

**I. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar und  
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum  
Technische Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**Frequenzabhängig veränderte zelluläre atriale Elektrophysiologie  
bei herzinsuffizienten Patienten: Alteration des langsamen  
Calciumeinwärtsstroms**

Bharat Kalra

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. R. M. Oberhoffer

Die Dissertation wurde am 11.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 ELEKTROPHYSIOLOGISCHES ATRIALES REMODELING BEI HERZINSUFFIZIENZ UND VORHOFFLIMMERN .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 WAHL DES EXPERIMENTELLEN MODELLS .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DES AKTIONSPOTENTIALS .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 EINLEITUNG.....	7
1.4.2 AM AKTIONSPOTENTIAL BETEILIGTE IONENKANÄLE UND IONENSTRÖME .....	8
<b>1.5 AUFBAU UND EIGENSCHAFTEN DES L-TYP CALCIUMKANALS .....</b>	<b>12</b>
<b>2. METHODIK .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 PATIENTENCHARAKTERISTIK.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 ENTNAHME UND TRANSPORT DER GEWEBEPROBEN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 ZELLISOLIERUNG .....</b>	<b>17</b>
2.3.1 EINLEITUNG.....	17
2.3.2 ISOLIERUNGSPROTOKOLL VON ATRIALEN KARDIOMYOZYTEN .....	18
<b>2.4 MESSLÖSUNGEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 VERSUCHSAUFBAU .....</b>	<b>21</b>
2.5.1 PATCH-CLAMP AUFBAU .....	21
2.5.2 PATCH-PIPETTE .....	23
2.5.3 PULLER.....	23
2.5.4 BADELEKTRODE .....	23
<b>2.6 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....</b>	<b>24</b>
2.6.1 POSITIONIERUNG UND AUSWAHL DER ZELLEN (VORBEREITUNG) .....	24
2.6.2 EINSATZ DER PIPETTE UND DES PIPETTENHALTERS .....	24
2.6.3 MESSUNG DER ZELLEN IM WHOLE-CELL-MODE (GANZZELLABLEITUNG) MITTELS PATCH-CLAMP-TECHNIK.....	24
<b>2.7 MESSPROTOKOLLE UND STROMKURVEN .....</b>	<b>27</b>
2.7.1 SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT.....	27
2.7.2 MESSUNG DER FREQUENZABHÄNGIGKEIT DES CALCIUMSTROMS.....	29
2.7.3 DIE ERHOLUNG DES CALCIUMSTROMS VON DER INAKTIVIERUNG .....	31
<b>2.8 DATENANALYSE .....</b>	<b>32</b>
<b>2.9 STATISTIK.....</b>	<b>34</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 CALCIUMSTROMGRÖßEN .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 INAKTIVIERUNG .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 FREQUENZABHÄNGIGE STRÖME BEI 1 HZ .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 FREQUENZABHÄNGIGE STRÖME BEI 5 HZ .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6 FREQUENZSTIMULATION BEI ERNIEDRIGTEM RUHEMEMBRANPOTENTIAL (-60MV).....</b>	<b>40</b>
<b>3.7 ERHOLUNG VON DER INAKTIVIERUNG („RECOVERY“).....</b>	<b>41</b>

