

UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES

Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Charakterisierung der arrhythmogenen Substrate für Vorhofflimmern in einem neuen Rattenmodell für obstruktive Schlafapnoe

verfasst von

Benedikt Linz

24.02.2020

Doktorvater: Prof. Dr. Michael Böhm
Betreuer: Dr. Mathias Hohl und PD. Dr. Dr. Dominik Linz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Synopsis	7
2. Einleitung	11
2.1. Vorhofflimmern	11
2.1.1. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	12
2.1.2. Klinik des Vorhofflimmerns	14
2.1.2.1. Diagnostik	14
2.1.2.2. Therapie	16
2.2. Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern	17
2.2.1. Pathophysiologie der schlafbezogenen Atmungsstörungen	18
2.2.2. Klinik der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern	20
2.2.2.1. Diagnostik der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern	20
2.2.2.2. Therapie der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern	21
3. Fragestellung und Ziel der Arbeit	23
4. Methode und Material	25
4.1. Einführung in die Methode	25
4.2. Die Versuchsreihen	32
4.2.1. Akute Versuchsreihe	32
4.2.2. Akute Versuchsreihe inklusive Erholungsphase	33
4.2.3. Chronische Versuchsreihe	34
4.2.3.1. Terminalversuche	35
4.2.3.1.1. Elektrokardiogramm (EKG)	35
4.2.3.1.2. EKG unter transösophagealer Vorhofstimulation; Differenzierung der Vorhofflimmerdauer	36
4.2.3.1.3. Invasive linksventrikuläre Druckmessung	39
4.2.3.1.4. Sektion und Organentnahme	40
4.3. Biochemische und Histologische Analyse der Organe	40
4.3.1. Molekularbiologische Analysen	40
4.3.2. Histologie	45
4.4. Statistik	47
5. Ergebnisse	48
5.1. Validierung des Modells	48
5.2. Vorhof: Akute Versuchsreihen	56
5.3. Vorhof: Chronische Versuchsreihe	57
5.4. Übersicht der Ergebnisse	66

6. Diskussion	67
6.1. Validierung des Modells	67
6.2. Akute Effekte obstruktiv respiratorischer Ereignisse im Vorhof	70
6.3. Das arrhythmogene Substrat für Vorhofflimmern	70
6.4. Limitationen des Modells	74
6.5. Klinische Implikationen	75
7. Literaturverzeichnis	77
8. Publikationen	83
9. Curriculum vitae	86
10. Danksagung	88

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Pathogenese des Vorhofflimmerns: Substrat und Trigger; HTN=Hypertonus, OSA=obstruktive Schlafapnoe, MetS= metabolisches Syndrom	13
Abb. 2 A „Natural“ time course of AF; B Vorhofflimmern in Abhängigkeit seiner Komorbiditäten (AFNET registry) (Nabauer et al. 2009; Schotten et al. 2011).....	15
Abb. 3 Vier Pfeiler der Vorhofflimmertherapie (angelehnt an (Lau et al. 2017)).....	17
Abb. 4 Auswirkungen einer Okklusion der oberen Atemwege auf Herz, Thorax und intrathorakale Hämodynamik. Links: physiologischer Zustand. Rechts: Zustand bei Okklusion der oberen Atemwege (angelehnt an (Kasai and Bradley 2011; Linz et al. 2017; Linz et al. 2018b)) Legende: AP: Arteria pulmonalis, VP: Vena pulmonalis, LA: linkes Atrium, RA: rechtes Atrium, LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel, → Blutfluss, → Druck.....	19
Abb. 5 Score Sheet zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere	26
Abb. 6 Belastungsgrade 0-3	26
Abb. 7 1.) Sauerstoff (SpO ₂)-Infrarotsonde (links), 2.) Versuchstiermaske des Isofluranverneblers, 3.) Versuchstiermaske für IH-Manöver, 4.) Versuchstiermaske für INAP-Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	27
Abb. 8 Arbeitsplatz: Ratten unter Isoflurannarkose, an „Vismo PVM-2701k“ – Monitor angeschlossen	28
Abb. 9 „Vismo PVM-2701k“ – Monitoraufnahme: keine Intervention (links), während IH-/INAP-Manöver (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	28
Abb. 10 Versuchstiere unter Isoflurannarkose auf Heizkissen.....	28
Abb. 11 Atembemühungen einer spontan atmenden Ratte während eines IH-Manövers (links) und eines INAP-Manövers (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	30
Abb. 12 Druckmessgerät mit Induktivkontakt Typ 831 zur Applikation der INAP-Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	31
Abb. 13 Zeigerwerk: rot – Sollwert-Zeiger; schwarz – Istwert-Zeiger	31
Abb. 14 zeitliche Ablauf der Versuchsreihen ATS, ATS-REC und CTS. ATS Akute Testserie. ATS-REC Akute Testserie-Recovery. CTS Chronische Testserie.....	32
Abb. 15 Ratte während INAP-Manöver (links); Ratte während IH-Manöver (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	33
Abb. 16 periphere Blutdruckmessung am Rattenschwanz, „Tailcuff“-methode: Ratten in Versuchstierhaltern während der Messung	35
Abb. 17 Versuchstier an EKG angeschlossen; Aufnahme des EKG über die „Notocord hem evolution“ – Software. EKG Elektrokardiogram.	36
Abb. 18 EKG-Versuchsaufnahme: atriales „Capture“ und anschließende Salve an Erregungen.....	37
Abb. 19 EKG-Versuchsaufnahme: Sinusrhythmus (oben) und Vorhofflimmern (unten).....	38
Abb. 20 HSE Stimulator P Typ 201.....	39
Abb. 21 Einflussgrößen eines Reizes: Grundrhythmus G, Reizbreite B, Reizamplitude A.....	39
Abb. 22 Glutathionoxidation durch Einwirken von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (linker Schenkel) und Glutathionreduktion unter Opferung von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) (rechter Schenkel) 44	
Abb. 23 Atemfrequenzänderung nach je einer Minute Sauerstoff (O ₂), IH oder INAP. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	48
Abb. 24 Atembemühungen gemessen anhand der Druckfluktuationen zwischen Inspiration und Expiration in Millibar (mbar) während einminütiger Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	49
Abb. 25 ATS/ATS-REC: TaqMan-PCR Biomarker linker Ventrikel: Akute-Test-Serie (ATS) (CTR=10, IH=8, INAP=8) versus Akute-Test-Serie-Recovery (ATS-REC)(CTR=5, IH=5, INAP=5). Biomarker: ANP, BNP, Hif1 α , Hif2 α , CTGF in Relation zur Genexpression des Haushaltsenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	50
Abb. 26 CTS: TaqMan-PCR Biomarker linker Ventrikel. Biomarker: BNP (CTR=10, IH=9, INAP=9), Hif1 α (CTR=8, IH=9, INAP=7), Hif2 α (CTR=8, IH=10, INAP=7) in Relation zur Genexpression des Haushaltsenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	51
Abb. 27 CTS: größenadaptierte Herzgewichte als Quotient aus dem Herzgewicht [g] und der Tibialänge [cm] (CTR=9, IH=9, INAP=8).....	52
Abb. 28 Linker Ventrikel: histologische Beispielbilder der H.E.- Färbung. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	52
Abb. 29 CTS: Kardiomyozytendurchmesser linker Ventrikel (LV) (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“	53

Abb. 30 Linker Ventrikel: histologische Beispielbilder Pikro-Sirius-Rot Färbung. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	53
Abb. 31 CTS: Quantifizierung der interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV) (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	53
Abb. 32 CTS: Tailcuffauswertung	54
Abb. 33 CTS: intraventrikuläre Blutdruckmessung: LVESP – Left Ventricular Endsystolic Pressure, LVEDP – Left Ventricular Enddiastolic Pressure. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	55
Abb. 34 CTS: +/- dp/dt _{max/min} : maximale/minimale intraventrikuläre Druckerhöhungs-/Druckabfallgeschwindigkeit. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	55
Abb. 35 ATS/ATS-REC: Mittlere Sauerstoffsättigung ATS (CTR=9, IH=8, INAP=7) versus ATS-REC (CTR=5, IH=5, INAP=5). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	56
Abb. 36 ATS/ATS-REC: atriale antioxidative Kapazität: ATS (CTR=7, IH=8, INAP=8) versus ATS-REC (CTR=5, IH=5, INAP=5). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	57
Abb. 37 CTS: Mittlere Sauerstoffsättigungen (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	58
Abb. 38 CTS: atriale antioxidative Kapazität (CTR=8, IH=8, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	58
Abb. 39 CTS: Hypertrophie linker Vorhof: Beispielbilder, vierhundertfache Vergrößerung: von links nach rechts: CTR, IH, INAP. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	59
Abb. 40 CTS: Kardiomyozytendurchmesser linker Vorhof (CTR=9, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	60
Abb. 41 CTS: Kardiomyozytendurchmesser rechter Vorhof (CTR=9, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	60
Abb. 42 CTS: Interstitielle Fibrose linker Vorhof: Beispielbilder: von links nach rechts: CTR, IH, INAP. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	61
Abb. 43 CTS: Interstitielle Fibrose linker Vorhof (CTR=8, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	61
Abb. 44 CTS: Interstitielle Fibrose rechter Vorhof (CTR=8, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	62
Abb. 45 CTS: Korrelation Interstitielle Fibrose des linken Vorhofes und tGSH (CTR=8, IH=8, INAP=7). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	62
Abb. 46 CTS: Korrelation Interstitielle Fibrose des linken Vorhofes und Ratio GSH/GSSG (CTR=8, IH=8, INAP=7). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	63
Abb. 47 CTS: Immunhistologische Färbung des Connexin 43 im linken Vorhof (CTR=8, IH=8, INAP=7). Beispielbilder CTR und INAP (oben links), Referenzbeispielbild ohne Antikörper (no Ab, oben rechts). Auswertung der prozentualen Connexin 43 Expression in der immunhistologischen Färbung (unten). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	64
Abb. 48 CTS: Vorhofflimmerinduzierbarkeit in Prozent: VHF-Ereignisse/Anzahl der Stimulationen*100 (CTR=7, IH=8, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	64
Abb. 49 CTS: induzierbare Vorhofflimmerdauer nach transösophagealer Stimulation mittels des „HSE Stimulator P Typ 201“ (CTR=7, IH=8, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure”	65
Abb. 50 Dynamisches Substrat für Vorhofflimmern	72

Abkürzungsverzeichnis

+/- dP/dt	maximale/minimale Intraventrikuläre Druckerhöhung/ Druckabfallgeschwindigkeit
Abb.	Abbildung
AHI	Apnoe/Hypopnoe-Index
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AF	Atrial Fibrillation, englisch für Vorhofflimmern
ATS	Akute Testserie
ATS-REC	Akute Testserie-Recovery
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BNP	B-natriuretisches Peptid
BP	Blood Pressure, englisch für Blutdruck
CANPAP	Canadian Continuous Positive Airway Pressure for Patients with Central Sleep Apnea and Heart Failure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
cDNA	Complementary DNA, auch copy DNA genannt
CHA2DS2-VASc-Score	Score zur Ermittlung der oralen Antikoagulation: C = Congestive Heart Failure, H = Hypertension, A = Age ≥75 (doubled), D = Diabetes, S = Stroke (doubled), V = Vascular Disease, A = Age 65– 74, Sc = Sex Category (female)
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
CSA	Cheyne-Stokes-Atmung
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTR	Kontrolltiere
CTS	Chronische Testserie
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
Cx43	Connexin 43
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EEG	Elektroenzephalographie
EHRA-Score	Score zur Symptomschwere in Patienten mit VHF nach der European Heart Rhythm Association
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMG	Elektromyographie
EOG	Elektrookulographie
etc.	et cetera
g	Gramm
GSH	Glutathion, reduzierte Form (Monomer)
GSSG	Glutathion, oxidierte Form (Dimer)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hif	Hypoxie-induzierter Faktor
in vitro	„im Glas“
in vivo	„im lebenden“
IH	Intermittent Hypoxia, intermittierende Hypoxie
INAP	Intermittent Negative Airway Pressure; „Inverse CPAP“
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LVedP	Left Ventricular Enddiastolic Pressure (Linksventrikulärer Enddiastolischer Druck)
LVesP	Left Ventricular Endsystolic Pressure (Linksventrikulärer Endsystolischer Druck)

LVP	Left Ventricular Pressure (Linksventrikulärer Druck)
MAD	mittlerer arterieller Druck
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar, 1 mmol/l
mmHg	Torr, Millimeter Quecksilbersäule
mol	Maßeinheit der Stoffmenge
msec	Millisekunde
µm	Mikrometer
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nmol	Nanomol
NOAC	Non - Vitamin K – Antagonist Oral Anticoagulant
O ₂	Sauerstoff
OSA	Obstruktive Schlafapnoe
p	Signifikanzniveau p <0,05
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck im Blut
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Polygraphie
PSG	Polysomnographie
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleic Acid
RR	Riva-Rocci, Blutdruck
s	Sekunde
SAVE-Studie	Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints Study
SBAS	Schlafbezogene Atmungsstörungen
SERVE-HF	Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure
SEM	Standard Error of the Mean
SpO ₂	periphere Sauerstoffsättigung
SPRD	Sprague Dawley
TGFβ	Transforming Growth Factor β
tGSH	total Glutathion, Gesamtglutathion
U	atomare Masseneinheit
VKA	Vitamin K – Antagonisten
VHF	Vorhofflimmern
vs.	Versus
ZSA	Zentrale Schlafapnoe
z.B.	zum Beispiel

1. Synopsis

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Arrhythmie des Menschen und ist mit einer Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren und Komorbiditäten assoziiert. Eine dieser epidemiologisch eng vergesellschafteten Erkrankungen ist die obstruktive Schlafapnoe.

Pathognomonisch für diese schlafbezogene Atmungsstörung ist ein nächtlicher Kollaps der oberen Atemwege bei erhaltenem Atemantrieb. Dies führt einerseits zu einem Abfall des Sauerstoffgehaltes im Blut und andererseits zu ausgeprägten negativ thorakalen Druckschwankungen während frustraner Atembemühungen gegen verlegte obere Atemwege. Während der nächtlich obstruktiv respiratorischen Ereignisse wird der Vorhof somit sowohl erhöhten transmuralen Druckgradienten als auch intermittierender Hypoxieepisodes ausgesetzt. Die unterschiedlichen Rollen intermittierender Hypoxie und intrathorakaler Druckschwankungen sind besonders hinsichtlich einer möglichen Begünstigung für Arrhythmien bisher noch nicht ausreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es ein neues Rattenmodell für obstruktive Schlafapnoe zu entwickeln, um die Entstehung eines Schlafapnoe-assoziierten atrialen arrhythmogenen Substrates zu untersuchen. Zunächst sollten transiente, akut reversible Effekte intermittierender Hypoxieepisodes alleine, im Vergleich zu Hypoxieepisodes zusammen mit negativ thorakalen Druckschwankungen untersucht werden. Da obstruktive Schlafapnoe sich zumeist durch einen dynamischen Krankheitsverlauf mit einer hohen Nacht-zu-Nacht-Variabilität auszeichnet, sollte geklärt werden, ob die Akkumulation repetitiv akuter Effekte jeden zweiten Tag über drei Wochen zur Entstehung eines strukturellen und arrhythmogenen Substrates im Vorhof beiträgt.

In anästhesierten Ratten wurde hierfür für eine Minute entweder intermittierende Hypoxie (IH) alleine oder ein simuliert obstruktiv respiratorisches Ereignis induziert. Das Manöver der intermittierenden Hypoxie ist durch eine Vergrößerung des Totraumvolumens simuliert worden, das Manöver des simulierten obstruktiv respiratorischen Ereignisses hingegen durch die Anlage eines definierten negativen Druckes im Bereich der oberen Atemwege über eine Versuchsmaske (INAP, Intermittent Negative Airway Pressure).

Beide Manöver resultierten in einem vergleichbaren Abfall der Sauerstoffsättigung. Das INAP-Manöver zeichnete sich darüber hinaus durch negativ intrathorakale Druckschwankungen während ineffektiven Atembemühungen aus.

In einer akuten Testserie (ATS) wurden diese einminütigen Manöver alle fünf Minuten wiederholt. Nach vier Stunden wurden acht IH-Tiere und acht INAP-Tiere direkt und je fünf IH- und INAP- Tiere nach einer Erholungspause von 24 Stunden getötet (ATS-REC). In einer chronischen Testserie (CTS) wurden einminütige IH- oder INAP-Manöver alle zehn Minuten über vier Stunden jeden zweiten Tag appliziert. Nach drei Wochen wurden auch diese Tiere mit einer Latenz von 24 Stunden nach letztem Manöver getötet. In allen Versuchen wurden Ratten mit identischer Narkoseart und -dauer als Kontrollen (CTR) verwandt. In terminalen Versuchen wurden in allen Ratten invasive linksventrikuläre Druckmessungen

als auch transösophageale Vorhofstimulationen zur Induktion von Vorhofflimmern durchgeführt. Vorhofgewebe und Gewebe des linken Ventrikels wurden für histologische sowie biochemische Analysen asserviert.

Im Vorhof der ATS-behandelten Tiere führten vier Stunden repetitiver INAP-Manöver, nicht aber IH alleine, zu einem transienten Absinken der antioxidativen Kapazität im Vorhofgewebe. Dies war innerhalb von 24 Stunden nach einem Versuchstag in den ATS-REC Ratten sowie nach dem letzten Versuchstag in den CTS-Tieren komplett reversibel. In den CTS-Versuchstieren führte eine Applikation des INAP alle zwei Tage zu einer signifikanten Herabregulation von Connexinen und zu einer Tendenz zu erhöhter interstitieller Fibrose und vergrößerter Kardiomyozytendurchmesser im linken Vorhof. Diese Veränderungen waren mit signifikant längeren induzierbaren Vorhofflimmerzeiten in Ratten der INAP-Gruppe vergesellschaftet. Die induzierbaren Vorhofflimmerzeiten zeigten sich in den Tieren der IH-Gruppe nicht verlängert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Rattenmodell für Schlafapnoe zur Untersuchung der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrates entwickelt. Zusammenfassend führten in diesem Tiermodell vier Stunden simuliert obstruktiv respiratorischer Ereignisse im Sinne der INAP-Manöver, aber nicht IH alleine, zu einem transienten Abfall der antioxidativen Kapazität im Vorhof. Die kumulative Exposition gegenüber dieser transienten Abfälle der antioxidativen Kapazität war mit der Entstehung arrhythmogener Substrate im Vorhof assoziiert. Diese waren charakterisiert durch erniedrigte Connexinlevel und einer längeren induzierbaren Vorhofflimmerdauer.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die Anzahl obstruktiv respiratorischer Ereignisse während der Nacht und nicht die Anzahl der Sauerstoffentsättigungen alleine zum Substrat von Vorhofflimmern beitragen, selbst dann, wenn diese Stressoren nur jede zweite Nacht auftreten. Ob die gezielte Verhinderung obstruktiv respiratorischer Ereignisse das entscheidende Therapieziel bei Patienten mit Vorhofflimmern und obstruktiven Schlafapnoe darstellt, und ob eine Therapie der obstruktiven Schlafapnoe auch bei Patienten mit sehr hoher Tag-zu-Tag Variabilität des Schweregrades der obstruktiven Schlafapnoe nötig ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Englische Synopsis – English summary

Characterization of arrhythmogenic substrates for atrial fibrillation in a novel rat model for obstructive sleep apnea

Atrial fibrillation is the most common sustained arrhythmia and associated with a magnitude of cardiovascular comorbidities, one of which is obstructive sleep apnea. Obstructive sleep apnea is characterized by two main features: intermittent desaturations and inefficient breathing attempts against occluded upper airways leading to pronounced intrathoracic pressure fluctuations. Thus, the heart and especially the atria are exposed to intermittent hypoxia and repetitive stretch due to the thoracic pressure fluctuations. However, it remains to be elaborated how much these two individual features of sleep apnea contribute to an atrial arrhythmogenic substrate.

In this study we therefore established a novel rat model for sleep apnea, in which we investigated sleep apnea associated atrial arrhythmogenic substrates. Acute reversible effects of intermittent hypoxia were compared to intermittent hypoxia plus intrathoracic pressure fluctuations. In a chronic group, we investigated whether the accumulation of the acute reversible effects every other day throughout 3 weeks, in terms of a high night-to-night variability of sleep apnea, could induce a structural substrate for atrial fibrillation. In anesthetized rats, either one minute of intermittent hypoxia (IH) or a simulated obstructive respiratory event was simulated. Intermittent hypoxia was applied via an increase in respiratory dead space, whereas the obstructive respiratory event was simulated by applying intermittent negative airway pressure (INAP) with a negative pressure device via a customized rat mask.

Both maneuver resulted in comparable oxygen desaturations. Apart from that, the INAP-maneuver was characterized by negative thoracic pressure swings during ineffective breathing attempts.

In an acute test-series (ATS), maneuvers were applied for one minute which was repeated every five minutes. After four hours of protocol, eight IH- and INAP-rats were sacrificed immediately and five IH- and INAP-rats were sacrificed with a latency of 24 hours after the last maneuver (ATS-REC). In a chronic test series (CTS), IH and INAP was applied for one minute every ten minutes for four hours every second day. After three weeks, these animals were also sacrificed with a latency of 24 hours after the last maneuver. In all trials, rats with the same weight and anesthesia were used as respective controls. In a terminal procedure, left ventricular pressures and transesophageal atrial fibrillation inducibility and induced atrial fibrillation duration were determined. Atrial and ventricular tissue was harvested afterwards for histological and biochemical analysis.

In the ATS, four hours of repetitive INAP, but not IH alone, decreased transiently atrial antioxidative capacity, which was reversible after 24 hours of rest after the last maneuver in the ATS-REC and CTS. In CTS-rats, application of INAP every other day for three weeks, downregulated atrial connexins and showed a tendency towards increased atrial interstitial fibrosis and atrial hypertrophy. These changes were associated with increased induced atrial fibrillation durations in the INAP-group. The IH-group however did not show an increase in induced atrial fibrillation durations.

In summary, the cumulative exposure of acute transient decreases in atrial antioxidative capacity induced by simulated respiratory events (INAP) was associated with an atrial arrhythmogenic substrate. This was characterized by decreased levels of connexins and increased inducible atrial fibrillation durations.

This study supports the notion that the count of obstructive respiratory events at night and not simply the counts of desaturations are crucial and contribute to atrial arrhythmogenic substrates, even though those stimuli only occur every other night. If the targeted prevention of obstructive respiratory events and of a high night-to-night variability of sleep apnea in patients with atrial fibrillation is the main and most essential treatment strategy remains to be elaborated.

2. Einleitung

Zwischen schlafbezogenen Atmungsstörungen (SBAS) und Vorhofflimmern (VHF) besteht eine enge klinische und epidemiologische Verbindung (Kirchhof et al. 2016a). Besonders die obstruktive Schlafapnoe (OSA) als Hauptvertreter der SBAS bietet in ihren Pathomechanismen Faktoren, die die Entstehung von VHF begünstigen können. Im Folgenden soll daher vorerst die Pathophysiologie des VHF vorgestellt werden, um im Anschluss zu klären, inwiefern Krankheitsaspekte der OSA zu der Entstehung eines Substrates für VHF beitragen könnten.

Das Kapitel „2.2. Schlafbezogene Atmungsstörungen (SBAS) bei Vorhofflimmern“ ist bereits in adaptierter Form als Artikel in der Deutschen medizinischen Wochenschrift unter dem Titel „Update: Kardiovaskuläre Schlafmedizin“ von Benedikt Linz et al., mit mir als Erstautor veröffentlicht worden (Linz et al. 2017). Die Ergebnisse der vorgestellten Studie sind Teil eines Manuskriptes, welches bereits in einem internationalen „Peer-review“- Journal „eingereicht“ worden ist und derzeit unter Begutachtung steht.

2.1. Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Rhythmusstörung des Menschen. 2010 wurde die Prävalenz des VHF auf über 33 Millionen Patienten weltweit geschätzt mit steigender Tendenz für die kommenden Jahrzehnte (Chugh et al. 2014). Im globalen Vergleich scheint die Prävalenz sowie Inzidenz in entwickelten Ländern höher zu sein als in weniger entwickelten (Chugh et al. 2014; Colilla et al. 2013; Kirchhof et al. 2016a). Außerdem tritt VHF vermehrt bei älteren Patienten auf und die Prävalenz scheint proportional zur Anzahl gleichzeitig vorhandener Komorbiditäten wie z.B. Herzinsuffizienz, Hypertonie, Koronarer Herzerkrankung, Klappenerkrankungen, Adipositas, Schlafapnoe etc. zu sein (Maan et al. 2015; Zoni-Berisso et al. 2014). Die über die Jahre steigende Prävalenz des VHF kann jedoch auch als Resultat der stetig verbesserten Diagnostik sowie des höheren durchschnittlichen Lebensalters gewertet werden (Colilla et al. 2013; Kernan et al. 2014; Kirchhof et al. 2016a).

VHF ist durch eine sehr schnelle und unregelmäßige elektrische Aktivierung des Vorhofes charakterisiert. Frequenzen von bis zu 600 Schlägen pro Minute können im Vorhof während des VHF registriert werden. Aufgrund der schnellen Aktivierung des Vorhofes geht die koordinierte Kontraktilität des Vorhofes verloren. Dies erhöht das Risiko der Thrombenbildung im Vorhof und stellt somit einen relevanten Risikofaktor für Schlaganfall dar (Kernan et al. 2014). Ebenso kann VHF zu einer schnellen und unregelmäßigen Aktivierung im Ventrikel führen, was die häufigsten Symptome des VHF wie Palpationen und eingeschränkte Belastbarkeit erklärt. Darüber hinaus kann VHF zu der Entstehung einer Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz (Tachykardiomyopathie) beitragen (Martin and Lambiase 2017).

2.1.1. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Für die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF ist ein Trigger (Auslöser) und ein Substrat (elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen im Vorhof) notwendig.

Trigger

Früheinfallende atriale Extrasystolen stellen die häufigsten Trigger von VHF dar und entstehen häufig im Bereich des Übergangs des linken Vorhofes zu den Pulmonalvenen (Haissaguerre et al. 1998) (**Abb. 1**). Eine kathetergeführte Ablation im Sinne einer Pulmonalvenenisolation kann das Auftreten dieser Trigger verhindern und stellt somit eine effektive Behandlung des VHF dar (Kuck et al. 2016). Bei Patienten mit VHF finden sich darüber hinaus entscheidende Veränderungen des zellulären Calciumhaushaltes, die zu spontanen Calciumentladungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führen und somit Trigger des VHF unabhängig der Pulmonalvenen darstellen können.

Substrat

Während VHF kommt es zu elektrophysiologischen Veränderungen im Vorhof (elektrisches Remodelling), die insbesondere durch Veränderungen der Refraktärzeit charakterisiert sind. Bereits kurze VHF-Episoden sind in einem strukturell normalen Vorhof mit einer Verkürzung der atrialen Aktionspotentialdauer assoziiert (Wijffels et al. 1995), um eine Calciumüberladung der Vorhofmuskelzellen zu verhindern. Die daraus resultierende Verkürzung der atrialen Refraktärzeit kann die Entstehung von kreisenden Erregungen, sogenannte Re-Entry-Erregungen, begünstigen (Schotten et al. 2011) (**Abb. 1**). Im Gegensatz dazu, sind Herzinsuffizienz und andere strukturellen Erkrankungen mit einer Verminderung repolarisierender Kaliumströme und dadurch mit einer Verlängerung der atrialen Refraktärzeit vergesellschaftet (Li et al. 1999; Li et al. 2000). Zu lange Refraktärzeiten können zur Entstehung von frühen Nachdepolarisationen („early afterdepolarisation“, EAD) und späte Nachdepolarisationen („delayed afterdepolarisation“, DAD) führen und so proarrhythmisch wirken.

Verschiedene hämodynamische (z.B. Volumen- und Drucküberladung des Vorhofes (Schotten et al. 2011)) sowie neurohumorale Faktoren (z.B. Aktivierung des autonomen Nervensystems oder des Renin-Angiotensin System (Ehrlich et al. 2006; Linz et al. 2014b)) können zu einer Aktivierung von Fibroblasten und so zu einer vermehrten Produktion des kollagenen Bindegewebes und einer Zunahme der extrazellulären Matrix im Vorhof führen (strukturelles Remodelling, **Abb.1** Pathogenese des Vorhofflimmerns) (Nattel 2017). Dies kann so zur Entstehung eines progressiven atrialen Remodelling-Prozesses (atriale Kardiomyopathie) beitragen. Die entstehende Fibrose sowie die ebenfalls durch atriale Belastung entstehende Myokardhypertrophie können eine wesentliche Hürde für eine physiologische Fortleitung der elektrischen Aktivierung zwischen den Kardiomyozyten im Vorhof bilden. Folge dieser Veränderungen können lokale Fortleitungsstörungen und alternative Leitungswege in der Konduktion des Reizes sein, die in kreisenden Erregungen (Re-Entrys) resultieren, die wiederum die Entstehung sowie die Aufrechterhaltung von Arrhythmien begünstigen (Allessie et al. 2010)(**Abb.1**). Eine Begrifflichkeit, die der anschaulichen Erklärung dieser Arrhythmieentstehung dienlich sein kann, ist die

Theorie der Anisotropie. Die Anisotropie beschreibt die inhomogene Erregungsausbreitung in verschiedene Richtungen im Myokard in Abhängigkeit der myokardialen strukturellen Eigenschaften, zu denen vorwiegend Zellgeometrie, Zellgröße, Extrazellulärmatrix und Zell-Zell-Interaktionen zählen (Kleber and Rudy 2004). Wie zuvor beschrieben, stellen sich bei Druckbelastung des Myokards auf Dauer pathophysiologische Kompensationsmechanismen ein, die die myokardialen Eigenschaften über Fibroseformation und Hypertrophie verändern. Dies kann zu einer pathologisch veränderten Anisotropie beitragen und Ursache für Arrhythmien sein. Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonus, Übergewicht, Diabetes, und Alter sind mit fortschreitenden strukturellen Veränderungen (strukturelles Remodelling) im Vorhof assoziiert und tragen zur Progression des Substrates für VHF bei (Hayashi et al. 2002; Hohl et al. 2017; Lau et al. 2013; Linz et al. 2016c; Nabauer et al. 2009).

