

Technische Universität München  
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des  
Deutschen Herzzentrums München des Freistaates Bayern

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

## **Elektrophysiologische Umbauprozesse des humanen atrialen Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz**

### **Beteiligung des L-Typ-Kalziumstroms und seiner β-adrenergen Regulation**

Mathias C. Busch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation 1. apl. Prof. Dr. C. G. Schmitt

2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig

3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, em.,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 02.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 15.12.2004 angenommen.

# Inhalt

1	Einleitung.....	4
1.1	Arrhythmogene Bedeutung der Herzinsuffizienz.....	4
1.2	Bedeutung des L-Typ Kalziumstroms bei Arrhythmien und Herzinsuffizienz .....	5
1.2.1	Grundlegende Physiologie.....	5
1.2.2	Elektrophysiologisches Remodeling bei Vorhofflimmern.....	6
1.2.3	Kalziumüberladung.....	7
1.2.4	Herzinsuffizienz.....	8
1.3	Fragestellung .....	9
1.3.1	Übergeordnete Fragestellung.....	9
1.3.2	Datenlage vor Versuchsbeginn .....	9
1.3.3	Fragestellungen dieser Arbeit.....	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Patientenauswahl .....	13
2.2	Materialgewinnung .....	15
2.3	Zellisolation.....	15
2.4	Elektrophysiologische Messungen .....	16
2.4.1	Patch-clamp Technik.....	16
2.4.2	Versuchsaufbau.....	17
2.4.3	Versuchsablauf.....	18
2.4.4	Pulsprotokolle und deren Auswertung .....	19
2.5	Lösungen.....	21
2.5.1	Kalziumfreie Elektrolytlösung.....	22
2.5.2	KB-Medium.....	22
2.5.3	Interne Lösung .....	22
2.5.4	Externe Lösung .....	23
2.5.5	Isoproterenol Lösungen.....	23
2.6	Statistische Auswertung.....	23
3	Ergebnisse .....	25
3.1	Gruppen $LVEF \geq 60\%$ und $LVEF \leq 45\%$ .....	25
3.1.1	Klinische Charakteristika der Patientengruppen.....	25
3.1.2	Basalstromgröße und Zellkapazität.....	27
3.1.3	Stimulation mit Isoproterenol.....	29

3.1.4	Spannungsabhängigkeit.....	32
3.1.5	Kalziumstrominaktivierung.....	34
3.2	Korrelation mit Herzinsuffizienzparameter.....	39
3.2.1	Stromdichte.....	39
3.2.2	Steigerungsfaktoren.....	40
3.3	Spenderherzen und deren Vergleich mit der Gruppe $\geq 60\%$ .....	42
3.3.1	Basalstromgröße und Zellkapazität.....	42
3.3.2	Stimulation mit Isoproterenol.....	44
3.3.3	Spannungsabhängigkeit.....	45
3.3.4	Kalziumstrominaktivierung.....	46
4	Diskussion.....	50
4.1	Basaler L-Typ-Kalziumstrom.....	50
4.2	$\beta$ -adrenerge Stimulation.....	53
4.3	Patientenauswahl.....	56
4.3.1	Herzinsuffizienz- und Kontrollgruppe.....	56
4.3.2	Spenderherzen.....	57
4.4	Methodische Einschränkungen.....	58
5	Zusammenfassung.....	60
6	Verzeichnisse.....	61
6.1	Abkürzungen.....	61
6.2	Abbildungen.....	62
6.3	Tabellen.....	64
6.4	Literatur.....	66
7	Danksagung.....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Arrhythmogene Bedeutung der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist die gemeinsame Endstrecke vieler kardialer Erkrankungen. Außerdem ist sie selbst Risikofaktor für ventrikuläre<sup>129</sup> und atriale Arrhythmien<sup>6;126</sup>. Vorhofflimmern ist in diesem Kontext, insbesondere auch durch die epidemiologische Bedeutung, von besonderem Interesse. Dabei besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und der Häufigkeit von Vorhofflimmern<sup>6;7;20;24;27;28;116;117;120;126</sup>.

Da nicht nur eine Herzinsuffizienz das Auftreten von Vorhofflimmern begünstigt, sondern auch umgekehrt Vorhofflimmern die Manifestation einer Herzinsuffizienz fördern kann<sup>20;28</sup>, kommt es bei vielen Patienten zu einem Teufelskreis, der an beiden Ansatzpunkten gehemmt werden muss. Daher ist die Kenntnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie von besonderer Wichtigkeit. Hier sollen vor allem wichtige Mechanismen erörtert werden, welche zur gesteigerten Prävalenz von Vorhofflimmern bei Herzinsuffizienz beitragen.

Multiple, kreisende, elektrische Erregungswellen im Vorhof<sup>81;82</sup> sind die ursächlichen Mechanismen zur Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern. Diese sog. Mikroentrywellen führen zur charakteristischen chaotischen hochfrequenten (300-500/min) elektrischen Aktivität des Vorhofs.

Eine atriale Dilatation, welche aufgrund der diastolischen atrialen Druckverhältnisse bei Herzinsuffizienz entstehen kann, erlaubt schon aus geometrischen Gesichtspunkten gehäufte Mikroentrywellen und stellt so ein Substrat für Vorhofflimmern dar<sup>76</sup>. Zusätzlich führen atriale Dilatation und Veränderungen der Wandspannung zu heterogenen elektrophysiologischen Veränderungen am Vorhof<sup>57;101;115</sup>, welche die Auslösbarkeit von Vorhofflimmern deutlich steigern<sup>108</sup>.

Durch die neurohumoralen Veränderungen bei der Herzinsuffizienz, insbesondere die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es zu einem Umbau der atrialen extrazellulären Matrix<sup>71;123</sup>. Es entwickelt sich eine interstitielle Fibrose, welche eine Heterogenität der atrialen Repolarisation erzeugt, die wiederum die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt<sup>69;89;128</sup>.

Neben dem Substrat sind bei Herzinsuffizienz auch Auslösemechanismen für Vorhofflimmern verändert. So führt eine Wanddehnung zu einer erhöhten ektopen Aktivität<sup>30;104</sup>. In diesem Zusammenhang ist eine deutliche Zunahme der Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bei Herzinsuffizienz von Bedeutung<sup>70;88</sup>. Diese führt zu einer

Zunahme von verspäteten Nachdepolarisationen und somit zu einer erhöhten Rate an supraventrikulären Extrasystolen<sup>5;11;88;100</sup>.

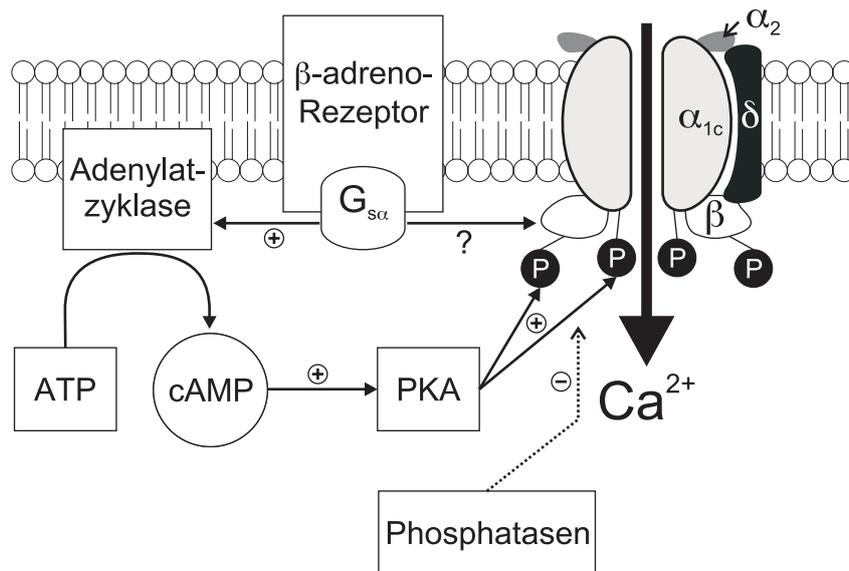
Zu weiteren Alterationen der zellulären Elektrophysiologie bei Herzinsuffizienz gehören Änderungen der Ionenkanalströme atrialer Kardiomyozyten. Neben nachgewiesenen Einflüssen auf Kaliumströme<sup>54;62;65;70;100;107;109;127</sup> ist auch der L-Typ-Kalziumstrom verändert, der in dieser Arbeit eingehender untersucht werden soll. Trotz dieser Erkenntnisse sind bei der Herzinsuffizienz die Bedeutung des atrialen elektrophysiologischen Remodelings und die zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend ungeklärt<sup>75;87</sup>.

## **1.2 Bedeutung des L-Typ Kalziumstroms bei Arrhythmien und Herzinsuffizienz**

### **1.2.1 Grundlegende Physiologie**

In Kardiomyozyten wurden zwei verschiedene Kalziumkanäle identifiziert: T-Typ und L-Typ<sup>3;41;92</sup>. Diese Bezeichnung rührt von der betreffenden Kanalkinetik und Leitfähigkeit her<sup>93</sup>. Während der T-Typ transient aktiviert wird und eine kleine Leitfähigkeit zeigt (transient opening, tiny conductance), zeigt der L-Typ eine lang anhaltende Öffnung und große Leitfähigkeit (long-lasting opening, large conductance). Der charakteristische transmembranäre L-Typ-Kalziumstrom einer Zelle stellt den Summationsstrom aller über die einzelnen Kalziumkanäle fließenden Ionen dar.

Die Funktion und pharmakologische Beeinflussbarkeit des L-Typ-Kalziumkanals ist in den letzten 20 Jahren ausführlich charakterisiert und der strukturelle Aufbau detailliert aufgeklärt worden<sup>19;21;48;85;118</sup>. Zusammenfassend besteht der kardiale L-Typ-Kalziumkanal aus mindestens vier Untereinheiten ( $\alpha_{1c}$ ,  $\beta$  und  $\alpha_2\text{-}\delta$ ). Dabei ist  $\alpha_{1c}$  die porenbildende Komponente und Angriffspunkt von kalziumkanalblockierenden Pharmaka. Über Phosphorylierung von  $\alpha_{1c}$  und der regulatorischen Untereinheit  $\beta$  kommt es zur  $\beta$ -adrenergen Stimulation des Kanals über den Weg der G-Protein-/cAMP-abhängigen Aktivität der Proteinkinase A<sup>4;103;114;121;122</sup>.



**Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau des L-Typ-Kalziumkanals und Regulation über die β-adrenerge Signalkaskade<sup>19;85</sup> (α<sub>1c</sub>, β, α<sub>2</sub>-δ: Untereinheiten des L-Typ-Kalziumkanals; G<sub>sα</sub>: G-Protein; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A)**

Der L-Typ-Kalziumstrom ist am Kardiomyozyten in zweierlei Weise von zentraler Bedeutung. Einerseits ist er wesentlich an der Entstehung des Aktionspotentials beteiligt. Im Zusammenspiel mit anderen Ionenströmen spielt er eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Aktionspotentialplateaus und somit der Refraktärzeit der Kardiomyozyten<sup>8;48;102</sup>. Andererseits bewirkt der Kalziumeinstrom durch den L-Typ-Kanal über die Triggerung einer sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung die elektromechanische Koppelung, die zur Kontraktion des Kardiomyozyten führt<sup>8;130</sup>.

### 1.2.2 Elektrophysiologisches Remodeling bei Vorhofflimmern

Die oben beschriebenen Mikroentrywellen bei Vorhofflimmern (Kapitel 1.1, S. 4) können sich bei einer Verkürzung des Aktionspotentials und somit der Refraktärzeit der atrialen Kardiomyozyten leichter ausbilden<sup>89;134</sup>. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass in diesem Zusammenhang ein Umbauprozess auf Ebene der Ionenkanäle des atrialen Kardiomyozyten eine entscheidende Disposition für Vorhofflimmern darstellt<sup>136</sup>. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird als elektrophysiologisches Remodeling bezeichnet. Der Einfluss des elektrophysiologischen Remodelings auf das Aktionspotential kann diese Disposition erklären. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass es durch Remodeling zu einer absoluten Verkürzung der Aktionspotentialdauer und einer Abnahme der Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer von der Herzfrequenz kommen kann<sup>15;128</sup>.

Tachykarde Dauerstimulation, beziehungsweise das Bestehen von Vorhofflimmern an sich, kann ein elektrophysiologisches Remodeling induzieren. Durch diese Mechanismen trägt das Vorhofflimmern somit zu seiner Selbsterhaltung bei. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte dies am Ziegen-<sup>128</sup> und Hundemodell<sup>134</sup> demonstriert werden. Ebenfalls existieren gute Daten, welche Veränderungen bei Vorhofflimmern auf der Ionenkanalebene des humanen atrialen Kardiomyozyten nachweisen. Im Einzelnen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es zu einer Verminderung des kalziumabhängigen transienten Kaliumauswärtsstroms ( $I_{to}$ ), des ultraschnellen verzögerten Gleichrichter-Kaliumauswärtsstroms ( $I_{Kur}$ )<sup>125</sup> und des Kalziumeinwärtsstroms<sup>14;124</sup> kommt.

Der L-Typ Kalziumkanal nimmt im Rahmen des elektrophysiologischen Remodelings eine entscheidende Stellung ein. Hordorf und Mitarbeiter fanden, dass sich das Aktionspotential der Zellen gesunder Vorhöfe durch den Kalziumantagonisten Verapamil beeinflussen lässt, nicht jedoch das von Zellen dilatierter Vorhöfe<sup>50</sup>. Die Studie von Yue und Mitarbeiter<sup>134</sup>, in welcher das Remodeling im Hundemodell durch schnelle Vorhofstimulation erzeugt wurde, lässt folgende Schlüsse zu: Die beobachtete Verkürzung der Refraktärzeit beruht vor allem auf Veränderungen bei der zellulären Repolarisation. Nifedipin verkürzt das Aktionspotential normaler Zellen auf solche Weise, wie es im Rahmen des elektrischen Remodelings geschieht. Andererseits hat Nifedipin keinen Einfluss mehr auf die Zellen nach dem Remodelingprozess. Allerdings kann bei diesen Zellen durch den  $Ca^{2+}$ -Kanal-Agonisten Bay K8644 ein Aktionspotential erzeugt werden, welches dem normaler Zellen entspricht. Daher können die Veränderungen des Aktionspotentials und der Refraktärzeit auf eine Verringerung des L-Typ-Kalziumstroms zurückgeführt werden<sup>95</sup>. Diese Schlussfolgerungen konnten experimentell für chronisches, nicht jedoch für intermittierendes Vorhofflimmern bestätigt werden<sup>113</sup>. Diese Studie zeigte auch, dass trotz Reduktion des L-Typ-Kalziumstroms seine  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit (in Bezug auf den Ausgangsstrom) unter Vorhofflimmern erhalten bleibt. Diese war im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar gesteigert, wenngleich die Ströme unter Stimulation in der Gruppe mit Vorhofflimmern noch immer signifikant kleiner waren als die in der Kontrollgruppe.

### **1.2.3 Kalziumüberladung**

Mit der Überladung des Kardiomyozyten mit Kalzium wird eine erhöhte intrazelluläre Kalziumgesamtmenge bezeichnet, da aufgrund der Heterogenität innerhalb der Zelle (Zytosol/sarkoplasmatisches Retikulum, Änderungen während des Aktionspotentials)

Konzentrationen schwer anzugeben sind. Die Kalziumüberladung scheint im Rahmen atrialer elektrophysiologischer Remodeling-Prozesse eine wesentliche Bedeutung zu haben, da diese entscheidend durch Kalziumantagonisten beeinflussbar sind. Durch Gabe von Verapamil wurde die Verkürzung der atrialen Refraktärzeit bei schneller Schrittmacherstimulation im Hundeherz gemildert<sup>39</sup>. Vergleichbare Ergebnisse brachten Untersuchungen am Ziegenmodell. Dabei war auffällig, dass die Auslösbarkeit von Vorhofflimmern bei längerer Stimulation durch Verapamil nicht verändert wurde<sup>119</sup>. Auch am Menschen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Verkürzung der effektiven atrialen Refraktärzeit durch kurzzeitig induziertes Vorhofflimmern sowie die Empfindlichkeit zur Induktion wurden durch Verapamil abgeschwächt<sup>26</sup>.

Neben den elektrophysiologischen Effekten der Kalziumüberladung zeichnet sich auch eine Bedeutung bei der kontraktilen Dysfunktion ab. So kann durch Verapamil die Einschränkung der kontraktilen Funktion nach kurzzeitigem Vorhofflimmern abgemildert werden. Andererseits verstärkt der Kalziumkanal-Agonist Bay K8644 die kontraktile Dysfunktion<sup>68</sup>.

Dennoch scheint die Kalziumüberladung nicht die einzige Pathophysiologie zu sein, da die Verkürzung der Refraktärzeit jeweils nur abgemildert, aber nicht aufgehoben wird, und die Auslösbarkeit von Vorhofflimmern bei längerer Stimulation unverändert ist<sup>95</sup>.

#### **1.2.4 Herzinsuffizienz**

Wie in Kapitel 1.2.1 (S. 5) beschrieben spielt der L-Typ-Kalziumstrom eine entscheidende Rolle bezüglich der elektromechanischen Koppelung bei der Kontraktion der Kardiomyozyten. Mittels pharmakologischer Beeinflussung des L-Typ-Kalziumstroms können die Menge der sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung beeinflusst und entsprechende Veränderungen der Kontraktilität ausgelöst werden<sup>83;86;112</sup>. Da einer Herzinsuffizienz eine Reduktion der zellulären kontraktilen Funktion zugrunde liegt, und der L-Typ-Kalziumstrom einen entscheidenden Einfluss darauf zu haben scheint, ist seine Pathophysiologie in diesem Rahmen von besonderer Bedeutung.

Die Fähigkeit des Kalziumstroms, eine Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum auszulösen, ist im experimentellen Herzinsuffizienz- und Hypertrophiemodell reduziert<sup>40</sup>. Diese Einschränkung ist durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation bei der Hypertrophie, nicht jedoch bei der Herzinsuffizienz reversibel<sup>40</sup>.

So sind Regulationsmechanismen des L-Typ-Kalziumstroms von der Herzinsuffizienz ebenfalls betroffen. Insbesondere wird seine  $\beta$ -adrenerge Kontrolle durch die Veränderungen

des Katecholaminhaushaltes wesentlich beeinflusst. Durch die bei Herzinsuffizienz gesteigerte Aktivität des Enzyms  $\beta$ AR-Kinase 1 kommt es zu einer Phosphorylierung des  $\beta$ -adreno-Rezeptors, der dadurch desensibilisiert wird<sup>61;67;99</sup>. Auf ventrikulärer Ebene ist diese Herunterregulierung einschließlich der klinischen Konsequenzen gut etabliert<sup>36;67;73</sup>. Auf atrialer Ebene ist die Konstellation noch unklar, insbesondere da die gesteigerte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit des dortigen L-Typ-Kalziumkanals bei Vorhofflimmern<sup>113</sup> (vgl. Kapitel 1.2.2, S. 7) in den älteren Arbeiten nicht berücksichtigt und Interaktionen dieser beiden Krankheitsbilder bisher nicht aufgearbeitet wurden.

### **1.3 Fragestellung**

#### **1.3.1 Übergeordnete Fragestellung**

Wie bereits beschrieben ist eine Reduktion des L-Typ-Kalziumstroms eine zentrale Alteration im elektrophysiologischen Umbauprozess bei Vorhofflimmern (vgl. Kapitel 1.2.2, S. 6). Über entsprechende Mechanismen vor Einsetzen von Vorhofflimmern, insbesondere bei Krankheiten, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Vorhofflimmern erhöhen, ist weniger bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, zur Beantwortung der Frage beizutragen, ob es auf Ebene der zellulären Elektrophysiologie bei Herzinsuffizienz Prädispositionen für atriale Tachyarrhythmien, insbesondere für Vorhofflimmern, gibt. Diesbezüglich wurde die Bedeutung des L-Typ Kalziumkanals und seine  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit untersucht.

#### **1.3.2 Datenlage vor Versuchsbeginn**

##### **1.3.2.1 L-Typ-Kalziumkanal im Ventrikel bei Herzinsuffizienz**

Zu Veränderungen des L-Typ Kalziumkanals bei Herzinsuffizienz auf Ebene ventrikulärer Kardiomyozyten liegen zahlreiche, wenngleich teilweise widersprüchliche Daten vor. Im Tiermodell lässt sich Herzinsuffizienz mittels chronischer tachykarder Schrittmacherstimulation auslösen<sup>83;84</sup>. Mit diesem Modell zeigte sich am Schwein und am Kaninchen eine Abnahme des basalen maximalen L-Typ-Kalziumstroms ventrikulärer Myozyten<sup>83;133</sup>. Diese Veränderungen konnten an anderer Stelle am Hunde- und Kaninchenmodell nicht nachvollzogen werden<sup>54;107</sup>. Als Ursache dieses scheinbaren Widerspruchs werden methodische Unterschiede diskutiert, insbesondere die Dauer der Schrittmacherstimulation vor der Messung<sup>85</sup>. Übereinstimmend wurde jedoch gezeigt, dass

die Steigerung des L-Typ-Kalziumkanalstroms durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation im Herzinsuffizienzmodell reduziert ist<sup>54;83;84;107</sup>.

Bei humanen ventrikulären Kardiomyozyten ist die Datenlage ähnlich. Einerseits konnte kein Unterschied des basalen L-Typ-Kalziumstroms bei Herzinsuffizienz festgestellt werden<sup>9</sup>. Andererseits existieren Studien, die einen erniedrigten L-Typ-Kalziumstrom bei Herzinsuffizienz nahe legen<sup>79;96</sup> sowie Untersuchungen, die zwar keinen Unterschied der basalen Kalziumstromdichte, jedoch eine unterschiedliche spannungsabhängige Aktivierung des L-Typ-Kalziumkanals zeigen<sup>22</sup>. Einigkeit herrscht jedoch wiederum darin, dass die Zunahme des L-Typ-Kalziumstroms unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei Herzinsuffizienz vermindert ist<sup>22;96</sup>.

### **1.3.2.2 Verhalten anderer Kanäle bei Herzinsuffizienz auf atrialer Ebene**

Insbesondere für Kaliumkanäle liegen für humane atriale Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz einige Ergebnisse vor. Beispielsweise wurde eine erniedrigte Dichte von  $I_{K1}$  und  $I_{K(ACh)}$ , sowie ein vermindertes Ansprechen von  $I_{K(ACh)}$  auf eine Gi-vermittelte Kanalaktivierung mit einer Erniedrigung des Ruhemembranpotentials bei Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht<sup>62</sup>. Außerdem wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit eingeschränkter LVEF und Sinusrhythmus die Dichte des kalziumabhängigen transienten Kaliumauswärtsstroms ( $I_{to}$ ) erhöht und dessen Kinetik verändert ist<sup>109</sup>. Die Erhöhung der Kaliumstromdichte steht im Widerspruch zu tierexperimentellen Daten, da im Hundemodell eine Verringerung des atrialen  $I_{to}$  gefunden wurde<sup>70</sup>. Diese Widersprüche demonstrieren die Notwendigkeit von Untersuchungen am humanen Kardiomyozyten.

### **1.3.2.3 L-Typ Kalziumkanal im Vorhof bei Herzinsuffizienz**

Eine Dilatation der Vorhöfe, welche infolge einer Herzinsuffizienz auftreten kann, wurde in einer älteren Arbeit mit einer Erniedrigung des L-Typ-Kalziumkanalstroms humaner atrialer Kardiomyozyten assoziiert, wobei keine Veränderung der Kanalkinetik festgestellt wurde<sup>65</sup>. Allerdings wurde bei dieser Arbeit die der Vorhofdilatation zugrunde liegende kardiale Pathologie nicht berücksichtigt. Rückschlüsse, ob bei Herzinsuffizienz die Vorhofdilatation als solche oder andere, von einer Dilatation unabhängige, Mechanismen zu Veränderungen der atrialen Elektrophysiologie des L-Typ-Kalziumkanals führen, sind daher aus dieser Untersuchung nicht möglich. Hinzu kommt, dass etwa 25% der Patienten mit dilatierten Vorhöfen in dieser Studie chronisches Vorhofflimmern hatten. Da dies, wie man heute weiss,

einen großen Einfluss auf die atriale Kalziumstromdichte hat (vgl. Kapitel 1.2.2, S. 6), lässt sich eine Trennung von den ausschließlich durch die Dilatation verursachten Effekten nicht mehr vornehmen.