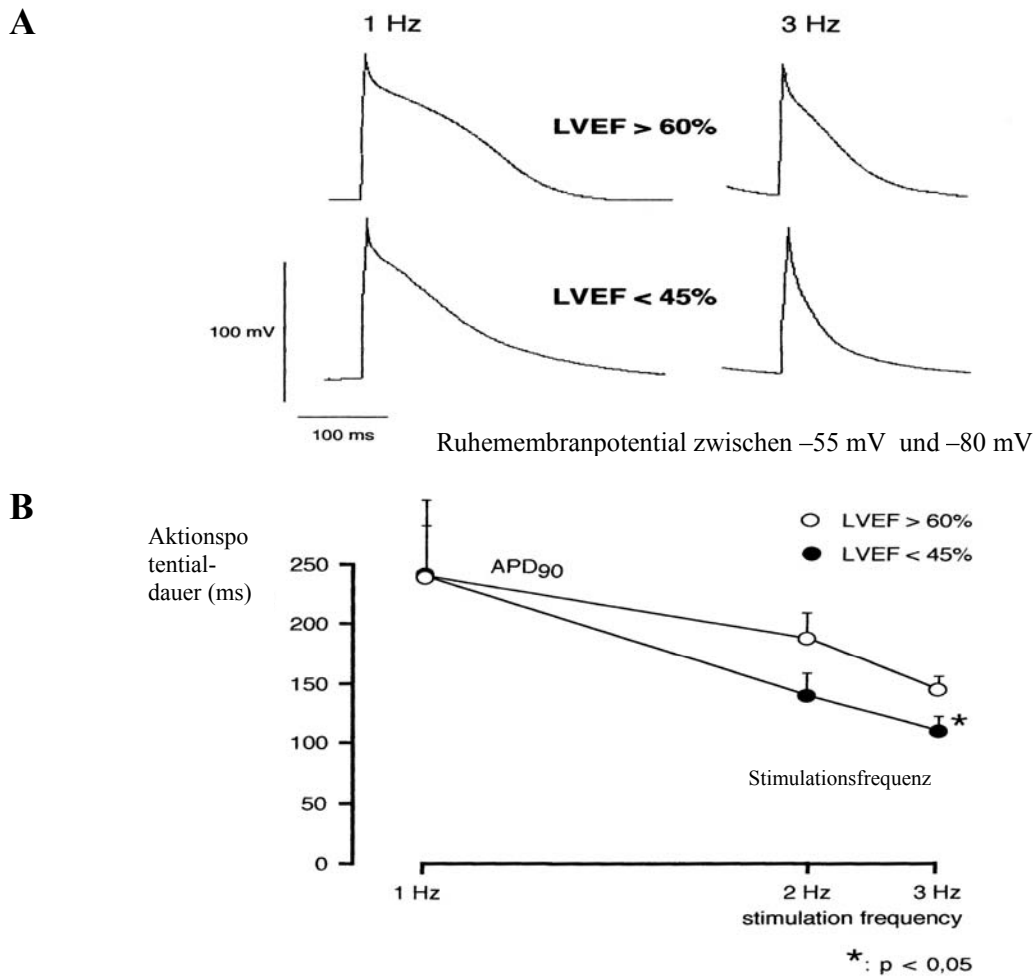
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>43</b>
4.1 VERGLEICH MIT BISHERIGEN STUDIEN AN HUMANEN ATRIALEN KARDIOMYOZYTEN ...	43
4.2 MÖGLICHE ERKLÄRUNGEN FÜR DIE VERÄNDERUNGEN DES CALCIUMSTROMS .....	44
4.3 KLINISCHE BEDEUTUNG DER CALICIUMSTROMALTERATION.....	46
4.4 LIMITATIONEN DER UNTERSUCHUNG .....	47
<b>5. SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>49</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>50</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>51</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>52</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>10. LITERATUR .....</b>	<b>55</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Elektrophysiologisches atriales Remodeling bei Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern**

Die Herzinsuffizienz ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für Vorhofflimmern. Man geht davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, bei Vorliegen einer Herzschwäche ein Vorhofflimmern zu entwickeln, etwa 6mal höher ist, als in der gleichaltrigen nicht erkrankten Bevölkerung.<sup>3</sup>

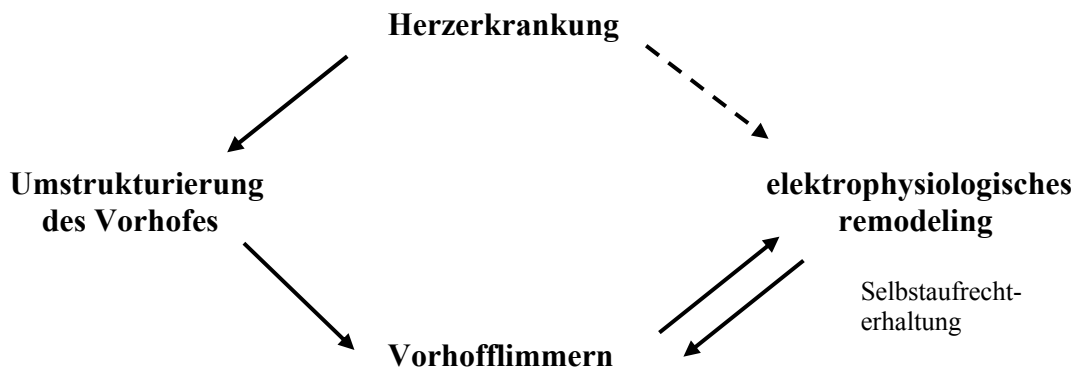
Frühere Studien ergaben veränderte elektrophysiologische Eigenschaften in humanen atrialen Kardiomyozyten bei herzkranken Patienten.<sup>28, 32</sup> Eine Untersuchung von atrialen Aktionspotentialen von Schreieck et al.<sup>37</sup> (Abb. 1 und 2) zeigte eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer bei höheren Herzfrequenzen bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Gegensatz zu Patienten mit erhaltener kardialer Pumpfunktion. Daraus lässt sich eine frequenzabhängige Verkürzung der Refraktärzeit bei herzinsuffizienten Patienten ableiten, welche wiederum zur Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern beitragen kann.



