

Aus dem  
Zentrum für Präklinische Forschung der Technischen Universität München  
am Klinikum rechts der Isar  
(Leitung: PD Dr. med. vet. J. Henke, Dr. med. vet. T. Brill)

Angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. med. vet. J. Henke und PD Dr. B. Guth

Vorgelegt über  
Prof. Dr. med. vet. B. Aigner  
Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. E. Wolf

**Das Göttinger Minipig  
als Telemetriemodell  
für pharmakologische Zwecke**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Miriam Stubhan  
aus  
Ehingen  
München, 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Aigner
Koreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Literatur.....</b>	<b>6</b>
2.1 Das Minipig als Tiermodell .....	6
2.1.1 Herkunft.....	6
2.1.2 Das Minipig im Tierversuch .....	7
2.1.3 Ethische Aspekte.....	7
2.1.4 Pharmakologische Aspekte .....	8
2.1.5 Eigenschaften des Schweines im Vergleich zu Mensch und Hund .....	8
2.2 Telemetrie in der Versuchstierkunde.....	9
2.2.1 Definition der Telemetrie .....	9
2.2.2 Implantate zur Messung kardiovaskulärer Parameter bei frei beweglichen Großtieren .....	10
2.2.3 Aufbau und Funktion des Telemetriesystems .....	12
2.3 Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks im Tierversuch.....	15
2.3.1 Prinzip der indirekten und direkten Methoden .....	15
2.3.2 Genauigkeit der Methoden .....	17
2.3.3 Einfluss von physischer und chemischer Fixation .....	17
2.3.4 Telemetrie zur direkten Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks .....	18
2.4 Messung des linken Ventrikeldrucks (LVP) im Tierversuch.....	20
2.4.1 Bedeutung des LVP .....	20
2.4.2 Methoden zur Messung des LVP .....	20
2.5 Elektrokardiogramm (EKG) .....	21
2.5.1 Prinzip des EKG`s .....	21
2.5.2 EKG-Ableitungen und Methoden beim Minipig.....	22
2.5.3 EKG-Morphologie beim Minipig.....	23
2.5.4 Arrhythmien (Torsades de Pointes).....	23

<b>3. Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>25</b>
3.1 Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig .....	25
3.2 The value added by measuring myocardial contractility 'in vivo' in safety pharmacological profiling of drug candidates .....	53
<b>4. Erweiterte Diskussion .....</b>	<b>72</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>85</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>87</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	87
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	89
7.3 Tabellenverzeichnis.....	91
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>

# 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Telemetrie wird als Methode in verschiedenen Bereichen wie der Raumfahrt, der Meteorologie, der Erforschung von Wildtieren und der medizinischen Forschung eingesetzt. Sie besteht in der drahtlosen Übertragung von Daten eines Sensors zu einem räumlich getrennten Empfänger.

In der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung stellt die Telemetrie eine wertvolle Methode dar, um Effekte von pharmakologischen Substanzen auf den Organismus zu beurteilen. Tierzahlen für Versuche können im Sinne der Komponente „Reduction“ der 3 R's aufgrund der wiederholten Einsatzmöglichkeit der implantierten Tiere stark reduziert werden. Ein weiterer Vorteil der Telemetrie mit vollständig implantierbaren Einheiten liegt in der Erhebung verlässlicher und aussagekräftiger Daten. Diese werden durch ein Minimum an Stress produzierendem „Handling“ der Versuchstiere sowie dem Vorteil einer kontinuierlichen Datenaufzeichnung über lange Zeiträume erreicht. Die Messungen können an wachen Tieren ohne Narkose oder physische Fixation geschehen. Dazu existiert eine Vielzahl von Implantaten für die Analyse der verschiedenen Parameter der Körperfunktionen. Eine telemetrische Datenerfassung ist sowohl bei unfixierten Kleintieren wie Maus, Ratte und Meerschweinchen als auch bei Großtieren wie Hund, Schwein und Primat möglich. In der Sicherheitspharmakologie und Toxikologie wird häufig der Hund als Nicht-Nager Spezies zur Beurteilung von Nebeneffekten auf das Herz-Kreislaufsystem verwendet. Zunehmend werden dafür auch kleinwüchsige Schweinerassen wie das Göttinger Minipig eingesetzt. Gründe dafür sind die physiologischen Ähnlichkeiten zum Mensch und die höhere Akzeptanz in Öffentlichkeit und Behördenwesen gegenüber dem Einsatz von landwirtschaftlichen Nutztieren in Tierversuchen.

Telemetriesysteme zur Messung von kardiovaskulären Parametern sind beim Göttinger Minipig bisher noch nicht sehr verbreitet. Insbesondere die Verwendung von vollständig implantierbaren Einheiten mit Druckaufnehmern zur Messung des linken Ventrikeldrucks (LVP) wurden in der Literatur beim Göttinger Minipig noch nicht beschrieben, da sie relativ neu auf dem Markt sind und an bereits etablierten und validierten Systemen zur Messung des systemischen Blutdrucks ohne LVP festgehalten wird. Aus diesen Gründen gibt es keine verfügbaren Normalwerte für

Herz-Kreislauf- und EKG-Daten beim nicht anästhesierten oder nicht fixierten Göttinger Minipig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Telemetriesystem, das beim Hund bereits erfolgreich angewendet wird, beim Göttinger Minipig als zweite Nicht-Nager Spezies zu etablieren und physiologische Herz-Kreislauf- (Herzfrequenz, systolischer und diastolischer arterieller Blutdruck, linker Ventrikeldruck, LVdP/dt als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels) und EKG-Werte sowie die Körpertemperatur an wachen, frei beweglichen Minipigs zu erfassen. Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf die analgetische Versorgung während der operativen Phase und auf das Training und die Haltungsbedingungen während den Messungen gelegt werden. Die erfassten Daten sollen als physiologische Referenzwerte für spätere toxikologische und sicherheitspharmakologische Studien an Minipigs dienen.

## **2. Literatur**

### **2.1 Das Minipig als Tiermodell**

#### **2.1.1 Herkunft**

Die Zuchtgeschichte der Miniaturschweine hat ihren Ursprung im Jahre 1949 (Bustad und McClellan 1968) und brachte eine Vielzahl an verschiedenen Züchtungen hervor wie z.B. das Hanford Miniaturschwein, das Minnesota Minipig, das Yucatan Miniaturschwein (Leucht et al. 1982) und das Münchner Troll Miniaturschwein (Schmidt et al. 1988). In Deutschland wurde seit 1960 an der Universität Göttingen das Göttinger Minipig als Kreuzung aus deutscher Landrasse, Minnesota Minipig und Vietnamesischem Hängebauchschwein entwickelt (Bustad und McClellan 1968, Svendsen 2006). Aufgrund ihres geringeren Endgewichtes sind Miniaturschweine geeigneter für die Forschung. Darunter ist das Göttinger Minipig mit einem Adultgewicht von 35 – 40 kg eine der kleinsten Rassen (Svendsen 2006). Das Göttinger Minipig zeichnet sich außerdem durch einfaches „Handling“, kontrollierten genetischen Hintergrund und einheitlichen Phänotyp aus. Die Haltung unter SPF-

Bedingungen bedingt eine sehr gute hygienische Qualität der kommerziell erhältlichen Göttinger Minipigs (Mahl et al. 2006).

### **2.1.2 Das Minipig im Tierversuch**

Das Göttinger Minipig ist im Vergleich zu traditionellen Schweinerassen, die stressanfällig und zum Teil aggressiv sind (Crick et al 1998), von freundlichem und ruhigem Wesen (Lehmann 1998). Gestresste Tiere sind aufgrund ihres wechselnden kardialen Auswurfes und peripheren Widerstandes (Dantzer und Mormède 1986) ungeeignet für Untersuchungen, die das Herz-Kreislauf-System betreffen. Auch aus Tierschutzgründen sollten Studien nur an gut trainierten Tieren in ruhiger, vertrauter Umgebung stattfinden.

### **2.1.3 Ethische Aspekte**

Der Einsatz von Hunden als Begleit- und Haustiere für Tierversuche wird in den Augen der Öffentlichkeit kritisch bewertet (Khan 1984, Hughes 1986, Bollen und Ellegaard 1997). Bei Primaten kommt neben der kritischen Meinung der Öffentlichkeit auch eine geringe Akzeptanz der Behörden hinzu. Das Minipig wird als alternative Nicht-Nager Großtier-Spezies zu Hund und Primat in der präklinischen Entwicklung von Medikamenten immer beliebter (Mahl et al. 2006). Jones et al. (1999) argumentieren, die emotionale Bindung zum Schwein wäre im Allgemeinen niedriger im Vergleich zu anderen Spezies. Im Gegensatz zum Hund wird der ethische Wert von Schweinen von der Öffentlichkeit geringer eingestuft und Tierversuche am Schwein aufgrund dessen weniger kritisiert. Auch die Bedenken gegenüber radikalen Tierschutzorganisationen spielen in forschenden Einrichtungen eine Rolle (Lehmann 1998).

#### **2.1.4 Pharmakologische Aspekte**

Für einige pharmakologische Substanzen ist der Hund oder der Primat als Testspezies ungeeignet, da die Pharmakokinetik und die Sensitivität gegenüber der zu testenden Substanz vom Menschen wesentlich abweichen. Beispiele hierfür sind nicht-steroidale Entzündungshemmer (Lehmann 1998) und Sympathomimetika (Dogterom et al. 1992). Da von den Behörden in toxikologischen und pharmakologischen Untersuchungen eine Nicht-Nager Spezies gefordert wird, ist das Minipig in solchen Fällen eine aussagekräftige Alternative.

#### **2.1.5 Eigenschaften des Schweines im Vergleich zu Mensch und Hund**

Schweine werden aufgrund der physiologischen, anatomischen und metabolischen Ähnlichkeiten zum Mensch immer häufiger in der präklinischen Forschung und Entwicklung von pharmazeutischen Substanzen verwendet (Kuwahara et al. 1999, Mahl et al. 2006).

Beispielsweise ist die Haut des Schweines in Morphologie, Mitose-Zyklus und Metabolismus dem Menschen ähnlich (Lin et al. 1992, Bollen et al. 2000a, Mahl et al. 2006). Weiterhin finden sich große Übereinstimmungen im Magen-Darm-Trakt, da das Schwein genau wie der Mensch ein Allesfresser ist (Beglinger et al. 1975, Miller und Ullrey 1987, Bellinger et al. 2006). Die Neigung zu Übergewicht prädestiniert das Göttinger Minipig für die Metabolismus-Forschung (Bellinger et al. 2006). Da das Schwein nach kurzer Zeit der Aufnahme von fettreicher Nahrung und im fortgeschrittenen Alter Atherosklerose entwickelt (Hughes 1986, Bollen et al. 2000a), ist es als Tiermodell in diesem Bereich verbreitet. Genau wie der Mensch hat das Schwein einen unverzweigten Ductus pancreaticus (Bollen et al. 2000a), was eine auf den Menschen gut übertragbare Untersuchung der Pankreas-Sekretion in dieser Spezies ermöglicht.

Eine enge Übereinstimmung findet sich im Bereich des Kreislaufsystems, womit sich Schweine als Modelle für viele Herz-Kreislaferkrankungen des Menschen eignen (Henke et al. 2005). Minipigs haben die gleiche Relation von Herzgröße zu Körpergewicht wie der Mensch. Auch der Koronarkreislauf ist vergleichbar (Khan 1984, Hughes 1986, Weaver et al. 1986, Bollen et al. 2000a). Im Gegensatz zum



Hund, der ein sog. linkskoronarer Versorgungstyp (Nickel et al. 1996) ist, haben Schweine wie der Mensch eine beidseitige, koronare Blutversorgung des Herzens. Wie der Mensch hat das Schwein wenige subepikardiale Kollateral-Anastomosen (Swindle 2007). Diese Gemeinsamkeiten prädestinieren das Schwein für Untersuchungen zu Myokardinfarkten (Lehmann-Drache 2005).

Die übereinstimmende Anatomie des Herzens wird von vielen Autoren erwähnt. Ausführliche Untersuchungen zu diesem Thema von Crick et al. (1998) stellten neben Übereinstimmungen auch einige Unterschiede heraus. So ist die Morphologie des rechten Vorhofes verschieden, was die unterschiedlichen P-Wellen im porcinen und humanen EKG bedingen könnte. Der abweichende Aufbau des rechten His-Bündels mag für die schnellere Überleitung vom Atrium zum Ventrikel und deshalb für die beim Schwein kürzere PR-Zeit verantwortlich sein. Die PR-Zeit beträgt beim Menschen nach Timmis (1993) 120 - 200 ms verglichen zum fixierten Minipig mit 70 - 113 ms (Larks et al. 1971). Die Morphologie des Elektrokardiogramms insgesamt weicht von der des Menschen und des Hundes ab. Da die Purkinje Fasern die freien Teile des Myokards durchdringen, wird die linke Kammer in einem differierenden Ablauf aktiviert als dies bei Hund und Mensch der Fall ist (Hughes 1986). Im humanen Herz verzweigt sich das Purkinje Fasernetz nur in den subendokardialen Anteilen des Myokards (Katz 2001).

## **2.2 Telemetrie in der Versuchstierkunde**

### **2.2.1 Definition der Telemetrie**

Telemetrie ist eine Fernübertragung von Messgrößen (Pschyrembel 2007). Das Wort ist griechischen Ursprungs und kommt von tele = entfernt und metron = messen. Unter Biotelemetrie versteht man die Fern-Detektion und Fern-Messung von menschlichen und tierischen Funktionen, Aktivitäten oder Zuständen (Merriam-Webster 2003).

## **2.2.2 Implantate zur Messung kardiovaskulärer Parameter bei frei beweglichen Großtieren**

Zahlreiche physiologische Parameter wie Herzfrequenz, arterieller Blutdruck, EKG, pulmonaler Druck, intratrachealer Druck, Pleuraldruck, Atemfrequenz und Elektroenzephalogramm können mittels der Radiotelemetrie bei verschiedenen Tierarten erfasst werden (Kramer 2000). Dazu sind Technologien von 5 verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich: Biomedic Data Systems, Data Science International (DSI), Königsberg Instruments, Mini-Mitter und Star Medical (Kramer et al. 2001).

Zur Messung von arteriellem Blutdruck, linkem Ventrikeldruck, EKG und Temperatur bei großen Labortieren gibt es zwei kommerzielle Hersteller von Implantaten (Königsberg Instruments und DSI). Beide Implantattypen haben Vor- und Nachteile (Tabelle 1). Unterschiede liegen u.a. im technischen Aufbau. So wird der Druck im Fabrikat der Fa. Königsberg Instruments über die Widerstandsänderung in einer Wheatstone Brücke gemessen (Casadei et al. 1972, Vatner und Patrick 1974, Sarazan 1993), während die Druckwellen im Implantat von DSI über einen flüssigkeitsgefüllten Katheter, der durch ein patentiertes Gel abgedeckt wird, zum Signalempfänger weitergeleitet werden (Brockway et al. 1991, Guiol et al. 1992, De Pasquale et al. 1994, Kramer 2000, Van Vliet et al. 2000, Soloviev et al. 2006). Außerdem ist die Platzierung der EKG-Elektroden unterschiedlich. Während die Elektroden von DSI subkutan so nahe wie möglich an der elektrischen Herzachse zu platzieren sind, ist beim Königsberg System die 2. Elektrode für die EKG-Ableitung im Druckaufnehmer für den arteriellen Druck im Aortenbogen integriert, wodurch sich die Linie durch die Ableitpunkte näher entlang der Herzachse bewegt und die Signalstärke größer wird (Harmeyer 2000).

	<b>Konigsberg Implantat T27</b>	<b>DSI Implantat D70-PCTP</b>
<b>Messmöglichkeiten</b>	3 Druckmessungen 2 Biopotentiale Temperatur	2 Druckmessungen 2 Biopotentiale Temperatur
<b>Gewicht</b>	78 g	49 g
<b>Batterie (ein/ausschaltbar)</b>	Bis 24 Monate bei Dauerbetrieb	Bis 2,5 Monate bei Dauerbetrieb
<b>Sendefrequenz</b>	Sender mit unterschiedlichen Sendefrequenzen → Gruppenhaltung während Messung möglich	Sender mit gleichen Sendefrequenzen → nur Einzelhaltung während Messung möglich
<b>Druckmesstechnik</b>	Titandruckaufnehmer mit Membran an Silikonkabel  Druckmessung über Widerstandsänderung (Wheatstone Brücke) im Druckaufnehmerkopf	Flüssigkeitsgefüllter Katheter mit Gelmembran  Druckmessung über Druckübertragung auf flüssigkeitsgefüllten Katheter
<b>Arterieller Zugang</b>	Aorta thoracalis	A. femoralis
<b>EKG Ableitung II (Elektrodenposition)</b>	1. Elektrode subkutan in Nähe des Sternums 2. Elektrode im Aortendruckaufnehmer integriert → Ableitung immer konstant entlang der Herzachse	1. und 2. Elektrode subkutan an Thoraxwand möglichst nahe der Herzachse  → Ableitung nicht genau entlang der Herzachse möglich
<b>Finanzieller Aufwand</b>	Ca. 10 000 US \$	Ca. 3 800 US \$

Tab. 1: Vergleich eines Konigsberg- (links) und eines DSI (rechts) Implantates für Großtiere (<http://www.dissdata.com>, <http://www.datasci.com>, Kramer 2000)

### 2.2.3 Aufbau und Funktion des Telemetriesystems

Radio-Telemetriesysteme zur Messung von Parametern der Körperfunktionen bei Labortieren bestehen prinzipiell aus den gleichen Grundkomponenten (Brockway et al. 1991, Brockway und Hassler 1993, Sato et al. 1994, Kramer 2000):

- 1) Sensoren zur Messung der gewünschten Parameter
- 2) Signalverstärker
- 3) Umwandlung der Sensorsignale in Radiofrequenzen
- 4) Antenne
- 5) Empfänger an einem vom Tier entfernten Ort
- 6) Datenverarbeitungssystem

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System ist im Grundaufbau gleich (Abb.1).

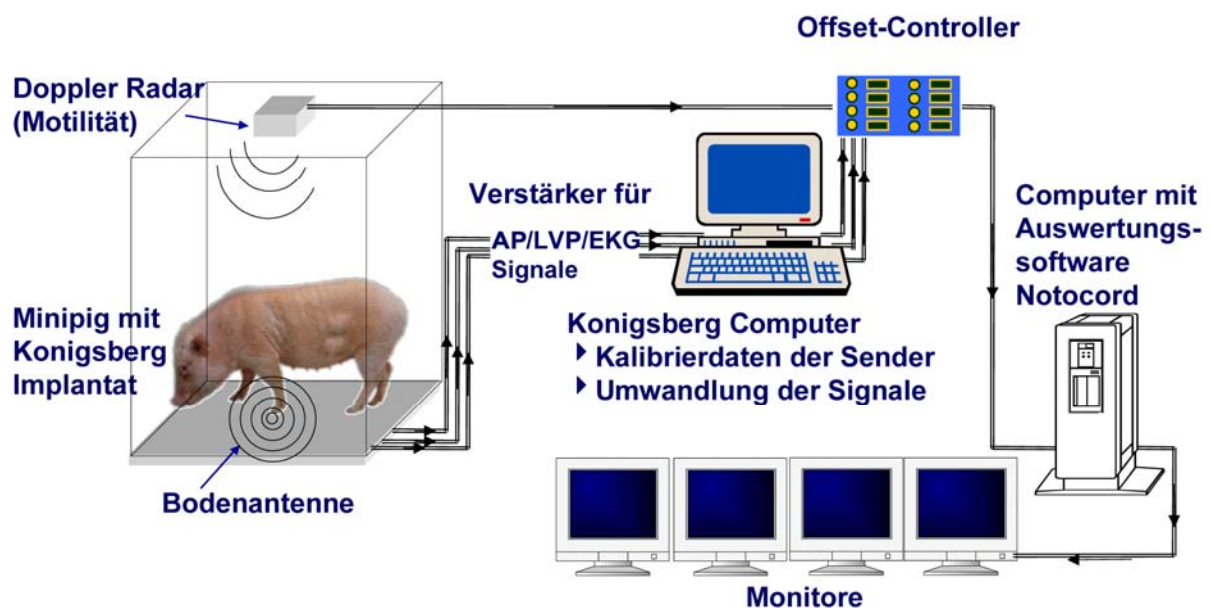


Abb. 1: Aufbau des Telemetriesystems.

Vor der Implantation der Königsberg-Sender in das Tier werden die Druckaufnehmer kalibriert (250 mmHg werden verstärkerseitig auf +5 Volt Ausgangsspannung kalibriert) und mittels Niederdruck-Ethylenoxid sterilisiert. Weitere Komponenten im Aufbau der Telemetrieanlage, die die Gewinnung zusätzlicher Informationen ermöglichen, sind der Doppler Radar an der Decke der Tierbox zur Erfassung der Motilität, sowie eine Kamera zur kontinuierlichen Überwachung des Verhaltens der Tiere im Versuch.

AP (Aortendruck)-, LVP (linker Ventrikeldruck)- und EKG-Signale werden im Elektronikmodul des Senders moduliert und kontinuierlich auf einer Frequenz im Bereich von 180 – 220 MHz gesendet. So werden sie zur Antenne übertragen, die im Epoxidharzboden der Tierbox eingegossen ist, was eine optimale Signalstärke und gute Signalqualität zur Folge hat. Die an der Antenne ankommenden Signale werden verstärkt (Verstärker-Einheit in der Tierbox) und über ein BNC-Kabel zum Königsberg-Computer, der sog. „Basestation“ weitergeleitet. Dort werden die Antennensignale demoduliert, d.h. in analoge Signale (-5 bis +5 Volt) umgewandelt. Die „Basestation“ dient außerdem dazu, sämtliche Kalibrierdaten der Sender zu verwalten sowie anzuwenden und den gemessenen Druck an den atmosphärischen Druck des entsprechenden Tages anzupassen.

Ein potentieller Messfehler kann durch die allmähliche Drift der Drucksignale von der Nulllinie weg entstehen, der nach der Implantation auftritt. Dieses Phänomen ist durch eine gewisse Materialermüdung im Druckaufnehmer zu erklären. Dadurch biegt sich die Membran nach und nach leicht durch und bedingt in der Wheatstone Brücke eine Widerstandsänderung, ohne dass zu dieser Zeit ein adäquater Blutdruck besteht. Um diesem Problem entgegenzutreten, muss der Druck im linken Ventrikel vor jedem Versuch auf Null kalibriert werden (Vatner und Patrick 1974). Um die regelmäßige Kalibrierung zu erleichtern, wurde im verwendeten System ein sog. „Offset-Controller“ integriert, mit dessen Hilfe es möglich ist, die LVP-Drucksignale in einem Arbeitsschritt an Null anzupassen und den AP daran auszurichten. Ohne diesen „Offset-Controller“ muss der Druck über das Kalibriermenü der „Basestation“ eingestellt werden, was aufwändiger ist.

Die analogen Signale für alle Parameter werden gebündelt und vom Königsberg Computer zu einem Erfassungsrechner weiter transferiert, auf dem die Software zur Verarbeitung und Auswertung der Daten („Notocord hem“) installiert ist. Dieser

Rechner wandelt die analogen Signale mit einer A/D-Wandler-Karte (32-Kanäle) in digitale Signale um. Die Signale werden am Monitor als Einzelsignale (Abb. 2), im Tagesverlauf (Abb. 3) oder als dezimaler Wert dargestellt. Der Erfassungsrechner speichert die Daten zusätzlich dauerhaft ab.

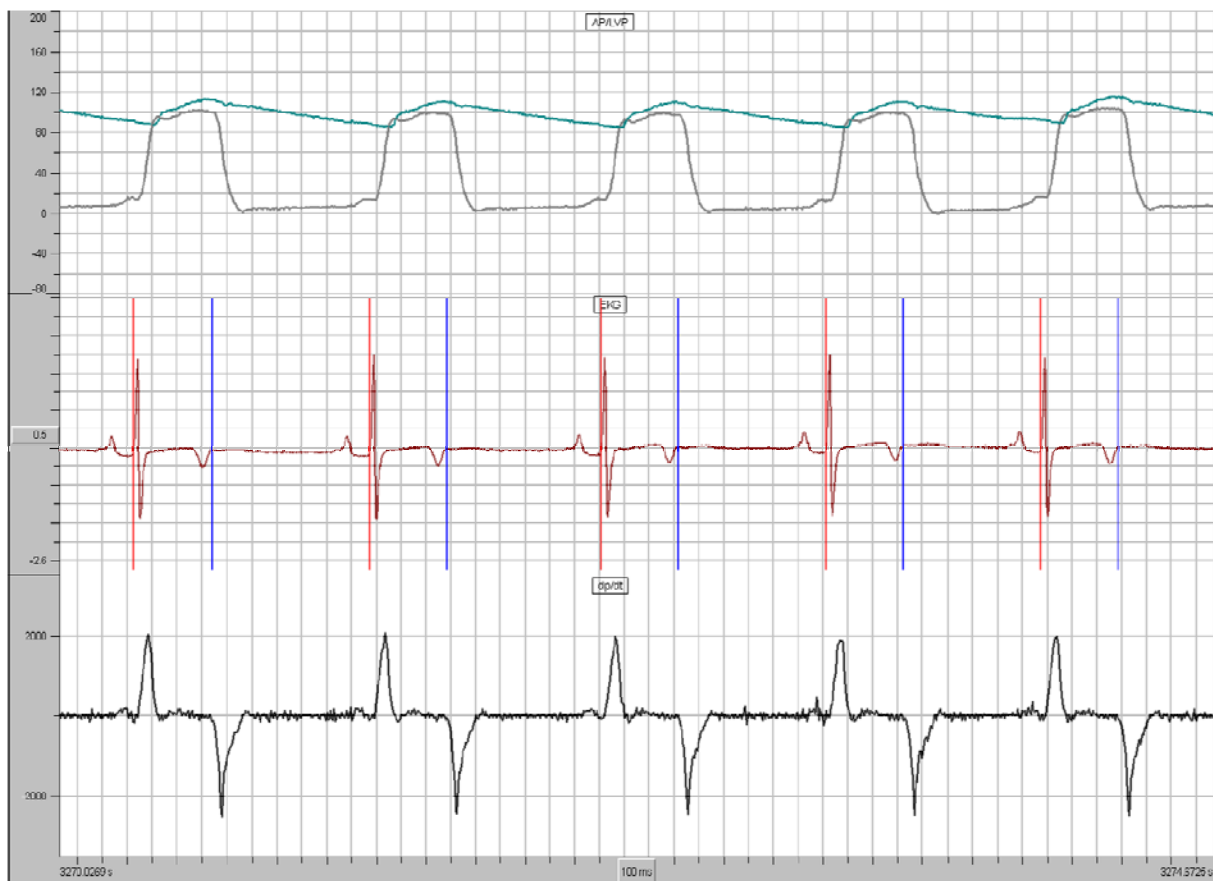


Abb. 2: Monitoranzeige (Oberfläche der „Notocord hem“ Software) der Einzelsignale für Aortendruck und linken Ventrikeldruck (oben), EKG (Mitte) und LVdP/dt (unten).

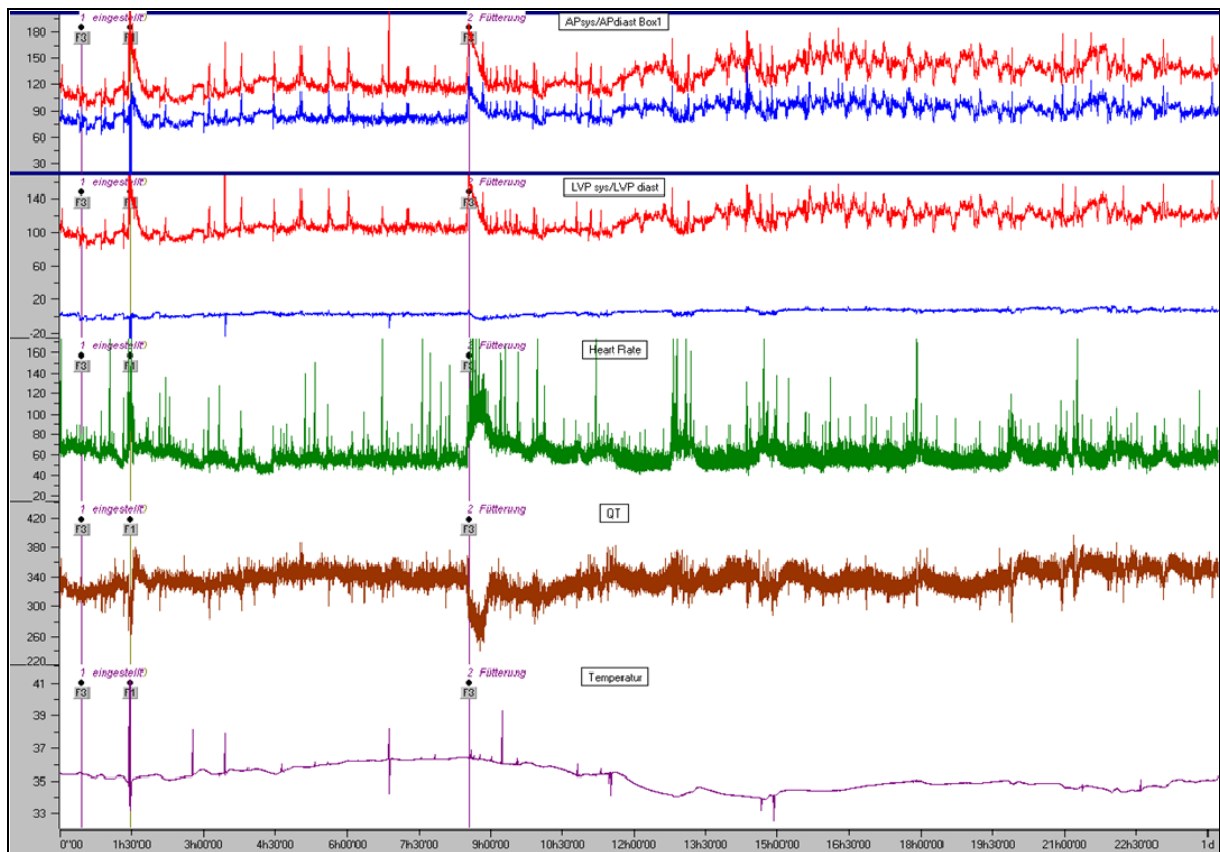


Abb. 3: Monitoranzeige (Oberfläche der „Notocord hem“ Software) für AP (systolisch und diastolisch), LVP (systolisch und diastolisch), Herzfrequenz, QT-Intervall und Temperatur im Tagesverlauf über 24 Stunden.