Ouadid und Mitarbeiter untersuchten die L-Typ-Kalziumkanäle atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten terminal herzinsuffizienter Patienten nach Explantation des Herzens bei einer Herztransplantation<sup>96</sup>. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die im Rahmen einer offenen Herzoperation an der Herzlungenmaschine aus rechtsatrialem Herzohrgewebe, beziehungsweise aus Papillarmuskelgewebe bei einer Mitralklappenersatzoperation, gewonnen wurden. Dabei zeigten sich bei einer gepoolten Auswertung ventrikulärer und atrialer Zellen eine erhöhte Zellkapazität sowie eine verminderte Dichte des L-Typ Kalziumkanals in der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten. Außerdem war die  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit des L-Typ-Kalziumkanals mit Isoproterenol bei den atrialen Kardiomyozyten der herzinsuffizienten Patienten deutlich reduziert. Jedoch existieren bei dieser Untersuchung entscheidende Einflußgrößen neben der Herzinsuffizienz. Eine möglicherweise vorliegende Dilatation der Vorhöfe, welche, wie oben erwähnt, Einfluss auf die atriale Elektrophysiologie hat, wurde nicht erfasst. Auch in dieser Arbeit wurde der Herzrhythmus der Patienten mit den entsprechenden Implikationen nicht berücksichtigt. Dieselben Einschränkungen gelten für eine weitere ältere Untersuchung von Cheng und Mitarbeitern<sup>23</sup>, die ebenfalls atriale Kardiomyozyten von explantierten Herzen und rechtsatrialem Herzohrgewebe aus offenen Herzoperationen bei nicht-herzinsuffizienten Patienten vergleicht. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zur vorher genannten Studie<sup>96</sup> kein Unterschied der basalen elektrophysiologischen Eigenschaften des L-Typ-Kalziumkanals, einschließlich der Zellkapazität und Stromdichte. Die  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit war in der Gruppe der explantierten und somit terminal insuffizienten Herzen eingeschränkt.

### **1.3.3 Fragestellungen dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es bei Herzinsuffizienz zu Veränderungen am L-Typ-Kalziumstrom des humanen atrialen Kardiomyozyten, noch vor dem Auftreten von Vorhofflimmern, kommt. Die genauen Fragestellungen dieser Arbeit waren zum einen, ob der basale atriale L-Typ-Kalziumstrom bei Herzinsuffizienz verändert ist, sowie zweitens, ob die  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit des atrialen L-Typ-Kalziumstroms verändert ist.

Dazu wurde zur Graduierung der Herzinsuffizienz die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) gewählt, da es sich um einen eindeutig definierbaren Parameter der Herzinsuffizienz handelt und eine klare Assoziation zum Auftreten von Vorhofflimmern besteht<sup>126</sup>.

Der alleinige Studieneinschluss von Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die für eine Bypassoperation vorgesehen waren, definierte ein Untersuchungskollektiv mit einheitlicher Grunderkrankung. Um Kofaktoren, welche die zelluläre Elektrophysiologie bekanntermaßen beeinflussen, zu minimieren, wurden Patienten mit relevanten Klappenvitien oder atrialer Dilatation<sup>65</sup>, Vorbehandlung mit Antiarrhythmika oder Kalziumantagonisten<sup>64,66</sup> sowie Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen<sup>2;37;60;94;131</sup> nicht in die Untersuchung mit aufgenommen. Entsprechend der oben genannten Fragestellung wurden außerdem alle Patienten ausgeschlossen, bei welchen aktuell oder anamnestisch Vorhofflimmern bestand.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenauswahl

Die Patienten, von denen für diese Arbeit Vorhofgewebe gewonnen wurde, wurden entsprechend ihrer angiographisch gemessenen LVEF in Gruppen eingeteilt. Eine LVEF  $\geq$  60% klassifizierte die Gruppe der Patienten mit erhaltener LV-Funktion, eine LVEF  $\leq$  45% galt als Kriterium für die Gruppe der Patienten mit eingeschränkter LV-Funktion. Patienten, deren LVEF zwischen 45% und 60% lag, wurden lediglich für die Bestimmung von Korrelationen mit eingeschlossen, nahmen am Gruppenvergleich aber nicht teil. Bei all diesen Patienten wurden im Rahmen einer aortokoronaren Bypassoperation Gewebeproben des rechten Vorhofes gewonnen. Eine zusätzliche Gruppe ergab sich aus der Gewinnung von Vorhofgewebe bei Spenderherzen im Rahmen einer Herztransplantation (HTX).

Ausschlusskriterien waren:

- Hämodynamisch relevante Klappenstenose oder –insuffizienz (mitral, trikuspidal, aortal und pulmonal)
- Dilatation des linken Vorhofes auf  $> 45$ mm im transversalen Durchmesser im echokardiographischen 4-Kammer-Blick
- Dilatation des rechten Vorhofes auf  $> 45$ mm Durchmesser im echokardiographischen 4-Kammer-Blick
- Einnahme von Klasse I oder III Antiarrhythmika innerhalb der letzten 12 Monate
- Chronische Einnahme von Kalziumantagonisten in den letzten 12 Monaten
- Jede Einnahme von Kalziumantagonisten innerhalb einer Woche vor OP
- Abnorme Schilddrüsenparameter (fT3, fT4, TSH), Behandlung mit Schilddrüsenhormonen oder thyreostatischer Medikation
- Vorhofflimmern (persistierend oder intermittierend) in der Vorgeschichte.

Aufgrund der diagnostischen Schwierigkeit von Vorhofflimmern wurden Patienten, die anamnestisch von einer paroxysmalen Tachykardie oder von unregelmäßigem Pulsschlag berichteten, ebenfalls ausgeschlossen. Von jedem Patienten wurden mindestens ein 24h-Langzeit-EKG sowie mehrere EKGs zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst.

**Tabelle 2-1: Patienten der Gruppe LVEF  $\geq$  60 %**

Nr.	Geschlecht	Alter	LVEF	Medikation
1	W	75	85	ASS, N/M, CSEI
2	M	55	77	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, Thiazid, CSEI
3	W	62	80	ASS, N/M, CSEI
4	M	46	68	ASS, N/M
5	M	72	75	ASS, N/M, ACEI/ATRB, Thiazid
6	W	78	86	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, Thiazid, CSEI
7	M	58	70	ASS, $\beta$ -Blocker, ACEI/ATRB, Thiazid, CSEI
8	M	58	74	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, Thiazid, CSEI
9	M	73	67	ASS, N/M, ACEI/ATRB, CSEI
10	M	71	71	ASS, $\beta$ -Blocker, CSEI
11	M	76	72	ASS, $\beta$ -Blocker, Thiazid
12	M	67	78	ASS, $\beta$ -Blocker, ACEI/ATRB, CSEI
13	M	74	75	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, CSEI
14	M	77	77	ASS, $\beta$ -Blocker, CSEI
15	M	59	78	ASS, $\beta$ -Blocker, Thiazid, CSEI
16	M	70	66	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M
17	M	51	67	ASS, N/M, CSEI

**Tabelle 2-2: Patienten der Gruppe LVEF  $\leq$  45%**

Nr.	Geschlecht	Alter	LVEF	Medikation
1	M	62	31	ASS, ACEI/ATRB, SD, OAD
2	M	73	36	ASS, N/M, ACEI/ATRB
3	W	73	17	ASS, $\beta$ -Blocker, ACEI/ATRB, SD
4	M	68	45	ASS, $\beta$ -Blocker, ACEI/ATRB, SD, CSEI
5	M	60	34	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, CSEI
6	M	72	31	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, SD, OAD, CSEI
7	M	70	43	ASS, $\beta$ -Blocker, ACEI/ATRB, CSEI
8	M	64	40	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB, SD, CSEI
9	M	48	45	ASS, N/M, SD
10	M	63	32	ASS, N/M, ACEI/ATRB

**Tabelle 2-3: Patienten mit LVEF 45-60%**

Nr.	Geschlecht	Alter	LVEF	Medikation
1	M	62	52	ASS, N/M, ACEI/ATRB, OAD
2	M	67	53	ASS, $\beta$ -Blocker, N/M, ACEI/ATRB

(ASS=Acetylsalicylsäure, N/M=Nitrate/Molsidomin, CSEI, Cholesterinsynthese-Hemmer, ACEI/ATRB=ACE-Hemmer/Angiotensinrezeptorblocker, SD=Schleifendiuretikum, OAD=orale Antidiabetika)

Eine zusätzliche, kardial nicht erkrankte Untersuchungsgruppe ergab sich aus der Gewinnung von Vorhofgewebe aus Spenderherzen im Rahmen einer HTX (4 Herzen, Alter 21, 25, 33 und 46 Jahre).

## **2.2 Materialgewinnung**

Für die Gruppen  $EF \geq 60\%$  und  $EF \leq 45\%$  wurde das Vorhofgewebe im Rahmen einer koronaren Bypassoperation bei Kanülierung des rechten Vorhofs an die Herz-Lungen-Maschine gewonnen. Die Operationstechnik unterscheidet sich bei den hier untersuchten Patienten nicht vom üblichen Vorgehen bei dieser Operation. Nach Eröffnung des Thorax und der Präparation einer oder beider Aa. mammae erfolgte die Kanülierung des rechten Vorhofes über das rechte Herzohr. Dabei wurde von der Spitze ein im Einzentimeterbereich liegendes Stück entfernt und sofort in gekühlter, präoxigenerter, kalziumfreier Elektrolytlösung (vgl. Kapitel 2.5.1; S.22) asserviert und zur weiteren Verarbeitung innerhalb von 30 Minuten gekühlt ins Labor transportiert.

Da die Herzen der Spendergruppe transplantiert wurden, war eine Gewinnung des rechten Vorhofes nicht möglich. Jedoch konnte Gewebe der lateralen Wand des linken Vorhofes gewonnen werden. Nach Explantation des Spenderorgans in toto und transplantatgerechtem Transport in unser Klinikum wurde, nach Präparation, das Vorhofgewebe ebenfalls in gekühlte, präoxigenerte, kalziumfreie Lösung gegeben und sofort weiterverarbeitet.

## **2.3 Zellisolation**

Die Isolation der einzelnen Kardiomyozyten erfolgte in Anlehnung an die von Escande und Mitarbeitern<sup>31</sup> beschriebene Methode. In einer kalziumfreien, sauerstoffgesättigten Elektrolytlösung (vgl. Kapitel 2.5.1; S.22) wurde das Gewebe bei 4 °C mit Hilfe einer mikroskopischen Präparierschere von Fett- und Bindegewebe befreit und in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten. Dabei war das Gewebe mit dünnen Nadeln auf einer Silikonplatte fixiert. Die Dissektion erfolgte unter Vermeidung von mechanischem Zug am Präparat. Anschließend wurden die Gewebstücke zweimal für jeweils 5 Minuten in kalziumfreier Elektrolytlösung gewaschen. Dann folgte der erste Schritt der enzymatischen Isolation. Dazu wurde das Gewebe unter sanftem Magnetrühren und unter ständiger Begasung mit Sauerstoff in Enzymlösung für etwa 45 Minuten prozessiert. Die Temperatur wurde in einem Wasserbad mit Hilfe eines Thermomuwälzers (HAAKE F3, Berlin) konstant bei 36 °C gehalten. Die Lösung entsprach kalziumfreier Lösung, der 350 IE/ml Kollagenase (Typ I, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 2 IE/ml Protease (Typ XXIV, Sigma) und 1 mg/ml bovines Serum Albumin (Sigma) beigefügt waren. Nach diesem Schritt wurde nach kurzer Zentrifugation (30sec, 60g, Hermle Z200A, Wehringen) der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Lösung für den zweiten Schritt enthielt kalziumfreie Lösung mit 300 IE/ml Kollagenase. Das

Gewebe wurde in dieser Lösung ebenfalls bei 36 °C unter Rühren und Begasung weiterverarbeitet. Beginnend nach etwa 10 Minuten wurden alle 2 Minuten kleine Mengen der Lösung abpipettiert und mikroskopisch untersucht. Sobald kantige, quergestreifte Zellen sichtbar waren, wurde das Rühren unterbrochen und gewartet, bis sich die Gewebstücke abgesetzt hatten. Die Enzymlösung wurde mit Hilfe einer Transferpipette abgesaugt und für 1 Minute sanft bei 60 g zentrifugiert, um das Absetzen der Zellen zu beschleunigen. Anschließend wurde der Überstand durch präoxigeniertes KB-Medium (siehe Kapitel 2.5.2, S.22), dem 1 mg/ml bovines Serum Albumin beigefügt war, ersetzt. Das verbleibende Gewebe wurde dann erneut in Kollagenaselösung gegeben und, wie oben beschrieben, weiterverarbeitet. Dieser Vorgang wurde etwa alle 10 Minuten wiederholt, bis die Anzahl der gesehenen Zellen deutlich abnahm (etwa 4-6mal), so dass die gesamte Isolationszeit etwa 60 Minuten für den zweiten Schritt betrug. Die isolierten Zellen wurden anschließend bis zur Messung am gleichen Tag unter einer Sauerstoffdecke bei 4 °C aufbewahrt.

## **2.4 Elektrophysiologische Messungen**

### **2.4.1 Patch-clamp Technik**

Die transmembranären Ionenströme der isolierten Zellen wurden mit Hilfe der patch-clamp-Technik in Ganzzell-Konfiguration („whole-cell“) untersucht<sup>43;90</sup>. Sie ermöglicht eine rauscharme Aufzeichnung von Ionenströmen im pA-Bereich und somit in unserem Fall die Messung der Größe und Kinetik des L-Typ-Kalziumstroms<sup>78;98</sup>. Auf einen intakten Kardiomyozyten wird mit Hilfe eines Mikromanipulators unter mikroskopischer Kontrolle eine dünn ausgezogene Glaspipette aufgesetzt. Dabei wird kontinuierlich der Pipetteneingangswiderstand, durch einen biphasischen Testpuls (Amplitude:  $\pm 5\text{mV}$ , Dauer 10ms, Frequenz 20Hz), gemessen. Dieser steigt sprunghaft an, sobald die Zelle berührt wird. Durch einen dann angelegten kleinen Unterdruck in der Pipette wird ein Membranfleck („patch“) eingesaugt. Dadurch entsteht eine elektrisch dichte Verbindung zwischen der Pipette und der Zellmembran („seal“). Durch Einreißen der eingesaugten Membran erreicht man einen elektrischen Zugang zum Inneren der Zelle über die Pipette. Durch einen angestrebten Abdichtungswiderstand im Gigaohmbereich werden Leckströme minimiert und eine hohe Auflösung der elektrischen Membranströme erreicht. Über diesen Zugang kann nun das Membranpotential auf einen Sollwert geklemmt und die resultierenden Ionenströme gemessen werden („voltage-clamp“).

Aufgrund des im Vergleich zum Pipettenvolumen sehr kleinen Zellvolumens, lässt sich das Elektrolytmilieu des Zellinneren über osmotischen Ausgleich durch die Zusammensetzung der internen Pipettenlösung definieren. Die Isolation einzelner Ströme erfolgt einerseits durch Elimination einzelner Ionen in den Lösungen und andererseits durch gezielte Blockade nicht untersuchter Ionenkanäle. In dieser Untersuchung wurden zur Isolation des Kalziumstroms Natrium und Kalium aus interner und externer Lösung eliminiert und durch TEA und Cäsium ersetzt, welche zusammen mit 4-Aminopyridin die verschiedenen Kaliumkanäle zusätzlich blockieren.

#### **2.4.2 Versuchsaufbau**

Um Störungen bei der Messung zu vermeiden, wurde die Messanordnung aus inversem Mikroskop (DM IL, Leica, Wetzlar) mit Versuchskammer und Präzisionsmikromanipulator (Leica, Wetzlar) mit befestigtem patch-clamp-Vorverstärker (HEKA elektronik, Lambrecht) auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Zur elektrischen Abschirmung war dieser Messplatz von einem geerdeten Faraday'schen Käfig umschlossen.

In den Mikroskopiertisch war die Untersuchungskammer eingelassen, die mit einem Zu- und Ablaufsystem zur laminaren Superperfusion der Kardiomyozyten versehen war. Der patch-clamp-Vorverstärker mit Pipettenhalterung war an einen Mikromanipulator montiert, der eine exakte Positionierung der Pipette in alle drei Raumrichtungen im  $\mu\text{m}$ -Bereich und somit das Heranführen an die Zelle ermöglichte. Als Messelektrode diente ein chlorierter Silberdraht. Die Referenzelektrode, ebenfalls aus chloriertem Silber, befand sich ebenfalls in interner Lösung, und war mit Hilfe einer Salzbrücke leitend mit dem Experimentierbad verbunden. Diese Salzbrücke bestand aus einer mit interner Lösung gefüllten Kapillare, welche mit einem Agarpfropfen verschlossen war, um ein Vermischen von interner und externer Lösung zu verhindern.

Die Behältnisse des Zu- und Ablaufsystem der Versuchskammer, sowie die End-Verstärker/Wandler-Einheit mit Auswertecomputer des patch-clamp-Systems (EPC9, HEKA elektronik, Lambrecht) waren mechanisch vom Messplatz weitgehend entkoppelt aufgestellt und mit diesem über Schläuche bzw. Kabel verbunden. Zur optischen Kontrolle der über den A/D-Wandler auf dem Auswertecomputer aufgezeichneten Strompulse diente ein Oszilloskop (HM 1007, HAMEG, Frankfurt)

Die Glaspipetten wurden aus Borosilikatkapillaren (Länge 10cm, Außendurchmesser 1,5mm, Innendurchmesser 1,17mm, Clark, Pangbourne, UK) mit einem automatischen Ziehgerät

(DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg) mit drei Hitze-/Zugvorgängen gezogen. Bei einer vierten Erhitzung wurde die gezogene Pipettenspitze abgerundet („fire-polishing“). Die Einstellungen wurden so gewählt, dass der elektrische Eingangswiderstand der elektrolytgefüllten Pipetten etwa 2 M $\Omega$  betrug.

Mit dem patch-clamp-System werden die im Elektrodenstromkreis fließenden Ströme verstärkt, gefiltert und über einen A/D-Wandler zur weiteren Auswertung am Computer digitalisiert. Zur Steuerung und Überwachung des Versuchsablaufs diente die Software Pulse (HEKA elektronik, Lambrecht).

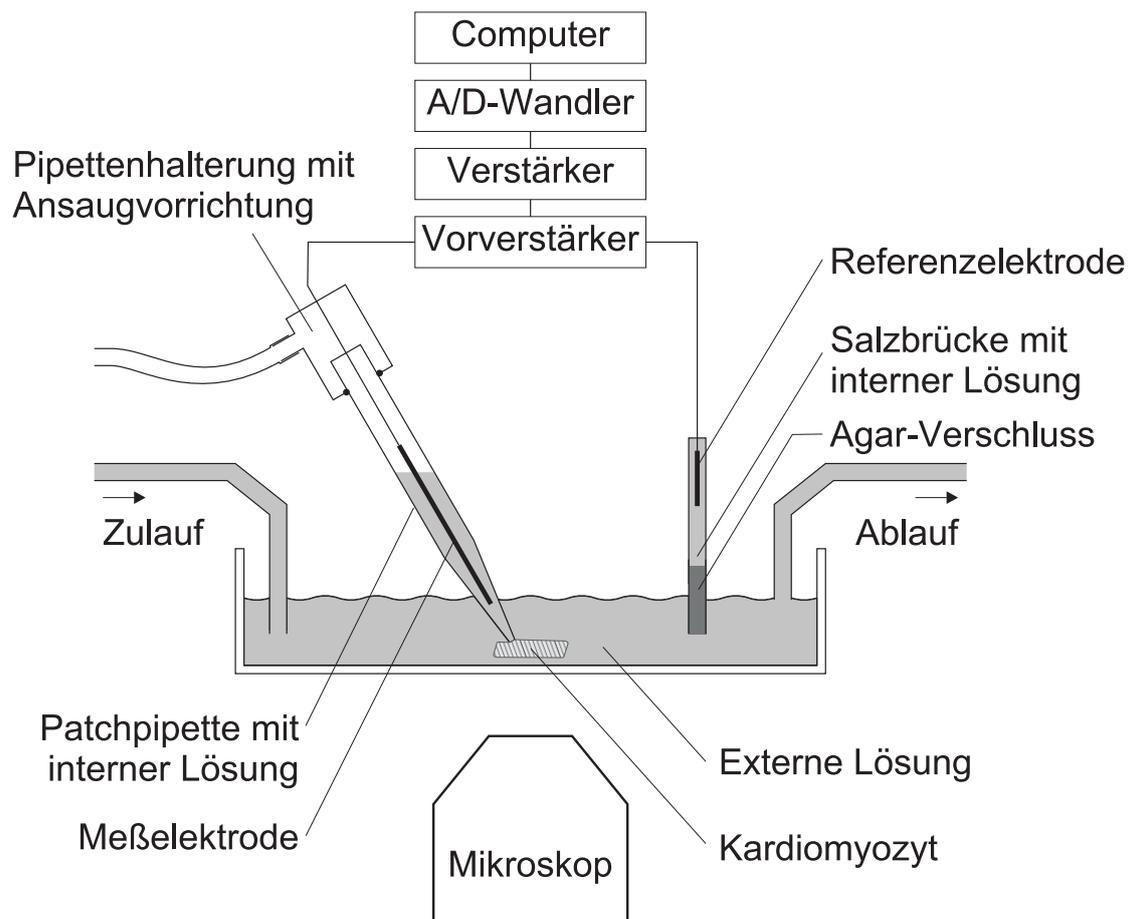


Abbildung 2-1: Schematischer Versuchsaufbau

### 2.4.3 Versuchsablauf

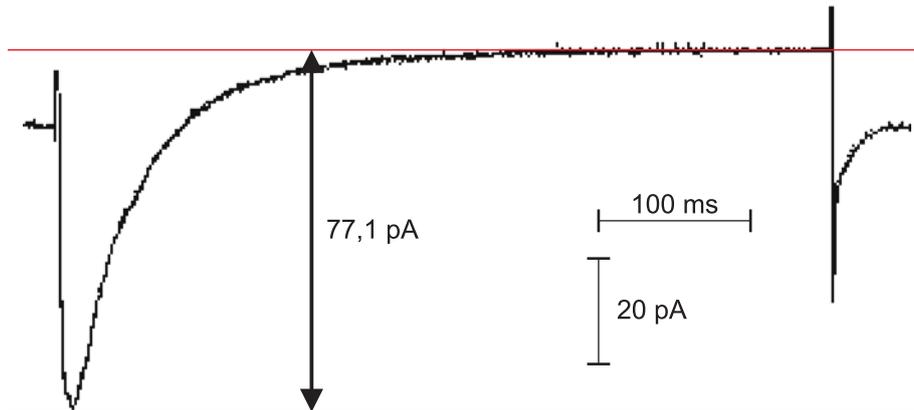
Die isolierten Zellen wurden aus der kalziumfreien Vorratslösung (vgl. Kapitel 2.3; S. 15) in die mit externer Lösung vorgefüllte Versuchskammer pipettiert. Anschließend wurde einige Minuten gewartet, dass die Zellen auf den Boden des Bades sedimentieren konnten. Dann wurde die Superperfusion mit Isoproterenol-freier kalziumhaltiger externer Meßlösung begonnen. Nach mindestens 10 minütiger Äquilibration wurden mit Hilfe des Mikroskops

geeignete Zellen identifiziert. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich kantige und quergestreifte Zellen, ohne sichtbare Degenerationszeichen (z.B. Blasenbildung), verwendet. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipette an eine geeignete Zelle herangeführt und gemäß der in Kapitel 2.4.1 (S. 16) beschriebenen Weise ein Zugang zur Zelle hergestellt. Das Potential der Zelle wurde dann sofort auf das Haltepotential von  $-80\text{mV}$  geklemmt. Anschließend wurde mit Hilfe der in Kapitel 2.4.4 (S. 19) beschriebenen Pulsprotokolle der basale L-Typ-Kalziumstrom charakterisiert.

