

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C  
Kardiologie und Angiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt**

**Echo- und Doppler-echokardiographische  
Phänotypisierung des Herzens der  
SCPx/SCP2-defizienten Maus unter  
Normal- und 0,5% Phytolkost**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Feierabend Michael

aus Wesseling

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. M. Semik

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C (Kardiologie und Angiologie)

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Semik

### **Zusammenfassung**

*Echo- und Doppler-echokardiographische Phänotypisierung des Herzens der SCPx/SCP2-defizienten Maus unter Normal- und 0,5% Phytolkost*

Michael Feierabend

Das nach seinem Erstbeschreiber (1936) benannte Refsum-Syndrom ist durch intrazelluläre Kumulation verzweigtkettiger Fettsäuren (Phytansäure) charakterisiert. Neben den regelmäßig auftretenden neurologischen Symptomen können auch kardiale Funktionsstörungen beobachtet werden.

Beim SCP2/SCPx-defizienten Mausmodell kommt es nach zwei- bis dreiwöchiger Ernährung mit phytolangericherter Diät zu einem dem Refsum-Syndrom ähnlichen Bild. Die Tiere versterben an kardialen Komplikationen (plötzlicher Herztod). In der vorliegenden Arbeit wurden echokardiographisch die morphologischen und funktionellen Änderungen der Herzen analysiert. Hierzu wurden 45 Tiere (20♂, 25♀) vor und nach einem 14-tägigen Fütterungsexperiment mit phytolhaltiger Diät unter Narkose untersucht. Dabei zeigten sich keine direkten Auswirkungen der Phytolkost auf die Morphologie der Herzen. Abnahmen der linksventrikulären diastolischen und systolischen Binnendimensionen sowie eine Zunahme der diastolischen Wandstärken von Interventrikularseptum und linksventrikulärer Hinterwand erklären sich am ehesten durch Volumendepletion infolge verminderter Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Funktionell war eine Abnahme des Herzzeitvolumens, überwiegend bedingt durch Reduktion der Herzfrequenz, auffällig. Bei gleichzeitiger Gewichtsabnahme der Tiere änderte sich der Cardiac Index nicht. Es fanden sich Hinweise für eine durch die Phytoldiät bedingte Relaxationsstörung des linken Ventrikels. Methodisch bedingt lässt sich dies aber mit den Möglichkeiten der Standardecho-kardiographie nicht eindeutig belegen.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2006

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>8</b>
1.1.	Die Aufgabe von Cholesterin in der Zellmembran	8
1.1.1.	Cholesterinstoffwechsel	8
1.2.	Sterol-Carrier-Protein 2 (SCP2) und Sterol-Carrier-Protein x (SCPx)	9
1.2.1.	Bildung und chemische Struktur der Sterol-Carrier-Proteine (SCP2 und SCPx)	9
1.2.2.	In-vitro-Funktion der Sterol-Carrier-Proteine (SCP2 und SCPx)	9
1.3.	SCP2/SCPx-defiziente Maus, Phänotypisierung und Züchtung	10
1.4.	Refsum-Syndrom	10
1.4.1.	Phytansäure: Metabolismus und Bedeutung	10
1.4.2.	Klinisches Erscheinungsbild des Refsum-Syndroms	11
1.5.	Echokardiographische Phänotypisierung der SCP2/SCPx-defizienten Maus bei Normalkost und 0,5% Phytoldiät	11
1.6.	Fragestellung und Ziel der Untersuchung	12
<b>II.</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>15</b>
2.1.	Tiere	15

2.1.1.	Herkunft	15
2.1.2.	Tierhaltung und Tierversorgung	16
2.2.	Versuchsaufbau	16
2.2.1.	Fütterungsexperiment	16
2.2.2.	Versuchsvorbereitung	18
2.2.3.	Versuchsnachbereitung	20
2.3.	Untersuchungstechnik	21
2.3.1.	Physikalische Grundlagen der Echokardiographie	21
2.3.2.	Das zweidimensionale B-Bild	22
2.3.3.	Der TM-Mode	23
2.3.4.	Die Doppler-Technik	24
2.3.5.	Die Anwendung der Echokardiographie bei Mäusen	26
2.4.	Messungen	29
2.4.1.	Technische Ausrüstung	29
2.4.2.	Messungen im M-Mode	30
2.4.3.	Messungen mit gepulster (PW), kontinuierlicher (CW) und farbkodierter Doppler-Technik	30
2.4.4.	Abgeleitete Parameter	31
2.5.	Statistische Auswertung	34
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1.	Gesamtkollektiv	38
3.1.1.	Klinische Daten	38
3.1.2.	M-Mode und 2-D-Messwerte	39

---

3.1.3.	Abgeleitete Grössen (M-Mode / 2-D-Bild)	42
3.1.4.	Hämodynamische Daten	45
3.1.5.	Doppler-Messungen	46
3.2.	Geschlechtsspezifische Unterschiede	50
3.2.1.	Klinische Daten	50
3.2.2.	M-Mode und 2-D-Messwerte	54
3.2.3.	Abgeleitete Daten (M-Mode / 2-D-Bild)	56
3.2.4.	Hämodynamische Daten	57
3.2.5.	Doppler-Messungen	58
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1.	Klinische Daten	59
4.2.	2-D- und M-Mode-Messwerte	62
4.2.1.	Geschlechtsabhängige Änderungen	63
4.2.2.	Auswirkungen der Phytoldiät	66
4.3.	Doppler-echokardiographische Messgrössen	70
4.3.1.	Aortovalvuläre Messwerte	70
4.3.2.	Mitrale Messwerte und Parameter der diastolischen LV-Funktion	71
4.4.	Hämodynamische Daten und Parameter der systolischen LV-Funktion	75
4.5.	Studiendesign	78
4.6.	Analysetechnik	79
4.6.1.	Doppler-/Echokardiographie	79

4.6.2.	Narkoseeinfluß	80
4.7.	Ausblicke	82
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>VIII.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>I.</b>	<b>IX. Lebenslauf</b>	<b>98</b>

## **I. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1. Die Aufgabe von Cholesterin in der Zellmembran**

In der eukaryoten Zelle ist Cholesterin wesentlicher Membranbestandteil. Es dient als Grundbaustein für die Biosynthese, Stabilität und Funktion von Membranen, der Synthese von Gallensäuren, Vitamin D<sub>3</sub> und Steroidhormonen (Hochner et al., 1996, Lynen, 1972).

#### **1.1.1. Cholesterinstoffwechsel**

Neben der endogenen de-novo-Synthese kann Cholesterin auch über die Nahrung aufgenommen werden (Ferdinandusse et al., 2000, Garcia et al., 2000). Die chemische Struktur des Cholesterins, die Orte der Cholesterinbiosynthese sowie auch die Regulationsmechanismen sind bereits gut charakterisiert worden. Gleichermaßen gut belegt sind auch die Cholesterinresorption, der exogene wie auch der endogene Cholesterintransport und Abbau (Hashimoto et al., 1992, Lichtenstein et al., 1990). Seedorf et al. konnten 1994 nähere Erkenntnisse zum intrazellulären Transport von Cholesterin gewinnen. Dabei kommt zwei Carrierproteinen, dem Sterol-Carrier-Protein 2 (SCP2) und dem Sterol-Carrier-Protein X (SCPx) eine zentrale Rolle zu (Aristizabal et al., 1998, Crain et al., 1980). Beide Proteine konnten in den Aminosäuresequenzen von Mensch, Maus und Ratte mit einer Homologie von über 85 % ermittelt werden (Van Amerongen et al., 1987, Basu et al., 1988, Crain et al., 1980). Diese hohe evolutionäre Konservierung deutet eine erhebliche physiologische Relevanz beider Proteine an.

## **1.2. Sterol-Carrier-Protein 2 (SCP2) und Sterol-Carrier-Protein X (SCPx)**

### **1.2.1. Bildung und chemische Struktur der Sterol-Carrier-Proteine (SCP2 und SCPx)**

Die Bildung beider Carrier-Proteine sowie auch deren Aminosäuresequenz und Molekulargewicht konnte durch in-vitro-Versuche ermittelt und nachvollzogen werden (Basu et al., 1988, Crain et al., 1980, Keller et al., 1989, Fujiki et al., 1989, Ohba et al., 1995).

SCP2 ist ein 13 kD großes, hitzestabiles, basisches Protein, das 123 Aminosäuren trägt. Bei in-vitro-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass zur Synthese ein 20 Aminosäuren umfassendes Präpeptid erforderlich ist. Intra-peroxisomal erfolgt die Umwandlung zu reifem SCP2, das eine höhere Bindungsaffinität zu Cholesterin und Fettsäuren in vitro aufweist als das prä-SCP2. SCPx ist ein 547 Aminosäuren tragendes Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kD. DNA-Analysen ergaben eine enge Verwandtschaft zum SCP2. Beide werden durch alternative Initiation der Transskription vom gleichen Gen gebildet. (Van Amerongen et al., 1987, Basu et al., 1988, Choinowski et al., 2000, Crain et al., 1980, Ferdinandusse et al., 2000).

### **1.2.2. In-vitro-Funktion der Sterol-Carrier-Proteine (SCP2 und SCPx)**

Die peroxisomalen Sterol-Carrier-Proteine (SCP2 und SCPx) besitzen wichtige Transporteigenschaften für Cholesterin sowie Phospholipide und stimulieren zahlreiche Prozesse im intrazellulären Cholesterinmetabolismus (Choinowski et al., 2000, Wirtz et al., 1990).

SCP2 transportiert in-vitro polare Lipide wie z. B. Sterole, Phospholipide und Glykolipide zwischen Donor- und Akzeptormembranen. Aufgrund dieser

Eigenschaft stimuliert SCP2 in-vitro zahlreiche Prozesse des zellulären Cholesterinmetabolismus. Neben der Cholesterinbiosynthese wird auch die Veresterung des Cholesterins gefördert. Ebenso werden die Gallensäurebio- und Steroidhormonsynthese positiv beeinflusst.

SCPx katalysiert in-vitro den letzten Schritt der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation (Seedorf et al., 1994). Diese dient vor allem der Kettenverkürzung von lang- und verzweigt-kettigen Fettsäuren, damit sie anschließend in die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation eingeschleust werden können. Außerdem besitzt SCPx auch eine Lipidtransfer- und Sterol-Carrier-Funktion.

### **1.3. SCP2/SCPx-defiziente Maus, Phänotypisierung und Züchtung**

Eine Möglichkeit zu Überprüfung der in-vitro Funktionen in-vivo eröffnete sich durch die Züchtung einer SCP2/ SCPx-defizienten Maus.

Im Rahmen genommodifizierender Verfahren entstand eine "knock-out" Mutante der C57BL/6 – Maus, deren Genotypisierung einen Defekt auf dem SCP2/SCPx kodierenden Genom (SCP2/SCPx -/-) (Raabe, 1995) ergab.

Phänotypisch fielen die lebens- und fortpflanzungsfähigen Tiere durch eine leichte Hypoglykämie auf. Intrahepatisch fand sich eine Peroxisomenproliferation sowie eine Veränderung der Gallensäurezusammensetzung. Im Gegensatz zu den in-vitro-Funktionen beider Proteine bestand keine Störung des Cholesterinmetabolismus (Ferdinandusse et al., 2000).

Am auffallendsten war jedoch eine dreifach erhöhte Phytansäurekonzentration im Serum der „knock-out“-Variante im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Raabe, 1995, Steinberg et al., 1965).

Verlaufsbeobachtungen der Arbeitsgruppe um Seedorf zeigten eine erhöhte spontane Absterberate. Unter mit Phytansäure angereicherter Ernährung nahm deren Inzidenz deutlich zu. Transpondergestützte Langzeit-EKG-Analysen

bestätigten den zuvor vermuteten, ursächlichen Zusammenhang mit rhythmogenen, kardialen Ereignissen (Mönnig et al., 2004).

Auf der Grundlage der Genotypisierung war es nun auch möglich, mittels homologer Rekombination SCP2/SCPx-defiziente Mäuse herzustellen und zu züchten (Raabe, 1995).

#### **1.4. Refsum-Syndrom**

##### **1.4.1. Phytansäure: Metabolismus und Bedeutung**

Phytansäure ist als verzweigt-kettige, gesättigte Fettsäure-Abbauprodukt des Chlorophyllstoffwechsels. Sie entsteht nach Esterhydrolyse der Chlorophyllseitenkette durch Oxidation des Isoprenoid-Alkoholes Phytol (Ellinghaus et al., 1999, Jansen et al., 1997). Die hierzu notwendige mikrobielle Aktivität findet sich ausschließlich im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern (Pansen). Damit rekrutiert sich die vom Menschen aufgenommene Phytansäure überwiegend aus Milch- und Fleischprodukten und stammt nicht aus pflanzlicher Nahrung.

Laborchemisch beobachtet man einen Anstieg der Phytansäurekonzentration bei zahlreichen peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen (Steinberg et al., 1965). In diesem Zusammenhang wurde bereits 1936 erstmals ein klinisches Krankheitsbild beschrieben, das seitdem nach seinem Erstbeschreiber als Refsum-Syndrom bekannt ist (Refsum, 1946).

##### **1.4.2. Klinisches Erscheinungsbild des Refsum-Syndroms**

Der norwegische Neurologe Sigvald Refsum beschrieb 1936 als Erster das klinische Erscheinungsbild einer Lipidstoffwechselstörung, die durch Kumu-

lation von Phytansäure im menschlichen Organismus entsteht. Dabei ist der Abbau von Phytansäure durch einen Phytansäure-alpha-hydroxylase-Mangel gestört. Klinisch manifestiert sich das Refsum-Syndrom zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr mit Ichthyosis der Haut, Knochenanomalien, Retinitis pigmentosa, progredienter Schwerhörigkeit, Polyneuropathie und cerebellären Symptomen. Ursächlich verantwortlich ist eine genetische Mutation der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase (Jansen et al., 1997).

Neben diesen neurologischen Störungen treten später auch kardiale Symptome in Form von Erregungsausbreitungs- und Erregungsrückbildungsstörungen auf. Ebenso wird in wenigen Fällen das Auftreten einer ausgeprägten Herzinsuffizienz beschrieben (Leys et al., 1989). Histopathologische Untersuchungen zeigen Fibrillendegenerationen, eine hydropische Schwellung sowie den Verlust der Feinstruktur des Myokards mit herdförmig ausgebildeten Fibrosen.

Bis zum heutigen Tag besteht lediglich die Möglichkeit einer diätetischen Behandlung, bei der Lebensmittel tierischen Ursprungs möglichst gemieden werden sollten.

### **1.5. Echokardiographische Phänotypisierung der SCP2/SCPx-defizienten Maus bei Normalkost und 0,5 % Phytoldiät**

Nach erfolgter Genotypisierung kann mittels homologer Rekombination eine SCP2/SCPx-defiziente Maus hergestellt und in ausreichender Quantität gezüchtet werden. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, vor und nach einem Fütterungsexperiment mit einer 0,5 % phytolhaltigen Diät mittels Ultraschalluntersuchungstechniken nichtinvasiv die Auswirkungen des Defektes auf Organe und hier im besonderen auf Morphologie und Funktion des Herzens zu ermitteln.

### **1.6. Fragestellung und Ziel der Untersuchung**

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in wie weit die beobachtete erhöhte kardiale Mortalität gendefizienter Mäuse (SCP2/SCPx knock-out Mutante), bei denen phänotypisch Analogien zum Refsum-Syndrom auffallen, unter phytolangericherter Diät mit sonographisch erfassbaren organischen Korrelaten am Herzen einhergeht. Durch Anwendung der Doppler-Echokardiographie können dabei auch funktionelle Aspekte in die Betrachtung mit einbezogen werden. Klinisch ist bekannt, dass Refsum-Patienten auch unter kardialen Symptomen im Rahmen ihrer Erkrankung leiden. Dabei stehen Erregungsausbreitungs- und Erregungsrückbildungsstörungen im Vordergrund. Allerdings finden sich auch Veränderungen der myokardialen Feinstruktur und Funktion (s.o.).

Die Vorteile der echokardiographischen Untersuchung liegen in dem nicht-invasiven Verfahren bei guter Reproduzierbarkeit und geringem Kostenaufwand. Die Echokardiographie ermöglicht neben Aussagen zur Morphologie und topographischen Anatomie auch eine Abschätzung der Hämodynamik. Die Untersuchung ist nicht an eine stationäre Einheit gebunden und ohne nennenswerte Nebenwirkungen durchführbar. Bei Menschen ist diese Untersuchung nach Erhebung der Anamnese und dem körperlichen Untersuchungsbefund daher bei fast allen vermuteten Herzerkrankungen bildgebendes Verfahren der ersten Wahl. Die Untersuchungen wurden standardisiert in Anlehnung an die "Guidelines" der Amerikanischen Gesellschaft für Echokardiographie durchgeführt und sind daher reproduzierbar (Shanewise et al., 1999).

Die Maus als transgenes Tiermodell hat sich aus verschiedenen Gründen besonders gut etablieren lassen. Zum einen sind Zucht und Aufzucht kostengünstig. Die kurze Generationszeit ermöglicht ein hohes Kontingent an Tieren und Untersuchungen. Das Genom ist bereits komplett charakterisiert und kann mit Methoden des Gen-Targeting gezielt verändert werden. Bei der

Herzstruktur ergeben sich bei der Maus im Vergleich zum Menschen nur marginale Unterschiede (Doevendans et al., 1998).

Bei der Maus finden sich zwischen apikalem Trabekelsystem des linken und rechten Ventrikels geringere Unterschiede im Vergleich zum menschlichen Herz. Der wesentliche Unterschied der kardialen Struktur betrifft die Vorhofebene und das venöse Abflusssystem. Im Mäuseherzen persistiert – im Gegensatz zum humanen Herz – die linke obere Hohlvene und mündet in den rechten Vorhof. Die Pulmonalvenen drainieren in einem gemeinsamen Ostium in den linken Vorhof. Darüberhinaus besteht bei den Mäuseherzen nur ein rudimentäres Septum secundum auf Vorhofebene (Webb et al., 1996).

Ultrastrukturelle Unterschiede (Meijler, 1985; Lev et al., 1973) sind in diesem Rahmen aufgrund ihrer Unzugänglichkeit für echokardiographische Untersuchungen von untergeordnetem Interesse.

Durch die verbesserten technischen Voraussetzungen können heute echokardiographisch auch bei den kleinen Dimensionen der Mäuseherzen und schneller Herzfrequenz verlässliche, reproduzierbare Untersuchungsergebnisse erhoben werden. Dadurch können mit einem nicht-invasivem Verfahren umfassende, reproduzierbare Aussagen zur Morphologie und Funktion gemacht werden.

Die Phänotypisierung des Herzens der „knock-out“-Maus verfolgt das Ziel, mit Hilfe der gewonnenen Information das Verständnis der Mechanismen des plötzlichen Herztodes am Beispiel des Refsum-Syndroms zu komplettieren. Es sollen Einblicke in die morphologischen und funktionellen Auswirkungen gestörter peroxisomaler Lipidstoffwechselfvorgänge gewonnen werden. Hieraus könnten sich Konsequenzen für die Prophylaxe wie auch Therapie der Erkrankung beim Menschen ergeben.

## **II. Material und Methode**

### **2.1. Tiere**

#### **2.1.1. Herkunft**

Aus der C57BL/6-Wildtypmaus gelang es der Arbeitsgruppe Seedorf nach genetischer Veränderung eine SCP2/SCPx-defiziente Maus zu züchten. Freundlicherweise wurden zwei weibliche und ein männliches Tier zur weiteren Zucht zur Verfügung gestellt. Aus diesen drei Tieren wurde in mehreren Etappen und zum Teil unter Verwendung der Nachkommen ein Tierkollektiv von insgesamt 63 Tieren gezüchtet. 22 männliche und 27 weibliche Mäuse gelangten hiervon zur Untersuchung. Die übrigen 14 Tiere wurden entweder in andere Versuchsreihen aufgenommen oder verendeten während der Aufzuchtperiode (3 Tiere). Die Todesursache blieb dabei unklar.

Die Tiere wurden bis zur Geschlechtsreife in getrennten Käfigen in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster aufgezogen.

Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Tiere zunächst zusammengesetzt, die begatteten Weibchen anschließend wieder vereinzelt. Nach dem Wurf verblieben die Jungen bis zu einem Alter von etwa 50 Tagen (6 – 8 Wochen) bei dem Muttertier. Danach wurden sie geschlechtsgetrennt zu 5 bis 6 Tieren in einen Käfig umgesetzt und dort mit Standardfutter weiter aufgezogen bis zu einem Gewicht von durchschnittlich 24,25 g ( $\pm 1,57$  g) bei den Weibchen und durchschnittlich 29,91 g ( $\pm 5,25$  g) bei den Männchen. Anschließend erfolgte die erste echokardiographische Untersuchung in Narkose. Danach erhielten die Tiere eine Erholungsphase zum Ausgleich des durch die Narkose sowie den Untersuchungsstress bedingten Gewichtsverlustes. Am Ende des

folgenden Fütterungsexperimentes, bei dem die Tiere phytolhaltige Kost (Standarddiät mit 0,5 % Phytolgehalt) erhielten, erfolgte erneut die Untersuchung des Herzens mittels Ultraschall.

Die Untersuchung der Tiere erfolgte in Konformität zu den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Studie wurde unter dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 (G 49/99) durch das Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt der Stadt Münster genehmigt.

### **2.1.2. Tierhaltung und Tierversorgung**

Die Mäuse wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätskliniken Münster unter konventionellen Bedingungen in Drahtkäfigen mit Kunststoffschale bei 20 – 22 Grad Celsius überwiegend in Dunkelheit gehalten. Die Luftzufuhr erfolgte über eine Klimaanlage mit 10- bis 12-fachem Luftwechsel, wobei die Luftfeuchtigkeit 60 % betrug. Die Fütterung erfolgte mit einem Standardfutter (Firma Altromin, Hannover); zusätzlich erhielten die Tiere Wasser ad libitum.

Im Rahmen des Fütterungsexperimentes erhielten die Tiere eine phytolange-reicherte Diät (5 mg/g Phytol; Firma Sigma-Aldrich, Schnelldorf).

## **2.2. Versuchsaufbau**

### **2.2.1. Fütterungsexperiment**

Bei insgesamt 49 Mäusen (22 m., 27 w.) erfolgte echokardiographisch die Messung der unten im einzelnen aufgeführten Parameter vor und nach einer Fütterungsperiode mit phytolangereicherter Nahrung (s.o.).

Voraussetzung für die Erstuntersuchung war das Erreichen eines steady states im Gewichtsverlauf der heranwachsenden Tiere über ca. eine Woche, kontrolliert durch Gewichtsbestimmung alle zwei bis drei Tage. Bei den männlichen Mäusen war dies nach durchschnittlich 87,6 Tagen bei einem mittleren Körpergewicht von 29,91g ( $\pm$  5,25g) der Fall. Die weiblichen Tiere kamen nach durchschnittlich 86 Tagen und mit einem mittleren Gewicht von 24,25g ( $\pm$  1,57g) zur Erstuntersuchung. Zum Ausgleich des ca. zehnpromtigen periinterventionellen Gewichtsverlustes erhielten alle Tiere in der Folgezeit eine Erholungsphase bis zum Erreichen des Ausgangsgewichtes.

Danach begann das eigentliche Fütterungsexperiment. Die Tiere erhielten eine mit 0,5% Phytol angereicherte Nagetierkost und Wasser ad libitum.

Täglich wurden Gewichtsverlauf und Nahrungsmittelverbrauch kontrolliert.

Die zweite echokardiographische Untersuchung erfolgte spätestens nach Erreichen eines kritischen Gewichtsverlustes von 25% des Ausgangsgewichtes vor Start des Experimentes oder Sistieren der Nahrungsaufnahme über zwei Tage meist verbunden mit erheblichen Verhaltensauffälligkeiten der Tiere, wie ausgeprägte Adynamie und gestörte Bewegungsabläufe. Insbesondere das Kletterverhalten wirkte kraftlos und war durch ataktisch anmutende Bewegungsmuster erschwert. Die Tiere bewegten sich unkoordinierter, fast torkelnd. Ihr Muskeltonus erschien deutlich reduziert. Die Fellpflegeintensität nahm ab, so dass das Fell glanzlos und struppig wirkte. Zuletzt reduzierte sich auch der Fluchttrieb und die Mäuse sassen überwiegend adynam in den Käfigecken. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich meist auch die Nahrungsaufnahme erheblich reduziert bzw. sistierte. Durch Festlegen dieser Kriterien sollte sichergestellt werden, dass jedes Tier erst am Endpunkt der Diätwirkung zur Nachuntersuchung kam. Ein weiteres Verzögern der Untersuchung war andererseits mit einem steilen Anstieg spontaner Todesfälle verbunden.

Aus beiden Untersuchungsreihen (männlich, weiblich) verendeten dennoch jeweils zwei Tiere vorzeitig. Die männlichen Tiere wiesen dabei Zeichen von Kanibalismus auf. Hier ist also auch eine exogene Todesursache möglich.

Beim Weibchen waren Spuren der Fremdeinwirkung nicht nachweisbar. Der Todeseintritt in der Spätphase des Fütterungsexperimentes macht hier eher endogene Ursachen (rhythmogenes Ereignis?) wahrscheinlich.

### **2.2.2. Versuchsvorbereitung**

Die Untersuchung der Tiere erfolgte in Narkose nach einem bei Mäusen etablierten Narkoseschema mit Xylasin und Ketamin (Wesseley et al., 1998, Gottshall et al., 1997, Kemi et al 2002). Die gewichtsadaptierte Medikamentenapplikation erfolgte intraperitoneal. Dabei erhielten die Tiere 50 µg/g Ketamin und 5 µg/g Xylasin 2%. Nach Eintritt der Narkose, die sich klinisch anhand der Bewegungslosigkeit der Tiere äußerte, wurden die Tiere im Bereich des Thorax und des Abdomens geschoren. Anschließend erfolgte die Fixierung der Tiere in Rückenlage an den Extremitäten auf einer Wärmeplatte (41 ° Celsius), um das Auskühlen zu vermeiden. Eine gründliche Benetzung der geschorenen Fellpartien mit Wasser bzw. zentrifugiertem Ultraschall-Kontaktgel verminderte das Auftreten von Artefakten durch Lufteinschlüsse erheblich. Danach konnte eine ca. 5 mm starke Schicht Ultraschall-Kontaktgel auf den Thorax der Tiere aufgetragen werden. Dieses war zuvor ebenfalls durch Zentrifugieren von störenden Lufteinschlüssen befreit worden.