## 2.3 Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks im Tierversuch

### 2.3.1 Prinzip der indirekten und direkten Methoden

Für die Messung des arteriellen Blutdrucks stehen invasive und nicht-invasive Methoden zur Verfügung (Kramer et al. 2001). Bei nicht-invasiven Druckmessungen ist zwischen der Doppler-Ultraschallmethode, der oszillometrischen und der HDO (High Definition Oszillometrie) Methode zu unterscheiden. Während sich die Doppler-Ultraschallmethode des Phänomens des Doppler-Shiftes (d.h. Ultraschallwellen werden an den Blutkörperchen mit einer hörbaren Frequenzänderung reflektiert) bedient, liegt den beiden anderen genannten Methoden die Messung der schwingenden Arterienwand zugrunde. Für alle indirekten Methoden wird den Tieren eine Blutdruckmanschette angelegt (Oberarm, Unterarm oder Schwanzwurzel), die

den Blutfluss im darunter liegenden Gefäß zunächst verhindert. Im Anschluss wird aus dem wieder einsetzenden Blutstrom bei nachlassendem Druck der Manschette (über Ultraschallfrequenz oder oszillierende Gefäßwand) der arterielle Blutdruck errechnet.

In der Intensivmedizin wird im Rahmen von Operationen eine invasive, arterielle Druckmessung mit flüssigkeitsgefüllten Kathetern durchgeführt, die in das Gefäß eingebracht und mit extrakorporalen Druckmessern verbunden werden. Eine Alternative sind sog. Tip-Katheter. Der Drucksensor an der Spitze von Tip-Kathetern misst den Druck direkt im Gefäß, also intrakorporal. Aufgrund des höheren Maßes an Invasivität ist die direkte Blutdruckmessung keine Routinemethode in der kurativen Medizin (Erhardt et al. 2007).

In akuten Tierversuchen sind die Katheter mit einem Gerät außerhalb des Körpers verbunden, das die Druckwellen (flüssigkeitsgefüllter Katheter) bzw. Drucksignale (Tip-Katheter) aufnimmt und nach Demodulation graphisch darstellt. Für chronische Versuche (Tiere überleben mehrere Tage bis Monate) werden die austretenden Schläuche von einer Vorrichtung über der Tierbox gehalten und nach außen zur Messeinheit weitergeführt (Bulpitt et al. 1970). Die Tiere können sich hierbei auf eingeschränktem Raum bewegen. Die aus dem Körper austretenden Kabel stellen einen Stressfaktor und eine Eintrittspforte für Infektionen dar. Adams et al. (1988) zeigten bei *Cynomolgus* Affen eine um 30 – 50 Schläge pro Minute erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zu telemetrisch gemessenen Tieren.

Als weitere Möglichkeit werden die Katheter mit einer telemetrischen Sendeeinheit verbunden, die vom Tier auf dem Rücken getragen wird und von dort aus die Signale an einen entfernten Empfänger sendet (Vatner und Patrick 1974, Armentano et al. 1990). Eine weitere Variante ist mit einer chronisch subkutan, intramuskulär oder intraperitoneal implantierten Sendeeinheit verbunden (Guiol et al. 1992, Sadoff et al. 1992, Truett und West 1995, Brooks et al. 1996, Fossum et al. 2003, Hassimoto und Harada 2003, Taylor et al. 2007). Das Tier wird in diesem Fall nicht von einem Rucksack gestresst und in der Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Außerdem bestehen keine Kabelaustritte aus dem Körper, die potentielle Eintrittspforten für Infektionen sind und aufwändiger Pflege bedürfen (Brooks et al. 1996). Ein stark limitierender Faktor beim Einsatz von flüssigkeitsgefüllten Kathetern ist die Durchgängigkeit, da die Katheter leicht verstopfen (Brockway und Hassler 1993).



### **2.3.2 Genauigkeit der Methoden**

Abhängig von der Messmethode ist bei indirekten Messungen im Vergleich zu invasiven Messungen mit ungenaueren Werten zu rechnen, die durch Bewegungsartefakte der Tiere (Hassler et al. 1979), Stress durch die Fixation (Brockway und Hassler 1993) und anwenderbedingte Messfehler zustande kommen (Brockway und Hassler 1993, Erhardt et al. 2007). Verschiedene Studien untersuchten die Übereinstimmung der Ergebnisse invasiver und nicht-invasiver Messverfahren bei verschiedenen Tierarten wie Kaninchen, Ratten und Mäusen (Bazil et al. 1993, Van Vliet et al. 2000), Hunden (Pettersen et al. 1988, Gain et al. 1995) und Yucatan Minipigs (Cimini und Zambraski 1985). In allen Studien wurde eine mehr oder weniger ausgeprägte Abweichung der mit den unterschiedlichen Methoden gemessenen systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckwerte dokumentiert. Die Ergebnisse aus den direkten und indirekten arteriellen Blutdruckmessungen zeigten zwar eine lineare Abhängigkeit, die absoluten Werte wichen jedoch ab (Pettersen et al. 1988). Bazil et al. (1993) zeigten eine akzeptable Korrelation der Ergebnisse aus den Messungen mit Telemetrie-Implantat zu den mit externem Katheter gemessenen Werten. Die Werte aus den indirekten Messungen mit Schwanz-Manschette ergaben im Gegensatz dazu höhere Werte für den systolischen Blutdruck und die Herzfrequenz. Diese beiden erhöhten Parameter bei der indirekten Messung wiesen auf einen höheren Stresslevel der Tiere während der Messung hin. Die sensitivsten und akkuratesten Messungen waren bei chronisch implantierten Tieren möglich.

### **2.3.3 Einfluss von physischer und chemischer Fixation**

Grundsätzlich ist bei der Blutdruckmessung zwischen Methoden zu unterscheiden, die unter verschiedenen physischen oder chemischen (Anästhesie) Fixationstechniken stattfinden bzw. an wachen, frei beweglichen Tieren durchgeführt werden. Beide Formen der Fixation, physisch sowie chemisch, üben einen erheblichen Einfluss auf die gemessenen Druckwerte aus (Brockway und Hassler 1993, Sarazan 1993, Brooks et al. 1996).

So bewirkt Isofluran als viel verwendeter Vertreter aus der Gruppe der Inhalationsanästhetika eine Vasodilatation und somit eine Senkung des systemischen arteriellen Blutdrucks (Becker et al. 1984, Van den Berg und Honjol 1993, Erhardt et al. 2004).

Stress durch die Immobilisation führt zur Ausschüttung von Katecholaminen, die wiederum das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen. Adrenalin und Noradrenalin wirken an den Rezeptoren des sympathischen Nervensystems ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren) und verursachen am Herzen eine Vasokonstriktion und positive Inotropie (Pettersen et al. 1988, Weiskopf et al. 1989, Hauser et al. 2005). Die Katecholamin-Ausschüttung nach Fixation wurde in der Literatur bereits weitreichend am Beispiel der Ratte (Kvetnansky et al. 1978, Livezey et al. 1987) dokumentiert.

#### **2.3.4 Telemetrie zur direkten Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks**

Telemetrische Methoden zur Ermittlung des arteriellen Blutdrucks wurden in der Vergangenheit bei Nagern (Bazil et al. 1993, Brockway and Hassler 1993, Van Vliet et al. 2000) und bei Hunden (Armentano et al. 1990, Truett und West 1995, Brooks et al. 1996) als akkurate, verlässliche Messmethode bewertet. Die Telemetrie mit vollständig implantierbaren Einheiten kommt ohne Artefakte durch Fixation, „Handling“ und störende Kabelsysteme aus und bietet die Möglichkeit einer kontinuierlichen Messung über längere Zeiträume (Stunden bis Tage) hinweg. Limitierender Faktor ist bei vollständig implantierbaren Systemen die Lebensdauer der Batterie (Brockway und Hassler 1993).

Wie bereits erwähnt gibt es die Variante eines telemetrischen Systems, bei der die Enden der implantierten Katheter mit der Instrumentenbox (Sender und Batterie) vom Tier in einem Rucksack getragen werden (Bulpitt et al. 1970, Patrick et al. 1974). Diese Methode zur Druckmessung ist veraltet, wird aber noch zur nicht-invasiven, kontinuierlichen Messung des EKG's an frei beweglichen Tieren eingesetzt, z.B. bei Primaten (Bassiouny et al. 1994). Moderne Systeme hierfür werden von verschiedenen Herstellern angeboten (siehe 2.5.2).

Im Sicherheitsscreening von neuen pharmakologischen Substanzen werden zur Messung des arteriellen Blutdrucks und des EKG's vollständig implantierbare Einheiten routinemäßig v.a. beim Hund eingesetzt (Takahara et al. 2001, Markert et al. 2004, Kim et al. 2005). Hier sind die Tiere völlig frei von Bewegungseinschränkungen. Diese Systeme liefern deshalb artefaktfreie Messdaten, die der Physiologie des Tieres am nächsten kommen und sind aus Gesichtspunkten des Tierschutzes zu befürworten.

Für das Schwein gibt es wenige Daten über arterielle Blutdruckmessungen mit chronisch implantierten, telemetrischen Sendern. Bei Bulpitt et al. (1970) trug das Schwein die Einheit auf dem Rücken, während Fossum et al. (2003) eine DSI-Einheit in einem Bluthochdruck-Modell bei Micro-Minipigs verwendeten. Der flüssigkeitsgefüllte Blutdruck-Katheter lag hier in der A. thoracica interna und der Sender in einer Tasche der Bauchmuskulatur. Die Kontrolltiere zeigten in dieser Studie einen arteriellen Blutdruck von 109 mmHg im Tagesmittel und eine Herzfrequenz von 97 Schlägen pro Minute. Gemessen wurde allerdings nur alle 2 Stunden für 30 Sekunden. Eine zweite Gruppe von Micro-Minipigs wurde nicht mit einem DSI-Implantat instrumentiert, sondern zur Messung des Blutdrucks über einen Katheter in der A. carotis in einer Hängematte fixiert. Der Katheter wurde zur Anzeige der Werte mit einem Blutdruckmonitor verbunden. Die fixierten Micro-Minipigs hatten einen höheren systolischen und diastolischen Blutdruck als die telemetrisch gemessenen. Die Art der Messung beeinflusste die Ergebnisse signifikant. Auch Kano et al. (2005) verwendeten ein DSI-Implantat zur Messung von EKG und arteriellem Blutdruck bei Minipigs. Im Zentrum der dortigen Untersuchungen standen aber die EKG-Werte, wobei nur Ergebnisse zu RR-Intervall und QT-Zeit graphisch (keine Zahlen) abgebildet und besprochen wurden. Somit stehen bisher in der Literatur für Minipigs keine Messdaten zum physiologischen Blutdruck bei nicht anästhesierten, frei beweglichen Tieren zur Verfügung.

## **2.4 Messung des linken Ventrikeldrucks (LVP) im Tierversuch**

### **2.4.1 Bedeutung des LVP**

Das Signal des linken Ventrikeldrucks (siehe Abb. 2) bildet verlässlich die Funktionsabläufe im Herzen ab. Mit dem Verschluss der Mitralklappe beginnt die Systole der linken Herzkammer, die Aortenklappe ist zu diesem Zeitpunkt ebenfalls verschlossen. Damit startet die isovolumetrische Kontraktion des linken Ventrikels und der Druck steigt so lange an, bis er den Druck in der Aorta übersteigt und die Valva aortae sich aufgrund des Druckunterschieds öffnet. Die Funktion der linken Herzkammer ist dafür verantwortlich, den Organismus mit oxygeniertem Blut zu versorgen (Harmeyer 2000). Folglich stellt dieser Parameter, zusammen mit dem davon abgeleiteten  $LVdP/dt_{max}$  als myokardiales Kontraktionsmaß, eine wichtige zusätzliche Information in der Beurteilung von neuen Medikamenten dar, zumal von vielen Substanzen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die Kontraktilität des Myokards haben (Kubo 1994, Harkin et al. 1995).  $LVdP/dt_{max}$  ist ein aus dem LVP-Signal errechneter Wert und repräsentiert den Punkt in der Druckkurve des linken Ventrikels, an dem die größte Steigung herrscht.

### **2.4.2 Methoden zur Messung des LVP**

Im Unterschied zu Messmethoden des arteriellen Blutdrucks stehen für die Messung des Drucks in der linken Herzkammer nur invasive Verfahren zur Verfügung. So brachten Hauser et al. (2005) einen Tip-Katheter über die A. carotis in den linken Ventrikel ein und führten dort Messungen am anästhesierten Meerschweinchen durch. Eine Alternative ist, den Brustkorb in Narkose zu eröffnen, um den Katheter direkt in den linken Ventrikel einzubringen, wie es Mitchell et al. (2005) am Hund praktizierten. Um den LVP bei wachen Tieren zu messen, kann der Druckkatheter das Drucksignal zu einer Sendeeinheit in einem Rucksack leiten, die die Werte wiederum telemetrisch weitergibt (Patrick et al. 1974). Hierbei sind die Tiere frei beweglich, im Gegensatz zu Messungen, bei denen die Tiere in einer Hängematte (Vainio et al. 1992) fixiert werden und die implantierten Katheter im linken Ventrikel

direkt mit einem Druckumwandler verbunden werden. Dieser Demodulator wandelt die Druckwellen in graphische Signale und digitale Werte um.

Für sicherheitspharmakologische Fragestellungen ist es in vielen Fällen von Vorteil, den LVP an wachen, unfixierten und chronisch implantierten Tieren (Hund und Ratte) zu messen (Gerold et al. 1981, Sato et al. 1994, Markert et al. 2004). Hierfür gibt es die bereits genannten, kommerziell erhältlichen Implantate inklusive Druckaufnehmer für den linken Ventrikel. Daten über Werte des LVP an wachen, frei beweglichen Tieren sind jedoch selten, da das routinemäßig eingesetzte Modell in der Sicherheitspharmakologie und Toxikologie in den meisten Fällen nur die Messung des arteriellen Blutdrucks beinhaltet. Gründe dafür sind u.a. in einer komplizierten und aufwändigen Operationstechnik zu suchen, die ein erfahrenes Personal erfordert. Während der Zugang zur Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks in der Aorta abdominalis auch über periphere Gefäße wie z.B. die A. femoralis erreicht werden kann (Kano et al. 2005), muss für die Implantation des LVP-Druckaufnehmers eine Thorakotomie durchgeführt werden (Markert et al. 2004). Die anschließenden Manipulationen am Herzen und an der Aorta zur Implantation der Druckaufnehmer führen bei ungeübter Verfahrensweise zu Tierverlusten. Auch das perioperative Management mit Anästhesie und Analgesie ist bei der Implantation von Einheiten inklusive LVP-Messung anspruchsvoller.

## **2.5 Elektrokardiogramm (EKG)**

### **2.5.1 Prinzip des EKG's**

Das autonome Erregungsbildungs- und Reizleitungssystem am Herzen sorgt dafür, dass das Myokard ausgehend vom Sinusknoten erregt wird. Die Aktionspotentiale der Muskelzellen, die dabei entstehen, werden als Dipole (Potentialdifferenzen) gemessen und als Summe aller Einzelvektoren in einer Kurve, dem Elektrokardiogramm, abgebildet. Die unterschiedlichen Wellen im EKG stellen bestimmte Phasen der Erregungsleitung über das Herz und folglich stattfindende Kontraktionen dar (Harmeyer 2000, Baatz 2002a). So bildet die P-Welle die Depolarisation der Atrien ab, der QRS-Komplex die Kontraktion bzw. Depolarisation der Ventrikel und die T-Welle die Phase der Repolarisation der Ventrikel (Katz 2001).

Die einzelnen Punkte im EKG wurden von Einthoven bezeichnet, der zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Wellen PQRST nannte, um seine Methode von vorherigen Forschern abzuheben, die die Wellen mit ABCD benannten (Katz 2001).

## **2.5.2 EKG-Ableitungen und Methoden beim Minipig**

Die Ableitpunkte eines Elektrokardiogramms sind bei Mensch und Tier standardisiert festgelegt (Harmeyer 2000). Generell gibt es bipolare (Einthoven I, II, III; Nehb-Ableitungen) und unipolare (Goldberger aVR, aVL aVF; Wilson V1-6) Ableitungen (Horacek 1998). Bei bipolaren Ableitungen finden die Messungen der Potentialdifferenz zwischen zwei differenten Elektroden statt (d.h. diese sind nicht geerdet) während bei unipolaren Ableitungen zwischen einer differenten und einer geerdeten Elektrode (zwei über einen Widerstand verbundene Elektroden) gemessen wird (Harmeyer 2000, Silbernagel 2005). Eine Ableitung parallel zum Summenvektor zeigt den vollen Ausschlag, senkrecht dazu jedoch keinen (Silbernagel 2005). Beim Minipig, wie auch bei den anderen Großtier-Spezies, werden verschiedene Ableitungen angewendet und kombiniert (Dukes und Szabuniewicz 1969, Nahas et al. 2002). Dukes und Szabuniewicz (1969) kombinierten beispielsweise Goldberger-, Einthoven- und Wilson-Ableitungen, um ein dreidimensionales System zu bekommen. Ableitung I, aVF und V10 bilden hier ein senkrecht zueinander stehendes System, das sich auf Herzhöhe schneidet.

Für die EKG-Messung beim Minipig stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Das Tier ist in einer Hängematte fixiert (Dukes und Szabuniewicz 1969, Beglinger et al. 1975, Eckenfels und Schuler 1988, Nahas et al. 2002) oder trägt eine Jacke (Suzuki et al. 1998). Diese Jacke beinhaltet das Equipment, das die Daten radiotelemetrisch oder via Bluetooth (<http://www.datasci.com>) zur Empfängerstation sendet. Die Anwendung einer Jacke zur EKG-Messung wurde auch bei Primaten (Hassimoto et al. 2002) und Hunden (Kusakabe et al. 1990) eingesetzt. Hassimoto et al. (2002) bemerkten allerdings, dass die Tiere für das Tragen der Jacke gut trainiert und adaptiert werden müssen, da sie anfänglich Stressreaktionen zeigten. Auch Suzuki et al. (1998) hielten fest, dass die EKG-Messung mit Jacke beim Miniaturschwein einige Komplikationen mit sich brachte, da sich die Tiere daraus befreien konnten.

Es wurden Krokodilklemmen (Eckenfels und Schuler 1988), selbstklebende Elektroden (Suzuki et al. 1998) oder subkutane Nadeln (Nahas et al. 2002) zur Ableitung des EKG's von der Körperoberfläche verwendet. Kano et al. (2005) implantierten Minipigs chronisch mit subkutanen Elektroden eines DSI-Systems. Eine Methode, die eine Ableitung entlang der elektrischen Herzachse möglich macht, wurde beim Minipig bisher nicht beschrieben.

### **2.5.3 EKG-Morphologie beim Minipig**

Dukes und Szabuniewicz (1969) stellten beim Schwein ein stark variables EKG-Muster fest. Auch die T-Wellen zeigten eine starke inter- und intraindividuelle Abweichung in Form und Polarität. Darüber hinaus sind die Herzachsenrichtung, die Polarität des QRS-Komplexes sowie seine Amplitude sehr variabel, unabhängig von Körperposition und „Handling“ (Eckenfels und Schuler 1988).

### **2.5.4 Arrhythmien (Torsades de Pointes)**

Arrhythmien werden in supraventrikuläre und ventrikuläre Rhythmusstörungen eingeteilt, außerdem können auch Störungen der Erregungsleitung, sog. AV-Blöcke oder Schenkelblöcke bestehen (Baatz 2002b).

In der Entwicklung von Medikamenten liegt derzeit der Fokus auf einer ventrikulären Tachyarrhythmie, den sogenannten „Torsades de Pointes“ (Crumb und Cavero 1999, De Ponti et al. 2000, Malik and Camm 2001, Haverkamp et al. 2002). Torsades de Pointes sind wellenförmig um die Nulllinie kreisende Bewegungen des EKG's und können in tödlichem Kammerflimmern münden (Priori et al. 2001, Haverkamp et al. 2002). Prädisponierender Faktor für ein solches kardiales Ereignis ist eine Verlängerung der QT-Zeit im EKG. Man hat festgestellt, dass viele pharmazeutische Substanzen eine Verlängerung des QT-Intervalls bewirken, aber nicht jede QT-Verlängerung lebensbedrohliche Rhythmusstörungen zur Folge hat. Es gibt also „gute“ und „schlechte“ QT-Verlängerungen (Malik 2001). Beispiele für Medikamente, die für einen QT-verlängernden Effekt bekannt sind, sind einige Antiarrhythmika wie Sotalol oder Dopamin, verschiedene Antibiotika (Erythromycin, Moxifloxacin) und

bestimmte Neuroleptika (z.B. Pimozid). Abgesehen von dieser erworbenen QT-Verlängerung kann sie auch eine genetische Ursache besitzen (Priori et al. 2001). Die Ursache einer QT-Verlängerung liegt in einer Blockade von Ionenströmen während der Repolarisationsphase des Aktionspotentials der Herzmuskelzellen, v.a. des IKr-Kanals (= die schnelle Komponente des verzögerten Kaliumgleichrichterstromes), auch HERG- (Human Ether-a-go-go Related Gene) Kanal genannt (Crumb und Caverio 1999). Über diese Blockade kommt es zu einer Verlängerung der Plateauphase des Aktionspotentials und somit des QT-Intervalls. Fällt ein neues Aktionspotential in diese Phase, so kann es zu Torsades de Pointes kommen (Abb. 4) (Haverkamp et al. 2002).

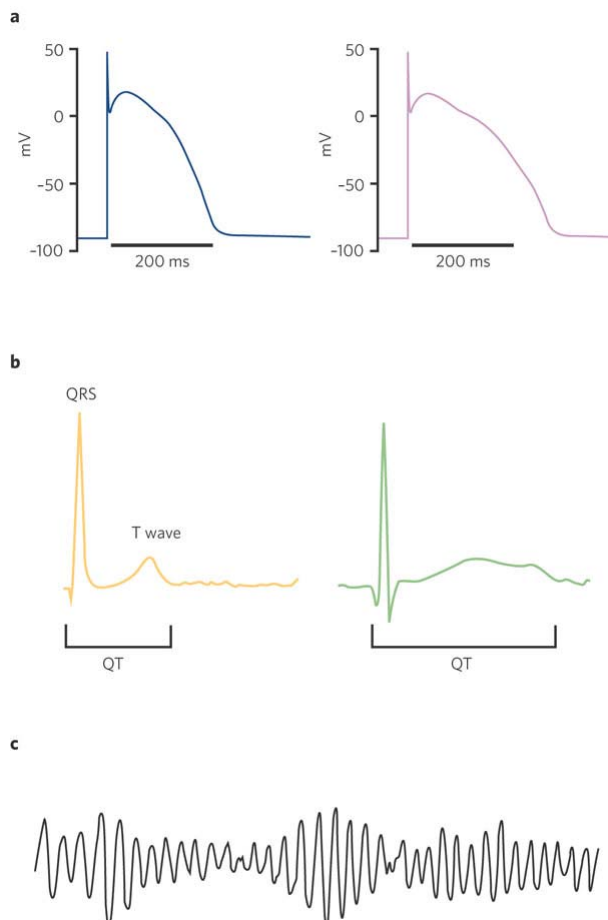


Abb. 4 Entstehung von Torsades de Pointes (Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006).  
a Normales Aktionspotential einer Herzmuskelzelle (links) und verlängertes Aktionspotential durch HERG-Blockade (rechts).  
b Normales EKG (links) und EKG mit verlängertem QT-Intervall (rechts).  
c Aufzeichnung von Torsades de Pointes im EKG.



### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1**

#### **Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig**

Publication in Journal of Pharmacological and Toxicological Methods  
(accepted 13 February 2008)

Miriam Stubhan  
Michael Markert  
Karin Mayer  
Thomas Trautmann  
Anja Klumpp  
Julia Henke  
Brian Guth

# EVALUATION OF CARDIOVASCULAR AND ECG PARAMETERS IN THE NORMAL, FREELY MOVING GÖTTINGEN MINIPIG

Miriam Stubhan<sup>§</sup>, Michael Markert\*, Karin Mayer, Thomas Trautmann, Anja Klumpp, Julia Henke<sup>§</sup>, Brian Guth

*Department of Drug Discovery Support, General Pharmacology Group, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Germany*

*<sup>§</sup> Department of Non Clinical Drug Safety, Biological Lab Service Group, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Germany*

## Abstract

**Introduction:** The objective of this study was to evaluate the normal cardiovascular and ECG parameters in freely moving minipigs and to use these data as the basis of pharmacological drug safety evaluation.

**Methods:** 7 Göttingen Minipigs were equipped with radiotelemetry transmitters (ITS). Aortic pressure (AP), left ventricular pressure (LVP), lead II of the ECG and body temperature were continuously monitored. NOTOCORD hem 4.2 software was used for data acquisition. Power calculations for the various parameters were done to assess appropriate sample sizes.

**Results:** We obtained excellent signal quality and found stable hemodynamic parameters with a low intrinsic heart rate in the Göttingen Minipig. After oral dosing of vehicle, the hemodynamic parameters returned quickly to baseline values indicating that the procedure was well tolerated. The heart rate dependency of the QT interval had to be corrected individually. A sufficient power could be achieved with a sample size of 4 due to the low variability of the parameters measured.

**Discussion:** These are, to our knowledge, the first data documenting the course of systemic arterial and ventricular hemodynamic parameters in the freely moving Göttingen Minipig over 24 hours. As such, they may serve as a basis for future studies in which drug effects are studied in these animals.

## 1. Introduction

Pigs are being used increasingly in biomedical research, particularly in pharmacological and toxicological testing. Preclinical testing for tolerability and safety is required in both rodents (usually the rat) and in a second, non-rodent species (Guth et al., 2004; Pugsley & Curtis, 2006). The dog has been the non-rodent species most commonly used for toxicity studies (Lehmann, 1998). Nevertheless, there are cases in which the dog is not suitable. This can be due to dog-specific drug malabsorption, metabolism or any other atypical response that can impact on drug safety. Furthermore, a pharmacodynamic response to a given agent is needed to qualify a species for toxicological testing. If a given pharmacodynamic effect cannot be demonstrated in the dog, alternative species must be considered. The primate has been widely used when the dog has been shown to be inappropriate, but animal availability and ethical considerations limit the use of primates. Thus, further options for non-rodent safety pharmacology and toxicity testing are needed.

The domestic pig, due to its large size as an adult (can exceed 100 kg bodyweight), has not been a commonly used animal for research purposes. In 1949, first attempts were made to develop smaller pigs ("miniature pigs") at the University of Minnesota (Bustad & McCellan, 1968). Today, several different breeds of minipigs are available that are suitable for laboratory use since they reach weights of only 20-35 kg. The Göttingen Minipig is one such breed, having a consistent phenotype, exhibiting a friendly behaviour suitable for handling in the laboratory environment (Lehmann, 1998).

In the meantime, use of pigs for biomedical research has demonstrated that they offer potential advantages, when certain comparisons to man are desirable. For instance, the minipig has a similar heart-to-body weight ratio and a coronary artery distribution similar to humans. Moreover, cardiac anatomy, metabolism and electrophysiology are comparable to man (Bollen & Ellegaard, 1997; Crick et al., 1998; Glodek & Oldigs, 1981; Henke, Brill, & Feußner, 2005; Hughes, 1986; Khan, 1984; Leucht, Gregor, & Stier, 1982; Zambraski & Fuchs, 1980). First analyses show that the major myocardial ion currents responsible for the human myocardial action potential are also present in the Göttingen Minipig (Poster Presentation on SPS Meeting 07). At the same time, use of the dog as an experimental animal has drawn criticism due to its role as a companion animal (Bollen & Ellegaard, 1997; Hughes,

1986; Khan, 1984; Rollin, 1986). In contrast, the pig is still viewed primarily as a farm animal with fewer emotional and ethical implications.

As a consequence, minipigs are being more extensively used not only for cardiovascular biomedical research (Bustad & McCellan, 1968; Kuwahara et al., 1999), but as an alternative non-rodent species for toxicological studies (Khan, 1984; Lehmann, 1998). In spite of this trend, there are few cardiovascular and electrocardiographic reference data available from minipigs in the literature. Most of the published hemodynamic data have been collected with invasive measurement techniques (Beglinger et al., 1975). ECG data from normal minipigs is available from animals restrained in a sling with external limb leads (Dukes & Szabuniewicz, 1969; Eckenfels & Schuler, 1988; Larks, Wescott, & Larks; 1971, Nahas, Baneux, & Detweiler 2002; Suzuki et al., 1998). To our knowledge there are no published data for left ventricular pressure from normal, freely moving minipigs. LVP measurements have been done only in anesthetized (Benharkate et al., 1993; Diederer & Kadatz 1981; Lal, Bhattacharya, & Dadkar, 1981; Smith, Spinale, & Swindle, 1990; Vainio, Bloor, & Kim, 1992) or in awake, sling-restrained animals (Vainio, Bloor, & Kim, 1992). LVP measurements are particularly useful in that the derivative of LVP, i.e.  $LVdP/dt$ , is a well-established parameter for the assessment of cardiac contractility (Klumpp et al., 2006; Markert et al., 2004; Markert et al., 2007). Thus, one goal of the present work was to establish baseline hemodynamic data, including left ventricular hemodynamics and contractility, in freely moving, conscious minipigs.

We recently established a telemetric animal model using Göttingen Minipigs for safety pharmacology assessments. A fully implantable telemetric system was used with pressure transducers in the left ventricle and the descending thoracic aorta connected to a transmitter unit and with integrated ECG leads. This is to our knowledge the first application of this system in the minipig. In the present study, we evaluated hemodynamic (heart rate, aortic pressure, left ventricular pressure,  $LVdP/dt_{max}$ ) and electrocardiographic (PR, QRS, QT, RR) parameters, as well as body temperature, in 7 normal, freely moving Göttingen Minipigs over 24 hours. Diurnal effects were analyzed and we also assessed the dependency of the QT interval duration on heart rate using various correction models.

## **2. Methods**

### **2.1 Telemetry System**

The telemetry system used to measure cardiovascular parameters is manufactured by Konigsberg Instruments, Inc. (Pasadena, CA) and marketed by RMISS (Delaware). It consists of 5 major components: a) an implantable unit; b) a receiver (antenna) located in the animals cage together with an amplifier; c) ambient pressure monitor to measure atmospheric pressure; d) a PC-based “base station” to receive and process the amplified signals; and e) a PC-based data acquisition system (NOTOCORD hem 4.2) to process signals.

The implantable unit (“T27” total implant) consists of: (1) two high fidelity pressure transducers (4.0 mm diameter), (2) ECG cable; (3) micro-power battery-operated electronics that process and digitize the information from the pressure transducers and the ECG lead, (4) a radio-frequency transmitter that sends the signals to the telemetry receiver, and (5) a battery. A small cable projecting from the transmitter contains a switch that allows the device to be turned on and off to prolong battery life.

### **2.2 Animals**

Treatment of the animals followed the German Law on the Protection of Animals and was performed with permission from the Baden-Württemberg Animal Welfare Committee.