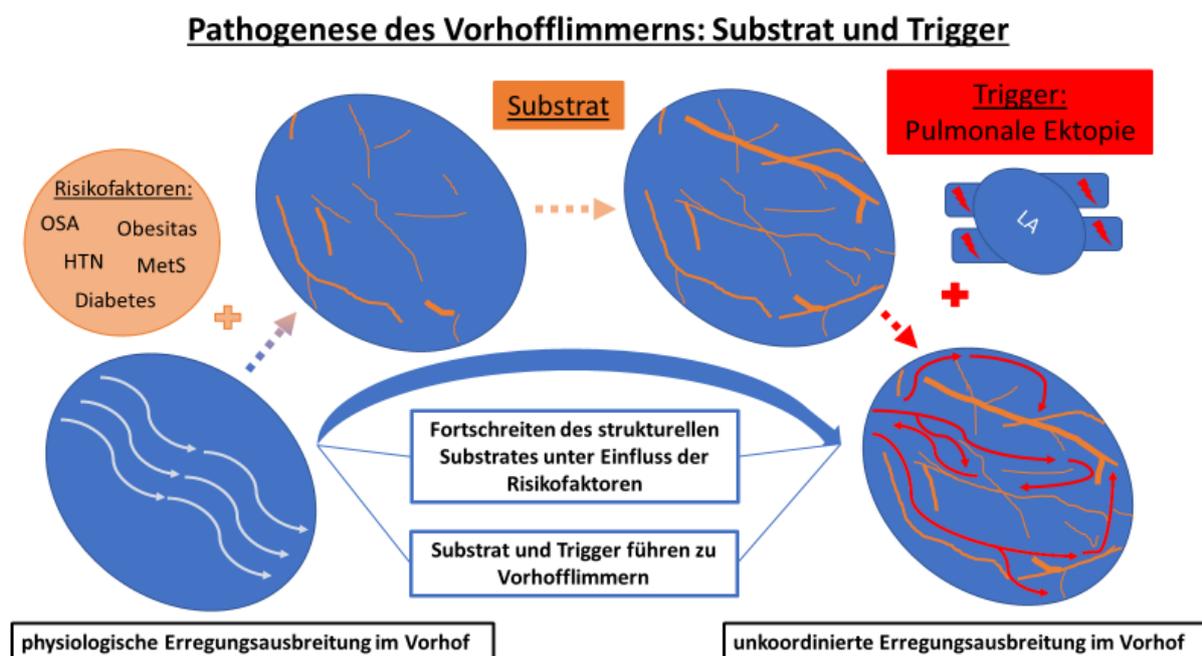


Abb. 1 Pathogenese des Vorhofflimmerns: Substrat und Trigger; HTN=Hypertonus, OSA=obstruktive Schlafapnoe, MetS=metabolisches Syndrom

Betrachtet man die hier vorgestellten pathophysiologischen Veränderungen, die zu VHF beitragen können, ist anzumerken, dass zumeist ein Zusammenwirken der Faktoren die plausibelste Erklärung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF ist. So können multiple kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einem Fortschreiten der beschriebenen strukturellen Veränderungen im Vorhof führen. Das progressive Substrat führt zu einem stetig ansteigenden VHF-Risiko und so zu einer Senkung der individuellen Schwelle für Arrhythmien. Ein Trigger, der wie oben erwähnt, eine atriale Extrasystole sein kann, kann bei gleichzeitig vorhandenem arrhythmogenem Substrat und erniedrigter VHF-Schwelle zu anhaltendem VHF führen.

2.1.2. Klinik des Vorhofflimmerns

Die Symptome eines Patienten mit VHF können sich sehr heterogen präsentieren. Das kann von Symptomfreiheit bis zu Beschwerden wie Palpitationen, Dyspnoe, Lethargie, Schlafstörungen, Angina pectoris etc. reichen und einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität haben (Steg et al. 2012; Thrall et al. 2006; Xiong et al. 2015). Klinisch kann der Schweregrad der Symptome über den EHRA-Score quantifiziert werden. Dieser Score der European Heart Rhythm Association gliedert die Symptome in die Schweregrade: 1 = keine Symptome („none“), 2a = milde Symptome („mild“): normale Tagesaktivität nicht beeinflusst durch VHF, 2b = moderate Symptome („moderat“): normale Tagesaktivität nicht beeinflusst durch VHF, aber Patient klagt über Symptome, 3 = schwerwiegende Symptome („severe“): normale Tagesaktivität ist beeinflusst durch VHF, 4 = schwer einschränkende Symptome („disabling“): normale Tagesaktivität nicht mehr ausführbar.

Der Score soll als Entscheidungshilfe einer symptom-orientierten Behandlung und zur longitudinalen Profilverlaufskontrolle des Patienten mit VHF dienen (Kirchhof et al. 2016a; Wynn et al. 2014).

2.1.2.1. Diagnostik

Für die Diagnosestellung von VHF bedarf es neben einer ausführlichen Anamnese und einer körperlichen Untersuchung eines Elektrokardiogramms. Episoden über mindestens 30 Sekunden gelten nach allgemein geltender Konvention als diagnostisch. Typisch für VHF im Elektrokardiogramm (EKG) sind unregelmäßige Intervalle zwischen den QRS-Komplexen, die die Aktivierung der Herzkammer widerspiegeln, und die Abwesenheit einer klar erkennbaren P-Welle, die die physiologische elektrische Aktivierung des Vorhofes darstellt. Je nach Häufigkeit und Dauer des Auftretens wird das VHF klinisch in paroxysmal, persistierend und permanent klassifiziert. Wohingegen das paroxysmale VHF spontan zu einem Sinusrhythmus innerhalb von 48 Stunden bis sieben Tagen konvertiert, kann das persistierende VHF länger als sieben Tage andauern. Es kann entweder spontan oder mittels einer pharmakologischen oder elektrischen Kardioversion konvertieren. Das permanente VHF lässt sich weder durch Kardioversion noch durch andere Strategien der Rhythmuskontrolle in den Sinusrhythmus konvertieren. Zwischen dem permanenten und dem persistierenden VHF befindet sich in der Regel noch das langanhaltende persistierende VHF. Es stellt ein kontinuierliches VHF über ein Jahr dar bevor eine Entscheidung bezüglich der Rhythmuskontrolle gefällt wird (Kirchhof et al. 2016a).

Vorhofflimmern: eine progressive Arrhythmie

Wie die klinische Einteilung bereits vermuten lässt, ist VHF keine stabile und starre, sondern eine progressive und dynamische Rhythmusstörung. Das heißt, dass viele Patienten nach der Detektion des VHF die einzelnen Stadien von paroxysmal bis permanent in unterschiedlicher Geschwindigkeit in Abhängigkeit ihrer Grunderkrankungen und Komorbiditäten durchlaufen oder zwischen den klassifizierenden Stadien springen (Nabauer et al. 2009; Schotten et al. 2011).

Abbildung 2 A spiegelt die Progression des VHF in einem repräsentativen Patienten mit VHF wider („Natural“ time course of AF)(Schotten et al. 2011). Der Zeitstrahl demonstriert in grau die Phasen des Patienten im Sinusrhythmus und in schwarz die Phasen im VHF. Nach der ersten Diagnose treten initial kurze paroxysmale VHF-Episoden auf, die konsequent länger und häufiger werden. Die Blitze stellen Kardioversionen als akute therapeutische Intervention dar, die ein zumeist nur eine temporäre Konversion des VHF zu Sinusrhythmus bewirken können. Schlussendlich gehen einige Patienten in ein permanentes VHF über. **Abbildung 2 B** präsentiert die Verteilung der unterschiedlichen VHF-Stadien in Abhängigkeit der Anzahl der Komorbiditäten aus dem Zentralregister der „German Competence NETwork on Atrial Fibrillation (AFNET)(Nabauer et al. 2009). Zu sehen ist hier eine kontinuierliche Zunahme des prozentualen Anteils des permanenten VHF mit steigender Anzahl der Komorbiditäten, zu denen in dieser Studie Alter, Hypertonie, Diabetes, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Klappenerkrankungen und -ersatz gezählt wurden. Mit jeder hinzukommenden Komorbidität werden paroxysmale Episoden seltener, wohingegen das persistierende VHF nahezu gleich bleibt, was suggeriert, dass dieses Stadium als Übergangsstadium zu permanentem VHF gewertet werden kann (Schotten et al. 2011). Die Progression des VHF von paroxysmalem, über persistierendem bis hin zum permanenten VHF scheint daher direkt von der Anzahl und dem Ausmaß der gleichzeitig vorhandenen kardiovaskulären Risikofaktoren abhängig zu sein.

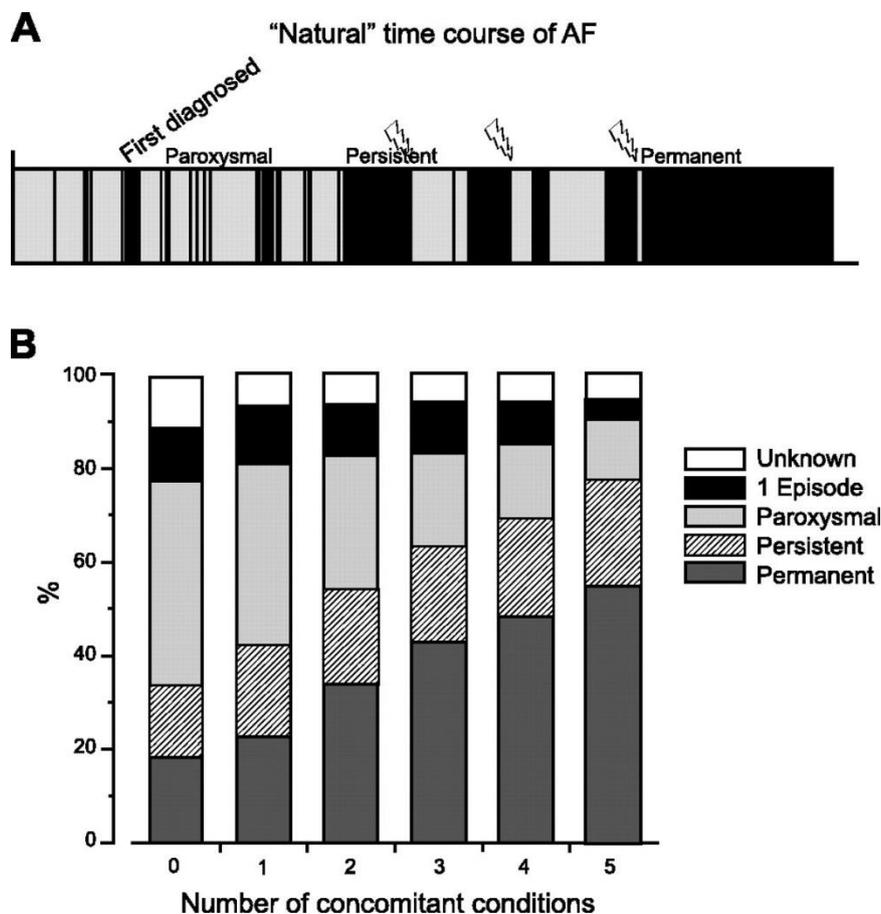


Abb. 2 A „Natural“ time course of AF; B Vorhofflimmern in Abhängigkeit seiner Komorbiditäten (AFNET registry) (Nabauer et al. 2009; Schotten et al. 2011)

2.1.2.2. Therapie

Eine rechtzeitige Diagnosestellung des VHF und frühe Therapieabwägung ist wichtig, um unerwünschte Folgeschäden wie Schlaganfall oder verminderte linksventrikuläre Funktion zu verhindern. Die Therapie stützt sich daher auf grundlegende Pfeiler (Lau et al. 2017).

Zur Symptomkontrolle stehen sowohl die Strategie der Rhythmus- als auch der Frequenzkontrolle bei VHF zur Verfügung. Das Ziel einer Rhythmuskontrolle ist den Sinusrhythmus zu stabilisieren und VHF-Episoden durch pharmakologische antiarrhythmische Therapie (z.B. Amiodaron, Sotalol oder Flecainid) oder kathetergeführte Pulmonalvenenisolation zu reduzieren. Als Alternative kann durch die Gabe negativ dromotroper Medikamente wie Beta-Blocker, Calcium-antagonisten oder Herzglykosiden eine Frequenzkontrolle angestrebt werden, um die ventrikuläre Frequenz und so die Symptome wie Palpitationen zu reduzieren und die Entstehung einer Tachykardiomyopathie zu verhindern. Entsprechend der Ergebnisse der AFFIRM Studie (Atrial Fibrillation Follow-Up Investigation of Rhythm Management Trial) scheinen diese beiden Therapiestrategien hinsichtlich des Langzeitüberlebens vergleichbar zu sein (Wyse et al. 2002). Jedoch war bei Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz und VHF in der CASTLE-AF Studie (Catheter Ablation versus Standard conventional Treatment in patients with Left ventricular dysfunction and Atrial Fibrillation trial) eine Rhythmuskontrolle durch Pulmonalvenenisolation mit einem besseren Überleben assoziiert, wahrscheinlich bedingt durch Reduktion der Tachykardiomyopathie (Marrouche et al. 2018). Ob eine kathetergeführte Rhythmuskontrolle einer antiarrhythmischen pharmakologischen Therapie überlegen ist, wurde in der CABANA Studie (The Catheter Ablation versus Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation trial) untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00911508) (Packer et al. 2018). Die „Per-protocol“-Analysen ergaben keinen Unterschied zwischen kathetergeführten und medikamentösen Rhythmuskontrolle hinsichtlich der primären Endpunkte (Allursächliche Mortalität, Schlaganfall, schwerwiegende Blutung, Herzstillstand). Jedoch bleibt bei der Interpretation der Studie zu beachten, dass die Rate an primären Endpunkten geringer war als angenommen und dass der Effekt der kathetergeführten Rhythmuskontrolle möglicherweise durch einen nicht zu vermeidenden Behandlungs-„Crossover“ beeinträchtigt war (Mark et al. 2019).

Weiterhin soll bei Patienten mit VHF ermittelt werden, ob eine Antikoagulation vorgenommen werden soll und somit eine suffiziente Schlaganfallprophylaxe erreicht wird (Kirchhof et al. 2013). Der CHA₂DS₂-VASc-Score bietet hier eine orientierende Entscheidungshilfe. Das Akronym CHA₂DS₂-VASc steht für: C = Congestive Heart Failure, H = Hypertension, A = Age ≥ 75 (doppelt), D = Diabetes, S = Stroke (doppelt), V = Vascular Disease, A = Age 65–74, Sc = Sex Category (weiblich). Patienten erhalten für jedes Merkmal, das sie erfüllen einen Punkt, ausgenommen „Age ≥ 75 “ und „Stroke“, für welche sie je zwei Punkte erhalten. Bei Patienten mit einem CHA₂DS₂-VASc-Score von mindestens 2 soll eine Antikoagulation eingeleitet werden. Die Antikoagulation, sofern erforderlich, soll mit einem

Vitamin K – Antagonisten (VKA) oder einem non-vitamin K – antagonist oral anticoagulant (NOAC) erfolgen (Lip et al. 2010).

Auf längere Sicht sollen Grunderkrankungen und Komorbiditäten, die bei der Entstehung von VHF beteiligt sein können, aufgedeckt und Lebensstiländerungen vorgenommen werden, um ein allgemein reduziertes kardiovaskuläres Risiko zu erreichen. Zu diesen ursächlichen Erkrankungen und Komorbiditäten können zählen: genetische Prädispositionen, Alter, Hypertonus, Klappenerkrankungen, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, Obesitas, Diabetes mellitus, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), chronische Nierenerkrankungen, Rauchen, Alkoholkonsum und obstruktive Schlafapnoe (Lau et al. 2017). Gemäß diesen Empfehlungen zur Einschränkung der Risikofaktoren wird in der Literatur von dem „forth pillar of atrial fibrillation care“ (vierten Pfeiler der VHF-Therapie) gesprochen, die als Ergänzung neben der Antikoagulation, der Rhythmuskontrolle und der Frequenzkontrolle unabdingbar in der multimodalen VHF-Therapie ist. Eine grundlegende Aufklärung des Patienten über die Erkrankung, Folgen, Therapie und Einfluss des eigenen Handelns stellt das stabilisierende „Dach“ dieser vier Pfeiler der VHF-Therapie dar (**Abb. 3**).

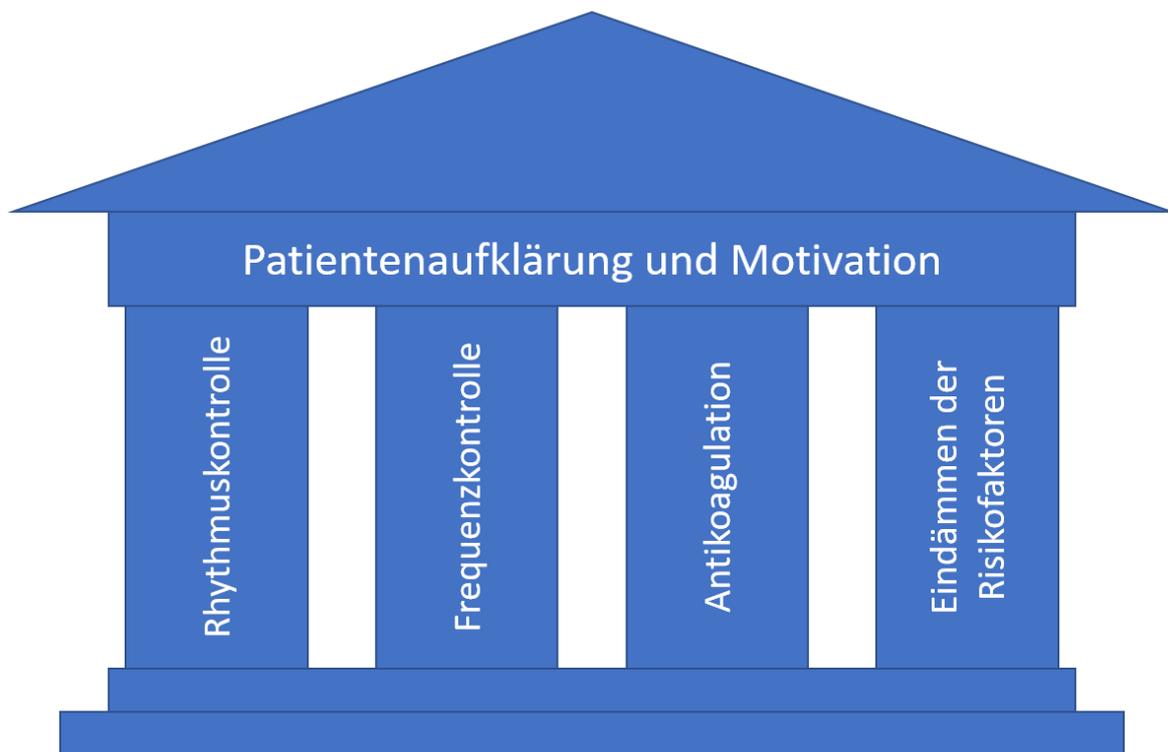


Abb. 3 Vier Pfeiler der Vorhofflimmertherapie (angelehnt an (Lau et al. 2017))

2.2. Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern

Bei Patienten mit Vorhofflimmern stellt die obstruktive Schlafapnoe einen häufigen modifizierbaren Risikofaktor dar. Epidemiologische Daten zeigen eine enge Verbindung zwischen VHF und

schlafbezogenen Atmungsstörungen (SBAS). Hierunter ist besonders die obstruktive Schlafapnoe eine wichtige Komorbidität des VHF, die in bis zu 60% aller Patienten mit VHF diagnostiziert werden kann (Stevenson et al. 2008). Auch im klinischen Alltag ist die Koexistenz beider Erkrankungen von prognostischer Bedeutung. Das Vorhandensein einer OSA bei einem Patienten mit VHF verringert die Wahrscheinlichkeit des medikamentösen Therapieerfolges. Darüber hinaus erhöht eine OSA-Diagnose die Rückfallrate nach erfolgter Kardioversion und/oder Katheterablation von VHF (Heinzer et al. 2015; Li et al. 2014; Ng et al. 2011; Qureshi et al. 2015; Stevenson et al. 2008; Strotmann et al. 2018).

2.2.1. Pathophysiologie der schlafbezogenen Atmungsstörungen

Die Pathophysiologie der schlafbezogenen Atmungsstörungen ist Resultat eines Zusammenwirkens dreier wesentlichen Systeme: Atemregulation, Schlaf und kardiovaskuläres System (Kasai et al. 2012; Linz et al. 2017). Im Allgemeinen unterscheidet man bei der SBAS zwischen zentraler und obstruktiver Schlafapnoe. Während sich eine zentrale Schlafapnoe durch eine Dysregulation des Atemzentrums auszeichnet, manifestiert sich eine obstruktive Schlafapnoe durch eine Verlegung der oberen Atemwege (Dempsey et al. 2010; Linz et al. 2017).

Obstruktive Schlafapnoe

Bei der obstruktiven Schlafapnoe ergeben sich einige Faktoren, die die Pathogenese des VHF prädisponieren können. Darunter zählen insbesondere negativ thorakale Druckschwankungen, intermittierende Hypoxie und kombinierte sympatho-vagale Aktivierung (Linz et al. 2018b).

Während einer obstruktiven Apnoe kommt es während des Schlafes durch einen Tonusverlust der Pharynxmuskulatur oder aufgrund individueller Anatomie des Pharynx zu einer repetitiven Verlegung der oberen Atemwege. Frustrane Atembemühungen gegen die verlegten oberen Atemwege führen nicht nur zu Hypoxie und Hyperkapnie, sondern auch zu einem Aufbau eines intrathorakalen Unterdrucks während eines ineffektiven Inspirationsversuchs (Linz et al. 2017; Ryan and Bradley 2005). Somit können bei Patienten während obstruktiver respiratorischer Ereignisse intrathorakale Unterdrücke von bis zu -80 mmHg auftreten (Linz and Arzt 2015), die den transkardialen Druckgradienten erhöhen und folglich am gesamten Myokard zerren und sich am stärksten auf das dünnwandige Myokard der Vorhöfe auswirken. Hinzu kommt, dass diese Drücke zu einer Zunahme des venösen Rückstroms und somit zu einem Anstieg der rechts-atrialen und rechts-ventrikulären Vorlast führen. Das Zusammenwirken von gesteigerter Vorlast und intrathorakalem Unterdruck verschiebt in der Diastole das Septum in Richtung des linken Ventrikels. Dies hat zur Folge, dass ein erhöhter linksventrikulärer Druckgradient aufgebaut wird und dies in erhöhter Nachlast resultiert. Darüber hinaus beeinflusst der steigende Druck im rechten Ventrikel die diastolische Füllung des linken Ventrikels, wodurch der Druck im linken Vorhof ansteigt. Beide Vorhöfe sind also während jeder einzelnen Apnoe erhöhten Drücken ausgesetzt. Die reduzierte linksventrikuläre Füllung führt zu einer verringerten linksventrikulären Vorlast und Schlagvolumen. Simultan zu diesen Vorgängen konstringieren sich die Pulmonalgefäße durch den Hypoxiestimulus, den

der Körper bei insuffizienter Atmung erfährt. Die Vasokonstriktion führt zu einem vorübergehenden pulmonalen Hypertonus, der rückwirkend die Drücke im rechten Ventrikel weiter ansteigen lässt (Dempsey et al. 2010; Kasai and Bradley 2011; Linz et al. 2017) (**Abb. 4**).

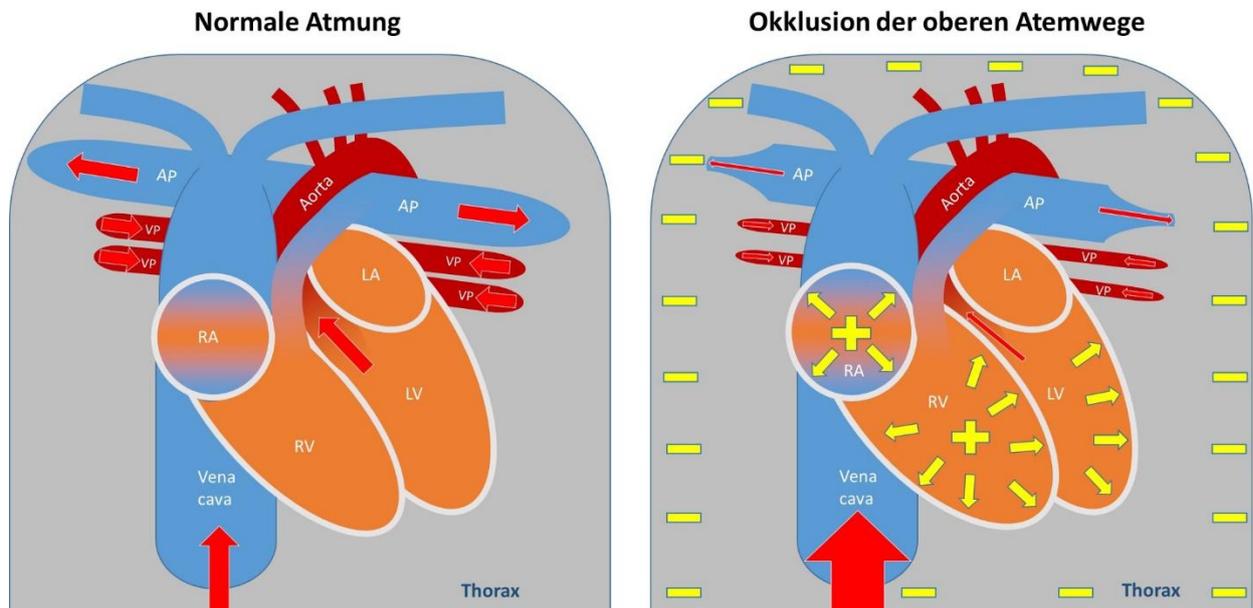


Abb. 4 Auswirkungen einer Okklusion der oberen Atemwege auf Herz, Thorax und intrathorakale Hämodynamik. Links: physiologischer Zustand. Rechts: Zustand bei Okklusion der oberen Atemwege (angelehnt an (Kasai and Bradley 2011; Linz et al. 2017; Linz et al. 2018b)) Legende: AP: Arteria pulmonalis, VP: Vena pulmonalis, LA: linkes Atrium, RA: rechtes Atrium, LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel, → Blutfluss, ↗ Druck.

Außer den Alterationen in der Hämodynamik und den rein mechanischen Veränderungen hat eine jede Apnoe komplexe Auswirkungen auf das autonome Nervensystem. Im Wesentlichen handelt es sich hier um eine kombinierte sympatho-vagale Aktivierung (Gammoudi et al. 2015; Linz et al. 2014a; Linz et al. 2011). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass sowohl der thorakale Unterdruck als auch die Hypoxie für diese autonome Reaktion verantwortlich sind (Linz et al. 2011). Die kombinierte autonome Aktivierung äußert sich unter anderem in einem postapnoeischen Blutdruckanstieg, der einen sympathischen Stimulus als Reaktion auf eine Aufweckreaktion (Arousal) gegen Ende der Apnoe darstellt. Diese Reaktion geht wider Erwarten nicht mit einer Tachykardie einher, sondern ist von einer Bradykardie begleitet, die die zusätzlich vagale Aktivierung widerspiegelt. Grundsätzlich führt eine obstruktive Apnoe, bestehend aus intrathorakalen Druckschwankungen und voranschreitender Asphyxie zur Aktivierung des sogenannten Tauchreflexes: Bradykardie (vagal), periphere Vasokonstriktion und Zentralisierung des Blutvolumens (sympathisch) (Linz and Arzt 2015).

Neben den aufgezeigten Pathomechanismen erfahren OSA-Patienten auf lange Sicht außer dem Einwirken einer chronischen Hypoxie, die für sich bereits zu kardialem Remodelling beitragen kann (Prabhakar and Semenza 2012), periodische Desoxy- und Reoxygenierung, die entscheidende pathophysiologische Wirkung zu haben. Dieser Vorgang ähnelt dem eines Ischämie- und Reperfusionsschadens, der eine vaskuläre Entzündungsreaktion hervorrufen, oxidativen Stress initiieren und Blutdrücke ansteigen lassen kann (Kohler and Stradling 2010; Linz et al. 2018b; Prabhakar and Semenza 2012).

Wenn man davon ausgeht, dass die beschriebenen Mechanismen nun repetitiv auf das Herz einwirken, wie es bei einem Patienten mit OSA der Fall ist, stellt sich die Frage, welche Effekte einzelne solcher Apnoen haben und ob es eine Schwelle gibt, ab wann sich bei persistierender Einwirkung der Apnoen strukturelle Veränderungen zeigen, die zur Entstehung eines arrhythmogenen Substrates beitragen können.

2.2.2. Klinik der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern

2.2.2.1. Diagnostik der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern

Aufgrund der aufgezeigten Assoziation einer OSA bei Patienten mit VHF ist eine zielgerichtete Diagnostik der OSA empfehlenswert, da sie entscheidenden Einfluss auf die Therapieführung und -gestaltung des VHF haben kann. Die aktuellen Leitlinien zur Therapie des Vorhofflimmerns der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie empfiehlt die Evaluation typischer OSA assoziierter Symptome bei jedem Patienten mit VHF (Mayer et al. 2017). Erster Schritt der Diagnostik sollte daher eine richtungsweisende Anamnese sein, die klassische schlafbezogene Symptome wie Nykturie, nächtliche Dyspnoe und pektanginöse Beschwerden während des Schlafes mit einbeziehen sollte. Fragebögen (Epworth Sleepiness Scale, Berlin Questionnaire etc.) können zur Skalierung und Erfassung der Symptome (Tagesschläfrigkeit, erhöhte Schlafneigung, Müdigkeit, Ein- und Durchschlafstörung) als Unterstützung dienen (Mayer et al. 2017). Zu erwähnen sei hierbei jedoch, dass besonders kardiologische Patienten oft nicht unter typischen Symptomen (z.B. Tagesschläfrigkeit) leiden. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere Patienten mit Herzinsuffizienz und VHF (Arzt et al. 2006; Linz and Arzt 2015). Bei Verdacht auf Vorliegen einer OSA sollte nun als weiterer Schritt eine ambulante kardiorespiratorische Polygraphie (PG) erfolgen, die Atembewegungen, Atemfluss, Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Körperlage während des Schlafes ermittelt (Berry et al. 2012). Die Einteilung der Schwere einer OSA stützt sich auf einen Index, der die durchschnittliche Anzahl der polygraphisch gemessenen Apnoen und/oder Hypopnoen pro Stunde Schlaf anzeigt (Apnoe/Hypopnoe-Index (AHI)). Aktuell ist der AHI der klinisch am breitesten etablierte und meist angewandte Parameter zur Graduierung des Schweregrades einer OSA (Corra et al. 2006):

- Leichtgradige OSA: AHI > 5/h
- Mittelgradige OSA: AHI ≥ 15/h - 30/h
- Schwergradige OSA: AHI ≥ 30/h

Sollte nach stattgehabter PG keine klare Aussage zu treffen sein, kann eine kardiorespiratorische Polysomnographie (PSG) im Schlaflabor erwogen werden, die außer der PG-Aufzeichnung eine Elektro-Enzephalographie (EEG), Elektromyographie (EMG), Elektrookulographie (EOG), eine Videoaufzeichnung und CO₂-Messung beinhaltet (Berry et al. 2012; Oldenburg et al. 2015).

Trotz der breiten klinischen Anwendung des AHI zur Schwereinteilung der OSA wurde und wird dieser regelmäßig in Frage gestellt. Studien zeigen, dass z.B. Hypertonus als eng assoziierte Erkrankung der OSA nach suffizienter AHI-Reduktion lediglich marginale Besserung zeigte (Iftikhar et al. 2014). Ein

Erklärungsansatz hierfür sei, dass die allgemein gültigen Definitionskriterien einer Apnoe oder Hypopnoe die eigentliche Erkrankungslast nur inadäquat beschreibt und die breite heterogene Masse an Apnoen nur unzureichend beschreibt (Khoshkish et al. 2018). Eine Apnoe ist als 90 prozentige Reduktion des nasalen Flusses über zehn Sekunden definiert, eine Hypopnoe als 30 prozentige Reduktion des nasalen Druckes über zehn Sekunden und einer Sauerstoffentsättigung von drei Prozent oder eines Arousals (Berry et al. 2012). Somit spiegelt die Anzahl der Apnoen z.B. nicht zwangsweise die individuelle Hypoxielast wider und stellt damit keinen guten Indikator für hypoxie-getriggerte Pathomechanismen dar (Linz et al. 2018a). Alternative Parameter, wie die Zeit, die unter 90 Prozent Sauerstoffsättigung verbracht wurden (T90) oder das Integral der Sauerstoffsättigungskurve über die Zeit, wurden vereinzelt an kleinen Kollektiven mit Erfolg angewandt, bedürfen zur allgemeinen Validierung jedoch noch weiterer großangelegter randomisierter Studien (Linz et al. 2018a).