Dann wurde die Superperfusionslösung auf eine externe Lösung mit Isoproterenolzusatz umgestellt. Bei wiederholten Testpulsen mit einer Frequenz von  $0,1\text{Hz}$  wurde die Zunahme des Stroms beobachtet. Nach Ausbildung eines Plateaus erfolgte dann die spannungsabhängige Charakterisierung des L-Typ-Kalziumstroms unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Anschließend wurde dieser Zyklus mit der nächst höheren Konzentration von Isoproterenol fortgesetzt. Die Werte für die maximale  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden ausschließlich aus Messungen mit einer Isoproterenolkonzentration von  $100\text{nM}$  oder  $1\mu\text{M}$  bestimmt, da bei diesen Konzentrationen von einem nahezu maximalen  $\beta$ -adrenergen Effekt ausgegangen werden kann<sup>55;56;63</sup>. Für die Messung der nächsten Zelle wurde eine neue Versuchskammer verwendet.

#### **2.4.4 Pulsprotokolle und deren Auswertung**

Zur Messung des L-Typ-Kalziumstroms wurden die Zellen vom eingestellten Haltepotential von  $-80\text{mV}$  für  $500\text{ms}$  oder  $1000\text{ms}$  auf  $+10\text{mV}$  depolarisiert. Die Größe des aus diesen Pulsen resultierenden L-Typ-Kalziumstroms wurde berechnet als die Differenz zwischen dem maximalen Einwärtsstrom und dem Plateaustrom kurz vor Beendigung des Pulses und Repolarisation der Zelle. Die Vorzeichenkonvention ist dabei so, dass einwärts gerichtete Kationenströme negativ ausgedrückt werden. Der  $1000\text{ms}$  Impuls wurde gewählt, wenn es innerhalb von  $500\text{ms}$ , z.B. bei sehr großen Strömen, nicht zur Ausbildung eines Plateaustroms kam.



**Abbildung 2-2: Bestimmung der Größe des L-Typ Kalziumstroms**

In vergleichbarer Weise erfolgte die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit des L-Typ-Kalziumstroms. Dazu wurden die Zellen mit einzelnen Spannungspulsen von 500ms Dauer stimuliert, deren Amplitude, ausgehend vom Haltepotential, schrittweise um 10mV erhöht wurde (Klemmpotential  $V$ ). Die Amplitude der dabei resultierenden Ströme wurde entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise ermittelt. Aus diesen Amplituden lässt sich über das Ohm'sche Gesetz (Gleichung 1) die Leitfähigkeit des Kanals ( $g$ ) bei einem bestimmten Klemmpotential bestimmen.

**Gleichung 1**

$$I(V) = g \cdot (E_{Ca} - V)$$

Dabei ist  $E_{Ca}$  das Umkehrpotential für Kalzium, als Ausdruck des elektrochemischen Gradienten der Zelle für Kalzium. Es ist mit Hilfe der Nernst'schen Gleichung (Gleichung 2) aus den intrazellulären  $[Ca]_i$  und extrazellulären  $[Ca]_e$  Kalziumkonzentrationen bestimmbar.

**Gleichung 2**

$$E_{Ca} = \frac{R \cdot T}{2F} \cdot \ln\left(\frac{[Ca]_e}{[Ca]_i}\right)$$

In unseren Versuchen ergibt sich für Raumtemperatur ( $20^\circ\text{C}$ ), einer externen Kalziumkonzentration von 1,2mM und einer internen Konzentration von  $10^{-7}\text{M}$  ein  $E_{Ca}$  von 118,6mV (vgl. <sup>48</sup> S. 11ff).

Nach Normierung der Leitfähigkeit ( $g(V)/g_{\text{max}}$ ) wurde die Abhängigkeit vom Klemmpotential ( $V$ ) mittels Regression an eine Boltzmannfunktion (Gleichung 3) charakterisiert.

### Gleichung 3

$$\frac{g(V)}{g_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V-V_{1/2}}{k}}}$$

Dabei ist V das Klemmpotential,  $V_{1/2}$  das Potential für die halbmaximale Aktivierung des Kalziumkanals und k der Steigungsfaktor der Kurve. Das so ermittelte  $V_{1/2}$  diente zur Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit des Kalziumstroms.

Die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten erfolgte aus den im Rahmen der Spannungsabhängigkeit aufgezeichneten Strompulsen, bei einer Depolarisation auf  $-10\text{mV}$ ,  $0\text{mV}$  und  $+10\text{mV}$ . Dazu wurde eine doppel-exponentielle Funktion (Gleichung 4) der jeweiligen Stromkurve angenähert. Die ermittelten Werte wurden als schnelle ( $\tau_1$ ) und langsame ( $\tau_2$ ) Inaktivierungskonstante mit den dazugehörigen Amplituden ( $A_1$ ,  $A_2$ ) festgehalten.

### Gleichung 4

$$I(t) = A_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Durch mathematische Integration der Gleichung wurde die Fläche unter der Stromkurve von Beginn der Depolarisierung bis 200ms, welches einer mittleren ADP<sub>50</sub> (Aktionspotentialdauer bis zur halben Repolarisierung) entspricht, errechnet. Dieser Wert kann als Maß für die Kalziummenge, die in dieser Zeit in die Zelle fließt (Nettokalziumeinstrom), angesehen werden.

Die hier beschriebene Auswertung der Pulse wurde mit der Software Pulse (HEKA elektronik, Lambrecht) zur Messung der Stromgröße, und PulseFit (HEKA elektronik, Lambrecht) zur Bestimmung der Inaktivierungskonstanten, durchgeführt. Die mathematischen Berechnungen erfolgten mit den Programmen Excel v.X. für Macintosh (Microsoft Corp.) und SPSS Version 11.0.2 für Macintosh (SPSS Inc.).

## 2.5 Lösungen

Es sind tabellarisch die Konzentrationen der einzelnen Substanzen für jede Lösung sowie die daraus errechnete Menge angegeben, die für eine typische Ansatzmenge notwendig ist. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte der Ansatz mit destilliertem Wasser. (Substanzen von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

### 2.5.1 Kalziumfreie Elektrolytlösung

Die kalziumfreie Lösung diente als Transportmedium und zur Isolation der Zellen

**Tabelle 2-4: Kalziumfreie Elektrolytlösung**

	mM	g/l
NaCl	126	7,36
KCl	5,4	0,40
MgCl <sub>2</sub>	1,0	0,20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33	0,05
Glukose	10	1,80
HEPES	10	2,38

Mit NaOH adjustiert auf pH=7,4

### 2.5.2 KB-Medium

Das KB-Medium diente als Aufbewahrungslösung für die Zellen nach Isolation<sup>51</sup>.

**Tabelle 2-5: KB-Medium**

	mM	g/l
Taurin	10	1,25
Glutamat	70	10,3
KCl	25	1,86
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	1,36
Glukose	22	3,94
EGTA	0,5	0,19

Mit KOH adjustiert auf pH=7,4

### 2.5.3 Interne Lösung

Die Patch-Clamp-Pipetten wurden mit interner Lösung gefüllt.

**Tabelle 2-6: Interne Lösung**

	mM	g/100 ml
CsCl	133	2,24
MgCl <sub>2</sub>	2	0,04
HEPES	10	0,24
EGTA	15	0,57
Glukose	10	0,18
Mg <sup>2+</sup> -ATP	3	0,15

Mit CsOH adjustiert auf pH=7,2

## 2.5.4 Externe Lösung

Zur Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurden die Zellen mit externer Lösung superperfundiert, der je nach Versuchsprotokoll unterschiedliche Mengen von Isoproterenol beigefügt wurden (vgl. Kapitel 2.5.5; S.23).

**Tabelle 2-7: Externe Lösung**

	mM	g/l
TEA-Cl <sup>-</sup>	136	22,54
CsCl	20	3,87
CaCl <sub>2</sub>	1,2	0,73
MgCl <sub>2</sub>	1	0,20
4-Aminopyridin	3	0,28
HEPES	10	2,38
Glukose	10	1,80

Mit CsOH adjustiert auf pH=7,2

## 2.5.5 Isoproterenol Lösungen

Die Substanzen wurden in der oben beschriebenen externen Lösung aufgelöst. Die Stammlösung enthält als antioxidatives Konservierungsmittel 10mM Ascorbinsäure. Es erfolgte anschließend eine logarithmische Verdünnungsreihe, ebenfalls in externer Lösung. Es wurden so externe Lösungen mit Zusatz von 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  hergestellt.

**Tabelle 2-8: 1mM Isoproterenol Stammlösung**

	mM	mg/100ml
Isoproterenol	1	36,1
Ascorbinsäure	10	176

## 2.6 Statistische Auswertung

Bei Gruppengrößen von mehr als 30 Beobachtungseinheiten erfolgte zur Auswertung quantitativer Variablen zunächst ein Test auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Lilliefors Korrektur. Bei einem Ergebnis, dass eine signifikant von der Normalverteilung unterschiedliche Verteilung annehmen lässt, erfolgten die weiteren Tests mit nicht parametrischen Testverfahren. Bei kleineren Gruppengrößen erfolgte die Testung von vornherein mit nicht parametrischen Tests. Bei der Auswertung dieser Arbeit kamen parametrische Testverfahren mit der genannten Vorgehensweise nicht zum Einsatz. Daher wurde der Vergleich der Gruppen untereinander mit dem Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Zum Vergleich der Daten innerhalb einer Gruppe wurde bei drei Parametern (hier Vergleich der Inaktivierungskonstanten bei verschiedenen

Spannungen) der globale Test nach Friedman für verbundene Stichproben durchgeführt. Zum Vergleich von zwei Parametern innerhalb einer Gruppe vor und nach Gabe von Isoproterenol wurde der 1-seitige Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben benutzt.

Die Angabe der Maßzahlen erfolgt, wenn nicht anders angegeben, nach folgendem Schema: Median (10%-Perzentile; 90%-Perzentile) Mittelwert  $\pm$  SEM; Beispiel: 95,1 (21,1; 360,4)  $141,8 \pm 23,9$ . Zur graphischen Darstellung dienen Box-Plots, bei denen die äußersten Markierungen jeweils die 10%- und 90%-Perzentilen angeben. Die Begrenzungen der farblich hinterlegten Rechtecke markieren jeweils die 25%- und 75%-Perzentile. Der Mittelstrich gibt den Median (50%-Perzentile) der Stichprobe an. Bei der Darstellung der Spannungsabhängigkeit des Stroms (Kapitel 3.1.4 S. 32 und 3.3.3 S. 45) wurden die Werte jeweils für ein Depolarisationspotential gemittelt. Daher kann nach dem zentralen Grenzwertsatz der Statistik von einer Normalverteilung ausgegangen werden, so dass als Fehlerindikator das 95%-Konfidenzintervall gewählt wurde.

Die Auswertung qualitativer Variablen erfolgte mit dem exakten Test nach Fischer.

Der Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Variablen wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $\rho$ ) bestimmt, da, wie oben beschrieben, keine Normalverteilung vorlag, bzw. die Fallzahl den Nachweis einer Normalverteilung nicht zuließ. Bei einem signifikant von 0 unterschiedlichen  $\rho$  erfolgte die Ermittlung der mathematischen Beziehung mittels Regression.

Alle statistischen Tests wurden 2-seitig durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Ein p-Wert von  $<0,10$  wurde als Kriterium zur Annahme einer Tendenz angesehen. Ein signifikantes Ergebnis wurde mit \*\* markiert, eine Tendenz mit \*.

Die Datenerfassung und ein Teil der graphischen Aufarbeitung der Daten erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel v.X. für Macintosh (Microsoft Corp.). Zur statistischen Auswertung und weiteren grafischen Darstellung der Daten kam das Programm SPSS in Version 11.0.2 für Macintosh (SPSS Inc.) zum Einsatz.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gruppen LVEF $\geq$ 60% und LVEF $\leq$ 45%

In den Abbildungen sind die Gruppen durchgehend farblich einheitlich markiert. Die Daten der Gruppe LVEF  $\geq$  60% sind durch grüne Farbtöne, die der Gruppe LVEF  $\leq$  45% durch rote Farbtöne repräsentiert.

##### 3.1.1 Klinische Charakteristika der Patientengruppen

Aus den Krankenunterlagen der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Operation die unten aufgeführten wesentlichen klinischen Werte ermittelt. Aufgrund der Einteilung nach der LV-Funktion kann bei folgenden Größen keine Übereinstimmung erwartet werden:

**Tabelle 3-1: Unterschiedliche Parameter der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%**

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	17	10	
LVEF [%]	75 (67; 85) 75 $\pm$ 1,5	35 (18; 45) 35 $\pm$ 2,7	p<0,001**
ESV [ml]	52 (11; 82) 51 $\pm$ 8,2	102 (52; 150) 98 $\pm$ 17,0	p=0,040**
LVEDP [mmHg]	11 (5; 24) 13 $\pm$ 1,8	21 (9; 40) 23 $\pm$ 3,3	p=0,009**

(ESV=endystolisches Volumen, LVEDP= enddiastolischer linksventrikulärer Druck)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45% liegen bezüglich der übrigen klinischen Charakteristika nicht vor. Im Einzelnen vergleichen sie sich wie folgt:

**Tabelle 3-2: Übereinstimmende Charakteristika der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%**

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	17	10	
Geschlecht	W=3; M=14	W=1; M=9	p=1,0
Alter [Jahre]	70 (50; 77) 66 $\pm$ 2,4	66 (49; 73) 65 $\pm$ 2,4	p=0,711
Größe [cm]	172 (161; 183) 172 $\pm$ 1,9	169 (162; 178) 169 $\pm$ 1,7	p=0,414
Gewicht [kg]	81 (65; 107) 81 $\pm$ 3,4	75 (64; 94) 76 $\pm$ 3,2	p=0,309
MAP [mmHg]	101 (82; 125) 101 $\pm$ 4,1	99 (78; 114) 96 $\pm$ 4,3	p=0,367
RA-Druck [mmHg]	10 (4; 12) 9 $\pm$ 0,7	10 (7; 17) 10 $\pm$ 1,0	p=0,978
HF [/min]	68 (52; 92) 71 $\pm$ 3,3	72 (56; 93) 73 $\pm$ 4,2	p=0,639
PQ-Zeit [ms]	160 (140; 200) 169 $\pm$ 5,3	179 (154; 210) 181 $\pm$ 7,2	p=0,238
QRS-Dauer [ms]	80 (70; 148) 92 $\pm$ 7,9	98 (80; 160) 105 $\pm$ 8,9	p=0,087*
QTc-Zeit [ms]	341 (266; 549) 381 $\pm$ 25,7	371 (273; 429) 360 $\pm$ 21,6	p=0,636
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	141 (135; 143) 140 $\pm$ 0,6	142 (135; 146) 141 $\pm$ 1,0	p=0,264
K <sup>+</sup> [mmol/l]	4,2 (3,7; 4,9) 4,2 $\pm$ 0,09	4,0 (3,3; 4,9) 4,1 $\pm$ 0,16	p=0,309
Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]	2,39 (2,26; 2,53) 2,39 $\pm$ 0,025	2,40 (2,21; 2,59) 2,39 $\pm$ 0,040	p=0,938
EDV [ml]	176 (84; 271) 172 $\pm$ 20,1	147 (95; 221) 150 $\pm$ 23,0	p=0,661

(MAP=mittlerer arterieller Blutdruck; RAP=rechtsatrialer Druck; HF=Herzfrequenz; EDV=enddiastolisches Volumen)

In Bezug auf die Medikamenteneinnahme liegen folgende Werte vor:

Einnahme von	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
$\beta$ -Blocker	65% (n=11)	60% (n=6)	p=0,563
ACEI/ATRB	41% (n=7)	90% (n=9)	p=0,016**
Diuretika	41% (n=7)	60% (n=6)	p=0,293
N/M	65% (n=11)	60% (n=6)	p=0,563
CSEI	76% (n=13)	50% (n=5)	p=0,162

(ACEI/ATRB=ACE-Hemmer/Angiotensinrezeptorblocker, N/M=Nitrate/Molsidomin, CSEI=Cholesterinsynthese-Hemmer)

### 3.1.2 Basalstromgröße und Zellkapazität

Die Auswertung der initial gemessenen absoluten basalen Kalziumstromgröße ergibt für den Vergleich der Gruppen mit  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$  keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,734$ ). Auch in Bezug auf die gemessene Zellkapazität, welche als indirektes Maß für die Zellgröße angenommen werden kann, ist kein Unterschied nachweisbar ( $p=0,580$ ). Bei der, dem Quotienten aus absoluter Stromgröße und Zellkapazität entsprechenden, Stromdichte findet sich demnach erwartungsgemäß ebenfalls kein signifikanter Unterschied ( $p=0,928$ ).

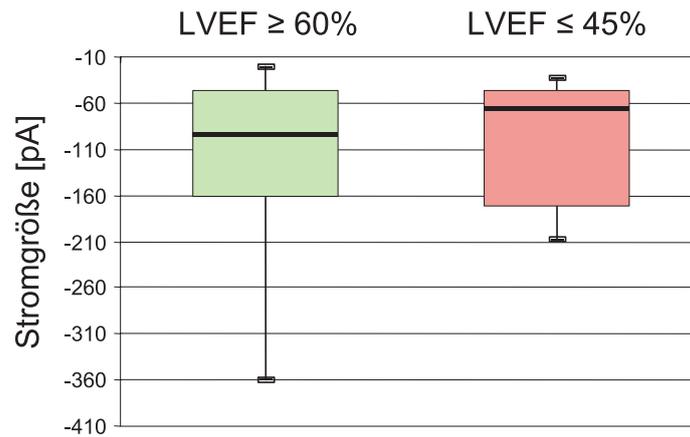


Abbildung 3-1: Basale Stromgröße der Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$ . Darstellung als Box-Plot mit 10%-, 25%-, 50%-, 75%-, 90%-Perzentilen (vgl. Kapitel 2.6, S. 24)

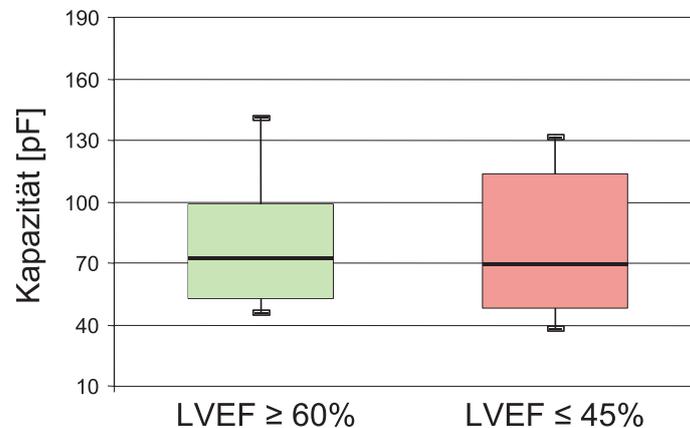


Abbildung 3-2: Zellkapazität der Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$

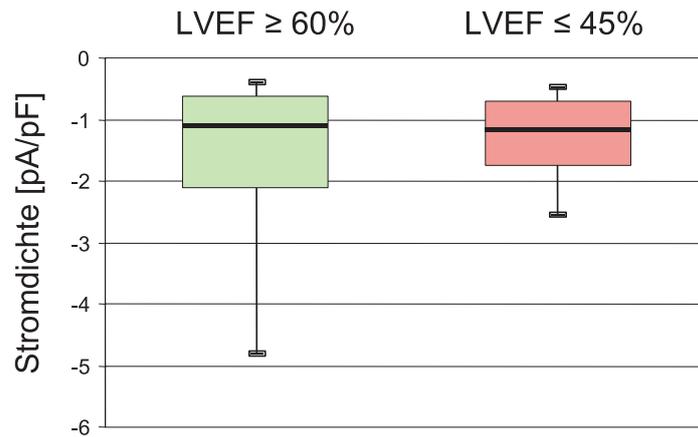


Abbildung 3-3: Basale Stromdichte der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%

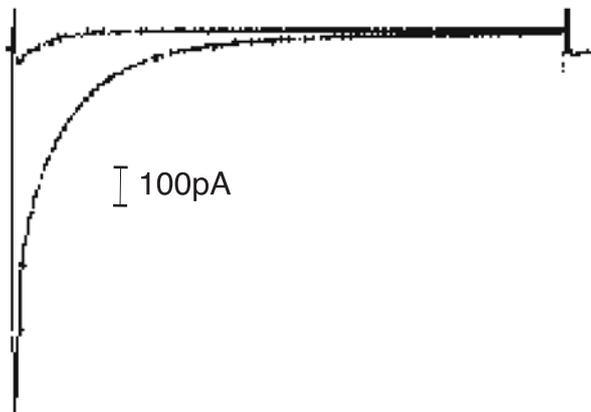
Tabelle 3-3: Basale Stromgröße, Zellkapazität und basale Stromdichte der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	44	31	
Basale Stromgröße [pA]	-95,1 (-21,1; -360,4) -141,8 $\pm$ 23,9	-65,9 (-33,3; -207,9) -101,0 $\pm$ 12,5	p=0,734
Zellkapazität [pF]	72 (46; 141) 82 $\pm$ 6	69 (38; 132) 78 $\pm$ 6	p=0,580
Basale Stromdichte [pA/pF]	-1,09 (-0,39; -4,82) -1,72 $\pm$ 0,26	-1,16 (-0,46; -2,55) -1,36 $\pm$ 0,16	p=0,928

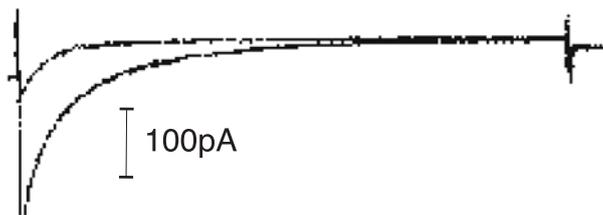
### 3.1.3 Stimulation mit Isoproterenol

In Abbildung 3-6 und Tabelle 3-4 ist für Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$  nur für die Zellen, bei denen der Strom mit Isoproterenol stimuliert wurde, jeweils die basale Stromdichte sowie die Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol dargestellt bzw. angegeben. Daher unterscheiden sich die Werte für die basale Stromdichte geringfügig von den in der Tabelle 3-3 angegebenen Maßzahlen, welche sich aus allen Zellen, bei denen ein basaler Kalziumstrom gemessen wurde, errechnen.

Im statistischen Vergleich zeigt sich in der Gruppe  $LVEF \geq 60\%$  eine signifikant höhere Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol ( $p=0,022$ )



**Abbildung 3-4: Beispielstromkurven einer Messung bei einer Zelle der Gruppe  $LVEF \geq 60\%$  basal und nach Stimulation mit Isoproterenol**



**Abbildung 3-5: Beispielstromkurven einer Messung bei einer Zelle der Gruppe  $LVEF \leq 45\%$  basal und nach Stimulation mit Isoproterenol**

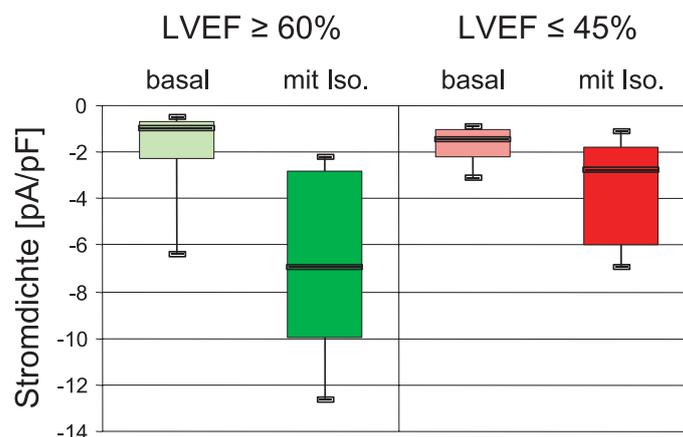


Abbildung 3-6: Stromdichte vor und nach Gabe von Isoproterenol

Tabelle 3-4: Stromdichte unter maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	11	13	
Basale Stromdichte [pA/pF]	-0,93 (-0,46; -2,30) -1,11 $\pm$ 0,19	-1,16 (-0,86; -3,26) -1,54 $\pm$ 0,23	
Stromdichte unter Isoproterenol [pA/pF]	-6,93 (-2,23; -12,65) -6,71 $\pm$ 1,14	-2,75 (-1,09; -6,92) -3,56 $\pm$ 0,61	p=0,022**

Eine weitere Methode der Quantifizierung ist die Bestimmung der Steigerungsfaktoren. Diese wurden errechnet aus dem Quotienten des Kalziumstroms unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol und dem basalen Strom der jeweiligen Zelle. Der Faktor gibt also an, auf das Wievielfache sich der basale Ausgangsstrom unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol steigern ließ.