For this study we used 7 Göttingen Minipigs obtained from Ellegaard Göttingen Minipigs Aps, Dalmose, Denmark. The Göttingen Minipig is a cross between the Vietnamese potbelly pig, Minnesota Minipig and the German landrace pig. It is now a genetically outbred minipig available for research. Our animals were of both sexes (4 males, 3 females), at least one year of age and weighed 22-32 kg. The minipigs were housed in our AAALAC-accredited facility individually or in pairs in separated pens. Room temperature ( $21 \pm 2$  °C) and humidity ( $60 \pm 15\%$ ) was controlled with a ventilation turnover of 12/h. They had access to water ad libitum and were fed ~300 g per animal (~25 kg) of a solid standard minipig diet (SDS SMP(E) from Special Diets Services, Witham, Essex, U.K.; supplier SDS Deutschland, Altrip) adapted to body

weight once daily. The minipig pens were enriched with wood shavings and sleeping boxes with straw, metal chains, rubber nipples to bite and balls to play with. Furthermore, they received a daily training from our animal staff and were weighed at least twice a week. To monitor the health status of the minipigs, blood is collected every 3 months to determine blood count and clinical parameters, including electrolytes and kidney parameters. Before surgery each animal underwent a routine veterinary health inspection and a short check (about 15 minutes) of the external ECG taken while resting in a sling.

The minipigs were already well trained in the telemetry lab, a process beginning at least 2 months before surgery (e.g. p.o. application, general handling, etc.). Room temperature and humidity was controlled ( $22 \pm 2$  °C;  $60 \pm 15\%$  humidity) with a ventilation turnover of 13/h. We maintained a 12 h light (365 lx) and dark (3 lx, “moonlight”) cycle. Background “noise” was supplied using a radio during the lighted period.

### **2.3 One-time surgical implantation**

The transducers of the T27 implant were calibrated and the unit was sterilized using a low pressure ethylene oxide process prior to implantation. All procedures were conducted under strict aseptic conditions.

For perioperative analgesia the minipigs were given Metacam (meloxicam, 0.4 mg/kg). Additionally, a second analgesic component was given: 2-4 Durogesic smat plasters (fentanyl, 25 µg/h) were attached behind the ear the day before surgery after shaving and degreasing the skin. During surgery a supplemental fentanyl infusion (0.005 mg/kg/h) was given. For prophylactic antibiotic treatment, Duphamox LA (amoxicillin, 15 mg/kg) was given beginning the day before surgery.

Animals were sedated with a combination of Ketavet (ketamine hydrochlorid, 15 mg/kg i.m.) and Dormicum (midazolam, 0.35 mg/kg i.m.). Propofol Lipuro 1% (propofol, ~2 mg/kg) was then administered i.v. to allow endotracheal intubation. The dose was dependant on effect and administration was performed very slowly to prevent depression of the respiratory system. After preparing the animals skin for surgery under aseptic conditions, anesthesia was maintained throughout the

remaining procedure with isoflurane (1-3%) inhalation anesthesia with mechanical ventilation (66% O<sub>2</sub>) at a ventilation rate of 14/min.

The minipigs were placed in a lateral recumbency with the left side facing the surgeon. An incision was made near the fifth or the sixth rib. The preparation through the connective tissue and the muscles was continued until the rib and the intercostal muscles were reached. As next step a small pocket was opened in the abdominal wall for implantation of the transmitter, battery housing and induction switch coil. The cables with both pressure transducers and the ECG leads extending from the transmitter were guided subcutaneously to the lateral incision. The antenna was guided subcutaneously from the transmitter location ventral towards the linea alba and further parallel to the mamma complexes in a cranial direction.

The initial ventral incisions required for battery and transmitter placement were closed. A left thoracotomy was then performed after removing the fifth or sixth rib to provide access to the left ventricle apex and the thoracic aorta. After insertion of the left ventricular Konigsberg transducer and fixing it in place with a purse string suture, the aortic pressure transducer, which also served as one electrode of the ECG, was implanted just below the aortic arch. The other electrode was placed toward the sternum under ECG-signal control to ensure a good (with lead II configuration) signal quality. After the implantation, the lung was inflated, the intercostal muscles were sutured closed and the pneumothorax evacuated. Chest incisions were closed.

The gas anesthesia was then turned off and the minipigs were allowed to wake up. Antibiotics were administered for 10 days postoperatively. To ensure postoperative analgesia, the transdermal fentanyl plaster was kept in place for 4 days and meloxicam administration was continued for 10 days.

The animals were given at least 21 days for a full recovery prior to the initiation of experiments.

## **2.4 Experimental design**

Forty-four experiments were carried out with the 7 instrumented minipigs. The experimental design was that used with our safety pharmacology studies (Fig.1). The animals were put in their telemetry pens as pairs of 2 in the early morning. An initial

period of 30 - 45 min allowed the minipigs to acclimate to these measurement pens. After this acclimatization period, the measurements were started. The subsequent hour preceding the administration procedure was taken as a control period for baseline measurements. After this hour, the minipigs were taken out of their pens and vehicle was administered orally (drinking water, volume 1.5 x bodyweight) with a special dosing catheter. In this study for the generation of normal, physiological parameters, only vehicle (water) was administered. After dosing, the minipigs were returned promptly to their telemetry pens and thereafter left undisturbed. The animals were monitored continuously by video for the duration of the study. They had free access to water and 7 hours after application they were fed their standard diet.

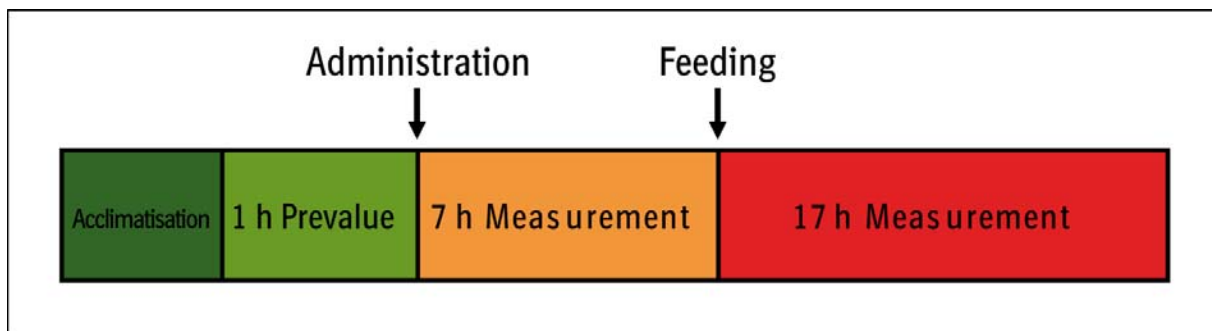


Fig. 1 Study design.

## 2.5 Data acquisition and analysis

Digitized telemetry signals were processed by NOTOCORD software (hem 4.2) on a beat-to-beat basis. The following parameters were continuously measured throughout the experiment: aortic pressure (AP, @250Hz), left ventricular pressure (LVP, @250Hz), ECG (@1000Hz) and temperature (1Hz). Hemodynamic parameters calculated from these signals during the experiment included: systolic and diastolic aortic pressure, peak systolic and end-diastolic left ventricular pressure, LV dP/dt max and min, heart rate and from the ECG wave PQ-, QRS- and QT-intervals. EXCEL software was used for data analysis. Data were summarized at predefined time points every 10 minutes as median values  $\pm$  SD. For each time point a minimum of 400 sequential beats were used to calculate the median value. The mean of the median values  $\pm$  SD of every parameter is presented in graphically over 24 hours



study period. Values after placebo administration were compared to the pre-treatment values. For statistical evaluation, a standardized area under the curve was calculated for each parameter to be evaluated at predefined time intervals. Two measurement phases were defined, one being the lighted period before feeding and the other being the dark period after feeding. The specification of the time interval was as follows:

- 1 hour to 7 hours after administration of placebo (light period)
- 8.3 hours to 20.3 hours after administration of placebo (dark period)

Comparisons between these 2 phases were performed by a paired *t* test in 4 animals, from which 8 experiments per individual were available. Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ .

For evaluation of the QT-RR relationship, a newly inhouse developed computer program (Qtana) was used. Using this program the data were divided into a training set and a test set. With the data from the training set, the regression algorithm calculated the best parameter estimates (a, b, c, d) for each correction function (nonlinear, logarithmic, exponential, Bazett, Fridericia, Sarma, etc., see Tab. 3). Different criteria, such as the Pearson's coefficients (*r*), Akaike's information criterion (AIC) and PRESS RMSE were considered in order to select the best model.

To illustrate the results, the QT or QTc values are plotted against RR and the respective correlations were determined and graphically displayed as the corresponding regression lines as described elsewhere (Meyners & Markert, 2004).

For the determination of the power of the statistical test, it was assumed that four groups were under investigation, each consisting of 3, 4, 5 and 6 animals, respectively. It was considered that all groups consist of the same number of animals. For each parameter, the different base levels of the animals are taken into account by referring the values after administration of the test compound to the pre values (30 minutes before administration). With these values the standardized area under the curve (AUC divided by interval length) is calculated. For each compound, two phases are considered, while the specification of the time intervals is arbitrary for this analysis, as the results are valid in all applicable circumstances. Furthermore, a relevant difference of interest was defined in advance as  $\delta = 10$  or 20 percentage points dependant on the target parameter. Hence, the power was given by

$$\text{Power} = 1 - P(T \leq t_{1-\frac{\alpha}{2}, edf}) + P(T \leq t_{\frac{\alpha}{2}, edf}),$$

where T is t-distributed with edf degrees of freedom (error dfs from the ANOVA) and

non centrality parameter  $\sqrt{n} \frac{\delta}{\sigma}$ .

The statistical evaluation was performed using the software package SAS Version 8.2.

### 3. Results

All animals survived the surgical procedure and recovered quickly following the surgery. We obtained excellent signal quality and found stable hemodynamic parameters with a low intrinsic heart rate in the Göttingen Minipig. After oral dosing (in this case with only vehicle/water) the hemodynamic parameters returned quickly to baseline values indicating that the procedure was well tolerated. Interestingly, feeding was associated with a marked and sustained effect on hemodynamic parameters and body temperature. A summary of hemodynamic values, HR and temperature is given in Tab. 1.

	Mean (day, 1 - 7 h)	±SD	±SEM	Mean (night, 8.3 – 20.3 h)	±SD	±SEM
SAP mmHg	122	15	0.43	123	14	0.29
DAP mmHg	86	10	0.30	88	9	0.18
LVP mmHg	113	15	0.38	110	14	0.24
LVdP/dt mmHg/s	2282	390	9.69	2450	288	5.08
HR bpm	56	7	0.23	71	10	0.18
Temp. ° C	37.0	0.8	0.02	37.5	1.1	0.02

Tab. 1 Summarized values for measured hemodynamic parameters, heart rate and body temperature in the freely moving Göttingen Minipig.

### 3.1 Heart rate (HR)

The course of heart rate values is shown in Fig. 2. The dark period is represented as the shaded area between 8.3 and 20.3 hours. After oral administration values returned to baseline level within 1 hour. The fact that heart rates remained below 100 bpm even during the administration indicates that the animals were well trained and that the procedure was not associated with a high level of stress. During the next 7 hours of daytime, HR averaged 56 bpm (mean of all experiments) but increased at feeding to 122 bpm. The marked effect of feeding on HR was long-lasting and never returned to the daytime level for the rest of the monitoring period (mean of all experiments at night: 71 bpm). Comparison of the light period (1 to 7 hours) and the dark period (8.3 to 20.3 hours) showed a highly significant ( $p < 0.0001$ ) increase of heart rate during the night. A further experiment ( $n=4$ ) was performed without feeding. In this study a mean HR during daytime of 53 bpm was followed by a heart rate of 51 bpm at night (Fig. 3), demonstrating that the effect is dependant upon the postprandial condition and is not merely a diurnal effect.

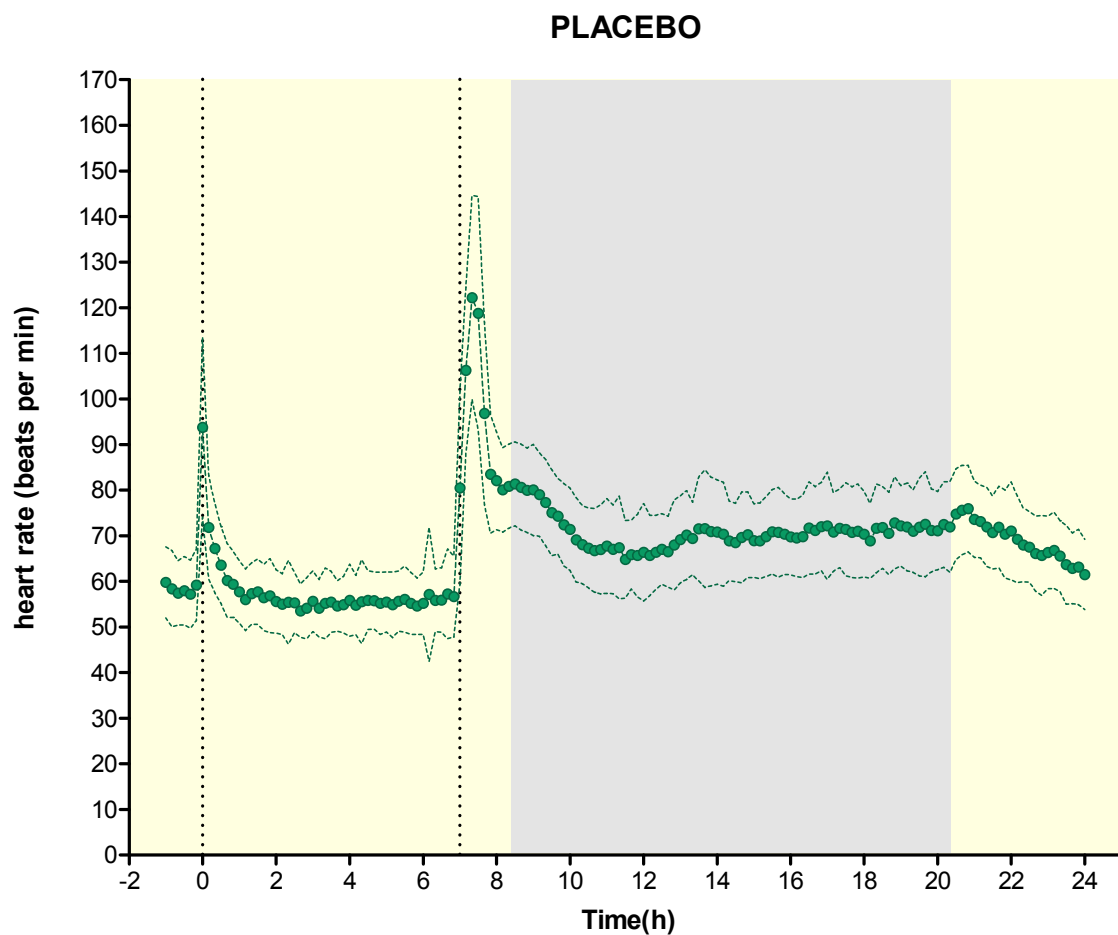


Fig. 2 Heart rate (HR) measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs. Data of all experiments were summarized as mean  $\pm$  SD. The dotted line at 0 hours indicates oral administration of placebo whereas the dotted line at 7 hours indicates feeding. The grey shaded area represents the dark period.

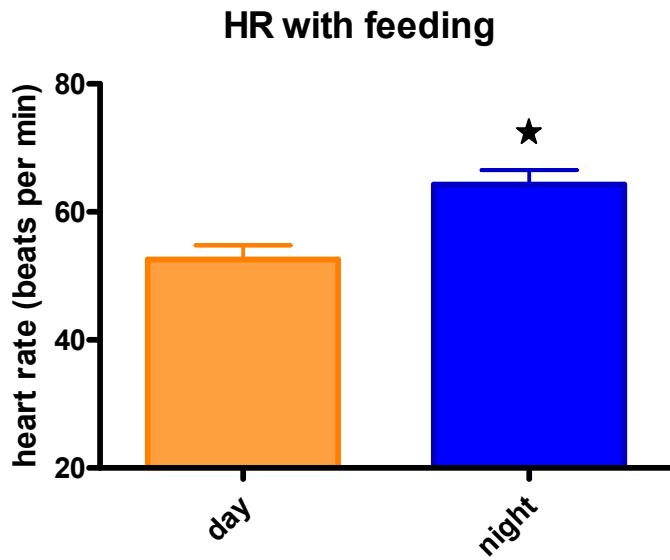


Fig. 3.1 HR in 4 animals at day (mean 53 bpm) compared to night (mean 64 bpm) with feeding 7 hours after treatment;  $p = 0.0120$ .



Fig. 3.2 HR in 4 animals at day (mean 53 bpm) compared to night (mean 51 bpm) without feeding 7 hours after treatment;  $p = 0.2101$ .

### 3.2 Systolic and diastolic arterial blood pressure

Fig. 4 shows the systolic (SAP) and diastolic (DAP) arterial blood pressure over the 24 hours monitoring period. Arterial blood pressure was very stable throughout, with a SAP of  $122 \pm 16$  mmHg and a DAP of  $88 \pm 10$  mmHg. Short-lasting artefacts were associated with the administration procedure and with feeding. No differences in SAP or DAP were seen between day and night phases (SAP,  $p=0.7224$ , DAP  $p=0.3793$ ).

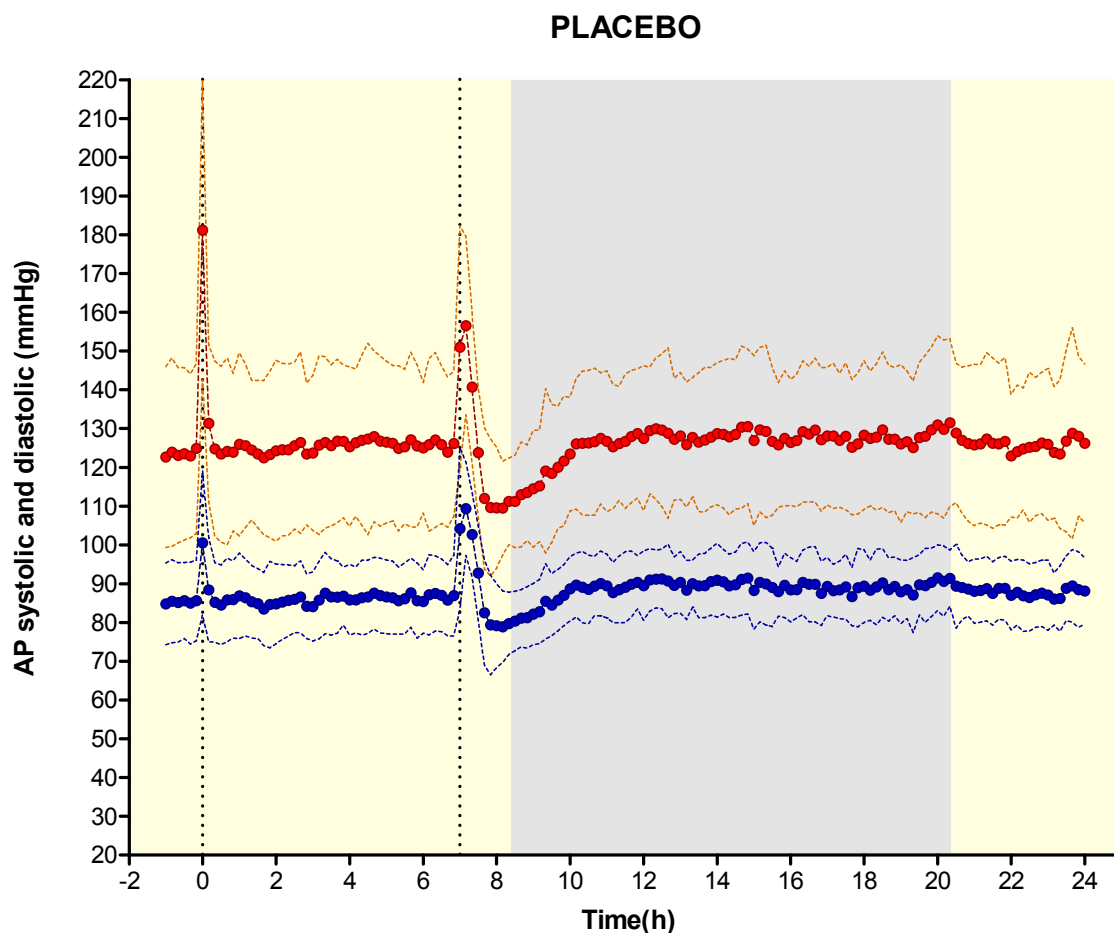


Fig. 4 Systolic and diastolic arterial blood pressures measured over 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs. Data of all experiments were summarized as mean  $\pm$  SD. The dotted line at 0 hours indicates oral administration of placebo whereas the dotted line at 7 hours indicates feeding. The grey shaded area represents the dark period.

### 3.3 Systolic left ventricular pressure (LVP systolic)

The left ventricular pressure is summarized graphically in Fig. 5. Aside from the changes at dosing and feeding, the peak systolic left ventricular pressure remained at  $111 \pm 15$  mmHg throughout the 24 hours. There was no diurnal rhythm with no significant difference ( $p = 0.0822$ ) when the lighted period and the dark period were compared.

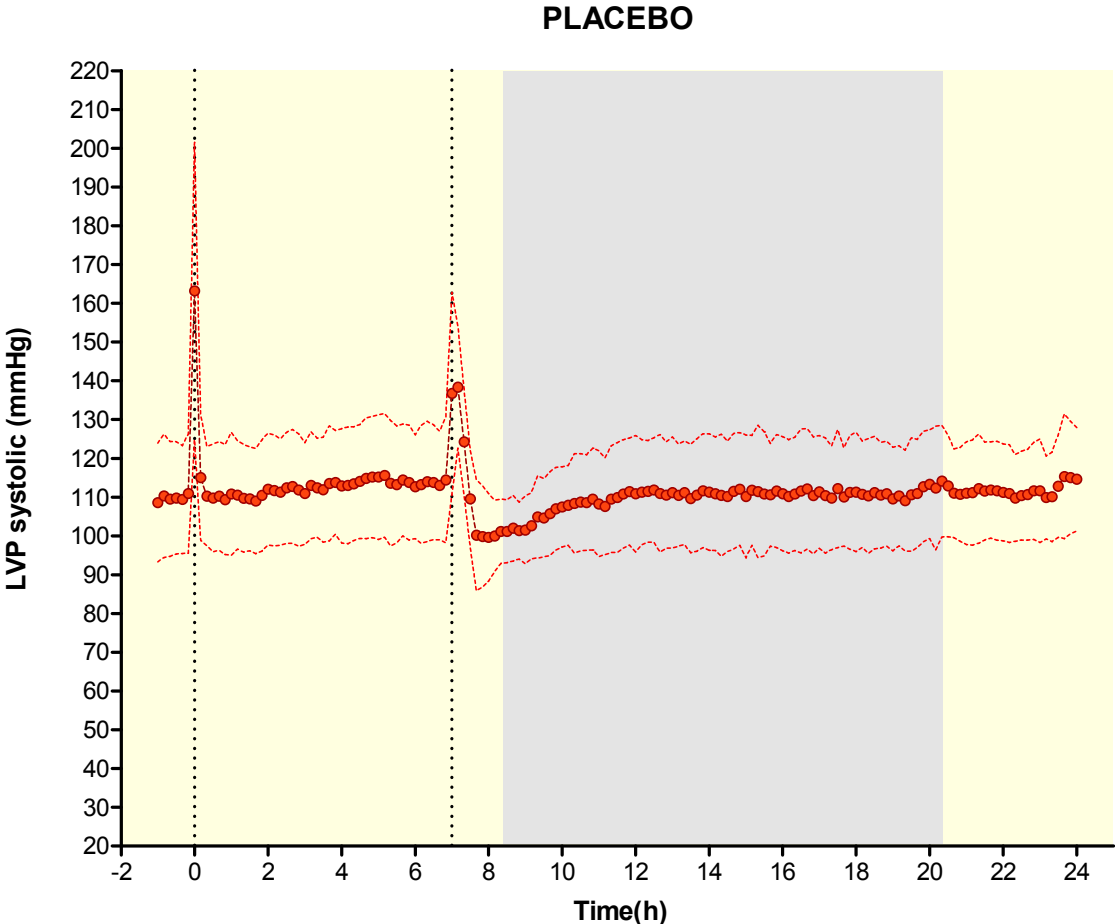


Fig. 5 Peak systolic left ventricular pressure (LVP systolic) measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs. Data of all experiments were summarized as mean  $\pm$  SD. The dotted line at 0 hours indicates oral administration of placebo whereas the dotted line at 7 hours indicates feeding. The grey shaded area represents the dark period.

### 3.4 LVdP/dtmax

LVdP/dtmax was calculated over the monitoring period as a measure of contractility of the left ventricle (Fig. 6). Similar to heart rate, this parameter was significantly ( $p < 0.0001$ ) higher at night. In contrast to heart rate, the effect of feeding on LVdP/dt was not that sustained but returned towards baseline levels 1 hour after feeding. However, the slight elevation of LVdP/dt throughout the night may be attributed to the prolonged increase in heart rate. Without feeding this finding disappeared and LVdP/dt showed a reversed course with lower levels at night than day ( $p = 0.0347$ ).

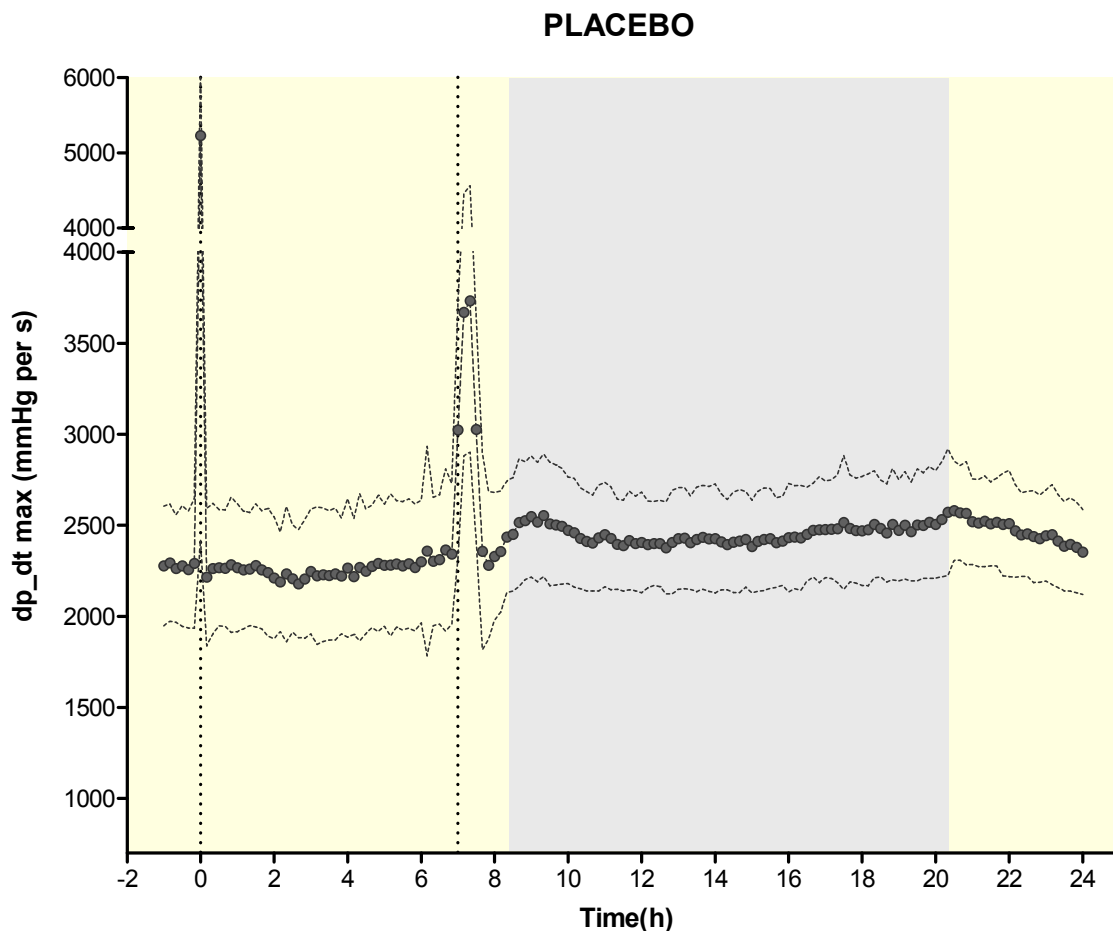


Fig. 6 LVdP/dtmax measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs. Data of all experiments were summarized as mean  $\pm$  SD. The dotted line at 0 hours indicates oral administration of placebo whereas the dotted line at 7 hours indicates feeding. The grey shaded area represents the dark period.



### 3.5 Body temperature

Fig. 7 shows the body temperature measured over 24 hours. During the day, the pigs had an average temperature of 37.0 °C. In parallel to HR, body temperature increased significantly ( $P = 0.0011$ ) at night.

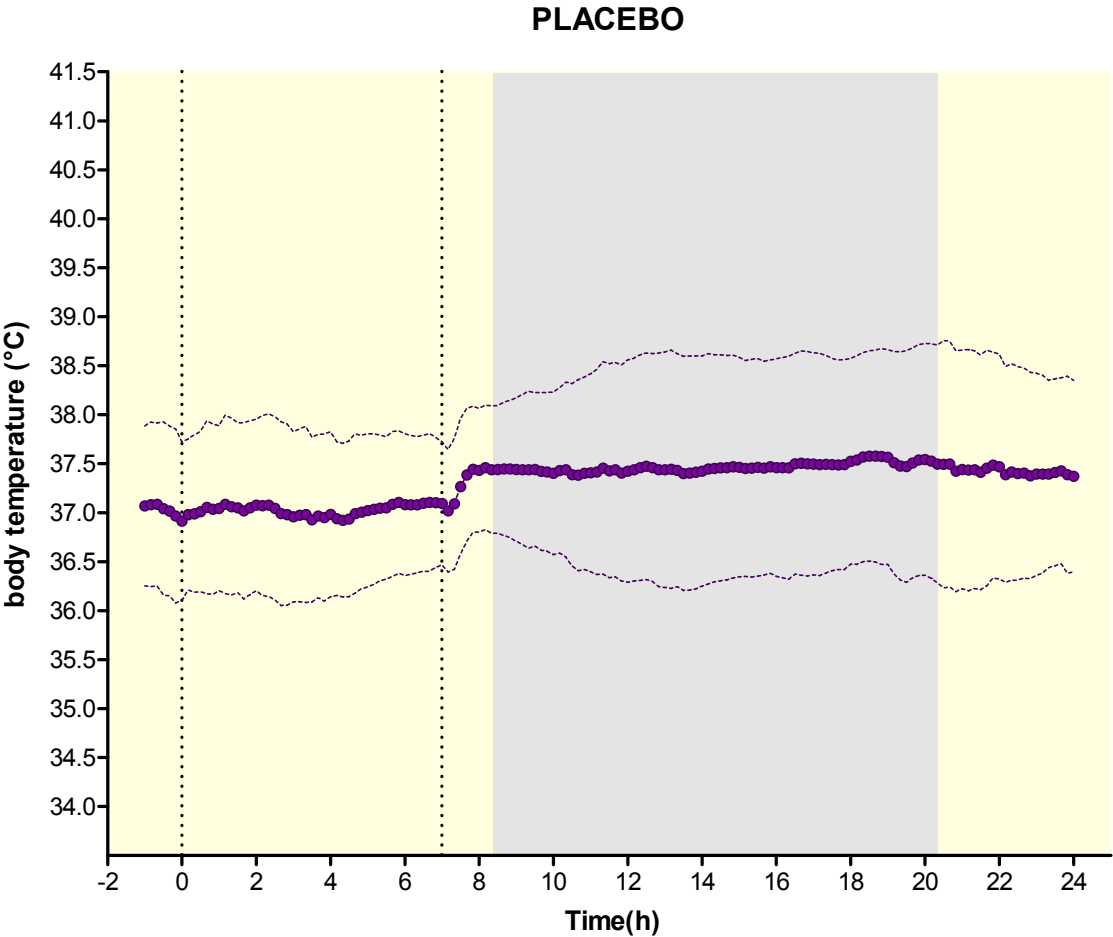


Fig. 7 Body temperature in °C measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs. Data of all experiments were summarized as mean  $\pm$  SD. The dotted line at 0 hours indicates oral administration of placebo whereas the dotted line at 7 hours indicates feeding. The grey shaded area represents the dark period.