Zum Ausschluß von Nahfeldfehlern wurde eine Wasservorlaufstrecke durch Aufbringen einer stabilen 1,5 cm starken Kontaktgelschicht auf den Ultraschallkopf realisiert.

Während der echokardiographischen Untersuchung wurde kontinuierlich ein Oberflächenelektrokardiogramm über Metallflächenelektroden, die an den Läufen fixiert waren, abgeleitet.

## **Ketamin**

Ketamin ist ein Phencyclidinderivat, das chemisch den Halluzinogenen nahesteht. Es erzeugt eine „dissoziative Anästhesie“. Dieser Zustand geht mit einer ausgeprägten Analgesie und Amnesie einher. Unter Ketaminwirkung treten häufig bizarre, teilweise furchterregende Träume und optische Halluzinationen auf. Als einziges intravenöses Anästhetikum führt es initial zu einer Stimulation des Herz-Kreislauf-Systems, wobei der Mechanismus noch nicht sicher geklärt ist. Am ehesten scheint eine zentrale Sympathikusstimulation ursächlich verantwortlich zu sein. Unter hoher Dosierung wurden gelegentlich Atemstillstände beobachtet.

## **Xylasin**

Xylasin ist in der Veterinärmedizin seit 1988 als Additivum bei der Narkose etabliert (Green und Thurmon, 1988). Es zeigt einen stark analgetischen, muskelrelaxierenden sowie sedativen Effekt. In der Tiermedizin nutzt man diese Eigenschaften, um den Anästhetikaverbrauch zu reduzieren. Die Substanz bewirkt am Herzen eine ausgeprägte Frequenzdepletion und, nach einem initialen Blutdruckanstieg, eine eher hypotone Kreislaufsituation. Gelegentlich wurde ein Absinken der Atemfrequenz beschrieben.

## **Kombinationsnarkose aus Xylasin und Ketamin**

Die Kombinationsnarkose aus Xylasin und Ketamin stellt eine etablierte, sichere Methode in der Veterinärmedizin dar. Zahlreiche echokardiographische Untersuchungen an Mäusen sind mit diesem Narkoseregime durchgeführt worden (Semeniuk et al., 2002, Patten et al., 2003, Nemoto et al., 2003, Stypmann

et al., 2002). Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu anderen Anästhesieverfahren relativ starke Abnahme der Herzfrequenz (Fentzke et al., 1997). Dieser Trend zeigte sich auch in der hier vorliegenden Arbeit. Weitere beschriebene Narkoseeffekte sind eine Abnahme der LV-FS% bei gleichzeitiger Zunahme der LVedD (Roth et al., 2002). Am ehesten sind diese Veränderungen durch den negativ chronotropen und negativ inotropen Effekt der Anästhetika erklärlich (Yang et al., 2001). Als unerwünschte Nebenwirkung sind bei hohen Dosierungen drastische Blutdruckabfälle sowie Atemdepressionen beschrieben worden.

### **2.2.3. Versuchsnachbereitung**

Nach der ca. 20- bis 30-minütigen Untersuchung wurden die Tiere wieder zurück in einen Käfig gesetzt und für ca. 8 bis 12 Stunden in der Erholungsphase mit einer Wärmelampe bestrahlt. Bereits unmittelbar nach Untersuchungsende bewegten sich die Mäuse wieder und nahmen auch bald wieder Flüssigkeit sowie Standardfutter zu sich. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihren gewohnten Stall verbracht. Schwierigkeiten bei dem Anästhesieverfahren wurden lediglich in drei Fällen und auch nur bei Tieren, die vorher mit phytolhaltiger Kost gefüttert wurden, gesehen. Diese Tiere verendeten unmittelbar nach der Untersuchung. Als ursächlich verantwortlich scheint der reduzierte Allgemeinzustand der Tiere gewesen zu sein. Dieser äußerte sich in einer erheblichen Gewichtsabnahme, glasigen Augen, struppigem Fell und weitestgehender Bewegungslosigkeit vor Narkoseeinleitung.

### **2.3. Untersuchungstechnik**

#### **2.3.1. Physikalische Grundlagen der Echokardiographie**

Physikalisch ist Schall definiert als mechanische Schwingung in festen, flüssigen oder gasförmigen Medien. Vom Menschen wahrgenommen werden Schallwellen mit Frequenzen zwischen 16 Hz bis 20 KHz. In elastischen Medien erfolgt seine Weiterleitung vorwiegend in Form von Longitudinalwellen und ruft dabei im menschlichen Gehör einen Sinneseindruck hervor. Die schematische Darstellung dieser Wellen erfolgt in Form von Sinusschwingungen. Sie sind charakterisiert durch ihre Schallintensität bzw. Amplitude, ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie ihre Wellenlänge. Wellen, die über 20 KHz betragen, werden als „Ultraschall“ bezeichnet. In der medizinischen Diagnostik finden in der Regel Ultraschallwellen von 1 bis 10 MHz Anwendung. Diese Frequenzen werden weder von Tier noch Mensch akustisch wahrgenommen. Ultraschallwellen in biologischen Geweben verhalten sich entsprechend der in der Akustik und Optik bekannten Gesetze der Absorption, Beugung, Brechung, Reflexion, Streuung und Transmission.

Die im Ultraschallkopf angeordneten Kristalle wandeln elektrische Energie über den piezoelektrischen Effekt in mechanische Energie um. Diese gelangt in Form von Schallwellen in den Organismus. Technisch können zwei Formen von Ultraschallköpfen unterschieden werden, elektronische und mechanische. In letzteren wird die Schallrichtung durch mechanisch verstellbare Emitter bestimmt. Moderne Echokardiographiegeräte verwenden fast ausschliesslich die elektronische Variante (phased-array-Systeme).

Wenn Ultraschallwellen im Organismus auf unterschiedliche Gewebearten stoßen, werden diese nach den physikalischen Gesetzen der Grenzzonenreflexion in Abhängigkeit von den Unterschieden im Schallleitverhalten der Gewebe und der eingesetzten Schallqualität absorbiert und reflektiert. Dabei

werden Ultraschallgeschwindigkeiten in den Weichteilgeweben im Mittel von 1540 m/s erreicht. Dem Ultraschallkopf kommt dabei auch die Aufgabe zu, die reflektierten Schallwellen in elektrische Signale umzuwandeln. Er dient gleichzeitig als Sender und Empfänger. Auf dem Monitor kommen die reflektierten Ultraschallwellen in Form von Lichtpunkten zur Darstellung, deren Helligkeit die Reflexionsintensität repräsentiert und deren Laufzeitermittlung die Signalerfernung vom Schallkopf auf der Longitudinalen kodiert (M-Mode). Werden zusätzlich weitere Ultraschallemissionen in lateraler Ablenkung analysiert, entsteht als Information ein zweidimensionales Bild, mit dem Strukturen in Längs- und Querrichtung wiedergegeben werden können (2D-Bild).

In der Echokardiographie kommt regelmäßig ein Ultraschallkopf mit Sektor-scanner zur Anwendung. Dieser zeichnet sich in besonderem Maße dadurch aus, dass Untersuchungen auch auf engem Raum, wie dem Intercostalraum, sicher durchgeführt werden können, um schwer zu erreichende Organe zu untersuchen. Nachteilig ist die mit der Tiefe abnehmende Qualität der Darstellung bedingt durch Abnahme der lateralen Auflösung und Signalabschwächung. Es kommt jedoch bei der inhomogenen Darstellungsqualität nicht zu einer Verzerrung der Strukturen.

### **2.3.2. Das zweidimensionale B-Bild**

Charakteristisch für das zweidimensionale B-Bild-Verfahren, das seinen Namen aus dem englischen ableitet (B = brightness/Helligkeit), ist die Darstellung der reflektierten Echos als Leuchtpunkte auf dem Monitor. Die auf dem Bildschirm erscheinenden Intensitätsunterschiede (Helligkeiten bzw. Graustufen) repräsentieren die variierenden Schallreflexionsqualitäten. Das für die Untersuchung zur Verfügung stehende Gerät der Firma Agilent Technologies, Sonos 5500, B 1-software package, Palo Alto, Ca, USA, ist in der Lage, intern mit 265

Amplitudenabstufungen zu arbeiten und diese mit 32 – 64 Graustufen auf dem Monitor abzubilden. Der Bildaufbau geschieht dabei in der sogenannten „real-time“-Technik, d.h. mit Bildwiederholungsraten, die reale Abläufe mit vom menschlichen Auge nicht wahrnehmbarer Zeitverzögerung abbilden. Der hierbei verwendete Schallkopf arbeitet als elektronischer Sektorscanner mit 12 Mhz nach der "phased-array-Technik", die phasenverschobene Ansteuerung der feststehenden Kristalle realisiert dabei die laterale Schallablenkung und Fokussierung.

Die Stärke des zwei-dimensionalen B-Bildes ist die Darstellung der Dimension und Struktur des untersuchten Gewebes. Dabei ist zu beachten, dass die laterale Auflösung der Grenzlinien ungenau ist.

### **2.3.3. Der TM-Mode**

Auch dieser Begriff leitet sich aus dem Englischen ab. T steht für „time“ (Zeit) und M für „motion“ (Bewegung). Landläufig wird diese Technik auch verkürzt als M-Mode bezeichnet. Vereinfacht gesagt, handelt es sich beim M-Mode um die eindimensionale Variante, wobei allerdings die Grenzflächensignale entlang des Meßstrahles auf der X-Achse gegen die Zeit aufgetragen werden. Die Beschränkung auf einen Meßstrahl ermöglicht sehr hohe Bildwiederholraten. Die Stärke dieser Methode ist daher die Darstellbarkeit schnell ablaufender, komplexer Bewegungsmuster. Bei senkrechter Einstellung des Ultraschallstrahls auf die zu untersuchende Struktur werden Bewegungsabläufe als Funktion der Zeit mit einem definierten Vorschub aufgezeichnet. Daher wird diese Technik insbesondere bei der Beurteilung von Bewegungsmustern an der Herzmuskelwand und den Herzklappen angewendet.

#### **2.3.4. Die Doppler-Technik**

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Beurteilung funktioneller Abläufe bietet die Anwendung der Doppler-Echokardiographie.

Mittels dieser Technik lassen sich Flussphänomene hinsichtlich ihrer Strömungsrichtung und Strömungsgeschwindigkeit analysiert.

Zugrunde liegt das aus der Physik bekannte Doppler-Prinzip. Schallwellenreflexionen von bewegten Objekten erfahren in Abhängigkeit von Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit des Objektes eine Verschiebung ihrer Frequenzen. Diese Differenz zwischen Sende- und Reflexionsfrequenz wird als Doppler-shift bezeichnet. Sie liegt bei der Echokardiographie im Bereich von 16 Hz und 20 KHz und kann daher als akustisches Signal direkt wiedergegeben werden. Als Reflexionsmedium dienen hauptsächlich bewegte Erythrozyten an denen die vom Ultraschallkopf ausgesandten Wellen zurückgeworfen und anschließend vom Ultraschallkopf wieder empfangen werden. Dabei kommt es je nach Flussrichtung zu den typischen Doppler-Effekten. Bei sich auf den Ultraschallkopf zu bewegendem Blut resultiert eine Abnahme der Wellenlänge mit einer konsekutiven Zunahme der Schallfrequenz. Das entsprechende Phänomen tritt bei umgekehrter Flussrichtung auf, allerdings wird dann eine Frequenzabnahme registriert.

Dargestellt werden die gemessenen Doppler-Frequenzen bzw. die über die Doppler-Gleichung berechneten Flußgeschwindigkeiten als Spektrum über die Zeit mit Helligkeitskodierter Signalintensität. Definitionsgemäß werden Bewegungen auf den Schallkopf zu als positive Werte erfaßt und über der Nulllinie aufgetragen.

Technisch gesehen erfolgt die Umsetzung des Doppler-Prinzipes bei der echokardiographischen Doppler-Untersuchung auf zweierlei Weise.

Zum einen ermöglicht das Unterbringen zweier verschiedener Ultraschallwandler in einem Ultraschallkopf eine parallele, kontinuierliche Signalverarbeitung im Hinblick auf die beiden Qualitäten Senden und Empfangen (sog.

„continuous-wave-Doppler“ (CW)). Entlang des Meßstrahles werden dabei alle auftretenden Flußgeschwindigkeiten ermittelt und als Spektrum dargestellt. Vorteil dieser Meßmethode ist: es gibt keine Begrenzung der meßbaren Geschwindigkeit. Eine räumliche Zuordnung der Meßsignale ist dafür allerdings nicht möglich.

Dies ist die Domäne des „pulsed-wave-Verfahrens“ (PW-Doppler). Hier sendet und empfängt eine Piezokristalleinheit wechselnd kurze Impulsfolgen mit variabler Wiederholfrequenz (Pulsrepetitionsfrequenz = PRF). Bei gegebener Gewebeschallgeschwindigkeit kann aus der Signallaufzeit die Reflektortiefe errechnet werden. Über die genaue Definition eines zeitlichen Empfangsfensters läßt sich damit die Bestimmung eines Meßvolumens in vorgegebener Lage realisieren. Nur die in diesem "gate" liegenden Signalanteile werden nach Fast-Fourier-Transformation als Doppler-Frequenzspektrum wiedergegeben. Im gate können Winkelfehler bei Divergenz zwischen Flußrichtung und Ultraschallstrahl bedingt ausgeglichen werden. Schallkopfsendefrequenz und resultierende max. Gewebeeindringtiefe bestimmen die mögliche Pulsrepetitionsfrequenz welche ihrerseits aus technischen Gründen die meßbaren Doppler-Frequenzen und damit Flußgeschwindigkeiten limitiert. Eine verwertbare Signalrekonstruktion erfordert Abtastraten mit längstens der halben Periode der höchstfrequenten Doppler-Signalkomponente oder über die Frequenz formuliert liegt die max. darstellbare Doppler-Frequenz bei  $\frac{1}{2}$  PRF (Nyquist-Theorem). Überschreitet die Flußgeschwindigkeit diese sog. Nyquistgrenze treten in der Darstellung der Frequenzspektren typische Fehler auf ("Aliasing-Phänomen"). Auf dem Monitor zeigt sich trotz beibehaltener Flussrichtung der Blutstrom in umgekehrter Richtung.

Die zweidimensionale gepulste Doppler-Technik ist die Farb-Doppler-Echokardiographie. Sie stellt ein Duplexverfahren dar. Dabei sendet und empfängt der Ultraschallwandler abwechselnd eine Ultraschallzeile zum Aufbau des zweidimensionalen B-Bildes und danach eine Zeile zur Erlangung der Doppler-

Information. Benachbarte Messvolumina erfassen die Blutströme und bilden sie simultan flächenhaft ab. Dabei gilt die Konvention, dass laminar auf den Schallkopf zufließendes Blut rot, vom Schallkopf wegfließendes Blut blau zur Darstellung kommt. Turbulenzen werden grün bis gelb erfasst. Die Stärke der farbkodierten Doppler-Technik besteht im optischen Auffinden kardialer Vitien oder pathologischer Turbulenzen. Allerdings ist diese Technik erheblich von technischen Faktoren wie der Eindringtiefe und der Größe des Messfensters abhängig.

### **2.3.5. Die Anwendung der Echokardiographie bei Mäusen**

Bereits Hoit B. D. et al. haben 1995 erste echokardiographische Untersuchungen bei Mäusen publiziert. Dieses Verfahren ist mittlerweile etabliert und standardisiert (Stypmann et al., 2002, Weiss et al., 2002).

Gardin et al. haben 1995 von guten echokardiographischen Untersuchungsbedingungen bei transgenen Mäusen berichten können. Die dabei erhobenen Ergebnisse waren reproduzierbar.

Dargestellt wurden die Dimensionen (Länge und Breite) des linken Ventrikels sowie die aortoavalvuläre Ausflussbahn und die Mitralklappe in der parasternalen Längsachse. Bei senkrechter Anlotung wurde unterhalb der Spitze der Mitralklappensegel auf Höhe der Sehnenfäden durch den linken Ventrikel der M-Mode gelegt. Dabei ist für die Messung eine klare Abgrenzbarkeit des Septums und der Hinterwand Voraussetzung. Darüberhinaus müssen Herzspitze und Anulus detektierbar sein. Aus den erhobenen Daten wurden die abgeleiteten Parameter berechnet. Dabei waren die linksventrikuläre Verkürzungsfraktion sowie die LV-Massen-Berechnung gut reproduzierbar. Die Darstellung der Flussgeschwindigkeiten über der Aorten- und Mitralklappe gelang über der Herzspitze im sog. „3-Kammer-Blick“ (Doevendans et al., 1998). In dieser Einstellung erfolgte auch die Beurteilung der linksventrikulären

Pumpfunktion (Gardin et al., 1995).

Von transthorakal nicht zuverlässig darstellbar sind der rechte Vorhof sowie der rechte Ventrikel. Scherrer-Crosbie et al. gelang 1998 transösophageal mittels 3,4 F intravasalem Katheter die Volumen- und Flussbestimmung des rechten Herzens. Als limitierend bei diesem Verfahren wirkt sich die geringe Framerate von 8 Hz aus.

In der vorliegenden Arbeit konnten in der parasternalen Längsachse die Dimensionen des linken Ventrikels sowie der Aortenausflusstrakt und die Mitraklappe abgegrenzt werden. Der linke Vorhof lässt sich in seinem Querdurchmesser vermessen.

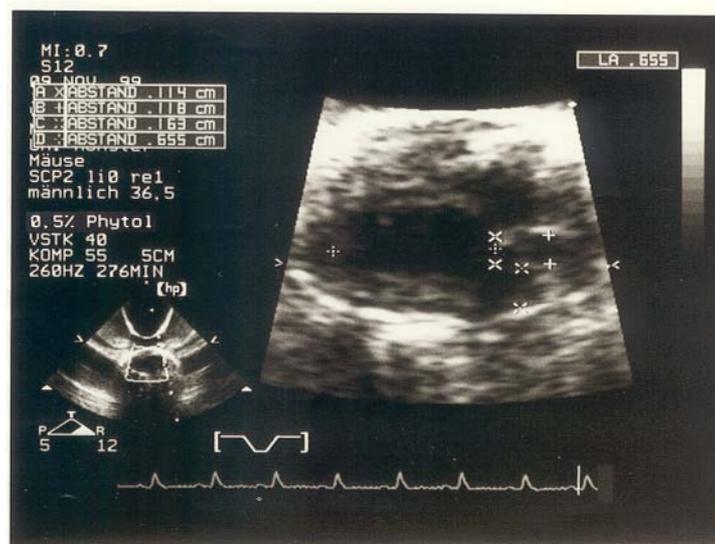


Abbildung 1: Parasternaler Längsschnitt

In dieser Ebene erfolgte auch die Messung der typischen linksventrikulären M-Mode-Parameter in Systole und Diastole.

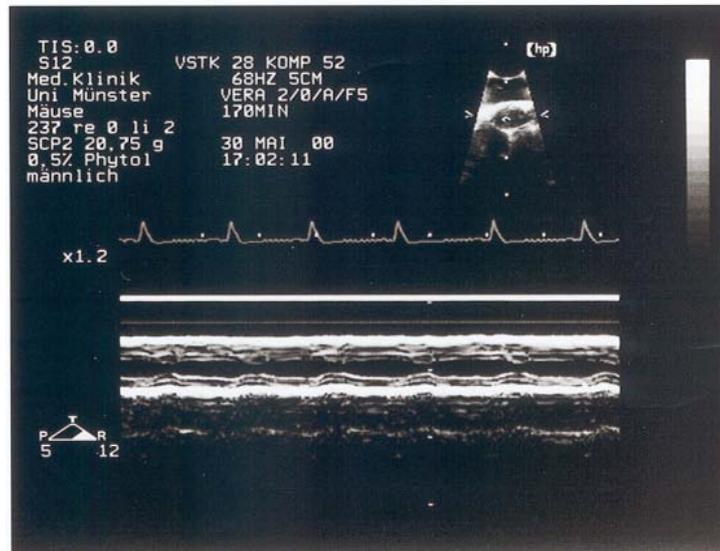


Abbildung 2: M-Mode

Darstellbar im apikalen 3-Kammer-Blick waren die Flussgeschwindigkeiten über Mitral- und Aortenklappe (Doevendans et al., 1998). Für die quantitative Auswertung war die klare Abgrenzbarkeit der Grenzflächen der Spektralkurve Voraussetzung. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle der Anlotung durch ein zeitgleich mitlaufendes 2-D-Bild. Bei der Messung wurde ein Winkelfehler deutlich kleiner  $30^\circ$  zur Blutstromrichtung eingehalten.

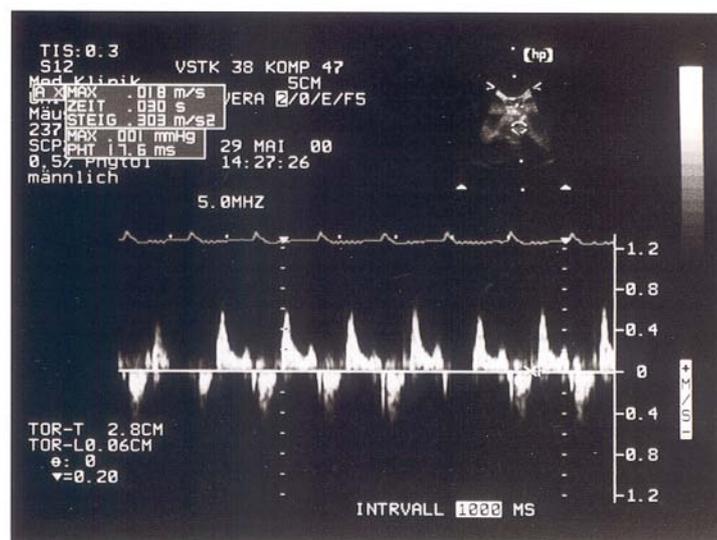


Abbildung 3: Flussprofil über der Mitralklappe

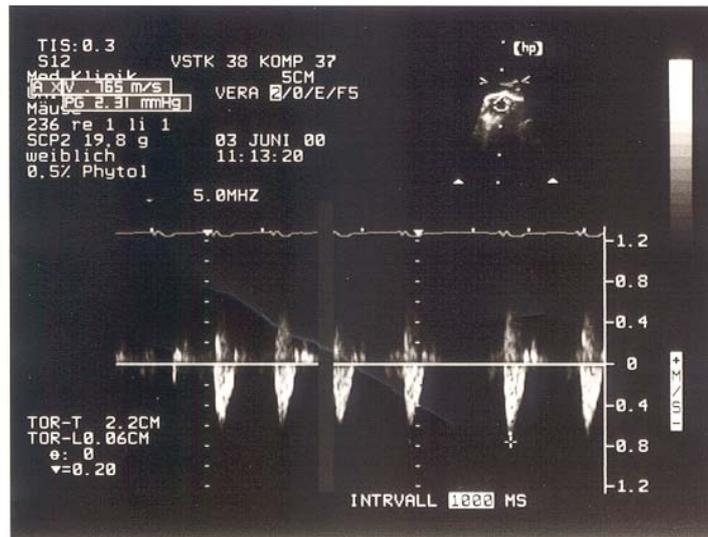


Abbildung 4: Flussprofil über der Aortenklappe

## 2.4. Messungen

### 2.4.1. Technische Ausrüstung

Für die Untersuchungen stand ein Ultraschallgerät der Firma Agilent Technologies, vormals Hewlett Packard, Typ Sonos 5500, B1-software package, Palo Alto, Ca, USA, zur Verfügung. Der verwendete Ultraschallkopf wies einen Sendefrequenzbereich von 6 bis 12 MHz auf, die Daten wurden durchgehend mit 12 MHz erhoben. Die Auswertung der Messwerte erfolgte über ein im Gerät integriertes Programm. Die Dokumentation wurde auf Fotopapier vorgenommen.

Alle Messungen erfolgten in 45 Grad Linksseitenlage von linksthorakal. Bei der apikalen Schallkopfführung kam im 2-D-Bild die linksventrikuläre Längsachse zur Darstellung. Dabei konnten der linksventrikuläre Ausflusstrakt, der linke Vorhof sowie die Mitralklappe abgegrenzt werden. Gemessen wurden die Länge des linken Ventrikels sowie der Querdurchmesser des linken Vorhofes,

der Durchmesser der Aortenwurzel und des linksventrikulären Ausflusstraktes im 2-D-Bild.

#### **2.4.2. Messungen im M-Mode**

In der parasternalen Längsachse erfolgten im M-Mode die Messungen der typischen linksventrikulären Diameter in Systole und Diastole. Abgeleitete Größen wie die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS) wurden gerätegestützt berechnet.

Im Einzelnen wurden folgende Parameter im M-Mode direkt ermittelt:

- Dicke des interventrikulären Septums, endsystolisch und enddiastolisch (IVSs, IVSed).
- Durchmesser des linken Ventrikels, endsystolisch und enddiastolisch (LVIDs, LVIDd).
- Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand, endsystolisch und enddiastolisch (LVPWs, LVPWd).

Die Darstellung des rechten Ventrikels gelang nur unregelmäßig und wurde daher für die Messung nicht herangezogen.

#### **2.4.3. Messungen mit gepulster (PW), kontinuierlicher (CW) und farbkodierter Doppler-Technik**

In der apikalen Längsachse fand die Untersuchung der Aorten- und Mitralklappe statt.

Bei der Auswertung des mitralen time-velocity Profiles erfolgte eine getrennte Erfassung der E- und A-Welle sowie eine Messung der Dezelerationszeit. Zur

Vitienerkennung wurde die farbkodierte Doppler-Technik angewendet. Diese ermöglicht semiquantitativ die Erfassung der Intensität und Charakteristik von Strömungen (tubulent oder laminar), der Geschwindigkeit und der Richtung derselben.