Hier zeigt der Vergleich der Steigerungsfaktoren zwischen den Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45% eine hochsignifikant höhere Steigerbarkeit in der Gruppe LVEF  $\geq$  60% (p=0,002).

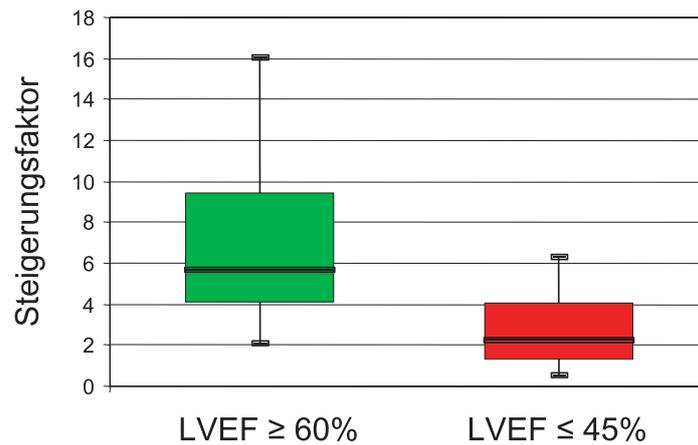


Abbildung 3-7: Steigerungsfaktoren des Stroms unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

Tabelle 3-5: Steigerungsfaktoren bei maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	11	13	
Steigerungsfaktor	5,7 (2,1; 16,1) 7,0 $\pm$ 1,3	2,3 (0,6; 6,4) 2,7 $\pm$ 0,5	p=0,002**

### 3.1.4 Spannungsabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom Klemmpotential wurde entsprechend der in Kapitel 2.4.4 (S. 21) geschilderten Methode charakterisiert. In beiden Gruppen waren die Kalziumeinwärtsströme durchgehend erst bei Depolarisationen auf  $-40\text{mV}$  und höher nachweisbar. Im Vergleich des halbmaximalen Aktivierungspotentials ( $V_{1/2}$ ) zeigt sich unter Ausgangsbedingungen kein Unterschied zwischen den Gruppen  $\text{LVEF} \geq 60\%$  und  $\text{LVEF} \leq 45\%$ . In der Gruppe  $\text{LVEF} \geq 60\%$  kommt es tendenziell ( $p=0,093$ ) zu einer Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. In der Gruppe  $\text{LVEF} \leq 45\%$  zeigt sich keinerlei statistisch relevante Veränderung der spannungsabhängigen Stromaktivierung. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ist zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

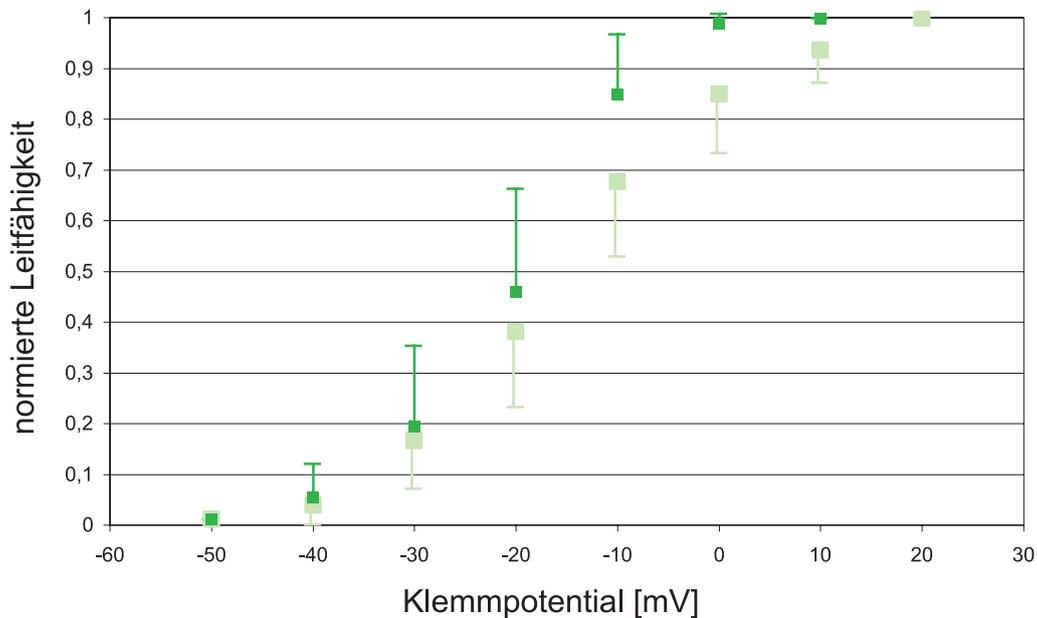


Abbildung 3-8: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe  $\text{LVEF} \geq 60\%$  (Werte basal: hellgrün, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation: dunkelgrün, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall, vgl. Kapitel 2.6 S. 24)

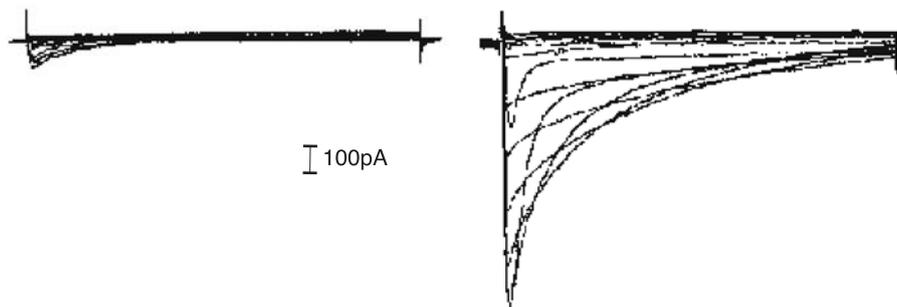


Abbildung 3-9: Beispielstromkurven einer Spannungsabhängigkeitsmessung bei einer Zelle der Gruppe  $\text{LVEF} \geq 60\%$  basal (links) und nach Stimulation mit Isoproterenol (rechts)

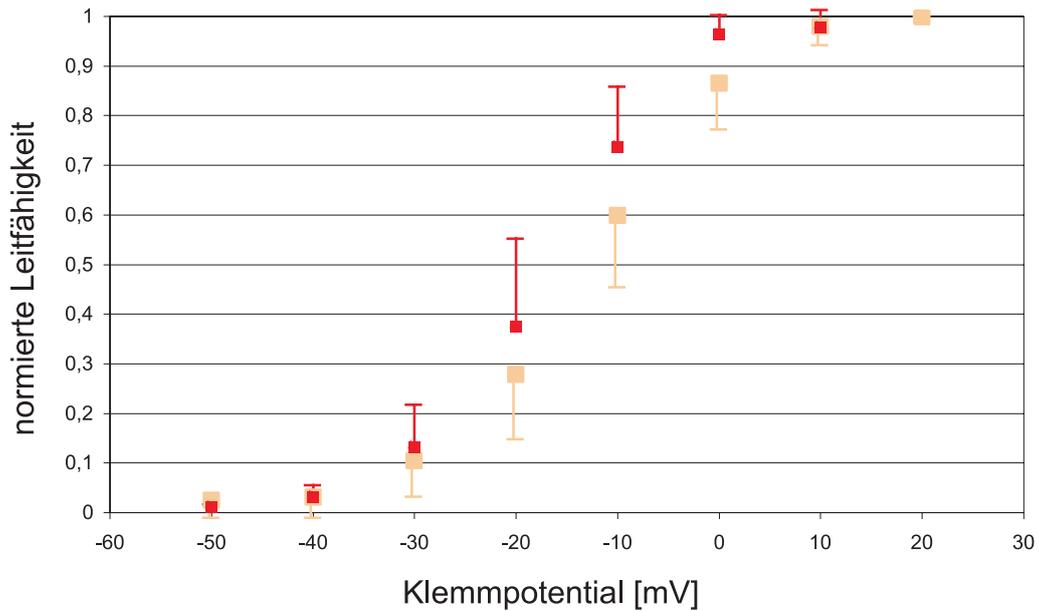


Abbildung 3-10: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe LVEF  $\leq$  45% (Werte basal: hellrot, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation: dunkelrot)

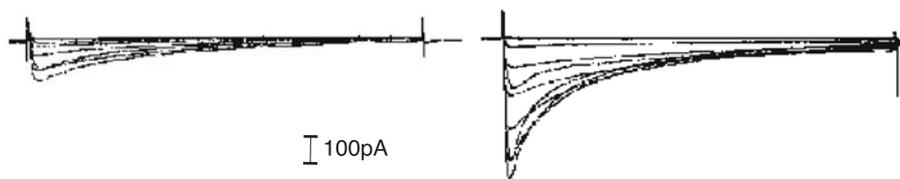


Abbildung 3-11: Beispielstromkurven einer Spannungsabhängigkeitsmessung bei einer Zelle der Gruppe LVEF  $\leq$  45% basal (links) und nach Stimulation mit Isoproterenol (rechts)

Tabelle 3-6:  $V_{1/2}$  der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45% basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
	basal n=24 mit Iso. n=11	basal n=23 mit Iso. n=13	
$V_{1/2}$ basal [mV]	-16,8 (-29,2; -0,96) -16,3 $\pm$ 2,1	-11,3 (-23,8; -1,7) -13,0 $\pm$ 1,8	p=0,202
$V_{1/2}$ mit Isoproterenol [mV]	-18,7 (-33,9; -10,4) -19,6 $\pm$ 2,1	-14,8 (-27,3 -9,1) -16,5 $\pm$ 1,7	p=0,228
	p=0,093*	p=0,754	

### 3.1.5 Kalziumstrominaktivierung

Die Stromabnahme über die Zeit während eines Spannungspulses ließ sich durchgängig mit einer doppeltexponentiellen Funktion beschreiben. Mit der in Kapitel 2.4.4 (S. 21) geschilderten Methode konnten so stets zwei Inaktivierungskonstanten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) und die dazugehörigen Amplituden ( $A_1$ ,  $A_2$ ) ermittelt werden.

In der Gruppe  $LVEF \geq 60\%$  zeigt die schnelle Inaktivierungskonstante ( $\tau_1$ ) unter Ausgangsbedingungen eine tendenzielle Abhängigkeit von der Depolarisationsspannung ( $p=0,056$ ), im Sinne einer langsameren Inaktivierung bei höherer Spannung. Dieser Zusammenhang ist unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ausgeprägter und statistisch signifikant ( $p=0,032$ ). Im Vergleich der Ausgangswerte mit den Werten unter Isoproterenol zeigt sich eine signifikante Beschleunigung der Inaktivierung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation.

Ein ähnlicher Zusammenhang zeigt sich in der Gruppe  $LVEF \leq 45\%$ . Allerdings ist hier die Spannungsabhängigkeit von  $\tau_1$  nur unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation statistisch auffällig ( $p=0,011$ ). Ferner ist die Verringerung von  $\tau_1$  nach Gabe von Isoproterenol nur bei 0mV statistisch signifikant. Für  $-10\text{mV}$  und  $+10\text{mV}$  wird das Signifikanzniveau jeweils nur knapp verfehlt, so dass jedoch das Kriterium zur Annahme einer Tendenz erfüllt wird.

Für die langsame Inaktivierungskonstante ( $\tau_2$ ) scheint es ebenfalls sowohl für  $LVEF \geq 60\%$ , als auch  $LVEF \leq 45\%$  zu einer Verringerung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu kommen. Jedoch sind die Beziehungen, auch bezüglich der Abhängigkeit vom Depolarisationspotential, jeweils weniger einheitlich.

In beiden Gruppen zeigt sich eine signifikante Steigerung der anteiligen Amplituden, sowohl der schnellen ( $A_1$ ), als auch der langsamen Inaktivierung ( $A_2$ ) unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation.

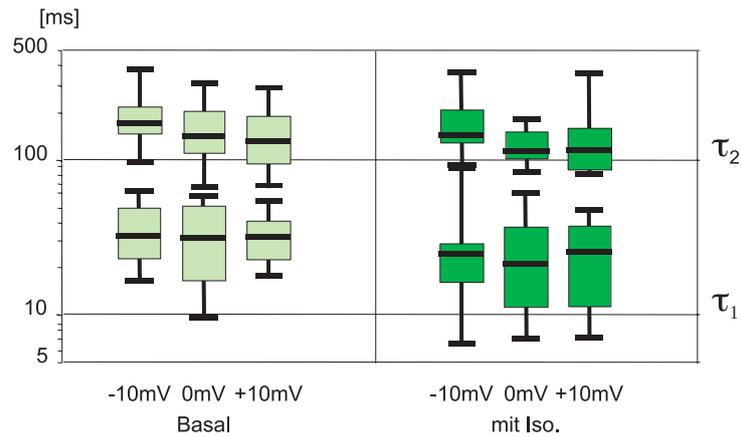


Abbildung 3-12: Inaktivierungskonstanten der Gruppe LVEF  $\geq 60\%$  basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

Tabelle 3-7: Inaktivierungskonstanten und anteilige Amplituden der Gruppe LVEF  $\geq 60\%$  basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

	Basal	Mit Isoproterenol	
n	22	10	
$\tau_1$ [ms] bei -10mV	30,6 (15,7; 58,5) 33,0 $\pm$ 3,4	23,2 (6,4; 82,5) 26,6 $\pm$ 7,4	p=0,009**
$\tau_1$ [ms] bei 0mV	32,6 (10,4; 60,7) 34,1 $\pm$ 3,8	22,6 (7,4; 64,5) 27,0 $\pm$ 5,7	p=0,036**
$\tau_1$ [ms] bei +10mV	34,6 (19,4; 57,2) 35,8 $\pm$ 3,1	27,9 (7,9; 51,6) 28,3 $\pm$ 4,9	p=0,035**
Globaler Test	p=0,056*	p=0,032**	
$\tau_2$ [ms] bei -10mV	162,0 (89,4; 355,0) 189,6 $\pm$ 18,4	136,0 (85,2; 340,0) 165,2 $\pm$ 25,3	p=0,058*
$\tau_2$ [ms] bei 0mV	143,0 (70,8; 319,6) 166,1 $\pm$ 16,4	116,5 (84,7; 185,8) 126,9 $\pm$ 10,5	p=0,032**
$\tau_2$ [ms] bei +10mV	141,0 (71,1; 305,8) 165,7 $\pm$ 17,8	124,5 (85,7; 385,9) 154,5 $\pm$ 30,2	p=0,433
Globaler Test	p=0,841	p=0,469	
$A_1$ [pA] bei -10mV	-54,4 (-191; -12,0) -80,6 $\pm$ 24,2	-329 (-612; -91,0) -310 $\pm$ 63,2	p=0,018**
$A_1$ [pA] bei 0mV	-34,5 (-156; -7,1) -68,3 $\pm$ 15,1	-304 (-905; -61,3) -386 $\pm$ 84,9	p=0,008**
$A_1$ [pA] bei +10mV	-58,2 (-155; -11,2) -64,4 $\pm$ 11,2	-235 (-530; -31,8) -260 $\pm$ 55,3	p=0,012**
$A_2$ [pA] bei -10mV	-35,9 (-132; -9,7) -58,0 $\pm$ 15,5	-222 (-333; -55,8) -208 $\pm$ 30,4	p=0,012**
$A_2$ [pA] bei 0mV	-36,8 (-161; -14,9) -73,1 $\pm$ 21,1	-328 (-812; -76,6) -347 $\pm$ 75,7	p=0,008**
$A_2$ [pA] bei +10mV	-41,0 (-157; -11,9) -69,2 $\pm$ 20,4	-307 (-980; -72,6) -391 $\pm$ 96,7	p=0,018**

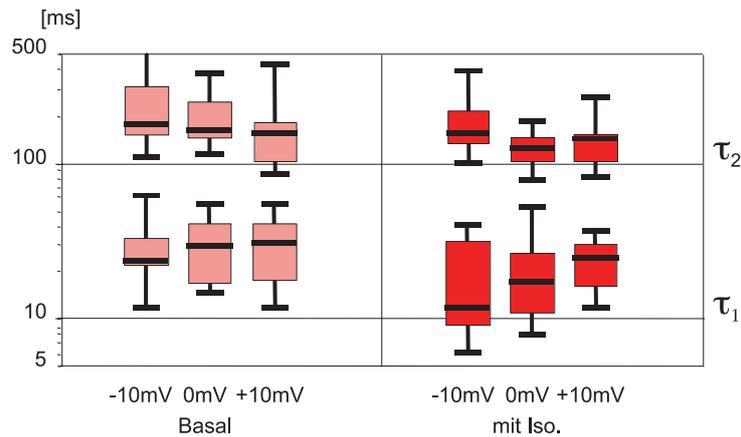


Abbildung 3-13: Inaktivierungskonstanten der Gruppe LVEF  $\leq 45\%$  basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

Tabelle 3-8: Inaktivierungskonstanten und anteilige Amplituden der Gruppe LVEF  $\leq 45\%$  basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

	Basal	Mit Isoproterenol	
n	24	14	
$\tau_1$ [ms] bei -10mV	23,6 (11,5; 61,1) 30,4 $\pm$ 4,2	11,6 (5,9; 39,5) 18,2 $\pm$ 3,4	p=0,058*
$\tau_1$ [ms] bei 0mV	28,7 (14,4; 52,8) 29,7 $\pm$ 2,8	17,4 (7,8; 50,6) 21,4 $\pm$ 4,0	p=0,032**
$\tau_1$ [ms] bei +10mV	30,9 (11,7; 53,1) 30,8 $\pm$ 2,9	24,3 (11,7; 36,4) 23,2 $\pm$ 2,3	p=0,055*
Globaler Test	p=0,269	p=0,011**	
$\tau_2$ [ms] bei -10mV	175,0 (109,2; 565,8) 244,0 $\pm$ 32,3	154,0 (97,0; 383,4) 186,4 $\pm$ 27,9	p=0,078*
$\tau_2$ [ms] bei 0mV	159,0(113,2; 358,2) 204,4 $\pm$ 19,9	125,0 (76,4; 185,6) 124,4 $\pm$ 9,3	p=0,009**
$\tau_2$ [ms] bei +10mV	151,0 (81,7; 421,5) 181,6 $\pm$ 24,8	140,0 (78,1; 257,8) 140,6 $\pm$ 16,0	p=0,230
Globaler Test	p=0,036**	p=0,004**	
A <sub>1</sub> [ms] bei -10mV	-46,6 (-114; -6,0) -60,0 $\pm$ 13,6	-169 (-762; -18,7) -265 $\pm$ 71,1	p=0,001**
A <sub>1</sub> [ms] bei 0mV	-53,0 (-164; -11,8) -63,7 $\pm$ 10,2	-174 (-733; -25,9) -269 $\pm$ 66,2	p=0,002**
A <sub>1</sub> [ms] bei +10mV	-41,7 (-114; -10,5) -51,5 $\pm$ 8,1	-114 (-538; -17,9) -187 $\pm$ 46,8	p=0,005**
A <sub>2</sub> [ms] bei -10mV	-33,7 (-181; -10,3) -61,2 $\pm$ 12,6	-121 (-430; -18,1) -164 $\pm$ 37,6	p=0,004**
A <sub>2</sub> [ms] bei 0mV	-63,4 (-175; -24,0) -76,8 $\pm$ 12,1	-143 (-594; -22,3) -228 $\pm$ 51,2	p=0,003**
A <sub>2</sub> [ms] bei +10mV	-65,5 (-139; -18,5) -77,4 $\pm$ 10,3	-178 (-628; -16,4) -259 $\pm$ 59,6	p=0,006**

Vergleicht man zwischen den Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$  einzeln die entsprechenden Inaktivierungskonstanten, findet man keine Unterschiede. Auch die anteiligen Amplituden unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

**Tabelle 3-9: Vergleich der Inaktivierungskonstanten zwischen den Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  (basal n=22, mit Iso. n=10) und  $LVEF \leq 45\%$  (basal n=24, mit Iso. n=14)**

	$\tau_1$	$\tau_2$
Basal bei -10mV	p=0,314	p=0,259
Basal bei 0mV	p=0,453	p=0,168
Basal bei +10mV	p=0,222	p=0,966
Iso. bei -10mV	p=0,305	p=0,682
Iso. bei 0mV	p=0,371	p=0,978
Iso. bei +10mV	p=0,472	p=0,978

**Tabelle 3-10: Vergleich der Amplitudengrößen zwischen den Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  (basal n=22, mit Iso. n=10) und  $LVEF \leq 45\%$  (basal n=24, mit Iso. n=14)**

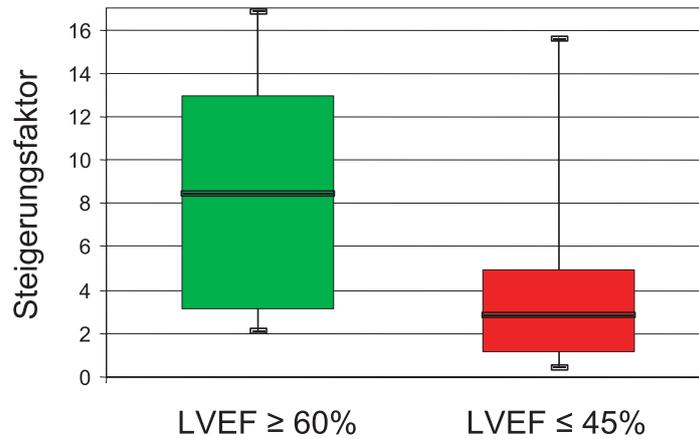
	$A_1$	$A_2$
Basal bei -10mV	p=0,464	p=0,848
Basal bei 0mV	p=0,749	p=0,167
Basal bei +10mV	p=0,560	p=0,067*
Iso. bei -10mV	p=0,378	p=0,263
Iso. bei 0mV	p=0,242	p=0,216
Iso. bei +10mV	p=0,219	p=0,285

Aus der dem Strom angeglichenen mathematischen Funktion lässt sich durch Integration ein Wert kalkulieren, der mit dem Nettokalziumeinstrom in die Zelle korreliert. Dieser Wert wurde für eine 200ms dauernde Depolarisation (entsprechend einer typischen  $APD_{50}$ ) errechnet. Dadurch sollte geprüft werden, ob die bereits erarbeiteten Unterschiede in der Stromgröße unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation (vgl. Kapitel 3.1.3, S. 29) durch die dann beschleunigte Inaktivierung des Stroms relativiert werden.

Beim Vergleich dieser Werte vor und nach Gabe von Isoproterenol zeigt sich für beide Gruppen, dass das Integral trotz der beschleunigten Inaktivierung signifikant zunimmt (p=0,006 und p=0,003). Zwischen den Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$ , ergibt sich, bei allerdings sehr großer Streuung, kein statistisch signifikanter Unterschied, sowohl für die basalen Werte, als auch für die unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Wenn man jedoch das Integral unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation in Bezug zum Ausgangswert setzt, zeigt sich für diesen Steigerungsfaktor ein signifikant höherer Wert in der Gruppe  $LVEF \geq 60\%$ .