### 3.6 ECG Evaluation

The polarity of the T-wave shifted during the monitoring period without obvious reason. Some examples of ECG waveforms from the same animal in the same experiment are shown in Fig. 8.1-4. However, at higher heart rates (for example after dosing or feeding) the T-wave was positive in all animals. In summary 45 % of the T-waves were positive, 42 % negative and 13 % bipolar. The morphology of the P-wave was typical for each individual and never changed obviously during the course of the experiment.

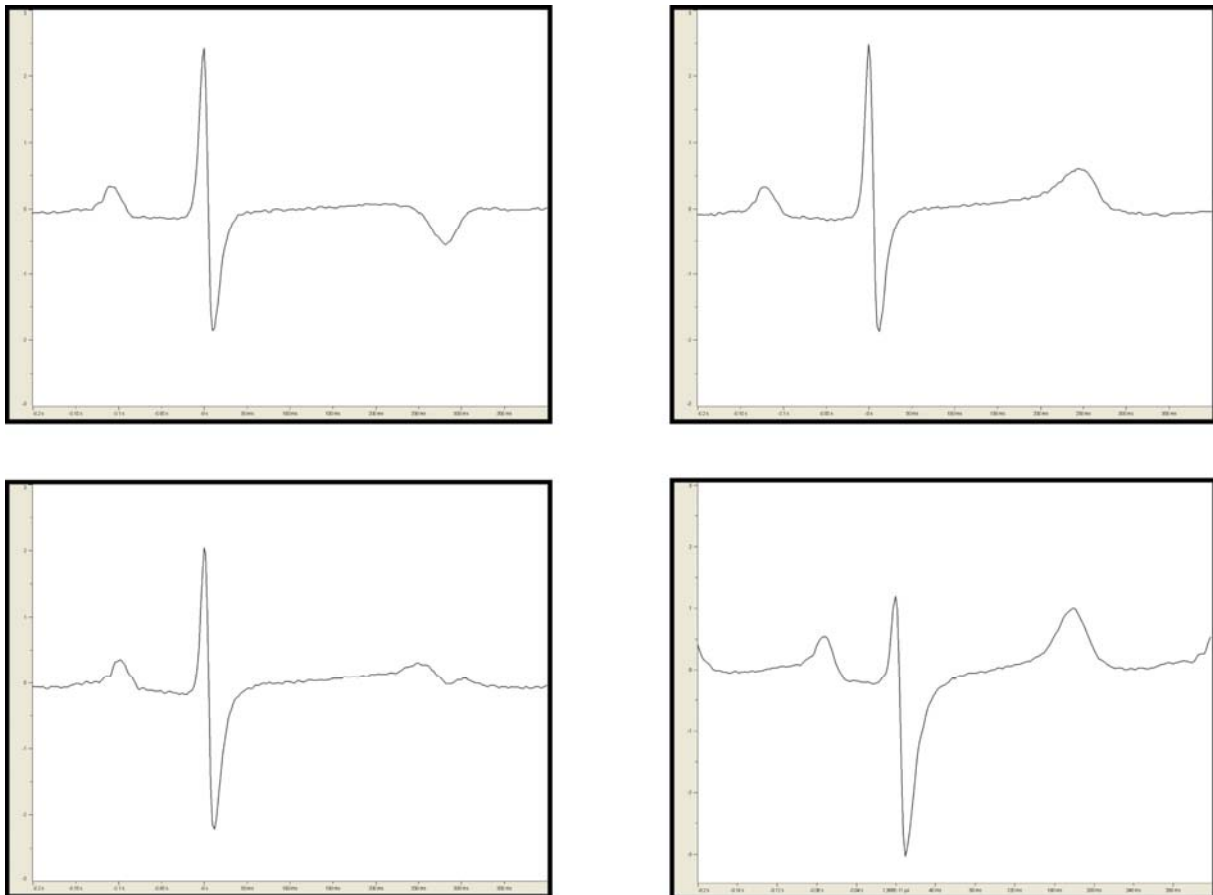


Fig.8 Examples of ECG waveforms in the same animal during the same experiment.

Fig.8.1 T-wave positive.

Fig.8.2 T-wave negative.

Fig.8.3 T-wave  $\pm$ .

Fig.8.4 ECG at high heart rates after dosing or feeding.

### 3.7 ECG values

Values for (manually) measured ECG intervals over the whole course of 24 hours in the freely moving Göttingen Minipig are summarized in Tab. 2.

	Mean (all timepoints)	$\pm$ SD	$\pm$ SEM	Mean (HR $\leq$ 80)	$\pm$ SD	$\pm$ SEM
PR (ms)	125	21	0.30	128	22	0.39
QRS (ms)	56	9	0.13	56	9	0.15
QT (ms)	320	38	0.53	335	26	0.46
RR (ms)	861	272	3.81	995	224	3.87

Tab. 2 Summarized values for (manually) measured ECG intervals during 24 hours in the freely moving Göttingen Minipig.

### 3.8 QT Correction

The heart rate dependency of the QT interval was different for each animal indicating that an individual correction is needed. Fig. 9 shows the uncorrected QT plot against RR and the QT correction with different formulas for the same individual (based on 1040 observations). In this case, a hyperbolic formula fitted best. In Tab. 3 the parameter estimates a, b, c and selection criteria as the Pearson's coefficients (r), Akaike's information criterion (AIC) and PRESS RMSE are listed for tested correction formulas.

Model	a	b	c	r	AIC	RMSE
Bazett QT = a*RR <sup>(1/2)</sup>	341.31			-0.78	2684.00	73.67
Fridericia QT = a*RR <sup>(1/3)</sup>	330.96			-0.10	2320.60	41.15
Sarma Exponential QT = a - b*exp(c*RR)	349.36	356.61	-2.82	0.00	2266.03	37.59
Linear QT = a + b*RR	206.02	123.59		0.02	2267.05	37.71
Hyperbolic QT = a + b/RR	391.56	-63.90		0.00	2264.93	37.58
Parabolic QT = a*RR <sup>b</sup>	329.43	0.31		0.04	2260.10	37.29
Logarithmic QT = a + b*log(RR)	329.41	93.82		-0.03	2269.86	37.88
Shifted logarithmic QT = log(a+b*RR)	4.21	1.28		0.73	1814.80	18.27
Exponential QT = a + b*exp(-RR)	429.82	-271.97		-0.02	2270.48	37.92

Tab. 3 Parameter estimates a, b, c and selection criteria Pearson's correlation coefficient r, Akaike's information criterion (AIC) and PRESS RMSE derived from 1040 observations of an individual QT correction.

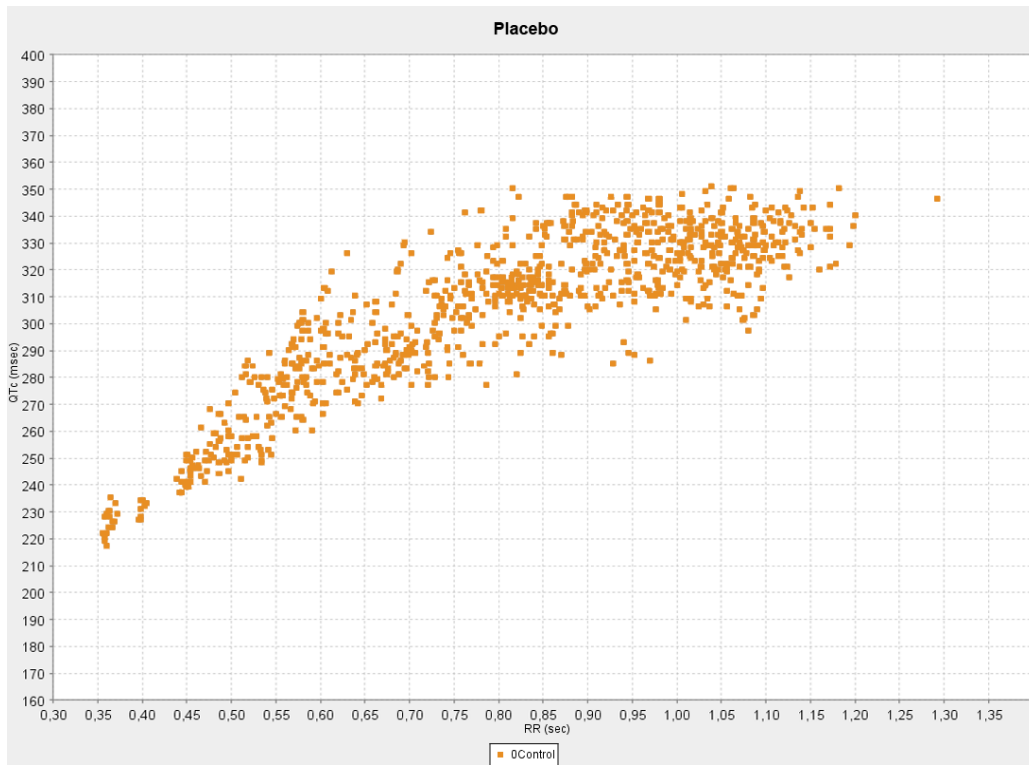


Fig. 9.1 Uncorrected plot.  
 Fig. 9.1-9.3 Comparison of QT correction models.

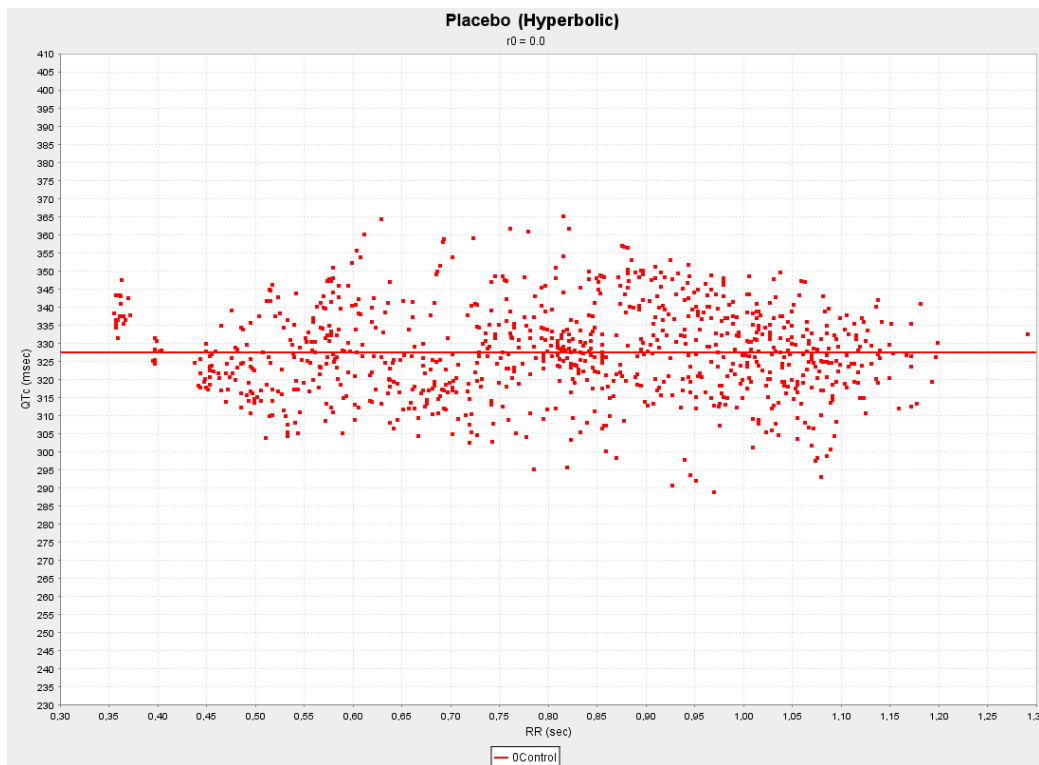


Fig. 9.2 Hyperbolic function.

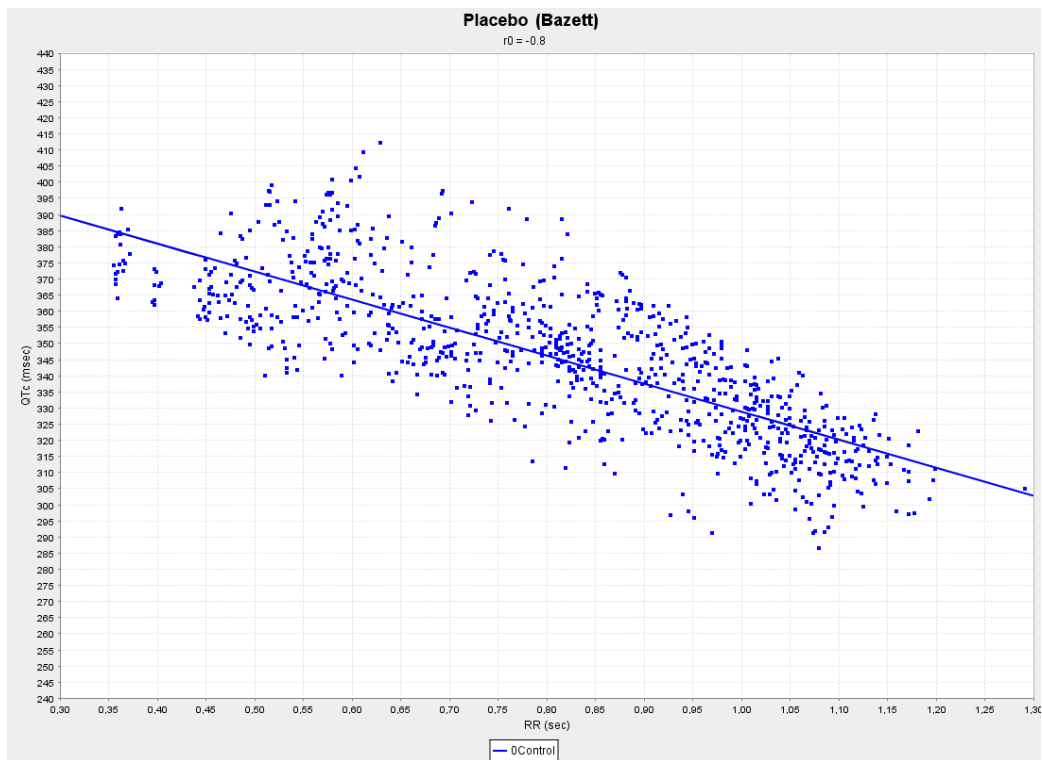


Fig. 9.3 Bazett function.

### 3.9 Power

Tab. 4 shows the summarized power calculation values for the parameters measured. With the exception of QT interval, we found statistically sufficient power in the minipig telemetry to show effects with  $n = 3$ . With  $n = 4$ , however, for all parameters highly statistically sufficient power based on a cross-over experimental design could be shown.

Parameter	Phase	#A	Root MSE	$\delta$ (%)	Power			
					N=3	N=4	N=5	N=6
SAP	1	4	3.271731	10	87.4005	96.9134	99.3026	99.8520
DAP	1	4	2.956288	10	92.8689	98.8384	99.8277	99.9762
LVP max	1	4	2.544483	10	97.7260	99.8362	99.9894	99.9994
LV dP/dt max	1	4	4.976622	20	98.1524	99.8852	99.9936	99.9997
Heart Rate	1	4	4.661808	20	99.0587	99.9638	99.9988	100.0000
RR-interval	1	4	5.059347	20	97.8439	99.8505	99.9907	99.9995
PR-Duration	1	4	2.170338	10	99.6032	99.9917	99.9998	100.0000
QRS-interval	1	4	1.480997	10	99.9999	100.0000	100.0000	100.0000
QT-interval	1	4	3.816120	10	76.2381	90.8170	96.6655	98.8477

Tab. 4 Power calculation for the parameters measured with various  $n$  numbers. The grey field shows that the power for detecting a 10% change in QT interval is too small with a  $n$  of 3 (i.e. < 80 %).

## **4. Discussion**

These are, to our knowledge, the first data documenting the course of systemic arterial and ventricular hemodynamic parameters in the freely moving Göttingen Minipig over 24 hours. As such, they may serve as a basis for future studies in which drug effects are studied in these animals.

### **4.1 Intrinsic heart rate in the Göttingen Minipig**

The high level of training as well as the excellent health status of these animals is evident with the low intrinsic heart rate of 56 bpm during daylight hours. Indeed, the low heart rates were surprising if one compares the currently available hemodynamic data in minipigs obtained with invasive measurements, or data from dogs when used for similar studies. Kano et al. (2005) reported values from 72 - 76 bpm in 17 kg weighing, freely moving miniature pigs (but not Göttingen Minipigs). HR in resting miniature pigs was  $80 \pm 3.5$  bpm in investigations from Kuwahara et al. (1999). Beglinger et al. (1975) report heart rates of  $103 \pm 14$  bpm in sling-restrained Göttingen Minipigs (~20 kg). Thus, we attribute the very low heart rates seen in this study to the low stress levels achieved using the well trained animals in a laboratory environment in which measures have been taken to reduce unnecessary stress factors. Furthermore, a low variability of the measured data was seen throughout the study which we also attribute to both training status and study environment. A low variability in the measured data is extremely important for the detection and quantification of potential drug-induced effects. Lower variability leads to an optimization of the statistical power of an experimental model and the possibility to reduce the number of animals used. The HRs in the present study are quite comparable to data from freely moving well-trained and group-housed Labrador dogs (Klumpp et al., 2006). This indicates that factors other than the species are decisive for the heart rates observed and this likely reflects the level of acclimatization to the laboratory environment, the low-stress experimental procedure and the fact that no restraint was needed.



## **4.2 Diurnal and feeding effects on hemodynamics**

Diurnal rhythms of heart rate in minipigs have been investigated by Kuwahara et al. (2004). They found that heart rate in the light phase was higher than in the dark phase when the animals were housed individually, but minipigs housed in pairs had no diurnal variation. Another group (Kano et al., 2005) reported no marked changes in heart rate between light and dark periods. The present data differ from both of these findings: we saw a significant increase in HR at night when the animals were fed shortly before the start of the dark phase. Intuitively, one would expect HR to decrease at night with an increase in parasympathetic activity. Examination of videos taken at night indicate that the minipigs were indeed sleeping most of the time at night (main sleeping period 11 p.m. to 5 a.m.), with only short periods of wandering but with no signs of excitement. When the study design was altered to eliminate feeding at 7 hours, the HR at night was 51 bpm being comparable to the daylight value. These findings indicate a dependency of the dark phase increase in HR on feeding. The pig is known to digest slowly, taking about 53 - 58 hours to empty the digestive tract after a meal, dependant on the kind of diet (Fernandez-Gil et al., 1995). A study by Lückmann (1968) investigated HR in domestic swine and reported an increase in heart rate of 8 – 10 % after feeding. The postprandial increase in HR can be larger with voluminous diet (Leucht, Gregor, & Stier, 1982). This phenomenon may be due to autonomic nervous fibres located in the wall of the digestive tract that react to the filling status of the gastrointestinal tract. Nevertheless, it is clear that the effect of feeding on HR can extend beyond 3 hours and that this must be taken into account when designing studies in Göttingen Minipigs.

## **4.3 Impact of model on hemodynamic parameters**

Since blood pressure varies with age and body weight (Beglinger et al., 1975; Gauvin et al. 2005a) and various blood pressure measurement techniques (direct - indirect, awake - anesthetized) are available, comparisons should be done with caution. Furthermore, the present data are first data coming from freely moving minipigs. Values returned to pre-dose values very quickly (in about 20 minutes) after dosing

indicating that our minipigs were well accustomed to the study conditions. This is in sharp contrast to the effects observed upon feeding which lasted 3 - 4 hours.

Systolic and diastolic arterial blood pressure was remarkably stable throughout the protocol without a diurnal effect with or without feeding. Values for arterial blood pressure from minipigs range from  $135 \pm 12$  to  $160 \pm 11$  for SAP and  $88 \pm 4$  to  $96 \pm 14$  for DAP (Beglinger et al., 1975; Cimini & Zambraski, 1985; Glodek & Oldigs, 1981; Leucht, Gregor, & Stier, 1982). None of the previous studies used normal, freely moving minipigs. Thus, the slightly higher pressures reported previously may be attributable to the restraint used when taking the measurements.

Left ventricular pressure values in normal, freely moving Göttingen Minipigs are presented in this publication for the first time. Glodek & Oldigs (1981) reported LVP measurements with pressure-tip catheters in awake, but sling-restrained animals and reported a value of  $142 \pm 14$  mmHg. In anesthetized miniature pigs, a LVP of  $58 \pm 2$  mmHg was reported in juvenile Yucatan Miniature swine (Smith, Spinale, & Swindle, 1990) whereas  $158.5 \pm 36.5$  mmHg was observed in adult Göttingen Minipigs (Benharkate et al., 1993). This substantial difference is likely explained by the markedly different models used. The mean value measured in our 7 minipigs over 24 hours was  $111 \pm 15$  mmHg, a value that remained extremely stable apart from dosing and feeding.

#### **4.4 Diurnal effects on body temperature**

The body temperature of the minipigs also demonstrated differences between daytime and nighttime. During daytime (before feeding) body temperature was  $37.0$  °C in our 7 minipigs, whereas during nighttime it increased to  $37.5$  °C. The body temperature range given in literature for normal miniature pigs ranges from  $37 - 38$  °C (Bollen et al., 2000b),  $37.7 \pm 0.2$  °C (Georgiev, Schoen, & Merckenschlager, 1972) to  $38.2 - 39.9$  °C (Zambraski & Fuchs, 1980). It should be mentioned that the temperatures measured using the full implant telemetry system are not actually core temperatures, since the temperature module is in the transmitter of the ITS "T27-F" device located in the abdominal muscle layers of the left flank. The increased heart rate during the night phase may have contributed to the increase in body temperature. But temperature was also increased in the experiment without feeding

in which heart rate was not affected, indicating that another factors than the elevated heart rate were responsible. One possibility is that the prolonged periods of lateral recumbency during sleeping may have led to an artifactual effect on temperature, since there was a warming lamp from above and the floor was heated.

#### **4.5 Value of myocardial contractility assessment**

The first derivative of LVP over time, LVdP/dt, is a well recognized index of myocardial contractility (Ross, Covell, & Sonnenblick, 1967). Many drugs influence myocardial contractility, hence this parameter gives important information in the evaluation of drug candidates and should therefore be included in testing for cardiovascular side effects. Changes in the inotropic state of the heart can also have effects on systemic arterial blood pressure and cardiac output. There is a clear dependency of LVdP/dtmax on HR and we have previously described this phenomenon in Labrador dogs, Rhesus monkeys, Cynomolgus monkeys and minipigs (Markert et al., 2007). We saw a difference in LVdP/dtmax between the light and the dark period which might be related to the observed increase in HR. Values for LVdP/dtmax similar to that observed in the present study were observed in anesthetized Göttingen Minipigs ( $2492 \pm 350$  mmHg/s; Benharkate et al., 1993). However, sling-restrained Göttingen Minipigs had higher levels of LVdP/dtmax presumably due to the higher heart rates and possible stress associated with the restraint ( $3821 \pm 787$  mmHg/s; Glodek & Oldigs, 1981).

#### **4.6 ECG evaluation**

Reported ECG investigations in the Göttingen Minipig were done without exception in relatively young (< 198 days) and sling-restrained animals (Beglinger et al., 1975; Eckenfels & Schuler, 1988; Glodek & Oldigs, 1981; Hohns, 1970; Nahas, Baneux, & Detweiler, 2002; Jones, Stuart, & Greufe, 1999). Therefore, all the reported values here are in much lower ranges than our ECG results (PR  $83 \pm 8$  ms, QT  $252 \pm 30$  ms to  $290 \pm 22$  ms, QRS  $36 \pm 4$  ms to  $58 \pm 5$  ms). The spontaneous changing of the polarity of the T-wave as we saw it, was also apparent in other experiments in

Göttingen Minipigs (Eckenfels & Schuler, 1988; Nahas, Baneux, & Detweiler, 2002). The reasons for these spontaneous changes are unclear. We could not, however, see a direct dependency between body position and the T-wave polarity. The T-wave was always positive during periods of excitement in the animals (see Fig. 8.4). The end of T-wave was easy to detect in both positive and negative morphologies (Fig. 8.1+2). In contrast, the end of the bipolar T-waves often was difficult to define (Fig. 8.3) and may cause problems for algorithms used for computerized ECG evaluation. The development of new algorithms to cope with this issue is promising.

QT is known to be strongly correlated to the RR interval. Various algorithms have been suggested to describe the relationship between QT and the RR interval or heart rate (Batey & Doe, 2002; Chiang, Holdsworth, & Leishman, 2006; Davey, 2002; Holzgrefe et al., 2007; Matsunaga et al., 1997; Miyazaki & Tagawa, 2002; Spence et al., 1998; Meyners & Markert, 2004). Based on the present data, we conclude that no correction model is applicable to all individuals, suggesting the use of an individual correction of the QT interval for heart rate changes.

## **5. Conclusion**

For the first time the present study provides values for aortic blood pressure, left ventricular pressure, LVdP/dt, heart rate, body temperature and ECG in the normal, freely moving Göttingen Minipig using a fully implantable telemetric device. We saw extremely stable patterns of all hemodynamic parameters and a good signal quality. In conclusion, the trained Göttingen Minipig appears to be well suited for cardiovascular safety pharmacology studies. Because of the described effect of feeding, we recommend to not feed the animal in studies in which T<sub>max</sub> of a given compound might occur very late (i.e. after the feeding).

## **3.2**

### **The value added by measuring myocardial contractility 'in vivo' in safety pharmacological profiling of drug candidates**

Publication in Journal of Pharmacological and Toxicological Methods  
(2007) 56(2), 203-211

Michael Markert

Anja Klumpp

Karin Mayer

Thomas Trautmann

Miriam Stubhan

Brian Guth

# THE VALUE ADDED BY MEASURING MYOCARDIAL CONTRACTILITY ‘IN VIVO’ IN SAFETY PHARMACOLOGICAL PROFILING OF DRUG CANDIDATES

Michael Markert\*, Anja Klumpp, Thomas Trautmann, Karin Mayer, Miriam  
Stubhan<sup>§</sup>, Brian Guth

*Department of Drug Discovery Support, General Pharmacology Group, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG,  
Germany*

*<sup>§</sup> Department of Non Clinical Drug Safety, Biological Lab Service Group, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG,  
Germany*

## Abstract

**Introduction:** The objective of this study was to define the normal LVdP/dt (an index of myocardial contractility)-heart rate relationship in telemetered conscious dogs, primates and minipigs in our laboratory and to use these data as the basis of an additional parameter useful in drug safety evaluation.

**Methods:** Trained dogs, Rhesus monkeys, Cynomolgus monkeys and minipigs (Goettingen) were equipped with radiotelemetry transmitters (ITS). Aortic pressure (AP), left ventricular pressure (LVP), ECG lead II and body temperature could be continuously monitored. The contractility index LVdP/dt<sub>max</sub> was derived from the LVP-signal. NOTOCORD hem 4.1 software was used for data acquisition. For each species a LVdP/dt-heart rate relationship was evaluated using spontaneous HRs throughout the observation period. A validation compound with positive inotropic effects (pimobendan) was then used to investigate the impact of this compound on the LVdP/dt-heart rate relationship.

**Results:** There was a clear LVdP/dt-HR relationship in the animals tested. The inotropic agent pimobendan demonstrated the expected shift in this relationship.

**Discussion:** Contractility of the myocardium is regulated by autonomic input activating primarily myocardial  $\beta_1$ -adrenoceptors, but it is also affected by the “force-frequency” relationship. Compounds can therefore either directly or indirectly affect the contractility of the heart. The chronotropic effects are routinely measured in preclinical studies; however, the inotropic effects are not routinely analyzed in cardiovascular safety studies. Our experience strongly recommends including this

evaluation for drug candidate selection. The evaluation of  $LVdP/dt_{max}$ , as an index of myocardial contractile state must, however, take into account its HR-dependency.

## 1. Introduction

Testing for cardiovascular side effects is an essential part of preclinical drug safety evaluation and a preferred model is the conscious, telemetered animal. The results of an interim survey of international pharmaceutical companies done by Friedrichs et al. (Friedrichs, Patmore, & Bass, 2005) showed that in vivo studies in anesthetized or conscious animals to determine the possible pro-arrhythmic potential of novel pharmaceuticals in humans are the most widely used cardiovascular tests. The preferred model as cited in the ICH S7 guideline (Pugsley & Curtis, 2006) uses the conscious animal and there are many publications of cardiovascular telemetry studies using conscious dogs (Chiang, Holdsworth, & Leishman, 2006; Ollerstam et al., 2005; Soloviev et al., 2006; Thomsen et al., 2004; Toyoshima et al., 2005). During such studies arterial blood pressure, heart rate (HR) and ECG are typically measured. However there are also systems available, in which left ventricular (LV) pressure can be measured from which the parameter  $LVdP/dt$  may be derived as an index of myocardial contractility (Klumpp, Trautmann, Markert, & Guth, 2006; Markert, Klumpp, Trautmann, & Guth, 2004). Drug-induced effects on the inotropic state of the heart are not uncommon; therefore, this parameter should be of great interest in drug development.