**Abb. 1:** Frequenzabhängig veränderte Aktionspotentiale bzw. Aktionspotentialdauer von atrialen Kardiomyozyten:  
**A:** Typische Beispiele atrialer Aktionspotentiale eines Patienten mit LVEF>60% (oben) u. <45% (unten) bei 1 Hz u. 3 Hz steady-state Stimulation (Quelle: Schreieck et al., 1998)  
**B:** Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation von Patienten mit LVEF>60% u.<45% (Quelle: Schreieck et al., 1998), Mittelwerte  $\pm$  SEM

Zu einer anhaltenden frequenzabhängigen Verkürzung der Refraktärzeit kommt es bei dem klassischerweise als elektrophysiologisches Remodeling bezeichneten Phänomen, welches in Folge von Vorhofflimmern auftritt und dessen Selbstaufrechterhaltung begünstigt.<sup>46</sup> Die erwähnten Ergebnisse von Schreieck et al.<sup>37</sup> zeigten nun auch einen anderen zellulären elektrophysiologischen Mechanismus auf, der ebenfalls zur Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern bei Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Andererseits können auch strukturelle Umbauvorgänge des Vorhofs durch eine kardiovaskuläre Erkrankung ein Vorhofflimmern begünstigen (siehe Schema in Abb. 2)



**Abb. 2:** Flußschema des atrialen Remodelings im Zusammenhang mit Vorhofflimmern und Herzerkrankung

Die oben erwähnten frequenzabhängigen Aktionspotentialverkürzungen von Patienten mit Herzinsuffizienz wurden in einem möglichen Zusammenhang mit der Änderung des atrialen transienten Auswärtsstroms  $I_{to1}$  gebracht.<sup>36</sup> Bisher ist nicht untersucht worden, inwiefern andere Ionenströme, wie z.B.  $I_{Ca}$ , die oben genannten Veränderungen erklären könnten.

Zelluläre elektrophysiologische Studien von Le Grand et al.<sup>28</sup> und Van Wagoner et al.<sup>41</sup> ergaben reduzierte Calciumströme im dilatierten menschlichen Herzvorhof bzw. eine verminderte Calciumstromdichte bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern. Die von Courtemanche et al.<sup>13</sup> veröffentlichten Ergebnisse belegen die zentrale Rolle der Reduktion des  $I_{Ca}$  (L-Typ) für die Aktionspotentialverkürzung bei Vorhofflimmern. Wir kamen dadurch zu unserer Hypothese, dass Calciumionenkanäle in der Aktionspotentialveränderung bei Patienten mit eingeschränkter Herzleistung involviert sein könnten.

## 1.2 Fragestellung

Es ergibt sich nun die Frage, in welchem Maße der langsame Calciumeinwärtsstrom  $I_{Ca}$  eine Rolle für die genannten frequenzabhängigen Aktionspotentialverkürzungen spielt.

Dazu sollten die Calciumstromdichte und die Calciumstromkinetik in atrialen Kardiomyozyten von herzinsuffizienten Patienten im Vergleich mit Patienten ohne Einschränkung der Herzleistung gemessen werden.

### 1.3 Wahl des experimentellen Modells

Die von Erwin Neher und Bert Sakmann Ende der 70er Jahre entwickelte Patch-Clamp-Technik („Membran-Fleck-Klemme“), welche 1991 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet wurde, legte den Grundstein für die moderne elektrophysiologische Untersuchung und hat diese grundlegend revolutioniert. Diese Methode ermöglicht, Ionen-Kanäle auch einzeln zu beobachten. Außerdem erlaubt sie den Einsatz einer Mikropipette als Spannungsklemme zur Ganzzelleableitung, um transmembranöse, spannungsabhängige Ionenströme zu analysieren,<sup>20</sup> wie es in Form von Calciumeinwärtsströmen in dieser Arbeit geschah.

Andere spannungsabhängige Ionenströme wie  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ströme ließen sich dabei durch Ersatz von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen in der intra- und extrazellulären Lösung ausblenden. Zusätzlich wurden kaliumkanalblockierende Substanzen verwendet (siehe 2.4).