Für die Auswertung der Kurvenverläufe wurde ein im Gerät integriertes Programm genutzt. Die Einzelparameter errechneten sich als Durchschnittswerte aus fünf unterschiedlichen Messungen nach manueller Konturmarkierung der am Monitor dargestellten Fluß-Zeit-Spektren mittels Trackball. Die vorgegebene Software berechnete hieraus das Geschwindigkeits-Zeit-Integral bzw. die maximale und mittlere Flußgeschwindigkeit sowie korrespondierend die maximalen und mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe. Die Größenwertbestimmung für die E- und A-Welle sowie die Messung der mitralen Dezelerationszeit, der linksventrikulären Ejektions- und isovolumetrischen Relaxationszeit wurden separat vorgenommen.

Die Messung der Flußgeschwindigkeiten in Aorta ascendens und descendens erfolgte von einer jugularen Schallkopfposition aus.

#### **2.4.4. Abgeleitete Parameter**

Aus den oben beschriebenen Messungen wurden folgende Parameter ermittelt:

*Systolische bzw. prozentuale systolische Durchmesserverkürzung* des linken Ventrikels (fractional shortening = FS bzw. % FS):

$$\text{FS} = (\text{LVIDd} - \text{LVIDs})/\text{LVIDd}$$

$$\% \text{FS} = \text{FS} \times 100$$

LVIDd = Durchmesser des linken Ventrikels – enddiastolisch

LVIDs = Durchmesser des linken Ventrikels – endsystolisch

*Herzzeitvolumen (HZV) [ml/min]*

a)  $\text{HZV}_{\text{LVOT}}$ : Berechnet nach der vereinfachten Bernoulli-Gleichung

$$\text{HZV}_{\text{LVOT}} = \text{SV} \times \text{HF}$$

SV = Schlagvolumen

$$= A \times \int V_{\text{AO(PW)}}$$

A = durchströmte Querschnittsfläche [mm<sup>2</sup>]

$$= \pi \times (\text{LVOT}/2)^2$$

LVOT = Diameter d. linksventrikulären  
Ausflusstraktes

subvalvulär [mm]

$\int V_{\text{AO(PW)}}$  = Doppler-Geschwindigkeitszeitintegral über der  
Aortenklappe pw-gemessen

HF = Herzfrequenz [min<sup>-1</sup>]

b)  $\text{HZV}_{\text{Teich.}}$ : Berechnet nach der Teichholz-Formel

$$\text{HZV}_{\text{Teich}} = \text{SV} \times \text{HF} \text{ [ml/min]}$$

SV = Schlagvolumen [ml]

$$= (\text{EDV}_{\text{Teich}} - \text{ESV}_{\text{Teich}}) / 1000$$

EDV<sub>Teich</sub> = Enddiastolisches linksventrikuläres Volumen

$$= [7 / (2.4 + \text{LVedD})] \times \text{LVedD}^3 \text{ [mm}^3\text{]}$$

ESV<sub>Teich</sub> = Endsystolisches linksventrikuläres Volumen

$$= [7 / (2.4 + \text{LVesD})] \times \text{LVesD}^3 \text{ [mm}^3\text{]}$$

HF = Herzfrequenz [min<sup>-1</sup>]

*Ejektionsfraktion (EF) [%]*

$$\text{EF}_{\text{Teich}} = [(\text{EDV}_{\text{Teich}} - \text{ESV}_{\text{Teich}}) / \text{EDV}_{\text{Teich}}] \times 100$$

*Linksventrikuläre Muskelmasse* nach der area-length-Methode (AL-LV-Mass)  
[mg]

$$\text{AL-LV-Mass} = 1.055 \times [(5/6 \times (A_1 \times (\text{LV-Length} + \text{IVSed}))) - (5/6 \times A_2 \times \text{LV-} \\ \text{Length})]$$

$A_1$  = epikardiale Kreisfläche via LVedD + (IVSed + LVPWed)

$A_2$  = endokardiale Kreisfläche via LVedD

### Indizes

Linksventrikulärer Massenindex (LV-Mass-Index) [mg/g]

$$= AL-LV-Mass / KG$$

Cardiac Index (CI)

$$= HZV_{LVOT/Teich} / KG$$

KG = Körpergewicht [g]

### Isovolumetrische Relaxationszeit (IVRT) [ms]

$$IVRT = (R - D-Punkt)_{pw} - (R - AoEJT)_{pw}$$

$(R - D-Punkt)_{pw}$  = Abstand der R-Zacke im EKG zum D-Punkt  
des mitralen Flußspektrums (pw-gemessen)

$(R - AoEJT)_{pw}$  = Abstand der R-Zacke im EKG zum Ende  
der Ejektionszeit über der Aortenklappe  
(pw-gemessen)

### E zu A Verhältnis (MV E/A)

MV E/A = Quotient aus E- und A-Welle des mitralen Doppler-  
Spektrums

## **2.5. Statistische Auswertung**

Der Messwert eines jeden Parameters wurde als Mittelwert von fünf Einzelmessungen ermittelt. Innerhalb der einzelnen Messreihen wurden für jeden Parameter der arithmetische Mittelwert und die empirische Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Mit Hilfe des doppelseitigen t-Testes für gepaarte Stichproben wurden die Messergebnisse unter Standardkost mit denen nach phytolhaltiger Diät verglichen. Zur Diskriminierung ggf. bestehender geschlechtsspezifischer Einflußfaktoren erfolgte die Auswertung für das Gesamtkollektiv ergänzt um eine Subgruppenanalyse mit männlichen bzw. weiblichen Tieren. Hierbei relevante Unterschiede sind separat dargestellt.

Für alle statistischen Erhebungen wurde das Statistikprogramm SPSS for Windows ®, Release 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) verwendet.

Als Grenze wurde ein Signifikanzniveau von  $< 0,05$  festgelegt.

$P < 0,05$  → signifikant

$P > 0,05$  → nicht signifikant (n.s.)



Parameter	Gesamtkollektiv			Männchen			Weibchen		
	Normalkost	Phytolkost	p	Normalkost	Phytolkost	p	Normalkost	Phytolkost	p
Abgeleitete Grössen /M-Mode/2-D)									
FS [%]	36,79 (± 5,4)	36,96 (± 6,40)	n.s.	36,26 (± 4,01)	36,16 (± 5,19)	n.s.	37,22 (± 6,45)	37,62 (± 7,27)	n.s.
EDV <sub>Teich</sub> [ml]	42,24 (± 9,82)	39,19 (± 10,73)	< 0,001	45,21 (± 11,75)	41,97 (± 12,96)	< 0,05	39,85 (± 7,1)	36,97 (± 7,87)	< 0,01
ESV <sub>Teich</sub> [ml]	13,79 (± 4,71)	12,92 (± 5,8)	n.s.	15,07 (± 4,94)	14,41 (± 6,52)	n.s.	12,78 (± 4,25)	11,72 (± 4,82)	n.s.
EF <sub>Teich</sub> [%]	67,59 (± 6,91)	67,78 (± 8,01)	n.s.	67,01 (± 5,12)	66,85 (± 6,58)	n.s.	68,05 (± 8,05)	68,52 (± 8,91)	n.s.
AL-LV-Mass [mg]	72,66 (± 14,97)	76,14 (± 15,24)	< 0,05	76,93 (± 18,34)	83,04 (± 17,54)	< 0,01	69,25 (± 10,4)	70,62 (± 10,14)	n.s.
AL-LV-Mass- Index [mg/g]	2,73 (± 0,4)	3,50 (± 0,49)	< 0,001	2,57 (± 0,36)	3,35 (± 0,41)	< 0,001	2,85 (± 0,38)	3,62 (± 0,51)	< 0,001
Doppler-Messungen									
AoV-V <sub>max</sub> [cm/s]	76,4 (± 6,9)	69,0 (± 9,0)	< 0,001	77,5 (± 7,3)	70,4 (± 8,7)	< 0,01	75,5 (± 6,6)	67,9 (± 9,3)	< 0,001
AoV-PG <sub>max</sub> [mmHg]	2,35 (± 0,42)	1,95 (± 0,52)	< 0,001	2,41 (± 0,44)	2,01 (± 0,5)	< 0,01	2,29 (± 0,4)	1,9 (± 0,54)	< 0,01
AoV-PG <sub>mean</sub> [mmHg]	1,17 (± 0,22)	0,95 (± 0,24)	< 0,001	1,25 (± 0,26)	1,02 (± 0,25)	< 0,001	1,11 (± 0,16)	0,9 (± 0,2)	< 0,001
MV E-wave [cm/s]	80,6 (± 9,6)	65,9 (± 12,5)	< 0,001	80,4 (± 9,3)	68,5 (± 11,3)	< 0,001	82,0 (± 9,2)	65,6 (± 13,9)	< 0,001
MV A-wave [cm/s]	25,3 (± 6,3)	25,4 (± 6,4)	n.s.	24,1 (± 7,1)	24,9 (± 5,8)	n.s.	26,2 (± 5,5)	25,8 (± 6,9)	n.s.
E-A-Ratio	3,34 (± 0,74)	2,70 (± 0,62)	< 0,001	3,55 (± 0,85)	2,87 (± 0,72)	< 0,01	3,24 (± 0,65)	2,63 (± 0,56)	< 0,001

Fortsetzung Tabelle 3.: Ergebnisüberblick

Parameter	Gesamtkollektiv			Männchen			Weibchen		
	Normalkost	Phytolkost	p	Normalkost	Phytolkost	p	Normalkost	Phytolkost	p
Doppler-Messungen									
MV-PG <sub>max</sub> [mmHg]	2,84 [± 0,65]	1,91 [± 0,72]	< 0,001	2,70 [± 0,68]	1,93 [± 0,67]	< 0,001	2,95 [± 0,61]	1,9 [± 0,77]	< 0,001
MV-PG <sub>mean</sub> [mmHg]	0,86 [± 0,24]	0,42 [± 0,2]	< 0,001	0,89 [± 0,31]	0,42 [± 0,2]	< 0,001	0,83 [± 0,17]	0,45 [± 0,19]	< 0,001
MV-Decel.time [ms]	39,09 [± 5,79]	41,23 [± 5,39]	n.s.	40,79 [± 6,14]	41,95 [± 5,33]	n.s.	37,9 [± 5,2]	40,65 [± 5,36]	n.s.
IVRT [ms]	30,23 [± 4,96]	34,88 [± 5,05]	< 0,001	32,5 [± 5,87]	35,59 [± 6,14]	< 0,001	28,55 [± 3,26]	34,35 [± 3,97]	< 0,001
Hämodynamische Daten									
HZV <sub>Lvor</sub> [ml/min.]	11,75 [± 2,33]	9,14 [± 2,33]	< 0,001	12,9 [± 1,94]	9,52 [± 2,75]	< 0,001	10,84 [± 2,25]	8,84 [± 1,95]	< 0,001
Cl <sub>Lvor</sub> [ml/min./g]	0,45 [± 0,11]	0,42 [± 0,11]	n.s.	0,44 [± 0,13]	0,39 [± 0,09]	< 0,05	0,45 [± 0,09]	0,45 [± 0,11]	n.s.
HZV <sub>Teich</sub> [ml/min.]	7,58 [± 1,94]	5,84 [± 1,79]	< 0,001	7,91 [± 1,77]	6,19 [± 1,57]	< 0,001	7,32 [± 2,03]	5,56 [± 1,91]	< 0,001
Cl <sub>Teich</sub> [ml/min./g]	0,29 [± 0,09]	0,27 [± 0,1]	n.s.	0,28 [± 0,09]	0,26 [± 0,07]	n.s.	0,3 [± 0,08]	0,29 [± 0,11]	n.s.

Fortsetzung Tabelle 3.: Ergebnisüberblick

### 3.1. Gesamtkollektiv

#### 3.1.2. Klinische Daten

Untersucht wurden insgesamt 45 Tiere. Das Durchschnittsalter der 20 männlichen und 25 weiblichen Tiere betrug 87 Tage vor dem Fütterungsexperiment ( $\pm 23$  Tage). Nach der phytolhaltigen Diät hatten die Tiere ein Durchschnittsalter von 117 Tagen erreicht ( $\pm 27$  Tage) und waren somit 34% älter. Ihr Gewicht betrug im Mittel 26,8g ( $\pm 4,62$ g) vor dem Fütterungsexperiment. Unter der phytolhaltigen Kost trat eine Gewichtsreduktion um 18,6% auf, das durchschnittliche Gewicht betrug nur noch 21,88g ( $\pm 3,73$ g). Die initiale Herzfrequenz betrug durchschnittlich 270 Schläge pro Minute ( $\pm 56$ ) und erfuhr unter Phytolkost eine Reduktion um 16,7% auf 225 Schläge pro Minute ( $\pm 56$ ). Alle erhobenen Werte waren signifikant.

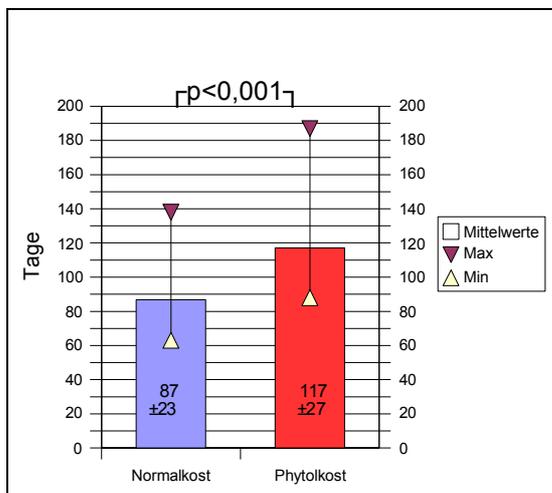


Abbildung 5: Alter der Mäuse

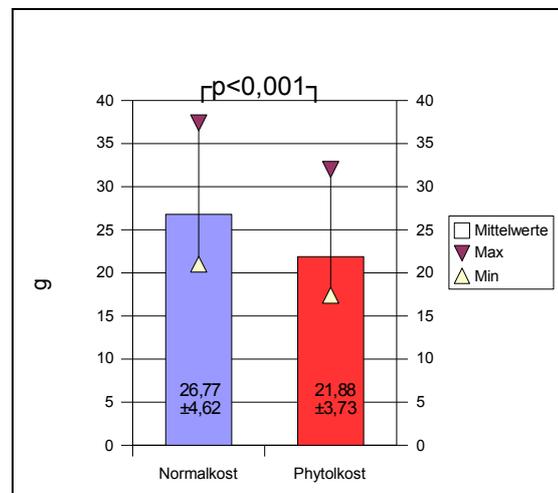


Abbildung 6: Gewicht der Mäuse

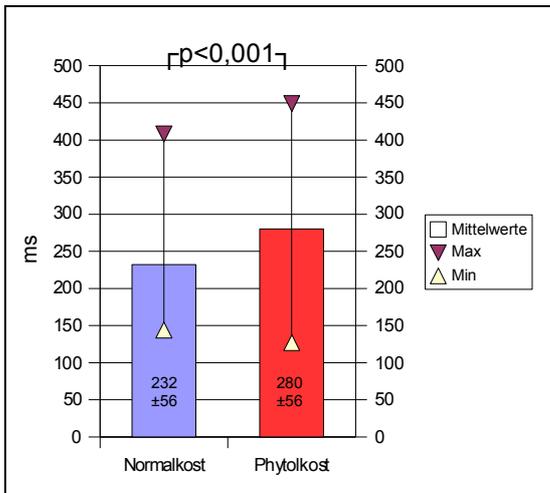


Abbildung 7: Ao-RR der Mäuse

### 3.1.2. M-Mode und 2-D-Messwerte

Vor dem Fütterungsexperiment betrug die Länge des linken Vorhofes durchschnittlich 1,79mm ( $\pm 0,15$ mm). Nach der phytolhaltigen Diät betrug die Länge des linken Vorhofes im Mittel 1,71mm ( $\pm 0,19$ mm) und war damit um 4,46% kürzer. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser war vor dem Fütterungsexperiment mit 3,22mm ( $\pm 0,30$ mm) um 10% größer als nach der Fütterungsphase mit Phytokost. Danach betrug er durchschnittlich 3,12mm ( $\pm 0,36$ mm). Ähnlich waren die Ergebnisse bei den endsystolischen Werten. Vor dem Fütterungsexperiment war der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser mit 2,04mm ( $\pm 0,27$ mm) um 14% größer als nach der Diät. Unter Phytokost konnten durchschnittliche Werte von 1,97mm ( $\pm 0,34$ mm) ermittelt werden.

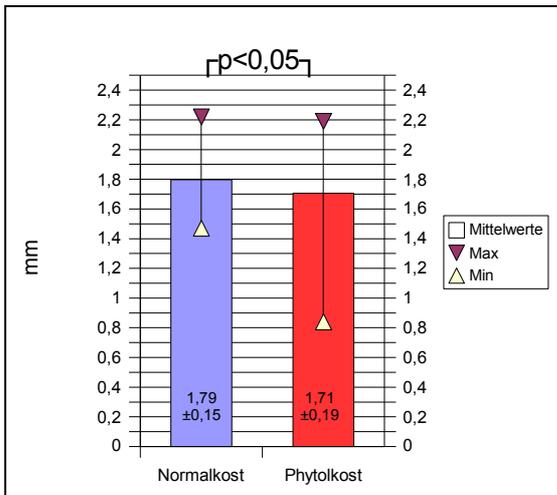


Abbildung 8: LA der Mäuse

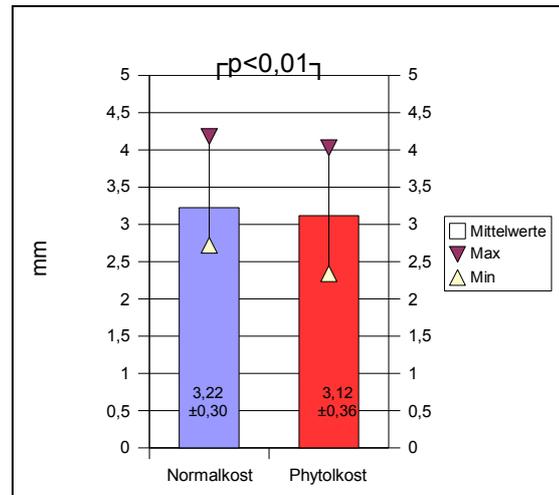


Abbildung 9: LVIDd der Mäuse

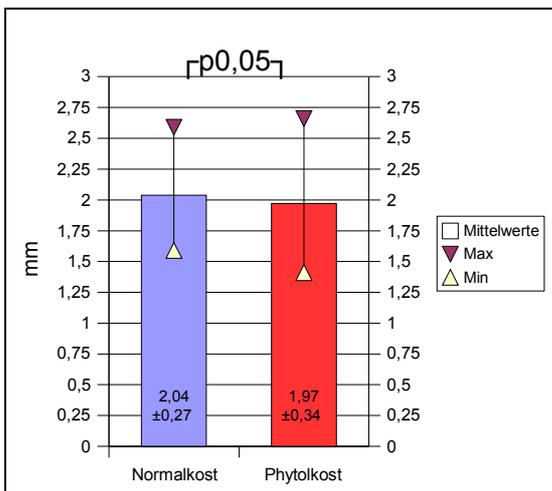


Abbildung 10: LVIDs der Mäuse

Bei folgenden Messwerten wurden unter Phytokost höhere Werte gemessen: Die enddiastolische Dicke des Interventrikularseptums betrug vor der Fütterungsphase mit 0,78mm ( $\pm 0,09$ mm) 4% weniger als nach der Diät mit Phytol, wobei eine Wanddicke von 0,82mm im Mittel ( $\pm 0,08$ mm) gemessen werden konnte. Der enddiastolische Durchmesser der Hinterwand stieg unter phytolhaltiger Diät um 5%. Vor der Fütterungsphase war der Durchmesser 0,85mm im Mittel ( $\pm 0,08$ mm), anschließend 0,9mm ( $\pm 0,07$ mm). Die Länge des linken Ventrikels war nach der Fütterung mit Phytokost mit 7,08mm ( $\pm 0,54$ mm) um

1,43% angestiegen. Vor der Fütterungsphase betrug die Länge durchschnittlich 6,98mm ( $\pm$  0,55mm).

Eine Abnahme um 3,43% von einem initialen Mittelwert von 2,04mm ( $\pm$  0,27 mm) unter Normalkost, auf 1,97mm ( $\pm$  0,34mm) nach Phytoldiät ergab die Messung des linksventrikulären systolischen Innendiameters. Alle Meßwertänderungen waren statistisch sigifikant.

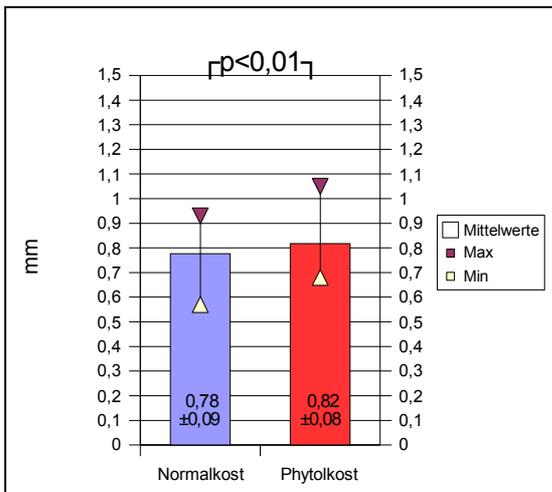


Abbildung 11: IVSed der Mäuse

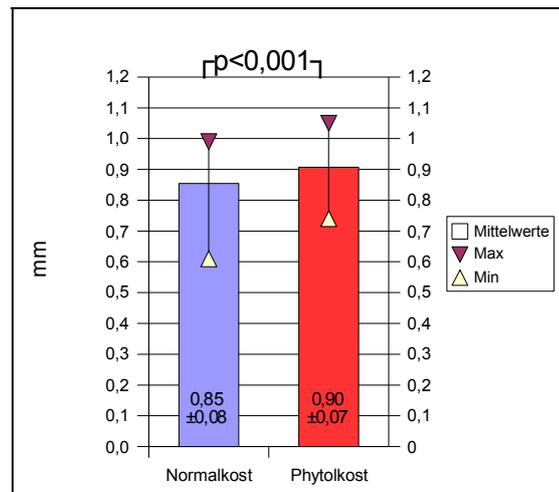


Abbildung 12: LVPWd der Mäuse

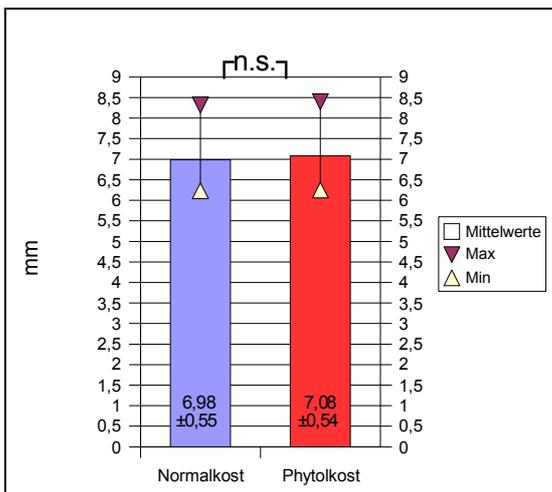


Abbildung 13: LV-Spitze der Mäuse

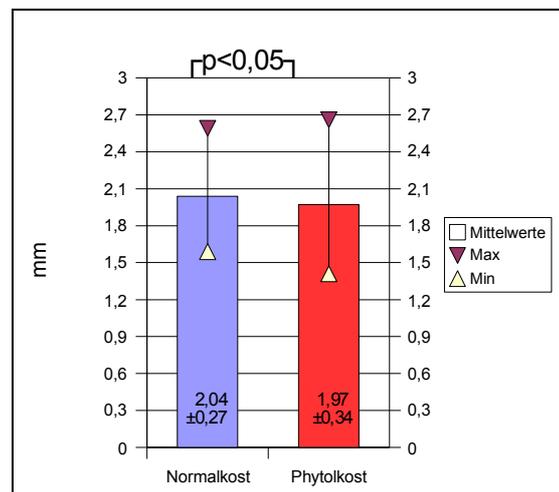


Abbildung 14: LVIDs der Mäuse

Die gemessenen systolischen Dimensionen des Interventrikularseptums, sowie

der linksventrikulären Hinterwand zeigten nach Phytoldiät keine oder nur geringgradige Änderungen, welche allesamt statistisch nicht sigifikant waren (IVSs 1,08mm ( $\pm 0,11$ mm bzw.  $\pm 0,12$ mm), LVPWs 1,12mm ( $\pm 0,08$ mm) vs. 1,13mm ( $\pm 0,11$ mm) entsprechend einer Differenz von + 0,89%).

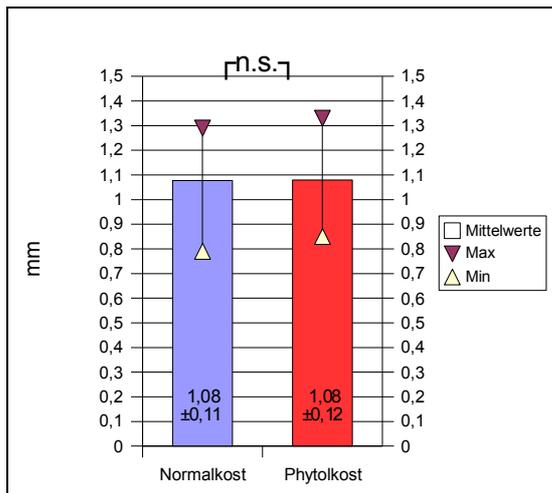


Abbildung 15: IVSs der Mäuse

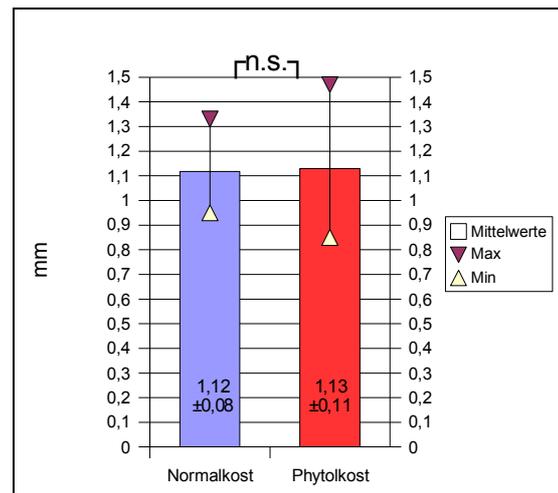


Abbildung 16: LVPWs der Mäuse

### 3.1.3. Abgeleitete Grössen (M-Mode / 2-D-Bild)

Die Verkürzungsfraction (FS) des linken Ventrikels wurde nach der in Abschnitt 2.4.5. beschriebenen Formel berechnet und betrug bei Fütterung mit Normalkost im Mittel 36,97% ( $\pm 5,4\%$ ). Nach Phytoldiät ließ sich mit 36,96% eine um 0,46% niedrigere FS berechnen. Diese Änderung war statistisch nicht signifikant.