The force-frequency relationship is a fundamental property of the myocardium first appreciated by Bowditch in his 1871 description of the “Treppe” (meaning staircase) phenomenon (Bowditch, 1871; Woodworth, 1902). This force-frequency relation has been demonstrated in isolated myocardium (Blinks & Koch-Weser, 1961; Buckley, Penefsky, & Litwak, 1972; Koch-Weser & Blinks, 1963; Koch-Weser, 1965), in the isolated mammalian heart (Covell, Mahler, O’Rourke, & Ross, 1973; Rosenblueth, Alanis, Rubio, & Lopez, 1959) as well as in anesthetized animals (Covell, Ross, Taylor, Sonnenblick, & Braunwald, 1967; Mitchell, Wallace, & Skinner, 1963; Suga, Sagawa, & Shoukas, 1973) and in human subjects (Segel, Hudson, Harris, & Bishop, 1964; Sonnenblick, Braunwald, Williams, & Glick, 1965). Still, the underlying mechanism of the force frequency effect on the inotropic state is still not fully

understood, however there is evidence that this phenomenon is related to changes in  $\text{Ca}^{++}$  availability within the myocardial cell. It has been shown by measuring intracellular free  $\text{Ca}^{++}$  that there is a positive correlation between contraction frequency, force development and the magnitude of the intracellular calcium transient (Morgan & Blinks, 1982). However, there are species that have a negative force-frequency relationship (Endoh, 2004).

An increase in heart rate enhances cardiac output when the venous blood return is increased (e.g. as during exercise). The dependence of cardiac muscle contraction and relaxation on stimulation frequency plays an important role in modulating heart function. This rate dependent, enhanced contractility helps to offset the decreased ventricular filling time at higher heart rates by shortening the length of systole, thereby increasing the proportion of time the cardiac cycle is in systole. There is evidence supporting the existence of a force-frequency relationship in paced or open chest animals (Mahler, Yoran, & Ross, 1974). However, less data are available on the HR-LVdP/dtmax relationship in conscious, non-paced animals, especially in minipigs and primates. In particular, in minipigs there is, to the best of our knowledge, no data available for the normal force-frequency (i.e. LVdP/dt-HR) relationship in conscious, freely moving telemetered animals.

We have generated baseline data describing the normal LVdP/dtmax-HR relationship in conscious animals and the effect of a known inotropic agent on this relationship. Thus, the objective of this study was to investigate the normal force-frequency relationship in telemetered conscious dogs, primates and minipigs in our laboratory and to use these data as the basis of an additional parameter for drug safety evaluation.

## **2. Methods**

### **2.1 Telemetry System**

The telemetry system used to measure cardiovascular parameters is manufactured by Konigsberg Instruments, Inc. (Pasadena, CA) and marketed by RMISS (Delaware). It consists of 5 major components: a) an implantable unit; b) a receiver (antenna) located in the animals cage together with an amplifier; c) ambient pressure monitor to measure atmospheric pressure; d) a PC-based "base station" to receive



and process the amplified signals; e) a PC-based data acquisition system (NOTOCORD hem 4.1) to process signals.

The implantable unit (“T27” total implant) consists of (1) two high fidelity pressure transducers (4.0 mm diameter), (2) ECG cable, (3) micro-power battery-operated electronics that process and digitize the information from the pressure transducers and the ECG lead, (4) a radio-frequency transmitter that sends the signals to the telemetry receiver, and (5) a battery. A small cable projecting from the transmitter contains a magnetic switch that allows the device to be turned on and off.

## **2.2 Animals**

Treatment of the animals followed the German Law on the Protection of Animals and was performed with permission from the State Animal Welfare Committee.

### **2.2.1 Dogs**

Trained Labrador dogs (male or female), at least 1.5 years of age, with body weights between 22 to 30 kg bred at Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach were used. The dogs were group-housed as pairs in separate cages and had access to water ad libitum and were fed a standard dog diet once daily. They also had daily exercise periods of at least one hour, each afternoon. To monitor the health of the animals, we collected blood samples every 3 months to determine the blood count and clinical parameters, including electrolytes and kidney parameters.

The dogs were trained in the telemetry lab beginning 3 months before surgery, which was performed when the dogs were at least 1.5 years old. Room temperature and humidity were controlled ( $22 \pm 2$  °C;  $60 \pm 15$  % humidity) with a ventilation turnover of 13/hr (11/h is the required). We maintained a 12 h light (365 lx) and dark (3 lx, “moonlight”) cycle. Background “noise” was supplied during the lighted period in the form of a radio. In order to achieve higher physiological heart rates the dog were trained to run on a treadmill, since our dogs have particularly low heart rates during a normal study period (Klumpp et al., 2006).

### **2.2.2 Primates**

The Cynomolgus monkeys were housed as a group of 8 animals (4 males and 4 females) in 8 stainless steel cages with free access to an outside “open-air” enclosure and were fed a standard primate diet with additional fruits. During the study the animals are pair-housed in 2 adjacent cages per pair or single housed depending on the study design.

The Rhesus monkeys were housed as a group of 4 animals (2 males and 2 females) in 4 stainless steel cages with free access to an outside “open-air” enclosure and were fed a standard primate diet with additional fruits. During the study the animals are pair-housed in 2 cages per pair or single housed depending on the study design. To monitor the health of the animals, we collected blood samples every 3 months to determine the blood count and clinical parameters, including electrolytes and kidney parameters.

### **2.2.3 Minipigs**

Trained Göttinger Minipigs (male or female), at least 1 year of age, with body weights between 22 to 30 kg bred at Ellegaard, Denmark were used. The minipigs were group-housed as pairs in separate cages and had access to water ad libitum and were fed a standard minipig diet once daily. To monitor the health of the animals, we collected blood samples every 3 months to determine the blood count and clinical parameters, including electrolytes and kidney parameters.

The minipigs were trained in the telemetry lab beginning 2 months before surgery, which was performed when the minipigs were at least 1.5 years old. Room temperature and humidity was controlled ( $22 \pm 2$  °C;  $60 \pm 15$  % humidity) with a ventilation turnover of 13/h (11/h is the required). We maintained a 12 h light (365 lx) and dark (3 lx, “moonlight”) cycle. Background “noise” was supplied during the lighted period in the form of a radio.

## **2.3 One-time surgical implantation**

### **2.3.1 Dogs**

The transducers of the T27 implant were calibrated and the unit was sterilized using a low pressure ethylene oxide process prior to implantation.

Animals were anesthetized with a combination of Rompun (xylazine hydrochloride, 1 ml/10 kg, i.v.) and Ketavet (ketamine hydrochloride, 0.7 ml/10 kg, i.v.) after premedication with atropine (0.04 mg/kg i.m.) and ventilated with 66% O<sub>2</sub> and 1% - 1.5% isoflurane at a ventilation rate of 14/min. Analgesia was maintained by intravenous fentanyl (0.01 to 0.05 mg/kg/h). Dogs were also administered Metacam<sup>®</sup> (meloxicam) pre-surgery. All procedures were performed under aseptic conditions using sterilized equipment.

The dogs were placed in a lateral recumbency with the left side facing the surgeon. An incision was made between the fifth and sixth intercostal space. A small pocket was opened in the abdominal wall for implantation of the transmitter, battery housing, and induction switch coil. The cables with both pressure transducers and ECG leads extending from the ventrally implanted transmitter were guided subcutaneously to the lateral incision. The antenna was guided subcutaneously from the transmitter location towards the spine and then runs parallel to the spine for ~25 cm. The initial ventral incisions required for battery and transmitter placement were closed. A left thoracotomy was performed between the fifth and sixth intercostal space to expose the left ventricle apex for insertion of the left ventricular Konigsberg transducer.

The aorta pressure transducer was implanted next. The aortic transducer, which also served as one electrode of the ECG, was inserted into the thoracic aorta just below the aortic arch. The transducer was sutured into place and blood flow was restored.

The lung was then inflated and the intercostal muscles were sutured closed and the pneumothorax evacuated. Chest incisions were closed.

The anesthetic was then turned off and dogs were allowed to wake up. Antibiotics (Duphamox<sup>®</sup> LA, amoxicillin-trihydrate) were administered for 10 days following the procedure to support a good recovery and to ensure that the dogs had no postoperative pain, a transdermal plaster (fentanyl, 25µg/h) was placed on the skin for 4 days. Dogs were allowed to recover for at least 21 days before experiments using test substances were initiated.

### **2.3.2 Minipigs**

Animals were anesthetized with Ketavet and Dormicum (ketamine hydrochloride, 0.2 ml/kg, i.m., midazolam 0.07 ml/kg i.m.). Propofol (Propofol Lipuro, 1%) was administered i.v. until the minipigs showed the clinical signs for sufficient anesthesia and the animals were then intubated and maintained under inhaled isoflurane (1–3%) anesthesia with mechanical ventilation (66% O<sub>2</sub>) at a ventilation rate of 14/min. Analgesia was maintained by intravenous fentanyl (0.01 to 0.05 mg/kg/h). Minipigs were also administered Metacam<sup>®</sup> (meloxicam) pre-surgery. All procedures were performed under aseptic conditions using sterilized equipment as described for the dogs.

### **2.3.3 Monkeys**

Monkeys were instrumented with a radiotelemetry device (Konigsberg implant (Model T27F-4), Integrated Telemetry Services, Pinckney, Michigan). All procedures were conducted according to standard aseptic surgical techniques. Ketamine (10–30 mg/kg, i.m.) was administered initially to sedate the monkeys. Propofol (Propofol Lipuro, 1%) was administered i.v. until the primates showed the clinical signs for sufficient anesthesia and the animals were then intubated and maintained under inhaled isoflurane (1–3%) anesthesia with mechanical ventilation (66% O<sub>2</sub>). Analgesia was maintained by intravenous fentanyl (0.01 to 0.05 mg/kg/h). Monkeys were also administered Metacam<sup>®</sup> (meloxicam) pre-surgery. The battery module was placed intraperitoneally and the electronics were placed in an intermuscular abdominal subcutaneous pocket on the left side. The associated wires (2 pressure transducer and 1 ECG lead) were tunneled subcutaneously to the incision made on the left thorax. A left thoracotomy was performed between the fifth and sixth intercostal space to expose the left ventricle apex for insertion of the left ventricular Konigsberg transducer. The aortic transducer, which also served as one electrode of the ECG, was inserted into the thoracic aorta just below the aortic arch. The transducer was sutured into place and blood flow was restored. In general, the ECG lead was implanted in a base apex configuration. The ECG electrode was secured to the region on the 7th rib close to sternum, and this position was then optimized based on the T wave morphology (as evident by the ECG waveform during surgery). The lung was then inflated and the intercostal muscles were sutured closed and the pneumothorax evacuated. Chest incisions were closed. Monkeys were administered

Temgesic<sup>®</sup> (buprenorphine 0.01 to 0.05 mg/kg) for 2 to 3 days (8 h intervals) post surgery, or longer if required. Monkeys were closely monitored daily for a minimum of 10 days. Monkeys were allowed to recover for at least one month post surgery before experiments using test substances were initiated.

## **2.4 Data acquisition and analysis**

Digitized telemetry signals were processed by NOTOCORD software (hem 4.1) on a beat-to-beat basis. The following parameters were continuously recorded for the duration of the experiment: aortic pressure (AP), left ventricular pressure (LVP), ECG lead II and body temperature. The hemodynamic and ECG parameters were calculated during the experiment and include: systolic, diastolic and mean aortic pressure, peak systolic and end-diastolic left ventricular pressure, LVdP/dtmax and dP/dtmin, heart rate; PQ-, QRS- and QT intervals. QTc-values were calculated by the equation published by Meyners and Markert (Meyners & Markert, 2004). NOTOCORD software was used for acquisition of data whereas EXCEL was used for some basic data analyses. Data were summarized at predefined time points by calculating median values  $\pm$  SD. At each time point, a minimum of 400 sequential beats were used to calculate the median value.

The summarized data are given as mean values  $\pm$  SEM. The different base-line levels of the individual animals were taken into account by referring the measured values after administration of the test compound to the pre-treatment values. With these values the standardized area under the curve (AUC divided by interval length) was calculated for the time intervals of interest. Comparisons between treatment and placebo were performed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student t-test. Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ . Using the error term of the analysis of variance as an estimate for the variability many-to-one t-tests comparing the dose groups of the test compound with the control group were added (Table 1). The evaluation was performed using the software package SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

For the equivalence study a different statistic was used:

For all parameters the different base levels of the animals were taken into account by referring the values after administration of the test compound to the pre values (30 minutes before administration).

With these values the standardized area under the curve (AUC divided by interval length) was calculated. According to the maximum in the observed plasma levels, two phases were considered, while the specification of the time intervals was as follows:

- 1 hour to 12 hours after administration of the treatment.

In case individual values of an animal were not measured until 12h after administration, the corresponding AUC value was adjusted to the measured interval length.

For all parameters as descriptive parameters the number of non-missing observations, the mean and the standard deviation (for  $n > 2$ ) per group were determined.

An analysis of variance for repeated measurements was considered with the factor device and the repeated factor animal. Using the error variance  $\sigma$  of the analysis of variance as an estimate for the variability, a many-to-one t-test comparing the two devices followed.

The significance level  $\alpha$  for the comparisons was set to 0.05. Due to the safety character of the experiment, no adjustment for multiple testing was used. All significant p values ( $\leq 0.05$ ) are marked bold in the result tables, indicative p values ( $0.05 < p \leq 0.1$ ) are set in italics.

To determine the p values for a test for equivalence, a relevant difference d of interest had to be defined for each parameter. Relevant differences were agreed in advance by the investigator to be as 20% for the LVdP/dtmax.

Confidence limits that exceed these values are marked bold in the result tables.

The data were directly imported from Oracle data base of the investigator. The statistical evaluation was performed using the software package SAS Version 8.2.

## 2.5 Compounds

Pimobendan capsules and chewable tablets were given orally in a modified Latin square cross-over design on different study days as described elsewhere (Guth, Germeyer, Kolb, & Markert, 2004; Markert et al., 2004). An initial equilibrium period of 120 min allowed the dogs to acclimate to their measurement pens and then they received the capsules or chewable tablets and were fed 1h after application. Then the dogs were left undisturbed for the duration of the study, which lasted 12 hrs.

## 3. Results

There was a clear LVdP/dtmax-HR relationship (Fig 1-4) with an almost linear relationship in dogs and minipigs but a more exponential relationship in the primates, with greater increases in LVdP/dtmax at the higher heart rates (Fig. 3 and 4).

For defining the normal force-frequency relationship in the dogs 144 experiments were used. The normal LVdP/dtmax-HR is shown in Fig. 1 and Table 1 and ranged in our Labrador dogs from  $1953 \pm 233$  mmHg/s to  $5100 \pm 543$  mmHg/s at heart rates of 40 to 180 bpm respectively. Peak systolic and diastolic pressure remained nearly constant at the average control value of  $120 \pm 8$  mmHg and  $80 \pm 5$  mmHg, respectively. For the normal force-frequency relationship in the minipigs 36 experiments were used. The normal LVdP/dtmax-HR is shown in Fig. 2 and Table 1 and ranged from  $1991 \pm 22$  mmHg/s to  $3350 \pm 94$  mmHg/s at heart rates of 55 to 120 bpm respectively. Peak systolic and diastolic pressure remained nearly constant at the average control value of  $124 \pm 10$  mmHg and  $81 \pm 9$  mmHg, respectively. For the primates 40 experiments were used. The normal LVdP/dtmax-HR is shown in Fig. 3 and 4 and Table 1 and ranged in our Rhesus from  $2326 \pm 86$  mmHg/s to  $3910 \pm 201$  mmHg/s at heart rates of 65 to 165 bpm respectively and in our Cyno's from  $1510 \pm 107$  mmHg/s to  $5500 \pm 473$  mmHg/s at heart rates of 65 to 190 bpm respectively. Peak systolic and diastolic pressure remained nearly constant at the average control value of  $115 \pm 11$  mmHg and  $80 \pm 9$  mmHg respectively.

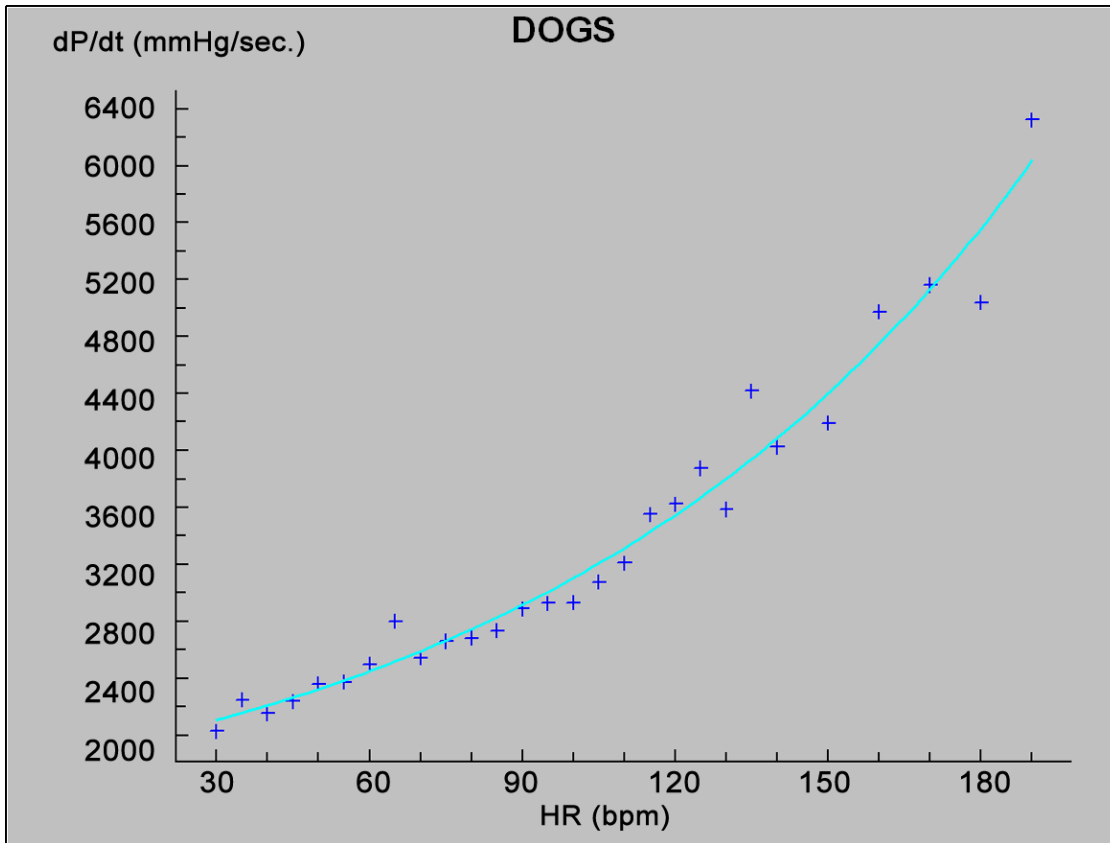


Fig. 1 The dog LVdP/dtmax-HR relationship.

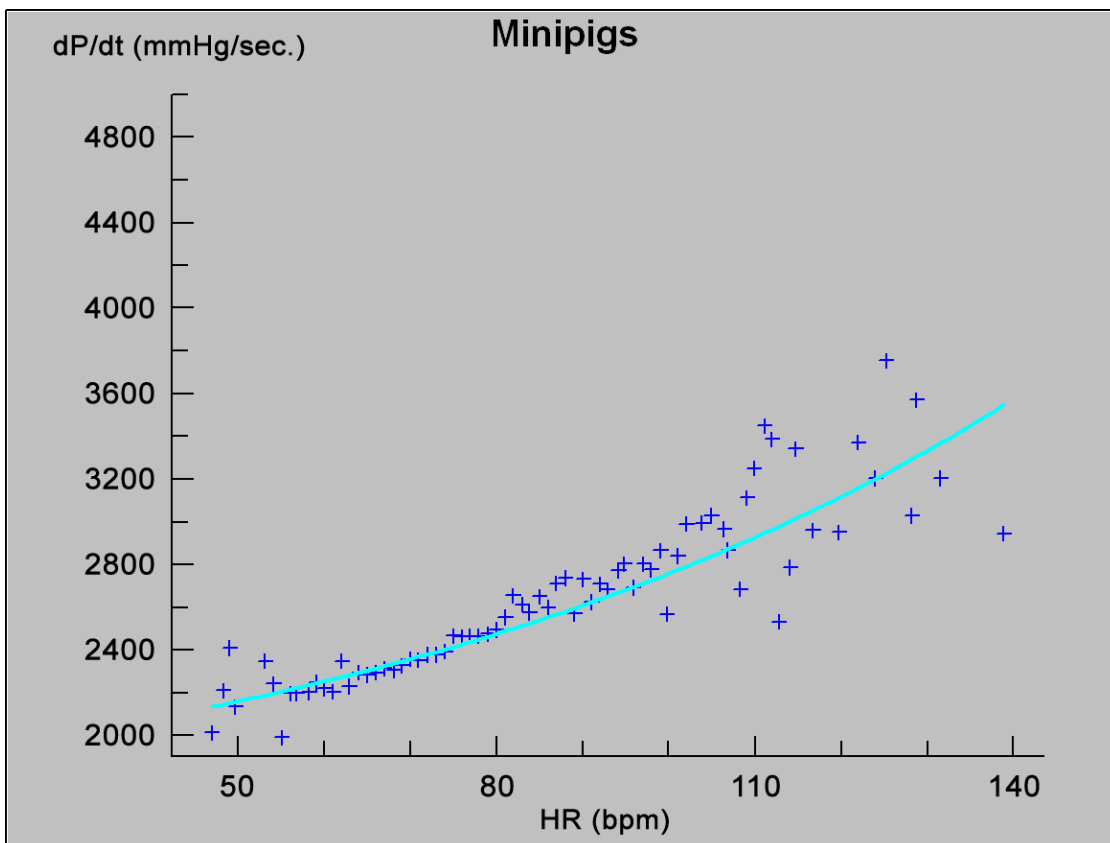


Fig. 2 The minipig LVdP/dtmax-HR relationship.



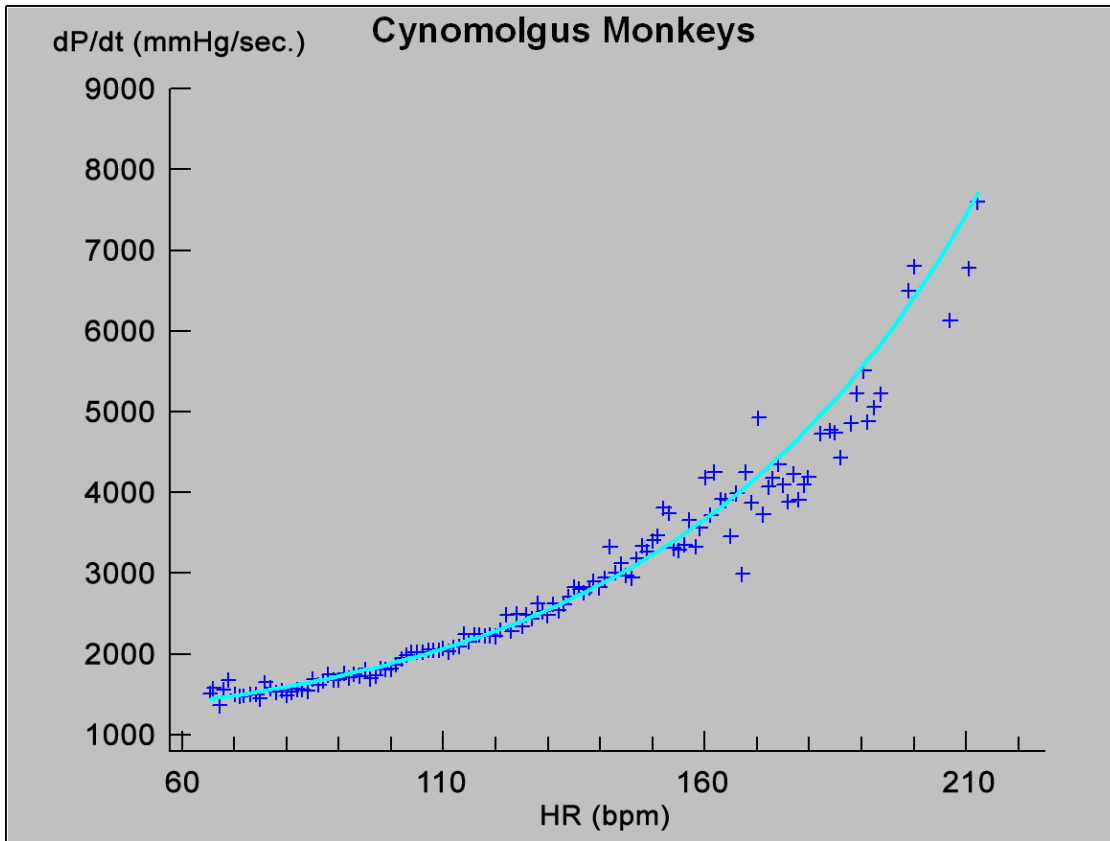


Fig. 3 The Cynomolgus monkey LVdP/dtmax-HR relationship.

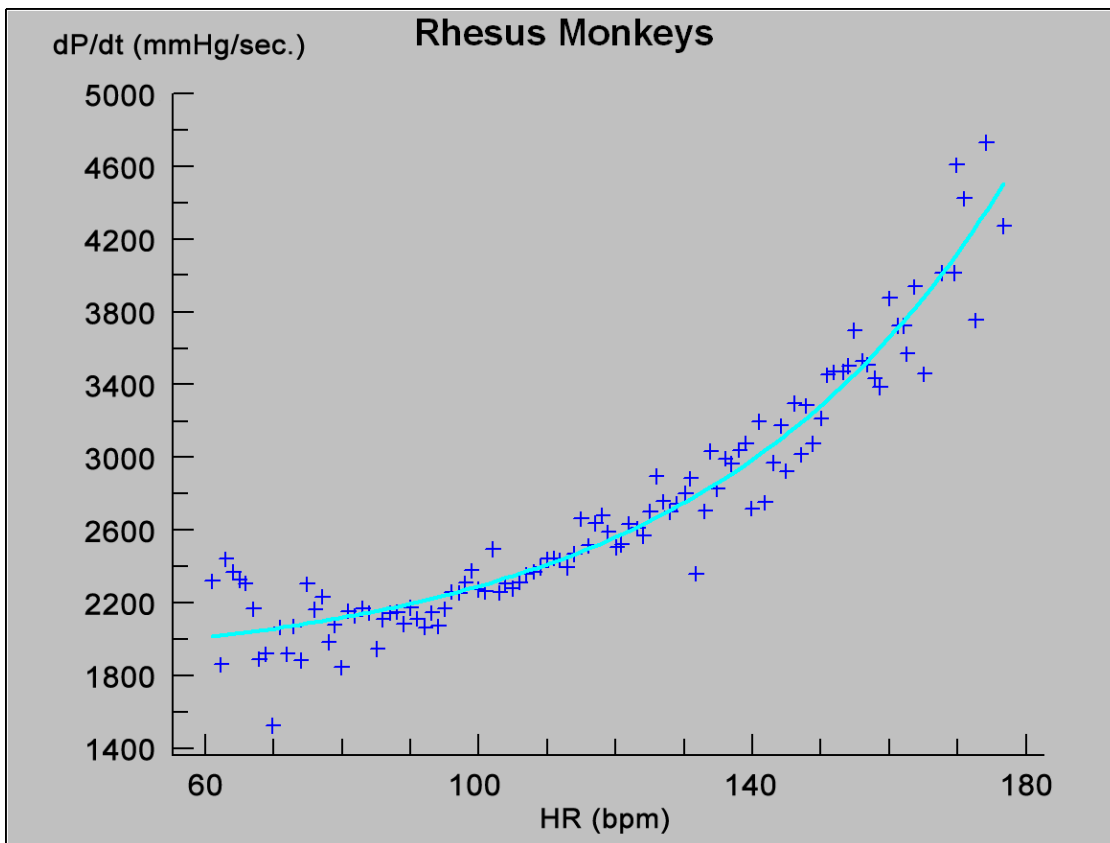


Fig. 4 The Rhesus monkey LVdP/dtmax-HR relationship.

	Dogs		Mini-pigs		Rhesus		Cynos	
HR	dP/dtmax (mmHg/s)	SD	dP/dtmax (mmHg/s)	SD	dP/dtmax (mmHg/s)	SD	dP/dtmax (mmHg/s)	SD
40	1953	233						
45	2029	241						
50	2075	246						
55	2106	256	1991	23				
60	2106	284	2222	53	2327	86	1511	107
65	2167	271	2286	31	2065	292	1498	47
70	2197	264	2359	38	2304	138	1490	36
75	2213	307	2467	28	1845	50	1691	46
80	2258	350	2495	46	1949	61	1682	39
85	2335	356	2651	47	2174	59	1815	39
90	2411	402	2732	41	2168	71	1809	34
95	2380	423	2804	79	2275	55	2023	41
100	2350	211	2569	224	2279	37	2072	45
105	2441	233	3030	78	2442	63	2148	35
110	2533	212	3250	473	2663	76	2215	30
115	2670	222	3342	198	2507	53	2344	63
120	2854	221	3350	84	2704	82	2476	95
125	3189	198			2803	125	2829	85
130	3652	170			2827	117	2824	70
135	3701	220			2719	88	2971	118
140	3790	332			2925	85	3404	170
145	3820	254			3215	156	3288	154
150	3998	276			3698	174	4183	376
155	4019	301			3876	61	3458	181
160	4020	236			3910	201	4921	517
170	4569	304					4094	387
175	4743	205					4189	294
180	5100	543					4739	444
190							5508	473

Table 1 The normal force-frequency relationship in different conscious animal species.

### 3.1 Positive inotropic compound (pimobendan)

The application of pimobendan showed the expected effects on the cardiac contractile function in conscious dogs. Fig. 5 shows the typical analog recording of the LVP and AP signals before and Fig. 6 after application of the positive inotropic compound. The most important parameter with regard to a comparison of the pharmacodynamic effects is LVdP/dtmax. The mean increase in this parameter was  $30 \pm 10 \%$ ,  $70 \pm 15 \%$ , and  $110 \pm 18 \%$  with doses of 0.1 mg/kg, 0.3 and 1 mg/kg respectively (Fig. 7). There was a slight increase in heart rate and LVP, but no effect on the other cardiovascular and electrophysiology parameters (i.e. systolic and diastolic blood pressure, PR-time, QRS interval QT interval and the QTc interval). Fig. 8 shows superimposed analog recordings of the LVP signal before (blue lines) and after (red lines) pimobendan.



Fig. 5 A typical analog recording of the LVP, AP and first derivative of the LVP signal in a conscious Labrador dog.



Fig. 6 A typical analog recording of the LVP, AP and first derivative of the LVP signal in a conscious Labrador dog after administration of the positive inotropic compound.