Ein weiteres Problem, das in der Schweregraduierung der OSA aufkommt, ist eine hohe Nacht-zu-Nacht-Variabilität der OSA (Dzierzewski 2020; Linz et al. 2019). Diese Variabilität stellt die zeitliche Inkonstanz der Schwere der OSA von Nacht zu Nacht dar. Studien weisen darauf hin, dass gerade deshalb eine einzige nächtliche Polygraphie das Ausmaß und Schwere der OSA nicht angemessen widerspiegeln kann. Somit ist anzunehmen, dass nicht unbedingt ein konstantes sondern vielmehr ein dynamisches und variables Auftreten der OSA zur Pathogenese eines Substrates für verschiedene kardiovaskuläre Folgeerkrankungen beiträgt (Ahmadi et al. 2009; Maestri et al. 2011). Darüber hinaus ist dies auch ein Merkmal welches den Langzeitverlauf einer OSA als Risikofaktor für VHF entscheidend von anderen Risikofaktoren abtrennt, welche zumeist kontinuierlich vorhandenen sind und zu über die Zeit fortschreitenden strukturellen Veränderungen führen (Lau et al. 2017).

2.2.2.2. Therapie der schlafbezogenen Atmungsstörungen bei Vorhofflimmern

Basis der OSA-Therapie ist die Verhaltenstherapie. Eine suffiziente Gewichtsabnahme wirkt sich positiv auf die Entwicklung einer OSA und den verbundenen Komorbiditäten (Bluthochdruck, koronarer Herzerkrankung, metabolisches Syndrom) aus [34,38,39,40]. Ebenso ist eine Abstinenz hinsichtlich Alkohol- als auch Nikotinkonsum ratsam, da diese je ein Risikofaktor für die Entwicklung einer OSA zu sein scheinen (Choi et al. 2016; Trenchea et al. 2013). Kongruent gestaltet sich hier die Therapie mit der Verhaltenstherapie des VHF (Lau et al. 2017).

Außer der Verhaltenstherapie stehen verschiedene nächtliche Beatmungstherapien zur Wahl. Durch Anlage eines positiven Druckes im Rachenbereich wird der Kollaps der oberen Atemwege verhindert. Durch diese pneumatische Schienung der Atemwege kann das Auftreten von Apnoen und Hypopnoen verhindert und der OSA-Schweregrad durch Reduzierung des AHIs gesenkt werden. Zusätzlich kann durch adaptive Algorithmen eine Beatmung während zentraler Apnoen oder Hypopnoen getriggert werden. Sobald die Diagnostik abgeschlossen ist, sollte unter Betrachtung des Schweregrades und der Art der SBAS, der Symptome und der Komorbiditäten die Indikation zur Behandlung gestellt werden

(Mayer et al. 2017). Alternativtherapien können chirurgische Maßnahmen, mechanische Hilfsmittel (Unterkieferprotrusionsschienen, Rückenlageverhinderungswesten „Schnarchrucksäcke“) oder elektrische Geräte (Hypoglossusstimulation, Stimulation des Nervus Phrenicus) sein (Mayer et al. 2017). Da jedoch diese alternativen Therapieoptionen bisher noch nicht an einem kardiologischen Patientenkollektiv erprobt worden sind, können diese Optionen aktuell nicht empfohlen werden (Linz and Arzt 2015). Ebenso besteht momentan noch keine medikamentöse Therapie im Hinblick auf einen kurativen Therapieansatz der SBAS (Mason et al. 2013).

„Continuous positive airway pressure“ (CPAP)– Therapie

Die „continuous positive airway pressure“-Therapie (CPAP-Therapie) stellt momentan den Goldstandard zur Behandlung der OSA dar. Bei dieser Beatmungstherapie wird nachts über eine individuell angepasste Maske ein kontinuierlicher positiver Druck appliziert, der die Atemwege vor einem Kollabieren bewahren soll. Der Druck wird so angepasst, sodass eine durchschnittliche nächtliche Sauerstoffsättigung von mindestens 90% und ein AHI < 5 erreicht wird (Mayer et al. 2017; Oldenburg et al. 2015).

CPAP-Therapie bei obstruktiver Schlafapnoe und kardiovaskulären Erkrankungen

Die Therapie der OSA kann auf eine Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen Einfluss nehmen und trägt nachgewiesen zu einer Verbesserung der Lebensqualität bei (McEvoy et al. 2016).

Bei Patienten mit Hypertonus kann eine effektive CPAP-Therapie über Tage bzw. Wochen suffizient den Sympathikotonus mindern und somit zu einer Senkung des Blutdruckes bei Nacht sowie Tag beitragen (Liu et al. 2016; Narkiewicz et al. 1999). Trotz dieser positiven Effekte konnte in großen randomisierten Studien (SAVE = Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints Study) die CPAP-Therapie keine kardiovaskulären Endpunkte wie Tod jeglicher kardiovaskulärer Ursache, Herzinfarkt, Schlaganfall, Akutes Koronarsyndrom, Transiente Ischämische Attacke und Hospitalisation aufgrund dekompensierter Herzinsuffizienz verhindern (McEvoy et al. 2016).

Der Effekt einer CPAP-Therapie der OSA bei Patienten mit VHF wurde in mehreren observativen nicht-randomisierten Studien untersucht und in verschiedenen Meta-Analysen zusammengefasst (Qureshi et al. 2015; Shukla et al. 2015). CPAP kann die Rezidivrate nach antiarrhythmischer Intervention senken (Kanagala et al. 2003; Linz et al. 2015b). Studien weisen sogar darauf hin, dass bei OSA-Patienten eine CPAP-Therapie den gleichen Effekt auf VHF habe wie eine invasive kathetergeführte Pulmonalvenenisolation (Fein et al. 2013). Basierend auf diesen Daten wird aktuell in internationalen Leitlinien eine Therapie der OSA bei Patienten mit VHF zum Ziel der Rhythmuskontrolle und Erhaltung des Sinusrhythmus empfohlen (Kirchhof et al. 2016b).

3. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die arrhythmogenen Substrate für VHF bei OSA näher zu charakterisieren. Im Einzelnen sollten die akuten Einflüsse intermittierender Hypoxie und intermittierender Hypoxie in Kombination mit intrathorakalen Druckschwankungen auf das Herz verglichen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern die genannten kardialen Stressoren kumulativ jeden zweiten Tag über drei Wochen, als Simulation einer ausgeprägten Nacht-zu-Nacht-Variabilität einer OSA, zu einem strukturellen arrhythmogenen Substrat beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit:

- (1) wurde ein Rattenmodell zur Untersuchung der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrates entwickelt,
- (2) wurden transiente Effekte kurzzeitiger intermittierender Hypoxieepisoden alleine mit denen kombiniert hypoxisch und obstruktiv respiratorischer Ereignisse verglichen und
- (3) untersucht, ob eine simulierte Nacht-zu-Nacht-Variabilität einer OSA, im Sinne repetitiver Applikation akuter Effekte kumulativ jeden zweiten Tag über drei Wochen zur Entstehung struktureller und arrhythmogener Substrate im Vorhof beiträgt.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, entwickelten wir ein neues Rattenmodell für Schlafapnoe. Hierfür wurden bei sedierten Ratten entweder rein hypoxische oder kombiniert obstruktiv respiratorische und hypoxische Manöver appliziert. Die intermittierende Hypoxie alleine wurde durch eine Vergrößerung des Totraumvolumens (IH, intermittierende Hypoxie) induziert, wodurch die Ratten bei offenen Atemwegen durch Rückatmung entsättigten. Das obstruktiv respiratorische Ereignis wurde durch die Anlage eines definierten negativen Druckes im Bereich der oberen Atemwege über eine Versuchsmaske (INAP, Intermittent Negative Airway Pressure) induziert, sodass im Sinne einer inversen CPAP-Therapie, diese zu einem Kollaps der oberen Atemwege führte und durch eine vergleichbare Hypoxie in Verbindung mit negativ intrathorakalen Druckschwankungen während der ineffektiven Atembemühungen charakterisiert war. Diese Manöver wurden bei Ratten in zwei akuten (ATS, ATS-REC) und einer chronischen Versuchsreihe (CTS) durchgeführt.

Um das zu untersuchende Substrat für VHF umfassend zu charakterisieren, wurden an Gewebe des linken Ventrikels und der Vorhöfe histologische und biochemische Analysen durchgeführt, die Hinweise auf profibrotische sowie hypertrophe Veränderungen liefern sollten. Im Einzelnen wurde als profibrotischer und redox-sensitiver Marker der Connective Tissue Growth Factor (CTGF) gewählt, der sich als Parameter in der Entstehungskaskade kardialer Fibrose, besonders in Zusammenhang mit der Entwicklung von VHF bewährt hat (Park et al. 2001; Thanigaimani et al. 2017). Da die Pathophysiologie der OSA Hinweise auf myokardiale Druckbelastung gibt, wurden ebenso ANP und BNP als Parameter bestimmt, die die kardiale Dehnung widerspiegeln (Fu et al. 2018). Als Ausmaß des naheliegenden oxidativen Stresses, der ebenso auf die Entstehung eines strukturellen Substrates einwirken kann sind

HIF1/2 und Glutathion als Parameter der zellulären Unterversorgung mit Sauerstoff bestimmt worden (Prabhakar and Semenza 2012). Histologische Untersuchungen sollten in diesem Sinne ebenfalls aus den genannten Geweben das Ausmaß der Fibrose, der Hypertrophie und verminderter interzellulärer Konnektivität darlegen.

Der Blutdruck wurde nicht-invasiv mittels einer Tailcuff-Messung in Terminalversuchen gemessen. Invasive linksventrikuläre Druckmessungen sollten Aufschluss über eventuelle Leistungseinschränkungen des Herzens geben. Ebenso wurde in diesen Terminalversuchen via einer ösophagealen Stimulationselektrode VHF induziert.

Die in vitro und in vivo gemessenen Daten wurden abschließend zusammengeführt, um das gesamte Bild und die neuen Einblicke in die Pathophysiologie der obstruktiven Schlafapnoe als Ursache eines arrhythmogenen Substrates besser zu verstehen.

4. Methode und Material

4.1. Einführung in die Methode

In unserem neuen Rattenmodell wurde der unterschiedliche Einfluss intermittierender Hypoxie per se durch eine Vergrößerung des Totraumvolumens (IH) im Vergleich zu kombinierten obstruktiv respiratorischen und hypoxischen Ereignissen durch die Anlage eines definierten negativen Druckes im Bereich der oberen Atemwege (INAP) untersucht. Darüber hinaus wurde Augenmerk auf mögliche Langzeitfolgen gelegt, wofür eine akute Versuchsreihe (ATS) einer chronischen (CTS) gegenübergestellt wurde. Bezüglich einer möglichen Reversibilität der akuten Ereignisse wurde zusätzlich eine gesonderte akute Versuchsreihe mit Erholungsphase (ATS-REC) vor der Organentnahme etabliert.

Versuchstiere

Für alle Versuche wurden gesunde, männliche, neun bis zehn Wochen alte Sprague Dawley Ratten (SPRD, Charles River; Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in Zweiergruppen in den Räumen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg gehalten und mit Trinkwasser und handelsüblichem Trockenfutter für Nagetiere versorgt (Haltungsdiät #1324; Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland).

Das Tierversuchsvorhaben „Einfluss des obstruktiven Schlafapnoe Syndroms auf die ventrikuläre Hämodynamik und das kardiale Remodeling“ wurde vom saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz unter dem Aktenzeichen #18/2014 genehmigt.

Der Gesundheitszustand der Ratten wurde mittels eines Score-Sheets (**Abb. 5**) vor Versuchsbeginn stets festgehalten und protokolliert. Dieses Protokoll bewertet das Versuchstier zu Beginn eines jeden Versuchstages in Hinsicht auf Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, klinischer Befund (Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur, etc.) und eventuell erfolgter Maßnahmen (z.B. Schmerzmittelgabe).

Score Sheet: Belastungszustände beim Tier erkennen und bewerten

Tiernummer:						
Datum:						
Punkte- wertung	0	1	5	10	20	
Körper- gewicht [g]	Unbeeinflusst oder Anstieg	Abfall um < 5 %	Abfall um 5 – 10 %	Abfall um 11- 20 %	Abfall um > 20 %	
Allgemein- zustand	Fell glatt, glänzend, Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend	Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege)	Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb, eingesunken erhöhter Muskeltonus	Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnatürliche Körperhaltung, Augen trüb, eingesunken, hoher Muskeltonus	Verkrampfung, Lähmungserschei- nungen, Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an	
Spontan- verhalten	Normales Verhalten (Schlafen, Neugier, Sozialkontakte, Reaktion auf Berührung)	Geringe Abweichungen vom Normalverhalten	Ungewöhnliches Verhalten, z.B. eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	Selbstisolation, Lethargie ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien, Koordinationsstörungen	Schmerzlaute beim Er-, Eingreifen, Automutilation, keine Reaktion beim Ergreifen	
Klinischer Befund	Puls, Atmung, Temperatur normal, Extremitäten warm, Schleimhäute durchblutet	Geringe Abweichungen von der Normalsituation		Temperaturabweichung +/- 1-2 °C, Atmung und Puls deutlich erhöht (+30%), Krämpfe, Zittern	Temperaturabweichung > 2 °C, Atmung und Puls +/- 50 %	
Maßnahmen	Gabe von Schmerzmittel, erneutes Verschliessen der Naht etc.					
Gesamtpunktzahl						

Abb. 5 Score Sheet zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere

Nach Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes ergibt sich eine Punktesumme, die den Belastungsgrad des Tieres widerspiegelt.

- Punktesumme 0: Belastungsgrad 0 = keine Belastung
- Punktesumme 1-9: Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten
- Punktesumme 10-19: Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung, ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie), ggf. Tierschutzbeauftragten und Leiter des Versuchsvorhabens informieren
- Punktesumme \geq 20: Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung, Tierschutzbeauftragten und Leiter konsultieren, medizinische Versorgung einleiten, ggf. sofort den Versuch abbrechen und das Tier einschläfern

Abb. 6 Belastungsgrade 0-3

Während der Versuche waren die Ratten durchgehend an einen „Vismo PVM-2701k“ – Monitor (Nihon Kohden Tokyo, Japan) angeschlossen, was eine kontinuierliche Überwachung der Vitalfunktionen

ermöglichte. Eine SpO₂-Infrarotsonde (#P203C; Nihon Kohden Tokyo, Japan) (**Abb. 8**) wurde am Fuß der Ratte angebracht, um Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung über den „Vismo PVM-2701k“ – Monitor (Nihon Kohden Tokyo, Japan) zu registrieren.

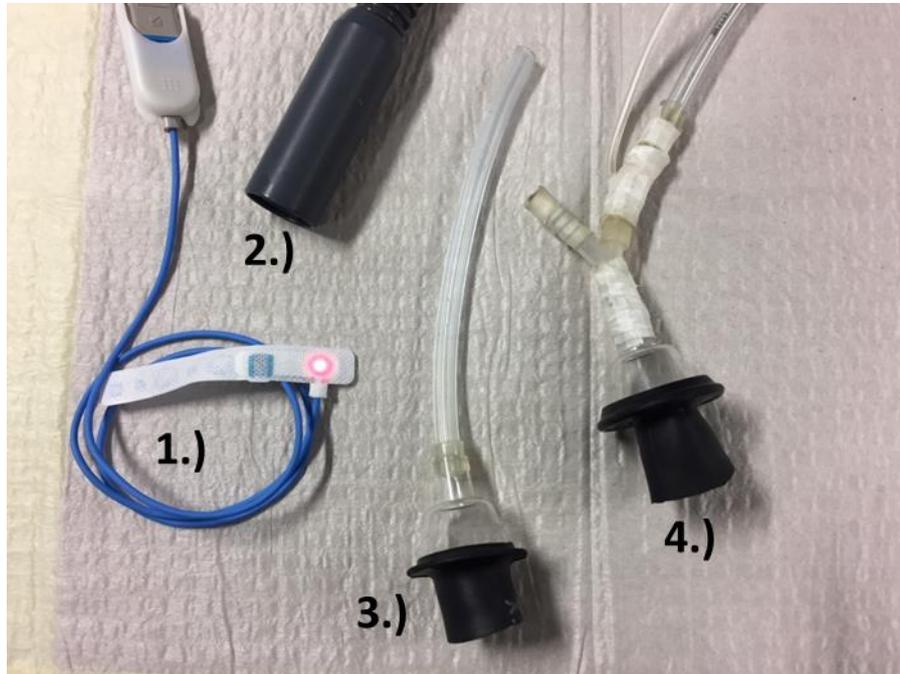


Abb. 7 1.) Sauerstoff (SpO₂)-Infrarotsonde (links), 2.) Versuchstiermaske des Isofluranverneblers, 3.) Versuchstiermaske für IH-Manöver, 4.) Versuchstiermaske für INAP-Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Um einer eventuellen Hypothermie während der mehrstündigen Versuche vorzubeugen, erhielten die Ratten konstante Wärmezufuhr über ein Heizkissen und eine provisorische Decke. Auf die Augen wurde regelmäßig Bepanthen® Augen- und Nasensalbe der Firma Bayer aufgetragen.

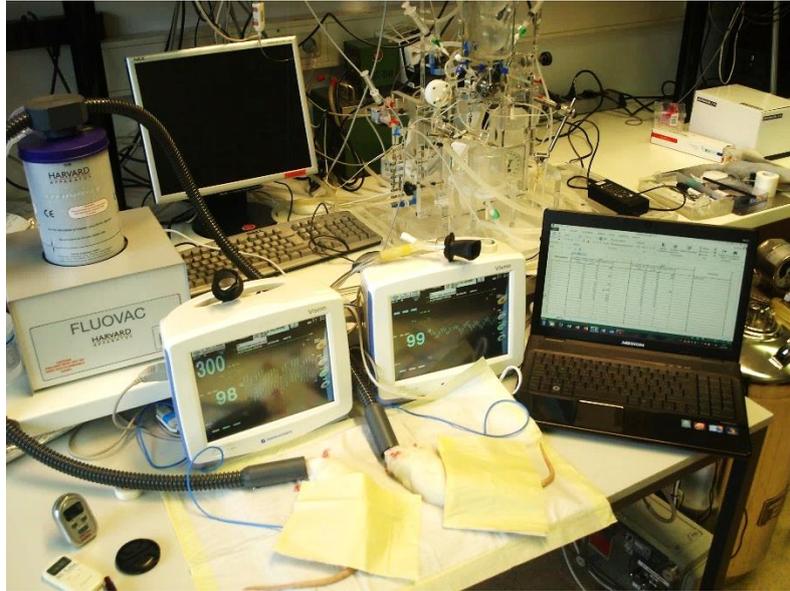


Abb. 8 Arbeitsplatz: Ratten unter Isoflurannarkose, an „Vismo PVM-2701k“ – Monitor angeschlossen

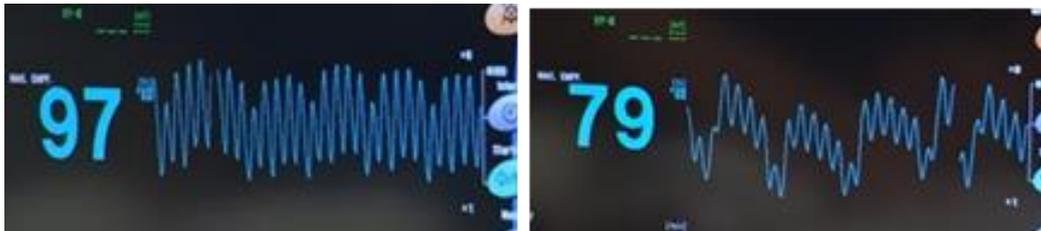


Abb. 9 „Vismo PVM-2701k“ – Monitoraufnahme: keine Intervention (links), während IH-/INAP-Manöver (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“



Abb. 10 Versuchstiere unter Isoflurannarkose auf Heizkissen

Isofluranvernebler – Fluovac System Harvard Apparatus

Der Isofluranvernebler „Fluovac System Harvard Apparatus“ diente zur Einleitung und Erhaltung der Narkose. Dieses System besteht aus vier in Reihe geschalteten Elementen: O₂-Gasflasche, Isofluran-Reservoir, Pumpe und Aktivkohlefilter, Versuchstiermaske. Am blinden Ende befindet sich die Sauerstoffgasflasche, die nach Öffnen bei konstantem O₂-Gasfluss Isofluran aus dem Reservoir aufnimmt und zur Pumpe fließen lässt. Dieses Isofluran-O₂-Gasgemisch wurde über die Pumpe den Versuchstieren entgegengeblasen. Darüber hinaus wurde Gas, welches an der Gesichtsmaske vorbei in den Raum fließen könnte, zurückgesaugt und über einen Aktivkohlefilter neutralisiert.

Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in eine spezielle, verschließbare Kammer aus Hartplastik gesetzt, in der sie mit 5 Vol. % Isofluran sediert wurden. Anschließend wurden die Tiere auf den Versuchstisch verbracht und die Narkose mittels einer Beatmungsmaske und 2 Vol. % Isofluran aufrechtgehalten.

INAP-Manöver und IH-Manöver

Über die Versuchstiermasken (**Abb. 7**) wurde entweder ein negativer Atemwegsdruck (INAP-Manöver; INAP-Gruppe) durch Anlegen eines Unterdrucks von -40 mbar mithilfe des „Druckmessgerät(s) mit Induktivkontakt Typ 831“ erzeugt oder es wurde das Todraumvolumen durch Aufsetzen eines langen, durchgangsfreien Schlauches auf die Atemmaske verlängert (Hypoxie-Manöver; IH-Gruppe). Das INAP-Manöver kann mit einer Art inversen „CPAP“-Applikation verglichen werden. Während CPAP bei OSA-Patienten den Kollaps der oberen Atemwege verhindert, induziert in diesem Modell der „inverse CPAP“ im Sinne einer intermittierenden negativen Atemwegsdruckapplikation (INAP) ein Kollaps der Atemwege. Die Verlängerung des Todraumvolumens resultiert in einen Abfall der Sauerstoffsättigung (IH) ohne jedoch ausgeprägte intrathorakale Druckschwankungen zu verursachen (**Abb. 11**).

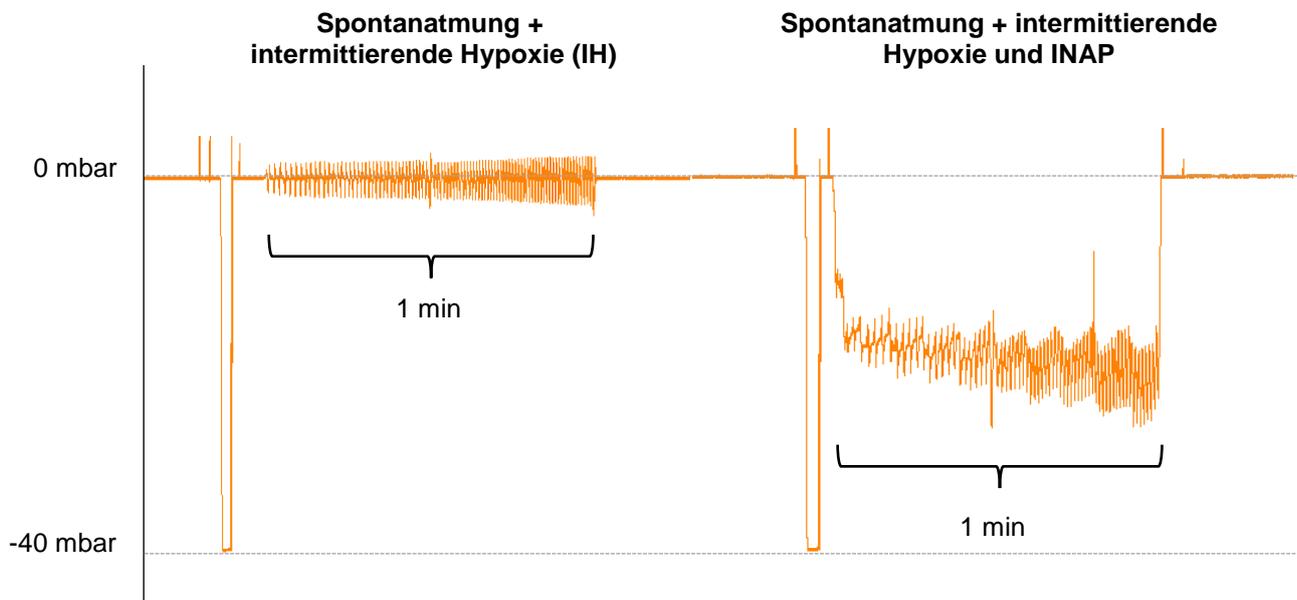


Abb. 11 Atembemühungen einer spontan atmenden Ratte während eines IH-Manövers (links) und eines INAP-Manövers (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Druckmessgerät mit Induktivkontakt Typ 831

Das Druckmessgerät entstammt der Firma „WIKA, Alexander Wiegand SE & Co. KG“ (**Abb. 12**). Funktionell zählt es zu den Plattenfederanometern. Dies bedeutet, dass der zu erfassende Druck an einer zwischen zwei Flanschen angebrachter Membranfeder wahrgenommen wird. Die Amplitude der Durchbiegung der Membran wird über ein Zeigerwerk nichtlinear in einem Ausschlag des Istwert-Zeigers ersichtlich.

Der Induktivkontakt Typ 831 dient der kontrollierten Druck- bzw. Unterdruckgeneration. Er besteht aus zwei kontaktlosen Näherungsschaltern, die nach Feststellen des Zieldruckes über einen Sollwert-Zeiger angesteuert werden (**Abb. 13**).

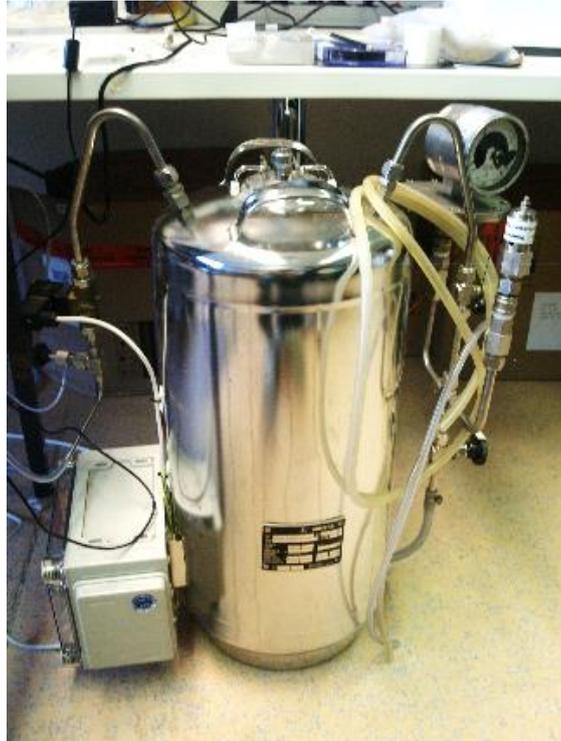


Abb. 12 Druckmessgerät mit Induktivkontakt Typ 831 zur Applikation der INAP-Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“



Abb. 13 Zeigerwerk: rot – Sollwert-Zeiger; schwarz – Istwert-Zeiger

4.2. Die Versuchsreihen

4.2.1. Akute Versuchsreihe

In der akuten Versuchsreihe (Akute Testserie, ATS) wurden Ratten untersucht, die sich bei 2 Vol. % Isofluran und einer Flussrate von 1,0-1,2 L/min in einer Gasnarkose befanden. Die Einleitung dieser erfolgte mit 5 Vol. % Isofluran bei einer Flussrate von 1,2 L/min für fünf Minuten. Die Tiere befanden sich spontan atmend in einem sedierten schlafähnlichen Zustand.

Ein Versuchstag dauerte vier Stunden, in denen alle fünf Minuten für eine Minute den Tieren eine Atemmaske aufgesetzt wurde.

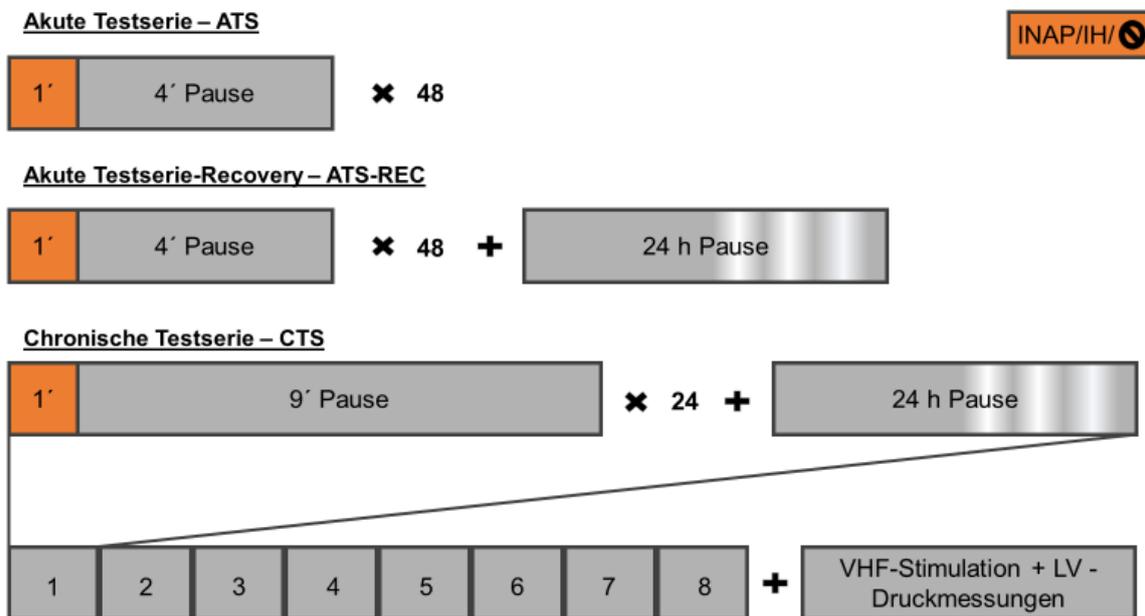


Abb. 14 zeitliche Ablauf der Versuchsreihen ATS, ATS-REC und CTS. ATS Akute Testserie. ATS-REC Akute Testserie-Recovery. CTS Chronische Testserie.

Zwischen den einminütigen INAP- bzw. IH-Manövern folgte eine vierminütige Erholungspause, während welcher die Ratten wieder an der Versuchstiermaske des Isofluranverneblers angeschlossen waren. Als Kontrolle dienten Ratten, die vier Stunden lang unter 2 Vol. % Isofluran narkotisiert waren (CTR, Kontroll-Gruppe), um einen möglichen Effekt der Narkose zu detektieren. Es wurden sowohl die Sauerstoffsättigungen der INAP-Gruppe und IH-Gruppe während des Aufsetzens der Atemmaske als auch die Sauerstoffsättigung der Kontroll-Gruppe protokolliert. Die Herzfrequenz diente lediglich bedingt zur Aufzeichnung eines verlässlichen Vitalparameters, da der „Vismo PVM-2701k“ – Monitor lediglich Herzfrequenzen bis zu 300/min anzeigt und eine Ratte auch in Ruhe nicht selten diesen Wert übertrifft.

Ziel des Versuches in der INAP-Gruppe war es, sowohl einen konstanten Unterdruck als auch eine Sauerstoffsättigung von mindestens 15% SpO₂ zu erzeugen. Während aller Versuche wurde mit Hilfe des „Notocord hem evolution“-Programmes kontrolliert, ob durch die INAP-Manöver der gleiche Unterdruck im System erreicht und dieser konstant war. Falls dies nicht der Fall war, konnte durch

Feinjustieren am Zeigerwerk im Rahmen des angegebenen Unterdruckbereiches ein höherer/niedrigerer Druck aufgebaut werden. In der IH-Gruppe sollte ebenfalls eine durchschnittliche Sauerstoffsättigung von mindestens 15% SpO₂ ohne Unterdruck als Ziel gelten.