Eine nur marginale Änderung ergab sich auch bei der nach Teichholz ermittelten Ejektionsfraction. Von 67,59% ( $\pm 6,91\%$ ) unter Normalkost stieg die mittlere Ejektionsfraction nach Fütterung mit phytolhaltiger Kost auf 67,78% ( $\pm 8,01\%$ ), entsprechend einer Zunahme von 0,28%.

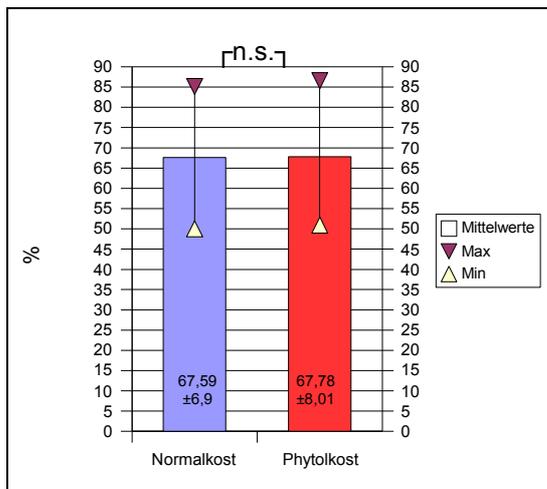
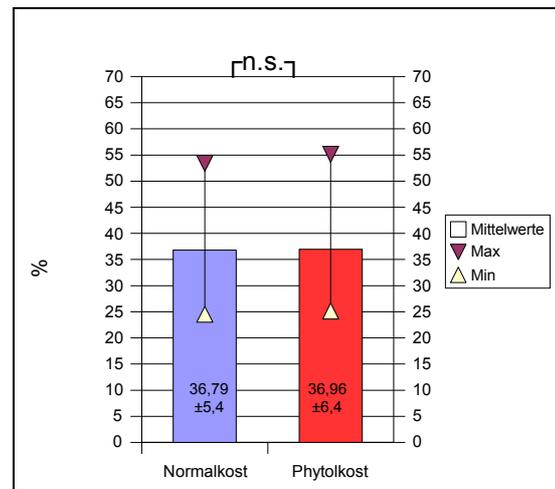
Abbildung 17:  $EF_{Teich}$  der Mäuse

Abbildung 18: FS der Mäuse

Die nach Teichholz ermittelten enddiastolischen und endsystolischen Volumina waren in der mit Normalkost gehaltenen Tiergruppe höher als in der Vergleichsgruppe. In der mit Normalkost gefütterten Gruppe betrug das enddiastolische Volumen  $42,24\text{mm}^3$  ( $\pm 9,82\text{mm}^3$ ) und war somit um 7,2% höher als bei der mit Phytolkost versorgten Tiergruppe. Dort betrug das Volumen  $39,19\text{mm}^3$  ( $\pm 10,73\text{mm}^3$ ). Das endsystolische Volumen betrug in der Normalkostgruppe durchschnittlich  $13,79\text{mm}^3$  ( $\pm 4,71\text{mm}^3$ ). Es war im Vergleich zur Phytolkostgruppe 6,3% höher. In dieser Gruppe betrug das endsystolische Volumen im Mittel  $12,92\text{mm}^3$  ( $\pm 5,8\text{mm}^3$ ). Das Signifikanzniveau lag für das  $EDV_{Teich}$  bei  $p=0,0004$ , für das  $ESV_{Teich}$  bei  $p=0,056$ .

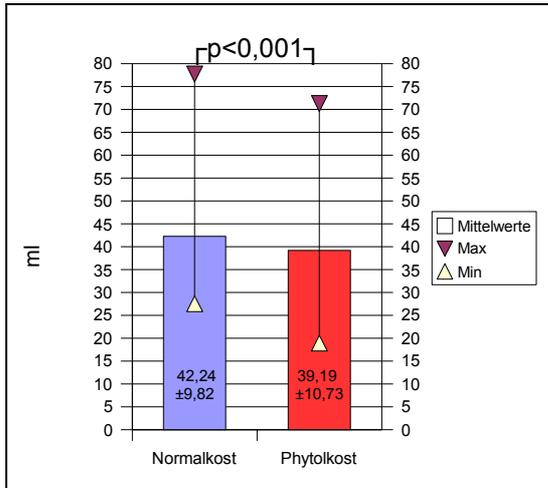


Abbildung 19: EDV<sub>Teich</sub> der Mäuse

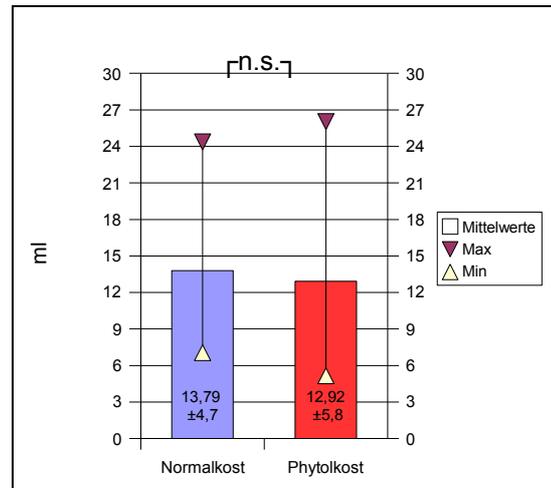


Abbildung 20: ESV<sub>Teich</sub> der Mäuse

Mittels „Area-Length-Methode“ erfolgte die Massenberechnung des linken Ventrikels in mg sowie aus dem erhaltenen Zahlenwert die Bestimmung des linksventrikulären Massen-Index in mg/g. Die mit Normalkost gefütterten Tiere hatten eine LV-Masse von 72,66mg ( $\pm 14,97$ mg) und einen Massen-Index in Höhe von 2,73mg/g ( $\pm 0,4$ mg/g). Demgegenüber betrug die LV-Masse nach Phytokostfütterung im Mittel 76,14mg ( $\pm 15,24$ mg) und war somit 4,8% höher. Der Massen-Index stieg um 28,2% auf 3,50 mg/g ( $\pm 0,49$  g/g).

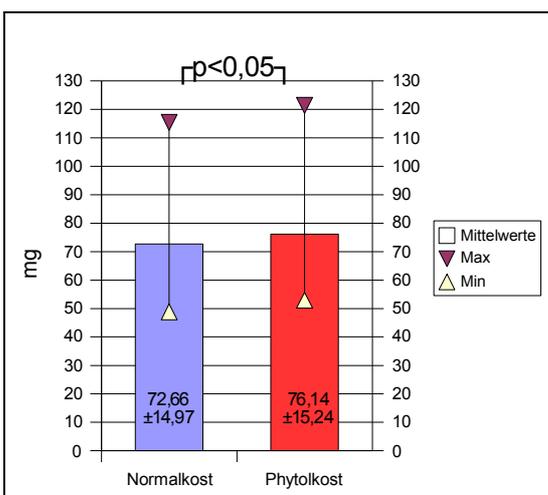


Abbildung 21: AL-LV-Masse der Mäuse

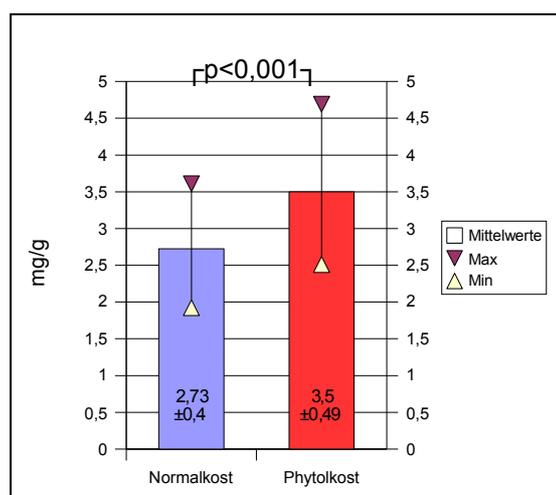
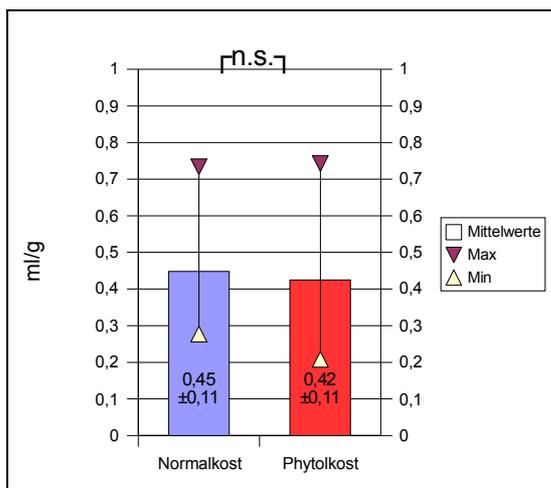
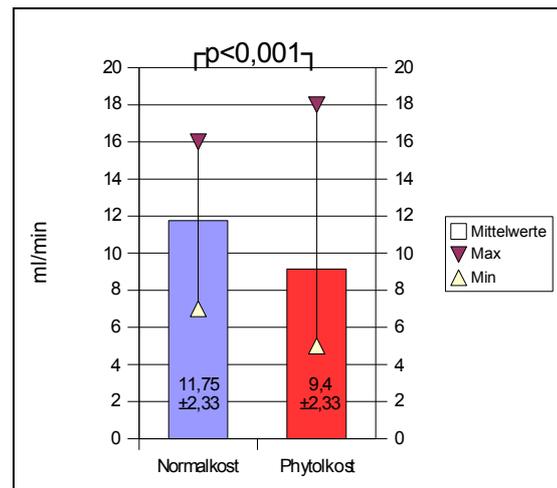


Abbildung 22: LV-Massenindex der Mäuse

### 3.1.4. Hämodynamische Daten

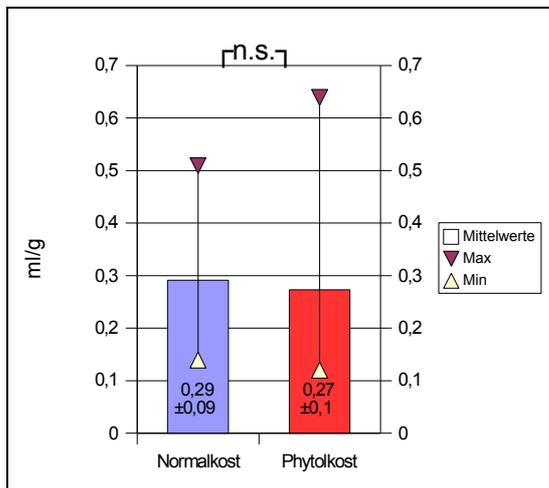
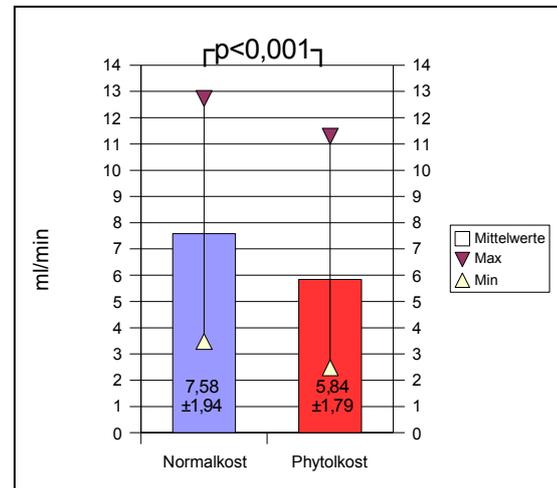
Bei der Bestimmung des Cardiac-Index sowie des Cardiac-Output via PW-Doppler auf Höhe des linksventrikulären Ausflusstraktes ergaben sich übereinstimmend höhere Werte in der Normalkostgruppe. Der Cardiac-Output betrug bei den Tieren, die mit Normalkost gefüttert wurden 11,75ml/min ( $\pm 2,33$  ml/min.) und war damit um 22,2% größer als in der Vergleichsgruppe. Bei den mit Phytokost gefütterten Tieren betrug der Cardiac-Output 9,14ml/min. ( $\pm 2,33$ ml/min.). Der Cardiac-Index betrug in der mit Normalkost versorgten Tiergruppe mit 0,44ml/min./g ( $\pm 0,11$ ml/min./g) 4,55% mehr als in der mit Phytol versorgten Tiergruppe. In dieser Gruppe betrug der Cardiac-Index 0,42 ml/min./g ( $\pm 0,11$ ml/min./g) ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,21$ )

Abbildung 23: CI<sub>LVOT</sub> der MäuseAbbildung 24: HZV<sub>LVOT</sub> der Mäuse

Die mittels Teichholz-Gleichung berechneten Werte ergaben für den Cardiac-Output für die mit Normalkost gefütterten Tiere um 22,9% höhere Werte. In dieser Gruppe betrug der Cardiac-Output 7,58ml/min. ( $\pm 1,94$ ml/min.). In der mit Phytokost versorgten Gruppe betrug der Cardiac-Output 5,84ml/min. ( $\pm 1,79$ ml/min).

Der korrespondierende Cardiac-Index lag in der Normalkostgruppe um 5,5%

höher und betrug  $0,29\text{ml/min./g}$  ( $\pm 0,09\text{ml/min./g}$ ). Nach Phytoldiät errechnete sich ein CI von  $0,27\text{ml/min./g}$  ( $\pm 0,1\text{ml/min./g}$ ). Auch hier waren die Änderungen nur für die Absolutwerte statistisch signifikant.

Abbildung 25:  $CI_{\text{Teich}}$  der MäuseAbbildung 26:  $HZV_{\text{Teich}}$  der Mäuse

### 3.1.5. Doppler-Messungen

Bei den mittels PW-Doppler-Messungen errechneten Daten zeigten sich bis auf eine Ausnahme sämtlich hoch signifikant höhere Werte bei den mit Normalkost gefütterten Tieren. Die maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe betrug mit  $76,4\text{cm/sec.}$  ( $\pm 6,6\text{cm/sec.}$ )  $9,7\%$  mehr bei den mit Normalkost gefütterten Tieren im Vergleich zur Phytolkostgruppe. Bei diesen Tieren betrug die maximale Geschwindigkeit über der Aortenklappe  $69,0\text{cm/sec.}$  ( $\pm 0,9\text{cm/sec.}$ ). Der maximale Druck über der Aortenklappe betrug in der Normalkostgruppe  $2,35\text{ mmHg}$  ( $\pm 0,42\text{ mmHg}$ ). Damit war dieser Wert um  $17,0\%$  größer als in der mit Phytol gefütterten Gruppe. In dieser betrug der maximale Druck über der Aortenklappe  $1,95\text{ mmHg}$  ( $\pm 0,52\text{ mmHg}$ ). Der mittlere Druck über der Aortenklappe bei den mit Normalkost gefütterten Tieren betrug  $1,17\text{ mmHg}$  ( $\pm 0,22\text{ mmHg}$ ). Dieser Wert war um  $18,81\%$  größer als in der Vergleichsgruppe. Die

mit phytolhaltiger Kost gefütterten Tiere zeigten mittlere Druckwerte über der Aortenklappe in Höhe von 0,95 mmHg ( $\pm$  0,24 mmHg).

Die über Aorta ascendens und descendens gemessenen Flußgeschwindigkeiten zeigten einen Rückgang der Maximalwerte nach Phytolfütterung. Einer mittleren Flußgeschwindigkeit von 98,33cm/s ( $\pm$  9,61cm/s) stand ein Wert von 93,55cm/s ( $\pm$  15,18cm/s) im Bereich der Aorta ascendens gegenüber. Diese Änderung von 4,86% war statistisch schwach signifikant. Außerhalb der statistischen Signifikanz lag die Änderung des entsprechenden Wertepaares für die Flußgeschwindigkeit über der Aorta descendens (78,47cm/s ( $\pm$  9,81cm/s) vs. 73,92cm/s ( $\pm$  10,71cm/s) entsprechend einer Abnahme von 5,79%.

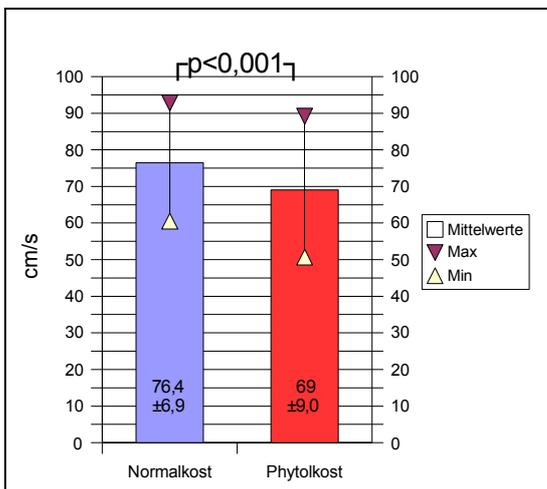


Abbildung 27: AoV- $V_{max}$  der Mäuse

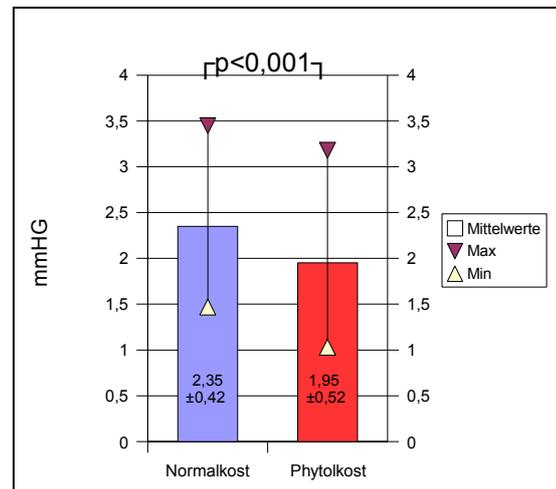


Abbildung 28: AoV- $PG_{max}$  der Mäuse

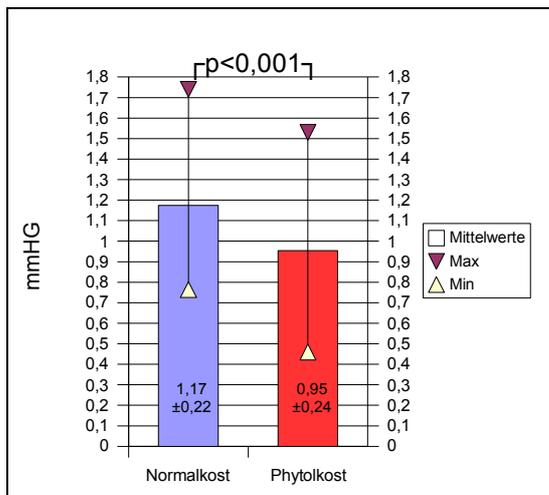


Abbildung 29: AoV-PG<sub>mean</sub> der Mäuse

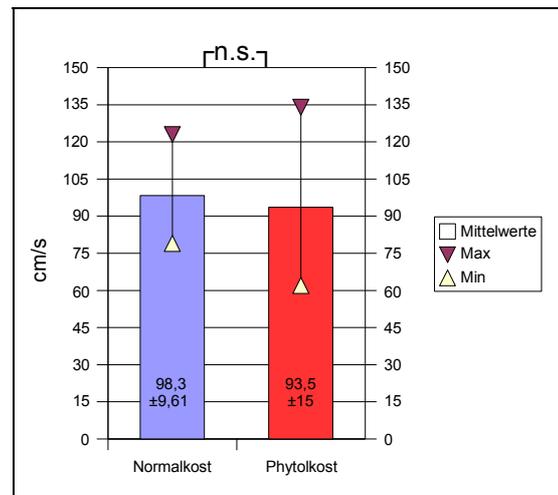


Abbildung 30: Ao asc. der Mäuse

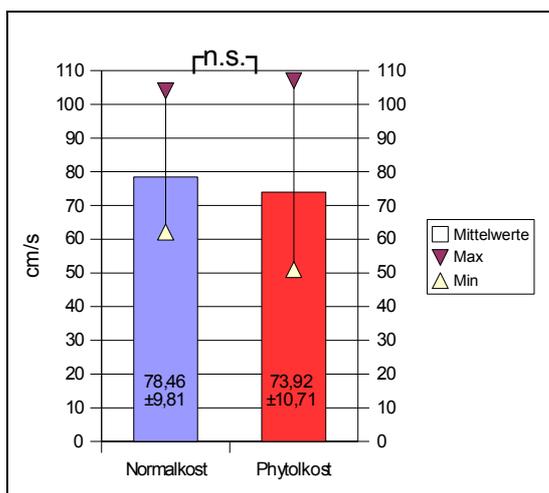


Abbildung 31: Ao desc. der Mäuse

Bei der den frühdiastolischen Bluteinstrom über der Mitralklappe repräsentierenden E-Welle zeigten sich in der Gruppe der Tiere, die mit Normalkost gefüttert wurden, im Mittel um 18,2% höhere Werte. Der Mittelwert lag hier bei 80,6cm/sec ( $\pm 9,6$ cm/sec.). In der mit phytolhaltiger Nahrung gefütterten Vergleichsgruppe betrug der entsprechende Wert 65,9cm/sec. ( $\pm 12,5$ cm/sec.). Die entsprechenden Werte für die A-Welle lauten 25,27cm/s ( $\pm 6,18$ cm/s) vs. 25,41cm/s ( $\pm 6,29$ cm/s) nach Phytoldiät entsprechend einem Plus von 0,55%. Das E-A-Verhältnis war zugunsten der mit Normalkost versorgten Tiere

verschoben und betrug  $3,34 (\pm 0,74)$ . In der Vergleichsgruppe betrug das Verhältnis  $2,70 (\pm 0,62)$  und war somit 19,2% geringer. Der maximale Druckgradient über der Mitralklappe betrug bei den mit Normalkost gefütterten Tieren  $2,84 \text{ mmHg} (\pm 0,65 \text{ mmHg})$ . Damit war dieser um 33% höher als in der mit Phytokost versorgten Gruppe. In dieser Gruppe betrug der Wert  $1,91 \text{ mmHg} (\pm 0,72 \text{ mmHg})$ . Der mittlere, über der Mitralklappe gemessene Druckgradient verhielt sich entsprechend. In der Normalkostgruppe betrug er  $0,68 \text{ mmHg} (\pm 0,24 \text{ mmHg})$  und war 38,2% höher als in der Vergleichsgruppe. Dort betrug er  $0,42 \text{ mmHg} (\pm 0,20 \text{ mmHg})$ .

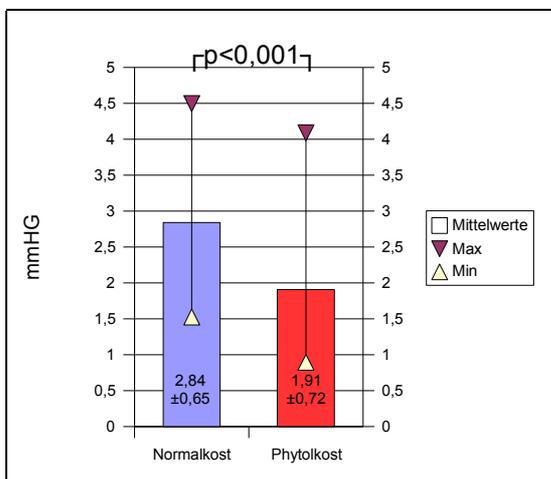


Abbildung 32: MV-PG<sub>max</sub> der Mäuse

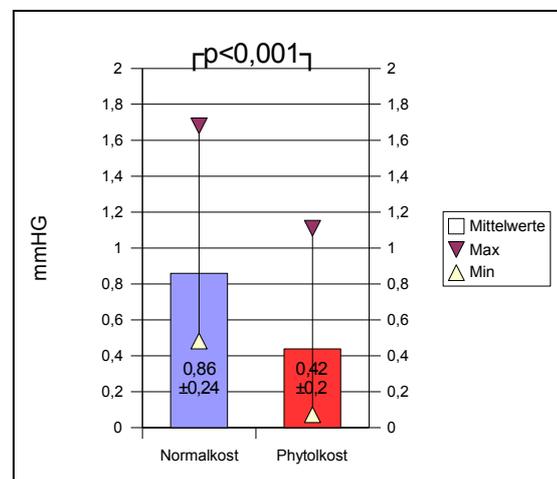


Abbildung 33: MV-PG<sub>mean</sub> der Mäuse

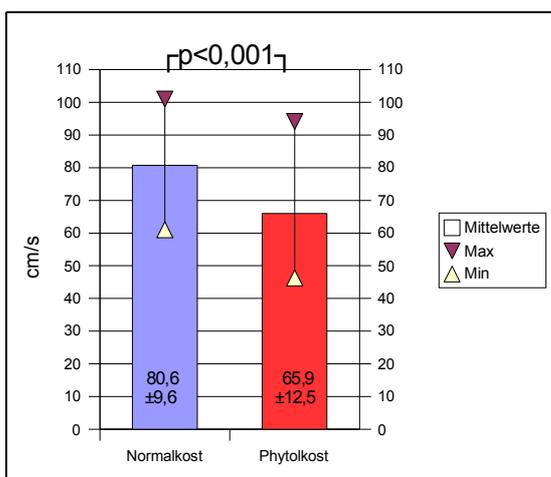


Abbildung 34: MV E-Welle der Mäuse

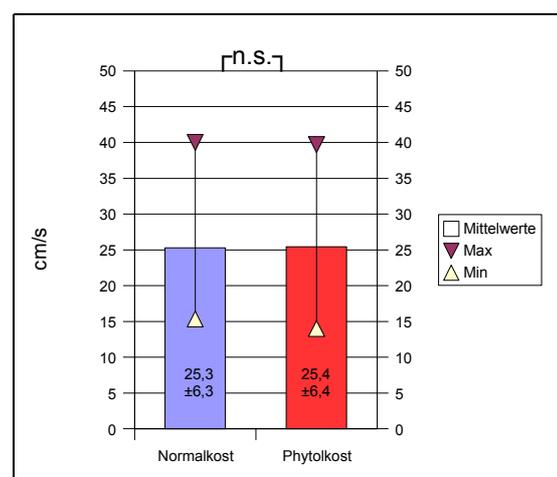


Abbildung 35: MV A-Welle der Mäuse

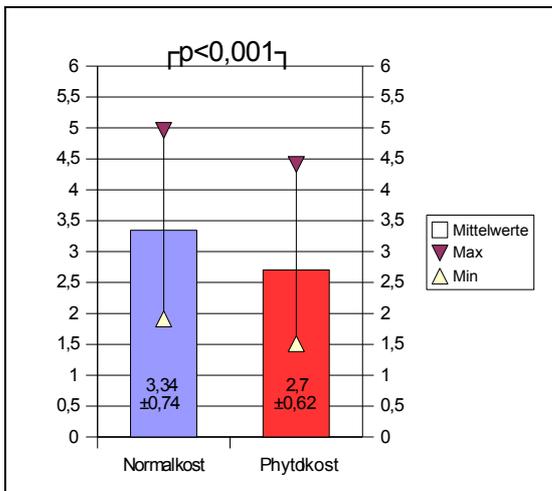


Abbildung 36: MV E/A-Verhältnis der Mäuse

### 3.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede

#### 3.2.1. Klinische Daten

Beim Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung gab es zwischen den Kollektiven der männlichen und weiblichen Tiere nur einen marginalen Unterschied von im Mittel 2 Tagen ( $88 \pm 28$ , vs.  $86 \pm 20$ ). Die Folgeuntersuchung nach Fütterungsexperiment erreichten die männlichen Mäuse durchschnittlich 11 Tage später als die Weibchen ( $123 \pm 32$  vs.  $112 \pm 21$ ).