### 1.4 Elektrophysiologische Grundlagen des Aktionspotentials

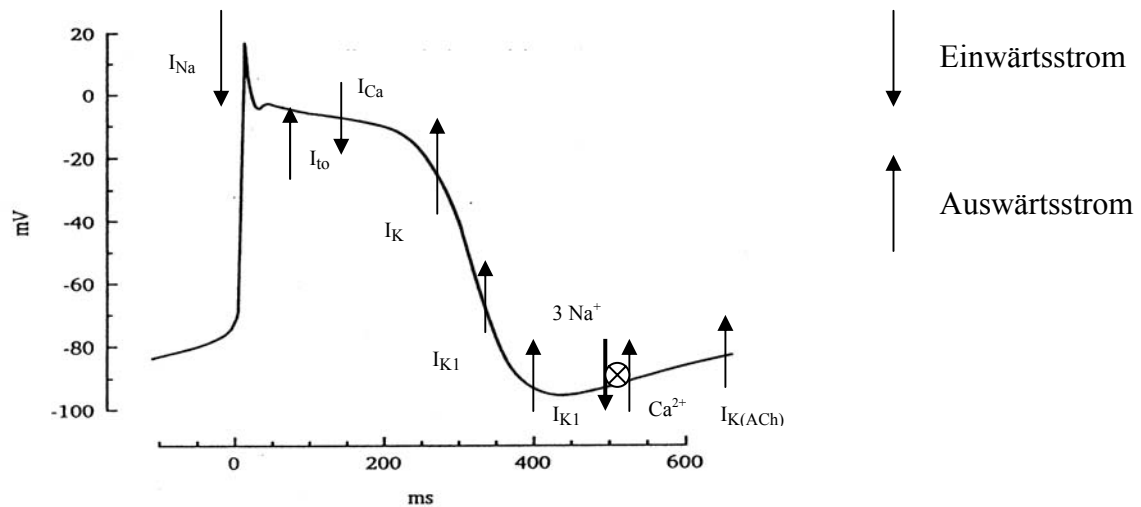
#### 1.4.1 Einleitung

Die Unterschiede zwischen dem Aktionspotentialverlauf eines atrialen Kardiomyozyten und einer Skelettmuskelzelle sind in der Mitbeteiligung des Calciumstromes am Aktionspotential und der Verschiedenartigkeit der Ionenströme in Hinsicht auf ihre Leitfähigkeit, ihre Amplitude, ihre Ladung und ihre Zeit-, und Spannungsabhängigkeit zu finden.

Man unterscheidet depolarisierende Einwärtsströme und repolarisierende Auswärtsströme. Unter ersterem versteht man den Vorgang, dass positiv geladene Ionen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  über Ionenkanäle ins Zellinnere gelangen und damit die Zelle depolarisieren können. Die beiden wichtigsten **Einwärtsströme** sind  $I_{\text{Ca}}$  und  $I_{\text{Na}}$ . Repolarisierende **Auswärtsströme** kommen überwiegend durch Kaliumströme zustande, in geringem Maße auch durch Chlorid(einwärts)ströme. Sie repolarisieren die Zelle nach der Aufstrich- und Plateauphase und führen zu einer Hyperpolarisierung des Ruhemembranpotentials.<sup>45</sup> (Überblick in Abb.3)

Die lange Zeitspanne der Nichterregbarkeit (Refraktärzeit) während des Aktionspotentialplateaus soll eine vorzeitige Wiedererregung verhindern und damit das Auftreten von Reentrytachykardien wie Vorhofflimmern unterdrücken.

## 1.4.2 Am Aktionspotential beteiligte Ionenkanäle und Ionenströme



$I_{Na}$ : Natriumeinwärtsstrom;  $I_{to}$ : transienter  $K^+$ -Auswärtsstrom;  
 $I_{Ca}$ : L-Typ Calciumstrom;  
 $I_K$ : verzögerter Auswärtsgleichrichterstrom mit 3 Komponenten im Atrium:  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$   
 $I_{K1}$ : Einwärtsgleichrichterstrom;  $I_{K(ACh)}$ : Acetylcholin-abhängiger Kaliumstrom  
 $3 Na^+ / Ca^{2+}$ : Na/Ca-Austauscher

**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines Aktionspotentials mit den dazugehörigen Einwärts- und Auswärtsströmen im atrialen Kardiomyozyten