Bei jedem Versuch standen das Wohl und das Überleben des Tieres im Vordergrund. Somit wurde auch ein ein-minütiges Manöver frühzeitig abgebrochen, wenn die Sauerstoffsättigung zu tief fiel und ein Überleben nach Einschätzung des Untersuchers fraglich war.

Versuchstiergruppen: (Kontroll-Gruppe (CTR): n=10; Hypoxie-Gruppe (IH): n=8, INAP-Gruppe: n=8) Unmittelbar nach dem letzten Aufsetzen der Atemmaske wurde dem Versuchstier ein COX-2-Hemmer (Carprofen) intraperitoneal zur Schmerzprophylaxe verabreicht. Die Dosierung des Schmerzmittels erfolgte nach dem Schema: 0,1 ml Carprofen /100 g Körpergewicht der Ratte. Für die Sektion mit anschließender Organentnahme wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 80 mg/kg Körpergewicht) und Rompun® (Xylazinhydrochlorid 6 mg/kg Körpergewicht) im Verhältnis 2:1 narkotisiert und das Ausfallen des Zwischenzehreflexes der Ratte abgewartet, um vor der Operation eine ausreichende Tiefe der Narkose zu gewährleisten. War dieser nicht auszulösen, wurde die Ratte abdominal in der Medianlinie eröffnet, das Zwerchfell durchschnitten und mit der Herzentnahme begonnen.

Entnommen wurden in dieser Versuchsreihe die Lungen und das Herz (aufgeteilt in rechten und linken Vorhof und linken Ventrikel). Die Proben wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bzw. in 4%iges Formalin verbracht und dienten später für histologische und molekularbiologische Analysen.

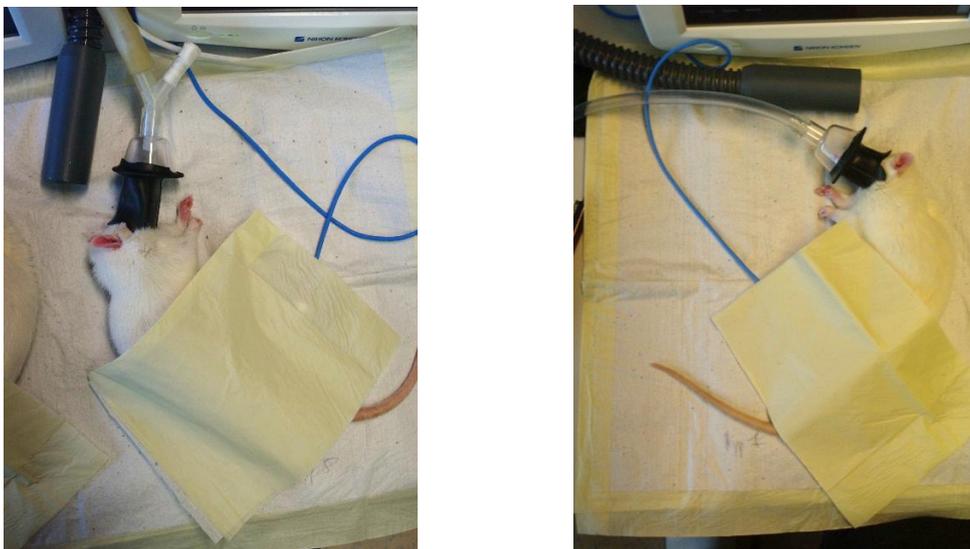


Abb. 15 Ratte während INAP-Manöver (links); Ratte während IH-Manöver (rechts). IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

4.2.2. Akute Versuchsreihe inklusive Erholungsphase

Die akute Versuchsreihe (CTR= 5, IH=5, INAP=5) inklusive Erholungsphase (Akute Testserie-Recovery, ATS-REC) war bezüglich des Versuchsaufbaues sowie -ablaufes der akuten Versuchsreihe

identisch. Lediglich erfolgte bei dieser Versuchsreihe die Organentnahme nach einer 24-stündigen Erholungsphase. Diese Latenz sollte zur Aufdeckung einer möglichen Reversibilität verschiedener biochemischer Prozesse und Signalkaskaden dienen.

4.2.3. Chronische Versuchsreihe

Für die chronische Versuchsreihe (Chronische Testserie, CTS), zur Simulation einer chronischen OSA inklusive ausgeprägter Nacht-zu-Nacht Variabilität, wurden die gleichen spontan atmenden Tiere unter identischer Narkosebedingung eingesetzt. Bevor jedoch diese Versuchsreihe anlaufen konnte, wurden die Ratten im Rahmen einer Blutdruckkontrolle über den gesamten Versuch hinweg einem „Tailcuff“-Training unterzogen. Dieses Training diente zur Gewöhnung an die strapaziösen Gegebenheiten, in der die Tiere sich befinden, wenn sie sich die ersten Male in den für das „Visitech BP-2000 Blood Pressure Analysis System“ vorgesehenen Versuchstierhaltern befinden. Nach insgesamt sechs Probemessungen wurde eine Baseline-Messung vorgenommen, die als Ausgangspunkt für alle kommenden über den chronischen Versuch verteilten Messungen dienen sollte. Alle Messungen wurden stets vor Isofluranexposition getätigt.

Nach erfolgreicher Blutdruckmessung wurden die Ratten drei Wochen lang jeden zweiten Tag in den Versuch genommen, wodurch sich eine Anzahl von acht Versuchstagen ergab. Die Verteilung der Versuchstage auf jeden zweiten Tag sollte zuvor genannte Nacht-zu-Nacht-Variabilität imitieren und hierüber zusätzlichen Aufschluss über die Auswirkung der Inkonsistenz der OSA-Schwere geben. Ein Versuchstag dauerte vier Stunden, in denen den Tieren alle zehn Minuten für eine Minute die Atemmaske aufgesetzt wurde und daraufhin ein wie in der ATS beschriebenes Manöver erfolgte. In diesem Versuch waren die Versuchstiergruppen identisch zu denen im akuten Versuchstiergruppen: INAP-Gruppe (n=9), IH-Gruppe (n=9), Kontroll-Gruppe (n=9).

Vor Beginn eines jeden Versuchstages erfolgte das Einschätzen des Gesundheitszustandes der Versuchstiere mittels eines Score Sheets (**Abb. 5**).

Blutdruckmessungen erfolgten am ersten, dritten, fünften und achten Versuchstag.

Visitech BP-2000 Blood Pressure Analysis System

„Visitech BP-2000 Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems inc. Napa Place, NC, USA)“ ist ein System zur Blutdruckmessung am Schwanz der wachen Ratte („Tailcuff“), bestehend aus einer Software, einer Control Unit und einer beheizbaren Plattform, die bis zu vier Stellplätze für Ratten bietet. Das Tier wurde in einem Versuchstierhalter eingesetzt, der am hinteren Ende eine speziell für den Rattenschwanz vorgesehene Öffnung besitzt. Der Versuchstierhalter erlaubt es dem Untersucher den Bewegungsfreiraum der Ratte bis auf ein Minimum einzuschränken, sodass bei vollfixierter Ratte ihr Schwanz durch die hintere Öffnung ragt und dem „Tailcuff“ zugänglich ist. Nach Anbringen der Blutdruckmanschette am proximalen Schwanzende erfolgten die Messungen auf der Basis eines individuell durch den Untersucher in der Software aufgestellten Schemas.



Abb. 16 periphere Blutdruckmessung am Rattenschwanz, „Tailcuff“-methode: Ratten in Versuchstierhaltern während der Messung

4.2.3.1. Terminalversuche

Nach acht Versuchstagen begann am darauffolgenden Tag der Terminalversuch. Somit ist die Erholungsphase nach dem letzten Versuch bis zur Sektion identisch zu der in den ATS-REC-Versuchen, sodass mögliche akute Einflüsse des letzten Versuchstages die realen Langzeitergebnisse nicht beeinflussen konnten. Der zuvor genannte Terminalversuch ist eine Abfolge an Versuchen zur Erfassung unterschiedlicher elektrophysiologischer und hämodynamischer Parameter:

- Elektrokardiogramm (EKG)
- EKG unter transösophagealer Vorhofstimulation; Messung der VHF-Dauer
- Linksventrikuläre Druckmessung via LVP-Katheter
- Sektion und Organentnahme

Für diesen Versuch wurde die Ratte lediglich kurz mit Isofluran in die Narkose eingeleitet. Zum Erhalt der Narkose wurde eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit der 2:1 Kombination aus Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, einem NMDA-Rezeptorantagonist, 80 mg/kg Körpergewicht), und Rompun® (Xylazinhydrochlorid, einem α_2 -Rezeptoragonist, 6 mg/kg Körpergewicht) gewählt. Die Dosierung erfolgte nach dem Schema: 0,1 ml Injektionsnarkose/ 100g Körpergewicht. Halbstündlich wurde die Hälfte der Anfangsdosis nachgegeben, um das Fortbestehen der Narkose zu sichern.

4.2.3.1.1. Elektrokardiogramm (EKG)

Das EKG wurde über die „Notocord hem evolution“ – Software aufgezeichnet. Es ist ein Zweikanal-EKG, welches Signale aus zwei subkutan liegenden Elektroden verarbeitet. Die Positionen der Elektroden sind so gewählt worden, dass die Amplitude der P-Welle den größtmöglichen Ausschlag anzeigte.

Software: „Notocord hem evolution“

„Notocord hem evolution“ (Notocord, Croissy, Frankreich) ist eine Software zur Aufnahme hämodynamischer und elektrophysiologischer Parameter *in vivo* sowie *in vitro*.

Mit Hilfe dieses Programmes ließ sich ein EKG ableiten und aufzeichnen sowie in terminalen Versuchen über einen linksventrikulären Katheter den Druck bei fortbestehender Herzfunktion aufnehmen. Darüber hinaus konnte man anhand des Programmes kontrollieren, ob der durch das „Druckmessgerät mit Induktivkontakt Typ 831“ erzeugte Unterdruck in dem gesamten System aus Druckmessgerät, Schlauch und Ratte stabil war und nicht leckte. Ebenfalls abzulesen war, wie tief der Unterdruck in dem System fiel und in welchem Rahmen das Tier versuchte gegen diesen anzutreten.

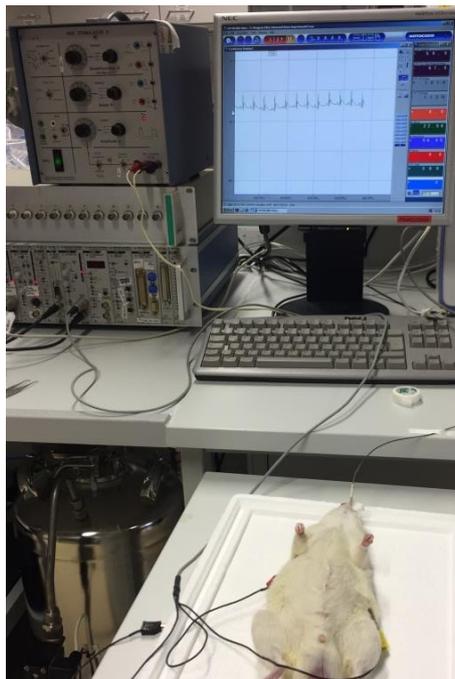


Abb. 17 Versuchstier an EKG angeschlossen; Aufnahme des EKG über die „Notocord hem evolution“ – Software. EKG Elektrokardiogramm.

4.2.3.1.2. EKG unter transösophagealer Vorhofstimulation; Differenzierung der Vorhofflimmerdauer

Sobald die „Notocord hem evolution“-Software ein stabiles, störfreies und die P-Welle deutlich anzeigendes EKG aufnahm, konnte mit dem Stimulieren des linken Vorhofs begonnen werden. Hierzu wurde ein multipolarer 4F-Katheter des „HSE Stimulator P Typ 201“ (Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland; **Abb. 20**) in den Ösophagus bis auf Herzhöhe vorgeschoben. Stimuliert wurde mit einer Spannung von 40 Volt (Amplitude A), mit einer Zykluslänge von 200 Millisekunden (msec) (Grundrhythmus G) bei einer Reizbreite von 8,6 msec (Breite B) (**Abb. 21** Einflussgrößen eines Reizes). Wenn man davon ausgeht, dass alle 200 msec der Katheter stimuliert, so stimuliert er fünf Mal in einer Sekunde und demnach 300 Mal pro Minute. Der Frequenz des Grundrhythmus G wurde knapp über der intrinsischen Herzfrequenz der narkotisierten Ratte gewählt. Eine erfolgreiche elektrische Stimulation

des Vorhofes wurde im EKG anhand der QRS-Komplexe mit unveränderter Morphologie folgend dem elektrischen Stimulationsartefakt sichergestellt. Dieser Vorgang wird im Folgenden als atriales „Capture“ bezeichnet (**Abb. 18**).

Nach sichergestellttem atrialem „Capture“ wurde die Zykluslänge des Grundrhythmus G auf ein Minimum heruntergedreht, was eine Salve an Erregungen auslöste, die nach drei Sekunden durch den Untersucher abgebrochen wurde. Falls das Tier dadurch in VHF übertrat, wurde abgewartet bis das Versuchstier wieder in den Sinusrhythmus übergang, falls nicht, schloss sich eine Pause von fünf Sekunden an, bevor die nächste atriale Stimulation eingeleitet wurde.

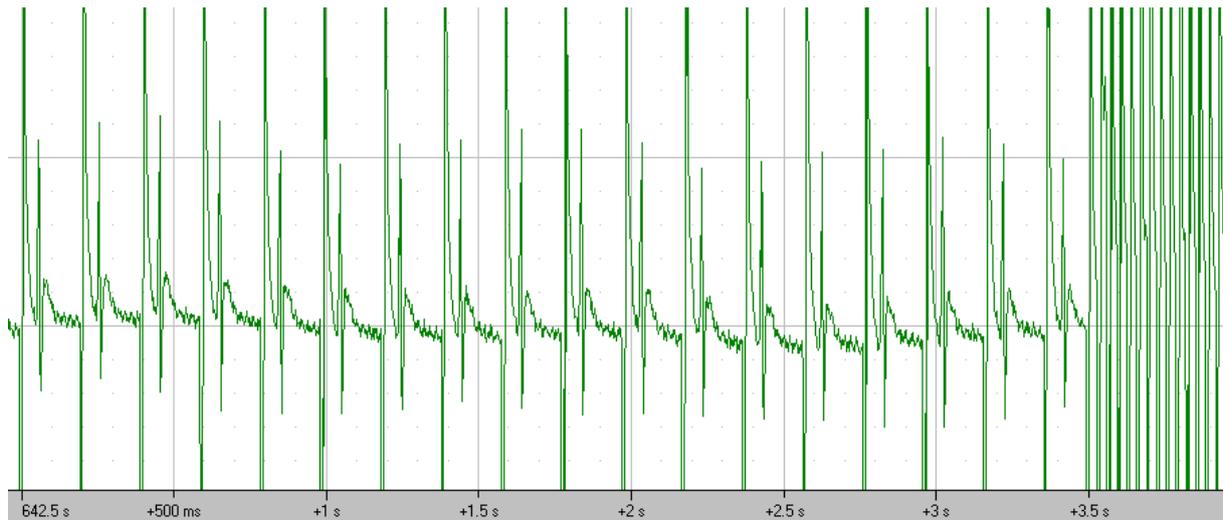


Abb. 18 EKG-Versuchsaufnahme: atriales „Capture“ und anschließende Salve an Erregungen

Unabhängig davon, ob eine Stimulation VHF nach sich zog oder nicht, erfolgten nach diesem Schema 20 Stimulationen. Die VHF-Induzierbarkeit errechnete sich nach den erfolgten Stimulationen als Quotient der erfolgreichen VHF-Induktionen zu den Stimulationsversuchen.

Die VHF-Dauer wird in der Auswertung als die Zeit im EKG unmittelbar nach der Stimulation bis Wiedereintritt in den Sinusrhythmus definiert. Als VHF werden die Phasen gewertet, die unmittelbar nach der Stimulation ein Ausbleiben der P-Welle und einen unregelmäßigen Kammerkomplexabstand zeigten. Mit Eintreten in den Sinusrhythmus, der sich im EKG als positive P-Welle und konsekutivem Kammerkomplex zeigte, endete die Dauer des VHF.

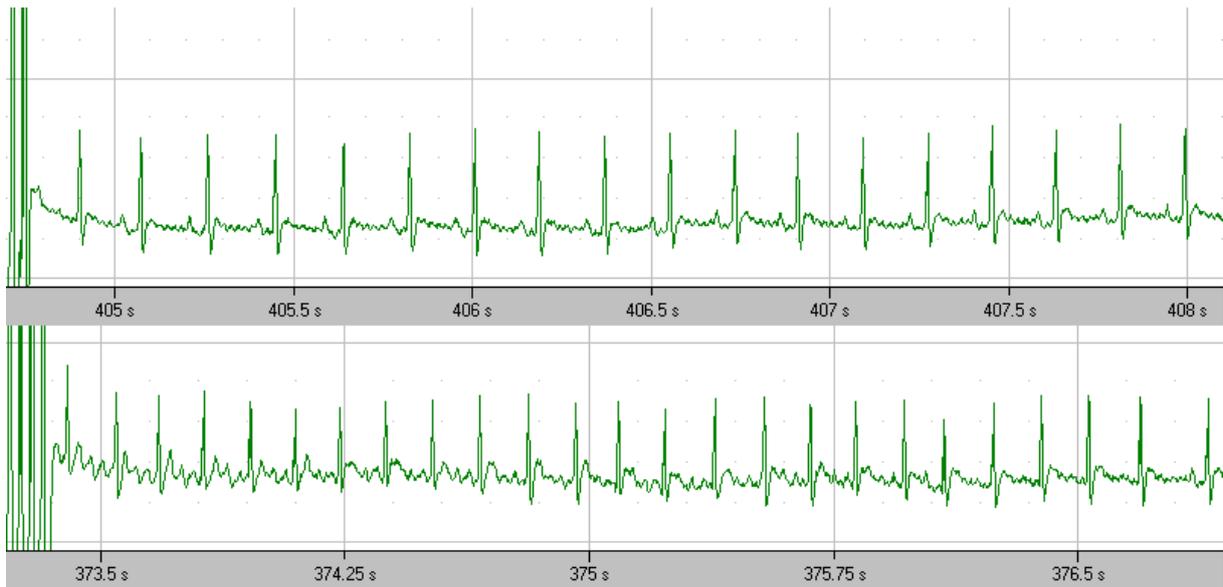


Abb. 19 EKG-Versuchsaufnahme: Sinusrhythmus (oben) und Vorhofflimmern (unten)

Auch während dieser Intervention war die Ratte zur Überwachung der Vitalparameter stets an einen Vismo PVM-2701k – Monitor angeschlossen. Auf diese Weise konnte eine absinkende Sauerstoffsättigung während der elektrischen Stimulation frühzeitig erkannt und die Stimulation abgebrochen werden.

HSE Stimulator P Typ 201

Der „HSE Stimulator P Typ 201“ des Herstellers „Hugo Sachs Elektronik“ wurde zur transösophagealen Stimulation des linken Vorhofs herangezogen.

Mittels eines multipolaren 4F-Katheters kann der Untersucher einen mono-/biphasischen elektrischen Reiz abgeben, der über drei Regler zu steuern ist. Durch den Grundrhythmus G wird die Frequenz und somit die Abstände zwischen den einzelnen Stimulationen festgelegt. Die Breite B beschreibt die Dauer eines Reizes und die Amplitude A die Höhe eines solchen.

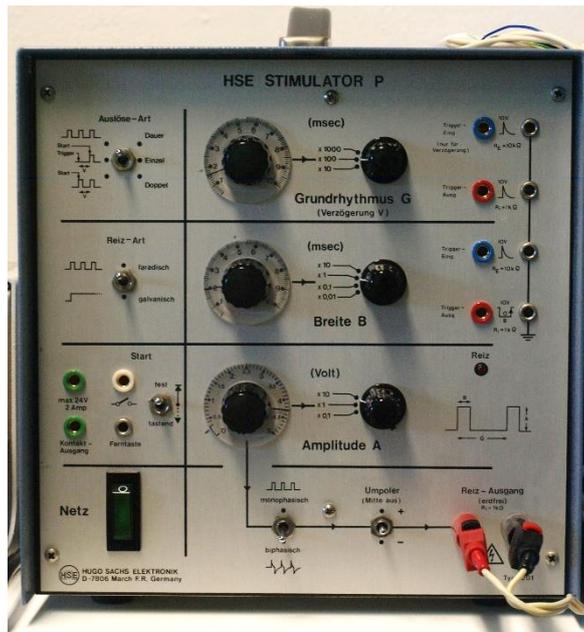


Abb. 20 HSE Stimulator P Typ 201

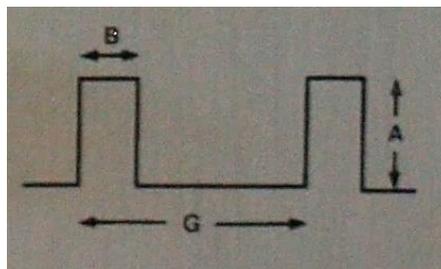


Abb. 21 Einflussgrößen eines Reizes: Grundrhythmus G, Reizbreite B, Reizamplitude A

4.2.3.1.3. Invasive linksventrikuläre Druckmessung

Im Anschluss an die Vorhofstimulation wurde nach Sicherstellen des fehlenden Zwischenzehreflexes, der Ratte in der Regio cervicalis anterior auf Höhe des Trigonum caroticum der Rattenhals eröffnet und die Arteria carotis communis freipräpariert. War die Arteria carotis communis zu sehen und frei zugänglich, wurde distal nahe der Clavicula und proximal nahe der Carotisgabel die Arterie abgebunden. In das nun gestaute Gefäß wurde mit einer Führungsnadel eingestochen, entlang welcher der LVP-Katheter eingeführt wurde. Befand sich der Katheter im Gefäßlumen, entfernte man die Führungsnadel und löste den distalen Knoten. Der LVP-Katheter konnte nun vorsichtig in Richtung Herz geschoben werden. Unter stetiger Beobachtung der Druck-Zeit Kurve in der „Notocord hem evolution“ – Software erkannte man ein Eintreten des Katheters in den linken Ventrikel an plötzlichem Sinken des diastolischen Wertes von ca. 80 mmHG auf ca. 5-10 mmHG. Die linksventrikulären Drücke wurden nach Stabilisierung unter Ruhebedingungen für drei Minuten aufgenommen.

Left ventricular Pressure (LVP) - Katheter

Der LVP-Katheter (Millar-TIP-Katheter, Model SPR-407, 2 French, Länge 140 cm, Millar Instruments, INC, Houston, Texas, USA) ist Bestandteil einer Working-Heart Anlage. Der Katheter, welcher an der Spitze mit einem Drucksensor ausgestattet ist, ermöglichte es dem Untersucher den aktuell gemessenen Druck am Computer über das „Notocord hem evolution“ - Programm zu verfolgen.

Daten wurden mit einer Datenerhebungsfrequenz von 1000 Hertz erhoben und digitalisiert. Als Parameter der systolischen linksventrikulären Funktion sind über die „Notocord hem evolution“ – Software der linksventrikuläre systolische Spitzendruck (LVesP) und die maximale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt) aufgezeichnet worden. Die diastolische Funktion wurde anhand der enddiastolischen Drücke (LVedP), der minimalen intraventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit (–dP/dt) und der Zeitkonstante der Relaxation (Tau) bestimmt (Linz et al. 2016a; Linz et al. 2015a; Weiss et al. 1976).

4.2.3.1.4. Sektion und Organentnahme

Entnommen wurden in der chronischen Versuchsreihe: Herz (aufgeteilt in rechten und linken Vorhof und linken Ventrikel) und Lunge. Die Gewebe wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Vom Herz wurden Proben zur histologischen Weiterverarbeitung in einer 4%ige Formaldehydlösung (Fischer, Saarbrücken, Deutschland; #PZN 02653048) für mindestens 24 Stunden asserviert.

Das Gewicht des Herzens (gesamt und aufgeteilt in Vorhöfe und Ventrikel) und der Lunge (Differenz Nass-/Trockengewicht) wurde ermittelt. Zur Erfassung der Ratio aus Organgewicht/Tibiallänge wurde zusätzlich die Länge der Tibia gemessen.

4.3. Biochemische und Histologische Analyse der Organe

4.3.1. Molekularbiologische Analysen

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan-PCR)

Die TaqMan-PCR diente zur Quantifizierung gezielt ausgesuchter Genexpressionen. Die Expression folgender Gene wurde getestet: atriales natriuretisches Peptid (ANP), brain natriuretisches Peptid (BNP), Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (Hif1 α), Hypoxie-induzierter Faktor 2 α (Hif2 α), „connective tissue growth factor“ (CTGF), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Während zuletzt genanntes als Haushaltsgen lediglich als Referenzwert gelten sollte, dienten ANP, BNP als

Hypertrophiemarker sowie als Marker für die Dehnung des Myokards, Hif als Transkriptionsfaktor für die zelluläre Hypoxielast und CTGF als redox-sensitiver profibrotischer Marker für Fibrose.

Im Einzelnen erfolgte die TaqMan-PCR wie folgt:

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach Vorlage des Protokoll Peqlab (Erlangen, Deutschland). Zuerst wurden 500 µl peqGoldTrifast (PeqGold Trifast, Cat. 30-2020) zu der Probe des zu untersuchenden Gewebes gegeben und mechanisch homogenisiert. Zur Begünstigung der Zelllyse erfolgte eine kurze Inkubation bevor weitere 500 µl peqGoldTrifast und 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; #C2432) zu der Probe hinzugefügt und diese anschließend mechanisch für 25 Sekunden zerkleinert wurde. Dieser Ansatz blieb acht Minuten unter einem Abzug bei Raumtemperatur stehen und wurde dann fünf Minuten bei 10.000 „rounds per minutes (rpm)“ in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation hatte sich die Probe in drei Phasen aufgetrennt, von welchen die oberste wässrige Phase die RNA beinhaltete. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 500 µl 100 % Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.09634.2511) zur RNA-Präzipitation zugegeben und zehn Minuten auf Eis gelegt. Danach erfolgte eine Kühlzentrifugation (4 °C) für zehn Minuten bei 13000 rpm. Am Boden des Reaktionsgefäßes bildete sich ein Pellet mit angereicherter RNA. Das Pellet wurde zweimal mit einem Milliliter 75% Ethanol (VWR, Darmstadt, Deutschland; #20821.330) gewaschen und abermals zentrifugiert. Nach einer kurzen Trocknungsphase bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurde das Pellet mit 50 µl 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat (DEPC, VWR; #E174))-H₂O resuspendiert.

In einem weiteren Schritt wurde ein Mikroliter RNA-Probe in einem Photometer, NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Peqlab; Erlangen, Deutschland), bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm quantifiziert. Um eine Kontamination eventuell angefallener chromosomaler DNA zu vermeiden, wurde zu der RNA-Probe ein DNA-verdauendes Konzentrat hinzugegeben, das sich aus den folgenden Substanzen zusammensetzte:

10 x DNase-Puffer 2,0 µl
DNase I (Peqlab, Cat. 04-1180) 2,0 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl von Promega, Cat.N2611) 0,5 µl
Nuclease-free H₂O 5,5 µl
RNA (2µg) gelöst in 10 µl 0,1%DEPC-H₂O
Volumen Total 20,0 µl

Der Ansatz inkubierte in einem Thermocycler (VWR):

Step 1	37°C	30 min
Step 2	75°C	5 min
Storage	4°C	Unendlich

Nachdem die RNA-Probe von chromosomaler DNA gereinigt war, konnte die RNA bei -80°C zwischengelagert werden.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription beschreibt den Prozess der DNA-Herstellung aus RNA. Hierfür schreibt das Enzym Reverse Transkriptase komplementäre cDNA (copy DNA) von isolierter Einzelstrang-RNA ab. Diese cDNA kann für molekularbiologische Versuche (Real-Time Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)) eingesetzt werden. Bei der reversen Transkription wurde das Kit und das Protokoll der Firma Applied Biosystems (Warrington, UK) verwendet (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. 4368814).

Zur Herstellung eines 20,0 µl Ansatzes wurden die Substanzen aus dem Kit mit einem Mikrogramm RNA in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß gemäß nachfolgendem Schema zusammen pipettiert:

10 x Buffer 2,0 µl
10 x Random Primers 2,0 µl
25 x dNTP Mix (100 mM) 0,8 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1,0 µl (200U)
RNAse Inhibitor 1,0 µl
H₂O 3,2 µl
1µg DNase-verdaute RNA (=10,0 µl des DNase Verdaus)
Volumen Total 20,0 µl

Dieser Ansatz wurde in einem Thermocycler (VWR) mit folgendem Programm inkubiert:

Step 1 (Annealing)	25°C	10 min
Step 2 (Elongation)	37°C	120 min
Step 3 (Termination)	85°C	5 min
Storage	4°C	Unendlich

Die gewonnene cDNA konnte nun für die qPCR eingesetzt werden. Gelagert wurde sie bei -20°C.

Real-Time Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung verschiedener Nucleinsäuren. Außerdem lassen sich Nucleinsäuren mittels dieser Methode zuverlässig quantifizieren.

Zur Messung und Quantifizierung binden spezifische Sonden zuerst an die Zielsequenz der zu untersuchenden Gene und senden ein Lichtsignal pro Kopiervorgang der Nucleinsäure aus. Das

gemessene Lichtsignal ist proportional zur Menge der Nucleinsäuren und kann über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode quantifiziert werden. Mittels einer entsprechenden Software, die die Lichtsignale misst, kann in Echtzeit (real-time) die Menge an gebildeten PCR-Produkten und dadurch die Geschwindigkeit der PCR gemessen werden. Die Software errechnet eine PCR-Kurve, sobald ein Mindestmaß an Nucleinsäuremenge überschritten wird. Die PCR-Kurve spiegelt eine Exponentialfunktion wider. Ein Cycle Threshold (=Ct-Wert) bzw. Schwellenwert gibt den Zyklus an, bei welchem die Geschwindigkeit der Reaktion am schnellsten ist. Dieser Ct-Wert korreliert mit der im Ansatz vorhandenen Nucleinsäuremenge.

Zur relativen Quantifizierung trägt man die Lichtemission gegen die Zyklenzahl auf und bezieht die Expression des gesuchten Gens auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), da die Expression dieses Gens als stabil und konstant angenommen werden kann. Die Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode setzt eine konstante Effizienz der abgelaufenen PCR-Reaktionen voraus. Bei einer Effizienz von 100%, verdoppelt sich die Nucleinsäuremenge in jedem Reaktionszyklus.

Effizienz $E = 10^{-1/m}$

$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{Haushaltsgen})$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Gruppe1}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})$

$\Delta\Delta\text{Ct}$ gibt die Expressionsdifferenz zwischen zwei Gruppen an und kann zur Berechnung der Ratio zwischen diesen Gruppen herangezogen werden.

$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Verwendet wurde das PCR-Gerät „StepOne Plus“ der Firma Applied Biosystems. Die Substanzen für den TaqMan sind von „Fa. Applied Biosystems“ (Cat. #4369016).