Die Aufzucht- und Untersuchungsmodalitäten bewirkten hinsichtlich der Altersstruktur in beiden Mäusekollektiven einen Streubereich für den Zeitpunkt der Erstuntersuchung mit 63 bis 138 Tagen bei den Männchen und 65 bis 118 Tagen bei den Weibchen. Innerhalb dieses Altersbereiches lassen sich in beiden Mäusekollektiven vier homogene Altersgruppen bilden (Abbildung 38). Die zwischen diesen Altersgruppen bestehenden Altersdifferenzen liegen zwischen 10 bis maximal 47 Tagen. Die Zweituntersuchung nach Phytoldiät er-

folgte in einem Alter zwischen 89 bis 169 Tagen. Das Zeitintervall zwischen beiden Untersuchungen differierte von minimal 16 bis maximal 35 Tage (in zwei Fällen 48 Tage, in je einem Fall 93 und 123 Tage, diese Tiere waren zur Aufzucht verwendet worden).

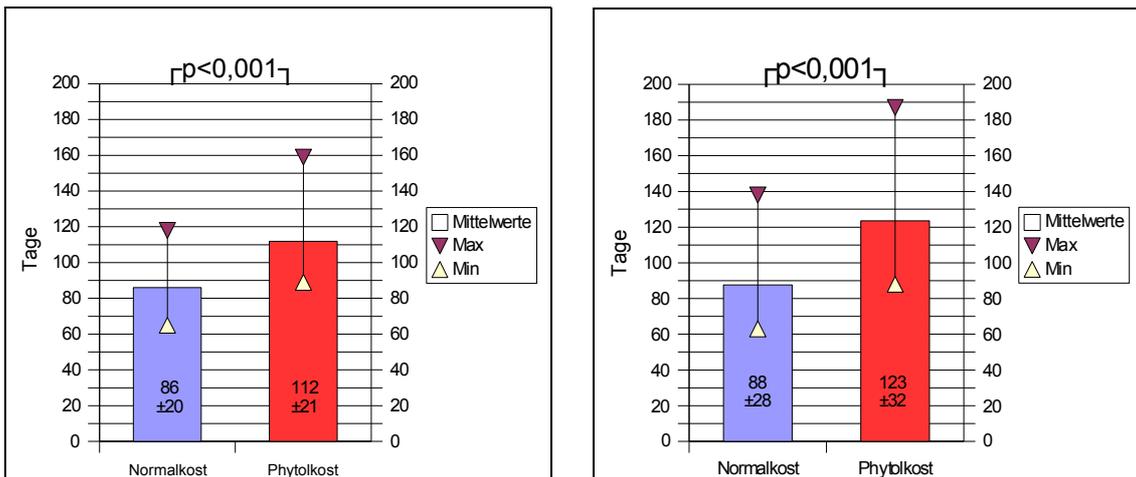


Abbildung 37a und b: Alter der weiblichen und männlichen Mäuse

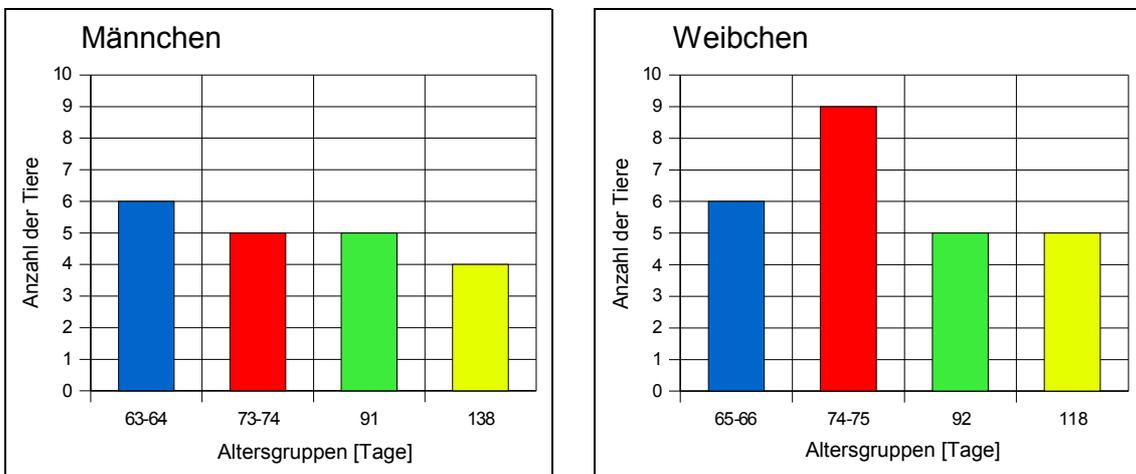


Abbildung 38: Altersverteilung bei Erstuntersuchung

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Physiologie differierte das Durchschnittsgewicht zwischen beiden Mäusekollektiven zugunsten der Männchen um 5,66g unter Normalkost und 5,19g unter Phytoldiät.

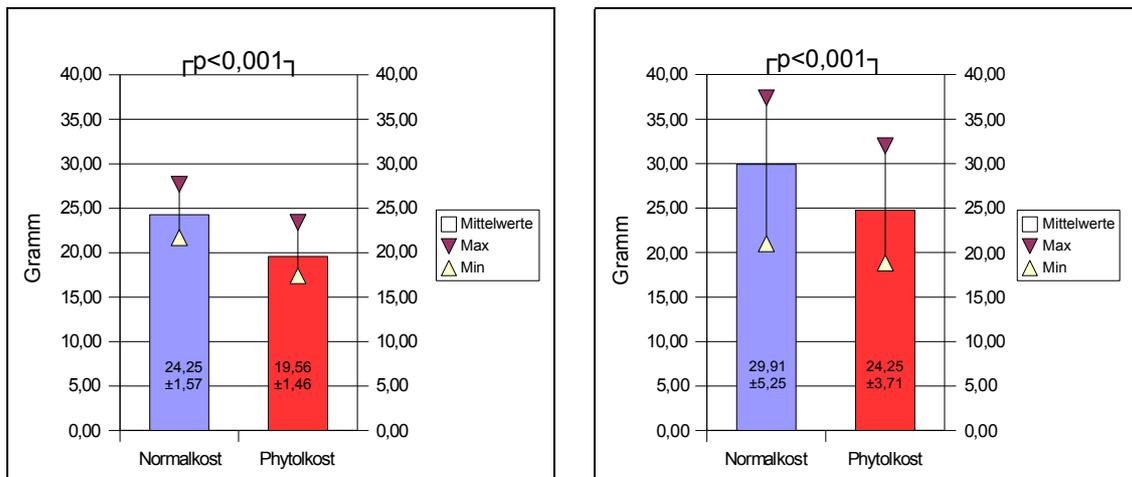


Abbildung 39 a und b: Gewicht der weiblichen und männlichen Mäuse

Bei der gegebenen Altersstruktur der Tiere läßt sich eine Altersabhängigkeit im Hinblick auf den Gewichtsverlauf für beide Mäusegruppen nachweisen.

Eine Gewichtszunahme der Tiere findet sich bis ca. zum einhundertzwanzigsten Lebensstag. Sie ist bei den männlichen Tieren in dieser Zeit deutlich stärker ausgeprägt als bei den Weibchen. So findet sich noch eine signifikante Gewichtszunahme bei den männlichen Tieren zwischen den Altersgruppen 3 (91 Tage) und 4 (138 Tage) von im Mittel 2,6g ( $p < 0,05$ ).

Für die weiblichen Tiere gilt dies nur bis zur Altersgruppe 2 (74-75 Tage). Hier nimmt das mittlere Gewicht im Vergleich mit den Tieren der Gruppe 4 (118 Tage) noch um 2,56g zu ( $p < 0,01$ ). Die Gewichtsveränderung zwischen den Altersgruppen 3 und 4 liegt hier mit einem Mittelwert von 0,73g bei den gegebenen kleinen Stichprobenumfängen außerhalb der statistischen Signifikanz ( $p = 0,37$ ).

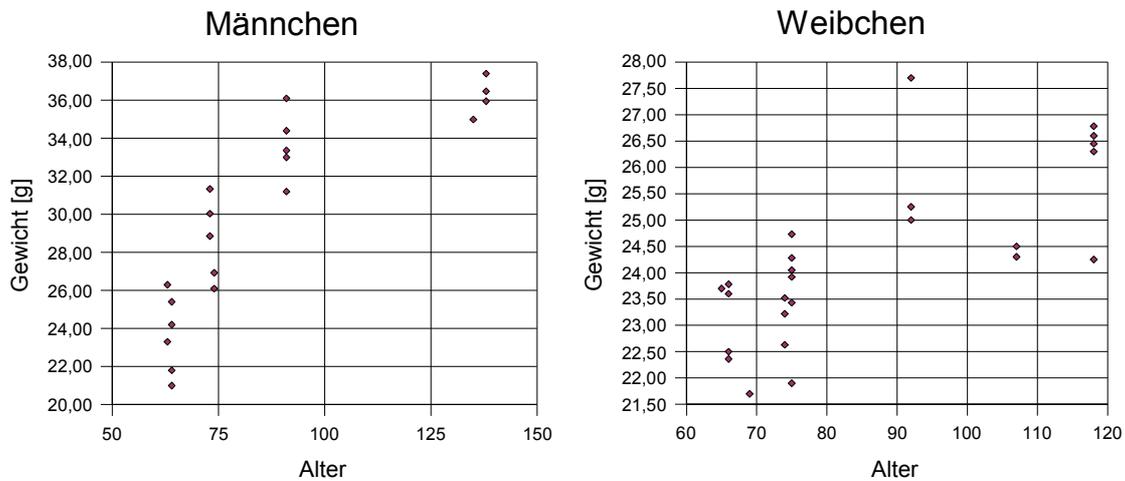


Abbildung 40: Altersabhängige Gewichtsverteilung bei Erstuntersuchung

Ein statistisch signifikanter Alterseinfluß auf die Gewichtsverteilung vor der Zweituntersuchung nach Phytoldiät ließ sich nur noch bei sieben männlichen Mäusen feststellen, die nach durchschnittlich 91 Tagen nachuntersucht wurden und sich bereits bei der Erstuntersuchung vor Beginn des Fütterungsexperimentes in den beiden niedrigsten Altersgruppen befanden. Verglichen mit den Tieren der höchsten Altersgruppe war ihr Gewicht im Durchschnitt 6,54g niedriger ( $p < 0,01$ ).

Das Ausmaß der Herzfrequenzreduktion nach Phytol Kostfütterung lag bei den weiblichen Tieren deutlich über dem der Männchen (im Mittel minus 53 Schläge pro Minute vs. minus 33 Schläge pro Minute).

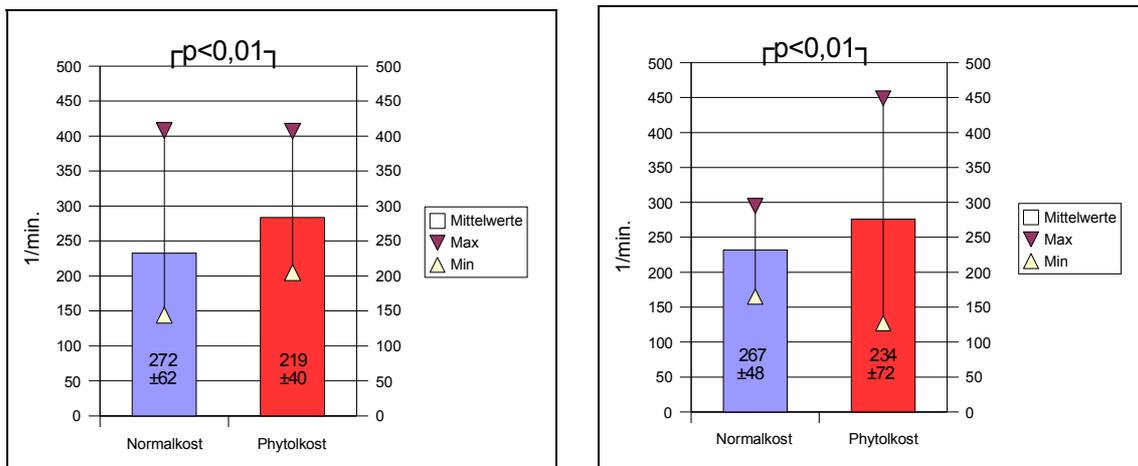


Abbildung 41 a und b: Herzfrequenz der weiblichen und männlichen Mäuse

### 3.2.2. M-Mode und 2-D-Messwerte

Bei den via M-Mode sowie im zweidimensionalen Bild bestimmten kardialen bzw. myokardialen Dimensionen fanden sich geschlechtsspezifische Unterschiede für vier der gemessenen Parameter.

Der linksatriale Querdurchmesser zeigt nur in der Gruppe der männlichen Mäuse nach Phytolfütterung eine statistisch nicht signifikante Längenabnahme (1,77mm  $\pm$ 0,13 vs. 1,69mm  $\pm$ 0,26), während im Kollektiv der Weibchen und über das Gesamtkollektiv betrachtet (s.o.) die prinzipiell gleichgerichteten Veränderungen schwach signifikant ausfallen (1,81mm  $\pm$ 0,17 vs. 1,72mm  $\pm$ 0,12,  $p < 0,05$ ).

Bei den linksventrikulären Binnendimensionen erreicht die messbare Abnahme des systolischen Ventrikeldurchmessers (LVIDs) nach Phytoldiät nur bei den männlichen Tieren nicht das geforderte Signifikanzniveau (2,11mm  $\pm$ 0,28 vs. 2,05mm  $\pm$ 0,38), während wiederum bei den Weibchen wie im Gesamtkollektiv (s.o.) schwach signifikante Wertabnahmen beobachtet werden (1,97mm  $\pm$ 0,26 vs. 1,9mm  $\pm$ 0,29).

Umgekehrtes gilt für den Parameter der linksventrikulären Längenausdehnung. Die gemessene leichte Zunahme unter Phytoldiät erreicht bei den männlichen

Tieren schwache Signifikanz ( $7,21\text{mm} \pm 0,63$  vs.  $7,36\text{mm} \pm 0,57$ ,  $p < 0,05$ ), ist ansonsten aber nicht signifikant geändert.

Bei den myokardialen Dimensionen ist die zu beobachtende leichte Zunahme der enddiastolischen septalen Myokarddicke (IVSed) nach Phytolernnahrung im Kollektiv der weiblichen Mäuse abweichend zu den Männchen und der entsprechenden Wertänderung im Gesamtkollektiv (s.o.) statistisch nicht signifikant ausgeprägt ( $\text{♀}$ :  $0,78\text{mm} \pm 0,07$  vs.  $0,8\text{mm} \pm 0,08$ ;  $\text{♂}$ :  $0,78\text{mm} \pm 0,11$  vs.  $0,84\text{mm} \pm 0,08$ ,  $p < 0,01$ ).

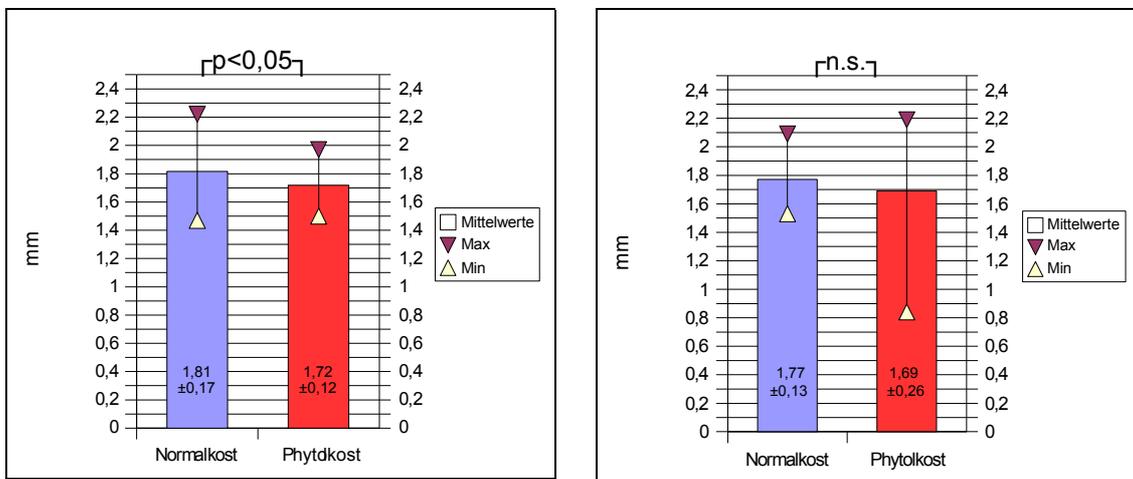


Abbildung 42 a und b: LA der weiblichen und männlichen Mäuse

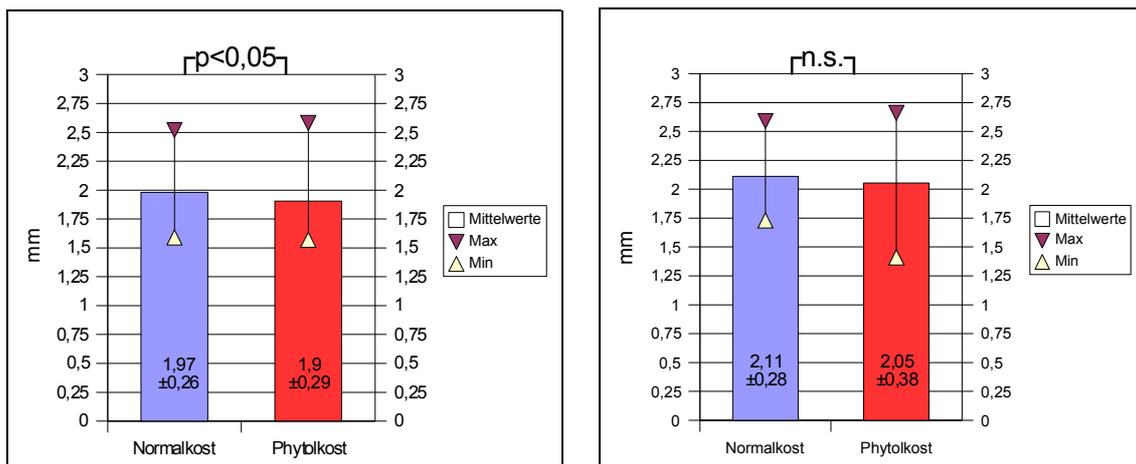


Abbildung 43 a und b: LVIDs der weiblichen und männlichen Mäuse

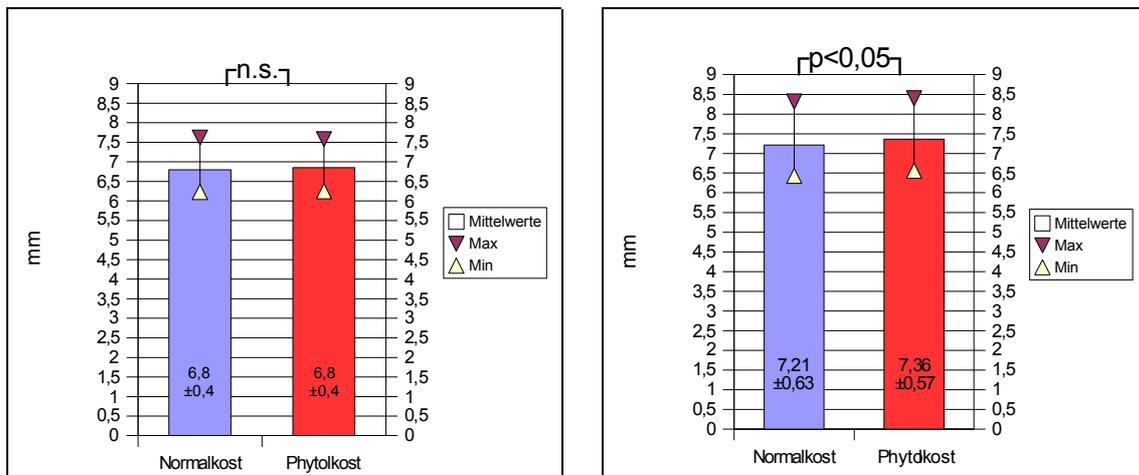


Abbildung 44 a und b: LV-Länge der weiblichen und männlichen Mäuse

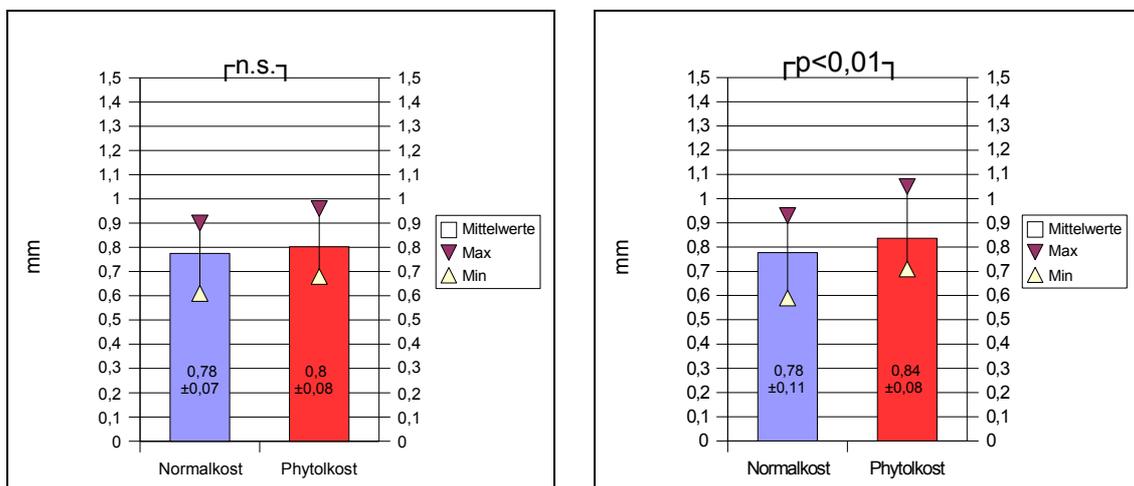


Abbildung 45 a und b: IV/Sed der weiblichen und männlichen Mäuse

### 3.2.3. Abgeleitete Daten (M-Mode / 2-D-Bild)

Nur für die nach der Area-Length-Methode berechneten linksventrikulären Muskelmasse findet sich zwischen den verglichenen Kollektiven ein statistischer Unterschied. In der Gruppe der Weibchen fällt die gesehene Herzgewichtsteigerung nach dem Fütterungsexperiment im Vergleich zu den männlichen Mäusen deutlich geringer aus und verfehlt daher das geforderte Signifikanzniveau

(♀: 69,25mg ±10,4 vs. 70,62mg ±10,14; ♂: 76,93mg ±18,34 vs. 83,04mg ±17,54, p<0,01).

Bei den übrigen abgeleiteten Grössen, den Kontraktilitätsparametern FS und EF<sub>Teich</sub>, den linksventrikulären Volumina sowie dem Massenindex, finden sich zwischen männlichen und weiblichen Tieren keine Unterschiede in der Messwertentwicklung nach Phytolfütterung.

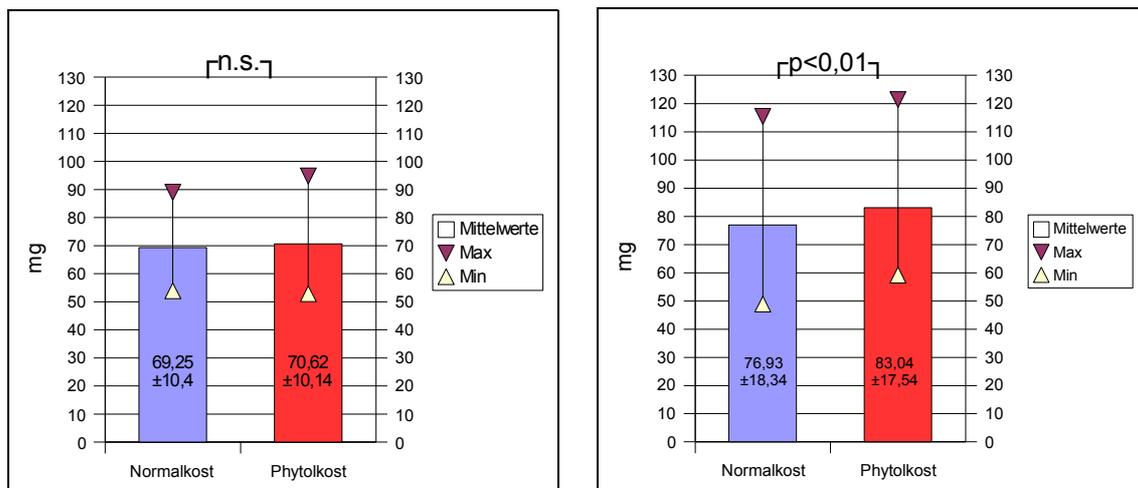


Abbildung 46 a und b: AL-LV-Masse der weiblichen und männlichen Mäuse

### 3.2.4. Hämodynamische Daten

Für die kardiale Auswurfleistung konnten bei den via PW-Doppler und mittels der Teichholz-Formel berechneten Werten keine geschlechtsgebundenen Effekte der Phytoldiät nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für den über Teichholz kalkulierten Cardiac-Index. Die Berechnung dieses Parameters unter Verwendung des Doppler-echokardiographisch ermittelten Herzzeitvolumens führt abweichend im Kollektiv der Männchen zu einer schwach signifikanten Abnahme des Wertes nach Phytolfütterung, die sich im Gesamtkollektiv sowie bei den weiblichen Tieren nicht nachweisen lässt (♀: 0,45ml/min./g ±0,09 vs. 0,45ml/min./g ±0,11; ♂: 0,44ml/min./g ±0,13 vs. 0,39ml/min./g ±0,09, p<0,05).