**Tabelle 3-11: Stromkurvenintegrale der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%**

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
	basal n=22 mit Iso. n=10	basal n=24 mit Iso. n=14	
Stromkurvenintegral Basal [nC]	5,0 (1,7; 19,8) 9,9 $\pm$ 2,9	8,7 (3,5; 22,9) 10,3 $\pm$ 1,5	p=0,170
Stromkurvenintegral unter Isoproterenol [nC]	40,4 (13,1; 114,7) 43,2 $\pm$ 10,0	21,1 (3,4; 70,9) 29,9 $\pm$ 6,5	p=0,260
	p=0,006**	p=0,003**	



**Abbildung 3-14: Steigerungsfaktoren des Stromkurvenintegrals<sub>0ms-200ms</sub> unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation**

**Tabelle 3-12: Steigerungsfaktor des Stromkurvenintegrals unter Stimulation mit Isoproterenol der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und LVEF  $\leq$  45%**

	LVEF $\geq$ 60%	LVEF $\leq$ 45%	
n	10	14	
Steigerungsfaktor	8,4 (2,1; 16,9) 8,5 $\pm$ 1,9	2,9 (0,44; 15,6) 4,5 $\pm$ 1,9	p=0,028**

## 3.2 Korrelation mit Herzinsuffizienzparameter

### 3.2.1 Stromdichte

Die Stromdichte, die unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol erreicht werden konnte, ist in Abbildung 3-15 gegen die bei den jeweiligen Patienten gemessene LVEF aufgetragen. Dabei wurde der Anschaulichkeit halber der Betrag der Stromdichte gewählt, um eine Zunahme des Stroms durch eine positive Korrelation zu repräsentieren. Darin enthalten sind auch die Zellen von 2 Patienten, deren LVEF zwischen 45% und 60% lag, so dass sie nicht in die definierten Gruppen eingeteilt werden konnten. Es lässt sich eine mit  $p=0,011$  hochsignifikante positive Korrelation zwischen der LVEF und Stromdichte unter maximaler Stimulation nachweisen. Der Korrelationskoeffizient ( $\rho$ ) beträgt 0,51. Die Funktion der Regressionsgeraden ist:

$$\text{Stromdichte [pA/pF]} = 1,258 + 0,076 \cdot \text{LVEF [\%]}$$

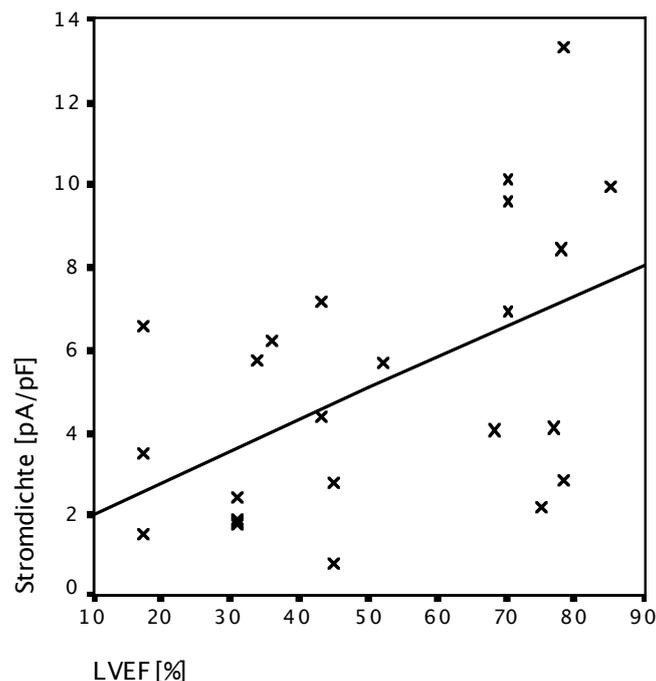


Abbildung 3-15: Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol in Abhängigkeit von LVEF

Mit dem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP), der bei den Patienten im Rahmen der präoperativen Herzkatheteruntersuchung bestimmt wurde, steht ein weiterer Wert zur Verfügung, welcher eine gute Aussage über die Einschränkung der Ventrikelfunktion erlaubt. In Abbildung 3-16 ist der Zusammenhang zwischen dem LVEDP und der Stromdichte unter maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulation dargestellt. Für die negative lineare

Korrelation ergibt sich ein Koeffizient von  $\rho = -0,58$ . Auch hier ist die Beziehung mit  $p = 0,003$  hochsignifikant. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$\text{Stromdichte [pA/pF]} = 7,962 - 0,155 \cdot \text{LVEDP [mmHg]}$$

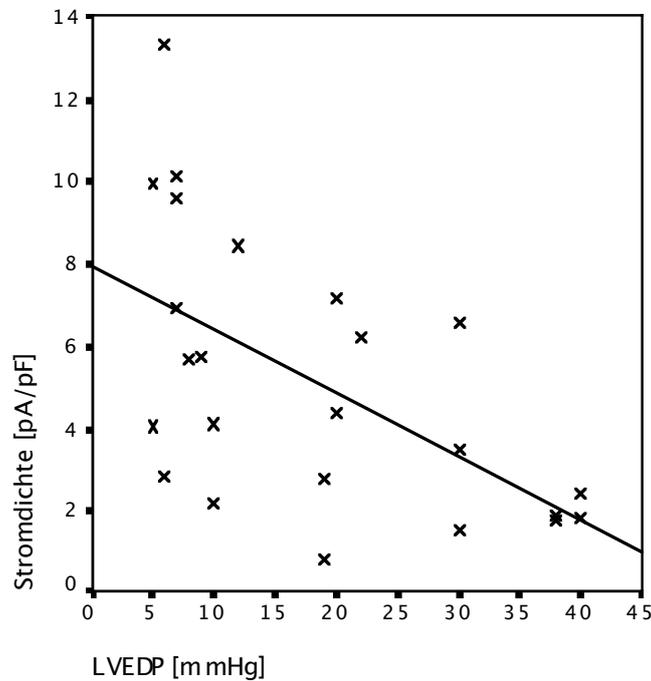


Abbildung 3-16: Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol in Abhängigkeit von LVEDP

### 3.2.2 Steigerungsfaktoren

Vergleichbare Beziehungen wie im vorhergehenden Kapitel lassen sich auch für die Steigerungsfaktoren herstellen. Der Zusammenhang zwischen der LVEF und den Steigerungsfaktoren mit einem Koeffizienten von  $\rho = 0,56$  ist mit  $p = 0,004$  hochsignifikant. Die entsprechende Gleichung der Geraden lautet:

$$\text{Steigerungsfaktor} = 0,276 + 0,087 \cdot \text{LVEF [\%]}$$

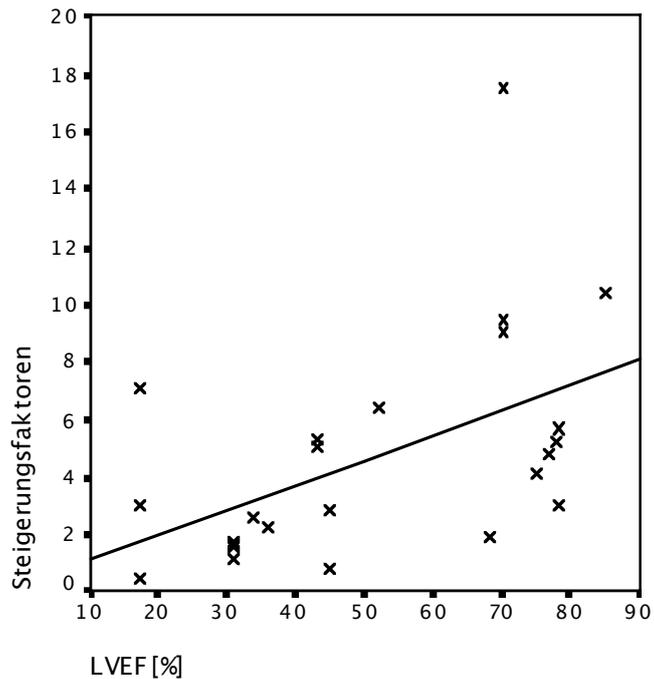


Abbildung 3-17: Steigerungsfaktoren in Abhängigkeit von LVEF

Auch hier lässt sich zum LVEDP als weiterem Herzinsuffizienzparameter eine hochsignifikante ( $p=0,002$ ) Beziehung mit dem Koeffizienten  $\rho=0,60$  nachweisen. Die lineare Regressionsfunktion ist:

$$\text{Steigerungsfaktor} = 7,724 - 0,166 \cdot \text{LVEDP [mmHg]}$$

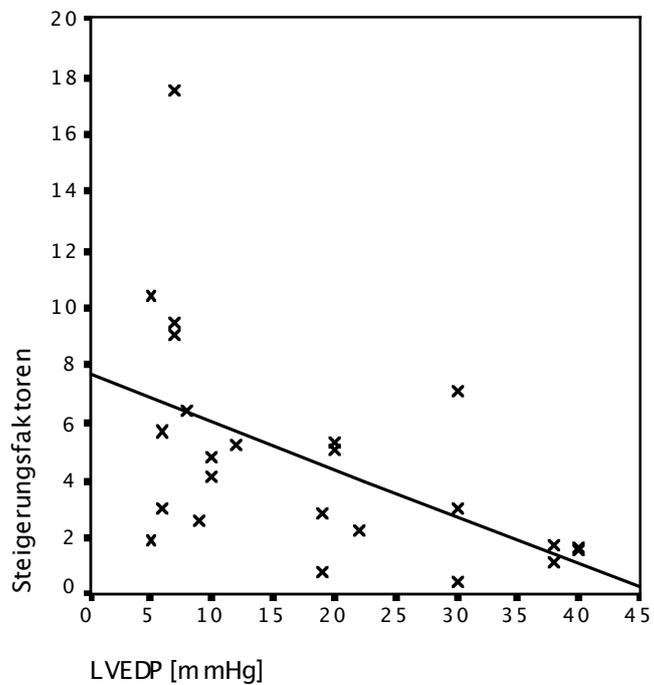


Abbildung 3-18: Steigerungsfaktoren in Abhängigkeit von LVEDP

### 3.3 Spenderherzen und deren Vergleich mit der Gruppe $\geq 60\%$

Entsprechend den einheitlichen farblichen Markierungen wurde auch für die Spenderherzgruppe in den Abbildungen durchgehend ein blauer Farbton gewählt.

#### 3.3.1 Basalstromgröße und Zellkapazität

Vergleicht man die absolute Kalziumstromgröße unter Ausgangsbedingungen zwischen der Gruppe mit  $LVEF \geq 60\%$  und der Spenderherzgruppe, so findet man einen tendenziell größeren Strom in der Spenderherzgruppe ( $p=0,075$ ). Ein Unterschied in der Zellkapazität lässt sich nicht feststellen ( $p=0,949$ ). Der Vergleich der basalen Stromdichte verfehlt nur knapp das Kriterium zur Annahme einer Tendenz zu höherer Stromdichte in der Spenderherzgruppe ( $p=0,106$ ).

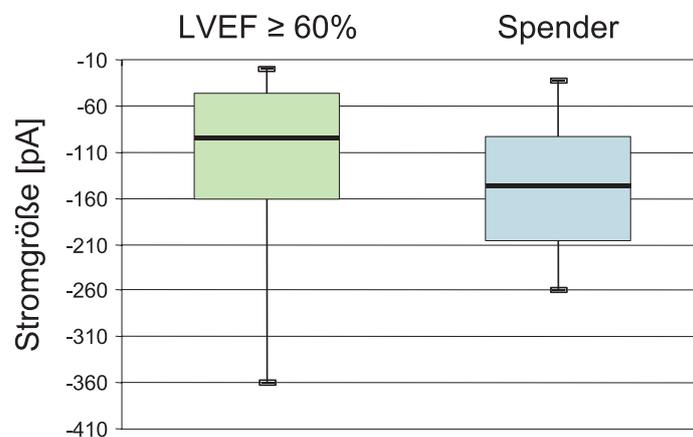


Abbildung 3-19: Basale Stromgröße der Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und Spenderherzen

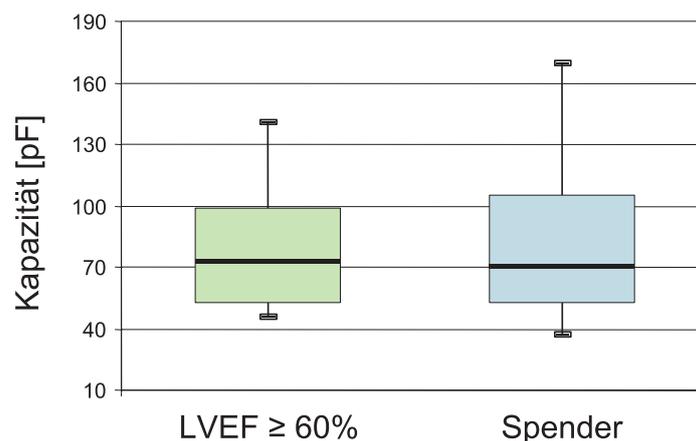


Abbildung 3-20: Zellkapazität der Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und Spenderherzen

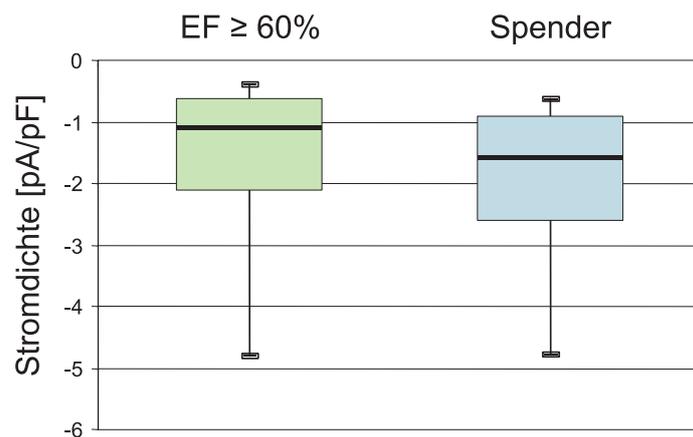


Abbildung 3-21: Basale Stromdichte der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und Spenderherzen

Tabelle 3-13: Basale Stromgröße, Zellkapazität und basale Stromdichte der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und Spenderherzen

	LVEF $\geq$ 60%	Spender	
n	44	29	
Basale Stromgröße [pA]	-95,1 (-21,1; -360,4) -141,8 $\pm$ 23,9	-147,0 (-31,7; -260,0) -147,0 $\pm$ 14,4	p=0,075*
Zellkapazität [pF]	72 (46; 141) 82 $\pm$ 6	70 (38; 170) 84 $\pm$ 8	p=0,949
Basale Stromdichte [pA]	-1,09 (-0,39; -4,82) -1,72 $\pm$ 0,26	-1,59 (-0,62; -4,78) -2,10 $\pm$ 0,32	p=0,106

### 3.3.2 Stimulation mit Isoproterenol

Ein Unterschied in der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit zwischen den Gruppen LVEF  $\geq$  60% und Spenderherzen lässt sich sowohl bei Betrachtung der absoluten Stromdichte unter maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulation als auch in Bezug auf die Steigerungsfaktoren nicht nachweisen.

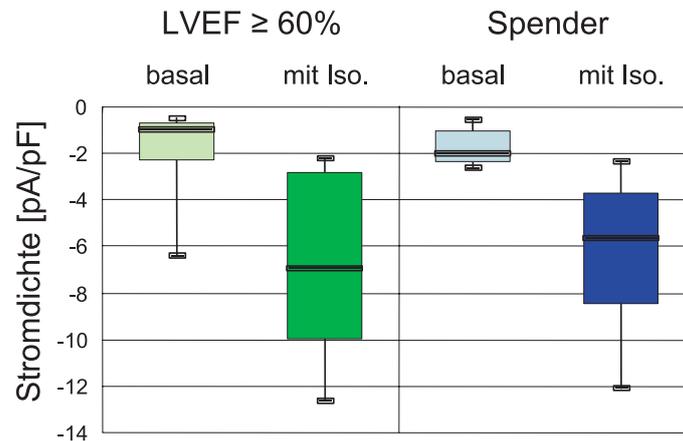


Abbildung 3-22: Stromdichte vor und nach Gabe von Isoproterenol

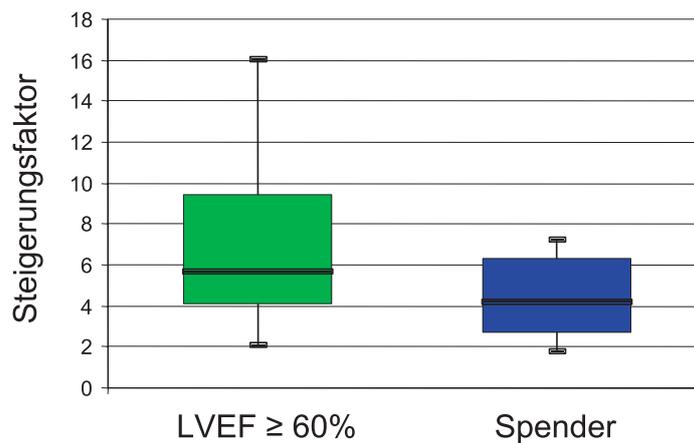


Abbildung 3-23: Steigerungsfaktoren des Stroms unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

Tabelle 3-14: Stromdichte und Steigerungsfaktoren bei maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF  $\geq$  60% und Spenderherzen

	LVEF $\geq$ 60%	Spender	
n	11	6	
Basale Stromdichte [pA/pF]	-0,93 (-0,46; -2,30) -1,11 $\pm$ 0,19	-1,44 (-0,56; -2,35) -1,52 $\pm$ 0,29	
Stomdichte unter Isoproterenol [pA/pF]	-6,93 (-2,23; -12,65) -6,71 $\pm$ 1,14	-5,61 (-2,34; -12,08) -6,18 $\pm$ 1,36	p=0,961
Steigerungsfaktor	5,7 (2,1; 16,1) 7,0 $\pm$ 1,3	4,2 (1,8; 7,3) 4,4 $\pm$ 0,8	p=0,301

### 3.3.3 Spannungsabhängigkeit

Unter Ausgangsbedingungen scheint die Spannungsabhängigkeit des Kalziumstroms der Spenderherzen im Vergleich zur Gruppe LVEF  $\geq 60\%$  nach rechts verschoben, ohne dass jedoch das statistische Merkmal einer Tendenz oder Signifikanz erfüllt wird.

Eine Abnahme des Potentials der halbmaximalen Aktivierung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, wie in der Gruppe LVEF  $\geq 60\%$ , lässt sich bei den Spenderherzen bei sehr kleiner Fallzahl nicht herausarbeiten. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation unterscheiden sich die Werte zwischen den zwei Gruppen tendenziell voneinander, im Sinne einer Aktivierung bei höheren Potentialen in der Gruppe der Spenderherzen, wobei das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt wird.

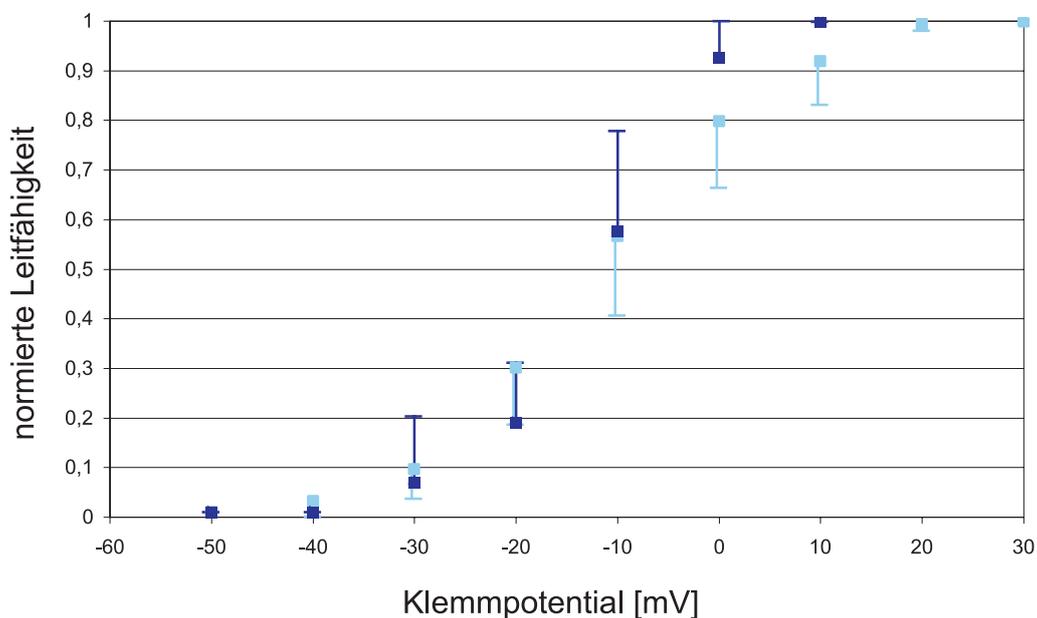


Abbildung 3-24: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe Spenderherzen (Werte basal: hellblau, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation: dunkelblau)

Tabelle 3-15:  $V_{1/2}$  der Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  und Spenderherzen basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

	LVEF $\geq 60\%$	Spender	
n	basal n=24 mit Iso. n=11	basal n=19 mit Iso. n=3	
$V_{1/2}$ basal [mV]	-16,8 (-29,2; -0,96) -16,3 $\pm$ 2,1	-12,4 (-24,5; -3,0) -11,5 $\pm$ 2,1	p=0,129
$V_{1/2}$ mit Isoproterenol [mV]	-18,7 (-33,9; -10,4) -19,6 $\pm$ 2,1	-9,9 (-15,2; -9,7) -11,5 $\pm$ 1,8	p=0,052*
	p=0,093*	p=0,285	

### 3.3.4 Kalziumstrominaktivierung

Innerhalb der Gruppe der Spenderherzen ist, auch aufgrund der niedrigen Fallzahl, die Charakterisierung der Beziehungen der Inaktivierungskonstanten und anteiligen Amplituden zu den Depolarisationspotentialen und der Stimulation mit Isoproterenol nur eingeschränkt möglich. Eine Beschleunigung der schnellen Inaktivierung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zeigt sich als statistische Tendenz. Die Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierungskonstante lässt sich nicht herausarbeiten. Bei  $\tau_2$  zeigt sie sich nur unter basalen Bedingungen.

Die Steigerung der anteiligen Amplituden unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ist bei niedriger Fallzahl statistisch nicht signifikant.