TaqMan Mastermix-Ansatz:

2x TaqMan Gene Expression Master Mix 10,0 μl

20x TaqMan Gene Expression Assay (Sonde) 1,0 μl

RNase-freies Wasser 9,0 μl

Volumen Total 20,0 μl

Template (cDNA) 1,0 μl

TaqMan Sonden (Applied Biosystems):

Rat ANP (Rn00664637_g1), Rat BNP (Rn00580641_m1), Rat Hif1a (Rn00577560_m1), Rat Hif2a (Rn00576515_m1), Rat CTGF (Rn01537279_g1), Rat GAPDH (Rn01775763_g1)

Bestimmung des oxidativen Stresses

Diese Messung repräsentiert das Ausmaß des oxidativen Stresses des Zielgewebes, der sich im Redoxstatus des Glutathions widerspiegelt. Die Ergebnisse wurden als Quotient des reduzierten

Zustandes des Glutathions (GSH) und des oxidierten Zustandes des Glutathions (GSSG) angegeben (**Abb. 22**). Ein niedriger Quotient aus GSH/GSSG spricht für eine stärkere Belastung durch oxidativen Stress als ein größerer Quotient. Anders formuliert, spricht ein niedriger Quotient aus GSH/GSSG für eine erniedrigte antioxidative Kapazität und ein hoher Quotient für eine hohe antioxidative Kapazität. Diese Versuche wurden mit Unterstützung von Alexander Nickel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Christoph Maack im kardiologischen Labor der Inneren Medizin des Uniklinikum des Saarlandes durchgeführt, orientierend an vorangegangener Arbeiten der genannten Arbeitsgruppe (Nickel et al. 2015).

Zur Probenvorbereitung wurden Teile des linken Ventrikels oder des linken Vorhofes in 300 μ l Isolationspuffer, bestehend aus 106,1 mM Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), 18,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 6,3 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) mittels MICCRA D-1 (Art, Müllheim, Deutschland) homogenisiert. Zur Bestimmung des oxidierten Glutathions wurde vor der Homogenisierung ein weiterer Teil Myokard und 3 mM 1-Methyl-2-Vinylpyridine zu dem Isolationspuffer hinzugegeben. Um die Mitochondrien aufzubrechen unterliefen sie einen Gefrier-Auftau-Zyklus bevor der Porteingehalt des nun gewonnenen Myokardlysats mittels der Methode nach Lowry ((Lowry et al. 1951)) bestimmt werden konnte. Das Gesamtglutathion wurde nach der Methode von Rahman et al, 2006 (Rahman et al. 2006) in einem Versuchsansatz bestehend aus 0,6 mM des Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB), 0,4 mM NADPH und 1,8 U Glutathionreduktase quantifiziert. Für die Messungen des Gesamtglutathion und des GSSG wurden 50 bis 500 μ g an Proteinmenge genutzt. Die Menge und der Anteil des GSH wurde durch Subtraktion der Mengen des GSSG von der Menge des Gesamtglutathion bestimmt. Alle Ergebnisse wurden in nmol/mg Protein angegeben (Nickel et al. 2015).

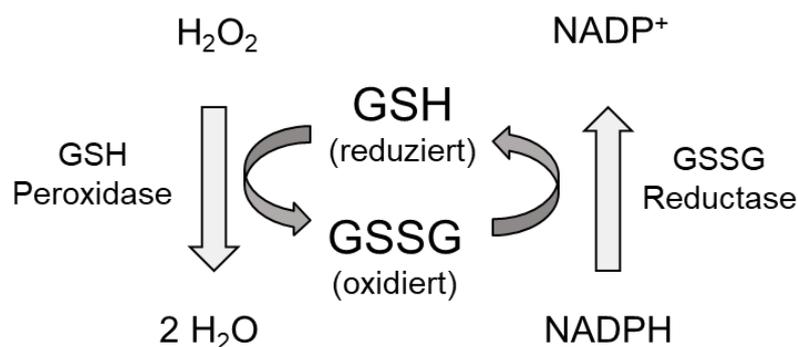


Abb. 22 Glutathionoxidation durch Einwirken von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (linker Schenkel) und Glutathionreduktion unter Opferung von Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) (rechter Schenkel)

4.3.2.Histologie

Präparation des Gewebes

Für die histologischen Untersuchungen wurden die in 4%igem Formaldehyd (Fischer, Saarbrücken, Deutschland; #PZN 02653048) konservierten Proben herangezogen. Formalin (Formaldehyd) vernetzt die freien Aminogruppen der Proteine mittels Methylenbrückenbildung und fixiert auf diese Weise die Struktur des Gewebes und verhindert darüber hinaus autolytische Vorgänge. Die Fixierungsflüssigkeit wurde ausgewaschen und im Anschluss mit einer Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) im Gewebeeinbettautomaten (Excelsior, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) schrittweise entwässert. Die Alkoholreste wurden mit Xylol entfernt. Danach wurden die Proben in TissueTek® Unikkassetten (TissueTek®, Sakura, Staufen, Deutschland) mit Paraffin überzogen und erkalten lassen bevor sie an einem Mikrotom (Leica RM2255) in 5 µm Abstand geschnitten wurden. Im Wasserbad wurden die Schnitte auf einen Objektträger gezogen. Nachdem die Objektträger 48 Stunden im Wärmeschrank bei 56 Grad Celsius gelagert und von den Überresten des Paraffins befreit wurden, erfolgten die spezifischen Färbungen.

Hämatoxylin-Eosin (H.E.) - Färbung

Der Farbstoff Hämatoxylin-Eosin dient der besseren Differenzierung der Zellkerne und des Cytoplasmas. Ersteres wurde mit dem basischen Farbstoff Eisen-Hämatoxylin blau gefärbt, letzteres mit dem sauren Farbstoff Eosin rot.

Lösungen:

70% Isopropanol, 90% Isopropanol, 100% Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.09634.2511), Xylol (VWR, #28975.325), Hämatoxylin n. Ehrlich (Waldeck, Münster, Deutschland; #2C-163), Aqua destilliert, 1%-ige Eosinlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.15935.0025), Salzsäure-Alkohol (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; #10372.00250)

Anleitung:

Die prozessierten Objektträger wurden drei Mal zehn Minuten in Xylollösung von übrig gebliebenem Paraffin befreit. Im Anschluss wurden die Objektträger nach Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) für jeweils fünf Minuten weitere fünf Minuten in destilliertem Aqua gebadet. Die Kernfärbung erfolgte über jeweils 12 Minuten in einem Hämatoxylinbad und darauffolgender zweimaliger Waschung mit destilliertem Wasser. Zur Differenzierung wurde Salzsäure-Alkohol auf die Schnitte gegeben, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und unter fließendem Wasser für 15min gebläut. Nach abermaliger Spülung mit destilliertem Wasser, wurden die Gewebeschnitte für 15 Sekunden in die Eosinlösung verbracht und im Anschluss wieder mit destilliertem Wasser gespült. Im weiteren Färbungsprozess durchliefen die Schnitte nun eine aufsteigende Alkoholreihe für je zwei

Minuten (70%, 90%, 100%). Im Anschluss daran wurden die Proben drei Mal für drei Minuten in Xylol gegeben bevor sie im Abzug trockneten. Anschließend konnten sie mit einem Tropfen Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland; #1.07961.0100) unter einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt werden.

Zur Darstellung der Hypertrophie im Herzen wurde unter einem Lichtmikroskop bei vierhundertfacher Vergrößerung pro Schnitt der Zelldurchmesser von ungefähr 100 Zellen ermittelt, bei denen die Zellkerne deutlich zu sehen und mittig angeschnitten waren. Hierfür wurden ausgewählten Ausschnitte der Präparate fotografiert und diese anschließend mit dem Programm „NIS-ELEMENTS BR“ ausgewertet.

Pikro-Sirius-Rot Färbung

Mit Hilfe der Pikro-Siriusrot Färbung wurde die Fibrosebildung untersucht. Unter dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern rot und Cytoplasma inklusive Kern gelblich dar. Bei Beurteilung unter polarisiertem Licht ist diese Färbung eine sensitive Methode zum Nachweis von Kollagen. Große Fibrillen stellen sich in der Regel gelb-orange, kleinere grün dar.

Lösungen:

Xylol, 70% Isopropanol, 90% Isopropanol, 100% Isopropanol, Aqua destilliert, Pikro-Siriusrot Lösung 0,1% (Morphisto, Frankfurt, Deutschland; 13422.00500)

Anleitung:

Die prozessierten Objektträger wurden drei Mal zehn Minuten in Xylollösung von überschüssigem Paraffin befreit. Im Anschluss wurden die Objektträger nach Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%) für jeweils fünf Minuten weitere fünf Minuten in destilliertem Aqua gebadet und anschließend 60 Minuten in Pikro-Siriusrot Lösung gefärbt. Im Anschluss wurde zweimal mit destilliertem Aqua gewaschen und nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) entwässert. Nach drei Mal drei minütiger Xylolwaschung wurden die Schnitte mit einem Tropfen Entellan unter einem Deckglas luftfrei eingedeckt.

Die Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop bei hundertfacher Vergrößerung fotografiert (20-30 Bilder pro Tier) und anschließend über das Programm „NIS-ELEMENTS BR“ (NIS-Elements, BR 3.2, Nikon Instruments, USA) ausgewertet. Das rot gefärbte Gewebe wurde markiert und in Relation zu dem umgebenen nicht gefärbten Gewebe gesetzt.

Immunhistologische Färbung atrialer Connexine (Connexin 43, Cx43)

Die immunhistologische Färbung dient zur Visualisierung und Quantifizierung atrialer Connexine, insbesondere des Connexins 43 (Cx43). Nach bereits beschriebener Deparaffinierung und Hydrierung

wurde das Gewebe am Mikrotom in 5 µm Abstand geschnitten. Die Gewebepreparationen wurden bei 98°C eine Stunde in einem Wasserbad mit 0.05% Zitronensäureanhydrid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) inkubiert, bevor sie mit 1xPBS-Tween (phosphate-buffered saline: 137,0 mmol/L NaCl; 2,7 mmol/L KCl; 4,3 mmol/L Na₂HPO₄; 1,47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4 containing 0,1 % Tween) gewaschen wurden. Die Gewebeschnitte wurden mit einem primären Antikörper (Maus anti-Cx43, Merck Millipore #MAB3068, Darmstadt, Deutschland), verdünnt mit 1xPBS-T (1/30), über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C inkubiert. Als Zweitantikörper diente Anti-mouse-IgG-FITC (Dianova, Hamburg, Deutschland), verdünnt in 1/30 1xPBS-T für 2 Stunden bei 37°C. Die Gewebeschnitte wurden mittels DAPI Medium (#H-1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop fotografiert und anschließend über das Programm „NIS-ELEMENTS BR“ (NIS-Elements, BR 3.2, Nikon Instruments, USA) ausgewertet.

4.4. Statistik

Alle Auswertungen beruhen auf der Testdurchführung mit Signifikanzniveau $p < 0,05$. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte \pm SEM („standard error of the mean“). Der SEM oder auch Standardfehler des Mittelwerts ergibt sich aus dem Quotienten aus Mittelwert und der Wurzel der Grundgesamtheit.

Bei Analysen, die die Unterschiede zweier Versuchsgruppen betraf, wurde ein ungepaarter Students t-Test („two tailed“) angewandt. Wurden Unterschiede zwischen drei Gruppen verglichen, so diente die „One-way ANOVA“- Analyse mit anschließendem „Tukey multiple comparison test“ als Methode der Wahl. Durchgeführt wurden die statistischen Tests mit der Statistiksoftware „GraphPad PRISM“ (La Jolla, USA).

5. Ergebnisse

Ziel des neu etablierten Rattenmodells war es einen tieferen Einblick in die Pathogenese des arrhythmogenen Substrates bei OSA zu liefern. Hierfür wurden obstruktiv respiratorische Ereignisse im Sinne der Apnoen bei OSA näher charakterisiert, um die Unterschiede zwischen reiner intermittierender Hypoxie (IH) und intermittierender Hypoxie in Verbindung eines negativen Druckes der oberen Atemwege (INAP) zu klären.

5.1. Validierung des Modells

Im Rahmen einer Validierung des Modells wurden die Effekte der IH-Manöver und INAP-Manöver auf Respirationsparameter (Atemfrequenz, Atembemühungen) und auf den linken Ventrikel betrachtet.

Atemfrequenzantwort und Atembemühungen auf IH- und INAP-Manöver

Die folgende Abbildung zeigt die Atemfrequenzänderung, die eine Minute vor („prä“) und eine Minute nach („post“) IH-, bzw. INAP-Manövern gemessen wurde. Um von einer reinen Aufwachreaktion durch Abatmen des Narkosegases zu unterscheiden, wurde als Kontrolle eine Minute Sauerstoff statt Narkosegas zugeführt und die Atemfrequenz zuvor bzw. danach gemessen.

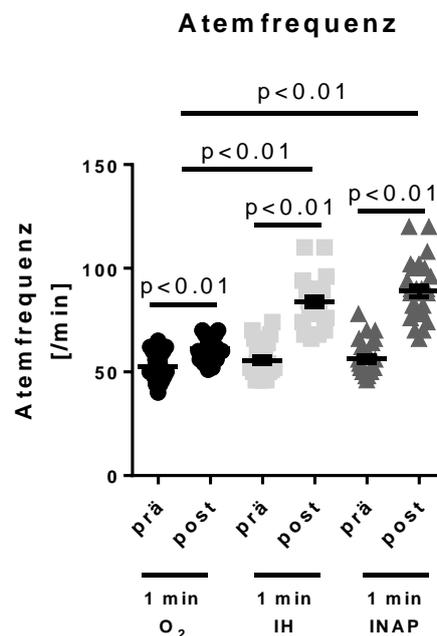


Abb. 23 Atemfrequenzänderung nach je einer Minute Sauerstoff (O₂), IH oder INAP. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Abbildung 23 zeigt, dass nach einer Minute Sauerstoff, einer Minute IH und einer Minute INAP die Atemfrequenz anstieg (O₂: prä vs. post +8,824 ± 3,44/min; IH: prä vs. post +28,04 ± 2,99/min; INAP: prä vs. post +32,81 ± 2,73/min). Dieser Anstieg der Atemfrequenz war bei signifikant nicht

unterschiedlichen Ausgangswerten zwischen IH und INAP vergleichbar und signifikant ausgeprägter als der durch Sauerstoff alleine.

Ein weiterer klinischer Parameter waren die Atembemühungen der Versuchstiere während eines einminütigen Hypoxie- und eines INAP-Manövers. Hierfür wurden die Atemdrücke, die über die Atemmaske und der beschriebenen Software aufgezeichnet wurden, zwischen Inspiration und Expiration gemessen und die Differenz dieser errechnet.

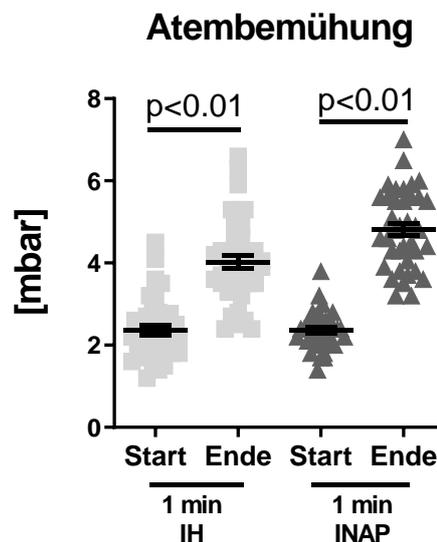


Abb. 24 Atembemühungen gemessen anhand der Druckfluktuationen zwischen Inspiration und Expiration in Millibar (mbar) während einminütiger Manöver. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Abbildung 24 zeigt, dass sowohl einminütige Hypoxie- als auch INAP-Manöver zu einer signifikanten Steigerung der Differenzen der Atemdrücke zwischen Inspiration und Expiration führten (Differenz 1 min IH Start vs. Ende $1.66 \pm 0,19$ mbar; Differenz 1 min INAP Start vs. Ende $2,46 \pm 0,19$ mbar). Dies spiegelt ein allgemein angestrengteres Atemverhalten der Tiere wider.

TaqMan-PCR-Analyse des linken Ventrikels: ATS und ATS-REC

In diesen Versuchsreihen ist Myokard des linken Ventrikels biochemisch auf die Expression verschiedener Biomarker untersucht worden. Der Focus lag hier auf mRNA-PCR-Analysen sowohl der Hypertrophie-Marker ANP und BNP, als auch des redox-sensitiven pro-fibrotischen Markers CTGF und der durch Hypoxie induzierten Faktoren Hif1 α und Hif2 α . Die mRNA-Expression der genannten Gene wurde gegen die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) abgeglichen, da davon auszugehen ist, dass GAPDH als essentielles Haushaltsenzym der Glykolyse in allen Zellen im gleichen Maß transkribiert wird.

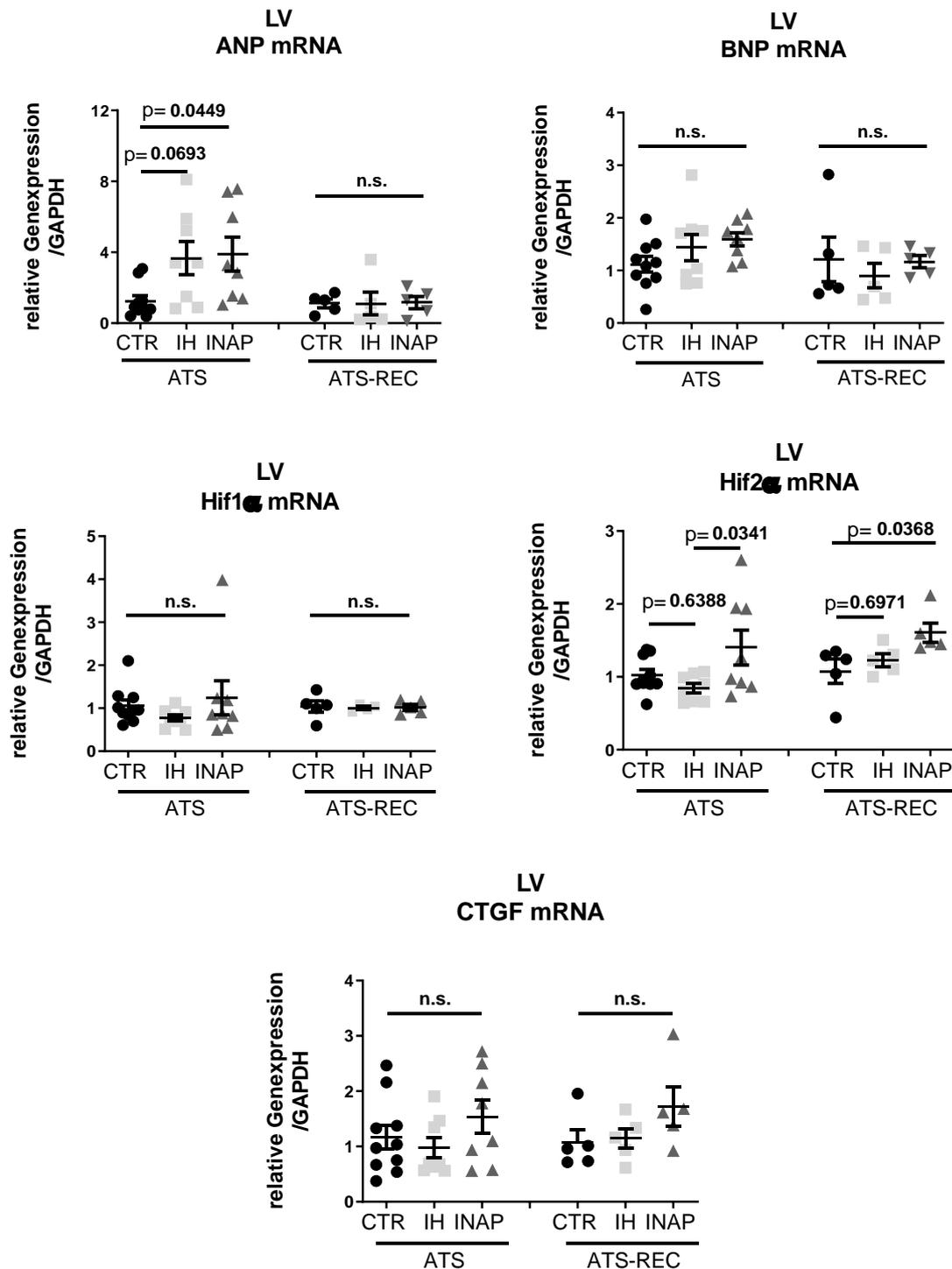


Abb. 25 ATS/ATS-REC: TaqMan-PCR Biomarker linker Ventrikel: Akute-Test-Serie (ATS) (CTR=10, IH=8, INAP=8) versus Akute-Test-Serie-Recovery (ATS-REC)(CTR=5, IH=5, INAP=5). Biomarker: ANP, BNP, Hif1 α , Hif2 α , CTGF in Relation zur Genexpression des Haushaltenszym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Abbildung 25 zeigt die TaqMan-PCR-Ergebnisse hinsichtlich der oben genannten Biomarker im linken Ventrikel. Lediglich in der INAP-Gruppe kam es zu einer gesteigerten Expression des ANP-Gens, die in der akuten Testreihe mit Erholungsphase reversibel war. Die BNP-Expression zeigte in beiden akuten Versuchsreihen keine wesentlichen Unterschiede. Im Vergleich zu der IH-Gruppe war in den INAP-Tieren Hif2 α akut vermehrt exprimiert. Dieser Effekt unterlag einer Reversibilität, jedoch wies in der

ATS-REC die INAP-Tiere eine vermehrte Expression gegenüber den Kontrollen auf. Hif1 α und CTGF zeigten in den akuten Testreihen keine Unterschiede in der Genexpression.

TaqMan-PCR-Analyse des linken Ventrikels: CTS

Die linken Ventrikel der chronischen Versuchsreihe wurden auf die Expression der Biomarker untersucht: BNP, Hif1 α , Hif2 α in Relation zu dem Haushaltsenzym GAPDH.

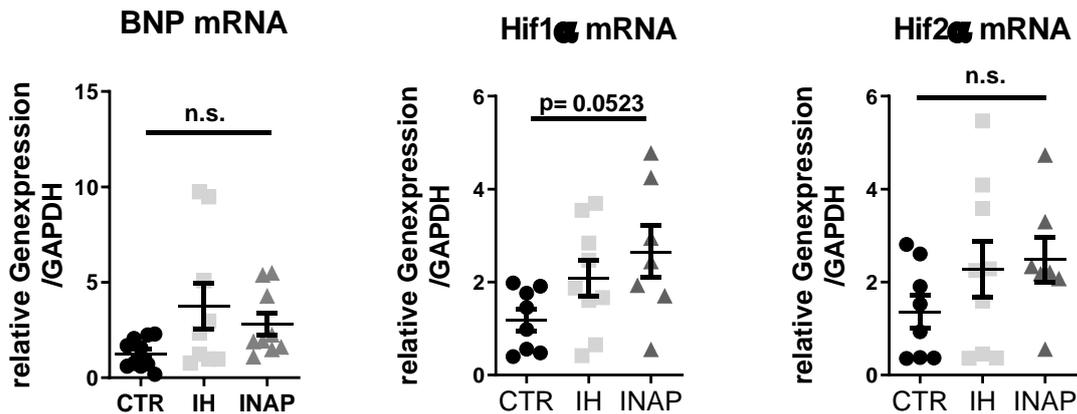


Abb. 26 CTS: TaqMan-PCR Biomarker linker Ventrikel. Biomarker: BNP (CTR=10, IH=9, INAP=9), Hif1 α (CTR=8, IH=9, INAP=7), Hif2 α (CTR=8, IH=10, INAP=7) in Relation zur Genexpression des Haushaltsenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Abbildung 26 zeigt bezüglich der Parameter der Dehnungslast (BNP) keinen signifikanten Unterschied der INAP-Gruppe sowie der IH-Gruppe zu den Kontrollen (INAP vs. CTR $p=0,3264$; IH vs. CTR $p=0,0714$). Nach dreiwöchiger Versuchslaufzeit ist bei den Hif1 α eine Tendenz zur vermehrten Expression in den INAP-Tieren (INAP vs. CTR $p=0,0523$) zu sehen. Die Expression des Gens Hif2 α zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede.

Organgewichte

Die Herzen wurden nach der Entnahme gewogen und in Verhältnis zu der versuchstierindividuellen Tibiallänge gesetzt.

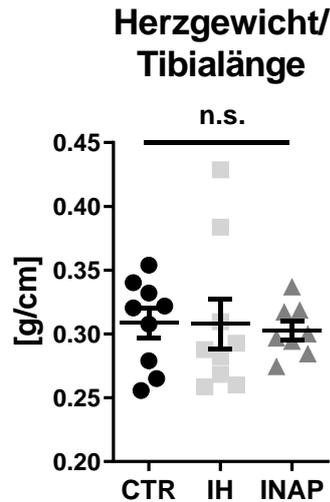


Abb. 27 CTS: größenadaptierte Herzgewichte als Quotient aus dem Herzgewicht [g] und der Tibialänge [cm] (CTR=9, IH=9, INAP=8)

Die Auswertung der Herzgewichte in Relation zu der Tibialänge ergab, dass die größenadaptierten Herzgewichte in den Kontrollen sowie in den Interventionsgruppen (IH-/INAP-Gruppe) auf vergleichbaren Niveaus (CTR= $0,31 \pm 0,01$ g/cm, IH= $0,31 \pm 0,02$ g/cm, INAP= $0,30 \pm 0,01$ g/cm) lagen. Darüber hinaus ergaben die Messungen der Lungen-Trocken- sowie Feuchtgewichte keinen Anhalt für akkumulierte Flüssigkeit in der Lunge (Ratio Lungenfeucht-/Lungentrockengewicht: CTR: $4,43 \pm 0,26$; IH: $4,92 \pm 0,05$; INAP: $4,39 \pm 0,32$).

Histologische Analyse der linken Ventrikel: CTS

Die linken Ventrikel sind histologisch hinsichtlich der Myozytengrößen und der interstitiellen Fibrose aufgearbeitet worden. Die Auswertung der Myozyten in der H.E.-Färbung zeigte, dass diese in Bezug auf ihre Durchmesser keine Unterschiede unter den Gruppen aufwiesen. Dies spricht für eine ausbleibende Manifestation einer zellulären Hypertrophie im linken Ventrikel.

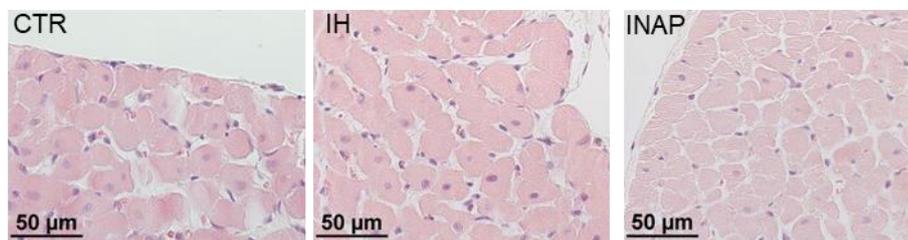


Abb. 28 Linker Ventrikel: histologische Beispielbilder der H.E.- Färbung. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

LV - Kardiomyozytendiameter

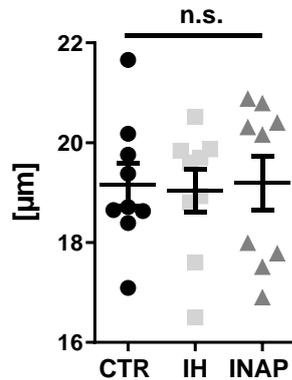


Abb. 29 CTS: Kardiomyozytendurchmesser linker Ventrikel (LV) (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Die Auswertung der interstitiellen Fibrose (Pikro-Sirius-Rot Färbung) hingegen zeigte einen signifikanten Anstieg der interstitiellen Fibrose nach 3 Wochen INAP im Vergleich zu den Kontroll-Tieren und der IH-Gruppe (INAP $4,63 \pm 0,30\%$ vs. IH $3,46 \pm 0,2 \%$, $p=0.0117$; INAP vs. CTR $3,05 \pm 0,27\%$, $p=0,0008$). Die IH-Gruppe zeigte hier keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.

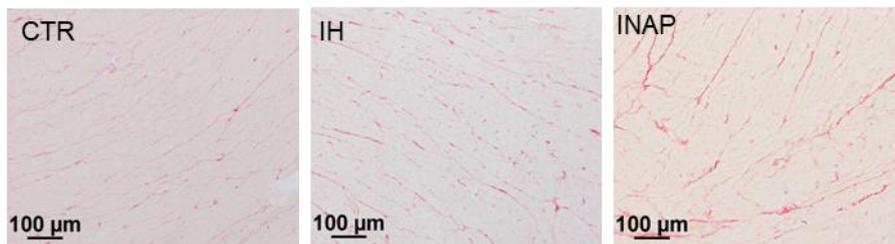


Abb. 30 Linker Ventrikel: histologische Beispielbilder Picro-Sirius-Rot Färbung. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

LV - interstitielle Fibrose

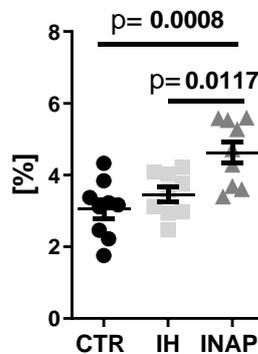


Abb. 31 CTS: Quantifizierung der interstitielle Fibrose im linken Ventrikel (LV) (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Hämodynamik

Die Tailcuff-Blutdruckmessungen, die an jedem zweiten Tag der Langzeitversuche stattfanden, zeigten im Vergleich der Ausgangs- („prä“) zu den Endwerten nach drei Wochen Versuchszeit („post“) keinen Unterschied des mittleren arteriellen Druckes (MAD) in den Kontrolltieren zu den IH-Tieren. Tiere mit negativem Atemwegsdruck (INAP-Tiere), zeigten einen signifikant angestiegenen mittleren arteriellen Druck nach drei Wochen Versuchslaufzeit.

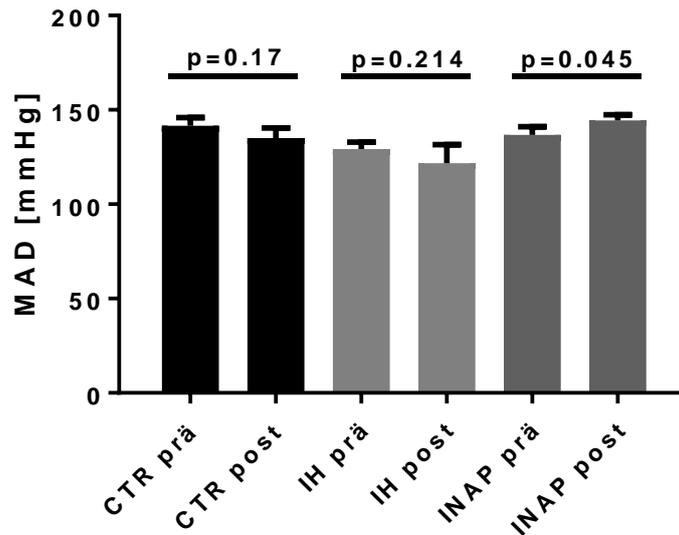


Abb. 32 CTS: Tailcuffauswertung

Die invasiv gemessenen linksventrikulären Druckparameter zeigten keinen erhöhten linksventrikulären endsystolischen Druck der INAP-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen (CTR 135 ± 9 mmHg vs. INAP 113 ± 4 mmHg). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Auffälligkeiten hinsichtlich der enddiastolischen Drücke der INAP-Tiere im Vergleich zu den IH- und Kontrolltieren (CTR 3 ± 1 mmHg vs. INAP 10 ± 3 mmHg).