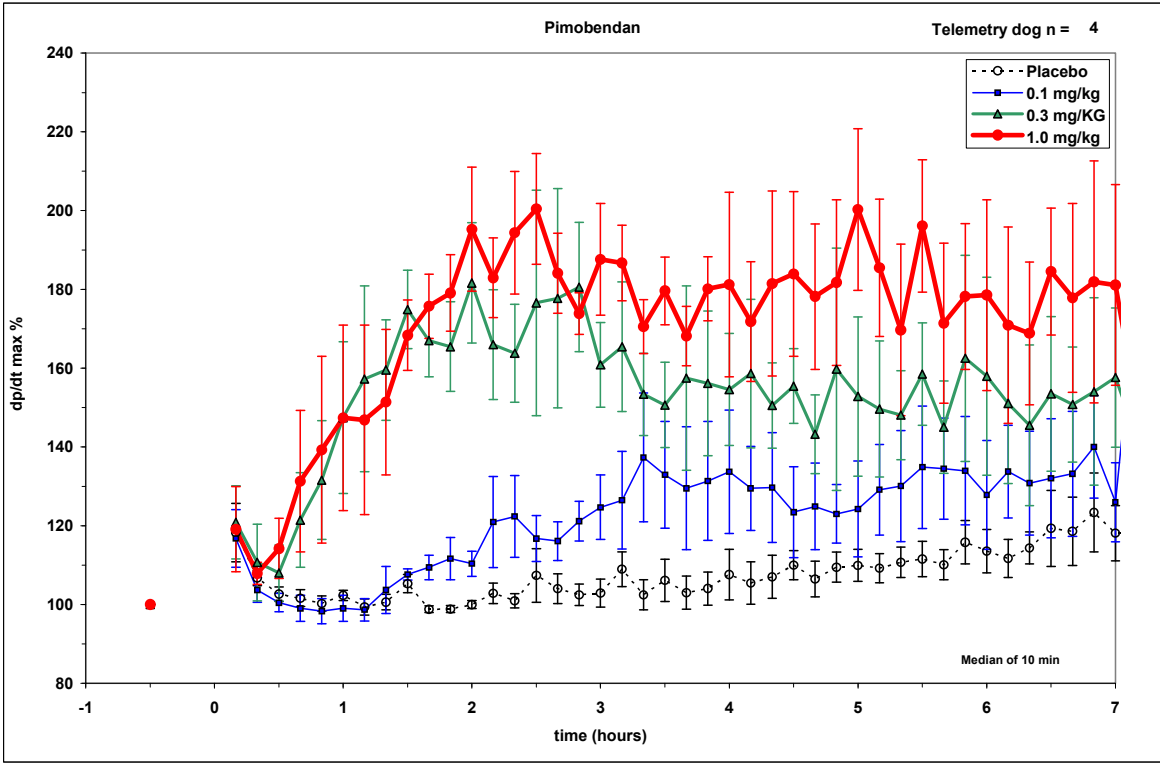


Fig. 7 Depicts the dose-dependent increase in myocardial contractility in conscious Labrador dogs after administration of pimobendan.

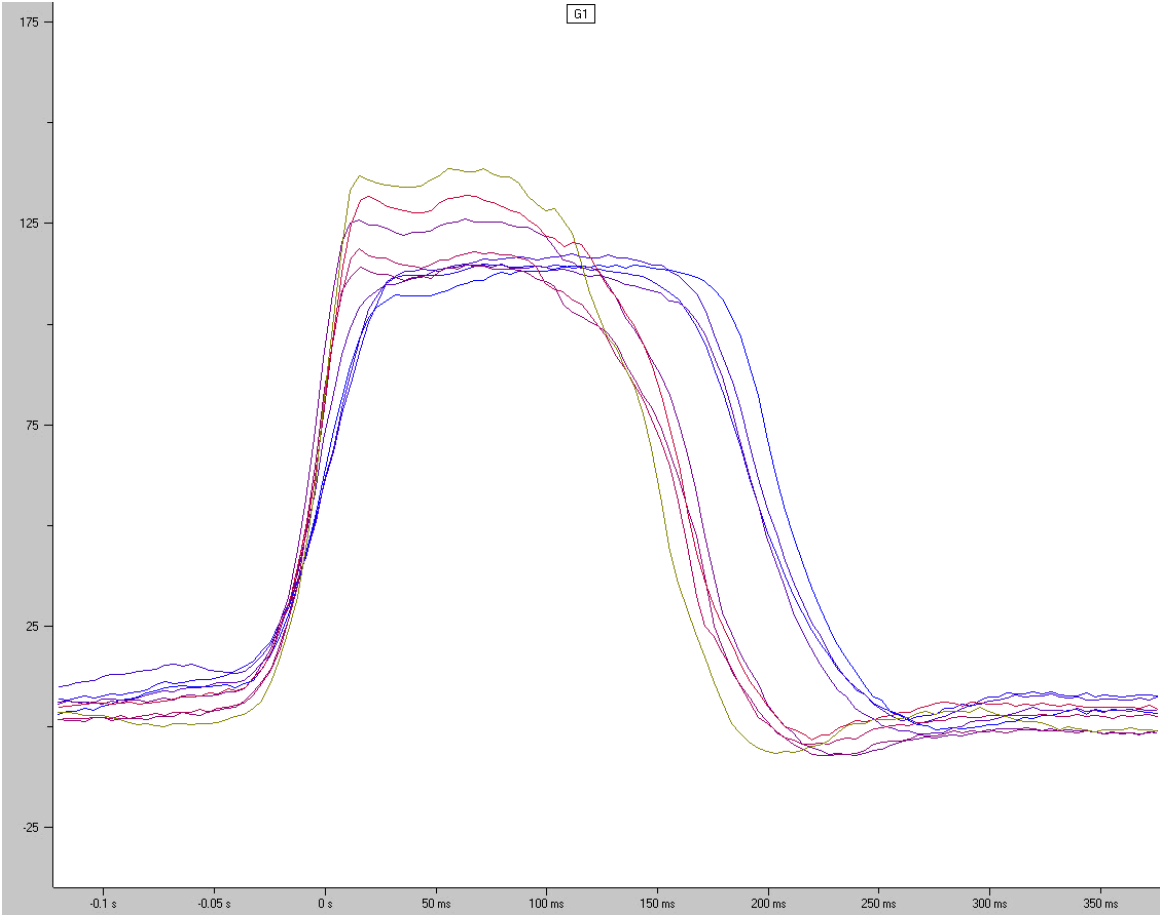


Fig. 8 Depicts changes in the analog LVP signal after application of the positive inotropic compound pimobendan in a conscious Labrador dog.

## 4. Discussion

The force-frequency relationship in anesthetized animals is well established. However, there is an altered force-frequency effect compared to the conscious state, probably mediated through an increased adrenergic stimulation by the anesthesia (Higgins, Vatner, Franklin, & Braunwald, 1973). In these studies, control levels of LVdP/dtmax in anesthetized dogs were considerably less than those measured in conscious animals, suggesting that the ventricular myocardium was markedly depressed by the anesthetics. Negative inotropic effects of barbiturates and other anesthetics have been well documented (Brown, 1960; Ross, Covell, & Sonnenblick, 1967; Siegel, 1969; Van Citters, Franklin & Rushmer, 1964) and it is suggested that barbiturates inhibit calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum.

The importance of the substantial force-frequency effect on the left ventricle in conscious animals has been discussed controversially. It was shown by Higgins (Higgins et al., 1973) that there was only a small increase in maximum LVdP/dt in conscious dogs compared to anesthetized animals after increasing the heart rate. Different extents of the force-frequency relationship on myocardial contractility have been shown in conscious dogs under resting conditions. Freeman (Freeman, Little, & O'Rourke, 1987) found a significant increase in myocardial contractility after increasing heart rate in conscious dogs. Miura et al. (Miura, Miyazaki, Guth, Indolfi, & Ross, 1994) showed that a slowing of the heart rate during exercise by using a sinus node inhibitor caused depressed myocardial contractility as indicated by the decrease in peak LVdP/dtmax in conscious dogs. This effect was attributed to a negative force-frequency effect and was manifested by a large reduction of the first derivative of LV pressure and a shift of end-systolic pressure-volume points. Additionally they reported that studies in resting dogs demonstrated that dobutamine caused a dose-dependent shift upward of the force-frequency effect studied with a pronounced increase in inotropic state at higher heart rates. Noble et al. found a linear relationship between stroke volume and heart rate and that maximum LVdP/dt is sensitive to procedures that change myocardial contractility and has certain theoretical advantages as an index of contractility (Noble, Wyler, Milne, Trenchard, & Guz, 1969).

However, there is little data available for the force-frequency relationship in non-paced conscious dogs, primates and minipigs as they are used in safety

pharmacology studies. Our data show that there is a substantial force-frequency relationship in the conscious dogs, minipigs, Rhesus monkeys and Cynomolgus monkeys. It is important to investigate the normal force-frequency relationship in the species used since new compounds may exhibit an alteration of the sympathetic tone and as a consequence change the heart rate. Harkin et al. (Harkin, Pagel, Tessmer, & Wartier, 1995) investigated the effect of a new myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizer with intact and blocked autonomic nervous system in conscious dogs. They found that the compound tested enhanced LVdP/dtmax to a greater degree in dogs with intact autonomic nervous function (ANS), suggesting that ANS activation contributes to augmentation of rapid ventricular filling. The compound induced tachycardia was more pronounced in dogs with intact ANS function, presumably resulting from activation of baroreceptor reflexes. It must also be acknowledged that we have addressed thus far only acute changes in the inotropic state of the heart. Other important mechanisms could lead to chronic changes in the contractile state of the heart but these were not addressed in the present study.

#### 4.1 Mechanisms of the positive inotropic compound pimobendan

Pimobendan is a compound with a potent positive inotropic and a vasodilatory effect (Baumann, Ningel, & Permanetter, 1989). Two separate mechanisms produce the positive inotropic action, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of cardiac contractile proteins and an inhibition of cardiac phosphodiesterase-III activity. Pimobendan also results in selective peripheral phosphodiesterase-III inhibition leading to systemic vasodilation and improvements in coronary and renal perfusion. It enhances myocardial contractility by augmenting  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the  $\text{Ca}^{2+}$ -specific regulatory site of cardiac troponin C and stabilizing  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conformational changes in this protein. Due to its pharmacological properties pimobendan is indicated for the treatment of congestive heart failure and was developed for the treatment of this condition in dogs.

## 5. Conclusion

Contractility of the myocardium is enhanced by autonomic input activating myocardial  $\beta_1$ -adrenoceptors, as well as the “force-frequency” relationship. The mechanism involved is ultimately the increased  $\text{Ca}^{2+}$  availability to the myofilament. The basic manifestation of the force-frequency relation to increase contractility progressively with an increase in heart rate has been shown to be subject to marked enhancement by  $\beta$ -adrenergic stimulation during normal exercise or as a consequence of administration of a  $\beta$ -adrenergic agonist. Compounds can therefore either directly or indirectly affect the contractility of the heart. The chronotropic effects are routinely measured in preclinical studies, however, the  $\text{LVdP/dtmax}$  is not routinely analyzed in cardiovascular safety studies. In the physiological state, augmented sympathetic tone always induces both positive inotropic and chronotropic effects, so that changes in heart rate are always coupled with contractility changes. Therefore it was of great importance to us to evaluate the normal force-frequency relationship over a wide range of heart rates in conscious telemetered animals. Our experience strongly recommends including this evaluation for drug candidate selection.

## 4. Erweiterte Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein erstmals beim Göttinger Minipig eingesetztes Telemetriesystem innerhalb der Sicherheitspharmakologie als Methode einzuführen und Normalwerte bereitzustellen.

### Diskussion zu 3.1

Die Publikation 3.1 zeigt die Ergebnisse normaler, kardiovaskulärer und elektrokardiographischer Parameter ohne Einwirkung einer pharmakologischen Substanz. Die Ergebnisse sollen hier erweitert diskutiert werden.

Mit 56 Schlägen pro Minute über den Tag gemessen (Stunde 1 bis 7 der Messung) zeigten die Göttinger Minipigs eine niedrige intrinsische Herzfrequenz. Bisherige Angaben in der Literatur gaben höhere normale Bereiche für Minipigs an. So zeigten Kano et al. (2005) als Vergleichswert vor Applikation von Propranolol eine Herzfrequenz von 71 bis 76 Schlägen pro Minute bei Minipigs mit DSI Implantat. Weitere Messungen der normalen Herzfrequenz fanden bei fixierten Tieren statt und reichten von 80 bis 103 Schlägen pro Minute bei Minipigs von 20 bis 50 kg Körpergewicht (Georgiev et al. 1972, Beglinger und Becker 1981, Kuwahara et al. 1999). Im Vergleich wurden bei Beagle Hunden in Telemetriestudien Herzfrequenzen von 75 bis 110 Schlägen pro Minute gemessen (Truett und West 1995, Soloviev et al. 2006) und bei Gauvin et al. (2005a) über 110 Schläge pro Minute. Eine Herzfrequenz von über 100 Schlägen pro Minute lässt daraus schließen, dass die Tiere während den Versuchen Stressfaktoren ausgesetzt waren. Die niedrige Herzfrequenz, wie sie in der vorliegenden Publikation beim Göttinger Minipig beobachtet wurde, spiegelt eine gute Adaptation an die Versuchsbedingungen und einen minimierten Stresslevel wieder. Die Fütterung 7 Stunden nach der oralen Applikation von Trinkwasser (Placebo) führte zu einem Anstieg der Herzfrequenz von 56 auf einen Maximalwert von 122 Schlägen pro Minute. Der ausgeprägte Anstieg hielt langsam absinkend 3 Stunden an. Nach dieser Zeit kehrte die Herzfrequenz zu einem Wert von 67 Schlägen pro Minute zurück, die vollständige Rückkehr zu den Werten vor der Fütterung trat die ganze Nacht über nicht ein (siehe 3.1, Abb. 2). Verzichtete man auf die Fütterung, so war dieser Effekt nicht zu sehen (siehe 3.1, Abb. 3.1 und 3.2). Der zirkadiane Verlauf der Herzfrequenz war bei den Göttinger



Minipigs also stark von der Fütterung anhängig. In bisherigen Studien zeigten Minipigs keine zirkadiane Rhythmik der Herzfrequenz (Kuwahara et al. 2004, Kano et al. 2005). Zirkadiane Rhythmik war nur in Studien von Kuwahara et al. (2004) in Einzelhaltung erkennbar, wobei die Herzfrequenz in den ersten 2 Wochen der Gruppenhaltung tagsüber signifikant höher war als in Einzelhaltung. Auch nach 2 Wochen Gruppenhaltung fanden die Werte nicht zum Ausgangswert wie in Einzelhaltung zurück. Nach Fütterung wurde bei Kano et al. (2005) ein ähnlicher unmittelbarer Effekt auf die Herzfrequenz festgestellt wie in eigenen Untersuchungen, jedoch hielt dieser nicht die ganze Nacht an und kehrte nach 3 Stunden wieder zu Ausgangswerten zurück. Um weitere Einblicke in dieses Phänomen zu bekommen, wurden außerhalb der publizierten Ergebnisse weitere Experimente durchgeführt, die später in der Diskussion besprochen werden.

Die hämodynamischen Parameter zeigten mit Werten von systolischem AP  $123 \pm 16$  mmHg, diastolischem AP  $88 \pm 10$  mmHg und LVP  $111 \pm 15$  mmHg (Mittelwert  $\pm$  SD; siehe auch 3.1, Tab. 1) einen stabilen Verlauf während der 24 stündigen Messung, abgesehen von kurzdauernden Anstiegsperioden durch orale Applikation und Fütterung (siehe 3.1, Abb. 4 und 5). Für diese Parameter waren bisher keine Angaben für frei bewegliche Minipigs in der Literatur zu finden. Ein LVP von 142 mmHg wurde bei Göttinger Minipigs in einer Hängematte mit Tip-Katheter gemessen (Beglinger und Becker 1981), während in anästhesierten Tiermodellen Werte von 56 (4 Monate alte Minipigs) bis 158 mmHg (erwachsene Minipigs) für den LVP beobachtet wurden (Smith et al. 1990, Benharkate et al. 1993). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Art der Fixation sowie die Art des Anästhetikums die LVP-Messung wesentlich beeinflussen. Gerold et al. (1981) gaben beim frei beweglichen Hund einen LVP von 118 mmHg an.

Der LVdP/dtmax beim frei beweglichen Göttinger Minipig betrug in der eigenen Placebostudie  $2417 \pm 379$  mmHg (siehe 3.1, Abb. 6). Göttinger Minipigs in Anästhesie mit  $\alpha$ -Chloralose hatten einen LVdP/dtmax von  $2492 \pm 350$  mmHg/s (Benharkate et al. 1993).  $\alpha$ -Chloralose zeichnet sich durch stabile Kreislaufbedingungen aus (Erhardt und Henke 2004), weshalb der LVdP/dt durch die Anästhesie wenig beeinflusst wurde. Durch die Fixation in einer Hängematte stieg der LVdP/dtmax bei Beglinger und Becker (1981) auf  $3821 \pm 787$  mmHg/s.

Das PR-Intervall war mit  $125 \pm 21$  ms länger als bisherige Studien an ausnahmslos fixierten Minipigs unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Rasse (Dukes und Szabuniewicz 1969, Jones et al. 1999, Nahas et al. 2002) ergaben. Die PR-Dauer ist von der Herzfrequenz abhängig, weswegen eine niedrige intrinsische Herzfrequenz, wie sie bei den 7 Göttinger Minipigs beobachtet wurde, zu längerer PR-Dauer führt. Die Intervalldauer im EKG ist daher im Zusammenhang mit den Gegebenheiten der Messmethode (fixiert – unfixiert - anästhesiert) zu interpretieren. Auch das Alter der Tiere spielte bei der EKG-Messung eine Rolle, wobei jüngere Tiere kürzere Intervalle zeigten als ältere (Larks et al. 1971, Lin et al. 1999).

Im Vergleich zum Hund mit einer QT-Dauer von 220 ms (Gauvin et al., 2005a) war beim Göttinger Minipig eine mit 320 ms deutlich längere QT-Zeit im EKG zu sehen. Die Schwierigkeit bei der Bestimmung der QT-Zeit durch Computerprogramme lag in der wechselnden Morphologie der T-Welle (siehe 3.1, Abb. 8). Bei der T-Welle wurde wie in anderen EKG-Studien am Minipig (Dukes und Szabuniewicz 1969, Eckenfels und Schuler 1988, Nahas et al. 2002) ein spontaner Wechsel zwischen negativer, positiver und bipolarer Ausrichtung beobachtet. 45 % der ausgewerteten T-Wellen waren positiv, 42 % negativ und 13 % bipolar. Es war keine eindeutige Abhängigkeit der Polarität der T-Welle von der Körperposition feststellbar. Als einzige Regelmäßigkeit war die T-Welle in hohen Bereichen der Herzfrequenz ausnahmslos positiv. Dies führte zu der Annahme, dass die Körperposition doch einen gewissen Einfluss haben muss, da eine hohe Herzfrequenz gleichzeitig eine stehende Körperposition impliziert. Erklärungsansätze könnten sein, dass das Schwein verglichen zum Hund eine rigide Thoraxwand besitzt und sich Verschiebungen der Herzachse durch Veränderung der Körperposition anders auswirken. Andere Arbeitsgruppen (Dukes und Szabuniewicz 1969, Eckenfels und Schuler 1988) gaben Einflüsse des autonomen Nervensystems als mögliche Ursache an.

### Diskussion zu 3.2

In Publikation 3.2 wurde die Beziehung von Herzfrequenz und Kontraktilität (LVdP/dtmax) bei Hund, Minipig und Primat bei wachen, frei beweglichen Tieren untersucht. Es zeigte sich eine lineare Beziehung bei Hund und Minipig (siehe 3.2 Abb. 1 und 2) und eine exponentielle Beziehung bei Cynomolgus- und Rhesus-Affen (siehe 3.2, Abb. 3 und 4). Der LVdP/dtmax beim Minipig reichte von 1991 bis 3359

mmHg/s bei Herzfrequenzen von 55 bis 120 Schlägen pro Minute. Für wache Tiere gab es wenige Daten über den Zusammenhang dieser Parameter. Bei wachen Hunden mit intaktem autonomem Nervensystem zeigte sich, dass Levosimendan den LVdP/dtmax stärker ansteigen ließ, als bei Hunden mit autonomer Nervenblockade durch Propranolol (Harkin et al. 1995). Higgins et al. (1973) untersuchten die Beeinflussung des Kraft-Frequenz-Effektes durch die Anästhesie und fanden bei anästhesierten Tieren einen niedrigeren LVdP/dtmax als bei wachen. Die negative Inotropie von verschiedenen Anästhetika ist aus anderen Studien bekannt (Brown 1960, Siegel 1969, Preckel et al. 2004).

Veränderungen der Herzfrequenz sind also mit einer Steigerung oder respektive Minderung der Kontraktilität verbunden. Substanzen, die sich direkt oder indirekt auf die Herzfrequenz auswirken, beeinflussen das Vermögen des Herzens, sich zu kontrahieren. Daher sollte der Parameter LVdP/dtmax und seine Abhängigkeit von der Herzfrequenz routinemäßig in die Bewertung der Sicherheit von pharmakologischen Substanzen miteinbezogen werden.

#### Normalwerte in pharmakologischen und toxikologischen Studien

Der Hund ist derzeit die Großtierspezies, die in der Sicherheitspharmakologie und Toxikologie am häufigsten eingesetzt wird (Lehmann 1998). Folglich gibt es hierzu die meisten Grundlagendaten. Das Minipig wird immer gefragter als alternative Nicht-Nager Spezies. Obwohl Basisdaten zur Hämatologie, klinischen Chemie, Histologie und Pathologie des Minipigs inzwischen zur Verfügung stehen (Ellegaard et al. 1995, Lehmann 1998, Madsen et al. 1998), gibt es noch viele Gebiete, auf denen diese Grundlageninformationen fehlen. Hierzu gehören kardiovaskuläre und EKG-Normalwerte an unfixierten Minipigs. Ganz allgemein ist der kardiovaskuläre Normalzustand im Bereich der Sicherheitspharmakologie und Toxikologie ein eher vernachlässigtes Thema. Nur Gauvin et al. (2005a, 2005b) und Soloviev et al. (2006) haben bei Beagles bzw. Cynomolgus Affen und Schnell und Wood (1993) bei Marmosets eine ähnliche Studie durchgeführt, in der der physiologische Zustand ohne pharmakologische Einwirkung im Mittelpunkt stand.

## Telemetrie und 3R

Im Fokus der eigenen Untersuchungen stand auch die Minimierung der Belastungen der Tiere während der perioperativen Phase sowie während der Messungen. Der Tierschutz spielt innerhalb der tierexperimentellen Forschung eine wichtige Rolle. Russell und Burch (1959) prägten das Prinzip der „3R“, die für „Replacement“, „Reduction“ und „Refinement“ stehen. Tierversuche sollen demnach von alternativen Verfahren abgelöst werden, Tierzahlen sollen reduziert und die Belastung der Versuchstiere minimiert werden. Chronisch angewendete Telemetriesysteme mit vollständig implantierbaren Einheiten haben das Potential, diese Anforderungen vor allem bezüglich der Tierzahlreduktion zu erfüllen (Kramer et al. 2001, Mallia 2007). Sie ermöglichen eine exakte, kontinuierliche Datenerfassung unter stressreduzierten, möglichst physiologischen Bedingungen (Kramer et al. 2001, Brockway und Hassler 1993). Durch die deutliche Verbesserung der Qualität der Daten und der Verwendung jedes Tieres als seine eigene Kontrolle, kann mit einer geringeren Tieranzahl eine statistisch signifikante Aussage erreicht werden (Sarazan 1993). Die implantierten Tiere können über Monate bis Jahre eingesetzt werden, was zu einer Reduktion der Tieranzahl um bis zu 90 % führt (Kramer et al. 2001).

## Qualität der Daten

Die Datenerfassung an wachen Tieren wird als geeigneter für die Übertragung auf den Menschen angesehen als die Datenerfassung bei fixierten Tieren (Kramer et al. 2001, Brockway und Hassler 1993, Sarazan 1993). Eine gute Qualität der Daten kann aber auch mit Hilfe der Telemetrie nur erreicht werden, wenn die Tiere gut trainiert sind und Vertrauen in das Personal haben (Klumpp et al. 2006). Ängstliche, gestresste Tiere führen zu instabilen Verläufen der Datenerfassung, die eine aussagekräftige Bewertung behindern (Balls et al. 1995, Guth et al. 2004, Klumpp et al. 2006). So ist die Bewertung des QT-verlängernden Effekts einer Substanz eingeschränkt, wenn die Herzfrequenz instabil ist, da QT herzfrequenzabhängig ist (Meyners und Markert 2004). Daher wurden die Göttinger Minipigs bereits vor der Operation an die Laborumgebung, das Personal und Schritt für Schritt an die „Handling“-Prozeduren wie die orale Applikation gewöhnt. Es stellte sich heraus, dass sich die Minipigs bei ruhigem Umgang relativ schnell (2 Wochen, abhängig von der Intensität des Trainings) an gegebene Bedingungen gewöhnten und sehr zahm

wurden. Diese gute Adaptation erklärt auch die niedrige intrinsische Herzfrequenz von 56 bpm (siehe 3.1). Tsutsumi et al. (2001) berichteten von mindestens 4 Wochen, um zahme Göttinger Minipigs zu erhalten. Allerdings beschränkte sich hier der Kontakt zu den Minipigs auf den Reinigungsvorgang in den Tierställen.

### Perioperatives Management

Bei der Telemetrie muss ein einmaliger, invasiver, technisch aufwändiger Eingriff mit Thorakotomie in Kauf genommen werden. Es ist initial mit hohen Kosten für die Operation, die Ausstattung des Labors mit dem System und die Implantate zu rechnen (Brockway und Hassler 1993, Kramer et al. 2001). Um die Belastung der Minipigs durch die chirurgische Implantation so gering wie möglich zu halten, muss die Anästhesie effektiv und gut steuerbar sowie die analgetische Versorgung gewährleistet sein. Die balancierte Anästhesie (BA) erfüllt diese Anforderungen, indem sie Injektionsanästhetika und Inhalationsanästhetika kombiniert (Erhardt und Haberstroh 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die Injektionsanästhetika Ketamin, Midazolam und Propofol mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran verwendet. Die Kombination von Anästhetika aus verschiedenen Substanzklassen führt dazu, dass sich die Wirkungen potenzieren. Deshalb wird eine geringere Dosis benötigt um ein chirurgisches Toleranzstadium zu erreichen und die Nebenwirkungen, die für jedes Anästhetikum charakteristisch sind, reduzieren sich (Erhardt und Haberstroh 2004).

Zur perioperativen Analgesie wurden in dieser Arbeit neben nichtsteroidalen Antiphlogistika transdermale Pflaster mit dem potenten Opioid Fentanyl eingesetzt. Fentanylpflaster geben kontinuierlich bis zu 72 Stunden den Wirkstoff über die Haut ab (Wilkinson et al. 2001, Malavasi et al. 2005). Der Wirkspiegel flutet langsam an und erreicht frühestens nach 12 Stunden (beim Hund schon nach 4 bis 8 Stunden, Paddleford 1999) einen konstanten Plasmaspiegel, abhängig von den Fettdepots in der Haut und der Durchblutung (Riviere und Papich 2001). Physiologische Schwankungen der Durchblutung und Temperatur der Haut hatten beim Menschen keinen Einfluss auf die Absorption. Erst Hyperthermie führte bei einem von drei Probanden zu erhöhter Aufnahme (Jeal und Benfield 1997). Als Lokalisation wurde in den vorliegenden Untersuchungen der dünne, nur leicht behaarte Bezirk hinter den Ohren gewählt. Hier war die beste Adhäsion des Pflasters an die Haut zu erreichen

und wenig Fetteinlagerungen, die das lipophile Fentanyl speichern, behinderten die Aufnahme in die Blutbahn. In anderen Studien wurde die Stelle dorsal vom Schulterblatt beklebt (Harvey-Clark et al. 2000, Wilkinson et al. 2001). Diese Stelle eignete sich hier aus praktischen Gründen nicht, da sie sich im Operationsfeld befand. Um sicher zu gehen, direkt nach der Operation einen genügend hohen Wirkspiegel erreicht zu haben, wurden die Pflaster bereits 24 Stunden vor dem Ende des Eingriffes aufgeklebt. Plasmaspiegel von Fentanyl konnten in der vorliegenden Studie länger als 72 Stunden nach der Operation detektiert werden. Alternativ kann Buprenorphin für die postoperative Analgesie verwendet werden. Buprenorphin wirkt 8 bis 12 Stunden (Henke und Erhardt 2001) und wird beim Schwein subkutan oder intramuskulär injiziert. Hermansen et al. (1986) stellten nur 7 Stunden lang eine analgetische Wirkung von Buprenorphin beim Schwein fest. Injektionen jeglicher Art bedeuten für das Schwein eine stressvolle Prozedur und ein sich wiederholendes An- und Abfluten des Wirkspiegels mit der Gefahr der Unterbrechung der Analgesie. Im Gegensatz dazu wurden die Pflaster aufgeklebt, während die Minipigs in einer Hängematte lagen. Diese Prozedur wurde von den meisten Tieren gut toleriert. Fentanyl-Pflaster zur postoperativen Versorgung beim Göttinger Minipig haben sich im Vergleich zu Buprenorphin bewährt und stellen eine für das Tier und das Personal angenehme Methode der Applikation dar.

Bei der chirurgischen Implantation selbst (siehe 3.1) war darauf zu achten, dass Sender und Batterie des Implantates tief zwischen den Musculus abdominis internus und externus platziert wurden. Eine subkutane Lokalisation hatte trotz des beim Schwein sehr gut ausgeprägten Hautmuskels und einer dicken Fettschicht eine zu starke mechanische Belastung zur Folge und ließ die Implantate Richtung Linea alba abrutschen. Manche Minipigs reagierten außerdem sensibel auf Manipulationen am offenen Herzen im Zuge der Implantation des Druckaufnehmers für den linken Ventrikel. Es hat sich deshalb bewährt, der Gefahr von Arrhythmien in Form von Kammerflimmern oder -flattern mit einer prophylaktischen Gabe Lidocain i.v. entgegenzutreten.

Serombildung wurde beim Schwein im Vergleich zum Hund in geringem Ausmaß und nur die ersten 3 Tage post operationem beobachtet. Spätkomplikationen traten in manchen Fällen in Form einer proliferativen Reaktion der Aorten-Gefäßwand um den Druckaufnehmer auf, was zu allmählichem Verlust des AP-Drucksignals führte. Beim Hund traten solche Komplikationen nur selten auf. Eine Erklärung hierzu kann sein,

dass Hunde dem exsudativen Entzündungstyp und Schweine dem fibrinösen bzw. proliferativen Entzündungstyp angehören (Voigt 2004).