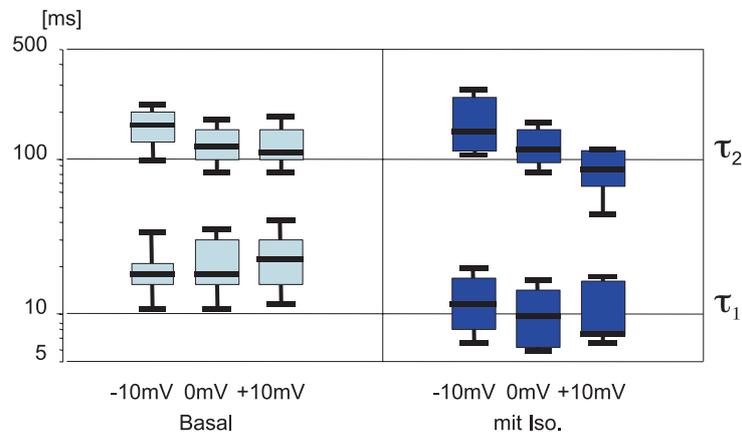


Abbildung 3-25: Inaktivierungskonstanten der Spenderherzgruppe basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation

**Tabelle 3-16: Inaktivierungskonstanten der Spenderherzgruppe basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation**

	Basal	Mit Isoproterenol	
n	16	5	
$\tau_1$ [ms] bei -10mV	18,0 (10,5; 33,4) 19,2 $\pm$ 1,9	11,6 (6,7; 19,3) 12,3 $\pm$ 2,6	p=0,090*
$\tau_1$ [ms] bei 0mV	18,3 (10,5; 34,4) 21,3 $\pm$ 2,2	9,9 (5,9; 16,7) 10,1 $\pm$ 2,0	p=0,055*
$\tau_1$ [ms] bei +10mV	22,5 (11,6; 39,8) 23,5 $\pm$ 2,3	7,6 (6,6; 17,1) 11,0 $\pm$ 2,3	p=0,055*
Globaler Test	p=0,165	p=0,779	
$\tau_2$ [ms] bei -10mV	158 (94,6; 218,9) 157,8 $\pm$ 10,7	145,5 (103,0; 266,0) 165,0 $\pm$ 36,4	p=0,328
$\tau_2$ [ms] bei 0mV	117 (80,4; 171,6) 122,0 $\pm$ 8,0	112,0 (78,9; 167,0) 119,9 $\pm$ 15,7	p=0,500
$\tau_2$ [ms] bei +10mV	107,5 (79,3; 179,1) 119,6 $\pm$ 8,7	84,5 (42,4; 111,0) 86,2 $\pm$ 12,5	p=0,328
Globaler Test	p=0,038**	p=0,174	
A <sub>1</sub> [pA] bei -10mV	-50,9 (-182; -21,1) -73,4 $\pm$ 14,0	-141 (-353; -92,6) -182 $\pm$ 60,9	p=0,180
A <sub>1</sub> [pA] bei 0mV	-69,7 (-172; -21,7) -82,3 $\pm$ 12,4	-235 (-528; -179) -298 $\pm$ 65,0	p=0,109
A <sub>1</sub> [pA] bei +10mV	-86,0 (-133; -35,7) -82,5 $\pm$ 8,6	-246 (-377; -144) -250 $\pm$ 37,2	p=0,109
A <sub>2</sub> [pA] bei -10mV	-43,1 (-129; -10,2) -52,4 $\pm$ 9,7	-82,0 (-145; -74,5) -95,9 $\pm$ 16,7	p=0,180
A <sub>2</sub> [pA] bei 0mV	-64,0 (-128; -13,3) -68,1 $\pm$ 9,9	-167 (-203; -124) -167 $\pm$ 14,6	p=0,109
A <sub>2</sub> [pA] bei +10mV	-79,7 (-132; -21,2) -76,4 $\pm$ 9,7	-226 (-355; -162) -239 $\pm$ 32,0	p=0,109

Beim Vergleich der Inaktivierungskonstanten des Ausgangsstroms zwischen der Gruppe mit LVEF  $\geq 60\%$  und der Spenderherzgruppe findet sich global betrachtet eine schnellere Inaktivierung des Stroms in der Gruppe der Spenderherzen (Werte vgl. Tabelle 3-7, S. 35 und Tabelle 3-16, S. 47). Ein signifikantes Ergebnis konnte unter Basalbedingungen für die schnelle Inaktivierungskonstante bei allen Depolarisationspotentialen errechnet werden. Wesentliche Unterschiede der Amplituden ergeben sich zwischen den zwei Gruppen nicht.

**Tabelle 3-17: Vergleich der Inaktivierungskonstanten zwischen den Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  (basal n=24, mit Iso. n=10) und Spenderherzen (basal n=16, mit Iso. n=5)**

	$\tau_1$	$\tau_2$
Basal bei -10mV	p=0,002**	P=0,452
Basal bei 0mV	p=0,039**	p=0,081*
Basal bei +10mV	p=0,004**	p=0,101
Iso. bei -10mV	p=0,106	p=0,940
Iso. bei 0mV	p=0,028**	p=0,679
Iso. bei +10mV	p=0,019**	p=0,019**

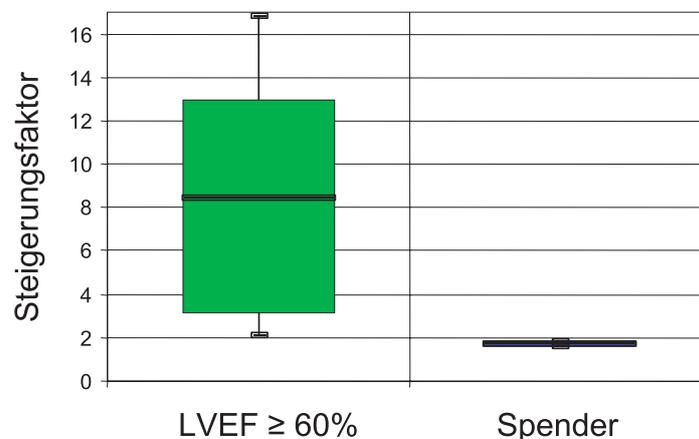
**Tabelle 3-18: Vergleich der Amplitudengrößen zwischen den Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  (basal n=24, mit Iso. n=10) und Spenderherzen (basal n=16, mit Iso. n=5)**

	$A_1$	$A_2$
Basal bei -10mV	p=0,643	p=0,740
Basal bei 0mV	p=0,135	p=0,288
Basal bei +10mV	p=0,124	p=0,070*
Iso. bei -10mV	p=0,280	p=0,050*
Iso. bei 0mV	p=0,426	p=0,206
Iso. bei +10mV	p=1,0	p=0,440

Wiederum wurde das Stromkurvenintegral als Maß für den Nettokalziumeinstrom bestimmt. Die Steigerung des Integrals unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation verfehlt in der Spenderherzgruppe, auch aufgrund der geringen Fallzahl und der großen Streuung, nur knapp das Signifikanzniveau ( $p=0,055$ ). Unterschiede der Absolutwerte der Integrale zwischen den Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  und Spenderherzen sind statistisch nicht signifikant. Die faktorielle Steigerbarkeit ist in der Gruppe der Spenderherzen jedoch signifikant niedriger.

**Tabelle 3-19: Stromkurvenintegrale der Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  und Spenderherzen**

	LVEF $\geq 60\%$	Spenderherzen	
	basal n=22 mit Iso. n=10	basal n=16 mit Iso. n=5	
Stromkurvenintegral basal [nC]	5,0 (1,7; 19,8) 9,9 $\pm$ 2,9	7,6 (3,6; 14,9) 9,0 $\pm$ 1,0	p=0,190
Stromkurvenintegral unter Isoproterenol [nC]	40,4 (13,1; 114,7) 43,2 $\pm$ 10,0	22,6 (11,2; 29,7) 20,6 $\pm$ 3,1	p=0,110
	p=0,006**	p=0,055*	



**Abbildung 3-26: Steigerungsfaktoren des Stromkurvenintegrals<sub>0ms-200ms</sub> unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation**

**Tabelle 3-20: Steigerungsfaktor des Stromkurvenintegrals unter Stimulation mit Isoproterenol der Gruppen LVEF  $\geq 60\%$  und Spenderherzen**

	LVEF $\geq 60\%$	LVEF $\leq 45\%$	
n	10	3	
Steigerungsfaktor	8,4 (2,1; 16,9) 8,5 $\pm$ 1,9	1,8 (1,6; 1,8) 1,7 $\pm$ 0,5	p=0,012**

## 4 Diskussion

Bei unseren Versuchen fanden wir, dass einerseits in Bezug auf die von uns bestimmten Charakteristika des basalen L-Typ-Kalziumstroms des atrialen Kardiomyozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Herzen vorliegen. Andererseits ist die Regulationsfähigkeit des Kalziumstroms durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation bei Herzinsuffizienz eingeschränkt. Dabei korrelieren die Messwerte mit Parametern für die Schwere der kardialen Funktionseinschränkung. Eine Besonderheit unserer Untersuchung ist die Verwendung klar umschriebener, strenger Ein- und Ausschlusskriterien für die Patienten, bei welchen das untersuchte Gewebe gewonnen wurde. Im Gegensatz zu vergleichbaren Voruntersuchungen ist so eine genauere Abgrenzung der Effekte der Herzinsuffizienz an sich von relevanten Störfaktoren, welche gehäuft mit einer Herzinsuffizienz einhergehen, jedoch eigenständige Einflüsse auf den L-Typ-Kalziumkanal haben, möglich.

Weiterhin fanden wir Unterschiede des basalen L-Typ-Kalziumstroms unserer Kontrollgruppe mit Gewebeproben aus Spenderherzen. Allerdings war die Modulation durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation vergleichbar.

### 4.1 Basaler L-Typ-Kalziumstrom

Da die Kalziumeinwärtsströme in beiden Gruppen bei Depolarisationen auf  $-50\text{mV}$  und weniger nicht nachweisbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass kein funktionell bedeutsamer T-Typ Kalziumeinwärtsstrom, welcher bereits bei  $-70\text{mV}$  aktiviert wird, vorhanden ist. Die gemessenen Ströme können daher als reiner L-Typ Kalziumstrom beschrieben werden, ohne jeweils eine spezifische pharmakologische Blockierung, mit Dihydropyridinantagonisten, welche ausschließlich den L-Typ, nicht jedoch den T-Typ hemmen, zur quantitativen Differenzierung hinzuziehen zu müssen.

Zwischen herzinsuffizienten und nicht-herzinsuffizienten Patienten zeigte sich kein Unterschied des absoluten basalen L-Typ-Kalziumstroms und der Stromdichte atrialer Kardiomyozyten. Auch die Charakterisierung des Stroms durch die Inaktivierungskonstanten und die spannungsabhängige Aktivierung ergab für beide Gruppen vergleichbare Ergebnisse. Bei den Stromkurvenintegralen als indirektes Maß für den Nettokalziumeinstrom, die als weitere Möglichkeit zur Interpretation der gefundenen Werte errechnet wurden, war ebenfalls

kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz nachweisbar.

Bei einer Dilatation der Vorhöfe, welche in unserer Untersuchung ein explizites Ausschlusskriterium darstellte, war eine erhebliche Reduktion des Kalziumstroms beobachtet worden<sup>65</sup>. Die Herzinsuffizienz, die dabei der atrialen Dilatation teilweise zugrunde lag, kann in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen als solche nicht die Ursache der Reduktion in dieser Gruppe sein. Da es im Rahmen des elektrophysiologischen Remodelings bei Vorhofflimmern unabhängig von einer atrialen Dilatation zu einer Erniedrigung des Kalziumstroms kommt<sup>95;113</sup> (vgl. auch Kapitel 1.2.2, S. 6), ist in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung, dass in der genannten Studie bei einem Viertel der Patienten der Gruppe mit dilatierten Vorhöfen Vorhofflimmern vorlag. Somit ist eine scharfe Trennung der Effekte der Vorhofgröße und des Rhythmus nicht mehr möglich. Dennoch sind direkte Auswirkungen einer atrialen Dilatation auf die zelluläre Elektrophysiologie, beispielsweise durch chronisch veränderte Wandspannungen<sup>104</sup> oder Gefügedilatation, nicht auszuschließen. Auch die von Ouadid und Mitarbeitern gefundene Reduktion des Kalziumstroms<sup>96</sup> atrialer Kardiomyozyten bei terminal herzinsuffizienten Patienten muss relativiert werden, da einerseits eine Dilatation der Vorhöfe in dieser Gruppe vermutet werden muss, und somit hierdurch, wie soeben erwähnt, Einflüsse auf den Kalziumstrom vorliegen könnten. Andererseits muss zusätzlich aufgrund der hohen Prävalenz von Vorhofflimmern bei terminaler Herzinsuffizienz davon ausgegangen werden, dass sowohl Patienten im Sinusrhythmus als auch mit Vorhofflimmern untersucht wurden. Unter Berücksichtigung unserer Resultate sind daher in erster Linie die beiden Störvariablen atriale Dilatation und Vorhofflimmern für die Reduktion des L-Typ-Kalziumkanals in dieser Studie verantwortlich zu machen.

Interessant ist dabei, dass in einem Hundemodell für Herzinsuffizienz, die mittels tachykarder Schrittmacherstimulation im rechten Ventrikel erzeugt wurde, eine signifikante Reduktion des L-Typ-Kalziumstroms um etwa 30% gefunden wurde<sup>70</sup>. Dies steht somit in scheinbarem Widerspruch zu unseren Ergebnissen. Bei einem Vergleich müssen jedoch einige Besonderheiten berücksichtigt werden. Erstens wurden bereits diskrepante Befunde bezüglich des atrialen elektrophysiologischen Remodelings bei Herzinsuffizienz zwischen dem genannten Tiermodell und Untersuchungen an humanem Gewebe beschrieben<sup>109</sup> (Kapitel 1.3.2.2, S. 10). Daher muss unter Umständen von unterschiedlichen speziesspezifischen pathophysiologischen Prozessen ausgegangen werden. Andererseits ist auch die Ursache der

Herzinsuffizienz bei unseren Patienten von derjenigen, mit welcher in der genannten Studie die Herzinsuffizienz am Hund ausgelöst wurde, gänzlich verschieden. Die Mechanismen der durch Schrittmacherstimulation ausgelösten Herzinsuffizienz ähneln am ehesten der am Menschen beschriebenen Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie<sup>97</sup>. Bei den Patienten in der Herzinsuffizienz-Gruppe unserer Untersuchung lag jedoch ausnahmslos eine ischämische Kardiomyopathie auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung vor. Auch aufgrund des unterschiedlichen Potentials zur Erholung der Ventrikelfunktion nach Elimination der Ursache (einerseits limitierte Erholungskapazität nach Revaskularisation, andererseits nahezu vollständige Restitution nach Behandlung der Tachykardie) muss bei diesen beiden Formen der Herzinsuffizienz davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei verschiedene Entitäten mit einer gemeinsamen Endstrecke handelt. Daher muss die Übertragbarkeit eines solchen Modells hinterfragt werden, zumal es sich bei der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz beim Menschen um eine eher seltene Form handelt.

Auch auf ventrikulärer Ebene sind äquivalente Stromdichten des L-Typ-Kalziumstroms in insuffizienten und nicht-insuffizienten menschlichen Herzen gemessen worden<sup>10;22;46</sup>. Zwar existieren auch Untersuchungen, die eine Erniedrigung des L-Typ-Kalziumstroms im Ventrikel bei Herzinsuffizienz vermuten<sup>79;96</sup>. Sie halten jedoch einer kritischen Betrachtung nicht stand. In der einen Studie wurde ein minimaler Unterschied der mittleren Stromdichten, der sich im Rahmen der Streuung bewegte und entsprechend auch nicht statistisch signifikant war, hervorgehoben<sup>79</sup>. In der anderen Beobachtung wurde diese Aussage aus einer gepoolten Auswertung atrialer und ventrikulärer Zellen getroffen<sup>96</sup>. Betrachtet man aber die Ergebnisse nach Vorhöfen und Ventrikeln getrennt, zeigt sich der Unterschied ausschließlich auf atrialer Ebene. Wie bereits oben erwähnt, muss die Reduktion in dieser Studie aber anderen Faktoren zugeschrieben werden.

Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass es durch Herzinsuffizienz bei Betrachtung der ganzen Zelle zu keiner Veränderung des L-Typ-Kalziumstroms beim humanen atrialen Kardiomyozyten kommt. Alterationen des basalen L-Typ-Kalziumstroms können somit die atriale Arrhythmogenität der Herzinsuffizienz zunächst nicht erklären. Vielmehr muss in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass Herzinsuffizienz andere atriale Veränderungen bedingen kann (Dilatation, Vorhofflimmern), die dann nachgewiesene Einflüsse auf den L-Typ-Kalziumstrom haben.

Interessanterweise sind im Ventrikel jedoch die Verfügbarkeit und Öffnungswahrscheinlichkeit des L-Typ-Kalziumkanals bei Messungen mit

Einzelkanalableitungen im insuffizienten Herzen erhöht<sup>45;110</sup>. Daher muss bei unveränderter Stromdichte davon ausgegangen werden, dass die Anzahl funktioneller Kanäle reduziert ist. Vergleichbare Untersuchungen liegen für atriale Kardiomyozyten bislang jedoch nicht vor. Aufgrund der richtungweisenden Befunde am Ventrikel sollten auch auf atrialer Ebene Einzelkanalmessungen durchgeführt werden, um eine weitere Differenzierung der Interaktion von Kanaldichte und Kanalcharakteristika zu ermöglichen. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, derartige Untersuchungen, wie in unserem Fall, an humanem Gewebe mit umschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien durchzuführen, um die Effekte der Herzinsuffizienz möglichst zu isolieren.

## **4.2 $\beta$ -adrenerge Stimulation**

Die Steigerbarkeit des L-Typ-Kalziumstroms bei nicht herzinsuffizienten atrialen Kardiomyozyten liegt bei unseren Untersuchungen (Steigerungsfaktor: Median 5,7; Mittelwert 7,0) zwischen den von Cheng und Mitarbeitern (mittlerer Faktor 5,1)<sup>23</sup> und Oquadid und Mitarbeitern (mittlerer Faktor 8,5)<sup>96</sup> bestimmten Werten. In Übereinstimmung mit diesen und anderen Studien<sup>22;36;84</sup> fanden wir eine deutlich schwächere Stimulierbarkeit des L-Typ-Kalziumkanals herzinsuffizienter atrialer Kardiomyozyten. Die Steigerungsfaktoren der herzinsuffizienten Zellen (Median 2,3; Mittelwert 2,7) liegt dabei ebenfalls zwischen den Werten vergleichbarer Voruntersuchungen (Faktoren 1,4<sup>23</sup> und 3,7<sup>96</sup>).

Bei den genannten Vergleichen ist jedoch immer zu berücksichtigen, dass in den genannten Studien, im Gegensatz zu unseren Untersuchungen, weniger strenge Ein- und Ausschlusskriterien angewandt wurden. Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sind außerdem Rassenunterschiede in der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit zu diskutieren<sup>53</sup>. Des Weiteren sind in Bezug auf die Streuung der  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit die mittlerweile beschriebenen, funktionell relevanten, genetischen Polymorphismen zu berücksichtigen<sup>13;42;58;80</sup>.

Hervorzuheben ist, dass wir nicht nur bei den Steigerungsfaktoren des Stroms, sondern auch in Bezug auf die absolute Stromdichte unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine signifikante Erniedrigung bei Herzinsuffizienz nachweisen konnten. Eine verringerte L-Typ-Kalziumstromdichte wurde für eine Abnahme der Aktionspotentialdauer (APD), sowie für eine reduzierte Anpassung der APD an die Herzfrequenz verantwortlich gemacht<sup>25;134</sup>. Durch die von uns beobachtete niedrigere Kalziumstromdichte ist daher nahe liegend, dass es unter hoher  $\beta$ -adrenerger Aktivität zu einer bei insuffizienten im Vergleich zu nicht-insuffizienten

Herzen verkürzten APD kommt. Eine verkürzte APD kann durch eine verkürzte effektive Refraktärzeit (ERP) wiederum das Auftreten der Mikroentrywellen von Vorhofflimmern begünstigen<sup>89;134</sup>. Nach unseren Ergebnissen träte bei herzinsuffizienten Patienten eine relativ verkürzte ERP in Zuständen mit hoher  $\beta$ -adrenerger Aktivität auf, also zu einer Situation mit ohnehin erhöhtem arrhythmogenem Potential. Diese Erkenntnisse könnten somit eine höhere Anfälligkeit für Vorhofflimmern bei Herzinsuffizienz erklären.

Der Nachweis einer Veränderung eines Ionenstroms muss jedoch nicht zwingend eine entsprechende Reaktion des Aktionspotentials auslösen, da begleitende gegenläufige Alterationen anderer Ionenströme vorliegen könnten. Daher sollte die oben genannte Hypothese mit direkter Messung des Aktionspotentials sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation geprüft werden. In der Vergangenheit zeigte sich, dass diese Messungen an humanen atrialen Kardiomyozyten zwar möglich, jedoch mit einigen Schwierigkeiten behaftet sind und somit eine besondere Herausforderung darstellen<sup>109</sup>.

Wenn man nun die pathophysiologischen Hintergründe für das eingeschränkte Ansprechen des L-Typ-Kalziumstroms erörtert, bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten, deren Gewichtung noch ungeklärt ist, die vermutlich aber alle einen Anteil haben. Einerseits zeigten zahlreiche Untersuchungen Veränderungen des  $\beta$ -adreno-Rezeptorsystems bei Herzinsuffizienz<sup>16-18;73</sup>. Dazu gehören eine verminderte Expression des  $\beta_1$ -adreno-Rezeptors<sup>29;59</sup>, eine Desensibilisierung der verbliebenen Rezeptoren<sup>72;106</sup> sowie Alterationen auf Ebene der G-Proteine<sup>12;32;34;74;91</sup> und der Adenylatzyklase<sup>52</sup>. Dieser Umbau der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade alleine könnte die verminderte Stimulationsfähigkeit des L-Typ-Kalziumstroms erklären. Jedoch gibt es in diesem Zusammenhang auch spezifische Auffälligkeiten des L-Typ-Kalziumkanals. So wurde beispielsweise beschrieben, dass die Kanaldichte von der Anzahl der  $\beta$ -adreno-Rezeptoren abhängt<sup>77</sup>. Dies ist mit der in Kapitel 4.1 (S. 53) erläuterten Vermutung vereinbar, dass bei Herzinsuffizienz die Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Kalziumkanals zwar erhöht, seine Dichte jedoch verringert ist. Die erhöhte Aktivität des Einzelkanals erlaubt noch weitergehende Schlüsse. So kann sie Ausdruck einer gesättigten Phosphorylierung der  $\alpha_{1c}$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Kanals<sup>46</sup> sein, da eine experimentelle Begünstigung einer weiteren Phosphorylierung nicht in der Lage war, die Aktivität weiter zu steigern<sup>110</sup>. Bei Herzinsuffizienz könnte also ein Teil der Leistungsreserve des Kanals bereits verbraucht und somit eine weitere Steigerung durch  $\beta$ -adrenerge Stimuli nur noch eingeschränkt möglich

sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist eine veränderte Expression der Kanaluntereinheiten bei Herzinsuffizienz<sup>38</sup>. Dadurch könnte es zu einer geänderten Zusammensetzung der Untereinheiten mit entsprechend unterschiedlichem Verhalten des Kanals in Bezug auf die Phosphorylierung kommen<sup>85</sup>. Diesen Hypothesen widersprechen allerdings Experimente mit Forskolin, welches in der Lage ist, die Adenylatzyklase direkt zu aktivieren<sup>111</sup> und so über die Proteinkinase A zur Phosphorylierung des Kanals<sup>121</sup> führt. Sowohl an ventrikulären<sup>79</sup>, als auch atrialen<sup>23</sup> Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass trotz eingeschränkter Reaktion des L-Typ-Kalziumstroms auf  $\beta$ -adreno-Rezeptoragonisten bei Herzinsuffizienz, mit Forskolin eine Steigerung möglich war, die der bei nicht-herzinsuffizienten Patienten entsprach. Dies spricht für eine alleinige Störung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade proximal der Proteinkinase A. Da die genauen molekularbiologischen Verhältnisse der  $\beta$ -adrenergen Regulation des L-Typ-Kalziumkanals weiterhin nicht erschöpfend geklärt sind<sup>49</sup>, sind weiterführende Untersuchungen angezeigt. Bei den Absolutwerten der Stromkurvenintegrale, als indirektes Maß für den Nettokalziumeinstrom, war basal und unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz nachweisbar. Dies relativiert ein wenig den demonstrierten Unterschied in der absoluten Stromdichte bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Trotz einer geringeren stimulierten Stromdichte bei Herzinsuffizienz, könnte ein unterschiedliches Ansprechen der Kanalkinetik auf Isoproterenol den Nettokalziumeinstrom während eines Aktionspotentials ausgleichen. Allerdings zeigte sich kein direkter Unterschied bei den Inaktivierungskonstanten als Ausdruck der Kanalkinetik, auch nicht unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation (vgl. Tabelle 3-9, S. 37). Tierexperimentell konnte an transgenen Ratten gezeigt werden, dass bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz die Fähigkeit zur sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung in ventrikulären Kardiomyozyten eingeschränkt ist, wenngleich die Kalziumstromdichte unverändert ist<sup>40</sup>. Dies könnte Ausdruck eines veränderten Nettokalziumeinstroms bei beschleunigter Inaktivierung des Kanals sein. In dieser Untersuchung war  $\beta$ -adrenerge Stimulation in der Lage, den Effekt bei Hypertrophie, nicht jedoch bei Herzinsuffizienz zu beheben. Legt man den Ergebnissen der genannten Untersuchung die Hypothese des unterschiedlichen Nettokalziumeinstroms zugrunde, so müsste dieser, in Widerspruch zu unseren Daten, bei Herzinsuffizienz sowohl basal als auch unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation erniedrigt sein. Aufgrund der bekannten Folgen einer Kalziumüberladung<sup>26;39;68;119</sup> und der Bedeutung für die elektromechanische Koppelung<sup>83;112</sup> sind Veränderungen des Kalziumeinstroms mit einigen Implikationen

behaftet. Die Integration der Kalziumstromkurve ist allerdings nur ein indirektes Maß für den Kalziumeinstrom. Wahrscheinlich scheint außerdem, dass sich Unterschiede der Absolutwerte der Stromkurvenintegrale dem statistischen Nachweis in unserer Untersuchung aufgrund der Streuung und der Stichprobengröße entziehen, da die faktorielle Steigerbarkeit der Integrale in der Herzinsuffizienzgruppe signifikant reduziert war. Die von uns nachgewiesenen Differenzen in der  $\beta$ -adrenerg stimulierten absoluten Stromdichte wiegen daher schwerer. Allerdings sollten die noch unklaren Verhältnisse des Nettokalziumeinstroms humaner atrialer Kardiomyozyten, insbesondere die Abhängigkeit von  $\beta$ -adrenerger Stimulation, in weiteren Untersuchungen mit direkten Meßmethoden beleuchtet werden.