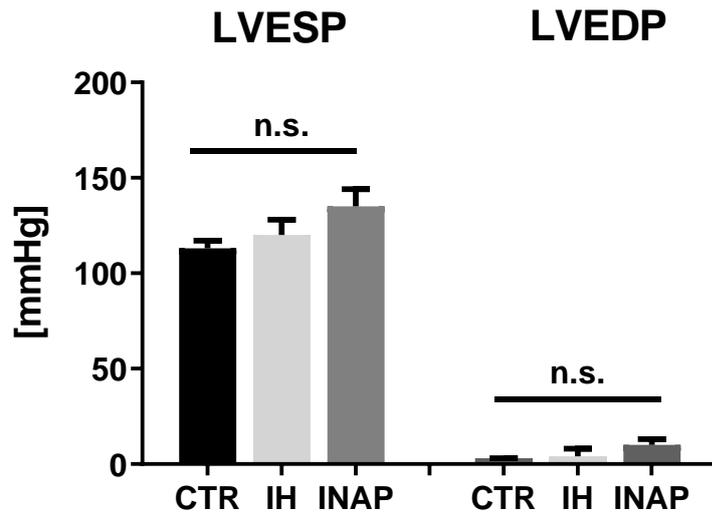


Abb. 33 CTS: intraventriculäre Blutdruckmessung: LVESP – Left Ventricular Endsystolic Pressure, LVEDP – Left Ventricular Enddiastolic Pressure. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

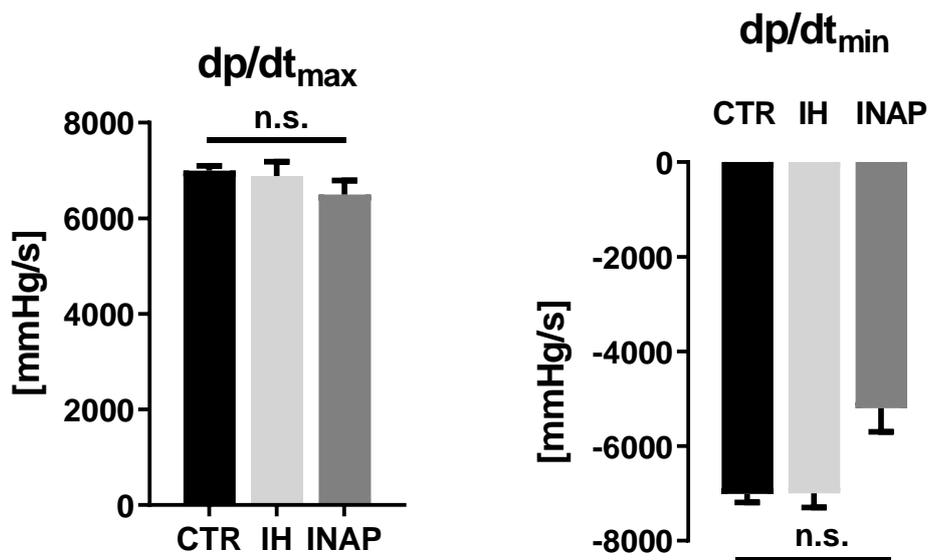


Abb. 34 CTS: +/- dp/dt_{max/min}: maximale/minimale intraventriculäre Druckanstiegs-/Druckabfallgeschwindigkeit. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Abbildung 34 zeigt die intraventriculären Druckgeschwindigkeitsmessungen. Hier ergibt sich weder ein Unterschied in den maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeiten (CTR 7000 ± 100 mmHg/s, IH 6887 ± 300 mmHg/s, INAP 6500 ± 290 mmHg/s) noch in den minimalen Druckabfallgeschwindigkeiten der INAP-Tiere im Vergleich zu den IH- sowie Kontrolltieren (CTR -7011 ± 180 mmHg/s, IH -6999 ± 300 mmHg/s, INAP -5201 ± 500 mmHg/s).

5.2. Vorhof: Akute Versuchsreihen

Die akuten Versuchsreihen dienten zur Detektion Myokard stressender Faktoren, die während und unmittelbar nach vierstündiger Versuchszeit aufgetreten waren. Zusätzlich sollte die akute Versuchsreihe, die eine vierundzwanzigstündige Erholungsphase mit beinhaltet, zeigen, inwiefern akute pro-arrhythmische Faktoren während der Versuche zu einem persistierenden pathophysiologischen Korrelat beitragen oder inwiefern eine Regeneration des jeweils untersuchten Gewebes eine Reversibilität des akuten myokardialen Stresses bewirken.

Mittlere IH- und INAP-induzierte Sauerstoffsättigung der Versuchstiere

Die Analyse der mittleren IH- und INAP-induzierten Sauerstoffsättigung der Versuchstiere in der ATS sowie ATS-REC zeigte, dass die Interventionsgruppen sich stets auf ein vergleichbares Niveau der Sauerstoffsättigung absenkten, wohingegen die Kontrollen in beiden Versuchsreihen konstant hoch blieben.

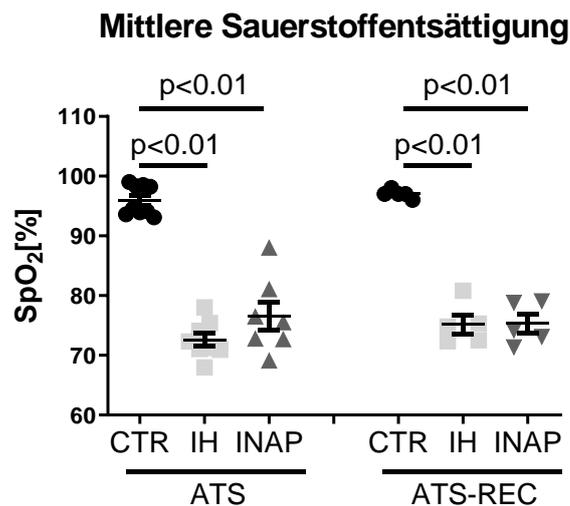


Abb. 35 ATS/ATS-REC: Mittlere Sauerstoffsättigung ATS (CTR=9, IH=8, INAP=7) versus ATS-REC (CTR=5, IH=5, INAP=5). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

In der ATS zeigten die Kontrollen (n=9) im Durchschnitt eine stabile Sauerstoffsättigung von $95,92 \pm 0,83\%$. IH-Tiere (n=8) wiesen einen Abfall der Sauerstoffsättigung auf $72,63 \pm 1,1\%$ und INAP-Tiere (n=7) einen Abfall der Sauerstoffsättigung auf $76,53 \pm 2,38\%$. In der ATS-REC betrug die Sauerstoffsättigung der Kontrollen (n=5) $97,00 \pm 0,32\%$, die der IH-Tiere (n=5) $75,15 \pm 1,53\%$ und die der INAP-Tiere (n=5) $75,3 \pm 1,55\%$.

Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität im Vorhof

Der oxidative Stress ist in den akuten Testreihen anhand der Ratio GSH/GSSG aus Vorhofgewebe beurteilt worden. Ein hohes Einwirken oxidativen Stresses spiegelte sich in einem erniedrigten Quotienten aus GSH/GSSG wider und repräsentiert dadurch eine erniedrigte antioxidative Kapazität.

Atriale antioxidative Kapazität

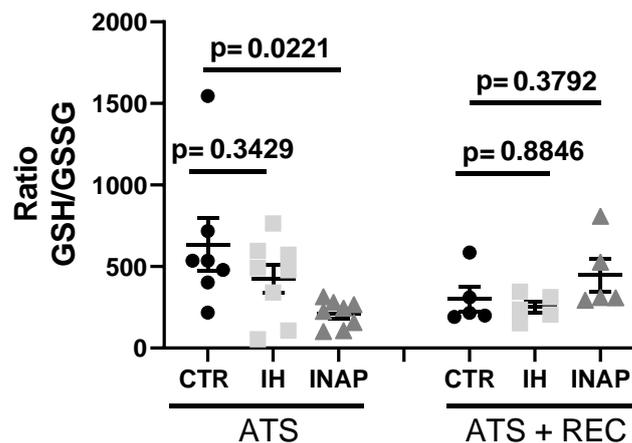


Abb. 36 ATS/ATS-REC: atriale antioxidative Kapazität: ATS (CTR=7, IH=8, INAP=8) versus ATS-REC (CTR=5, IH=5, INAP=5). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Bei der Bestimmung des Quotienten aus GSH/GSSG der linken Vorhöfe (**Abb. 36**) ist es in der akuten Testreihe zu einem Abfall der antioxidativen Kapazität in der INAP-Gruppe gekommen. Die Gruppe zeigte gegenüber den Kontrollen einen signifikanten Unterschied (INAP $209,66 \pm 74,12$ vs. CTR $633,38 \pm 239,4$; $p=0,0221$), jedoch nicht gegenüber der IH-Gruppe (INAP vs. IH $425,15 \pm 150,31$; $p=0,2958$). Zwar zeigte die IH-Gruppe ebenfalls eine Tendenz zu niedrigeren Gesamtwerten des GSH-GSSG-Quotienten, jedoch erreichte dieser im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht das Signifikanzniveau (IH vs. CTR $p=0,3429$).

ATS-REC wies keinen Unterschied unter den jeweiligen Gruppen auf. Das initiale Absinken der antioxidativen Kapazität zeigte sich somit 24 Stunden nach akut applizierten INAP-/IH-Manövern als reversibel (INAP $446,72 \pm 199,78$ vs. CTR $300,71 \pm 134,48$; $p=0,3792$; INAP vs. IH $250,72 \pm 112,12$; $p=0,1930$; CTR vs. IH $p=0,8846$).

5.3. Vorhof: Chronische Versuchsreihe

Die chronische Versuchsreihe zeigt die Langzeitwirkung der applizierten Manöver (INAP, IH) Hier werden neben den biochemischen Analysen auch die histologische Aufbereitung der Gewebe betrachtet. Weiterhin wird die Anfälligkeit des Vorhofes gegenüber Arrhythmien mittels induzierter VHF-Zeiten untersucht.

Mittlere Sauerstoffentsättigung der Versuchstiere

Abbildung 37 präsentiert die mittleren Sauerstoffentsättigungen der Versuchstiere. Beide Interventionsgruppen (IH, INAP) liegen auf vergleichbaren Sauerstoffentsättigungsniveaus (IH= 77,48 ± 1,11%; INAP= 77,94 ± 1,26%), wohingegen die Kontrolltiere (CTR= 97,86 ± 0,11%) auf einem konstant hohen Niveau der Sauerstoffentsättigung blieben.

Mittlere Sauerstoffentsättigung

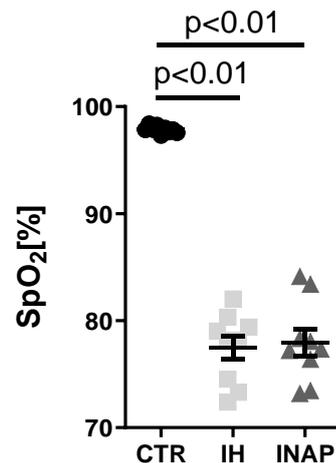


Abb. 37 CTS: Mittlere Sauerstoffentsättigungen (CTR=9, IH=9, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität im Vorhof

Im Langzeitversuch wurde das Einwirken des oxidativen Stresses auf den Vorhof anhand der Ratio GSH/GSSG evaluiert.

Atriale antioxidative Kapazität

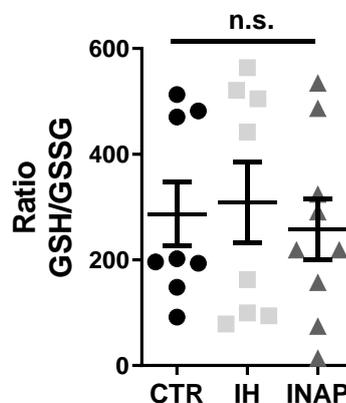


Abb. 38 CTS: atriale antioxidative Kapazität (CTR=8, IH=8, INAP=9). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

In dieser Versuchsreihe ergaben sich weder unter den Interventionsgruppen (INAP $257,58 \pm 85,86$ vs. IH $308,34 \pm 109,01$; $p=0,84$) noch zwischen den Interventionsgruppen zu den Kontrollen signifikante Unterschiede (INAP vs. CTR $287,06 \pm 101,49$; $p=0,94$; IH vs. CTR $0,97$) (**Abb. 38**). Die antioxidative Kapazität blieb somit unbeeinträchtigt.

Histologie

Die histologischen Untersuchungen dienten zur Objektivierung der Hypertrophie sowie der interstitiellen Fibrose.

Kardiomyozyten-Hypertrophie im Vorhof:

Die Hypertrophie wurde anhand der Durchmesser der Kardiomyozyten bestimmt. Hierfür wurde Gewebe des linken und rechten Vorhofes und des linken Ventrikels untersucht.

Im Folgenden sind je ein Beispielbild des linken Vorhofes eines Kontrolltieres, eines IH-Tieres und eines INAP-Tieres zu sehen.

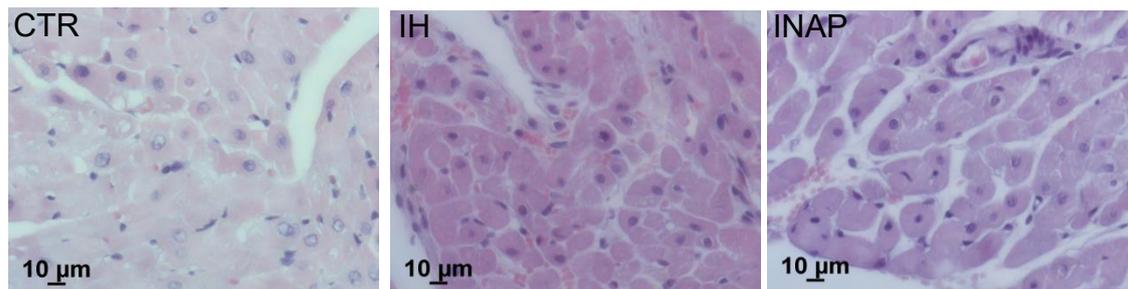


Abb. 39 CTS: Hypertrophie linker Vorhof: Beispielbilder, vierhundertfache Vergrößerung: von links nach rechts: CTR, IH, INAP. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Die Auswertung der Gewebeschnitte des linken Vorhofes zeigte keine signifikante Vergrößerung des Durchmessers der atrialen Kardiomyozyten der INAP-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen (INAP: $13,23 \pm 0,34 \mu\text{m}$ vs. CTR: $12,32 \pm 0,23 \mu\text{m}$ $p=0,15$) (**Abb.40**). Die Tiere in der Gruppe der intermittierenden Hypoxie (IH: $12,41 \pm 0,38 \mu\text{m}$ vs. CTR; $p=0,98$) zeigten ebenfalls keinen Unterschied zu den Kontrollen. Gleiches galt für den Vergleich zwischen IH- und INAP-Gruppe (IH vs. INAP $p=0,20$).

LA-Kardiomyozytendiameter

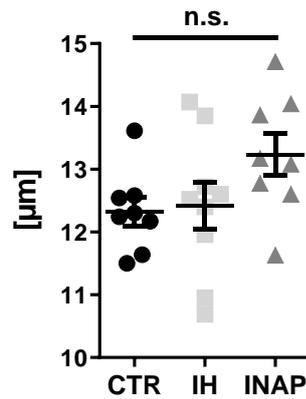


Abb. 40 CTS: Kardiomyozytendurchmesser linker Vorhof (CTR=9, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Der rechte Vorhof wies ebenfalls keine Unterschiede in den Durchmessern der Kardiomyozyten auf (Abb. 41). Mit $12,91 \pm 0,6 \mu\text{m}$ Durchmesser lag INAP-Gruppe auf demselben Niveau der Kontrollen, deren Durchmesser $12,86 \pm 0,45 \mu\text{m}$ betrug ($p=0,99$). Auch die Tiere in der Gruppe der intermittierenden Hypoxie (IH: $11,87 \pm 0,32 \mu\text{m}$ vs. CTR; $p=0,31$) zeigten weder einen Unterschied zu den Kontrollen noch zu den INAP-Tieren (IH vs. INAP $p=0,27$).

RA-Kardiomyozytendiameter

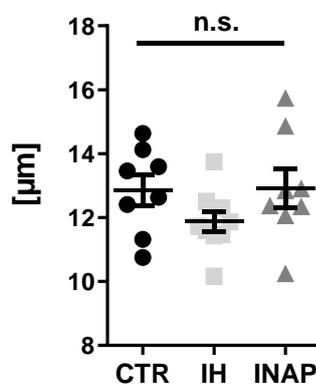


Abb. 41 CTS: Kardiomyozytendurchmesser rechter Vorhof (CTR=9, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Interstitielle Fibrose im Vorhofmyokard

Die im Folgenden aufgeführten Gewebeschnitte sind Beispielbilder des linken Vorhofes der interstitiellen Fibrose je eines Kontrolltieres, eines IH-Tieres und INAP-Tieres.

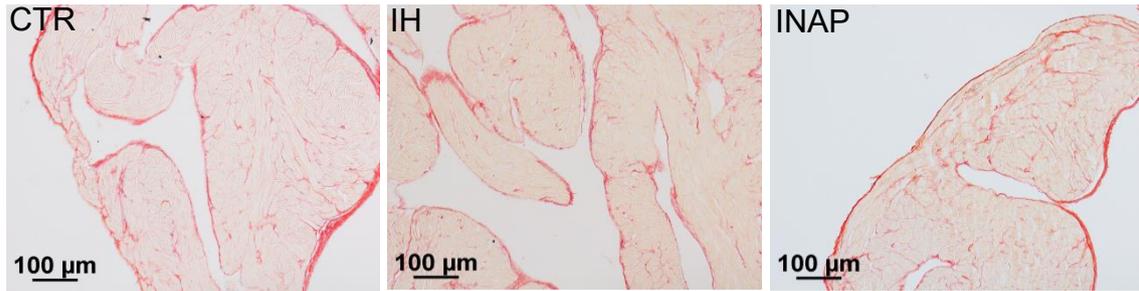


Abb. 42 CTS: Interstitielle Fibrose linker Vorhof: Beispielbilder: von links nach rechts: CTR, IH, INAP. CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Die Auswertung der interstitiellen Fibrose des linken Vorhofes wies eine Tendenz zur vermehrten prozentualen interstitiellen Fibrose zwischen der Gruppe der INAP-Tiere und der Kontrolltiere auf (INAP: $7,03 \pm 0,58\%$ vs. CTR: $5,01 \pm 0,3\%$ $p=0,073$), welche jedoch knapp unter dem Signifikanzniveau verblieb (**Abb. 43**). Kein Unterschied des Fibrosegehaltes der IH-Gruppe (IH: $6,48 \pm 0,75\%$) zur Kontrollgruppe (IH vs. CTR; $p=0,21$) war hierbei zu sehen.

LA-Interstitielle Fibrose

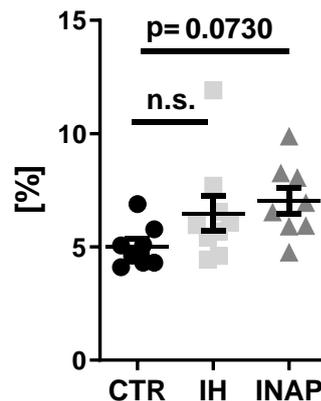


Abb. 43 CTS: Interstitielle Fibrose linker Vorhof (CTR=8, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Die interstitielle Fibrose im rechten Vorhof zeigte keine signifikante Unterschiede in den Interventionsgruppen (IH-/INAP-Gruppe) in Vergleich zu den Kontrollen (**Abb. 44**). Die Gruppe der INAP-Tiere lag mit $7,81 \pm 0,78\%$ Anteil interstitieller Fibrose nur unwesentlich höher im Vergleich zur Fibrose der Kontrolltiere (CTR: $6,53 \pm 0,36\%$ vs. INAP; $p=0,31$). Es bestand kein Unterschied zwischen der INAP- und der IH-Gruppe (IH: $6,65 \pm 0,59\%$ vs. INAP; $p=0,37$) und der Kontrollgruppe (IH vs. CTR; $p=0,98$).

RA-Interstitielle Fibrose

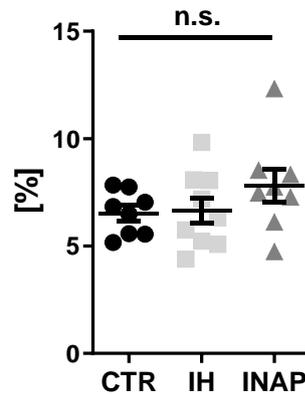


Abb. 44 CTS: Interstitielle Fibrose rechter Vorhof (CTR=8, IH=9, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Assoziation: Histologie und oxidativer Stress im Vorhof

In Zusammenschau der Ergebnisse des atrialen oxidativen Stresses und der links-atrialen Histologie korrelierte interstitielle Fibrose negativ mit den Absolutwerten des Glutathions (tGSH = „total GSH“ = Gesamt-GSH) (Korrelationskoeffizient $r=-0,6999$) und dem Quotienten aus GSH und GSSG (Korrelationskoeffizient $r=-0,5608$) (Abb.45 und Abb.46). Dies zeigt, dass sowohl bei hohen Glutathionwerten als auch bei hohen Quotienten aus GSH und GSSG im Allgemeinen niedrigere Prozentsätze an interstitieller Fibrose zu finden waren.

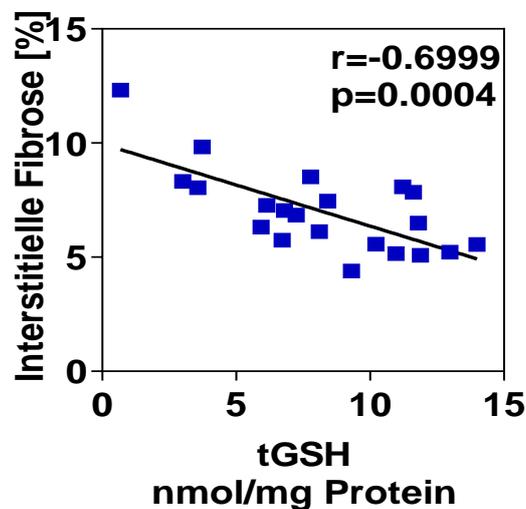


Abb. 45 CTS: Korrelation Interstitielle Fibrose des linken Vorhofes und tGSH (CTR=8, IH=8, INAP=7). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

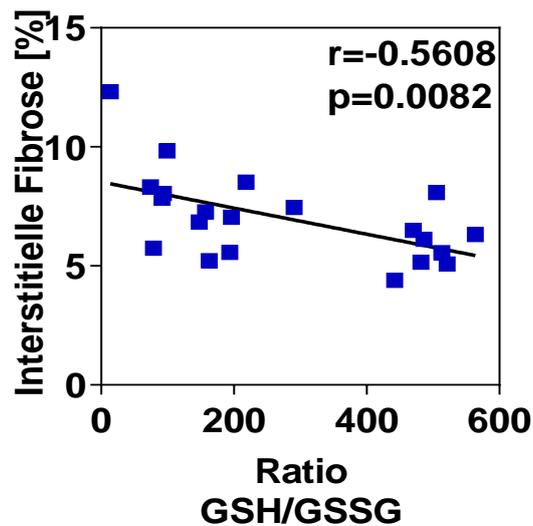
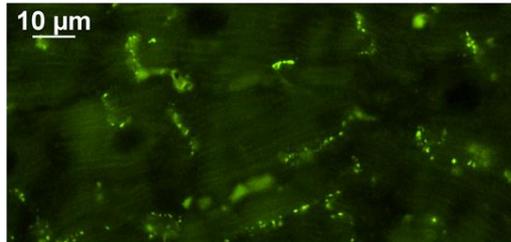


Abb. 46 CTS: Korrelation Interstitielle Fibrose des linken Vorhofes und Ratio GSH/GSSG (CTR=8, IH=8, INAP=7). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

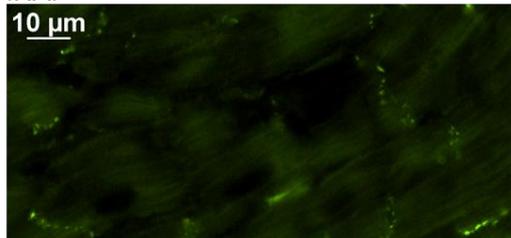
Connexine im linken Vorhof

Zur Charakterisierung der strukturellen interzellulären Reizübertragungseigenschaften wurde Connexin 43 immunhistologisch im linken Vorhof angefärbt. **Abbildung 47** zeigt histologische Beispielbilder eines Kontrolltieres (CTR), eines INAP-Tieres (INAP) und eines Referenzgewebeschnittes, in welchem kein Antikörper inkubiert wurde (no Ab). Die Auswertung der prozentuellen Connexin 43 Expression zeigte, dass sowohl in den IH-Tieren, als auch in den INAP-Tieren bei auf den Mittelwert der Kontrollen normalisierten Werten die C43 Expression signifikant sank.

CTR



INAP



no Ab



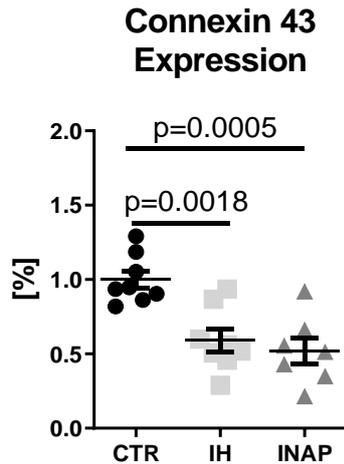


Abb. 47 CTS: Immunhistologische Färbung des Connexin 43 im linken Vorhof (CTR=8, IH=8, INAP=7). Beispielbilder CTR und INAP (oben links), Referenzbeispielbild ohne Antikörper (no Ab, oben rechts). Auswertung der prozentualen Connexin 43 Expression in der immunhistologischen Färbung (unten). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

Transösophageale Induktion des Vorhofflimmerns

Im Rahmen der Terminalversuche wurde nach Platzieren eines multipolaren Katheters im Ösophagus durch Stimulation VHF induziert. Im Durchschnitt ließ sich in den Kontrolltieren in $15,42 \pm 6,32\%$ der Stimulationen VHF auslösen. In den IH-Tieren betrug die Rate der Induzierbarkeit des VHF $29,19 \pm 7,95\%$ und in den INAP-Tieren $48,85 \pm 11,65\%$ (Abb.48). Die INAP-Tiere zeigten hiermit einen signifikanten Unterschied der VHF-Induzierbarkeit gegenüber den Kontrollen (INAP vs. CTR $p=0.0478$).

Vorhofflimmerinduzierbarkeit

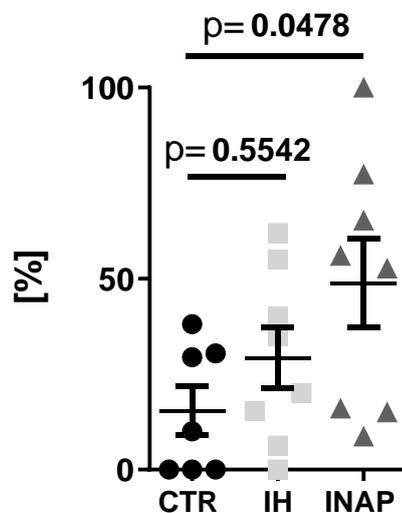


Abb. 48 CTS: Vorhofflimmerinduzierbarkeit in Prozent: VHF-Ereignisse/Anzahl der Stimulationen*100 (CTR=7, IH=8, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

In der Auswertung der VHF-Dauer zeigte sich eine durchschnittliche VHF-Dauer von $0,72 \pm 0,33$ Sekunden bei den Kontrollen, $1,28 \pm 0,33$ Sekunden bei den IH-Tieren und $11,65 \pm 4,43$ Sekunden bei den INAP-Tieren (**Abb.49**). Die INAP-Gruppe zeigte einen signifikanten Unterschied der VHF-Dauer gegenüber der IH-Gruppe (INAP vs. IH $p=0,0293$) und der Kontrollgruppe (INAP vs. CTR $p=0,0262$).

Induzierbare Vorhofflimmerdauer

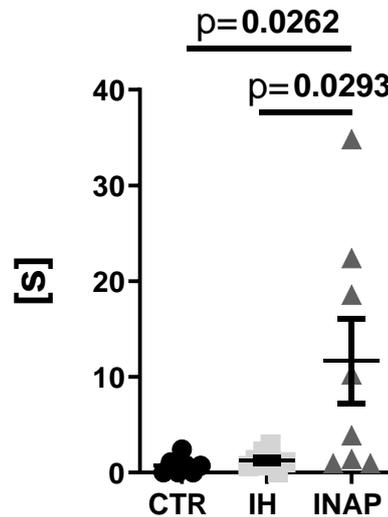


Abb. 49 CTS: induzierbare Vorhofflimmerdauer nach transösophagealer Stimulation mittels des „HSE Stimulator P Typ 201“ (CTR=7, IH=8, INAP=8). CTR Kontrolle. IH „Intermittent Hypoxia“. INAP „Intermittent Negative Airway Pressure“

5.4. Übersicht der Ergebnisse

Interventionsbedingte Änderungen in der Respiration

Eine Minute applizierter Manöver (IH und INAP) erhöhten signifikant Atembemühungen und Atemfrequenzen. Während beider Manöver sank die Sauerstoffsättigung auf vergleichbare Werte.

Linker Ventrikel

Repetitive Applikationen obstruktiv respiratorischer Ereignisse im Sinne der INAP, führten in der ATS zu transienten Anstiegen in der Genexpression Druck- (ANP) und Hypoxie-induzierter (Hif) Marker, welche weniger stark in der IH-Gruppe ausgeprägt war. Nach intermittierendem Einwirken dieser akuten reversiblen Effekte über drei Wochen an jedem zweiten Tag, wiesen lediglich die INAP-Gruppe eine erhöhte interstitielle Fibrose im linken Ventrikel auf, die mit einem moderat erhöhten mittleren arteriellen Druck vergesellschaftet war.

Linker Vorhof

In der ATS führten vier Stunden repetitiver INAP-Manöver, nicht aber IH alleine, zu transienten Abfall der atrialen antioxidativen Kapazität. Dies war innerhalb von 24 Stunden nach einem Versuchstag in den ATS-REC Ratten sowie nach dem letzten Versuchstag in den CTS-Tieren komplett reversibel. In den CTS-Versuchstieren führte eine Applikation des INAP alle zwei Tage über drei Wochen zu einer signifikanten Herabregulation an Connexinen, einem erhöhte interstitielle Fibrosegehalt und zu einem vergrößerten Kardiomyozytendurchmesser im linken Vorhof. Diese Veränderungen waren mit signifikant längeren induzierbaren VHF-Zeiten in Ratten der INAP-Gruppe vergesellschaftet. Die induzierbaren VHF-Zeiten zeigten sich in den Tieren der IH-Gruppe nicht verlängert.

6. Diskussion

Dass OSA mit einem Substrat für VHF vergesellschaftet ist, konnte sowohl in speziellen Tiermodellen für OSA als auch in Patienten mit OSA bereits nachgewiesen werden (Dimitri et al. 2012; Farre et al. 2007; Gami et al. 2004; Iwasaki et al. 2014; Iwasaki et al. 2012; Linz et al. 2011; Ng et al. 2011). Jedoch ist nicht umfassend geklärt, inwiefern Komponenten der OSA, IH oder INAP, zu der Entstehung atrialer Arrhythmien beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Rattenmodell für Schlafapnoe zur Untersuchung der Entstehung atrialer arrhythmogener Substrate entwickelt und charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es in einem neuen Rattenmodell der obstruktiven Schlafapnoe mit zwei unterschiedlichen Interventionsgruppen die Auswirkungen der intermittierenden Hypoxie (IH) und die der intermittierenden Hypoxie in Kombination mit negativen thorakalen Druckschwankungen (INAP) gegenüberzustellen. Zusätzlich wurde untersucht, ob trotz akuter Reversibilität der IH- und INAP-assoziierten Effekte eine kumulative Exposition der Manöver jeden zweiten Tag über drei Wochen, im Sinne einer hohen Nacht-zu-Nacht Variabilität einer OSA, mit der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrates einhergeht (Linz et al. 2019).