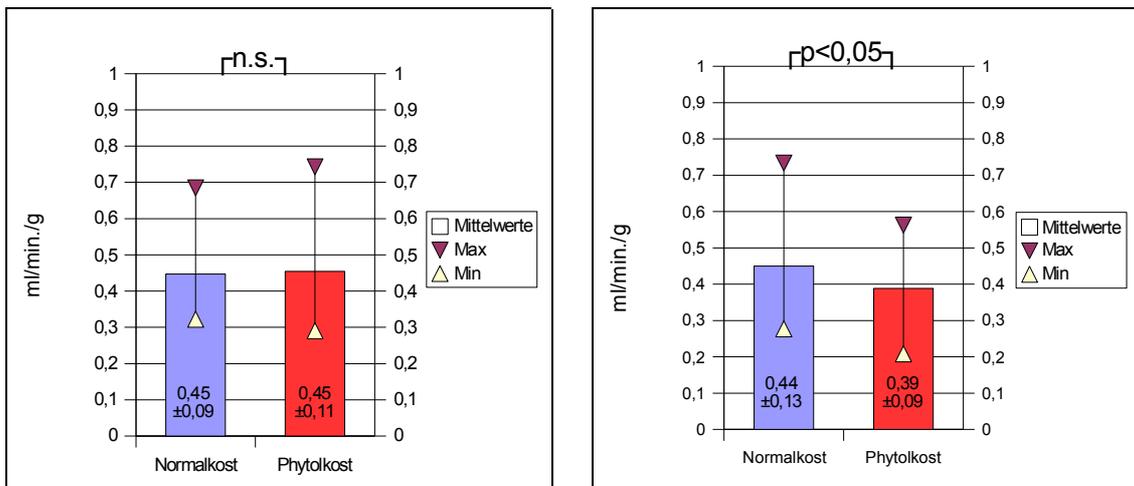


Abbildung 47 a und b:  $CI_{LVOT}$  der weiblichen und männlichen Mäuse

### 3.2.5. Doppler-Messungen

Die Auswirkungen der Phytoldiät auf die Flussdynamik lassen zwischen den Kollektiven der männlichen und weiblichen Tiere keine geschlechtsgebundenen Unterschiede in den via Doppler-Echokardiographie gemessenen Parametern erkennen.

## **IV. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die echokardiographisch gestützte Charakterisierung von Auswirkungen einer mit Phytol angereicherten Diät auf Morphologie und Funktion des Herzens erwachsener, genotypisch veränderter Mäuse. Der hierbei zugrunde liegende Defekt im SCPx/SCP2 kodierenden Genom bewirkt phänotypische Parallelen zum humanen Refsum-Syndrom, wenngleich es sich in beiden Fällen um einen unterschiedlichen pathogenetischen Ausgangspunkt handelt.

Die Phänotypisierung des transgenen Mauserzens im Vergleich zu seiner Wildtyp Variante, der C57/Bl6 Maus, und damit die Frage nach kardialen Auswirkungen des Gendefektes selber, unabhängig von Änderungen im Lipidstoffwechsel, war dabei nicht primäres Ziel dieser Untersuchung.

Aus diesem Grunde wurden keine Wildtypmäuse in die Studie mit aufgenommen, zumal sich in der Literatur keine Hinweise auf primäre kardiale Unterschiede zwischen Refsum-Patienten und Menschen ohne entsprechenden Gendefekt finden lassen. Vergleiche zwischen SCPx/SCP2 defizienter Maus und Wildtypvariante werden dennoch begrenzt möglich durch Rückgriff auf die bislang in der Literatur veröffentlichten Daten zur C57/Bl6 Maus, wobei insbesondere die zwischenzeitlich publizierte systematische Untersuchung dieser Tiere durch die Arbeitsgruppe um Tiemann zu nennen ist (Tiemann et al., 2002).

### **4.1. Klinische Daten**

Die in Narkose untersuchten Tiere entstammen einer eigens für den Versuch durchgeführten Zuchtreihe.

Entsprechend erklärt sich die Altersstruktur der untersuchten Tiere zum einen

aus der Vorgabe, nur ausgewachsene Mäuse mit abgeschlossenem Organlängenwachstum in die Messungen einzubeziehen. Zum anderen konnte aus räumlichen Gründen immer nur eine begrenzte Anzahl Tiere zeitgleich in das Fütterungsexperiment eingeschleust werden. Die hieraus resultierende Altersstruktur muß in dem untersuchten Altersfenster als möglicher eigenständiger Einflußfaktor bei der Interpretation der echokardiographischen Meßparameter berücksichtigt werden. Dies gilt insbesondere für Tiere bis zu einem Alter von ca. 110 Tagen, wie die Daten in der bereits oben erwähnten Arbeit von Tiemann (Tiemann et. al, 2002) nahelegen.

Besonders deutlich werden die altersbegründeten Einflüsse bei der Betrachtung der Gewichtsverläufe der Tiere vor und nach Phytoldiät. Entgegen dem allgemeinen Trend findet sich bei einigen Männchen der Altersklasse 1 und 2, die im Durchschnitt nach 91 Tagen nachuntersucht wurden, sogar ein Anstieg im Vergleich der Körpergewichte zum Zeitpunkt des Ultraschalls vor und nach Fütterungsexperiment. Die in diesem Altersintervall bei männlichen Mäusen noch physiologisch ausgeprägter vorhandene Gewichtszunahme steht hier in Konkurrenz zum Gewichtsverlust unter phytolangericherter Kost.

Eine katabole Stoffwechselsituation mit aktivierter Lipolyse, hervorgerufen durch die gendefektbedingte Phytolsäureanreicherung, wird als ein Grund dieses unter Phytoldiät beobachteten Gewichtsverlustes, dessen klinisches Korrelat insbesondere auch in einem deutlichen Schwund des Unterhautfettgewebes bestand, diskutiert (Raabe, 1995). In der Endphase des Fütterungsexperimentes tritt hierneben ein verändertes Nahrungsaufnahmeverhalten der Tiere. Nach einer initialen Phase der Hyperalimentation nahm die täglich umgesetzte Nahrungsmenge gegen Ende der zweiten Fütterungswoche bis zum völligen Sistieren in Einzelfällen ab. Das Erreichen dieses Punktes zusammen mit der dann meist auch bestehenden 25%-tigen Gewichtsreduktion war als Abbruchkriterium für das Fütterungsexperiment definiert worden, da von anderen Arbeitsgruppen eine hiernach einsetzende erhöhte spontane Absterberate bei den Tieren berichtet worden war (Daten unveröffentlicht).

In dieser terminalen Phase des Fütterungsexperimentes fanden sich bei der großen Mehrzahl der Tiere korrespondierende Verhaltensauffälligkeiten. Die motorischen Aktivitäten der Mäuse sanken bis hin zur Adynamie. Das Interesse der Mäuse an ihrer Umgebung, Sozialverhalten und Fellpflege waren ebenso beeinträchtigt. Es ist wahrscheinlich, daß in dieser Situation neben einer Reduktion der Nahrungsaufnahme auch die Aufnahme von Flüssigkeit durch die Tiere mit der Folge einer Volumendepletion vermindert war, ohne daß sich im Rahmen der hier gemachten Beobachtungen allerdings eine genaue Quantifizierung vornehmen ließe. Die Interpretation der gefundenen echokardiographischen Befunde muß aber auf diesem Hintergrund erfolgen.

Die von Tiemann (s.o.) dokumentierte Wachstumsdynamik der C57/Bl6 Maus legt eine Betrachtung der hier erhobenen echokardiographischen Befunde auch unter dem Gesichtspunkt des Mäusealters als unabhängigem Einflußfaktor nahe.

Mit dem Alter als unabhängigem Faktor errechnen sich statistisch signifikante Unterschiede für die gemessenen einzelnen Parameter bzw. die von ihnen abgeleiteten Größen zwischen den Altersgruppen wie folgt:

Bei den männlichen Mäusen findet sich eine statistisch signifikante Zunahme der Dimension des linksventrikulären Ausflußtraktes, des linksatrialen Durchmessers sowie des linksventrikulären Längendurchmessers im Vergleich der Tiere aus Altersgruppe 1 mit denen der Gruppe 4. Auch für die septalen Dimensionen (IVSed und IVSs) und die Dicke der linksventrikulären Hinterwand diastolisch (LVPWd) findet sich eine Altersabhängigkeit zwischen diesen beiden Altersgruppen. Ab Altersgruppe 2 zeigen sich allerdings bei den gegebenen Stichprobenumfängen keine weiteren statistisch signifikanten Altersabhängigkeiten. Eine altersabhängige Beeinflussung der Doppler-echokardiographisch ermittelten Parameter ließ sich bei den vorliegenden Altersstrukturen nicht nachweisen.

Bei den weiblichen Tieren hatte bereits die Analyse des Körpergewichtverlaufes eine nur schwach ausgeprägte Altersabhängigkeit zwischen den untersuchten

Altersgruppen ergeben. Entsprechend läßt sich ein statistisch signifikanter Einfluß der Altersgruppenzugehörigkeit auf die bestimmten kardialen Dimensionen hier nicht errechnen. Dieses Ergebnis korreliert mit der flacher verlaufenden Wachstumskurve bei weiblichen Mäusen wie in der o.g. Arbeit belegt. Die folgende Tabelle listet noch einmal für die betroffenen Meß- und Rechengrößen die altersgruppenbezogenen Mittelwertveränderungen sowie das statistische Signifikanzniveau der Änderung auf.

Tabelle 4.1.1.: Altersgruppenbezogene Mittelwertänderungen bei männlichen Mäusen

Parameter	Altersgruppe	Mittelwertänderung	P
LVOT (mm)	G1 zu G4	+ 0,18	= 0,0458
LA (mm)	G1 zu G4	+ 0,15	< 0,05
LV-Spitze (mm)	G1 zu G4	+ 1,42	< 0,01
IVSed (mm)	G1 zu G4	+ 0,23	< 0,01
LVPWd (mm)	G1 zu G4	+ 0,14	< 0,05
IVSs (mm)	G1 zu G4	+ 0,20	< 0,01
FS %	G1 zu G4	- 6,41	< 0,01
Cl <sub>Teich</sub>	G1 zu G4	- 0,19	< 0,001
Cl <sub>LVOT</sub>	G1 zu G4	- 0,24	< 0,01

#### 4.2. 2D- und M-Mode-Messwerte

Die Auswertung der vor und nach Phytolfütterung ermittelten Meßwerte des 2D- bzw. M-Mode Echokardiogramms ergibt signifikante Änderungen bei einer Anzahl von Parametern. Betroffen sind hiervon sowohl kardiale Binnenraum-diameter wie die Dimensionen der unterschiedlichen Myokardabschnitte.

Im Gesamtkollektiv der untersuchten Mäuse findet sich demnach eine signifikante Abnahme der Innendiameter für das linke Atrium (LA), den linksventrikulären enddiastolischen Innendurchmesser (LVIDd) sowie den korrespondierenden systolischen Wert (LVIDs). Hingegen zeigt die enddiastolisch gemessene Myokarddicke des Interventrikularseptums sowie der Hinterwand (IVSed, LVPWd) eine statistisch signifikante Zunahme.

Eine isolierte Betrachtung der weiblichen Mäuse ergibt ein weitgehend

identisches Ergebnis. Lediglich die Größenzunahme des Meßwertes für das IVSed ist statistisch nicht signifikant.

Im Kollektiv der männlichen Tiere findet sich abweichend von den Ergebnissen des Gesamtkollektives eine fehlende statistische Signifikanz bei gleichgerichteter Veränderung des linksatrialen (LA) sowie des endsystolischen linksventrikulären Innendurchmessers (LVIDs). Die linksventrikuläre Längenzunahme erreicht in dieser Gruppe ein signifikantes Niveau.

Keine statistisch signifikanten Änderungen bzw. identische Meßwerte bestehen in allen Untergruppen für den Querdurchmesser des linksventrikulären Ausflustraktes (LVOT) sowie der Aortenwurzel und die systolische septale Myokarddicke (IVSs).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse stellt sich daher neben dem zu klärenden Einfluß der Phytoldiät im Rahmen des bestehenden Defektes im SCPx/SCP2 kodierenden Gen die Frage nach weitergehenden geschlechtsspezifischen Einflußfaktoren.

#### **4.2.1. Geschlechtsabhängige Änderungen**

Die Subgruppendifferenzen (männlich vs. weiblich) weisen nicht auf geschlechtsabhängige Mechanismen hin. Grundsätzlich sind die Parameteränderungen bei männlichen und weiblichen Tieren nach Phytolkostfütterung, wenn vorhanden, gleichgerichtet. Auch Meßgrößen, die nur in einer Population - z.B. bei den Männchen - signifikante Unterschiede aufweisen, behalten zumindest im Trend ihr Änderungsverhalten bei den übrigen Tieren. Hier kommt offensichtlich die im Kollektiv der männlichen Mäuse noch nachweisbare Altersabhängigkeit für einzelne Meßwerte zum Tragen (vgl. Tiemann et al., 2002).

Ein Vergleich der in Tabelle 4.1.1. abgebildeten Daten mit den Ergebnislisten in Kapitel III verdeutlicht diesen Zusammenhang. Mit Ausnahme des LVIDs bestehen statistisch signifikante geschlechtsabhängige Unterschiede vor und nach

Phytolfütterung nur bei Meßgrößen, für die sich auch eine Altersabhängigkeit in der Gruppe der männlichen Mäuse nachweisen läßt. Die Richtung der jeweiligen Änderung entspricht dabei dem altersbezogenen Änderungsverhalten. Exemplarisch sei dies an zwei Größen, dem linksatrialen Durchmesser (LA) und der linksventrikulären Längsachse (LV-Spitze), veranschaulicht.

Nach Phytolfütterung nimmt die gemessene Dimension des LA sowohl in der Population der weiblichen wie der männlichen Tiere ab. Eine statistische Signifikanz der Änderung errechnet sich allerdings nur für die Gruppe der Weibchen. Gleichzeitig besteht bei den untersuchten männlichen Tieren noch eine altersbedingte Größenzunahme des LA, so daß bei einem Teil der Männchen die im Rahmen des Fütterungsexperimentes auftretende Dimensionsverringerung abgepuffert wird. Bei dem gegebenen Stichprobenumfang verliert die Änderung dieses Parameters daher im Kollektiv der Männchen ihre statistische Signifikanz. Entsprechend liegt der Wert für das Signifikanzniveau im Gesamtkollektiv durch den erhöhten Stichprobenumfang über dem für die Gruppe der weiblichen Tiere ( $p=0,017$  vs.  $0,026$ ).

Ein vergleichbarer Einfluß altersbezogener Effekte läßt sich auch für die Länge des linken Ventrikels zeigen. Nach Phytolfütterung findet sich im Kollektiv der weiblichen Mäuse wie im Gesamtkollektiv eine allerdings nicht statistisch signifikante Längenzunahme. Bei den männlichen Tiere erreicht diese Veränderung dagegen eine schwache statistische Signifikanz. Ein Blick auf Tabelle 4.1.1. zeigt die noch deutliche alterskorrelierte Größenzunahme für diesen Parameter. Im untersuchten Alterssegment führt also die noch nachweisbare natürliche Größenzunahme bei den männlichen Tieren zu scheinbaren geschlechtsspezifischen Differenzen in den Ergebnissen vor und nach Phytolstofffütterung. Schließt man die Tiere der Altersgruppe 1 (s.o.) von den statistisch mathematischen Betrachtungen aus, geht entsprechend die errechnete Signifikanz auch im Kollektiv der Männchen verloren. Dies ist kein Effekt bloß aufgrund reduzierten Stichprobenumfanges, denn eine gleichgroße Reduktion des Populationsumfanges etwa durch Elimination der Tiere aus Altersgruppe 3

zeigt diese Wirkung nicht.

Die folgende Tabelle listet noch einmal die nach Phytoldiät statistisch signifikant veränderten 2-D- und M-Mode Parameter getrennt für die Kollektive der männlichen und weiblichen Mäuse sowie für das Gesamtkollektiv auf.

Als zusätzliche Information wird das Altersverhalten des jeweiligen Parameters im Kollektiv der Männchen erfaßt.

	<i>LA</i>	<i>LV-Spitze</i>	<i>IVSed</i>	<i>LVIDd</i>	<i>LVPWd</i>	<i>LVIDs</i>
Gesamtkollektiv	-	+	+	-	+	-
Männchen	-	+	+	-	+	-
Weibchen	-	+	+	-	+	-
Altersabhängigkeit b. ♂	+	+	+	∅	+	∅

Tabelle 4.2.1.: + = Zunahme, - = Abnahme nach Phytoldiät ; rot = Änderung statistisch signifikant; ∅ = kein Einfluß nachweisbar

Die enddiastolisch gemessene Dicke des Interventrikularseptums nimmt bei männlichen und weiblichen Tieren nach dem Fütterungsexperiment zu. Nur bei den Männchen erreicht diese Änderung jedoch statistische Signifikanz, da ihr Ausmaß durch altersbedingte Einflüsse gesteigert wird (Mittelwertänderung 0,02 mm bei ♀ vs. 0.06 mm bei ♂ ). Das im Vergleich zum Kollektiv der Männchen höhere Signifikanzniveau der Änderung im Gesamtkollektiv ( $p < 0,005$ ) läßt jedoch die Vermutung zu, daß bei höherem Stichprobenumfang eine statistisch signifikante Zunahme auch unter den weiblichen Mäusen nachweisbar gewesen wäre.

Die gleiche Auswirkung des Stichprobenumfanges findet sich beim LVIDs. Die Abnahme dieses Wertes nach Phytoldiät erreicht bei der gegebenen Standardabweichung im kleineren Kollektiv der Männchen kein signifikantes Niveau, während bei den weiblichen Tieren eine schwache Signifikanz besteht. Für das Gesamtkollektiv errechnet sich entsprechend ein höheres

Signifikanzniveau als für die Weibchen ( $p=0,019$  ♀+♂ vs  $0,038$  ♀).

Die geschlechtsabhängigen Unterschiede bei den vor und nach Fütterungsexperiment mit den Methoden der 2D- und M-Mode-Echokardiographie ermittelten Parametern beruhen daher auf den folgenden zwei Faktoren. Zum einen bestehen alterskorrelierte Unterschiede im Wachtstumsverhalten zwischen männlichen und weiblichen Mäusen (Tiemann et al.), die bei der gegebenen Altersstruktur der untersuchten Tiere in der gezeigten Weise mit den fütterungsbedingten Werteänderungen interferieren. Zum anderen führt der begrenzte Populationsumfang aufgrund der bestehenden Messwertstreuung bei einzelnen Parametern zu einem Verfehlen der statistischen Signifikanzgrenzen (LVIDs bei den männlichen Tieren, IVSed bei den Weibchen).

Im engeren Sinne geschlechtsabhängige Ergebnisunterschiede finden sich hingegen nicht.

#### **4.2.2. Auswirkungen der Phytoldiät**

Werden die Ergebnislisten in diesem Sinne um altersgebundene und formalmathematische Effekte bereinigt, bleiben bei den mittels 2D- und M-Mode -Echokardiographie bestimmten morphologischen Größen folgende statistisch signifikante Änderungen nachweisbar.

Die kardialen Binnenraumdimensionen – LA, LVIDd, LVIDs – verringern sich nach Durchführung des Fütterungsexperimentes. Die enddiastolisch gemessenen Stärke des Interventrikularseptums und der linksventrikulären Hinterwand – IVSed, LVPWd – nimmt hingegen leichtgradig zu.

Der Umfang der jeweiligen Änderung wird durch Tabelle 4.2.2. veranschaulicht.

	<i>LA</i> [mm]	<i>LVIDd</i> [mm]	<i>LVIDs</i> [mm]	<i>IVSed</i> [mm]	<i>LVPWd</i> [mm]
♀	- 0,09	- 0,1	- 0,07	+ 0,02	+ 0,03
♂	- 0,08	- 0,11	- 0,06	+ 0,06	+ 0,07
♀+♂	- 0,08	- 0,1	- 0,07	+ 0,04	+ 0,05

Tabelle 4.2.2.: Mittelwertänderung nach Phytolkost

Die Dimensionen der kardialen Binnenraumdiater unterliegen einer Vielzahl von Einflußfaktoren. Funktionsstörungen des kardialen Klappenapparates, insbesondere solche mit volumenbelastender Wirkung (Patten et al., 2002), morphologische und funktionelle Veränderungen des Myokards unterschiedlicher Genese (Semeniuk et al., 2002) sowie Änderungen im Volumenstatus des Körpers überhaupt seien hier vordergründig genannt. Pathologische myokardiale Zustandsbilder auf morphologisch ultrastruktureller Ebene beeinträchtigen dabei häufig vorzeitig die diastolische Funktion des Herzens (Semeniuk et al., 2002) ebenso wie ischämische Funktionsstörungen oder eine myokardiale Hypertrophie. Veränderungen der atrialen oder ventrikulären Binnendiameter finden sich dann im Gefolge veränderter Druckverhältnisse. Dabei treten zumeist erhöhte intraluminale Drücke in Erscheinung mit zumindest im atrialen Bereich konsekutiver Dilatation.

Die echokardiographische Untersuchung des vorliegenden Mäusekollektives vor und nach phytolangericherter Diät gibt keinen Anhalt für valvuläre Fehlfunktionen oder Störungen der systolischen myokardialen Funktion (s.u.) - zur Zuverlässigkeit der Doppler-Echokardiographie bei Mäusen s. Patten et al. 2002. Wenngleich die Reduktion des E- zu A-Verhältnisses nach Phytolfütterung, die in allen Populationen nachweisbar ist, prinzipiell die Frage nach Bestehen einer beginnenden diastolischen Funktionsbeeinträchtigung aufkommen läßt, spricht die Richtung der Diameterveränderungen bei sowohl atrialen wie ventrikulären Dimensionen für einen primären Volumeneffekt.

Dieser steht in Zusammenhang mit dem unter phytolangericherter Ernährung

auftretenden Gewichtsverlust, wie die Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens bei gleichbleibendem Cardiac-Index belegt (s.u.). Weitere, den Volumenstatus der Tiere potentiell beeinflussende Effekte scheinen daneben eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Unter Phytoldiät war ein klinisch zu beobachtendes Phänomen, wie oben dargelegt, die Entwicklung einer progredienten Adynamie. Parallel hierzu änderte sich in der terminalen Phase des Fütterungsexperimentes das Nahrungsaufnahmeverhalten der Tiere deutlich bis zum völligen Sistieren in einzelnen Fällen. Das Eintreten dieser Situation war als ein Abbruchkriterium für das Fütterungsexperiment definiert worden. Es war vermutet worden, daß sich auch die Volumensituation der Tiere in dieser Phase im Sinne einer Volumendepletion durch verminderte Flüssigkeitsaufnahme ändert. Die daraus als Folge resultierende Vorlastsenkung wäre echokardiographisch durch Abnahme der Binnendimension insbesondere im Vorhofbereich aber auch linksventrikulär erfaßbar gewesen.

Eine zusätzlich vorlastsenkende Wirkung kann darüberhinaus von der Anästhesiemethode ausgehen. Die gewichtsadaptierte intraperitoneale Applikation einer standardisierten Anästhesielösung führt zu unterschiedlicher Volumenbelastung der Tiere mit Abnahme der Volumenmenge nach Phytolgabe. Unterschiede in der Vorlastwirksamkeit lassen sich dabei aber kaum quantifizieren, da die genaue Kenntnis der mit der Gewichtsreduktion unter Phytoldiät verbundenen Änderung des Verteilungsvolumens ebenso Voraussetzung wäre wie die eines sich möglicherweise ändernden peritonealen Resorptionsverhaltens.

Die Beteiligung beider Vorgänge an der Beeinflussung des Volumenstatus der Mäuse läßt sich echokardiographisch nicht ausreichend differenzieren, da die Kapazität von Gegenregulationsmechanismen bzw. das zur Adaptation an den Gewichtsverlust erforderliche Maß nicht überschritten werden. Anderenfalls wäre ein schlagvolumenbedingter Abfall des HZV und Cardiac-Index bei Ausbleiben einer kompensierenden EF- oder Hf-Erhöhung nachweisbar gewesen. In allen drei Kollektiven ist keine signifikante Veränderung der Verkürzungs-

fraktion nachweisbar. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass mit Hilfe der Verkürzungsfraction nur unzureichende Aussagen über geringe Veränderungen der Kontraktilität des linken Ventrikels möglich sind (Nemoto et al., 2002).

Die enddiastolische Myokarddickenzunahme in Septum und Hinterwand folgt aus geometrischen Gründen der Volumenabnahme und ist nicht Ausdruck geänderter morphologischer Verhältnisse im Myokard der SCPx/SCP2 defizienten Mäuse unter phytolangericherter Ernährung.

Diese Interpretation wird zum einen durch die Ergebnisse histologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen gendefizienter Mäuse unterstützt. Deren Myokard weist nach Phytolbelastung keine histomorphologisch faßbaren Veränderungen im Vergleich zu Tieren unter Normalkost auf.