### **4.3 Patientenauswahl**

#### **4.3.1 Herzinsuffizienz- und Kontrollgruppe**

Sowohl die Patienten der Herzinsuffizienz-, als auch der Kontrollgruppe waren Patienten, die sich aufgrund einer koronaren Herzerkrankung einer operativen Myokardrevaskularisation unterziehen mussten. Als Einteilungskriterium wurde die LVEF gewählt. Diese Vorgehensweise ist zu diskutieren.

Zum einen fällt es nicht leicht, einen zuverlässigen Marker für Herzinsuffizienz zu finden. Vergleichbare Voruntersuchungen griffen für die Herzinsuffizienzgruppe meist auf Gewebe explantierter Herzen im Rahmen einer Herztransplantation zurück<sup>23;79;96</sup>. Doch wie bereits erörtert, liegen bei den erwähnten Studien erhebliche Störfaktoren der atrialen zellulären Elektrophysiologie vor, da durch die genannte Vorgehensweise zwangsläufig Patienten mit beispielsweise dilatierten Vorhöfen oder Vorhofflimmern untersucht wurden. Durch eine Einteilung mittels LVEF ist das Aufstellen umschriebener Ein- und Ausschlusskriterien möglich. Man kann davon ausgehen, dass dadurch eher Patienten mit geringerer Ausprägung oder zu Beginn einer Herzinsuffizienz eingeschlossen wurden, da die Ausschlusskriterien noch nicht vorlagen. Dies wird auch durch die Feststellung bestätigt, dass sich zwar die endsystolischen, nicht jedoch die enddiastolischen Ventrikelvolumina unserer Patienten zwischen den Gruppen unterscheiden.

Die LVEF ist zur Einteilung geeignet, da es sich um einen zuverlässigen Parameter der Herzinsuffizienz handelt, der im klinischen Alltag etabliert ist. Interessant ist dabei, dass die Werte, bei denen in unseren Untersuchungen ein Unterschied zwischen Kontroll- und Herzinsuffizienzgruppe festgestellt wurde, mit dem Wert der LVEF direkt korrelieren. Dabei kann es als Bestätigung sowohl der Einteilung, als auch der Ergebnisse angesehen werden,

dass die Werte ebenfalls mit dem LVEDP korrelierten, der ein hämodynamisches Maß für die Einschränkung der Ventrikelfunktion darstellt.

Durch die getroffene Wahl der Gruppen wurde eine bestmögliche Vergleichbarkeit erreicht, da bei allen Patienten dieselbe Grunderkrankung und ein vergleichbares Alter vorlagen und das Gewebe unter analogen Bedingungen gewonnen und verarbeitet wurde. Ebenso wichtig für unsere Fragestellung war ein vergleichbarer Anteil an Patienten unter chronischer  $\beta$ -Blockertherapie in beiden Gruppen. In Bezug auf die Medikation konnte lediglich für die Einnahme von ACE-Hemmern oder Angiotensinrezeptorblockern keine Übereinstimmung der Gruppen erreicht werden, was aufgrund der Indikation für diese Therapie auch nicht zu erwarten war und die klinische Realität widerspiegelt.

### **4.3.2 Spenderherzen**

Die Patienten unserer Kontrollgruppe waren herzkrank und mit einer entsprechenden Medikation therapiert. Daher wurden die Werte dieser Gruppe mit Ergebnissen aus Vorhofgewebe von Spenderherzen verglichen. Die Spenderherzgruppe stellt ein Kollektiv herzgesunder Patienten ohne chronische kardiotope Medikation dar.

Die gemessenen Werte der Kontroll- und der Spenderherzgruppe unterscheiden sich in mehrfacher Hinsicht. Insbesondere ist der basale L-Typ-Kalziumstrom in der Spenderherzgruppe tendenziell größer als in der Kontrollgruppe. Außerdem zeigen die Inaktivierungskonstanten eine schnellere Inaktivierung des L-Typ-Kalziumstroms der Spenderherzen. Allerdings sind die Veränderungen des Stroms unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, mit Ausnahme der faktoriellen Steigerbarkeit des Kurvenintegrals, was jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl in der Spenderherzgruppe sehr skeptisch zu beurteilen ist, in beiden Gruppen weitgehend äquivalent.

Letzteres bedeutet für die Interpretation der Ergebnisse der  $\beta$ -adrenergen Stimulation der Gruppen  $LVEF \geq 60\%$  und  $LVEF \leq 45\%$ , dass nicht die koronare Herzerkrankung die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit erhöht, sondern dass sie die Herzinsuffizienz unter das Niveau Gesunder senkt.

Für die Unterschiede können mehrerlei Gründe verantwortlich gemacht werden. Da es sich in der Kontrollgruppe um Patienten mit koronarer Herzerkrankung handelt, ist zunächst prinzipiell von einem Effekt dieser Grunderkrankung auf die zelluläre atriale Elektrophysiologie auszugehen. Zusätzlich standen alle Patienten der Kontrollgruppe, im Gegensatz zur Spenderherzgruppe, unter einer chronischen Medikation. Zwar stellte die

Einnahme von Kalziumantagonisten, für die ein Einfluss auf die zelluläre Elektrophysiologie nachgewiesen ist<sup>26;64</sup>, ein Ausschlusskriterium dar, jedoch muss ein Effekt anderer Pharmaka unterstellt werden.

Da die Herzen der Spenderherzgruppe transplantiert wurden, konnte das rechte Herzohr nicht für unsere Experimente genutzt werden. Vielmehr erfolgte die Zellgewinnung aus der linkslateralen Vorhofwand. Somit ist die Lokalisation der Kardiomyozyten von derjenigen der Kontrollgruppe, in welcher nur Gewebe aus dem rechten Vorhofohr untersucht wurde, verschieden. Lokale Heterogenitäten bezüglich der atrialen Elektrophysiologie sind aber beschrieben<sup>35;132</sup> und müssen als Ursache für einen Teil des Unterschieds der Ergebnisse zwischen der Spenderherzgruppe und der Kontrollgruppe diskutiert werden.

Das mittlere Alter der Organspender war deutlich jünger als das der Patienten der Kontrollgruppe ( $31 \pm 5,5$  und  $66 \pm 2,4$  Jahre). Dies kann insbesondere Differenzen in der Kanalinaktivierung bedingen<sup>105</sup>.

Die aufgeführten Unterschiede schränken jedoch die Wertigkeit der Gruppe der Patienten mit einer LVEF  $\geq 60\%$  als Kontrollgruppe für die Vergleiche mit der Herzinsuffizienzgruppe nicht ein. Im Gegenteil, aufgrund der demonstrierten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Spenderherzgruppe muss, um den isolierten Einfluss der Herzinsuffizienz zu untersuchen, ein möglichst gleichwertiges Kontrollkollektiv genutzt werden.

#### **4.4 Methodische Einschränkungen**

Die Aussagen unserer Arbeit beschränken sich auf Kardiomyozyten des rechten Vorhofohrs (Spender vgl. Kapitel 4.3.2, S. 57). Bezüglich der Lokalisation sind jedoch Heterogenitäten der zellulären Elektrophysiologie beim Kaninchen<sup>132</sup> und Hund<sup>35</sup> beschrieben worden. Allerdings wurde eine Beteiligung des humanen rechten Vorhofohrs an globalen Remodelingprozessen nachgewiesen<sup>33;124;125</sup>, so dass eine Untersuchung dieser Vorgänge daran möglich erscheint.

Aus Gründen der Praktikabilität führten wir unsere Versuche bei Zimmertemperatur durch. Die Temperatur hat aber bekanntermaßen einen Einfluss auf den L-Typ-Kalziumstrom<sup>1</sup>, weshalb unsere Ergebnisse nicht direkt auf physiologische Bedingungen mit Körpertemperatur übertragbar sind. Da die Untersuchungsbedingungen jedoch für alle Zellen gleichermaßen galten, ist ein Vergleich der Gruppen untereinander zulässig.

Die enzymatische Isolation der einzelnen Kardiomyozyten hat ebenfalls einen Einfluss auf die zelluläre Elektrophysiologie. Im speziellen wurde dies für bestimmte Kaliumströme ( $I_K$ ) nachgewiesen<sup>135</sup>. Ob ein solcher Einfluss für den L-Typ-Kalziumkanal zutrifft, ist nicht bekannt. Jedoch bleibt festzuhalten, dass bei allen messbaren Zellen, die mit der beschriebenen Methode isoliert wurden, ein L-Typ-Kalziumstrom nachgewiesen wurde. Ebenso ist vorstellbar, dass es durch die Isolation zu einer Selektion von Zellen mit bestimmten Ausprägungen kommt.

Bei der von uns gewählten Messmethode der Ganzzelleableitung mit direktem Zugang zur Zelle („open patch“) kommt es zu einer Dialyse bestimmter intrazellulärer Bestandteile<sup>78</sup>. Dadurch wird eine stetige Abnahme des L-Typ-Kalziumstroms über die Zeit („rundown“) verursacht. Durch eine besondere Vorgehensweise („perforated patch“), bei welcher der Zugang zur Zelle mittels porenbildender Substanzen (z.B. Nystatin, Amphotericin B) erfolgt, kann dies limitiert werden<sup>63</sup>. Jedoch ist die Arbeitsweise mit einigen technischen Schwierigkeiten verbunden, was dazu führt, dass ein guter Zugang zur Zelle seltener gelingt. Aufgrund der ohnehin limitierten Zellzahl bei der Untersuchung von humanem Gewebe und der von uns möglichst kurz gehaltenen Versuchszeit je Zelle wurde auf eine solche Methode verzichtet.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der zellulären Elektrophysiologie stellen Einzelkanalableitungen dar, womit die Beschreibung des Verhaltens des einzelnen Kanals möglich ist. Entsprechende Messungen des L-Typ-Kalziumkanals wurden bereits erfolgreich an humanen Kardiomyozyten durchgeführt<sup>44;47;110</sup>. Im Gegensatz dazu misst die von uns gewählte Ganzzelleableitung den Summenstrom aller Kanäle einer Zelle. Dies erlaubt zwar nicht eine ähnlich detaillierte Beschreibung des Kanals, kommt den physiologischen Zuständen am Patienten aber näher, so dass die Ergebnisse besser übertragbar sind. Zusätzlich sind Einzelkanalmessungen dem oben beschriebenen „rundown“ besonders ausgesetzt, so dass längere Untersuchungen mit Gabe von Pharmaka problematisch sind.

## 5 Zusammenfassung

Physiologie und Pathophysiologie der zellulären Ionenkanäle sind für atriale Arrhythmien von entscheidender Bedeutung. Insbesondere ist für Vorhofflimmern bekannt, dass einerseits die Wahrscheinlichkeit des Auftretens durch Alterationen der zellulären Elektrophysiologie entscheidend beeinflusst werden kann. Andererseits kommt es durch Vorhofflimmern selber zu entsprechenden Umbauprozessen. Veränderungen des L-Typ Kalziumkanals sind dabei von zentraler Bedeutung.

Herzinsuffizienz ist als Risikofaktor für das Auftreten von Vorhofflimmern bekannt. Die Mechanismen, wie es dabei zur Entstehung der Arrhythmie kommt, sind noch nicht erschöpfend geklärt. Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie durch die Herzinsuffizienz selber –noch vor erstmaligem Auftreten der Rhythmusstörung– könnten die arrhythmogene Disposition erklären. Ziel dieser Arbeit war es, durch funktionelle Kalziumkanaluntersuchungen einen Beitrag zur Aufklärung der genannten pathophysiologischen Zusammenhänge zu leisten.

Es wurde der L-Typ-Kalziumstrom humaner atrialer Kardiomyozyten mit der „patch-clamp“-Technik in Ganzzellkonfiguration gemessen. Die Zellen stammten dabei von Patienten mit eingeschränkter (n=10) und erhaltener LV-Funktion (n=17). Eine weitere Vergleichsgruppe ergab sich aus der Gewinnung von Vorhofgewebe von Spenderherzen (n=4) im Rahmen einer HTX. Zur Untersuchung der  $\beta$ -adrenergen Regulation wurden die Zellen mit Isoproterenol superperfundiert.

Dabei zeigte sich im Wesentlichen, dass die basale Amplitude, Dichte und Inaktivierung des L-Typ-Kalziumstroms bei Herzinsuffizienz nicht verändert ist. Allerdings ist die Steigerbarkeit durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation eingeschränkt (Steigerung des Stroms auf das 5,7-fache bei erhaltener LV-Funktion vs. 2,3-fache bei eingeschränkter LV-Funktion,  $p=0,002$ ), was in dieser Situation zu einer signifikant niedrigeren Stromdichte bei Herzinsuffizienz führt.

Dies könnte bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu einer relativ verkürzten Aktionspotentialdauer führen. Ein verkürztes Aktionspotential erleichtert wiederum das Auftreten von Vorhofflimmern durch Begünstigung kreisender Erregungen. Unsere Ergebnisse liefern somit einen Beitrag zur Klärung der Disposition zu Vorhofflimmern bei Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene. Sicherlich sind jedoch noch vielfältige andere Prozesse daran beteiligt und weiterführende Untersuchungen notwendig.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abkürzungen

ACEI	Angiotensin-Conversions-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer)
APD	Aktionspotentialdauer
APD <sub>50</sub>	Aktionspotentialdauer bis zur halben Repolarisation
ATRB	Angiotensinrezeptorblocker
CSEI	Cholesterinsynthese-Hemmer
EDV	enddiastolisches Volumen
ESV	endsystolisches Volumen
HF	Herzfrequenz
HTX	Herztransplantation
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
N/M	Nitrate/Molsidomin
RAP	rechtsatrialer Druck
SD	Schleifendiuretikum

## 6.2 Abbildungen

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau des L-Typ-Kalziumkanals und Regulation über die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade <sup>19;85</sup> ( $\alpha_{1c}$ , $\beta$ , $\alpha_2$ - $\delta$ : Untereinheiten des L-Typ-Kalziumkanals; $G_{S\alpha}$ : G-Protein; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A).....	6
Abbildung 2-1: Schematischer Versuchsaufbau.....	18
Abbildung 2-2: Bestimmung der Größe des L-Typ Kalziumstroms.....	20
Abbildung 3-1: Basale Stromgröße der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	27
Abbildung 3-2: Zellkapazität der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	27
Abbildung 3-3: Basale Stromdichte der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	28
Abbildung 3-4: Beispielstromkurven einer Messung bei einer Zelle der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ basal und nach Stimulation mit Isoproterenol.....	29
Abbildung 3-5: Beispielstromkurven einer Messung bei einer Zelle der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ basal und nach Stimulation mit Isoproterenol.....	29
Abbildung 3-6: Stromdichte vor und nach Gabe von Isoproterenol .....	30
Abbildung 3-7: Steigerungsfaktoren des Stroms unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	31
Abbildung 3-8: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ (Werte basal: hellgrün, unter $\beta$ -adernerger Stimulation: dunkelgrün).....	32
Abbildung 3-9: Beispielstromkurven einer Spannungsabhängigkeitsmessung bei einer Zelle der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ basal (links) und nach Stimulation mit Isoproterenol (rechts)	32
Abbildung 3-10: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ (Werte basal: hellrot, unter $\beta$ -adernerger Stimulation: dunkelrot) .....	33
Abbildung 3-11: Beispielstromkurven einer Spannungsabhängigkeitsmessung bei einer Zelle der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ basal (links) und nach Stimulation mit Isoproterenol (rechts)	33
Abbildung 3-12: Inaktivierungskonstanten der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	35
Abbildung 3-13: Inaktivierungskonstanten der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	36
Abbildung 3-14: Steigerungsfaktoren des Stromkurvenintegrals <sub>0ms-200ms</sub> unter $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	38
Abbildung 3-15: Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol in Abhängigkeit von LVEF.....	39

Abbildung 3-16: Stromdichte unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol in Abhängigkeit von LVEDP.....	40
Abbildung 3-17: Steigerungsfaktoren in Abhängigkeit von LVEF .....	41
Abbildung 3-18: Steigerungsfaktoren in Abhängigkeit von LVEDP .....	41
Abbildung 3-19: Basale Stromgröße der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen .....	42
Abbildung 3-20: Zellkapazität der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen.....	42
Abbildung 3-21: Basale Stromdichte der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen.....	43
Abbildung 3-22: Stromdichte vor und nach Gabe von Isoproterenol .....	44
Abbildung 3-23: Steigerungsfaktoren des Stroms unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	44
Abbildung 3-24: Spannungsabhängigkeit in der Gruppe Spenderherzen (Werte basal: hellblau, unter $\beta$ -adernerger Stimulation: dunkelblau).....	45
Abbildung 3-25: Inaktivierungskonstanten der Spenderherzgruppe basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	46
Abbildung 3-26: Steigerungsfaktoren des Stromkurvenintegrals <sub>0ms-200ms</sub> unter $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	49

### 6.3 Tabellen

Tabelle 2-1: Patienten der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ .....	14
Tabelle 2-2: Patienten der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ .....	14
Tabelle 2-3: Patienten mit LVEF 45-60%.....	14
Tabelle 2-4: Kalziumfreie Elektrolytlösung.....	22
Tabelle 2-5: KB-Medium.....	22
Tabelle 2-6: Interne Lösung.....	22
Tabelle 2-7: Externe Lösung.....	23
Tabelle 2-8: 1mM Isoproterenol Stammlösung.....	23
Tabelle 3-1: Unterschiedliche Parameter der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	25
Tabelle 3-2: Übereinstimmende Charakteristika der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	26
Tabelle 3-3: Basale Stromgröße, Zellkapazität und basale Stromdichte der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und LVEF $\leq 45\%$ .....	28
Tabelle 3-4: Stromdichte unter maximaler $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und LVEF $\leq 45\%$ .....	30
Tabelle 3-5: Steigerungsfaktoren bei maximaler $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	31
Tabelle 3-6: $V_{1/2}$ der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	33
Tabelle 3-7: Inaktivierungskonstanten und anteilige Amplituden der Gruppe LVEF $\geq 60\%$ basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	35
Tabelle 3-8: Inaktivierungskonstanten und anteilige Amplituden der Gruppe LVEF $\leq 45\%$ basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	36
Tabelle 3-9: Vergleich der Inaktivierungskonstanten zwischen den Gruppen LVEF $\geq 60\%$ (basal n=22, mit Iso. n=10) und LVEF $\leq 45\%$ (basal n=24, mit Iso. n=14).....	37
Tabelle 3-10: Vergleich der Amplitudengrößen zwischen den Gruppen LVEF $\geq 60\%$ (basal n=22, mit Iso. n=10) und LVEF $\leq 45\%$ (basal n=24, mit Iso. n=14).....	37
Tabelle 3-11: Stromkurvenintegrale der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	38
Tabelle 3-12: Steigerungsfaktor des Stromkurvenintegrals unter Stimulation mit Isoproterenol der Gruppen LVEF $\geq 60\%$ und LVEF $\leq 45\%$ .....	38

Tabelle 3-13: Basale Stromgröße, Zellkapazität und basale Stromdichte der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen .....	43
Tabelle 3-14: Stromdichte und Steigerungsfaktoren bei maximaler $\beta$ -adrenerger Stimulation der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen .....	44
Tabelle 3-15: $V_{1/2}$ der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	45
Tabelle 3-16: Inaktivierungskonstanten der Spenderherzgruppe basal und unter $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	47
Tabelle 3-17: Vergleich der Inaktivierungskonstanten zwischen den Gruppen LVEF $\geq$ 60% (basal n=24, mit Iso. n=10) und Spenderherzen (basal n=16, mit Iso. n=5) .....	48
Tabelle 3-18: Vergleich der Amplitudengrößen zwischen den Gruppen LVEF $\geq$ 60% (basal n=24, mit Iso. n=10) und Spenderherzen (basal n=16, mit Iso. n=5).....	48
Tabelle 3-19: Stromkurvenintegrale der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen .....	49
Tabelle 3-20: Steigerungsfaktor des Stromkurvenintegrals unter Stimulation mit Isoproterenol der Gruppen LVEF $\geq$ 60% und Spenderherzen .....	49

## 6.4 Literatur

- 1 **Allen, T. J.** (1996). "Temperature dependence of macroscopic L-type calcium channel currents in single guinea pig ventricular myocytes." J Cardiovasc Electrophysiol 7: 307-21.
- 2 **Arnsdorf, M. F. and Childers, R. W.** (1970). "Atrial electrophysiology in experimental hyperthyroidism in rabbits." Circ Res 26: 575-81.
- 3 **Bean, B. P.** (1985). "Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology." J Gen Physiol 86: 1-30.
- 4 **Bean, B. P., Nowycky, M. C. and Tsien, R. W.** (1984). "Beta-adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells." Nature 307: 371-5.
- 5 **Benardeau, A., Hatem, S. N., Rucker-Martin, C., Le Grand, B., Mace, L., Dervanian, P., Mercadier, J. J. and Coraboeuf, E.** (1996). "Contribution of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange to action potential of human atrial myocytes." Am J Physiol 271: H1151-61.
- 6 **Benjamin, E. J., Levy, D., Vaziri, S. M., D'Agostino, R. B., Belanger, A. J. and Wolf, P. A.** (1994). "Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study." Jama 271: 840-4.
- 7 **Benjamin, E. J., Wolf, P. A., D'Agostino, R. B., Silbershatz, H., Kannel, W. B. and Levy, D.** (1998). "Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study." Circulation 98: 946-52.
- 8 **Bers, D. M.** (1991). Calcium influx via sarcolemmal Ca-channels. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Bers, D. M. Norwell, Kluwer Academic Publishers: 49-70.
- 9 **Beuckelmann, D. J. and Erdmann, E.** (1992). " $\text{Ca}^{2+}$ -currents and intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium." Basic Res Cardiol 87 Suppl 1: 235-43.
- 10 **Beuckelmann, D. J., Näbauer, M. and Erdmann, E.** (1992). "Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure." Circulation 85: 1046-55.

- 11 **Blaustein, M. P. and Lederer, W. J.** (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." Physiol Rev 79: 763-854.
- 12 **Böhm, M., Gierschik, P., Jakobs, K. H., Pieske, B., Schnabel, P., Ungerer, M. and Erdmann, E.** (1990). "Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy." Circulation 82: 1249-65.
- 13 **Borjesson, M., Magnusson, Y., Hjalmarson, A. and Andersson, B.** (2000). "A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure." Eur Heart J 21: 1853-8.
- 14 **Bosch, R. F., Zeng, X., Grammer, J. B., Popovic, K., Mewis, C. and Kuhlkamp, V.** (1999). "Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation." Cardiovasc Res 44: 121-31.
- 15 **Boutjdir, M., Le Heuzey, J. Y., Lavergne, T., Chauvaud, S., Guize, L., Carpentier, A. and Peronneau, P.** (1986). "Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia?" Pacing Clin Electrophysiol 9: 1095-100.
- 16 **Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C. and Stinson, E. B.** (1982). "Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts." N Engl J Med 307: 205-11.
- 17 **Brodde, O. E.** (1993). "Beta-adrenoceptors in cardiac disease." Pharmacol Ther 60: 405-30.
- 18 **Brodde, O. E. and Michel, M. C.** (1999). "Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart." Pharmacol Rev 51: 651-90.
- 19 **Campbell, D. L. and Strauss, H. C.** (1995). "Regulation of calcium channels in the heart." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 30: 25-88.
- 20 **Carson, P. E., Johnson, G. R., Dunkman, W. B., Fletcher, R. D., Farrell, L. and Cohn, J. N.** (1993). "The influence of atrial fibrillation on prognosis in mild to moderate heart failure. The V-HeFT Studies. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group." Circulation 87: VI102-10.
- 21 **Catterall, W. A.** (1995). "Structure and function of voltage-gated ion channels." Annu Rev Biochem 64: 493-531.