Zusammenfassend führten in diesem Tiermodell vier Stunden obstruktiv respiratorischer Ereignisse im Sinne der INAP-Manöver (intermittierende Hypoxie kombiniert mit negativem Atemwegsdruck), aber nicht IH (intermittierende Hypoxie) alleine, zu einem transienten, reversiblen Abfall der anti-oxidativen Kapazität im Vorhof. Die kumulative Exposition gegenüber transienter Abfälle der antioxidativen Kapazität mit kompletter Reversibilität war mit der Entstehung eines atrialen arrhythmogenen Substrats mit einer erhöhten VHF-Anfälligkeit assoziiert.

6.1. Validierung des Modells

Zur Validierung dieses Modells wurden einerseits die Effekte der IH- und INAP-Manöver auf klinische Parameter (Atemfrequenz, Atembemühungen) als auch auf verschiedene biochemische Parameter im linken Ventrikelgewebe der Tiere bestimmt, die den Einfluss hämodynamischer und hypoxievermittelter Stressoren auf das Herz widerspiegeln.

Atemfrequenzantwort und Atembemühungen auf IH- und INAP-Manöver

Die Ergebnisse der Atemfrequenzantwort auf ein einminütiges Manöver (IH, INAP) zeigten, dass jedes Manöver für sich nach einminütiger Applikation zu einem signifikanten Anstieg der Atemfrequenz führte. Zwar führte die Abwesenheit des Narkosegases über eine Minute bei den Kontrollen zu einem Anstieg der Atemfrequenz, doch war dieser Unterschied geringer ausgeprägt im Vergleich zu den Frequenzänderungen der Interventionsgruppen. Dies zeigt, dass der Unterschied in den Kontrollen durchaus als Aufwachreaktion gewertet werden kann, jedoch lag bei den Interventionsgruppen die

selbige Aufwachreaktion vor, da auch diese Gruppen während der einminütigen Manöver keine Narkose erhielten, und somit durch einen additiven Effekt der applizierten Manöver potenziert wurden.

Bezüglich der Atembemühungen war zu sehen, dass sowohl eine Minute der angewandten intermittierenden Hypoxie sowie eine Minute der intermittierenden Hypoxie und der negativen Atemdrücke zu angestrengteren Atemmustern führten. Dies ist kongruent zu den Erkenntnissen aus der Auswertung der Atemfrequenz und spiegelt einen möglichen sympathischen Stressor wider der im Laufe der Manöver auf die Versuchstiere einwirkte.

Akute Effekte: linker Ventrikel

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass bereits nach einem einmaligen vierstündigen Schlafapnoeereignis (entsprechend einer OSA-Nacht) die Expression unterschiedlicher Gene im linken Ventrikel Änderungen unterlag. Zu sehen war, dass in der INAP-Gruppe die Expression des Hypertrophie-assoziierten Markergens ANP angestiegen war. Da der adäquate Reiz dieses natriuretischen Peptids eine Myokarddehnung des Vorhofes darstellt, ist anzunehmen, dass entweder kardiale Druckalteration während simulierter obstruktiv respiratorischer Ereignisse in der INAP-Gruppe einen bereits suffizienten Stimulus darstellten oder, dass weitere ANP stimulierende Faktoren, wie Hypoxie und Herzfrequenzveränderungen, die Sekretion des ANPs beeinflusst haben könnten (Wong et al. 2017). Die Genexpression des BNP, als weiteres natriuretisches Peptid, war in allen Versuchsgruppen unverändert. BNP ist normalerweise weniger ausgeprägt im Ventrikel exprimiert (Fu et al. 2018). Jedoch wird es vor allem bei einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion in den Ventrikeln vermehrt gespeichert und sezerniert, oder wenn es zu transmuralen Druckgradienten und Volumenüberschuss in den Ventrikeln kommt (Fu et al. 2018). Dies würde zu jenen Pathomechanismen passen, die bei obstruktiven Apnoen im Herzen auftreten. In unseren Untersuchungen zeigte sich jedoch akut und nach vierundzwanzigstündiger Pause keine dieser Effekte in der Genexpression.

Als Ausdruck einer ausgeprägten Exposition des Herzens auf Hypoxie, war die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors (Hif-2 α) in der Gruppe der imitierten Schlafapnoe (INAP) gegenüber der Expression der IH-Gruppe erhöht. Der Hypoxie-induzierte Faktor (Hif) spielt eine wesentliche Rolle in der akuten Registrierung der Sauerstoffsättigung im Blut (Semenza 2009). Weiterhin ist eine koordinierte transkriptionelle Aktivierung unabdingbar für eine Adaptation gegenüber chronischer Hypoxie. Bei schlafbezogenen Atmungsstörungen kommt es jedoch durch die unkoordinierte Aktivierung des Hif zu einer Dysregulation der Transkription, die eine Initiierung oxidativen Stresses zur Folge haben kann (Prabhakar and Semenza 2012). In unserem Modell kam es interessanter Weise zu einer signifikant höheren Expression des Hif in den INAP-Tieren verglichen zu den IH-Tieren bei gleicher Sauerstoffsättigungsfrequenz und -tiefe. Da jedoch in der ATS ein Unterschied der Interventionsgruppen zu den Kontrollen ausblieb und nach eingeräumter Erholungspause die INAP-Gruppe eine signifikant erhöhte Expression des Gens aufwies, bleibt die Aussagekraft dieses Faktors fragwürdig. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass INAP, neben der reinen hypoxischen Effekte, einen

zusätzlichen zellulären Stressor darstellt, der zu einer gesteigerten Hif-Expression führen kann (Weidemann et al. 2008).

Die Expression des pro-fibrotischen Gens CTGF wies keine Veränderungen auf. Dies könnte daher rühren, dass der Versuchsaufbau in der vierstündigen akuten Testserie schlichtweg zu kurz war, um auf den redox-sensitiven pro-fibrotischen Faktor einzuwirken oder, dass der entstehende oxidative Stress durch die Redox-systeme der Zelle umgehend entgiftet und neutralisiert wurde (Park et al. 2001).

Chronische Effekte: linker Ventrikel

Auch nach dreiwöchiger Versuchslaufzeit wiesen die Genexpressionen des BNP und des Hypoxie-induzierten Faktors keine wesentlichen Unterschiede auf. Zu erkennen war eine Tendenz zwischen der INAP-Gruppe und den Kontrollen hinsichtlich des Hypoxie-induzierten Faktors (Hif1 α), welche in Zusammenschau der Ergebnisse der akuten Testreihe am ehesten als allgemeiner Parameter für ein Einwirken oxidativen und hypoxischen Stresses angesehen werden (Lavie 2003). Jedoch bleibt darüber hinaus ein weiterer Schluss über definitive Pathomechanismus aus.

In der CTS ist nach der Tötung der Tiere das Organgewicht des Herzens und der Lunge untersucht worden. Das Herzgewicht in Relation zur Tibialänge sollte aufzeigen, inwiefern sich die Manöver per se oder bereits Anpassungsmechanismen auf die Manöver, z.B. im Sinne einer Hypertrophie, manifestiert haben. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die in Relation gesetzten Herzgewichte keinerlei Unterschiede innerhalb der Gruppen aufwiesen und sich somit die genannten Anpassungsmechanismen zumindest nicht in Veränderung des Herzgewichtes widerspiegeln haben. Das Lungengewicht, welches als Quotient aus Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht angegeben wurde, ergab keinen Anhalt auf pulmonale Flüssigkeitsansammlung. Somit lässt dieser Parameter nicht darauf schließen, dass die Interventionsmanöver, insbesondere das INAP-Manöver, eine lungenschädigende Wirkung hatte und somit Ergebnisse hätte verfälscht werden können.

Die Histologie des linken Ventrikels, als Parameter zur Detektion pathologischer Anpassungsmechanismen gegenüber den angewandten Interventionen, war eine sensitivere Ergänzung zum alleinigen Herzgewicht. Während sich die Kardiomyozytendurchmesser als unverändert im Vergleich der Gruppen zueinander zeigten, wies die interstitielle Fibrose einen signifikant höheren Anteil der INAP-Gruppe im Vergleich zur IH-Gruppe und zur Kontrollgruppe auf. Dies ist ein erstes Anzeichen einer pathologischen Kompensation auf die intermittierenden negativen Atemdrücke (INAP). Hypoxie scheint in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle zu spielen, da in der IH-Gruppe kein Effekt zu sehen und darüber hinaus die Hypoxielast in beiden Interventionsgruppen gleich war. Gemäß den Erkenntnissen über intrakardiale Druckänderungen während eines ineffektiven Atemversuchs gegen verschlossene Atemwege, erhöhen sich durch gesteigerte Vorlast die Drücke im rechten Ventrikel, die wiederum zu einem Verlegen des linksventrikulären Ausflusstraktes führen, was ebenso Drücke im linken Ventrikel ansteigen lässt und die allgemeine linksventrikuläre Funktionstüchtigkeit beeinträchtigt (Dempsey et al. 2010; Kasai and Bradley 2011; Linz et al. 2017).

Dieser Mechanismus spielte sich in der INAP-Gruppe während eines jeden ineffektiven Atembemühens ab und kann auf den entscheidenden Unterschied hinweisen, warum sich ein erhöhtes Maß an interstitieller Fibrose ausschließlich in der Gruppe zeigte die obstruktiv respiratorische Ereignisse simulierte. In Einklang hiermit, zeigte der Blutdruck als klinisch messbare Größe ebenfalls Veränderungen. In den Tieren der INAP-Versuchsgruppe war der nicht invasiv gemessene mittlere arterielle Blutdruck nach der dreiwöchigen Versuchsreihe signifikant erhöht, wohingegen die IH-Tiere zu den Kontrollen keine Unterschiede aufwiesen. Die strukturellen Veränderungen im Ventrikel spiegelten sich jedoch nicht in ausgeprägten Alterationen der invasiv gemessenen linksventrikulären Drücke wider.

6.2. Akute Effekte obstruktiv respiratorischer Ereignisse im Vorhof

Die akuten Effekte intermittierender Hypoxie und kombinierter obstruktiv respiratorischer hypoxischer Ereignisse, wie sie in dem vorliegenden Rattenmodell appliziert worden sind, wurden durch die ATS demonstriert.

Die Ergebnisse des oxidativen Stresses im linken Vorhof wiesen auf eine akut verminderte antioxidative Kapazität hin. In der INAP-Gruppe zeigte sich ein signifikant erniedrigter Quotient aus GSH/GSSG im Vergleich zu den Kontrollen. Wie bereits beschrieben, weist ein geringerer Quotient auf ein Überwiegen des oxidierten Glutathions und/oder ein reduziertes Glutathion hin. Beides spricht für ein hohes Ausmaß oxidativen Stresses und somit für eine erniedrigte antioxidative Kapazität aufgrund der Entgiftung von H₂O₂ und der damit verbundenen Oxidation von Glutathion (Zhang and Forman 2012). Nach bereits vierundzwanzig Stunden erwies sich dieser Effekt als reversibel. Die mittlere Sauerstoffsättigung der einzelnen Gruppen in der ATS und ATS-REC zeigen ähnliche Ergebnisse des Abfalls der antioxidativen Kapazität und bestätigen, dass in beiden Gruppen die Sauerstoffsättigung auf vergleichbare Niveaus absank. Interessanter Weise, zeigte sich im Vorhof bezüglich des oxidativen Stresses ebenfalls, dass das INAP-Manöver einen größeren Effekt auf die Reduktion der atrialen anti-oxidativen Kapazität hat als die IH-Manöver. Rattenmodelle weisen darauf hin, dass repetitive myokardiale Dehnungen dehnungssensitive und oxidative, stressensitive, profibrotische Signalkaskaden in Gang setzen (Shyu 2009; Wang et al. 2009). Dies lässt darauf schließen, dass ebenso bei den INAP-Manövern durch ausgeprägte thorakale Druckschwankungen Signalkaskaden in Gang gesetzt wurden, die vermehrt die anti-oxidative Kapazität mindern im Vergleich zur alleinigen Applikation intermittierender Hypoxie (Kim et al. 2018).

6.3. Das arrhythmogene Substrat für Vorhofflimmern

In unserem Langzeitversuch wurde untersucht, inwiefern ein repetitives Einwirken der akuten, transienten und partiell reversiblen Effekte kumulativ zur Bildung eines Substrates für VHF beitragen.

Die chronische Testserie zeigte, dass die VHF Induzierbarkeit durch transösophageale Stimulation in der Versuchstiergruppe mit den intermittierenden negativen Atemwegsdrücken in Kombination mit Hypoxie (INAP) signifikant erhöht war im Vergleich zu der Gruppe der intermittierenden Hypoxie und den Kontrolltieren. Dies weist auf eine deutliche Relevanz intrathorakaler Druckschwankungen für die Entstehung eines VHF Substrates bei OSA hin. Wie in der Pathogenese der OSA bereits erörtert, wird bei einem Patienten mit OSA mit jedem obstruktiven Ereignis bei erhaltenem Atemantrieb ein ausgeprägter negativ thorakaler Druck aufgebaut (Dempsey et al. 2010; Linz et al. 2017; Ryan and Bradley 2005). Dieser Unterdruck führt zu einem repetitiven mechanischen Stress des Myokards durch die direkte Wirkung des Unterdrucks auf das Myokard sowie einer indirekten veränderten Hämodynamik, die die alterierten transmuralen Drücke im Herzen potenziert (Kasai and Bradley 2011; Ryan and Bradley 2005). Wie unser Modell zeigt, scheint der applizierte Unterdruck ausschlaggebend für das Einwirken des oxidativen Stresses auf die anti-oxidative Kapazität zu sein. Vier Stunden INAP in der ATS waren mit einer Reduktion der antioxidativen Kapazität assoziiert, die sich nach 24 Stunden Erholungspause in der ATS-REC reversibel zeigte. Auch in der chronischen Testreihe waren 24 Stunden nach dem letzten IH- oder INAP-Manöver diese Veränderungen der antioxidativen Kapazität reversibel. Nichtsdestotrotz wies die antioxidative Kapazität in der CTS eine Korrelation mit der Histologie auf, was darauf hinweisen könnte, dass durch INAP-induzierte thorakale Druckschwankungen atrialer oxidativer Stress induziert wurde, der wiederum Ausgangspunkt für profibrotische Signalwege sein kann und ein wichtiger Hinweis zur Klärung des entstandenen atrialen arrhythmogenen Substrates wäre (Shyu 2009; Wang et al. 2009).

Die histologische Auswertung der linken Vorhöfe zeigte hinsichtlich atrialer Kardiomyozytendiameter und interstitieller Fibrose lediglich eine Tendenz zu einer vermehrten Fibroseformation und Hypertrophie in der Gruppe der simulierten Schlafapnoe auf. Trotz allem zeigte sich eine Korrelation zwischen interstitieller Fibrose und Höhe der antioxidativen Kapazität. Die Korrelation spiegelt wider, dass sowohl ein geringer GSH-Wert als auch eine geringere Ratio aus GSH/GSSG mit einem höheren Anteil an interstitieller Fibrose vergesellschaftet war. Obwohl eine Korrelation keinen Schluss über kausale Zusammenhänge ziehen lässt, war zu erkennen, dass bei zunehmendem oxidativen Stress, wie er zum Beispiel in der ATS vor allem in den INAP-Tieren zu verzeichnen war, auf Dauer trotz der intermittierenden Reversibilität eine ausgeprägtere interstitielle Fibrose entstand. Interstitielle Fibrose ist insbesondere durch eine Zunahme der extrazellulären Matrix zwischen den Kardiomyozyten charakterisiert, wodurch die Zellen voneinander isoliert werden und so deren Kommunikation erschwert wird (Xintarakou et al. 2020). Dies führt zu einer zunehmenden Inhomogenität der atrialen lokalen Erregungsleitung und zu intraatrialen Leitungsstörungen (Khalyfa and Gozal 2018). Zusätzlich kann auch eine Zunahme der Zellgröße im Sinne der Hypertrophie die Leitungsfähigkeit des Myokards beeinflussen, was zu einer abnormen Anisotropie der Erregungsleitung führt (Nattel 2017). Hiermit in Einklang zeigte die Expression der Connexine in der immunhistologischen Färbung, dass diese in durch IH und INAP signifikant reduziert war. Dass die Reduktion der Connexine durch IH und INAP induziert

wurde, lässt vermuten, dass dieser Pathomechanismus mehr durch intermittierende Hypoxie getriggert wird als durch die Druckalterationen des INAP-Manövers. Nichtsdestotrotz scheint dieser Mechanismus nur Teil des arrhythmogenen Substrates zu sein, da die induzierten Vorhofflimmerzeiten trotz allem in den INAP-Tieren ausgeprägt länger waren als in den IH-Tieren.

Der zeitliche Verlauf der Entstehung des arrhythmogenen Substrates gestaltet sich sukzessiv kumulativ an acht Versuchstagen über drei Wochen hinweg. An jedem dieser Versuchstage waren die Rattenvorhöfe durch vierstündige repetitive INAP-Manöver mechanischem und oxidativem Stress ausgesetzt, der sich im Laufe des Erholungstages wieder normalisierten. Über die Zeit jedoch löste der oxidative Stress ein sich progressiv entwickelndes Substrat aus, bis dieses sich an die Vorhofflimmerschwelle angenähert hatte. Hinzu kommen hier noch die akuten nächtlichen arrhythmogenen Veränderungen (z.B. verkürzte atriale Repolarisation), die in diesem Modell nicht nachgewiesen wurden, die jedoch mit OSA vergesellschaftet sind und bereits in vorherigen Arbeiten dargelegt wurden (Linz et al. 2011). Zusammen gesehen, führten diese intermittierend zum Überschreiten der VHF-Schwelle.

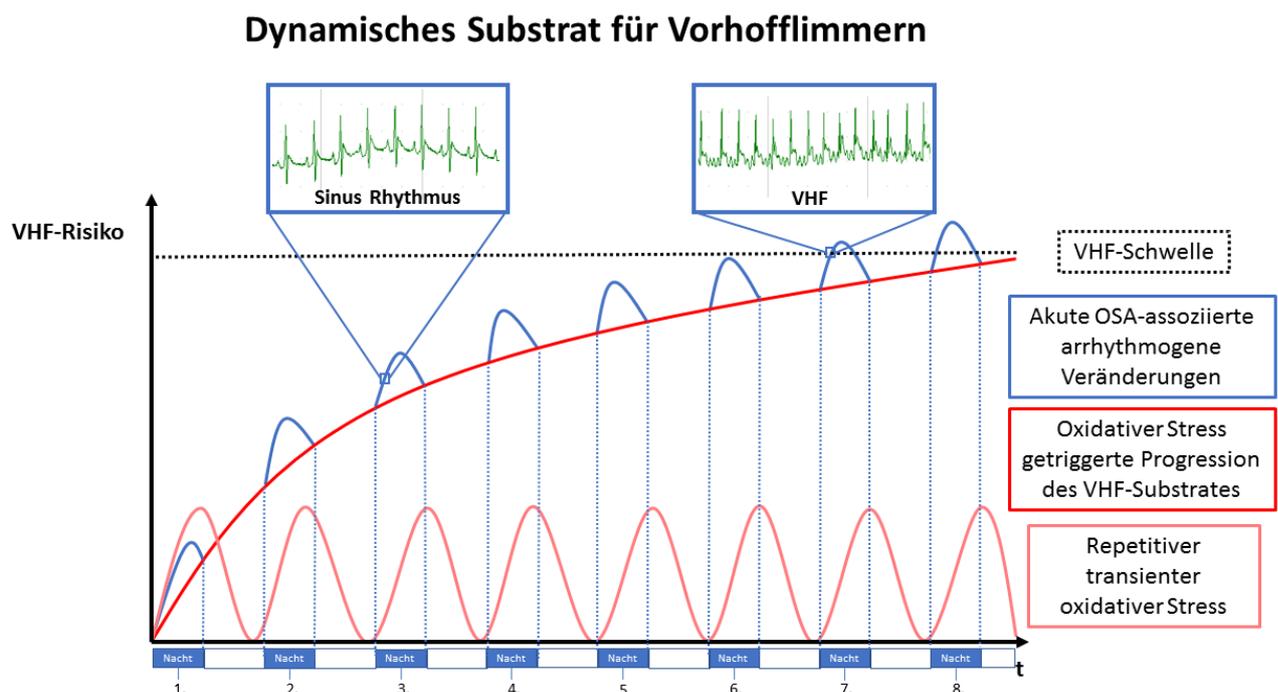


Abb. 50 Dynamisches Substrat für Vorhofflimmern

Unser Langzeitmodell spiegelt mit seinem dynamischen Verlauf das Phänomen der erwähnten Nacht-zu-Nacht-Variabilität wider. Daher, dass gerade in der chronischen Versuchsreihe lediglich jeden zweiten Tag bzw. Nacht die Manöver appliziert worden sind, repräsentiert die CTS einerseits ein relevantes in der Klinik zu Problemen führendes Phänomen und darüber hinaus einen realistischen Verlauf einer OSA, wie sie in der Klinik zu sehen ist (Dzierzewski 2020; Linz et al. 2019).

Vergleiche zu anderen Arbeiten

Atriale Substrate für Vorhofflimmern wurden bereits im Menschen untersucht. In Patienten mit OSA wurden in klinischen Studien abnormale atriale Fortleitungsstörungen, längere Sinusknotenerholungszeiten und vergrößerte Vorhöfe nachgewiesen (Dimitri et al. 2012). Darüber hinaus untersuchten auch andere Gruppen OSA-vermittelte Stressoren für Vorhofflimmern. So untersuchte unter anderem Iwasaki et al. Langzeiteffekte obstruktiv respiratorischer Ereignisse an der Ratte. Anästhesierte Ratten wurden hierfür über einen Zeitraum von vier Wochen an fünf Tagen pro Woche intubiert. Über diese Intubation erfuhren die Ratten 20 konsekutive Okklusionen der Intubation für je 40 Sekunden. In diesen Tieren konnte gezeigt werden, dass verglichen zu Kontrollen sich ein VHF begünstigendes atriales Remodelling einstellte. Die Ratten zeigten eine erhöhte atriale Fibrose und Reduktion der atrialen Konduktion, die in Verbindung mit einer Dysregulation von Connexinen gebracht werden konnten. Induzierbare VHF-Dauern waren in diesen Tieren signifikant erhöht. Darüber hinaus führten die obstruktiven Manöver zu linksventrikulärer Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion (Iwasaki et al. 2014).

Interessanterweise zeigte sich in unserem Modell bereits ein Substrat für VHF nach vergleichsweise milder Applikation unserer obstruktiv respiratorischen Ereignisse (INAP-Manöver) in Hinsicht Frequenz und Tiefe der Unterdrücke der Manöver. Wohingegen Iwasaki et al. einen negativen thorakalen Druck von -50 mmHg (= - 66,6 mBar) applizierten, war dieser in unserem Modell -40 mBar. Jedoch wurden bei leichten Undichtigkeiten des Systems, z.B. durch das Fell der Ratte am Kopf, welches die Dichtigkeit der Maske minderte, regulär ein Druck von -20 bis -25 mBar erreicht. Im Gegensatz zu Iwasakis Intubationsmodell bietet unser Modell eine Methode der nicht-invasiven Applikation eines negativen Atemwegdruckes. Außerdem wurden im Modell von Iwasaki et al. über vier Wochen, fünf Tage pro Woche, Ratten intubiert und 20 konsekutive Okklusionen über Intubation für je 40 Sekunden appliziert. In unserem Modell hingegen erfuhren Ratten in der CTS ein einminütiges Manöver alle zehn Minuten über vier Stunden an acht Versuchstagen über drei Wochen hinweg, welches eine leicht bis moderate Schlafapnoeschwere mit hoher Nacht-zu-Nacht Variabilität widerspiegelt.

Drückt man den Unterschied in Zahlen aus, ist in dem beschriebenen Intubationsmodell ein AHI von 30/h appliziert worden (Iwasaki et al. 2014), was im klinischen Alltag als hochgradige OSA klassifiziert wird. In unserem Modell dagegen ist in der ATS ein AHI von 12/h und in der CTS lediglich ein AHI von 6/h appliziert worden. Unser Modell mag einen Hinweis mehr geben, dass in Hinsicht auf Prognose und Prädiktion des Vorhofflimmerrisikos der AHI kein geeigneter Parameter ist. Darüber hinaus sei zu nennen, dass die CTS unseres Modelles im Gegensatz zu bestehenden Modellen den Aspekt der Nacht-zu-Nacht-Variabilität miteinschließt, wodurch sich das bereits bei einem AHI von 6 entstehende Substrat für VHF erklären könnte (Dzierzewski 2020; Linz et al. 2019).

Weitere OSA-Modelle untersuchten akute hämodynamische und elektrophysiologische Veränderungen in anästhesierten Schweinen, bei welchen über einen Trachealtubus ein Unterdruck appliziert wurde (Linz et al. 2014a). Während einer einminütigen Applikation eines intratrachealen Unterdrucks von -

100 mbar kam es in den Vorhöfen zu einer parasympathisch vermittelten Verkürzung der atrialen Repolarisation und zu einer sympathisch vermittelten Verlängerung der ventrikulären Repolarisation (Linz et al. 2016b). In Kongruenz zu diesen elektrophysiologischen Veränderungen kam es vereinzelt zu spontan einsetzendem VHF (Linz et al. 2013). Postapnöisch zeigten diese Schweine einen Blutdruckanstieg (Linz et al. 2011).

In unserem Model hingegen, haben wir keine invasiven elektrophysiologischen Untersuchungen durchführen können, jedoch ist unser Versuchsaufbau nach unserem Wissen der erste, der die Langzeiteffekte intermittierender Hypoxie und intermittierender Hypoxie in Kombination mit thorakalen Druckschwankungen gegenüberstellt.

6.4. Limitationen des Modells

Das vorgestellte Modell hatte die Veranschaulichung und nähere Charakterisierung der obstruktiven Schlafapnoe zum Ziel. Jedoch ergeben sich Limitationen, welche bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Zu nennen sei hier an erster Stelle, dass Ratten als Versuchstiere verwendet wurden und diese trotz all ihrer Ähnlichkeit zur menschlichen Physiologie nie eine vollständige Kongruenz aufweisen können. Darüber hinaus sind auf Grund besserer Ausgangsbedingungen gesunde und gleichalte Ratten für die Experimente herangezogen worden, die das heterogene Bild der obstruktiven Schlafapnoe bei, in der Regel kardiovaskulär vorbelasteten Patienten, nicht in jeder Hinsicht adäquat widerspiegeln können. Demnach muss berücksichtigt werden, dass keine lineare Verhältnismäßigkeit zwischen Stimulus und Reizantwort gegeben ist. Das soll heißen, dass der Effekt der Applikation des negativ thorakalen Druckes auf den Thorax sowie das Herz des Versuchstieres nicht in direktem Ursachen-Wirkungsverhältnis zu einer identischen Applikation des Stimulus auf ein menschliches eventuell vorerkranktes Herz gestellt werden darf.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Ratten einem anderen Tag-Nacht-Rhythmus folgen als der Mensch. Aufgrund ihrer Nachtaktivität erfolgten in vorgestelltem Modell daher alle Versuche am Tage, um dem physiologischen Schlafrythmus der Ratte entgegenzukommen.

Wie in dem Versuchsablauf beschrieben, erfolgte die Narkose mit Isofluran. Zwar wurde auf der einen Seite die Narkose sehr flach gehalten, um der Ratte ihren eigenen Atemantrieb nicht zu nehmen, doch musste auf der anderen Seite gewährleistet sein, dass die Narkose so tief ist, um dem sympathogenen Trigger der Apnoe standzuhalten, damit die Ratte nicht vollständig erwacht. Durch die Narkose ist zwar ein „schlafähnlicher“ Zustand erreicht worden, aber ist dieser nicht vollends gleichzusetzen mit dem physiologischen Ablauf des Schlafes. Um diesen Faktor zu relativieren, schliefen die Kontrolltiere unter gleicher Gasnarkose wie die Tiere der Interventionsgruppe.

Betrachtet man neben den Versuchstieren den apparativen Aufbau und den Versuchsablauf des Modells, wird ersichtlich, dass sich auch hier Diskrepanzen zwischen klinischer Realität und Labor auf tun. Aufgrund besserer Vergleichbarkeit zwischen den Interventionsgruppen folgten die Manöver einem

strengen zeitlichen Ablauf und jeweils im Rahmen gewisser Einschränkungen. Zu nennen wäre hier beispielsweise der strenge zeitliche Rahmen, der feste Pausen und Manöverzeiten vorgab. Dies ist natürlich, um eine fundierte wissenschaftliche Aussage zu treffen unabdingbar, doch besteht auch hierbei ein modifiziertes Bild der OSA, welches in dieser festen modellierten Struktur sich von dem klinischen Bild einer OSA abhebt.

Weiterhin ist anzumerken, dass in dem Versuch die OSA möglichst genau zu imitieren, zwar erfolgreich ein negativer Druck über die Atemwege appliziert worden ist, jedoch der über das Druckmessgerät gemessene Unterdruck nicht zwangsläufig den wahren Unterdruck im Thorax widerspiegelt.

Zuletzt sei anzumerken, dass die reine Form der OSA, wie sie in diesem Modell simuliert wurde, ebenfalls im klinischen Alltag selten zu finden ist. Zumeist handelt es sich bei Patienten mit Schlafapnoe, um ein gemischtes klinisches Bild aus zentralen und obstruktiven Apnoen (Linz et al. 2017).

Trotz der angeführten Limitationen des Modells, die bei Betrachtung und Beurteilung der Ergebnisse wichtig sind, sind diese notwendig gewesen, um einen strukturierten und standardisierten Versuchsablauf und Aufbau zu gestalten. Darüber hinaus waren viele der Einschränkungen unabdingbar, um aus den Versuchen valide Ergebnisse zu produzieren und schlüssige Interpretationen zu erlauben.

6.5. Klinische Implikationen

VHF ist die häufigste anhaltende Rhythmusstörung des Menschen (Chugh et al. 2014). Wie in der Einleitung beschrieben, finden sich bei Patienten mit VHF eine Reihe kardiovaskulärer Komorbiditäten, zu denen besonders auch die obstruktive Schlafapnoe zu zählen ist (Kirchhof et al. 2016a). Aufgrund der hohen Prävalenz und epidemiologischer Verknüpfung der OSA und des VHF bedarf es weiterer eingehender Charakterisierung der Pathogenese des VHF bei Patienten mit OSA. Um diese Verbindung näher zu charakterisieren ist das hier beschriebene Rattenmodell etabliert worden. Ziel war es die pathophysiologischen Aspekte der OSA, die zu einem Substrat für VHF beitragen, zu differenzieren. Wie in der Diskussion gezeigt, war die Kombination aus intermittierender Hypoxie und negativ thorakalem Druck (INAP) hinsichtlich der Entstehung des VHF in unserem Modell ein ausschlaggebender pathologischer Faktor.