### Haltungsbedingungen während der telemetrischen Messung

Die Haltungsbedingungen während den Messungen spielen eine große Rolle im Hinblick auf das Wohlbefinden der Tiere und damit im Hinblick auf die Qualität der Daten. Diese Tatsache wurde beim Hund (Hetts et al. 1992, Hubrecht 1993, Klumpp et al. 2006) und beim Primat (Gerber et al. 2002) bereits untersucht. Klumpp et al. (2006) stellten fest, dass gute und stabile Daten erreicht werden, wenn die Labrador Hunde zusammen mit ihren gewohnten Boxenpartnern gehalten wurden, wohingegen Einzelhaltung mit Sichtkontakt zu anderen Hunden eine höhere und unregelmäßigere Herzfrequenz zur Folge hatte. Ratten reagierten mit Blutdruck- und Herzfrequenzerhöhung, wenn sie auf Gitter oder Plastikböden statt auf Einstreu gehalten wurden (Krohn et al. 2003). Die Messungen innerhalb dieser Arbeit wurden in Paarhaltung, aber auch in Einzelhaltung durchgeführt. Es wurde kein Unterschied im Verhalten und in den Messparametern erkannt. Allerdings wurden keine Daten derselben Individuen in Einzel- und in Gruppenhaltung erhoben, was die Voraussetzung für eine vergleichende Bewertung ist. Da Schweine soziale Tiere sind, ist davon auszugehen, dass die Gruppenhaltung zu größerem Wohlbefinden der Tiere führt. Die Gruppenhaltung sollte deshalb bevorzugt werden, wenn die experimentellen Gegebenheiten dies erlauben (Bollen et al. 2000c). Eine Gruppenhaltung während den Messungen ist nur mit dem Implantat der Fa. Königsberg Instruments technisch möglich, was einen Vorteil gegenüber dem System von DSI darstellt. Wird eine Messung in Einzelhaltung durchgeführt, ist zu berücksichtigen, dass Minipigs bereits nach weniger als 24 Stunden Trennung das Gruppengefüge neu wiederherstellen, was mit aggressivem Verhalten und Verletzungsgefahr einhergehen kann (Ewbank und Meese 1971, Coutellier et al. 2007). Bei Ebern führte nach unserer Erfahrung eine Kastration zu einem ausgeglicheneren Wesen. Darüber hinaus konnte mit materiellen Veränderungen der Haltungsumwelt ruhiges und zufriedenes Verhalten der Göttinger Minipigs in den Telemetrieboxen erreicht werden. Im Vergleich zu vorher angebotener Einstreu und einer Liegebox sorgte in der vorliegenden Arbeit eine Kunststoffmatte für Rinder und

eine Wärmelampe dafür, dass die Minipigs sich vermehrt hinlegten und schliefen, was die stabilen Verläufe der Messwerte förderte.

### Einfluss der Fütterung auf den Datenverlauf

Der Verlauf der Daten wird in der Telemetrie nur durch unvermeidbare Interventionen wie z.B. orale Applikation oder Blutabnahmen unterbrochen. Die Fütterung hatte einen Einfluss auf die Messwerte und führte beim Göttinger Minipig zu einer mindestens 3 stündigen, erheblichen Anhebung der Herzfrequenz. Danach blieb diese Erhöhung geringer ausgeprägt über die folgende Nacht bestehen (siehe 3.1, Abb. 2). Bei Hunden erhöht sich die Herzfrequenz nach Fütterung nur bis zu 30 Minuten, bevor sie wieder zu Basalwerten zurückfindet. Beim Göttinger Minipig wurde also im Vergleich zu anderen Spezies eine ausgeprägtere und lang anhaltendere Steigerung der Herzfrequenz nach Fütterung beobachtet. Diese Tatsache wurde auch von Leucht et al. (1982) und Kano et al. (2005) beobachtet. Die Hintergründe dazu sind unbekannt. Um Einblicke in den Mechanismus dieses Phänomens zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Dissertation 4 Studiendesigns aufgestellt:

#### 1) Tageslauf (24 Stunden) ohne Fütterung:

Das Studiendesign wie in 3.1. beschrieben (Abb. 1) beinhaltete 7 Stunden nach der oralen Applikation die Fütterung (ca. 15.30 Uhr). Experimente (n = 4 Tiere), bei denen auf die Fütterung verzichtet wurde, zeigten, dass die Herzfrequenzerhöhung während der Nachtphase hier nicht zu beobachten war (siehe 3.1, Abb. 3). Der Mittelwert von 53 Schlägen pro Minute am Tag (Stunde 1 bis 7 der Messung) war im Studiendesign ohne Fütterung vergleichbar mit dem Mittelwert von 51 Schlägen pro Minute in der Nacht (Stunde 8,3 bis 20,3 der Messung). Die Erhöhung der Herzfrequenz bei Nacht blieb aus. Daraus war zu erkennen, dass die Fütterung einen großen Einfluss auf den Verlauf der Herzfrequenz hatte.

#### 2) Veränderung des Fütterungszeitpunktes:

Wenn die Fütterung nicht, wie im gewohnten Studiendesign, nachmittags um ca. 15.30 Uhr stattfand, sondern stattdessen um 8.30 Uhr, so war der gleiche



ausgeprägte Effekt auf die Herzfrequenz zu beobachten (4 Göttinger Minipigs, n = 16 Experimente). Die Herzfrequenz kehrte hier nach etwas weniger als 8 Stunden zu den Ausgangswerten vor der Fütterung zurück und blieb dann über die restliche Messperiode (15 Stunden) konstant.

### 3) Verflüssigtes Futter:

Das Schwein ist ein Allesfresser wie der Mensch und auch die Passagezeiten der Ingesta sind ähnlich lange (Miller and Ullrey 1987). Zu Passagezeiten beim Schwein wurde von Fernandez-Gil et al. (1995) eine Studie mit niedrigen und hohen Ballaststoffgehalten der Diäten durchgeführt. Die Futtermittel mit hohem Ballaststoffgehalt sollen die Passagezeit verkürzen, was jedoch nicht gezeigt wurde. Die Passagezeit betrug bei allen verwendeten Futterarten 53 - 58 Stunden. Die relativ zu anderen Spezies lange Verweildauer des Nahrungsbreies im Darm könnte bei der Herzfrequenzerhöhung nach Fütterung eine Rolle spielen. Bei voluminöser Fütterung erhöhte sich die Herzfrequenzsteigerung laut Leucht et al. (1982). In den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Standarddiät eingeweicht und in flüssiger Konsistenz verfüttert. Damit sollte erreicht werden, dass sich das Extrudat nicht erst im Magen-Darm-Trakt ausdehnt. Im gewohnten Versuchsdesign (siehe 3.1) wurde diese verflüssigte Standarddiät 7 Stunden nach Applikation an 4 instrumentierte Göttinger Minipigs verabreicht. Als Kontrolle wurden dieselben Tiere für einen weiteren Tageslauf mit dem gewohnten Extrudat des Futters verwendet. Beide Tagesläufe ergaben eine Differenz der Herzfrequenzwerte zwischen den Mittelwerten der Tagphase (Stunde 1 bis 7 der Messung) und denen der Nachtphase (Stunde 8,3 bis 20,3 der Messung) von 16 Schlägen pro Minute. Das Einweichen der Standarddiät erbrachte also keine Verringerung des Fütterungseffektes auf die Herzfrequenz.

### 4) Sympathikus-Dämpfung mit Propranolol:

Propranolol ist ein nicht-selektiver  $\beta$ -Blocker.  $\beta$ -Rezeptoren vermitteln die Wirkung von Adrenalin bzw. Noradrenalin und die sympathomimetische Wirkung von pharmakologischen Substanzen.  $\beta$ -Blocker oder auch  $\beta$ -Adrenolytika wirken als kompetitive Antagonisten und die Wirkung des Sympathikus wird aufgehoben bzw. abgeschwächt. Die Halbwertszeiten von  $\beta$ -Blockern liegen im Bereich von 2 - 6

Stunden, wobei die Wirkzeit aufgrund der Lipophilie dieser Substanzen länger ist als die Halbwertszeit vermuten ließe. Die Wirkdauer von Propranolol beim Hund beträgt nach oraler Gabe 6 - 8 Stunden (Löscher 2002). Die Wirkung von Propranolol im Tiermodell wurde oft in Interaktion mit anderen Substanzen untersucht (Humphrey 1998, Main et al. 1996) oder Propranolol wurde als Validierungssubstanz verwendet (Kano et al. 2005). Propranolol als bradykardiogenes Agens induzierte beim Meerschweinchen eine Verlängerung der RR-Zeit im EKG (Yamabe et al, 2007). Beim mit Halothan anästhesierten Hund bewirkte Propranolol einen Abfall der Herzfrequenz, während der mittlere arterielle Blutdruck nicht signifikant verändert wurde (Shiina et al. 2000). Beim Minipig wurde durch Propranolol in einer oralen Dosierung von 3 - 10 mg/kg ein signifikanter Abfall der Herzfrequenz bei unverändertem mittleren arteriellen Blutdruck beobachtet, während Sotalol, ein weiterer Vertreter der  $\beta$ -Blocker, weder den mittleren arteriellen Blutdruck, noch die Herzfrequenz signifikant änderte (Kano et al. 2005). Kuwahara et al. (1999) demonstrierten eine Herzfrequenzminderung von 80 auf 67 Schläge pro Minute nach Propranolol-Gabe bereits in einer Dosierung von 1 mg/kg intravenös. Um den Einfluss einer  $\beta$ -Blockade auf die Herzfrequenzerhöhung nach Fütterung zu sehen, wurde den Göttinger Minipigs (n = 2 Tiere) in der vorliegenden Arbeit eine Stunde vor Fütterung Propranolol in einer Dosierung von 10 mg/kg oral appliziert. Daraufhin stieg die Herzfrequenz unmittelbar nach dem Fütterungsvorgang nicht wie in 3.1 auf einen Maximalwert von 122 sondern auf nur 85 Schläge pro Minute. Während der Nachtphase hatten die Minipigs im Mittel eine Herzfrequenz von 62 Schlägen pro Minute. Hieraus ist tendenziell eine Dämpfung des Fütterungseffektes durch eine Sympathikus-Blockade zu erkennen. Eine Schlussfolgerung kann jedoch erst nach weiteren Experimenten mit höheren Tierzahlen gezogen werden.

Als Konsequenz sollte beim Minipig nicht gefüttert werden, wenn der maximale Wirkspiegel einer zu testenden Substanz erst zu einem Zeitpunkt nach der Fütterung zu erwarten ist (siehe 3.1). Eventuelle Substanzwirkungen auf die Messparameter werden in dieser Zeit vom ausgeprägten Fütterungseffekt maskiert.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde beim Göttinger Minipig ein Telemetriemodell zur Messung kardiovaskulärer und elektrokardiographischer Parameter etabliert. Dazu wurde eine vollständig implantierbare Telemetrieinheit der Fa. ITS (Integrated Telemetry Services) mit Druckaufnehmern für systemischen arteriellen Blutdruck (Aorta thoracica) und linksventrikulären Druck, mit integrierten EKG Elektroden für die II. Standardableitung sowie mit einem Modul zur Messung der Körpertemperatur verwendet. Kontinuierliche Langzeitmessungen (24 Stunden) aller Parameter wurden bei frei beweglichen Tieren durchgeführt. Zusätzlich stellt diese Methode aus tierschutzrechtlichen Aspekten eine wertvolle Alternative zu akuten, invasiven Messungen dar, die viel höhere Tierzahlen erfordern.

Für frei bewegliche Minipigs standen bisher noch keine kardiovaskulären Daten über normale Parameter für Aortendruck (AP), linken Ventrikeldruck (LVP) und EKG in sicherheitspharmakologischen und toxikologischen Studien zur Verfügung. Um Normalwerte für frei bewegliche Göttinger Minipigs zu erfassen, wurde eine Placebostudie mit 7 Tieren (4 männlich, 3 weiblich, im Alter von 1 bis 1,5 Jahren) durchgeführt. Hierzu wurde ein Studiendesign verwendet, bei dem die Tiere pro Experiment 24 Stunden kontinuierlich gemessen wurden. Nach 1 Stunde der Messung wurde den Tieren Trinkwasser oral appliziert (morgens) und nach 7 Stunden (nachmittags) wurde gefüttert. Abgesehen davon blieben die Minipigs ungestört und wurden mit einer Videokamera überwacht. Alle 10 Minuten wurden wenigstens 400 Messwerte ausgewertet und als Mittelwert dargestellt. Für die hämodynamischen Parameter und die Herzfrequenz ergaben sich folgende Normalwerte (Mittelwert  $\pm$  SD) für Göttinger Minipigs über 24 Stunden: Herzfrequenz  $68 \pm 14$  Schläge pro Minute, systolischer AP  $123 \pm 16$  mmHg, diastolischer AP  $88 \pm 10$  mmHg, LVP  $111 \pm 15$  mmHg und LVdP/dtmax  $2417 \pm 379$  mmHg (LVdP/dt ist ein Index für die myokardiale Kontraktilität). Während die Druckparameter in den 24 Stunden abgesehen vom Einfluss durch Applikation und Fütterung sehr stabil verliefen, zeigte die Herzfrequenz nachts (71 Schläge pro Minute) eine signifikante Erhöhung gegenüber den niedrigen Tagwerten von 56 Schlägen pro Minute. Die Herzfrequenz erhöhte sich nach der Fütterung auf einen Maximalwert von 122 Schlägen pro Minute und kehrte danach über die ganze Nachtphase hinweg nicht mehr zu den Tagwerten zurück. Wurde auf die Fütterung am Nachmittag verzichtet,

so blieb die Herzfrequenz während der Tag- und der Nachtphase gleich. Weitere Veränderungen des Studiendesigns wurden vorgenommen, um den Einfluss der Fütterung zu bewerten.

Die EKG-Morphologie wich von der des Menschen und des Hundes ab. Vor allem die T-Welle erwies sich als variabel in Form und Polarität, was für computerisierte EKG-Auswertungen eine Schwierigkeit darstellen kann. Die Ausmessung der EKG-Intervalle über 24 Stunden ergab folgende Ergebnisse (Mittelwert  $\pm$  SD) für das Göttinger Minipig: PR-Intervall  $125 \pm 21$  ms, QRS-Intervall  $56 \pm 9$  ms, QT-Intervall  $320 \pm 38$  ms und RR-Intervall  $862 \pm 272$  ms. Diese Daten stehen für zukünftige Studien von Substanzwirkungen in pharmakologischen und toxikologischen Studien am Göttinger Minipig als Referenzwerte zur Verfügung.

Zusätzlich wurde die normale Beziehung von  $LVdP/dt_{max}$  zur Herzfrequenz beim Göttinger Minipig untersucht. Es zeigte sich eine deutliche, nahezu lineare Abhängigkeit dieser beiden Parameter.

Zusammenfassend wird das Göttinger Minipig als geeignet für telemetrische Studien in der Pharmakologie und Toxikologie beurteilt und stellt eine wertvolle Alternative zum Hund dar.

## 6. Summary

In the present study a telemetry-based model for the measurement of cardiovascular and electrocardiographic parameters was established in the Göttingen Minipig. A fully implantable device produced by the company ITS (Integrated Telemetry Services) was used and included pressure transducers for aortic blood pressure (A. thoracica) and left ventricular pressure, integrated ECG (lead II) electrodes and a body temperature module. Continuous long-term measurements (24 hours) of all parameters were conducted in freely moving animals. Concerning animal welfare this method is preferable compared to acute, invasive measurements that require much higher animal numbers.

To date, there have been no baseline data available for normal, freely moving minipigs for AP, LVP and ECG parameters in safety pharmacology and toxicology studies. Therefore, a placebo study was done in 7 freely moving Göttingen Minipigs (4 male, 3 female, 1 – 1.5 years old) to collect these normal parameters. The study design included 24 hours of continuous data collection. After 1 hour of measurement the animals were dosed with drinking water (in the morning) and were fed after 7 hours of measurement (in the evening). Apart from dosing and feeding the minipigs were left undisturbed and only observed by means of video cameras. Every 10 minutes a minimum of 400 sequential beats were evaluated and presented as mean value. For normal, freely moving Göttingen Minipigs over the course of 24 hours the following values (mean  $\pm$  SD) were observed: HR  $68 \pm 14$  bpm, SAP  $123 \pm 16$  mmHg, DAP  $88 \pm 10$  mmHg, LVP  $111 \pm 15$  mmHg and LVdP/dtmax  $2417 \pm 379$  mmHg (LVdP/dt is an index of myocardial contractility). Although the pressure values demonstrated a very stable pattern during the course of 24 hours apart from dosing and feeding, heart rate showed a significant increase during the night (71 bpm) compared to the low heart rates during the day phase (56 bpm). Heart rate increased after feeding to a maximum value of 122 bpm and never returned to the baseline day values of 56 bpm. An experiment without feeding found similar heart rates during day and night. Further variations in the study design were investigated to assess the effect of feeding.

The ECG morphology of the minipig differed to that of man and dog. Particularly the T wave showed a variable pattern and polarity, which could cause problems for

computerized ECG waveform analysis. Measurements of ECG intervals over 24 hours demonstrated the following results (mean  $\pm$  SD): PR interval  $125 \pm 21$  ms, QRS interval  $56 \pm 9$  ms, QT interval  $320 \pm 38$  ms and RR interval  $862 \pm 272$  ms. These results serve as reference data for future safety pharmacology and toxicology studies.

Additionally the normal LVdP/dtmax-HR relation in the Göttingen Minipig is investigated. A clear and almost linear relationship in these two parameters was shown.

In conclusion the Göttingen Minipig appears to be well suited for telemetry studies in pharmacology and toxicology and represents a valuable alternative to the dog.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	<b>A</b> rteria (Arterie)
Abb.	<b>A</b> bbildung
AAALAC	<b>A</b> ssociation for <b>A</b> ssessment and <b>A</b> ccreditation of <b>L</b> aboratory <b>A</b> nimal <b>C</b> are
A/D	<b>A</b> nalog/ <b>D</b> igital
a.m.	<b>a</b> n <b>te m</b> erid <b>iem</b> (engl. before noon)
AP	<b>A</b> ortendruck ( <b>A</b> ortic <b>P</b> ressure)
AUC	<b>A</b> rea <b>U</b> nder the <b>C</b> urve
AV	<b>A</b> trioventricular
BNC	<b>B</b> ayonet <b>N</b> eill <b>C</b> oncelmann
bpm	Schläge pro Minute ( <b>b</b> eats <b>p</b> er <b>m</b> inute)
Bsp.	<b>B</b> eispiel
bzw.	<b>b</b> eziehungsweise
cm	<b>C</b> entimeter
° C	Grad <b>C</b> elsius
DAP	diastolischer arterieller Blutdruck (engl. <b>D</b> ia <b>s</b> to <b>l</b> ic <b>A</b> rt <b>e</b> ri <b>a</b> l <b>P</b> ressure)
d.h.	<b>d</b> as <b>h</b> eiß <b>t</b>
DISS	<b>D</b> ata <b>I</b> ntegrated <b>S</b> cientific <b>S</b> ystems
DSI	<b>D</b> ata <b>S</b> cience <b>I</b> nternational
ECG	engl. <b>E</b> lectro <b>C</b> ardiogram
e.g.	<b>e</b> xempli <b>g</b> ratia (engl. for example)
EEG	<b>E</b> lektro <b>e</b> n <b>z</b> ephalogramm
EKG	<b>E</b> lektro <b>k</b> ardiogramm
et al.	et alii (und andere)
etc.	<b>e</b> t <b>c</b> etera
Fig.	engl. <b>F</b> igure
g	<b>G</b> ramm
h	Stunde/n (engl. <b>H</b> our/s)

HR	engl. <b>H</b> ear <b>R</b> ate
Hz	<b>H</b> ertz
i.e.	id <b>e</b> st (engl. das heißt)
i.m.	in <b>t</b> ra <b>m</b> uskulär
i.v.	in <b>t</b> ra <b>v</b> enös
IKr Kanal	schnelle (rapid) Komponente der „delayed rectifier“ <b>K</b> aliumkanäle
ITS	Integrated <b>T</b> elemetry <b>S</b> ystems
kg	<b>K</b> ilogramm
LV	left <b>v</b> entricular
LVP	Linker Ventrikeldruck (engl. <b>L</b> eft <b>V</b> entricular <b>P</b> ressure)
LVdP/dtmax	<b>m</b> aximaler Druckanstieg pro Zeiteinheit im linken Ventrikel
lx	<b>L</b> ux
mg	<b>M</b> illigramm
ml	<b>M</b> illiliter
min	<b>M</b> inute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MHz	<b>M</b> egahertz
ms	<b>M</b> illisekunden
n	Anzahl
PC	<b>p</b> ersonal <b>c</b> omputer
p.m.	<b>p</b> ost <b>m</b> eridie(m) (engl. after noon)
p.o.	<b>p</b> er <b>o</b> s
SD	Standardabweichung (engl. <b>S</b> tandard <b>D</b> eviation)
SPF	<b>s</b> pezifisch <b>p</b> athogen <b>f</b> rei
Tab.	<b>T</b> abelle (engl. table)
u.a.	<b>u</b> nter <b>a</b> nderem
µg	Microgramm
SAP	systolischer arterieller Blutdruck (engl. <b>S</b> ystolic <b>A</b> rterial <b>P</b> ressure)
sog.	<b>s</b> ogenannte
V.	<b>V</b> ena (Vene)
v.a.	<b>v</b> or <b>a</b> llem
z.B.	<b>z</b> um <b>B</b> eispiel
z.T.	<b>z</b> um <b>T</b> eil



## 7.2 Abbildungsverzeichnis

### Zu 2.

Abb. 1:  
Aufbau des Telemetriesystems.

Abb. 2:  
Monitoranzeige (Oberfläche der „Notocord hem“ Software) der Einzelsignale für Aortendruck und linken Ventrikeldruck, EKG und LVdP/dt.

Abb. 3:  
Monitoranzeige (Oberfläche der „Notocord hem“ Software) für AP (systolisch und diastolisch), LVP (systolisch und diastolisch), Herzfrequenz, QT-Intervall und Temperatur im Tagesverlauf über 24 Stunden.

### Zu 3.1

Fig. 1:  
Study design.

Fig. 2:  
Heart rate (HR) measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs.

Fig. 3:  
3.1 HR in 4 animals at day (mean 53 bpm) compared to night (mean 64 bpm) with feeding 7 hours after treatment;  $p = 0.0120$ .  
3.2 HR in 4 animals at day (mean 53 bpm) compared to night (mean 51 bpm) without feeding 7 hours after treatment;  $p = 0.2101$ .

Fig. 4:  
Systolic and diastolic arterial blood pressures measured over 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs.

Fig. 5:  
Peak systolic left ventricular pressure (LVP systolic) measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs.

Fig. 6:  
LVP dP/dt max measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs.

Fig. 7:  
Body temperature in °C measured over a 24 hours monitoring period with a fully implantable telemetric device (ITS) in freely moving Göttingen Minipigs.

Fig. 8:  
Examples of ECG waveforms in the same animal during the same experiment.  
8.1 T-wave positive.  
8.2 T-wave negative.  
8.3 T-wave  $\pm$ .  
8.4 ECG at high heart rates after dosing or feeding.

Fig. 9:  
Comparison of QT correction models.  
9.1 Uncorrected plot.  
9.2 Hyperbolic function.  
9.3 Bazett function.

### **Zu 3.2**

Fig. 1:  
The dog LVdP/dtmax-HR relationship.

Fig. 2:  
The minipig LVdP/dtmax-HR relationship.

Fig. 3:  
The Cynomolgus monkey LVdP/dtmax-HR relationship.

Fig. 4:  
The Rhesus monkey LVdP/dtmax-HR relationship.

Fig. 5:  
A typical analog recording of the LVP, AP and first derivative of the LVP signal in a conscious Labrador dog.

Fig. 6:  
A typical analog recording of the LVP, AP and first derivative of the LVP signal in a conscious Labrador dog after administration of the positive inotropic compound.

Fig. 7:  
Depicts the dose-dependent increase in myocardial contractility in conscious Labrador dogs after administration of pimobendan.

Fig. 8:  
Depicts changes in the analog LVP signal after application of the positive inotropic compound pimobendan in a conscious Labrador dog.

## 7.3 Tabellenverzeichnis

### Zu 2

Tab. 1:  
Vergleich eines Königsberg- und eines DSI Implantates.

### Zu 3.1

Tab. 1:  
Summarized values for measured hemodynamic parameters, heart rate and body temperature in the freely moving Göttingen Minipig.

Tab. 2:  
Summarized values for (manually) measured ECG intervals during 24 hours in the freely moving Göttingen Minipig.

Tab. 3:  
Parameter estimates  $a$ ,  $b$ ,  $c$  and selection criteria Pearson's correlation coefficient  $r$ , Akaike's information criterion (AIC) and PRESS RMSE derived from 1040 observations of an individual QT correction.

Tab. 4:  
Power calculation for the parameters measured with various  $n$  numbers.

### Zu 3.2

Table 1:  
The normal force-frequency relationship in different conscious animal species.

## 8. Literaturverzeichnis

**Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Überseder B, Larkin KT, 1988**

Persistent sympathetic nervous system arousal associated with tethering in  
Cynomolgus macaques

*Laboratory Animal Science*, 38(3), 279-81

**Armentano R, Cabrera-Fischer E, Breitbart G, Pichel R, Levenson J, Chau NP,  
1990**

Telemetry for aortic pressure in unrestrained animals: validation of the method over a  
wide range of blood pressure (from 40 to 200 mmHg)

*Medical Progress through Technology*, 16(3), 125-129

**Baatz G, 2002a**

Die elektrokardiographische Untersuchung. In: EKG bei Hund und Katze. Hrsg.:

Baatz G

*Schattauer Verlag, Stuttgart*

**Baatz G, 2002b**

Herzrhythmen und Rhythmusstörungen. In: EKG bei Hund und Katze. Hrsg.: Baatz G

*Schattauer Verlag, Stuttgart*

**Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch RL, Festing MF, 1995**

The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM

Workshop 11

*ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 23(3), 838-866

**Bassiouny HS, Zarins CK, Kadowaki MH, Glagov S, 1994**

Hemodynamic stress and experimental aortoiliac atherosclerosis

*Journal of Cardiovascular Surgery*, 19(3), 426-434

**Batey AJ, Doe CPA, 2002**

A method for QT correction based on beat-to-beat analysis of the QT/RR interval relationship in conscious telemetred beagle dogs

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 48(1), 11-19

**Baumann G, Ningel K, Permanetter B, 1989**

Clinical efficacy of Vetmedin (UD-CG 155 BS) in patients with chronic congestive heart failure

*Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 14(Suppl 2), 23-30

**Bazil MK, Krulan C, Webb RL, 1993**

Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats

*Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22(6), 897-905

**Becker M, Beglinger R, Youssef HA, 1984**

Isofluran beim Göttinger Miniaturschwein

*Anaesthetist*, 33(8), 377-383

**Beglinger R, Becker M, Eggenberger E, Lombard C, 1975**

Das Göttinger Miniaturschwein als Versuchstier. 1. Mitteilung: Literaturübersicht, Zucht und Haltung, Kreislaufparameter

*Research in Experimental Medicine*, 165(3), 251-263

**Beglinger R, Becker M, 1981**

6. Herz und Kreislauf. In: Das Göttinger Miniaturschwein. Hrsg.: Glodek P, Oldigs B  
*Paul Parey, Berlin und Hamburg*

**Bellinger DA, Merricks EP, Nichols TC, 2006**

Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications

*ILAR Journal*, 47(3), 243-258

**Benharkate M, Zanini V, Blanc R, Boucheix O, Coyez F, Genevois JP, Pairet M, 1993**

Hemodynamic parameters of anesthetized pigs: a comparative study of farm piglets and Göttingen and Yucatan miniature swine

*Laboratory Animal Science*, 43(1), 68-72

**Blinks JR, Koch-Weser J, 1961**

Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility

*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 134(3), 373-389

**Bollen P, Ellegaard L, 1997**

The Göttingen minipig in pharmacology and toxicology

*Pharmacology and Toxicology*, 80(Suppl 2), 3-4

**Bollen PJA, Hansen AK, Rasmussen HJ, 2000a**

Important biological features. In: The laboratory swine. Ed.: Suckow MA

*CRC Press, Boca Raton*

**Bollen PJA, Hansen AK, Rasmussen HJ, 2000b**

Veterinary care. In: The laboratory swine. Ed.: Suckow MA

*CRC Press, Boca Raton*

**Bollen PJA, Hansen AK, Rasmussen HJ, 2000c**

Husbandry. In: The laboratory swine. Ed.: Suckow MA

*CRC Press, Boca Raton*

**Bowditch H, 1871**

Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. Berichte über Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft zu Leipzig

*Mathematisch Physische Classe*, 23, 652-689

**Brockway BP, Mills PA, Azar SH, 1991**

A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry

*Clinical And Experimental Hypertension -Theory and Practice, A13(5), 885-895*

**Brockway BP, Hassler CR, 1993**

Application of radiotelemetry to cardiovascular measurements in pharmacology and toxicology. In: New technologies and concepts for reducing drug toxicity. Eds.: Salem H, Baskin SI

*CRC Press, Boca Raton*

**Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Waddell TK, Render CL, Phillipson EA, 1996**

Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure

*Journal of Applied Physiology, 81(2), 1012-1018*

**Brown JM, 1960**

Anesthesia and the contractile force of the heart

*Anesthesia and Analgesia, 39, 487*

**Buckley NM, Penefsky ZJ, Litwak RS, 1972**

Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium

*Pflugers Archiv, 332(4), 259-270*

**Bulpitt CJ, Dollery DT, Pallett JE, Chenery L, Johnston A, Kohner EM, Archer DA, 1970**

Drug infusion and monitoring of blood pressure by radio-telemetry in unrestrained pigs

*Cardiovascular Research, 4(4), 520-528*

**Bustad LK, McClellan RO, 1968**

Miniature swine: development, management, and utilization

*Laboratory Animal Care, 18(2), 280-287*

**Casadei FW, Gerold M, Baldinger E, 1972**

Implantable blood pressure telemetry system

*IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 19(5), 334-341

**Chiang, AY, Holdsworth DL, Leishman DJ, 2006**

A one-step approach to the analysis of the QT interval in conscious telemetrized dogs

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(2), 183-88

**Coutellier L, Arnould C, Boissy A, Orgeur P, Prunier A, Veissier I, Meunier-Salaün MC, 2007**

Pig`s responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period

*Applied Animal Behaviour Science*, 105(1-3), 102-114

**Covell JW, Ross J Jr, Taylor R, Sonnenblick EH, Braunwald E, 1967**

The effects of increasing frequency of contraction on the force-velocity of the left ventricle

*Cardiovascular Research*, 1(1), 2-8

**Cimini CM, Zambraski, 1985**

Non-invasive measurement in Yucatan miniature swine using tail cuff sphygmomanometry