- 22 **Chen, X., Piacentino, V., 3rd, Furukawa, S., Goldman, B., Margulies, K. B. and Houser, S. R.** (2002). "L-type Ca<sup>2+</sup> channel density and regulation are altered in failing human ventricular myocytes and recover after support with mechanical assist devices." Circ Res 91: 517-24.
- 23 **Cheng, T. H., Lee, F. Y., Wei, J. and Lin, C. I.** (1996). "Comparison of calcium-current in isolated atrial myocytes from failing and nonfailing human hearts." Mol Cell Biochem 157: 157-62.
- 24 **CONSENSUS Trial Study Group** (1987). "Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)." N Engl J Med 316: 1429-35.
- 25 **Courtemanche, M., Ramirez, R. J. and Nattel, S.** (1999). "Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model." Cardiovasc Res 42: 477-89.
- 26 **Daoud, E. G., Knight, B. P., Weiss, R., Bahu, M., Paladino, W., Goyal, R., Man, K. C., Strickberger, S. A. and Morady, F.** (1997). "Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans." Circulation 96: 1542-50.
- 27 **Deedwania, P. C., Singh, B. N., Ellenbogen, K., Fisher, S., Fletcher, R. and Singh, S. N.** (1998). "Spontaneous conversion and maintenance of sinus rhythm by amiodarone in patients with heart failure and atrial fibrillation: observations from the veterans affairs congestive heart failure survival trial of antiarrhythmic therapy (CHF-STAT). The Department of Veterans Affairs CHF-STAT Investigators." Circulation 98: 2574-9.
- 28 **Dries, D. L., Exner, D. V., Gersh, B. J., Domanski, M. J., Waclawiw, M. A. and Stevenson, L. W.** (1998). "Atrial fibrillation is associated with an increased risk for mortality and heart failure progression in patients with asymptomatic and symptomatic left ventricular systolic dysfunction: a retrospective analysis of the SOLVD trials. Studies of Left Ventricular Dysfunction." J Am Coll Cardiol 32: 695-703.
- 29 **Engelhardt, S., Böhm, M., Erdmann, E. and Lohse, M. J.** (1996). "Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by

- quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure." J Am Coll Cardiol 27: 146-54.
- 30 **Escande, D., Coraboeuf, E. and Planche, C.** (1987). "Abnormal pacemaking is modulated by sarcoplasmic reticulum in partially-depolarized myocardium from dilated right atria in humans." J Mol Cell Cardiol 19: 231-41.
- 31 **Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J. F. and Coraboeuf, E.** (1986). "Characteristics of the time-dependent slow inward current in adult human atrial single myocytes." J Mol Cell Cardiol 18: 547-51.
- 32 **Eschenhagen, T.** (1993). "G proteins and the heart." Cell Biol Int 17: 723-49.
- 33 **Fareh, S., Villemaire, C. and Nattel, S.** (1998). "Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling." Circulation 98: 2202-9.
- 34 **Feldman, A. M., Cates, A. E., Veazey, W. B., Hershberger, R. E., Bristow, M. R., Baughman, K. L., Baumgartner, W. A. and Van Dop, C.** (1988). "Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart." J Clin Invest 82: 189-97.
- 35 **Feng, J., Yue, L., Wang, Z. and Nattel, S.** (1998). "Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium." Circ Res 83: 541-51.
- 36 **Fowler, M. B., Laser, J. A., Hopkins, G. L., Minobe, W. and Bristow, M. R.** (1986). "Assessment of the beta-adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response." Circulation 74: 1290-302.
- 37 **Freedberg, A. S., Papp, J. G. and Williams, E. M.** (1970). "The effect of altered thyroid state on atrial intracellular potentials." J Physiol 207: 357-69.
- 38 **Gidh-Jain, M., Huang, B., Jain, P., Battula, V. and el-Sherif, N.** (1995). "Reemergence of the fetal pattern of L-type calcium channel gene expression in non infarcted myocardium during left ventricular remodeling." Biochem Biophys Res Commun 216: 892-7.
- 39 **Goette, A., Honeycutt, C. and Langberg, J. J.** (1996). "Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms." Circulation 94: 2968-74.

- 40 **Gomez, A. M., Valdivia, H. H., Cheng, H., Lederer, M. R., Santana, L. F., Cannell, M. B., McCune, S. A., Altschuld, R. A. and Lederer, W. J.** (1997). "Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure." Science 276: 800-6.
- 41 **Hagiwara, N., Irisawa, H. and Kameyama, M.** (1988). "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells." J Physiol 395: 233-53.
- 42 **Hajjar, R. J. and MacRae, C. A.** (2002). "Adrenergic-receptor polymorphisms and heart failure." N Engl J Med 347: 1196-9.
- 43 **Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J.** (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch 391: 85-100.
- 44 **Handrock, R., Schröder, F., Hirt, S., Haverich, A., Mittmann, C. and Herzig, S.** (1998). "Single-channel properties of L-type calcium channels from failing human ventricle." Cardiovasc Res 37: 445-55.
- 45 **He, J., Conklin, M. W., Foell, J. D., Wolff, M. R., Haworth, R. A., Coronado, R. and Kamp, T. J.** (2001). "Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca<sup>2+</sup> channels in canine tachycardia-induced heart failure." Cardiovasc Res 49: 298-307.
- 46 **Hersel, J., Jung, S., Mohacsi, P. and Hullin, R.** (2002). "Expression of the L-type calcium channel in human heart failure." Basic Res Cardiol 97 Suppl 1: I4-10.
- 47 **Hess, P., Lansman, J. B., Nilius, B. and Tsien, R. W.** (1986). "Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation." J Cardiovasc Pharmacol 8 Suppl 9: S11-21.
- 48 **Hille, B.** (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Sinauer Associates Inc.
- 49 **Hofmann, F., Lacinova, L. and Klugbauer, N.** (1999). "Voltage-dependent calcium channels: from structure to function." Rev Physiol Biochem Pharmacol 139: 33-87.
- 50 **Hordof, A. J., Edie, R., Malm, J. R., Hoffman, B. F. and Rosen, M. R.** (1976). "Electrophysiologic properties and response to pharmacologic agents of fibers from diseased human atria." Circulation 54: 774-9.

- 51 **Isenberg, G. and Klockner, U.** (1982). "Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium"." Pflugers Arch 395: 6-18.
- 52 **Ishikawa, Y., Sorota, S., Kiuchi, K., Shannon, R. P., Komamura, K., Katsushika, S., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Homcy, C. J.** (1994). "Downregulation of adenylylcyclase types V and VI mRNA levels in pacing-induced heart failure in dogs." J Clin Invest 93: 2224-9.
- 53 **Johnson, J. A., Burlew, B. S. and Stiles, R. N.** (1995). "Racial differences in beta-adrenoceptor-mediated responsiveness." J Cardiovasc Pharmacol 25: 90-6.
- 54 **Kaab, S., Nuss, H. B., Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Pak, P. H., Kass, D. A., Marban, E. and Tomaselli, G. F.** (1996). "Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure." Circ Res 78: 262-73.
- 55 **Kameyama, M., Hescheler, J., Hofmann, F. and Trautwein, W.** (1986). "Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart." Pflugers Arch 407: 123-8.
- 56 **Kameyama, M., Hofmann, F. and Trautwein, W.** (1985). "On the mechanism of beta-adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart." Pflugers Arch 405: 285-93.
- 57 **Kaseda, S. and Zipes, D. P.** (1988). "Contraction-excitation feedback in the atria: a cause of changes in refractoriness." J Am Coll Cardiol 11: 1327-36.
- 58 **Kass, D. A.** (2003). "Beta-receptor polymorphisms: heart failure's crystal ball." Nat Med 9: 1260-2.
- 59 **Kiuchi, K., Shannon, R. P., Komamura, K., Cohen, D. J., Bianchi, C., Homcy, C. J., Vatner, S. F. and Vatner, D. E.** (1993). "Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure." J Clin Invest 91: 907-14.
- 60 **Klein, I. and Ojamaa, K.** (2001). "Thyroid hormone and the cardiovascular system." N Engl J Med 344: 501-9.
- 61 **Koch, W. J., Milano, C. A. and Lefkowitz, R. J.** (1996). "Transgenic manipulation of myocardial G protein-coupled receptors and receptor kinases." Circ Res 78: 511-6.

- 62 **Koumi, S., Arentzen, C. E., Backer, C. L. and Wasserstrom, J. A.** (1994). "Alterations in muscarinic K<sup>+</sup> channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts." Circulation 90: 2213-24.
- 63 **Kurachi, Y., Asano, Y., Takikawa, R. and Sugimoto, T.** (1989). "Cardiac Ca current does not run down and is very sensitive to isoprenaline in the nystatin-method of whole cell recording." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 340: 219-22.
- 64 **Le Grand, B., Hatem, S., Deroubaix, E., Couetil, J. P. and Coraboeuf, E.** (1991). "Calcium current depression in isolated human atrial myocytes after cessation of chronic treatment with calcium antagonists." Circ Res 69: 292-300.
- 65 **Le Grand, B. L., Hatem, S., Deroubaix, E., Couetil, J. P. and Coraboeuf, E.** (1994). "Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria." Cardiovasc Res 28: 548-56.
- 66 **Le Heuzey, J. Y., Le Grand, B., Hatem, S., Lavergne, T. and Guize, L.** (1991). "Cellular electropharmacology of human atrium: effects of antiarrhythmic drugs." Cardiologia 36: 37-41.
- 67 **Lefkowitz, R. J., Rockman, H. A. and Koch, W. J.** (2000). "Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure." Circulation 101: 1634-7.
- 68 **Leistad, E., Aksnes, G., Verburg, E. and Christensen, G.** (1996). "Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644." Circulation 93: 1747-54.
- 69 **Li, D., Fareh, S., Leung, T. K. and Nattel, S.** (1999). "Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort." Circulation 100: 87-95.
- 70 **Li, D., Melnyk, P., Feng, J., Wang, Z., Petrecca, K., Shrier, A. and Nattel, S.** (2000). "Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology." Circulation 101: 2631-8.
- 71 **Li, D., Shinagawa, K., Pang, L., Leung, T. K., Cardin, S., Wang, Z. and Nattel, S.** (2001). "Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure." Circulation 104: 2608-14.

- 72 **Lohse, M. J.** (1995). "G-protein-coupled receptor kinases and the heart." Trends Cardiovasc Med 5: 63.
- 73 **Lohse, M. J., Engelhardt, S. and Eschenhagen, T.** (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" Circ Res 93: 896-906.
- 74 **Longabaugh, J. P., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Homcy, C. J.** (1988). "Decreased stimulatory guanosine triphosphate binding protein in dogs with pressure-overload left ventricular failure." J Clin Invest 81: 420-4.
- 75 **Maisel, W. H. and Stevenson, L. W.** (2003). "Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy." Am J Cardiol 91: 2D-8D.
- 76 **Markides, V. and Peters, N. S.** (2002). "Mechanisms underlying the development of atrial arrhythmias in heart failure." Heart Fail Rev 7: 243-53.
- 77 **Marsh, J. D.** (1989). "Coregulation of calcium channels and beta-adrenergic receptors in cultured chick embryo ventricular cells." J Clin Invest 84: 817-23.
- 78 **Marty, A. and Neher, E.** (1995). Tight-seal whole-cell recording. Single-channel recording. Sakmann, B. and Neher, E. New York, Plenum Press: 31-52.
- 79 **Mewes, T. and Ravens, U.** (1994). "L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium." J Mol Cell Cardiol 26: 1307-20.
- 80 **Mialet Perez, J., Rathz, D. A., Petrashevskaya, N. N., Hahn, H. S., Wagoner, L. E., Schwartz, A., Dorn, G. W. and Liggett, S. B.** (2003). "Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure." Nat Med 9: 1300-5.
- 81 **Moe, G. K. and Abildskov, J. A.** (1959). "Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge." Am Heart J 58: 59-70.
- 82 **Moe, G. K., Rheinboldt, W. C. and Abildskov, J. A.** (1964). "A Computer Model of Atrial Fibrillation." Am Heart J 67: 200-20.
- 83 **Mukherjee, R., Hewett, K. W. and Spinale, F. G.** (1995). "Myocyte electrophysiological properties following the development of supraventricular tachycardia-induced cardiomyopathy." J Mol Cell Cardiol 27: 1333-48.

- 84 **Mukherjee, R., Hewett, K. W., Walker, J. D., Basler, C. G. and Spinale, F. G.** (1998). "Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure." Cardiovasc Res 37: 432-44.
- 85 **Mukherjee, R. and Spinale, F. G.** (1998). "L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review." J Mol Cell Cardiol 30: 1899-916.
- 86 **Näbauer, M., Böhm, M., Brown, L., Diet, F., Eichhorn, M., Kemkes, B., Pieske, B. and Erdmann, E.** (1988). "Positive inotropic effects in isolated ventricular myocardium from non-failing and terminally failing human hearts." Eur J Clin Invest 18: 600-6.
- 87 **Nattel, S.** (1999). "Ionic determinants of atrial fibrillation and Ca<sup>2+</sup> channel abnormalities : cause, consequence, or innocent bystander?" Circ Res 85: 473-6.
- 88 **Nattel, S. and Li, D.** (2000). "Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation." Circ Res 87: 440-7.
- 89 **Nattel, S., Li, D. and Yue, L.** (2000). "Basic mechanisms of atrial fibrillation--very new insights into very old ideas." Annu Rev Physiol 62: 51-77.
- 90 **Neher, E. and Sakmann, B.** (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature 260: 799-802.
- 91 **Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Döring, V. and Kalmar, P.** (1988). "Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure." Lancet 2: 936-7.
- 92 **Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B. and Tsien, R. W.** (1985). "A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells." Nature 316: 443-6.
- 93 **Nowycky, M. C., Fox, A. P. and Tsien, R. W.** (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." Nature 316: 440-3.
- 94 **Ojamaa, K., Sabet, A., Kenessey, A., Shenoy, R. and Klein, I.** (1999). "Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific." Endocrinology 140: 3170-6.

- 95 **Olgin, J. E. and Rubart, M.** (2000). Remodeling of the Atria and Ventricles Due to Rate. Cardiac Electrophysiology, From Cell to Bedside. Zipes, D. P. and Jalife, J., W.B. Saunders Company: 364-378.
- 96 **Ouadid, H., Albat, B. and Nargeot, J.** (1995). "Calcium currents in diseased human cardiac cells." J Cardiovasc Pharmacol 25: 282-91.
- 97 **Packer, D. L., Bardy, G. H., Worley, S. J., Smith, M. S., Cobb, F. R., Coleman, R. E., Gallagher, J. J. and German, L. D.** (1986). "Tachycardia-induced cardiomyopathy: a reversible form of left ventricular dysfunction." Am J Cardiol 57: 563-70.
- 98 **Pelzer, D., Pelzer, S. and McDonald, T. F.** (1991). Calcium channels in the heart. The heart and cardiovascular system. Fozzard, H. A., Haber, E. and Jennings, R. B. New York, Raven Press: 1049-1089.
- 99 **Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J.** (1998). "G protein-coupled receptor kinases." Annu Rev Biochem 67: 653-92.
- 100 **Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. and Bers, D. M.** (2001). "Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness." Circ Res 88: 1159-67.
- 101 **Ravelli, F. and Allesie, M.** (1997). "Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart." Circulation 96: 1686-95.
- 102 **Reuter, H.** (1974). "Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance." Circ Res 34: 599-605.
- 103 **Reuter, H. and Scholz, H.** (1977). "The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline." J Physiol 264: 49-62.
- 104 **Riemer, T. L., Sobie, E. A. and Tung, L.** (1998). "Stretch-induced changes in arrhythmogenesis and excitability in experimentally based heart cell models." Am J Physiol 275: H431-42.

- 105 **Roca, T. P., Pigott, J. D., Clarkson, C. W. and Crumb, W. J., Jr.** (1996). "L-type calcium current in pediatric and adult human atrial myocytes: evidence for developmental changes in channel inactivation." *Pediatr Res* 40: 462-8.
- 106 **Rockman, H. A., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J.** (2002). "Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function." *Nature* 415: 206-12.
- 107 **Rozanski, G. J., Xu, Z., Whitney, R. T., Murakami, H. and Zucker, I. H.** (1997). "Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing." *J Mol Cell Cardiol* 29: 721-32.
- 108 **Satoh, T. and Zipes, D. P.** (1996). "Unequal atrial stretch in dogs increases dispersion of refractoriness conducive to developing atrial fibrillation." *J Cardiovasc Electrophysiol* 7: 833-42.
- 109 **Schrieck, J., Wang, Y., Overbeck, M., Schömig, A. and Schmitt, C.** (2000). "Altered transient outward current in human atrial myocytes of patients with reduced left ventricular function." *J Cardiovasc Electrophysiol* 11: 180-92.
- 110 **Schröder, F., Handrock, R., Beuckelmann, D. J., Hirt, S., Hullin, R., Priebe, L., Schwinger, R. H., Weil, J. and Herzig, S.** (1998). "Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle." *Circulation* 98: 969-76.
- 111 **Seamon, K. B. and Daly, J. W.** (1986). "Forskolin: its biological and chemical properties." *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 20: 1-150.
- 112 **Shirayama, T. and Pappano, A. J.** (1996). "Biphasic effects of intrapipette cyclic guanosine monophosphate on L-type calcium current and contraction of guinea pig ventricular myocytes." *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1274-81.
- 113 **Skasa, M., Jungling, E., Picht, E., Schondube, F. and Luckhoff, A.** (2001). "L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation." *Basic Res Cardiol* 96: 151-9.
- 114 **Skeberdis, V. A., Jurevicius, J. and Fischmeister, R.** (1997). "Beta-2 adrenergic activation of L-type Ca<sup>++</sup> current in cardiac myocytes." *J Pharmacol Exp Ther* 283: 452-61.

- 115 **Solti, F., Vecsey, T., Kekesi, V. and Juhasz-Nagy, A.** (1989). "The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias." Cardiovasc Res 23: 882-6.
- 116 **SOLVD Investigators** (1991). "Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure." N Engl J Med 325: 293-302.
- 117 **SOLVD Investigators** (1992). "Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions." N Engl J Med 327: 685-91.
- 118 **Striessnig, J.** (1999). "Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels." Cell Physiol Biochem 9: 242-69.
- 119 **Tieleman, R. G., De Langen, C., Van Gelder, I. C., de Kam, P. J., Grandjean, J., Bel, K. J., Wijffels, M. C., Allessie, M. A. and Crijns, H. J.** (1997). "Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria." Circulation 95: 1945-53.
- 120 **Torp-Pedersen, C., Møller, M., Bloch-Thomsen, P. E., Køber, L., Sandøe, E., Egstrup, K., Agner, E., Carlsen, J., Videbaek, J., Marchant, B. and Camm, A. J.** (1999). "Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality on Dofetilide Study Group." N Engl J Med 341: 857-65.
- 121 **Trautwein, W. and Hescheler, J.** (1990). "Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins." Annu Rev Physiol 52: 257-74.
- 122 **Tsien, R. W., Bean, B. P., Hess, P., Lansman, J. B., Nilius, B. and Nowycky, M. C.** (1986). "Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists." J Mol Cell Cardiol 18: 691-710.
- 123 **Van den Berg, M. P., Tuinenburg, A. E., Crijns, H. J., Van Gelder, I. C., Gosselink, A. T. and Lie, K. I.** (1997). "Heart failure and atrial fibrillation: current concepts and controversies." Heart 77: 309-13.
- 124 **Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M. and Nerbonne, J. M.** (1999). "Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation." Circ Res 85: 428-36.

- 125 **Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S. and Nerbonne, J. M.** (1997). "Outward  $K^+$  current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation." Circ Res 80: 772-81.
- 126 **Vaziri, S. M., Larson, M. G., Benjamin, E. J. and Levy, D.** (1994). "Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study." Circulation 89: 724-30.
- 127 **Wang, Z., Fermini, B. and Nattel, S.** (1993). "Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier  $K^+$  current similar to Kv1.5 cloned channel currents." Circ Res 73: 1061-76.
- 128 **Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R. and Allessie, M. A.** (1995). "Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats." Circulation 92: 1954-68.
- 129 **Wilber, D., J.** (2000). Ventricular Tachycardia in Patients with Heart Failure. Cardiac Electrophysiology, From Cell to Bedside. Zipes, D. P. and Jalife, J., W.B. Saunders Company: 569-579.
- 130 **Williams, A. J.** (1997). "The functions of two species of calcium channel in cardiac muscle excitation-contraction coupling." Eur Heart J 18 Suppl A: A27-35.
- 131 **Yalcin, Y., Carman, D., Shao, Y., Ismail-Beigi, F., Klein, I. and Ojamaa, K.** (1999). "Regulation of Na/K-ATPase gene expression by thyroid hormone and hyperkalemia in the heart." Thyroid 9: 53-9.
- 132 **Yamashita, T., Nakajima, T., Hazama, H., Hamada, E., Murakawa, Y., Sawada, K. and Omata, M.** (1995). "Regional differences in transient outward current density and inhomogeneities of repolarization in rabbit right atrium." Circulation 92: 3061-9.
- 133 **Yao, A., Su, Z., Nonaka, A., Zubair, I., Spitzer, K. W., Bridge, J. H., Muelheims, G., Ross, J., Jr. and Barry, W. H.** (1998). "Abnormal myocyte  $Ca^{2+}$  homeostasis in rabbits with pacing-induced heart failure." Am J Physiol 275: H1441-8.
- 134 **Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z. and Nattel, S.** (1997). "Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation." Circ Res 81: 512-25.

- 135 **Yue, L., Feng, J., Li, G. R. and Nattel, S.** (1996). "Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods." Am J Physiol 270: H2157-68.
- 136 **Zipes, D. P.** (1997). "The seventh annual Gordon K. Moe Lecture. Atrial fibrillation: from cell to bedside." J Cardiovasc Electrophysiol 8: 927-38.

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Claus Schmitt möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, in seinem Team wissenschaftlich arbeiten zu können. Die weit über das Thema meiner Arbeit hinausreichenden Einblicke in die kardiologische Elektrophysiologie waren eine prägende Bereicherung meiner medizinischen Ausbildung.

Für die exzellente und aufopferungsvolle Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Jürgen Schreieck. Die Vermittlung des ersten Kontaktes zur Arbeitsgruppe für experimentelle Elektrophysiologie verdanke ich Herrn PD Dr. Christian Firschke.

Ganz besonders danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Bernhard Kemkes, Chefarzt der Abteilung für Herzchirurgie am Krankenhaus München Bogenhausen, für die bereitwillige Kooperation bei der Gewinnung der Gewebeproben. Auch seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern gebührt für ihre stete Hilfsbereitschaft aufrichtiger Dank. Hervorzuheben ist dabei Frau Kühn, die sich stets entgegenkommend meiner Anliegen annahm.

Auch Herrn Prof. Dr. Rüdiger Lange, Direktor der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie am Deutschen Herzzentrum München, möchte ich für die Bereitstellung von Gewebeproben herzlich danken. Besonderes verbunden bin ich dabei Herrn Dr. Matthias Overbeck für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung von Spenderherzgewebe.

Meinen Eltern möchte ich nicht nur für die allgemeine bedingungslose Unterstützung danken. Meiner Mutter danke ich im speziellen für die wesentliche Mitarbeit in allen mathematisch-statistischen Belangen dieser Arbeit, meinem Vater für zahlreiche Korrekturlesungen.