Zusätzlich weist die Konstanz der über die Area-Length-Methode berechneten linksventrikulären Myokardmasse in die gleiche Richtung. Bei den weiblichen Mäusen finden sich nach Phytolkostfütterung keine signifikanten Veränderungen dieses Parameters. Die deutlich signifikanten Änderungen bei den Männchen sind Ausdruck des bereits oben angesprochenen altersabhängigen Wachstumseffektes. Mathematisch bedingt wirken sich dabei die Änderungen der zur Massenberechnung herangezogenen Myokarddimensionen besonders deutlich aus. Im Gesamtkollektiv der untersuchten Tiere läßt sich dementsprechend nur noch eine schwache Signifikanz für die Zunahme der LV-Masse nachweisen, die sofort verlorengel, schließt man die männlichen Tiere der Altersgruppe I von den Betrachtungen aus.

Die unter Phytolkost auftretende Gewichtsabnahme der Mäuse bedingt bei ansonsten unbeeinträchtigt kardialer Struktur naturgemäß eine signifikante Änderung in den gewichtskorrelierten LV-Massenindizes sowohl bei männlichen wie weiblichen Tieren. Die in allen Kollektiven nachweisbare signifikante Zunahme des Massenindex nach Phytolkostfütterung erklärt sich also im Rahmen der Gewichtsabnahme der betroffenen Tiere, da dem diätbedingten Körper-

masseverlust keine gleichgerichteten Veränderungen am Myokard folgen.

### **4.3. Doppler-echokardiographische Messgrößen**

Alle mittels pw- und cw-Doppler gemessenen Werte über der Aorten- und Mitralklappe zeigen größtenteils hochsignifikante Änderungen nach Phytolkostfütterung der untersuchten Tiere.

#### **4.3.1 Aortovalvuläre Messwerte**

Im Kollektiv der männlichen wie weiblichen Mäuse zeigt sich unter Phytolfütterung ein Rückgang der Strömungsgeschwindigkeiten über der Aortenklappe von durchschnittlich 9 bzw. 10% (♂ vs. ♀). Konsekutiv reduzieren sich die darüber bestimmten Druckgradienten in einer Größenordnung von 17% bis 19% vom Ausgangswert. Bei geringgradig höherem Ausgangsniveau liegt das Ausmaß der Reduktion im Kollektiv der Männchen minimal unter dem der Weibchen.

Beeinflusst wird die transaortale Blutflußgeschwindigkeit neben den geometrischen Verhältnissen im linksventrikulären Ausflußtrakt, die bei den untersuchten Tieren keine signifikanten Änderungen zeigten, von Vor- und Nachlast sowie der linksventrikulären Kontraktilität. Zusätzlich ist das Velocity-time-Integral frequenzsensitiv.

Während Nachlastveränderungen ohne kompensatorische Kontraktilitätsveränderungen zu einer gegensinnigen Flowbeeinflussung und eher gleichgerichteter Modifikation der kardialen Binnendiameter führen, treten bei primärer Kontraktilitätsbeeinflussung genau umgekehrte Effekte in Erscheinung. Vorlastsenkungen bedingen durch die damit verbundenen Füllungsdruckverminderungen eine Abnahme des Schlagvolumens (Franck-Starling-

Mechanismus). Die transvalvuläre Flußgeschwindigkeit nimmt damit ab. Die Druck- und Flußminderung im linksventrikulären Ausflußtrakt nach Phytoldiätfütterung findet ihre Begründung daher zum einen in einer herzfrequenzbedingten Kontraktilitätsminderung (force-frequency-Beziehung). Zum anderen sind die vom Franck-Starling-Mechanismus beschriebenen Effekte im Rahmen der oben angesprochenen Volumendepletion der Mäuse unter Diät wirksam. Daher bleiben auch die Marker der myokardialen Funktionalität, FS und EF, stabil (s.u.). Die 2002 von Schmidt et al. erhobenen Daten waren gleichgerichtet.

#### **4.3.2. Mitrale Messwerte und Parameter der diastolischen LV-Funktion**

Das transmitral gemessene Velocity-time-Integral ändert sich bei den untersuchten Tieren unter Phytoldiät im Sinne einer signifikanten Erniedrigung der E-Wellenamplitude bei stabiler A-Welle. Entsprechend sinkt auch der E/A-Quotient signifikant. Statistisch signifikante Änderungen der Mitralklappen-Dezeleration können nicht festgestellt werden. Die nach der Bernoulligleichung systemintern errechneten transmitralen Druckgradienten reduzieren sich entsprechend. Die relativ stärkere Abnahme des Mitteldruckgradienten (MV-MPG) reflektiert dabei auch die verlängerte Diastolendauer bei signifikant niedrigerer Herzfrequenz nach Durchführung des Fütterungsexperimentes (s.u.). Die isovolumetrische Relaxationszeit als ein Parameter zur Beschreibung des linksventrikulären Füllungsverhaltens verlängert sich bei den in Narkose untersuchten Tieren nach Phytoldiät signifikant.

Eine Zusammenfassung der Mittelwertänderungen für die einzelnen Parameter zeigt die untenstehende Tabelle.

	<i>MV-PGmax</i> [mmHg]	<i>MV-MPG</i> [mmHg]	<i>E-Welle</i> [cm/s]	<i>A-Welle</i> [cm/s]	<i>E-A-Ratio</i>	
♀	-1,05	-0,38	-16,4	-0,4	-0,61	
♂	-0,77	-0,47	-11,9	+0,8	-0,68	
♀+♂	-0,93	-0,44	-14,7	+0,1	-0,64	
Relative Änderung [%]	♀	-35	-45,7	-20	-1,5	-18,8
	♂	-28,5	-52,8	-14,8	+3,3	-19,1
	♀+♂	-32,7	-51,2	-18,2	+0,39	-19,2

Tabelle 4.3.2.: Mittelwertänderungen der mitralen Doppler-Werte rot = Änderung statistisch signifikant

	<i>IVRT</i> [ms]	<i>MV-Decel.zeit</i> [ms]	
♀	+ 5,8	+ 2,75	
♂	+ 3,09	+ 1,16	
♀+♂	+ 4,65	+ 2,14	
Relative Änderung [%]	♀	+ 20,3	+ 7,25
	♂	+ 9,50	+ 2,84
	♀+♂	+ 15,4	+ 5,47

Fortsetzung Tabelle 4.3.2.

Die transmitralen Flußverhältnisse sind bei gleichbleibender Klappenmorphologie Ausdruck des linksatrialen-linksventrikulären Druck-Zeit-Verhältnisses. Dieses unterliegt, wie schon bei der Aortenklappe beschrieben, zahlreichen kardialen aber auch extrakardialen Einflußfaktoren mit zum Teil gegenteiligen Effekten. Die myokardiale Funktionalität sowie die Funktion des Klappenapparates selber sind hier ebenso zu nennen wie Vor- und Nachlastverhalten. Aber auch Änderungen des Perikardiums und der intrathorakalen Verhältnisse könnten relevante Einflußfaktoren darstellen. Jeder dieser einzelnen Faktoren wird dabei selber wieder auf vielfältige Weise durch zahlreiche weitere

Stellgrößen beeinflusst. So können zum Beispiel Änderungen der myokardialen Funktion sowohl aus Veränderungen des Koronargefäßstatus wie aus modifizierten neuro-humoralen Einflüssen oder auch pharmakologischen Effekten resultieren. Die Komplexität dieser Zusammenhänge bedingt das Fehlen einzelner spezifischer Meßgrößen, die zum Beispiel echokardiographisch erfaßt werden könnten. Die methodisch erfaßbaren Meßgrößen repräsentieren somit multimodale Vorgänge, ihre Interpretation muß daher neben der Einzelwertveränderung im Befundkontext erfolgen und häufig auch methodenfremde Hinweise einbeziehen. Dennoch wird gerade die quantifizierende Analyse von Änderungen mit nur einer Untersuchungsmethode im Hinblick auf die zugrunde liegenden Ursächlichkeiten häufig unmöglich bleiben.

Die gefundene Konstellation der transmitralen Doppler-Meßwerte korreliert in Verbindung mit den Meßwertänderungen bei der linksventrikulären isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT) sowie der frühsystolischen Mitralklappen-dezeleration mit den hämodynamischen Veränderungen durch den diätbedingten Gewichtsverlust der Tiere sowie der beobachteten Herzfrequenzabsenkung.

Typischerweise ändert sich das transmitrale Flußprofil bei Vorlastsenkung im Sinne einer Abnahme sowohl der E-Wellenamplitude wie auch der A-Wellenamplitude. Der Steigungskoeffizient ( $\Delta P/\Delta t$ ) sinkt für Akzeleration wie Dezele-ration.

Berücksichtigt man die beobachtete Abnahme der Herzfrequenz bei den Tieren nach Phytolokostfütterung so sollte der amplitudensenkende Effekt auf die A-Welle eher noch verstärkt werden. Die Konstanz der A-Wellenamplitude weist daher möglicherweise auf eine begleitende Änderung des linksventrikulären Relaxationsverhaltens. Ein inverses Verhalten von E- und A-Welle mit Abnahme der E-Welle und Zunahme der A-Welle sind Charakteristika der verschlechterten linksventrikulären Relaxation. Gleichzeitig findet sich eine Verlängerung der echokardiographisch erfaßten, linksventrikulären IVRT, die anderer-

seits aber auch unter direktem Einfluß der Vor- und Nachlast steht. Die volumenbedingte A-Wellenreduktion wird daher möglicherweise durch eine begleitende linksventrikuläre Relaxationsstörung überlagert und (teil)kompensiert. Die mitrale Dezelerationszeit reagiert dabei stärker auf Änderungen der ventrikulären Compliance. Ein nicht signifikantes Verhalten steht hier bei dem gegebenen Populationsumfang und Streuungsverhalten (Variationskoeffizient 0,15) der Annahme einer Relaxationsstörung nicht im Wege. Eine Quantifizierung des Umfanges der Beiträge einzelner Einflußgrößen ist aufgrund der oben beschriebenen Interaktionen nicht möglich, zumal manche Größe echokardiographisch nicht erfaßt werden kann (z.B. Nachlast).

Auffällig sind Unterschiede im Ausmaß der Änderungen zwischen den Tieren im Kollektiv der Weibchen und Männchen. Das deutlich stärkere Absinken der Herzfrequenz bei den Weibchen (s.u.) ist hierfür zumindest teilweise verantwortlich.

Über den pathophysiologischen Hintergrund einer verlängerten Relaxationszeit durch eine phytolangereicherte Diät bei SCPx/SCP2 gendefizienten Mäusen kann zur Zeit nur spekuliert werden. Ausgangspunkt könnte die intrazelluläre Anreicherung verzweigtkettiger Fettsäuren wie der Phytansäure sein.

Die Relaxation des Myozyten ist ein aktiver, energieverbrauchender Vorgang. In diesem Zusammenhang könnten Beobachtungen relevant sein, die eine Beeinflussung des zellulären Energiestoffwechsels durch akkumulierte verzweigtkettige Fettsäuren wie Phytansäure durch Interferenz mit dem peroxisomalen proliferator-aktivierten Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) nahelegen. PPAR $\alpha$  wird eine modifizierende Wirkung auf die Expression solcher Gene zugeschrieben, die an der Fettsäure Aufnahme und Utilisation einerseits sowie der Glukoseverstoffwechselung andererseits beteiligt sind. Als physiologischen Liganden des PPAR $\alpha$  besteht die Rolle der Fettsäuren in einer ligandenabhängigen Modifikation der Gentranskription durch ein Heterodimer aus PPAR $\alpha$  und dem Retinoid X Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) nach Anbindung an peroxisomale Proliferations-Steurelemente (peroxisome proliferator response

elements, PPRE) (Wan et al., 1994, Nakajima et al., 1994).

#### **4.4. Hämodynamische Daten und Parameter der systolischen LV-Funktion**

Als kardiale Funktionsgrößen wurden neben den Standardgrößen zur Beurteilung der regionalen und globalen Kontraktilität (FS und EF) das Herz-Zeit-Volumen berechnet und daraus durch Korrelation mit dem Körpergewicht der Cardiac Index bestimmt. Zusätzlich wurde das Herzfrequenzverhalten aufgezeichnet. Die Berechnung des HZV erfolgte zum einen über die dopplerechokardiographische Bestimmung des Velocity-Time-Integrals im linksventrikulären Ausflußtrakt durch das im Gerät implementierte Programm. Alternativ wurde eine Volumenberechnung aus den gemessenen M-Mode-Werten nach Teichholz durchgeführt. Sie ist auch Grundlage der EF-Bestimmung.

Hinweise für eine Änderung der myokardialen systolischen Funktion finden sich nicht.

Diese wäre auch nur bei ausgeprägter Zu- oder Abnahme der Kontraktilität messbar (Nemoto et al., 2002).

Sowohl die Werte für das fractional shortening wie die berechnete Ejektionsfraktion zeigen nach Phytoldiät kein statistisch signifikantes Änderungsverhalten innerhalb der untersuchten Tiergruppen. Mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 0,12 lagen die Meßwerte dabei weit außerhalb des geforderten Signifikanzniveaus ( $p = 0,87$ ).

Die statistisch hoch signifikante Reduktion des HZV (16,6 – 26%) nach beiden Bestimmungsmethoden steht hierzu nicht im Gegensatz.

Sie erklärt sich zum einen durch eine zwischen 12,4% und 19,4% betragende Herzfrequenzerniedrigung unter der Phytoldiät (s.u.) sowie eine Reduktion des Schlagvolumens im Gefolge der Vorlastsenkung von über das Gesamtkollektiv berechnet durchschnittlich 7,6%.

Auffällig ist dabei die deutliche Diskrepanz in den absoluten Werten zwischen den beiden angewandten Berechnungsmethoden. Die nach Teichholz berech-

neten Werte liegen um durchschnittlich 35,5% (vor Phytoldiät) bzw. 36% (nach Phytoldiät) unter den dopplerechokardiographisch ermittelten Zahlen (Mittelwerte im Gesamtkollektiv  $11,76 \pm 2,31$  vs.  $7,58 \pm 1,94$  vor bzw.  $9,14 \pm 2,31$  vs.  $5,84 \pm 1,79$  nach Phytoldiät). Neben den hinlänglich beschriebenen methodischen Limitationen beider Verfahren (Erdmann u. Autenrieth, 1996, Moltzahn u. Zeydabadinejad, 2000) könnten hierfür auch Einflüsse durch einen standardisierten Untersuchungsablauf verantwortlich sein. Ein regelmäßig auftretender Zeitversatz zwischen den einzelnen Elementen der echokardiographischen Untersuchung kann so beispielsweise über eine veränderte Narkosetiefe und deren Wirkung auf z.B. die Herzfrequenz zu einer Beeinflussung der einzelnen Meßgrößen führen. Stypmann et al. (2002), Kemi et al. (2003) sowie Fentzke et al. (1997) haben das Absinken der Herzfrequenz unter Narkose bereits beschrieben. Die gemessenen Werte für das Herzzeitvolumen sind daher weniger als Absolutzahlenwerte als vielmehr im Verlauf durch ihr Änderungsverhalten von Interesse.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Absolutwerten sind körpergewichtsabhängig und nivellieren sich nach Bildung der entsprechenden Indizes.

Wird das Herzzeitvolumen durch Normierung auf das Körpergewicht als Cardiac-Index ausgedrückt, verliert sich auch die statistische Signifikanz der Änderungen in den einzelnen Tiergruppen unter Phytol Kostfütterung mit Ausnahme des  $CI_{LVOT}$  in der Gruppe der männlichen Mäuse ( $0,45 \pm 0,13$  vs.  $0,39 \pm 0,10$ ). Dieser Wert bleibt mit einem  $p=0,036$  innerhalb der festgelegten Signifikanzgrenze. Neben einem um 2,1% geringeren Gewichtsverlust am Ende des Fütterungsexperimentes liegt die Hauptursache hierfür in einer stärkeren Reduktion des Diameters des linksventrikulären Ausflußtraktes (LVOT) bei den männlichen Tieren von 0,48 vs. 0,18 Prozent bei den Weibchen. Da dieser Wert im Quadrat in die Berechnung der durchströmten Querschnittsfläche eingeht, potenzieren sich auch kleinere Differenzen. Die Änderung des LVOT-Diameter liegt dabei selbst weit außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus

und absolut gesehen in der Größenordnung des gerätetechnischen Maximalfehlers, so daß es sich um ein methodisches Phänomen handeln dürfte.

Die Konstanz des Cardiac-Index unter den Bedingungen der Phytoldiät spricht für die funktionelle Konstanz auch der Hämodynamik. Allerdings gilt dies idealerweise nur unter der Bedingung identischer Perfusionsverhältnisse in den unterschiedlichen Körpergewebsarten bzw. deren proportionaler Beteiligung an der beobachteten Gewichtsreduktion unter der Fütterung mit phytolangericherter Kost.

Grundsätzlich muß auch bei der Diskussion echokardiographischer Größen zur Beurteilung funktioneller myokardialer und hämodynamischer Verhältnisse deren multimodale Beeinflußbarkeit in Rechnung gestellt werden. Echokardiographisch nicht erfaßbare Parameter, wie die Nachlast, bleiben ein Unsicherheitsfaktor in der Befundinterpretation, da zum Beispiel eine infolge verminderter myokardialer Kontraktilität reduzierte EF durch Abnahme der Nachlast kompensiert werden kann. Beeinflussen pathophysiologische Mechanismen also zufällig mehrere Stellgrößen, können sich die Einzelwirkungen so möglicherweise einer Analyse entziehen. Mit diesen Limitationen bleibt die Doppler-Echokardiographie jedoch eine der führenden bildgebenden Verfahren zur Untersuchung des kardiovaskulären Systems der Maus (Hoit et al., 1995, Weiss et al., 2002).

Die Herzfrequenz nahm unter der phytolangericherten Diät in allen Tiergruppen statistisch signifikant ab und lag im Gesamtkollektiv am Ende des Fütterungsexperimentes mit einer mittleren Zykluslänge von  $280,1 \pm 61,4$ ms um 20,7% unter dem Ausgangswert vor Fütterungsbeginn ( $232 \pm 50,7$  ms).

Diese Daten decken sich in absoluter und relativer Größenordnung mit den Ergebnissen paralleler Arbeitsgruppen, die an SCPx/SCP2 defizienten Mäusen elektrokardiographische Studien mittels Oberflächen- und Transponder-EKG-Ableitungen durchführten (Mönnig et al., 2004). Insoweit scheinen auch

Einflüsse der Anästhesie in diesem Zusammenhang ausgeschlossen, zumal die Hf- und Doppler-echokardiographischen Messungen konstant am Ende des Untersuchungsganges bei dann oft nachlassender Anästhesietiefe durchgeführt wurden. Ebenso wie durch die oben angesprochenen Arbeitsgruppen ließen sich auch bei den echokardiographischen Untersuchungen gehäuft auftretende Störungen der Erregungsleitung (QRS-Verbreiterungen) bis hin zum Auftreten einer kompletten AV-Blockade (2 Tiere) beobachten.

Die hinter diesen EKG-Veränderungen stehenden pathophysiologischen Mechanismen sind derzeit Gegenstand intensiver Diskussion und größtenteils ungeklärt. In wie weit sich die Herzfrequenzabsenkung als spezifischer Effekt der genetischen Modifikation bei Belastung mit phytolangericherter Nahrung erweist und in Zusammenhang mit den beschriebenen übrigen elektrophysiologischen Änderungen steht, wird sich zeigen müssen. Außerhalb besonders schwerwiegender Leitungsstörungen mit z.B. Ersatzrhythmik ist die beobachtete Frequenzabsenkung möglicherweise zu einem Teil auch als physiologischer Anpassungsmechanismus an die durch den auftretenden Gewichtsverlust gewandelten hämodynamischen Bedingungen interpretierbar.

#### **4.5. Studiendesign**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 45 Tiere jeweils unter Normalkost und 0,5% phytolhaltiger Kost Doppler-echokardiographisch untersucht. In methodisch ähnlichen Studien waren die Fallzahlen vergleichbar (Fentzke et al., 2001, Weiss et al., 2002, Hoit et al., 1995). Dabei lag das Hauptaugenmerk auf den möglicherweise unter Phytolkost auftretenden echomorphologisch messbaren Veränderungen.

## **4.6. Analysetechnik**

### **4.6.1. Doppler-/Echokardiographie**

Die Doppler-/Echokardiographie ist das führende, nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Untersuchung des kardiovaskulären Systemes bei Mäusen. Die Methode ist standardisiert, ohne großen Aufwand verfügbar und relativ schnell durchführbar. Die kleinen Dimensionen (Herzgewicht ca. 100 mg) und die hohe Herzfrequenz stellen an den Untersucher eine grosse Herausforderung. Durch Optimierung der Technik mittels moderner hochauflösender Doppler-Echokardiographiegeräte ist jedoch eine verlässliche Datenerhebung möglich. Darüberhinaus ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass die relativ hohe Herzfrequenz der wachen Mäuse (550 – 620 bpm), Uechi et al. 1998, deutlich über der Herzfrequenz der narkotisierten Tiere liegt.

Aufgrund der kleinen Dimensionen und der Darstellung des Herzens in der linksparasternalen Längs- und Querachse sind bei der gegebenen Mausherzmorphologie reproduzierbare Aussagen über die Geometrie des rechten Atriums und Ventrikels nicht möglich. Technisch möglich ist die Darstellung dieser Kavitäten mittels transösophagealer Echokardiographie unter Verwendung eines 3,4 F intravasalen Katheters (Scherrer-Crosbie et al., 1998). Die Limitierung dieser Methode liegt in der geringen Framerate (8Hz) sowie der notwendigen Intubation.

Für die echokardiographische Untersuchung der Maus gelten darüberhinaus die gleichen Limitationen und Fehlerquellen wie für die humane Echokardiographie.

Winkelfehler bei der Doppler-Messung sind hier ebenso zu nennen wie der sogenannte Apexfehler aufgrund der geometrischen Beziehung der Herzspitze zur Thoraxwand. Es resultiert eine systematische Unterschätzung insbesondere im Bereich der Volumenberechnungen im Vergleich zu laevokardiographischen

Messungen. Unkalkulierbar bleibt in diesem Zusammenhang die Auswirkung des Gewichtsverlustes und die hiermit verbundene Reduktion des Unterhautfettgewebes auf die echokardiographisch relevanten geometrischen Verhältnisse zwischen Schallkopfposition und Herzlage bei den untersuchten Tieren. Abgeleitete Größen wie die LV-Masse und das dopplerechokardiographisch bestimmte HZV (Kreisflächenberechnung des LVOT) sind darüberhinaus aus mathematischen Gründen fehleranfällig. In ihre Berechnung finden Potenzen direkter Meßwerte Eingang, so daß sich hier bereits kleine Meßwertabweichungen mit Potenzierung des Fehlers im Ergebnis bemerkbar machen. Eine optimale Darstellbarkeit der kardial interessierenden Strukturen und ihre reproduzierbare (senkrechte) Anlotung sind daher Voraussetzungen, die, wenn sie vorliegen, trotz dieser Fehlerquellen zu einer guten Korrelation der echokardiographisch ermittelten Werte mit Nekrotomiedaten führen (Gardin et al., 1995; Reichel et al., 1983).

Gerätetechnisch bedingt beträgt die kleinste darstellbare Längendifferenz bei den M-Mode-Messungen 1/100mm. Daraus resultiert ein relativer gerätetechnischer Maximalfehler bei den myokardialen Dimensionen in einer Größenordnung von  $\pm 1,3\%$ . Bei den kardialen Binnendiametern reduziert sich dieser Wert auf ca.  $\pm 0,9\%$  (LVOT) –  $0,15\%$  (LV-Spitze).

#### **4.6.2. Narkoseeinfluß**

Zur Durchführung der Narkose bei Mäusen sind verschiedene Verfahren etabliert. Neben intraperitonealer Applikation (Patten et al., 2003, Stypmann et al., 2002) findet die Inhalationsnarkose ebenso Anwendung (Tiemann et al., 2002, Collins et al., 2001).

Jedes Verfahren zeigt aufgrund der Pharmakokinetik unterschiedliche Einflüsse auf das Herz-Kreislauf-System.

Bei der hier verwendeten Ketamin/Xylasin-Kombinationsnarkose, die

intraperitoneal verabreicht wurde, kommt es zu einer relevanten Herzfrequenzdepletion im Vergleich zu anderen Anästhesieverfahren (Fentzke et al., 1997). Gleichgerichtete Veränderungen zeigten sich auch in der hier vorliegenden Arbeit. Die Herzfrequenz lag im Rahmen der Narkose bei  $270 \pm 56$  bpm unter Normalkost und bei  $225 \pm 56$  bpm unter 0,5% Phytolkostfütterung. Die physiologische Herzfrequenz im Wachzustand beträgt 550 - 620 bpm. Dabei ist es nicht möglich transmitral E- und A-Welle abzugrenzen, da sie bei Frequenzen über 500 bpm verschmelzen und eine exakte Bestimmung nicht gelingt (Taffet et al., 1996).

Roth et al. beschrieben 2002, dass unter o.g. Narkoseregime mit Ketamin und Xylasin die LV-FS%, bei gleichzeitiger Zunahme des LVEDD, abnimmt. Am ehesten sind diese Veränderungen auf den negativ inotropen und chronotropen Effekt der Substanzen zurückzuführen (Yang et al., 2001).

Weiterhin relevant ist die Wirkstoffdosierung. Die in dieser Arbeit verwendete Dosierung von 50 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylasin zeichnet sich durch gute Steuerbarkeit aus, wobei kurzfristige Nachinjektionen möglich sind. Kemi et al. (2002) und Gottshall et al. (1997) verwendeten 100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylasin. Dabei sind eher stärkere negativ inotrope und chronotrope Effekte zu erwarten. Außerdem kann es zu einem "hang-over" kommen.

Semeniuk et al. haben 2002 die Doppler-Echokardiographie bei Mäusen im Wachzustand durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in einer speziellen Vorrichtung fixiert. Die Herzfrequenz lag bei dieser Untersuchungstechnik bei etwa 658 bpm und war somit deutlich höher als die telemetrisch ermittelte Ruhfrequenz von ca. 568 bpm. Dieser Effekt erklärt sich am ehesten durch einen streßbedingt höheren Sympathikotonus (Uechi et al., 1998). Außerdem wurden bradykarde Phasen beschrieben, die durch Druck auf den Thorax reproduzierbar waren.