*Laboratory Animal Science*, 35(4), 412-16

**Crick SJ, Sheppard MN, Yen Ho S, Gebstein L, 1998**

Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure

*Journal of Anatomy*, 193(Pt 1), 105-119

**Crumb W, Caverio I, 1999**

QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development

*Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(7), 270-280



**Dantzer R, Mormède P, 1986**

The behaviour of swine and its relevance to cardiovascular research. In: Swine in cardiovascular research, Vol.1. Eds.: Stanton MC, Mergmann MJ  
*CRC Press*

**Davey P, 2002**

How to correct the QT interval for the effects of heart rate in clinical studies  
*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 48(1), 3-9*

**De Pasquale MJ, Ringer LW, Winslow RL, Buchholz RA, Fossa AA, 1994**

Chronic monitoring of cardiovascular function in the conscious guinea pig using radio-telemetry  
*Clinical and Experimental Hypertension, 16(2), 245-260*

**De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N, 2000**

QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: lessons to be learned from recent experience  
*European Journal of Clinical Pharmacology, 56(1), 1-18*

**Diederer W, Kadatz R, 1981**

Effects of AR-L 115 BS, a new cardiotonic compound, on cardiac contractility, heart rate and blood pressure in anaesthetized and conscious animals  
*Arzneimittel-Forschung/Drug Research, 31(1A), 146-50*

**Dogterom P, Zbinden G, Reznik GK, 1992**

Cardiotoxicity of vasodilators and positive inotropic/vasodilating drugs in dogs: an overview  
*Critical Reviews in Toxicology, 22(3-4), 203-241*

**Dukes TW, Szabuniewicz M, 1969**

The electrocardiogram of conventional and miniature swine (*Sus scrofa*)  
*Canadian Journal of Comparative Medicine, 33(2), 118-127*

**Eckenfels A, Schuler S, 1988**

Über das normale Elektrokardiogramm des wachen Miniaturschweines

*Arzneimittel Forschung/Drug Research, 38(2), 253-259*

**Ellegaard L, Jørgensen KD, Klastrup S, Hansen AK, Svendsen O, 1995**

Haematologic and clinical chemical values in 3 and 6 month old Göttingen minipigs

*Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 22, 239-248*

**Endoh M, 2004**

Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium:

physiological and pathophysiological relevance

*European Journal of Pharmacology, 500(1-3), 73-86*

**Harmeyer J, 2000**

Herz. In: Physiologie der Haustiere. Hrsg.: Engelhardt W, Breves G

*Enke Verlag, Stuttgart*

**Erhardt W, Haberstroh J, 2004**

Anästhesietiefe und Anästhesiezeichen. In: Anästhesie und Analgesie bei Klein- und

Heimtieren. Hrsg.: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J

*Schattauer Verlag, Stuttgart*

**Erhardt W, Henke J, Kroker R, 2004**

Allgemeinanästhetika. In: Anästhesie und Analgesie bei Klein- und Heimtieren. Hrsg.:

Erhardt W, Henke J, Haberstroh J

*Schattauer Verlag, Stuttgart*

**Erhardt W, Henke J, 2004**

Versuchstiere. In: Anästhesie und Analgesie bei Klein- und Heimtieren. Hrsg.:

Erhardt W, Henke J, Haberstroh J

*Schattauer Verlag, Stuttgart*

**Erhardt W, Henke J, Carr A, Egnér B, 2007**

Technik. In: Blutdruck auf den Punkt gebracht. Hrsg.: Egnér B, Carr A, Brown S  
*VBS VetVerlag, Babenhausen*

**Ewbank R, Meese GB, 1971**

Aggressive behaviour in groups of domesticated pigs on removal and return of individuals

*Animal Production, 13, 685-693*

**Fernandez-Gil T, Focant M, Elsen F, Van Hoccke A, Vanbelle M, 1995**

Effect of finely ground wheat bran or spelt chaff on the transit time in pigs

*European Journal of Clinical Nutrition, 49(3), 182-185*

**Freeman GL, Little WC, O'Rourke R, 1987**

Influence of heart rate on left ventricular performance in conscious dogs

*Circulation Research, 61(3), 455-464*

**Löscher W, 2002**

Pharmakologie des vegetativen (autonomen) Nervensystems. In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Hrsg.: Frey HH, Löscher W  
*Enke Verlag, Stuttgart*

**Fossum TW, Baltzer WI, Miller MW, Aguirre M, Whitlock D, 2003**

A novel aortic coarctation model for studying hypertension in the pig

*Journal of Investigative Surgery, 16(1), 35-44*

**Friedrichs GS, Patmore L, Bass A, 2005**

Non-clinical evaluation of ventricular repolarization (ICH S7B): results of an interim survey of international pharmaceutical companies

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 52(1), 6-11*

**Gain MJ, Grodecki KM, Jacobs RM, Dyson D, Foster RA, 1995**

Comparison of direct and indirect blood pressures measurements in anesthetized dogs

*Canadian Journal of Veterinary Research, 59(5), 238-240*

**Gauvin DV, Tilley LP, Smith FWK, Baird TJ, 2005a**

Electrocardiogram, hemodynamics, and core body temperatures of the normal freely moving laboratory beagle dog by remote radiotelemetry

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 53(2), 128-139*

**Gauvin DV, Tilley LP, Smith FWK, Baird TJ, 2005b**

Electrocardiogram, hemodynamics, and core body temperatures of the normal freely moving cynomolgus monkey by remote radiotelemetry

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 53(2), 140-151*

**Georgiev S, Schoen A, Merckenschlager M, 1972**

Effect of various environmental temperatures and humidities of some physiologic parameters of the Göttinger minipig in various stages of growth. 3. Adults

*Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 85(21), 409-13*

**Gerber P, Schnell CR, Anzenberger G, 2002**

Behavioral and cardiophysiological responses of common marmosets (*Callithrix jacchus*) to social and environmental changes

*Primates, 43(3), 201-216*

**Gerold M, Eigenmann R, Wolfgang H, 1981**

Telemetry of cardiac left ventricular pressure in conscious dogs

*Biotelemetry Patient Monitoring, 8(1-2), 28-32*

**Glodek P, Oldigs B, 1981**

Das Göttinger Miniaturschwein, Schriftenreihe Versuchstierkunde 7

*Paul Parey, Berlin und Hamburg*

**Guiol C, Ledoussal C, Surgé JM, 1992**

A radiotelemetry system for chronic measurement of blood pressure and heart rate in the unrestrained rat - validation of the method

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 28(2), 99-105

**Guth BD, Germeyer S, Kolb W, Markert M, 2004**

Developing a strategy for the nonclinical assessment of proarrhythmic risk of pharmaceuticals due to prolonged ventricular repolarization

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 49(3), 159-169

**Harkin P, Pagel P, Tessmer J, Warltier D, 1995**

Systemic and coronary hemodynamic actions and left ventricular functional effects of levosimendan in conscious dogs

*Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 26(2), 179-188

**Harvey-Clark CJ, Giles K, Riggs KW, 2000**

Transdermal fentanyl compared with parenteral buprenorphine in post-surgical pain in swine: a case study

*Laboratory Animals*, 34(4), 386-398

**Hassimoto M, Harada T, Kaga N, Murano H, Obata M, 2002**

Accurate evaluation of QT interval in conscious rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) by use of Holter ECG

*Journal of Electrophysiology*, 35(4), 333-342

**Hassimoto M, Harada T, 2003**

Use of a telemetry system to examine recovery of the cardiovascular system after excitement induced by handling stress in a conscious *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*)

*Journal of Medical Primatology*, 32(6), 346-352

**Hassler CR, Lutz GA, Linebaugh R, Cummings KD, 1979**

Identification and evaluation of noninvasive blood pressure measuring techniques

*Toxicology and Applied Pharmacology*, 47(2), 193-201

**Hauser D, Stade M, Schmidt A, Hanauer G, 2005**

Cardiovascular parameters in anaesthetized guinea pigs: a safety pharmacology screening model

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52(1), 106-114

**Haverkamp W, Haverkamp F, Breithardt G, 2002**

Medikamentenbedingte QT-Verlängerung und Torsades de Pointes

*Deutsches Ärzteblatt*, 99(28-29), 1972-1979

**Henke J, Brill T, Feußner H, 2005**

Experimentelle Medizin: Vom Tiermodell zur Computeranimation

*Arzt und Krankenhaus*, 11, 329-335

**Henke J, Erhardt W, 2001**

Welche Analgetika stehen zur Verfügung? In: Schmerzmanagement bei Klein- und Heimtieren. Hrsg: Henke J, Erhardt W

*Enke Verlag, Stuttgart*

**Hermansen K, Pedersen LE, Olesen HO, 1986**

The analgesic effect of buprenorphine, etorphine and pethidine in the pig: a randomized double blind cross-over study

*Acta Pharmacological et Toxicological*, 59(1), 27-35

**Hetts S, Clark JD, Calpin JP, Arnold CE, Mateo JM, 1992**

Influence of housing conditions on Beagle behaviour

*Applied Animal Behaviour Science*, 34(1-2), 137-155

**Higgins CB, Vatner SF, Franklin D, Braunwald E, 1973**

Extend of regulation of the heart's contractile state in the conscious dog by alteration in the frequency of contraction

*Journal of Clinical Investigation*, 52(5), 1187-1194

**Hohns H, 1970**

Physiologische Untersuchungen am Herz-Kreislauf-System bei Schweinen verschiedener Rassen

*Schriftenreihe des Max-Planck-Instituts für Tierzucht und Tierernährung, Heft 51, Mariensee*

**Holzgreffe HH, Cavero I, Gleason CR, Warner WA, Buchanan LV, Gill MW, Burkett DE, Durham SK, 2007**

Novel probabilistic method for precisely correcting the QT interval for heart rate in telemetered dogs and Cynomolgus monkeys

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 55(2), 159-175*

**Horacek T, 1998**

Grundlagen. In: Der EKG-Trainer. Hrsg.: Horacek T  
*Georg Thieme Verlag, Stuttgart*

**Hubrecht RC, 1993**

A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs

*Applied Animal Behaviour Science, 37(4), 345-361*

**Hughes HC, 1986**

Swine in cardiovascular research

*Laboratory Animal Science, 36(4), 348-350*

**Humphrey SJ, 1998**

Cardiovascular and pharmacokinetic interactions between nicorandil and adjunctive propranolol, atenolol or diltiazem in conscious dogs

*Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology, 20(9), 779-791*

**Jeal W, Benfield P, 1997**

Transdermal fentanyl. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in pain control

*Drugs, 53(1), 109-138*

**Jones RD, Stuart BP, Greufe NP, Landes AM, 1999**

Electrophysiology and pathology evaluation of the Yucatan pig as a non-rodent animal model for regulatory and mechanistic toxicology studies

*Laboratory Animals*, 33(4), 356-365

**Kano M, Toyoshi T, Iwasaki S, Dato M, Shimizu M, Ota T, 2005**

QT PRODACT: Usability of miniature pigs in safety pharmacology studies: assessment for drug-induced QT interval prolongation

*Journal of Pharmacological Sciences*, 99(5), 501-511

**Katz AM, 2001**

The electrocardiogram. In: Physiology of the heart. Ed.: Katz AM

*Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*

**Khan MA, 1984**

Minipig: advantages and disadvantages as a model in toxicity testing

*Journal of the American College of Toxicology*, 3(6), 337-342

**Kim EJ, Seo JW, Hwang JY, Han SS, 2005**

Effects of combined treatment with sildenafil and itraconazole on the cardiovascular system in telemetered conscious dogs

*Drug and Chemical Toxicology*, 28(2), 177-186

**Klumpp A, Trautmann T, Markert M, Guth B, 2006**

Optimizing the experimental environment for dog telemetry studies

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(2), 141-149

**Koch-Weser J, Blinks JR, 1963**

The influence of the interval between beats on myocardial contractility

*Pharmacological Reviews*, 15, 601-652



**Koch-Weser J, 1965**

Role of norepinephrine release in the interval-strength relationship of heart muscle  
*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 150(2), 184-189

**Kramer K, 2000**

Applications and evaluation of radio-telemetry in small laboratory animals  
*PhD thesis (ISBN 90-393-2313-5), Universiteit Utrecht, Niederlande*

**Kramer K, Kinter L, Brockway BP, Voss HP, Remie R, Van Zutphen BLM, 2001**

The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances  
*Contemporary Topics*, 40(1), 8-16

**Krohn TC, Hansen AK, Dragsted N, 2003**

Telemetry as a method for measuring the impact of housing conditions on rat's welfare  
*Animal Welfare*, 12(1), 53-62

**Kubo SH, 1994**

Inotropic agents with calcium-sensitizing properties: clinical and hemodynamic effects of pimobendan  
*Coronary Artery Disease*, 5(2), 119-126

**Kusakabe K, Kamizono T, Fukuda H, 1990**

Study of the ambulatory ECG on the dog. 1. Lead method and jacket putting applied to the ambulatory ECG recording  
*Advances in Animal Cardiology*, 23, 29-37

**Kuwahara M, Suzuki A, Tsutsumi H, Tanigawa M, Tsubone H, Sugano S, 1999**

Power spectral analysis of heart rate variability for assessment of diurnal variation of autonomic nervous activity in miniature swine  
*Laboratory Animal Science*, 49(2), 202-208

**Kuwahara M, Tsujino Y, Tsubone H, Kumagai E, Tsutsumi H, Tanigawa M, 2004**

Effects of pair housing on diurnal rhythms of heart rate and heart rate variability in miniature swine

*Experimental Animals*, 53(4), 303-309

**Kvetnansky R, Sun CL, Lake CR, Thoa N, Torda T, Kopin IJ, 1978**

Effect of handling and forced immobilisation on rat plasma level of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase

*Endocrinology*, 103(5), 1868-1874

**Lal B, Bhattacharya BK, Dadkar NK, 1981**

Cardiovascular and antihypertensive activity of the new vasodilator 9,10-dimethoxy-2-mesitylimino-3-methyl-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido (6,1-a) isoquinolin-4-one hydrochloride (HL 725)

*IRCS Medical Science*, 9(4), 325-326

**Larks SD, Wescott RB, Larks GG, 1971**

Electrocardiograph studies of miniature swine: normal values

*Laboratory Animal Science*, 21(4), 553-557

**Lehmann H, 1998**

The minipig in general toxicology

*Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 25(Suppl 1), 59-62

**Lehmann-Drache C, 2005**

Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkung von Pyruvat am isolierten perfundierten Schweineherzen unter Ischämiebedingungen

*Veterinärmedizinische Dissertation, FU Berlin*

**Leucht W, Gregor G, Stier H, 1982**

Das Miniaturschwein. Einführung in die Versuchstierkunde Band VI

*VEB Gustav Fischer Verlag, Jena*

**Lin SY, Hou SJ, Hsu TH, Yeh FI, 1992**

Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies

*Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 14(8), 645-654

**Lin JH, Chu RM, Yang PC, Weng CN, Lin PH, Liu SK, Mao SJT, 1999**

Influence of age on the electrocardiographic waves in Taiwanese Lan-Yu miniature pigs

*Contemporary Topics*, 38(5), 36-41

**Livezey GT, Balabkins N, Vogel WH, 1987**

The effect of ethanol (alcohol) and stress on plasma catecholamine levels in individual female and male rats

*Neuropsychobiology*, 17(4), 193-198

**Lückmann J, 1968**

Die Herzfrequenz des Schweines

*Veterinärmedizinische Dissertation, Universität Hannover*

**Madsen LW, Jensen AL, Larsen S, 1998**

Spontaneous lesions in clinically healthy, microbiologically defined Göttingen minipigs

*Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 3(25), 159-166

**Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Vicente Nogués, 2006**

The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges

*Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(5-6), 341-345

**Mahler R, Yoran C, Ross J Jr, 1974**

Inotropic effect of tachycardia and poststimulation potentiation in the conscious dog

*American Journal of Physiology – Legacy*, 227(3), 569-575

**Main BW, Means JR, Rinkema LE, Smith WC, Sarazan RD, 1996**

Cardiovascular effects of the macrolide antibiotic tilmicosin, administered alone and in combination with propranolol or dobutamine, in conscious unrestrained dogs  
*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(3), 225-232

**Malavasi LM, Nyman G, Augustsson H, Jacobson M, Jensen-Waern M, 2005**

Effects of epidural morphine and transdermal fentanyl analgesia on physiology and behaviour after abdominal surgery in pigs  
*Laboratory Animals*, 40(1), 16-27

**Malik M, 2001**

Problems of heart rate correction in assessment of drug-induced QT interval prolongation  
*Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12(4), 411-420

**Malik M, Camm AJ, 2001**

Evaluation of drug-induced QT interval prolongation. Implications for drug approval and labelling  
*Drug Safety*, 24(5), 323-351

**Mallia T, 2007**

Refining telemetry surgery  
*Animal Technology and Welfare*, 81-83

**Markert M, Klumpp A, Trautmann T, Guth B, 2004**

A novel propellant-free inhalation drug delivery system for cardiovascular drug safety evaluation in conscious dogs  
*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 50(2), 109-119

**Markert M, Klumpp A, Trautmann T, Mayer K, Stubhan M, Guth B, 2007**

The value added by measuring myocardial contractility 'in vivo' in safety pharmacological profiling of drug candidates  
*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(2), 203-211

**Matsunaga T, Mitsui T, Harada T, Inokuma M, Murano H, Shibutani Y, 1997**

QT corrected for heart rate and relation between QT and RR intervals in Beagle dogs

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 38(4), 201-209

**Merriam-Webster, 2003**

Merriam-Webster's Collegiate Dictionary

*Merriam-Webster, Springfield*

**Meyners M, Markert M, 2004**

Correcting the QT interval for changes in HR in pre-clinical drug development

*Methods of Information in Medicine*, 43(5), 445-450

**Miller ER, Ullrey DE, 1987**

The pig as a model for human nutrition

*Annual Review of Nutrition*, 7, 361-382

**Mitchell JH, Wallace AG, Skinner NS Jr, 1963**

Intrinsic effects of heart rate on left ventricular performance

*American Journal of Physiology*, 205, 41-48

**Mitchell JR, Sas R, Zuege DJ, Doig CJ, Smith ER, Whitelaw WA, Tyberg JV, Belenkie I, 2005**

Ventricular interaction during mechanical ventilation in closed-chest anesthetized dogs

*Canadian Journal of Cardiology*, 21(1), 73-81

**Miura T, Miyazaki S, Guth BD, Indolfi C, Ross J Jr, 1994**

Heart rate and force-frequency effects on diastolic function of the left ventricle in exercising dogs

*Circulation*, 89(5), 2361-2368

**Miyazaki H, Tagawa M, 2002**

Rate-correction technique for QT interval in long-term telemetry ECG recording in Beagle dogs

*Experimental Animals*, 51(5), 465-475

**Morgan JP, Blinks JR, 1982**

Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients in the cat papillary muscle

*Canadian Journal of Pharmacology and Physiology*, 60(4), 524-528

**Nahas K, Baneux P, Detweiler D, 2002**

Electrocardiographic monitoring in the Göttingen minipig

*Comparative Medicine*, 52(3), 258-264

**Nickel R, Schummer A, Seiferle E, 1996**

Herz. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 3. Hrsg.: Habermehl KH, Vollmerhaus B, Wilkens H, Waibl H

*Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin*

**Noble M, Wyler J, Milne E, Trenchard D, Guz A, 1969**

Effect of changes in heart rate on left ventricular performance in conscious dogs

*Circulation Research*, 24(2), 285-295

**Ollerstam A, Visser S, Persson A, Eklund G, Nilsson L, Forsberg T, Wiklund S, Gabrielsson J, Duker G, Al-Saffar A, 2005**

Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of drug-induced effect on the QT interval in conscious telemetered dogs

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 53(2), 174-183

**Paddleford RR, 1999**

Analgesia and pain management. In: Manual of small animal anaesthesia. Ed.: Paddleford RR

*W.B. Saunders, Philadelphia, London*

**Patrick TA, Vatner SF, Kemper WS, Franklin D, 1974**

Telemetry of left ventricular diameter and pressure measurements from unrestrained animals

*Journal of Applied Physiology*, 37(2), 276-281

**Petterson JC, Linartz RR, Hamlin RL, Stoll RE, 1988**

Noninvasive measurement of systemic arterial blood pressure in the conscious Beagle dog

*Fundamental and Applied Toxicology*, 10(1), 89-97

**Preckel B, Müllenheim J, Hoff J, Obal D, Heiderhoff M, Thämer V, Schlack W, 2004**

Haemodynamic changes during halothane, sevoflurane and desflurane anaesthesia in dogs before and after the induction of severe heart failure

*European Journal of Anaesthesiology*, 21(10), 797-806

**Priori SG, Bloise R, Crotti L, 2001**

The long QT-syndrome

*Europace*, 3, 16-27

**Pschyrembel W, 2007**

Klinisches Wörterbuch Pschyrembel

*De Gruyter, Berlin*

**Pugsley MK, Curtis MJ, 2006**

Safety pharmacology in focus: new methods developed in the light of the ICH S7B guidance document

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(2), 94-98

**Riviere JE, Papich MG, 2001**

Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications

*Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 175-203

**Rollin BE, 1986**

Moral, social and scientific aspects of the use of swine in research. In: Swine in biomedical research. Ed.: Tumbleson ME  
*Plenum Press, New York*

**Rosenblueth A, Alanis J, Rubio R, Lopez E, 1959**

The two staircase phenomena  
*Archives Internationales de Physiologie et Biochimie, 67(3), 374-383*

**Ross J Jr, Covell W, Sonnenblick EH, 1967**

The mechanics of left ventricular contraction in acute experimental cardiac failure  
*Journal of Clinical Investigation, 46(3), 299-312*

**Russell WMS, Burch PH, 1959**

Principles of humane experimental technique  
*Universities Federation of Animal Welfare, Hertfordshire*

**Sadoff DA, Fischel RJ, Carroll E, Brockway B, 1992**

Chronic blood pressure radiotelemetry in Rhesus macaques  
*Laboratory Animal Science, 42(1), 78-80*

**Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M, 2006**

hERG potassium channels and cardiac arrhythmia  
*Nature, 440(7083), 463-469*

**Sarazan RD, 1993**

Chronically instrumented conscious dog model in cardiovascular toxicology studies  
*Toxicology Methods, 3(3), 195-211*

**Sato K, Hitoshi K, Sato S, 1994**

Evaluation of a new method using telemetry for monitoring the left ventricular pressure in free-moving rats  
*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 31(4), 191-198*



**Schmidt W, Dehn A, Hutter JF, 1988**

A central venous catheter for long-term studies on drug effects and pharmacokinetics in Munich minipigs

*European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 13(2), 143-147

**Schnell CR, Wood JM, 1993**

Measurement of blood pressure and heart rate by telemetry in conscious, unrestrained Marmosets

*American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 264, H1509-H1516

**Segel N, Hudson WA, Harris P, Bishop JM, 1964**

The circulatory effects of electrically induced changes in ventricular rate at rest and during exercise in complete heart block

*Journal of Clinical Investigation*, 43(8), 1541-1550

**Shiina H, Sugiyama A, Takahara A, Satoh Y, Hashimoto K, 2000**

Comparison of the electropharmacological effects of verapamin and propranolol in the halothane-anesthetized in vivo canine model under monophasic action potential monitoring

*Japanese Circulation Journal*, 64(10), 777-782

**Siegel JH, 1969**

The myocardial contractile state and its role in the response to anesthesia and surgery

*Anesthesiology*, 30(5), 519-564

**Silbernagel S, 2005**

Herz und Kreislauf. In: Taschenatlas der Pathophysiologie. Hrsg.: Silbernagel S, Lang F

*Georg Thieme Verlag, Stuttgart*

**Smith AC, Spinale FG, Swindle MM, 1990**

Cardiac function and morphology of Hanford miniature swine and Yucatan miniature and Micro swine

*Laboratory Animal Science*, 40(1), 47-50

**Soloviev MV, Hamlin RL, Shellhammer LJ, Barrett RM, Wally RA, Birchmeier PA, Schaefer GJ, 2006**

Variations in hemodynamic parameters and ECG in healthy, conscious, freely moving telemetrized beagle dogs

*Cardiovascular Toxicology*, 6(1), 51-62

**Sonnenblick EH, Braunwald E, Williams JF Jr, Glick G, 1965**

Effects of exercise on myocardial force-velocity relations in intact unanesthetized man: relative role of changes in heart rate, sympathetic activity, and ventricular dimensions

*Journal of Clinical Investigation*, 44(12), 2051-2062

**Spence S, Soper K, Hoe TM, Coleman J, 1998**

The heart rate-corrected QT interval of conscious Beagle dogs: a formula based on analysis of covariance

*Toxicological Sciences*, 45(2), 247-258

**Suga H, Sagawa K, Shoukas AA, 1973**

Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio

*Circulation Research*, 32(3), 314-322

**Suzuki A, Tsutsumi H, Kusakabe K., Kuwahara M, Sugano S, Tanigawa M, 1998**

Establishment of a 24-hour electrocardiogram recording system using a Holter recorder for miniature swine

*Laboratory Animals*, 32(2), 165-172

**Svensden O, 2006**

The minipig in toxicology

*Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(5-6), 335-339

**Swindle MM, 2007**

Cardiothoracic and vascular surgery. In: Swine in the laboratory. Surgery, anesthesia, imaging and experimental techniques. Ed.: Swindle MM

*CRC Press*

**Takahara A, Dohmoto H, Yoshimoto R, Sugiyama A, Hashimoto K, 2001**

Cardiovascular action of a cardioselective Ca<sup>2+</sup> channel blocker AH-1058 in conscious dogs assessed by telemetry

*European Journal of Pharmacology*, 413(1), 101-108

**Taylor GL, Patel B, Sullivan AT, 2007**

Evaluation of blood flow parameters in addition to blood pressure and electrocardiogram in the conscious telemetered beagle dog

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(2), 212-217

**Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, Beekman JD, de Pater G, van Opstal J, Volders PG, Vos MA, 2004**

Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs

*Circulation*, 110(16), 2453–2459

**Timmis AD, 1993**

The electrocardiogram and chest X-ray. In: Essentials of cardiology. Eds.: Timmis AD, Nathan AW

*Blackwell Scientific, Oxford*

**Toyoshima S, Kanno A, Kitayama T, Sekiya K, Nakai K, Haruna M, Mino T, Yamamoto K, 2005**

QT PROTECT: In vivo QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals

*Journal of Pharmacological Sciences*, 99(5), 459-471

**Truett AA, West DB, 1995**

Validation of a radiotelemetry system for continuous blood pressure and heart rate monitoring in dogs

*Laboratory Animal Science*, 45(3), 299-302

**Tsutsumi H, Morikawa N, Niki R, Tanigawa M, 2001**

Acclimatisation and response of minipigs towards humans

*Laboratory Animals*, 35(3), 236-242

**Vainio OM, Bloor BC, Kim C, 1992**

Cardiovascular effects of a ketamine-medetomidine combination that produces deep sedation in Yucatan mini swine

*Laboratory Animal Science*, 42(6), 582-588

**Van den Berg AA, Honjol NM, 1993**

Effects on heart rate, blood pressure and bronchomotor tone of halothane, enflurane and isoflurane in young fit patients

*Middle East Journal of Anesthesiology*, 12(3), 271-286

**Van Citters RL, Franklin DL, Rushmer RF, 1964**

Left ventricular dynamics in dogs during anesthesia with alpha-chloralose and sodium pentobarbital

*American Journal of Cardiology*, 13(3), 349-354

**Van Vliet BN, Chafe LL, Antic V, Schnyder-Candrian S, Montani JP, 2000**

Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure

*Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(2), 361-373

**Vatner SF, Patrick TA, 1974**

Radio telemetry of blood flow and pressure measurements in untethered conscious animals

*Bibliotheca Cardiologica, 34, 1-11*

**Voigt D, 2004**

Studie zur Wirksamkeit von Finadyne® RP zur unterstützenden Behandlung von fieberhaften Puerperalstörungen des Rindes

*Veterinärmedizinische Dissertation, FU Berlin*

**Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD, 1986**

A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man

*Cardiovascular Research, 20(12), 907-917*

**Weiskopf RB, Eger EI, Holmes MA, Rampil IJ, Johnson B, Joanna GB, Yasuda N, Targ AG, 1989**

Epinephrine-induced premature ventricular contractions and changes in arterial blood pressure and heart rate during I-653, isoflurane, and halothane anesthesia in swine

*Anesthesiology, 70(2), 293-298*

**Wilkinson AC, Thomas ML, Morse BC, 2001**

Evaluation of a transdermal fentanyl system in Yucatan miniature pigs

*Laboratory Animal Science, 40(3), 12-16*

**Woodworth RS, 1902**

Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause, of the heart

*American Journal of Physiology, 8, 213-249*

**Yamabe M, Sanyal, SN, Miyamoto S, Hadama T, Isomoto S, Ono K, 2007**

Three different bradycardic agents, zatebradine diltiazem and propranolol, distinctly modify heart rate variability and QT-interval variability

*Pharmacology, 80(4), 293-303*

**Zambraski EJ, Fuchs B, 1980**

Resting metabolism of Yucatan miniature swine

*Laboratory Animal Science, 30(1), 51-53*

## Danksagung

Herrn Prof. Bernhard Aigner gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung in Fragen der Durchführung der Arbeit sowie für die Korrektur.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Julia Henke für die jederzeit gewährte kompetente Beratung und ihre unentbehrliche Hilfe bei der Umsetzung dieser Arbeit bedanken.

Michael Markert möchte ich sehr herzlich danken, für die Aufnahme in sein Team und die Ausarbeitung des Themas. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Weiterhin gebührt Dr. Brian Guth ein großer Dank für die Betreuung der Doktorarbeit in seiner Gruppe, sowie für die Hilfe bei der Umsetzung und sprachlichen Ausarbeitung der Publikationen.

Für die Integration ins „Dream Team“, die Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Arbeit und bei der Betreuung unserer Tiere geht mein besonderer Dank an Karin Mayer, Anja Klumpp und Thomas Trautmann.

Dr. Lukas Schmid danke ich für seine fachlichen Ratschläge, seine kritische Korrektur und nicht zuletzt für die „mentale“ Betreuung während dieser Zeit.

Allen Tierpflegern sei herzlich gedankt für uneingeschränkten Einsatz bei der Umsetzung der Projekte für diese Arbeit und die vielen wertvollen Ideen und Tipps rund um das Wohlergehen der Tiere.

Weiterhin bedanke ich mich bei Kerstin Buck für fachlichen und freundschaftlichen Beistand und fürs Korrekturlesen sämtlicher schriftlicher Dokumente.

Danke an Gertraude Zachmann, Angelika Bader, Gariela Maier, Sabine Bürger, Dietlinde Dom-Miehle und Josef Simon die immer zur Stelle waren.

Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir immer zur Seite stehen.

Mathias Wetzel danke ich für seine Hilfe im Kampf gegen den Computer. Außerdem für seine seelische Unterstützung und die unendliche Geduld.