Aktuell wird zur Klassifikation der Schwere der OSA noch der Apnoe/Hypopnoe-Index (AHI) verwendet. Im vorliegenden Modell haben wir in den akuten Experimenten ein Apnoe/Hypopnoe-Index von 12/h und in den chronischen Experimenten ein Apnoe/Hypopnoe-Index von 6/h simuliert. Im klinischen Alltag würden beide gemessenen Werte als leichte oder moderate OSA eingestuft (Kapur et al. 2017), was auch jenem OSA-Schweregrad entspricht, der bei den meisten VHF-Patienten diagnostiziert wird (Kadhim et al. 2019). Trotz der leichten bis moderaten OSA zeigten sich in den akuten wie auch in den chronischen Testreihen tiefgreifende und weitreichende pathophysiologische

Veränderungen. Dies zeigt, dass der AHI zur Klassifikation der OSA gemessen anhand unseres Modelles nicht adäquat die Schwere des kardialen Schadens widerspiegelt. Ein weiterer Faktor, den unser Modell einschloss ist die Nacht-zu-Nacht-Variabilität, die in bereits bestehenden OSA-Modellen nach unserem Kenntnisstand nicht zu finden ist (Farre et al. 2007; Iwasaki et al. 2014; Iwasaki et al. 2012; Linz et al. 2011). Diese Variabilität, die in diesem Rattenmodell imitiert wurde durch die Applikation der Manöver lediglich über jeden zweiten Tag, kann Ausdruck dessen sein, dass der AHI einer einzigen Polygraphie als Prädiktor der Schwere der OSA unzulänglich ist. Das Problem, das bei dieser Variabilität auftritt und durch unseren Versuch ebenso gezeigt wurde, ist, dass nicht zwangsweise ein konstant hoher AHI jede Nacht zu pathophysiologischen Veränderungen und Konsequenzen führen muss, sondern auch ein moderater oder geringer AHI jede zweite Nacht bereits in der Lage ist zu unserem dargestellten Substrat für VHF zu führen. Kliniker stellt diese Erkenntnis vor das Problem, dass somit eine einzige nächtliche unauffällige Polygraphie bei einem Patienten mit OSA-assoziierten Begleiterkrankungen wenig aussagekräftig sein kann, da eventuell gerade eine Nacht, in der der Patient wenige Apnoen hat, aufgezeichnet worden ist (Dzierzewski 2020; Linz et al. 2019).

Auch in anderen Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass der AHI nicht der die Krankheitsschwere am besten klassifizierende Parameter ist (Linz et al. 2019). Diese Studien belegen, dass der AHI nicht adäquat die Hypoxielast widerspiegelt und daher auch nicht angemessen mit dem allgemeinen kardiovaskulären Risiko und der Krankheitsschwere korreliert (Khoshkish et al. 2018; Linz et al. 2018a). Auf pathomechanistischer Ebene sei abschließend nochmals erwähnt, dass gerade unser Modell aufgezeigt hat, dass die Pathologie der obstruktiven Schlafapnoe nicht ausschließlich durch das Einwirken der intermittierenden Hypoxie auf den Organismus zu erklären ist. Wie das beschriebene Modell belegt hat, ist insbesondere in Hinsicht auf die Entstehung des arrhythmogenen atrialen Substrates der negativ thorakale Druck der entscheidende additive Faktor zur intermittierenden Hypoxie. In Bezug auf Patienten mit OSA wird dies insofern relevant werden, dass die Therapie der OSA-Patienten mit koexistierendem VHF zunehmend an Bedeutung gewinnt. Wie eingangs dargelegt konnten Studien bereits demonstrieren, dass bei Patienten mit OSA und koexistierendem VHF eine CPAP-Therapie ebenso effektiv sei wie eine Pulmonalvenenisolation in Hinsicht auf den Therapieverlauf des VHF (Fein et al. 2013). Wenn man davon ausgeht, dass eine CPAP-Therapie suffizient Apnoen und den damit verbundenen negativ thorakalen Druck verhindern kann, gliedern sich die Ergebnisse unseres Modells sehr gut in die Ergebnisse der klinischen Studien ein. Nichtsdestotrotz bleiben weitere groß angelegte randomisierte Studien zu diesem Themenkomplex unabdingbar, um die Kausalität zwischen intermittierendem negativem Atemwegsdruck und Hypoxie und VHF weiter zu klären.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmadi N, Shapiro GK, Chung SA, Shapiro CM (2009) Clinical diagnosis of sleep apnea based on single night of polysomnography vs. two nights of polysomnography *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* 13:221-226 doi:10.1007/s11325-008-0234-2
- Allessie MA, de Groot NM, Houben RP, Schotten U, Boersma E, Smeets JL, Crijns HJ (2010) Electropathological substrate of long-standing persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: longitudinal dissociation *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 3:606-615 doi:10.1161/circep.109.910125
- Arzt M et al. (2006) Sleepiness and sleep in patients with both systolic heart failure and obstructive sleep apnea *Arch Intern Med* 166:1716-1722 doi:10.1001/archinte.166.16.1716
- Berry RB et al. (2012) Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine* 8:597-619 doi:10.5664/jcsm.2172
- Choi SJ, Lee SI, Joo EY (2016) Habitual Alcohol Consumption and Metabolic Syndrome in Patients with Sleep Disordered Breathing *PLoS one* 11:e0161276 doi:10.1371/journal.pone.0161276
- Chugh SS et al. (2014) Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study *Circulation* 129:837-847 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119
- Colilla S, Crow A, Petkun W, Singer DE, Simon T, Liu X (2013) Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population *The American journal of cardiology* 112:1142-1147 doi:10.1016/j.amjcard.2013.05.063
- Corra U et al. (2006) Sleep and exertional periodic breathing in chronic heart failure: prognostic importance and interdependence *Circulation* 113:44-50 doi:10.1161/circulationaha.105.543173
- Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP (2010) Pathophysiology of sleep apnea *Physiol Rev* 90:47-112 doi:10.1152/physrev.00043.2008
- Dimitri H et al. (2012) Atrial remodeling in obstructive sleep apnea: implications for atrial fibrillation *Heart Rhythm* 9:321-327 doi:10.1016/j.hrthm.2011.10.017
- Dzierzewski JM (2020) Night-to-Night Fluctuations in Sleep Apnea Severity: Diagnostic and Treatment Implications *J Clin Sleep Med* doi:10.5664/jcsm.8272
- Ehrlich JR, Hohnloser SH, Nattel S (2006) Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence *European heart journal* 27:512-518 doi:10.1093/eurheartj/ehi668
- Farre R, Nacher M, Serrano-Mollar A, Galdiz JB, Alvarez FJ, Navajas D, Montserrat JM (2007) Rat model of chronic recurrent airway obstructions to study the sleep apnea syndrome *Sleep* 30:930-933 doi:10.1093/sleep/30.7.930
- Fein AS et al. (2013) Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation *J Am Coll Cardiol* 62:300-305 doi:10.1016/j.jacc.2013.03.052
- Fu S, Ping P, Wang F, Luo L (2018) Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure *Journal of biological engineering* 12:2 doi:10.1186/s13036-017-0093-0
- Gami AS et al. (2004) Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea *Circulation* 110:364-367 doi:10.1161/01.CIR.0000136587.68725.8E
- Gammoudi N, Ben Cheikh R, Saafi MA, Sakly G, Dogui M (2015) Cardiac autonomic control in the obstructive sleep apnea *The Libyan journal of medicine* 10:26989 doi:10.3402/ljm.v10.26989
- Haissaguerre M et al. (1998) Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins *The New England journal of medicine* 339:659-666 doi:10.1056/nejm199809033391003

- Hayashi H et al. (2002) Aging-related increase to inducible atrial fibrillation in the rat model *Journal of cardiovascular electrophysiology* 13:801-808
- Heinzer R et al. (2015) Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study *The Lancet Respiratory medicine* 3:310-318 doi:10.1016/s2213-2600(15)00043-0
- Hohl M et al. (2017) Concomitant Obesity and Metabolic Syndrome Add to the Atrial Arrhythmogenic Phenotype in Male Hypertensive Rats *J Am Heart Assoc* 6 doi:10.1161/jaha.117.006717
- Iftikhar IH et al. (2014) Effects of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: a meta-analysis *J Hypertens* 32:2341-2350; discussion 2350 doi:10.1097/HJH.0000000000000372
- Iwasaki YK et al. (2014) Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model *J Am Coll Cardiol* 64:2013-2023 doi:10.1016/j.jacc.2014.05.077
- Iwasaki YK, Shi Y, Benito B, Gillis MA, Mizuno K, Tardif JC, Nattel S (2012) Determinants of atrial fibrillation in an animal model of obesity and acute obstructive sleep apnea *Heart Rhythm* 9:1409-1416 e1401 doi:10.1016/j.hrthm.2012.03.024
- Kadhim K et al. (2019) Self-Reported Daytime Sleepiness and Sleep-Disordered Breathing in Patients With Atrial Fibrillation: SNOozE-AF *Can J Cardiol* 35:1457-1464 doi:10.1016/j.cjca.2019.07.627
- Kanagala R et al. (2003) Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation *Circulation* 107:2589-2594 doi:10.1161/01.CIR.0000068337.25994.21
- Kapur VK, Auckley DH, Chowdhuri S, Kuhlmann DC, Mehra R, Ramar K, Harrod CG (2017) Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline *J Clin Sleep Med* 13:479-504 doi:10.5664/jcsm.6506
- Kasai T, Bradley TD (2011) Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications *J Am Coll Cardiol* 57:119-127 doi:10.1016/j.jacc.2010.08.627
- Kasai T, Floras JS, Bradley TD (2012) Sleep apnea and cardiovascular disease: a bidirectional relationship *Circulation* 126:1495-1510 doi:10.1161/circulationaha.111.070813
- Kernan WN et al. (2014) Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association *Stroke* 45:2160-2236 doi:10.1161/str.0000000000000024
- Khalyfa A, Gozal D (2018) Connexins and Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea *Current sleep medicine reports* 4:300-311 doi:10.1007/s40675-018-0130-7
- Khoshkish S et al. (2018) The association between different features of sleep-disordered breathing and blood pressure: A cross-sectional study *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 20:575-581 doi:10.1111/jch.13202
- Kim HK et al. (2018) Cyclic stretch increases mitochondrial biogenesis in a cardiac cell line *Biochemical and biophysical research communications* 505:768-774 doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.003
- Kirchhof P et al. (2016a) 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS *Europace* 18:1609-1678 doi:10.1093/europace/euw295
- Kirchhof P et al. (2016b) 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS *Eur Heart J* 37:2893-2962 doi:10.1093/eurheartj/ehw210
- Kirchhof P, Curtis AB, Skanes AC, Gillis AM, Samuel Wann L, John Camm A (2013) Atrial fibrillation guidelines across the Atlantic: a comparison of the current recommendations of the European Society of Cardiology/European Heart Rhythm Association/European Association of Cardiothoracic Surgeons, the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association/Heart Rhythm Society, and the Canadian Cardiovascular Society *European heart journal* 34:1471-1474 doi:10.1093/eurheartj/ehs446
- Kleber AG, Rudy Y (2004) Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias *Physiological reviews* 84:431-488 doi:10.1152/physrev.00025.2003
- Kohler M, Stradling JR (2010) Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea *Nature reviews Cardiology* 7:677-685 doi:10.1038/nrcardio.2010.145

- Kuck KH et al. (2016) Impact of Complete Versus Incomplete Circumferential Lines Around the Pulmonary Veins During Catheter Ablation of Paroxysmal Atrial Fibrillation: Results From the Gap-Atrial Fibrillation-German Atrial Fibrillation Competence Network 1 Trial *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 9:e003337 doi:10.1161/circep.115.003337
- Lau DH, Nattel S, Kalman JM, Sanders P (2017) Modifiable Risk Factors and Atrial Fibrillation *Circulation* 136:583-596 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023163
- Lau DH et al. (2013) Atrial arrhythmia in ageing spontaneously hypertensive rats: unraveling the substrate in hypertension and ageing *PloS one* 8:e72416 doi:10.1371/journal.pone.0072416
- Lavie L (2003) Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder *Sleep medicine reviews* 7:35-51
- Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort *Circulation* 100:87-95
- Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S (2000) Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology *Circulation* 101:2631-2638
- Li L et al. (2014) Efficacy of catheter ablation of atrial fibrillation in patients with obstructive sleep apnoea with and without continuous positive airway pressure treatment: a meta-analysis of observational studies *Europace* 16:1309-1314 doi:10.1093/europace/euu066
- Linz B, Bohm M, Linz D (2017) [Update: Cardiovascular Sleep Medicine] *Dtsch Med Wochenschr* 142:912-923 doi:10.1055/s-0042-124260
- Linz B, Hohl M, Reil JC, Bohm M, Linz D (2016a) Inhibition of NHE3-mediated Sodium Absorption in the Gut Reduced Cardiac End-organ Damage Without Deteriorating Renal Function in Obese Spontaneously Hypertensive Rats *J Cardiovasc Pharmacol* 67:225-231 doi:10.1097/FJC.0000000000000336
- Linz D, Arzt M (2015) [Sleep-disordered breathing and cardiac disease] *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 140:1272-1277 doi:10.1055/s-0041-102916
- Linz D et al. (2019) Variability of Sleep Apnea Severity and Risk of Atrial Fibrillation: The VARIOSAF Study *JACC Clin Electrophysiol* 5:692-701 doi:10.1016/j.jacep.2019.03.005
- Linz D et al. (2018a) Nocturnal hypoxemic burden is associated with epicardial fat volume in patients with acute myocardial infarction *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* doi:10.1007/s11325-017-1616-0
- Linz D et al. (2016b) Impact of obstructive and central apneas on ventricular repolarisation: lessons learned from studies in man and pigs *Clin Res Cardiol* 105:639-647 doi:10.1007/s00392-016-0961-5
- Linz D et al. (2016c) Cathepsin A mediates susceptibility to atrial tachyarrhythmia and impairment of atrial emptying function in Zucker diabetic fatty rats *Cardiovasc Res* 110:371-380 doi:10.1093/cvr/cvw071
- Linz D et al. (2013) Effect of renal denervation on neurohumoral activation triggering atrial fibrillation in obstructive sleep apnea *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 62:767-774 doi:10.1161/hypertensionaha.113.01728
- Linz D et al. (2015a) Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of renal sympathetic innervation *Am J Hypertens* 28:256-265 doi:10.1093/ajh/hpu123
- Linz D, Hohl M, Ukena C, Mahfoud F, Wirth K, Neuberger HR, Bohm M (2015b) Obstructive respiratory events and premature atrial contractions after cardioversion *The European respiratory journal* 45:1332-1340 doi:10.1183/09031936.00175714
- Linz D, Mahfoud F, Linz B, Hohl M, Schirmer SH, Wirth KJ, Bohm M (2014a) Effect of obstructive respiratory events on blood pressure and renal perfusion in a pig model for sleep apnea *American journal of hypertension* 27:1293-1300 doi:10.1093/ajh/hpu036
- Linz D et al. (2018b) Associations of Obstructive Sleep Apnea With Atrial Fibrillation and Continuous Positive Airway Pressure Treatment: A Review *JAMA cardiology* doi:10.1001/jamacardio.2018.0095

- Linz D, Schotten U, Neuberger HR, Bohm M, Wirth K (2011) Negative tracheal pressure during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation *Heart Rhythm* 8:1436-1443 doi:10.1016/j.hrthm.2011.03.053
- Linz D, Ukena C, Mahfoud F, Neuberger HR, Bohm M (2014b) Atrial autonomic innervation: a target for interventional antiarrhythmic therapy? *Journal of the American College of Cardiology* 63:215-224 doi:10.1016/j.jacc.2013.09.020
- Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ (2010) Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation *Chest* 137:263-272 doi:10.1378/chest.09-1584
- Liu L, Cao Q, Guo Z, Dai Q (2016) Continuous Positive Airway Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea and Resistant Hypertension: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials *J Clin Hypertens (Greenwich)* 18:153-158 doi:10.1111/jch.12639
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *The Journal of biological chemistry* 193:265-275
- Maan A et al. (2015) Obstructive Sleep Apnea and Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Implications for Treatment *Critical pathways in cardiology* 14:81-85 doi:10.1097/hpc.0000000000000044
- Maestri R, La Rovere MT, Robbi E, Pinna GD (2011) Night-to-night repeatability of measurements of nocturnal breathing disorders in clinically stable chronic heart failure patients *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* 15:673-678 doi:10.1007/s11325-010-0418-4
- Mark DB et al. (2019) Effect of Catheter Ablation vs Medical Therapy on Quality of Life Among Patients With Atrial Fibrillation: The CABANA Randomized Clinical Trial *JAMA* 321:1275-1285 doi:10.1001/jama.2019.0692
- Marrouche NF et al. (2018) Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure *The New England journal of medicine* 378:417-427 doi:10.1056/NEJMoa1707855
- Martin CA, Lambiase PD (2017) Pathophysiology, diagnosis and treatment of tachycardiomyopathy *Heart (British Cardiac Society)* 103:1543-1552 doi:10.1136/heartjnl-2016-310391
- Mason M, Welsh EJ, Smith I (2013) Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults *The Cochrane database of systematic reviews*:Cd003002 doi:10.1002/14651858.CD003002.pub3
- Mayer G et al. (2017) German S3 Guideline Nonrestorative Sleep/Sleep Disorders, chapter "Sleep-Related Breathing Disorders in Adults," short version: German Sleep Society (Deutsche Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin, DGSM) *Somnologie : Schlafforschung und Schlafmedizin = Somnology : sleep research and sleep medicine* 21:290-301 doi:10.1007/s11818-017-0136-2
- McEvoy RD et al. (2016) CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea *The New England journal of medicine* 375:919-931 doi:10.1056/NEJMoa1606599
- Nabauer M et al. (2009) The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 11:423-434 doi:10.1093/europace/eun369
- Narkiewicz K, Kato M, Phillips BG, Pesek CA, Davison DE, Somers VK (1999) Nocturnal continuous positive airway pressure decreases daytime sympathetic traffic in obstructive sleep apnea *Circulation* 100:2332-2335
- Nattel S (2017) Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation *JACC Clin Electrophysiol* 3:425-435 doi:10.1016/j.jacep.2017.03.002
- Ng CY, Liu T, Shehata M, Stevens S, Chugh SS, Wang X (2011) Meta-analysis of obstructive sleep apnea as predictor of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation *The American journal of cardiology* 108:47-51 doi:10.1016/j.amjcard.2011.02.343
- Nickel AG et al. (2015) Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure *Cell Metab* 22:472-484 doi:10.1016/j.cmet.2015.07.008
- Oldenburg O et al. (2015) Positionspapier „Schlafmedizin in der Kardiologie" Update 2014 *Der Kardiologe* 9:140-158 doi:10.1007/s12181-015-0654-8

- Packer DL et al. (2018) Catheter Ablation versus Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation (CABANA) Trial: Study Rationale and Design *Am Heart J* 199:192-199 doi:10.1016/j.ahj.2018.02.015
- Park SK et al. (2001) Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor *Biochemical and biophysical research communications* 284:966-971 doi:10.1006/bbrc.2001.5058
- Prabhakar NR, Semenza GL (2012) Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 *Physiological reviews* 92:967-1003 doi:10.1152/physrev.00030.2011
- Qureshi WT et al. (2015) Meta-Analysis of Continuous Positive Airway Pressure as a Therapy of Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea *Am J Cardiol* 116:1767-1773 doi:10.1016/j.amjcard.2015.08.046
- Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method *Nature protocols* 1:3159-3165 doi:10.1038/nprot.2006.378
- Ryan CM, Bradley TD (2005) Pathogenesis of obstructive sleep apnea *J Appl Physiol* (1985) 99:2440-2450 doi:10.1152/jappphysiol.00772.2005
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011) Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal *Physiological reviews* 91:265-325 doi:10.1152/physrev.00031.2009
- Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 *Physiology (Bethesda)* 24:97-106 doi:10.1152/physiol.00045.2008
- Shukla A et al. (2015) Effect of Obstructive Sleep Apnea Treatment on Atrial Fibrillation Recurrence: A Meta-Analysis *JACC Clinical electrophysiology* 1:41-51 doi:10.1016/j.jacep.2015.02.014
- Shyu KG (2009) Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes *Clin Sci (Lond)* 116:377-389 doi:10.1042/CS20080163
- Steg PG et al. (2012) Symptoms, functional status and quality of life in patients with controlled and uncontrolled atrial fibrillation: data from the RealiseAF cross-sectional international registry *Heart (British Cardiac Society)* 98:195-201 doi:10.1136/heartjnl-2011-300550
- Stevenson IH, Teichtahl H, Cunnington D, Ciavarella S, Gordon I, Kalman JM (2008) Prevalence of sleep disordered breathing in paroxysmal and persistent atrial fibrillation patients with normal left ventricular function *European heart journal* 29:1662-1669 doi:10.1093/eurheartj/ehn214
- Strotmann J, Fox H, Bitter T, Sauzet O, Horstkotte D, Oldenburg O (2018) Characteristics of sleep-disordered breathing in patients with atrial fibrillation and preserved left ventricular ejection fraction *Clin Res Cardiol* 107:120-129 doi:10.1007/s00392-017-1163-5
- Thanigaimani S, Lau DH, Agbaedeng T, Elliott AD, Mahajan R, Sanders P (2017) Molecular mechanisms of atrial fibrosis: implications for the clinic *Expert review of cardiovascular therapy* 15:247-256 doi:10.1080/14779072.2017.1299005
- Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY (2006) Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review *The American journal of medicine* 119:448.e441-419 doi:10.1016/j.amjmed.2005.10.057
- Trenchea M, Deleanu O, Suta M, Arghir OC (2013) Smoking, snoring and obstructive sleep apnea *Pneumologia (Bucharest, Romania)* 62:52-55
- Wang Y, Joyner RW, Wagner MB, Cheng J, Lai D, Crawford BH (2009) Stretch-activated channel activation promotes early afterdepolarizations in rat ventricular myocytes under oxidative stress *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H1227-1235 doi:10.1152/ajpheart.00808.2008
- Weidemann A et al. (2008) Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α , is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction *The Biochemical journal* 409:233-242 doi:10.1042/bj20070629
- Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML (1976) Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure *The Journal of clinical investigation* 58:751-760 doi:10.1172/jci108522

- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats *Circulation* 92:1954-1968
- Wong PC, Guo J, Zhang A (2017) The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides *Advances in physiology education* 41:179-185 doi:10.1152/advan.00177.2016
- Wynn GJ, Todd DM, Webber M, Bonnett L, McShane J, Kirchhof P, Gupta D (2014) The European Heart Rhythm Association symptom classification for atrial fibrillation: validation and improvement through a simple modification *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 16:965-972 doi:10.1093/europace/eut395
- Wyse DG et al. (2002) A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation *The New England journal of medicine* 347:1825-1833 doi:10.1056/NEJMoa021328
- Xintarakou A, Tzeis S, Psarras S, Asvestas D, Vardas P (2020) Atrial fibrosis as a dominant factor for the development of atrial fibrillation: facts and gaps *Europace* doi:10.1093/europace/euaa009
- Xiong Q, Proietti M, Senoo K, Lip GY (2015) Asymptomatic versus symptomatic atrial fibrillation: A systematic review of age/gender differences and cardiovascular outcomes *International journal of cardiology* 191:172-177 doi:10.1016/j.ijcard.2015.05.011
- Zhang H, Forman HJ (2012) Glutathione synthesis and its role in redox signaling *Seminars in cell & developmental biology* 23:722-728 doi:10.1016/j.semcd.2012.03.017
- Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S (2014) Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective *Clinical epidemiology* 6:213-220 doi:10.2147/cep.s47385

8. Publikationen

○ PUBLIKATIONEN

Original Arbeiten:

- 03/2018 Khoshkish S, Hohl M, **Linz B**, Arzt M, Mahfoud F, Baumert M, Schöpe J, Böhm M, Linz D
„The association between different features of sleep-disordered breathing and blood pressure: A cross-sectional study.”
Journal of Clinical Hypertension, 2018; 575-581.
- 09/2017 Hohl M, Lau DH, Müller A, Elliott AD, **Linz B**, Mahajan R, Hendriks JML, Böhm M, Schotten U, Sanders P, Linz D.
“Concomitant Obesity and Metabolic Syndrome Add to the Atrial Arrhythmogenic Phenotype in Male Hypertensive Rats.”
Journal of the American Heart Association, 2017 Sep 17;6(9). pii: e006717.
- 03/2016 **Linz B**, Hohl M, Reil JC, Böhm M, Linz D
“Inhibition of NHE3-mediated sodium absorption in the gut reduced cardiac end-organ damage without deteriorating renal function in obese spontaneously hypertensive rats”
Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2016;67:225-31.
- 02/2015 Linz D, Hohl M, Schütze J, Mahfoud F, Speer T, **Linz B**, Hübschle T, Juretschke HP, Dechend R, Geisel J, Rütten H, Böhm M
“Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of renal sympathetic innervation”
American Journal of Hypertension, 2015;28:256-265.
- 03/2014 Linz D, Mahfoud F, **Linz B**, Hohl M, Schirmer SH, Wirth KJ, Böhm M
“Effect of obstructive respiratory events on blood pressure and renal perfusion in a pig model for sleep apnea “
American Journal of Hypertension, 2014;27:1293-1300.
- 10/2013 Linz D, Wirth K, Ukena C, Mahfoud F, Pöss J, **Linz B**, Böhm M, Neuberger HR
“Renal denervation suppresses ventricular arrhythmias during acute ventricular ischemia in pigs “
Heart Rhythm, 2013;10:1525-1530.
- Reviews und Editorials:
- 11/2018 Mishima RS, Hohl M, **Linz B**, Sanders P, Linz D
“Too Fatty, Too Salty, Too Western.”
Hypertension, 2018 Nov;72(5):1078-1080.
- 06/2017 **Linz B**, Böhm M, Linz D
“Update: Cardiovascular Sleep Medicine”
Dtsch Med Wochenschr., 2017;142:912-923.
- 04/2016 Linz D, **Linz B**, Hohl M, Böhm M
“Atrial arrhythmogenesis in obstructive sleep apnea: Therapeutic implications”
Sleep Medicine Reviews, 2016;26:87-94.
- 11/2014 Hohl M, **Linz B**, Böhm M, Linz D
“Obstructive sleep apnea and atrial arrhythmogenesis”
Current Cardiology Reviews, 2014;10:362-368.
- 10/2014 Linz D, Ukena C, Wolf M, **Linz B**, Mahfoud F, Böhm M
“Experimental evidence of the role of renal sympathetic denervation for treating atrial fibrillation”
Journal of atrial Fibrillation, 2014;7:1128.

○ *POSTER/VORTRÄGE*

- 03/2019 **EHRA 2019 congress/43rd EWGCCE-meeting - Poster:** “Long-term effects of transient intermittent negative upper airway pressure on atrial remodeling in a novel rat model for obstructive sleep apnea”
- 11/2017 **41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention (DHL) – eingeladener Vortrag:** „Update Schlafapnoe-Syndrom und arterielle Hypertonie“
Linz B
- 11/2017 **41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention (DHL) – “Best of Vortrag” - Session:** „Effects of obstructive respiratory events on blood pressure and atrial fibrillation in a novel rat model for sleep apnea”
Linz B, Hohl M, Nickel A, Khoshkish S, Maack C, Böhm M, Linz D
- 11/2017 **41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention (DHL) – Poster:** „Effects of obstructive respiratory events on blood pressure and atrial fibrillation in a novel rat model for sleep apnea”
Linz B, Hohl M, Nickel A, Khoshkish S, Maack C, Böhm M, Linz D
- 08/2017 **ESC Congress 2017 – Poster:** „Simulated obstructive respiratory events, but not intermittent hypoxia alone, result in the development of an atrial arrhythmogenic substrate in a novel rat model for sleep apnea”
Linz B, Hohl M, Nickel A, Maack C, Böhm M, Lau D, Sanders P, Linz D
- 04/2016 **82. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) – Poster:** „Effects of repetitive intermittent hypoxic and obstructive respiratory events on the development of an atrial arrhythmogenic substrate in a novel rat model for sleep apnea “
Linz B, Hohl M, Nickel A, Khoshkish S, Maack C, Böhm M, Linz D
- 12/2015 **23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Schlafmedizin DGSM – Vortrag:** „Differential effects of obstructive respiratory events on atrial and ventricular neurohumoral activation and electrophysiology in a pig model for sleep apnea“
Linz B, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Ukena C, Ewen S, Schotten U, Maack C, Wirth K, Böhm M, Linz D
- 11/2015 **39. Wissenschaftlicher Jahreskongress der deutschen Hochdruckliga (DHL) “Hypertonie Saarbrücken 2015” – Vortrag:** „Effects of obstructive respiratory events on blood pressure, atrial and ventricular neurohumoral activation and electrophysiology in a pig model for sleep apnea“
Linz B, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Ukena C, Ewen S, Schotten U, Maack C, Wirth K, Böhm M, Linz D
- 11/2015 **39. Wissenschaftlicher Jahreskongress der Deutschen Hochdruckliga (DHL) „Hypertonie Saarbrücken 2015“ – Poster:** „Pharmacological inhibition of NHE3-mediated sodium absorption in the gut reduced cardiac end-organ damage without deteriorating renal functional in obese spontaneously hypertensive rats”
Linz B, Hohl M, Linz W, Reil JC, Ruetten H, Böhm M, Linz D
- 10/2015 **2015 – Herbsttagung und Jahrestagungen der Arbeitsgruppe Rhythmologie & der Arbeitsgruppe Interventionelle Kardiologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Poster:** „Differential effects of obstructive respiratory events on atrial and ventricular

neurohumoral activation and electrophysiology in a pig model for sleep apnea“

- 06/2015 **Linz B**, Hohl M, Nickel A, Mahfoud F, Ukena C, Ewen S, Schotten U, Maack C, Wirth K, Böhm M, Linz D
Hypertension Summer School der Deutschen Hochdruckliga - Vortrag: „Pharmacological inhibition of NHE3-mediated sodium absorption in the gut reduced cardiac end-organ damage without deteriorating renal functional in obese spontaneously hypertensive rats“
- 04/2015 **Linz B**, Hohl M, Reil JC, Heuer H, Ruetten H, Böhm M, Linz D
81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Poster: „Pharmacological inhibition of NHE3-mediated sodium absorption in the gut reduced cardiac end-organ damage without deteriorating renal functional in obese spontaneously hypertensive rats“
- 04/2014 **Linz B**, Hohl M, Linz W, Reil JC, Ruetten H, Böhm M, Linz D
80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Poster: “Pharmacological inhibition of NHE3-mediated sodium absorption in the gut reduces blood pressure and attenuates ventricular fibrosis formation”
Linz B, Hohl M, Schwahn U, Arndt P, Ruetten H, Böhm M, Linz D

○ *PREISE*

-
- 06/2019 **Danish Cardiovascular Research Academy - 2019 Summer Meeting: Second place for Best Presentation**
- 03/2019 **43rd EWGCCE - annual meeting of the ESC Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology: Poster Award**
- 08/2017 **ESC Congress 2017: Best Poster in the topic Cardiovascular physiology**
- 04/2014 **DGK-Posterpreis der Jahrestagung (2. Preis)**

9. Curriculum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die mich bei der Gestaltung dieser Arbeit im Fachlichen und darüber hinaus auch im Privatem unterstützt haben. In erster Linie möchte ich hierbei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Böhm danken, dafür, dass er mir die Möglichkeit bot diese Arbeit durchzuführen.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Mathias Hohl und meinem weiteren Betreuer und Bruder Dominik Linz entgegenbringen. Mathias und Dominik waren die Initiatoren des dieser Arbeit zugrundeliegenden Projektes und sicherten eine erstklassige Betreuung der Versuche und Eingliederung in das wissenschaftliche Arbeiten. Weiterhin danke ich allen übrigen Mitarbeitern des kardiologischen Labors des Uniklinikums des Saarlandes, die mich für die Zeit der Versuche herzlich aufnahmen und mich auf unterschiedlichster Weise unterstützten. Hierzu zählen besonders Alexander Nickel, der mich in der Messung der reaktiven Sauerstoffspezies unterstützte, Kathrin Gaspard und Jeanette Zimolong, die mir den artgerechten Umgang mit den Versuchstieren und verschiedenste biochemische und histologische Auswertungen lehrten.

Zuletzt sei den Menschen in meinem engsten persönlichen Umfeld zu danken, die mich vor allem auch außerhalb des Labors während dieser Arbeit stets begleitet haben. Zu diesen zählen insbesondere meine Freundin Franziska Knuf, meine beiden Brüder, Dominik und Julian, meine Eltern und mein engster Freundeskreis aus frühen Kindheitstagen.

Kolloquiumsvermerk:

Tag der Promotion:

22.10.2020

Dekan:

Univ. Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Böhm

Prof. Dr. Veit Flockerzi