#### **4.7.Ausblicke**

Durch stetige Forschungsbemühungen der letzten Jahre gelang die echo- und Doppler-echokardiographische Phänotypisierung der C57BL/6-Maus (Wildtyp). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte SCP2/SCPx-defiziente Maus (homozygote 0/0 Variante) zeigt keine echomorphologischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Die dopplerechokardiographischen Daten lassen allenfalls Vermutungen über das Auftreten diastolischer Funktionsstörungen aufkommen.

Die erhobenen Studienergebnisse sind auf den Menschen übertragbar und daher für die Erforschung des mit dem o.g. Gendefekt assoziierten Refsum-Syndrom von Bedeutung.

Zukünftig sollte das Hauptaugenmerk auf die Erforschung der funktionellen intrazellulären Veränderungen und ihre Verknüpfung mit den nach außen sichtbaren myokardialen Erregungsabläufen focussiert werden, um Erkrankten mit Refsum-Syndrom bessere Therapieoptionen anbieten zu können und das Verständnis für die Zusammenhänge intrazellulärer Fettstoffwechselfvorgänge und den elektrischen Aktivitäten erregbarer Zellstrukturen zu vertiefen.

## **V. Zusammenfassung**

Das Refsum-Syndrom, das nach seinem Erstbeschreiber Sigvald Refsum (1936) benannt ist, stellt eine Lipidstoffwechselstörung dar, die durch Kumulation von Phytansäure im menschlichen Organismus charakterisiert ist. Neben neurologischen Störungen treten auch kardiale Symptome in Form von Erregungsausbreitungs- und Herzrhythmusstörungen auf. In selteneren Fällen kommt es zu einer klinisch manifesten Herzinsuffizienz, meist auf dem Boden einer dilatativ verlaufenden Kardiomyopathie.

Der Arbeitsgruppe Seedorf gelang die Entwicklung eines SCP2/SCPx-defizienten Mausmodells, in dessen Folge eine der Refsum-Erkrankung verwandte intrazelluläre Fettsäure-Stoffwechselstörung resultiert. Klinisch treten bei diesen Tieren unter anderem vermehrte Herzrhythmusstörungen auf, die Mäuse versterben an kardialen Komplikationen (plötzlicher Herztod).

Ziel dieser Arbeit - mit der Genehmigungsnummer 23.0835.1.0 ( G 49/99 ) vom 22.06.1999 - war die echo- und Doppler-echokardiographische Phänotypisierung dieser Maus unter Normalkost sowie diätetischer Belastung mit phytansäureangereicherter Nahrung. Untersucht wurden 45 Tiere, 20 männliche und 25 weibliche Mäuse. Bei jedem Tier erfolgte in einem medianen zeitlichen Abstand von 30 Tagen eine morphologische und funktionelle Untersuchung des Herzens mittels Echokardiographie in Narkose. Dabei wurden die echo- und Doppler-echokardiographischen Standardparameter erfaßt. Der Zweituntersuchung ging eine Fütterungsphase mit phytansäureangereicherter Nahrung über durchschnittlich 14 Tage voraus.

Unter Phytoldiät fand sich mit Ausnahme des Wertes für die linksventrikuläre Längsachse eine Abnahme der systolischen und diastolischen linksventrikulären und linksatrialen Binnendiameter. Die erfaßten myokardialen Standardmesswerte zeigten hingegen eine diastolische Dickenzunahme sowohl des Interventrikularseptums sowie der linksventrikulären Hinterwand. Die korrespondierenden systolischen Werte verhielten sich bei größerer Streuung nicht

einheitlich. Die Dimensionsänderungen stehen in Zusammenhang mit einer Volumendepletion, welche bei den Mäusen unter Phytoldiät aufgrund deren klinischer Auswirkungen - Adynamie, verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme - zu beobachten war.

Bei allen Tieren fand sich nach Phytolfütterung eine deutliche Herzfrequenzabnahme. Sie war neben der oben genannten Volumendepletion Grund für eine Reduktion auch der Herzzeitvolumina, wobei allerdings infolge der starken Gewichtsabnahmen der Mäuse unter Phytoldiät der Cardiac Index stabil blieb. Die Doppler-echokardiographisch erfaßten dynamischen Parameter der kardialen Flußkinetik zeigten über Aorten- und Mitralklappe in Übereinstimmung zum verminderten Herzzeitvolumen eine entsprechende Abnahme der Flußgeschwindigkeiten. Die myokardiale Kontraktion, beurteilt über die relative myokardiale Verkürzungsfraction sowie die Ejektionsfraction, änderte sich unter dem Fütterungsexperiment nicht. Dies spricht für eine unbeeinflusste systolische Myokardfunktion.

Die zur Beurteilung der diastolischen Ventrikelfunktion herangezogenen Parameter – E-A-Ratio, Mitralklappendezelerationszeit und isovolumetrische Relaxationszeit – weisen auf eine verzögerte Relaxation entsprechend einer diastolischen Funktionsstörung des Schweregrades I hin. Änderungen im zellulären Energiestoffwechsel, wie sie unter intrazellulärer Anreicherung verzweigtkettiger Fettsäuren von anderen Arbeitsgruppen beschrieben sind, könnten dazu das pathophysiologische Korrelat darstellen. Der definitive Nachweis einer diastolischen Funktionsstörung setzt allerdings weitergehende Studien voraus, da die Standardechokardiographie methodisch bedingt dies nicht zu leisten vermag. Neben invasiven Messungen von Druck-Volumen-Beziehungen als Goldstandard zur Beschreibung der diastolischen Funktion könnte eine Relaxationsstörung durch Erfassung der Mitralingkinetik im tissue Doppler imaging (TDI) weiter validiert werden. Hierzu liegen aber bei Mäusen zur Zeit keine ausreichenden Vergleichswerte vor.

## VI. Literaturverzeichnis

**Van Amerongen A, Helms JB, Van der Krift TP, Schutgens RB and Wirtz KWA:** Purification of nonspecific lipid transfer protein sterol carrier protein 2 from human liver and its deficiency in livers from patients with cerebro-hepato-renal Zellweger syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1987; 919: 149-155.

**Aristizabal O, Christopher DA, Foster FS, Turnbull DH:** 40-MHZ echocardiography scanner for cardiovascular assessment of mouse embryos. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 1407-17.

**Basu J, Kundu M, Bhattacharya U, Mazunder C, Chakrabarti P:** Purification and characterisation of a non-specific lipid transfer protein from goat liver. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959: 134-142.

**Choinowski T et al.:** Structure of sterol carrier protein 2 at 1.8 Å resolution reveals a hydrophobic tunnel suitable for lipid binding. *Biochemistry* 2000; 39: 1897-1902.

**Crain RC, Zilversmit DB:** Two nonspecific lipid exchange proteins from beef liver. *Biochemistry* 1980; 19: 1433-1439.

**Doevendans PA, Mat J. Daemen, Ebo D. De Muinck, Jos F. Smits:** Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular research* 1998; 39: 34-49.

**Ellinghaus P, Wolfrum C, Assmann G, Spener F, Seedorf U:** Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice. *J Biol Chem* 1999; 274: 2766-2772.

**Erdmann E, Autenrieth G:** Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herzenahen Gefäße. Springer, Berlin 1996.

**Fentzke RC, Korcarz CE, Shroff SG, Lin H, Sandelski J, Leiden KM, Lang RM:** Evaluation of ventricular and arterial hemodynamics in anesthetized closed-chest mice. J Am Soc Echocardiogr 1997; 10: 915-925.

**Fentzke RC, Korcarz CE, Shroff SG, Lin H, Leiden JM, Lang RM:** The left ventricular stress-velocity relation in transgenic mice expressing a dominant negative CREB transgene in the heart. J Am Soc Echocardiogr 2001; 14:209-218.

**Ferdinandusse S, et al.:** Peroxisomal fatty acid oxidation disorders and 58 kD sterol carrier protein X (SCPx). Activity measurement in liver and fibroblasts using a newly developed method. J Lipid Res 2000; 41: 336-342.

**Fujiki Y, Tsuneoka M, Tashiro Y:** Biosynthesis of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) on free polyribosomes as a large precursor in rat liver. J Biochem (Tokyo) 1989; 106: 1126-1131.

**Garcia FL, et al:** NMR structure of the sterol carrier protein-2: implications for the biological role. J Mol Biol 2000; 295: 595-603.

**Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA:** Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. Circ Res 1995 ; 76: 907-914.

**Green SA, Thurmon JC:** Xylazine – A review of its pharmacology and use in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Therapy 1988; 11: 295-313

**Goodman DA, Smith FR, Seplowitz AH, et al.:** Prediction of the parameters of whole body cholesterol metabolism in humans. *J Lipid Res* 1980; 21: 699-713.

**Gottshall KR, Hunter JJ, Tanaka N, Dalton N, Becker KD, Ross J Jr, Chien KR:** Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 4710-4715.

**Grundy SM:** Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Ann Rev Nutr* 1983; 3: 71-96.

**Hashimoto T:** Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem Res* 1999; 24: 551-563.

**Hochner I, Blicke JF, Brograd JM:** Refsum disease. *Rec Med Interne* 1996; 17: 391-398.

**Hoit BD, Khan ZU, Pawloski-Dahm CM and Walsh RA:** In vivo determination of left ventricular wall stress-shortening relationship in normal mice. *Am J Physiol* 1997; 272: H1047 – H1052.

**Hoit BD and Walsh RA:** In vivo Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Function in Transgenic and Gene-Targeted Mice. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 129-134.

**Hoit BD, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA:** In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res* 1995; 77: 632-637.

**Hoit BD:** New approaches to phenotypic analysis in adult mice. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 27-35.

**Jansen GA, Ofman R, Ferinandusse S, Ijlst L, Muijsers AO, Skjeldal OH, Stokke O, Jakobs C, Besley GTN, Wraith JE, Wanders RJA:** Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nature Genetics* 1997; 17: 190-193.

**Kamphoven JHJ, Stubenitsky R, Reuser AJJ, Van der Ploeg AT, Verdouw PD, Dunker DJ:** Cardiac remodeling and contractile function in acid glycosidase knockout mice. *Physiol Genomics* 2001; 5: 171-179.

**Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen GL, Nakouzi A, Leinwand LA and Buttrick PM:** Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol* 1994; 267: H1167-H1173.

**Keller GA, Scallen TJ, Clarke D, Maher PA, Krisans SK, Singer SJ:** Subcellular localisation of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes. Its primary localisation to peroxisomes. *J Cell Biol* 1989; 108: 1353-1361

**Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O:** Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1301-1309.

**Leys D, Peteit H, Bonte-Adnet C, Millaire A, Fourrier F, Dubois F, Rousseaux M, Ducloux G:** Refsum's disease revealed by cardiac disorders. (Letter) *Lancet* 1989; I: 621.

**Lichtenstein AH:** Intestinal cholesterol metabolism. *Annals of Medicine* 1990; 22: 49-52.

**Lorenz JN and Robbins J:** Measurement of intraventricular pressure and

cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am J Physiol* 1997; 272: H1137-H1146.

**Lynen F:** Cholesterol and arterosklerosis. *Naturw RDSCH* 1972; 10: 382-387.

**Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Douglas PS and Gwathmey JK:** Echocardiographically Detected Myocardial Infarction in the Mouse. *Laboratory Animal Science* 1993; 43: 583-585.

**Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS:** In vivo assessment of LV mass in Mice using high-frequency cardiac ultrasound: necropsy validation. *Am J Physiol* 1994; 266 : H 1672-1675.

**Moltzahn S, Zeydabadinejad M:** Doppler-Echokardiographie: CW, PW, Farbdoppler; Eine Einführung. Thieme, Stuttgart, New York 2000.

**Mor-Avi V, PhD, Korcarz C, DVM, Fentzke RC, Hua Lin BS, MD, Leiden, JM MD, PhD and Lang RM, MD, Chiago, Illinois:** Quantitative Evaluation of Left Ventricular Function in a Transgenic Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy with 2-Dimensional Contrast Echocardiography. *J Am Soc of Echocardiogr* 1999; 12: 209-214.

**Mönnig G, Wiekowski J, Kirchhof P, Stypmann J, Plenz G, Fabritz L, Bruns H-J, Eckardt L, Assmann G, Haverkamp W, Breithardt G, Seedorf U:** Phytanic Acid Accumulation is Associated with Conduction Delay and Sudden Cardiac Death in Sterol Carrier Protein-2/Sterol Carrier Protein-x Deficient Mice. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2004; 15: 1310-1316.

**Nakajima H, Kizaki M, Sonada A, Mori S, Harigaya K, Ikeda Y:** Retnoids (all-trans and 9-cis retinoic acid) stimulate production of macrophage colony-

stimulating factor by human bone marrow stromal cells. *Blood* 1994; 84:4107-4115.

**Nemoto S, Defraitas G, Mann DL, Caragello BA:** Effects of changes in left ventricular contractility on indexes of contractility in mice. *Am J Physiol* 2000; 283: H2504-2510.

**Ohba T, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF:** Human sterol carrier protein x /sterol carrier protein 2 gene has two promoters. *Biochemistry* 1995; 34: 10660-10669

**Patten RD, Aronovitz MJ, Bridgman P, Pandian NG:** Use of pulse wave and color flow doppler echocardiography in mouse models of human disease. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15: 708-714.

**Pollick C, Hale SL, Kloner RA:** Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice. *J Am Soc Echocardiogr* 1995; 8: 602-610.

**Raabe M:** Entwicklung einer Sterin-Transportprotein 2- und Sterin-Transportprotein x-defizienten transgenen Maus, Erkenntnisse zu Struktur und Funktion von SCP2. Dissertation, Universität Münster 1995.

**Refsum S:** Heredopathia atactica polyneuritiformis. *Acta Psychiatr Scand* 1946; (suppl) 38:9.

**Reichek N, Helak J, Plappert T, Sutton M ST J, Weber K:** Anatomic validation of left ventricular mass estimates from clinical two-dimensional echocardiography: initial results. *Circulation* 1983; 67: 335-348.

**Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross J:** Impact of anesthesia

on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol* 2002; 282: H2134-H2140.

**Scallen TJ, Noland BJ, Gavey KL, Bass NM, Ockner RK, Chanderbhan R, Vahouny GV:** Sterol carrier protein 2 and fatty acid binding protein. Separate and distinct physiological functions. *J Biol Chem* 1985; 260: 4733-4739.

**Scherrer-Crosbie M, MD; Steudel W; MD; Hunziker PR, MD, Foster GP, MD; Garrido L, PhD; Liel-Cohen N, MD; Zapol WM, MD; Picard MH, MD:** Determination of Right Ventricular Structure and Function in Normoxic and Hypoxic Mice. A Transesophageal Echocardiographic Study. *Circulation* 1998; 98: 1015-21.

**Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Newell J, Zaroff J, Zapol WM, Picard MH:** Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1999; 277: H 986-992.

**Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Ullrich R, Zapol WM, Picard MH:** Three-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular wall motion abnormalities in mouse myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr* 1999; 12: 834-840.

**Schmidt AG, Gerst M, Zhai J, Carr AN, Pater L, Kranias EG, Hoit BD:** Evaluation of left ventricular diastolic function from spectral and color M-mode doppler in genetically altered mice. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15: 1056-1073.

**Seedorf U, Brysch P, Engel T, Schrage K, Assmann G:** Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thilase with intrinsic sterol carrier and

lipid transfer activity. J Biol Chem 1994; 269: 2177-2183.

**Seedorf U, Scheek S, Engel T, Steif C, Hinz HJ, Assmann G:** Structure-activity studies of human sterol carrier protein 2. J Biol Chem 1994; 269: 2613-2618.

**Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters F, Wirtz KW, Wanders RJ, Maeda N, Assmann G:** Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. Genes Dev 1998; 12: 1189-1201.

**Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL:** Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. Am J Physiol 2002; 238: H976-H982.

**Shanewise JS, MD; Cheung AT, MD; Aronson S, MD; Steward WJ, MD; Weiss RL, MD; Mark JB, MD; Savage RM, MD; Sears-Rogan P, MD; Mathew JP, MD; Quinones MA, MD; Cahalan MK, MD and Savino JS, MD:** ASE/SCA Guidelines for Performing a Comprehensive Intraoperative Multiplane Transesophageal Echocardiography Examination: Recommendations of the American Society of Echocardiography Council for Intraoperative Echocardiography and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Task Force for Certification in Perioperative Transesophageal Echocardiography. J Am Soc Echocardiogr 1999; 12: 884-900.

**Steinberg D, Avigan J, Mize C, Baxter JH:** Phytanic acid formation and accumulation in phytol-fed rats. Fed Proc 1965; 24: 290.

**Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R,**

**Mönning G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T:** Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. PNAS 2002; 99: 6234-6239.

**Taffet GE, Hartley CJ, Wen X, Pham T, Michael LH, Entmann ML:** Noninvasive indexes of cardiac systolic and diastolic function in hyperthyroid and senescent mouse. Am J Physiol 1996; 270: H2204-2209.

**Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockmann HA, Peterson KL, Gottshall KH, Hunter JJ, Chien KR, Ross JJ:** Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. Circulation 1996; 94: 1109-1117.

**Tiemann K, Weyer D, Djoufak PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB:** Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57/Bl/6 mice during early postnatal development. Am J Physiol Heart and circulatory physiology 2002; 284: H464-474.

**Uechi M, Asai K, Osaka M, Smith A, Sato N, Wagner TE, Ishikawa Y, Hayakawa H, Vatner DE, Shannon RP, Homcy CJ, Vatner SF:** Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G $\alpha$ . Circ Res 1998; 82: 416-423.

**Wall, WJ, Worthington BS:** Skeletal changes in Refsum's disease. Clin Radiol 1979; 30: 657-9.

**Wan YJ, Wang L, Wu TC:** The expression of retinoid X receptor genes is regulated by all-trans and 9-cis retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. Exp. Cell Res 1994; 210: 56-61.

**Weiss RE, Korcarz C, Chassande O, Cua K, Sadow PM, Koo E, Samarut J,**

**Lang R:** Thyroid hormone and cardiac function in mice deficient in thyroid hormone receptor-alpha or -beta: an echocardiograph study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 238: E428-435.

**Wills A.J., Manning N.J., Reilly M.M.:** Refsum's disease. *Q J Med* 2001; 94: 403-406.

**Wirtz KWA, Gadella TW:** Properties and modes of action of specific and non-specific phospholipid transfer proteins. *Experientia* 1990; 46: 592-599.

**Yang X-P, Liu Y-H, Rhaleb N-E, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA:** Echocardiographic assesment of cardiac function in conscious and anesthetizes mice. *Am J Physiol* 1999; 277: H1967-1974.

**Youn HJ, Rokosh G, Lester SJ, Simpson P, Schiller NB, Foster E:** Two-dimensional echocardiography with a 15 MHz transducer is a promising alternativ for in vivo measurement of left ventricular mass in mice. *J Am Soc Echocardiogr* 1999; 12: 70-75.

## **VII. Abkürzungsverzeichnis**

AL-LV Mass	Linksventrikuläre Muskelmasse, berechnet nach der Area-Length-Methode
Ao asc.	Aorta ascendens
Ao des.	Aorta descendens
Ao-RR	Zyklusintervall des Herzens
AoV $V_{\max}$	Maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
AoV $PG_{\max}$	Maximaler Druckgradient über der Aortenklappe
AoV $PG_{\text{mean}}$	Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
CoA	Coenzym A
CI	Cardiac Index
$CI_{\text{LVOT}}$	Cardiac Index, Doppler-echokardiographisch berechnet
$CI_{\text{Teich}}$	Cardiac Index, nach Teichholz-Formel berechnet
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
EDV	Enddiastolisches linksventrikuläres Volumen
$EDV_{\text{Teich}}$	Enddiastolisches Volumen nach Teichholz
$EF_{\text{Teich}}$	Ejektionsfraktion nach Teichholz
$ESV_{\text{Teich}}$	Endsystolisches Volumen nach Teichholz
ESV	Endsystolisches linksventrikuläres Volumen
FS	Fractional Shortening (Verkürzungsfraktion)
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
$HZV_{\text{LVOT}}$	Herzzeitvolumen, Doppler-echokardiographisch berechnet
$HZV_{\text{Teich}}$	Herzzeitvolumen, nach Teichholz berechnet
IVRT	Isovolumetrische Relaxationszeit
IVSed	Durchmesser des interventrikulären Septum enddiastolisch
IVSs	Durchmesser des interventrikulären Septum systolisch
kD	kilo Dalton

LA	Linker Vorhof
LV	Linker Ventrikel
LVIDd	Durchmesser des linken Ventrikel enddiastolisch
LVIDs	Durchmesser des linken Ventrikels endsystolisch
LVOT	Linksventrikulärer Ausflußtrakt
LVPWd	Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand enddiastolisch
LVPWs	Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand systolisch
LV-Spitze	Linksventrikulärer Längendiameter
MV A-Welle	Amplitude der A-Welle
MV-Decel. time	Dezelerationszeit der mitralen E-Welle
MV E-Welle	Amplitude der mitralen E-Welle
MV E/A-Welle	Verhältnis der E- und A-Welle in der mitralen Geschwindigkeits-Zeit-Kurve
MV MPG	Mittlerer Druckgradient über der Mitralklappe
MV PG <sub>max</sub>	Maximaler Druckgradient über der Mitralklappe
MV V <sub>max</sub>	Maximale Flussgeschwindigkeit über der Mitralklappe
n.s.	Werte statistisch nicht signifikant
SCP2	Sterol Carrier Protein 2
SCPx	Sterol Carrier Protein X
SV	Schlagvolumen
TDI	Tissue Doppler Imaging

allgemein gebräuchliche Abkürzungen werden nicht gesondert erläutert

## **VIII. Danksagung**

Im Gedenken an meinen Vater.

Die vorliegende Promotionsschrift entstand im Rahmen der Unterstützung durch das IZKF Münster innerhalb der ZPG 4 (Funktionelle Kleintierphänotypisierung in vivo).

Mein besonderer Dank gilt daher zuvorderst dem Projektleiter Herrn Dr. med. Jörg Stypmann für die Überlassung des Themas sowie die durch ihn erfahrene unermüdliche und freundschaftliche Unterstützung und seine Geduld im Hinblick auf die Fertigstellung der Arbeit. Seiner kompetenten Anleitung verdanke ich im besonderen die Einarbeitung in die Methodik der Mäusechokardiographie.

Der Arbeitsgruppe um Herrn PD. Dr. Udo Seedorf möchte ich für die Überlassung der genmodifizierten Mäuse danken. Aus dieser Arbeitsgruppe sei insbesondere Herr Johannes Wiekowski erwähnt, für seine Hilfestellung bei der Aufzucht der Mäuse. Von ihm erhielt ich auch manch wertvollen Hinweis zum Umgang mit den Tieren.

Herrn Dr. med. Gerold Mönning danke ich für die Durchsicht der Arbeit und seine ergänzenden Anregungen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt bedanken, unter dessen Gesamtverantwortung diese Arbeit entstand.

Abschließend danke ich ganz herzlich dem Menschen, ohne dessen beharrliche Unterstützung und liebevollen Ermahnungen diese Arbeit nie zustande gekommen wäre, meiner Ehefrau.

Münster, 2004









## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
Dr. med. Gerold Mönning  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
- Innere Medizin C (Kardiologie und Angiologie)  
der Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers

Aktenzeichen  
23.0835.1.0 (G 49/99)

22. Juni 1999

48129 Münster

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 15.03.1999, hier eingegangen am  
22.03.1999

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Mönning,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

I.

Implantation von EKG-Telemetrie-Sendern in transgenen Mäusemodellen zur Beurteilung elektrokardiographischer Daten, der körperlichen Aktivität und der Temperatur der Mäuse

II.

Untersuchungen zur Ätiopathogenese des plötzlichen Herztodes am Beispiel von knock-out-Mäusen mit Refsum Syndrom (Sterol-Carrier-Protein-2-knock-out-Maus-Modell).

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=dc, A=dbp, P=dvs-rrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 09 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Leiter des Versuchsvorhabens ist:

Herr  
 Dr. med. Gerold Mönning  
 Medizinische Klinik und  
 Poliklinik der  
 Westf. Wilhelms-Universität  
 Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

Seine Stellvertreter sind:

Herr  
 Dr. med. Wilhelm Haverkamp  
 Medizinische Klinik und  
 Poliklinik - Innere Medizin C  
 (Kardiologie u. Angiologie)  
 Albert-Schweitzer-Straße 33

48129 Münster

Herr  
 Dr. rer. nat. Udo Seedorf  
 Institut für Arteriosklerose-  
 forschung an der  
 Westf. Wilhelms-Universität  
 Domagkstraße 3

48129 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 30.06.2000.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere  
 verwendet werden:

40 Mäuse.

#### Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser  
 Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter  
 wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung  
 die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben  
 waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3  
 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb  
 einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann  
 widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht  
 erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG  
 wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

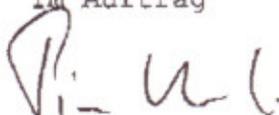
Das das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag



Dr. Piontkowski



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn

Dr. med. Gerold Mönning

Medizinische Klinik und Poliklinik

- Innere Medizin C -

der Westf. Wilhelms-Universität

Albert-Schweitzer-Straße 33

48129 Münster

Dienstgebäude:

Domplatz 1-3

Telefon: (0251)411-0

Durchwahl: 2110

Telefax: 2115

Raum: 431

Auskunft erteilt:

Frau Möllers

eMail:

irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de

Aktenzeichen:

23.0835.1.0 (G 49/99)

22.08.2000

Betr.: Tierschutz;

hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

- Verlängerung des Tierversuchs G 49/99:

- I. Implantation von EKG-Telemetrie-Sendern in transgenen Mäusemodellen zur Beurteilung elektrokardiographischer Daten, der körperlichen Aktivität und der Temperatur der Mäuse
- II. Untersuchungen zur Ätiopathogenese des plötzlichen Herztodes am Beispiel von knock-out-Mäusen mit Refsum Syndrom (Sterol-Carrier-Protein-2-knock-out-Maus-Modell)

Bezug: - Ihr Antrag vom 09.07.2000, hier eingegangen am 01.08.2000  
- Mein Genehmigungsbescheid vom 22.06.1999 Az. 23.0835.1.0 (G 49/99)

Sehr geehrter Herr Dr. Mönning,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren o. a. Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o. a. Versuchsvorhabens ausnahmsweise bis zum 30.06.2002.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

*P. U. I.*

(Dr. Piontkowski)

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

eMail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de • Telefax: (0251) 411-2115

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzivalmarkt und 10, 14 bis Domplatz