### Der $Na^+$ -Kanal

Der Natriumeinwärtsstrom ( $I_{Na}$ ) ist für den Aufstrich des Aktionspotentials in atrialen Kardiomyozyten verantwortlich. Durch einen elektrischen Reiz wird das Schwellenpotential der Zelle erreicht, und es kommt zu einem Anstieg der  $Na^+$ -Membranleitfähigkeit. Der dadurch ausgelöste, 1 bis 2 Millisekunden andauernde  $Na^+$ -Strom führt zu einer Depolarisation der Zelle, erreicht Werte um die +40 mV und nähert sich damit dem Natriumgleichgewichtspotential (+70 mV), bevor er wieder inaktiviert wird.<sup>17, 44</sup>

Der  $I_{Na}$  ist im Gegensatz zu anderen Kanaltypen in geringerem Maße diversifiziert, so daß weitere Subtypen im Rahmen der Aktionspotentialentstehung im atrialen Kardiomyozyten keine Rolle spielen sollten. Eine spät inaktivierende  $Na^+$ -Einwärtsstromkomponente verlängert die Repolarisationsphase im Ventrikel.<sup>33</sup> Inwieweit dies auch bei atrialen Kardiomyozyten eine Rolle spielt, ist fraglich.



### Frührepolarisierende Kanäle:

- **$I_{to}$**  (transienter Auswärtsstrom): Die durch die abnehmende Natriumleitfähigkeit bedingte frühe Repolarisationsphase des Aktionspotentials wird mit Hilfe des  $I_{to}$  eingeleitet. Unter dem  $I_{to}$  versteht man einen transienten Auswärtsstrom, der ab ca. -10 mV aktiviert wird. Er besteht aus 2 Komponenten:  $I_{to1}$  und  $I_{to2}$ .<sup>11, 39</sup>

$I_{to1}$  ist der spannungsabhängige, schnell aktivierende Kaliumstrom mit auswärtsgerichteter Gleichrichtung, der eine spannungs- und zeitabhängige Inaktivierung mit langsamer Erholung zeigt.<sup>15</sup> Eine hohe Dichte des  $I_{to1}$  wird insbesondere in epikardialen Zellen festgestellt, was zu einer Akzentuierung der frühen Repolarisation im Aktionspotential führt.<sup>1</sup>

$I_{to2}$  wird als  $Ca^{2+}$ -abhängiger Chlorid-Strom beschrieben, d.h. ein Einwärtsstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle.<sup>51</sup> Die Aktivierung dieses Kanals korreliert mit der Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, was wiederum im Zusammenhang mit dem Einstrom von  $Ca^{2+}$  durch den L-Typ Ca-Kanal steht.

Da der  $I_{to}$  im Gegensatz zum  $I_{Ca}$  in atrialen Kardiomyozyten relativ stark ausgeprägt ist, hat das atriale Aktionspotential eine kurz ausgeprägte Plateauphase.<sup>14, 18</sup>

- **$I_K$** : Der „delayed outward rectifier“ Strom<sup>8</sup> ist ein langsamaktivierender Auswärts-Gleichrichter-Strom und wohl der dominierende Auswärtsstrom während der Repolarisationsphase, insbesondere in der in atrialen Kardiomyozyten nur noch angedeuteten Plateau-Phase, und inaktiviert spannungsabhängig. Er wird bei über -50 mV langsam über 100-300 ms hinweg (je nach Subtyp) während der Depolarisation aktiviert.<sup>10, 34</sup>

Es sind bisher drei Komponenten von  $I_K$  bekannt:

**$I_{Kur}$** : „ultrarapid delayed rectifier“, hat bereits eine Bedeutung für die frühe atriale Repolarisation

**$I_{Kr}$** : „rapid delayed rectifier“ Kaliumstrom, der in der schwach ausgeprägten Plateauphase des Aktionspotentials der Herzvorhofzelle Bedeutung erlangt.

**$I_{Ks}$**  „slow delayed rectifier“ Kaliumstrom: Er wird langsam aktiviert und reagiert empfindlich auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Er gewinnt frequenzabhängig für die Repolarisation an Bedeutung.

## **Ca<sup>2+</sup>-Kanäle**

Die Calcium-Ströme können in atrialen Kardiomyozyten durch 2 verschiedene Calciumkanäle geleitet werden:<sup>2, 12</sup>

- **L-Typ Calciumkanal**

$I_{Ca,L}$  ist ein langandauernder, langsam inaktivierender Calciumstrom. Er wird durch Repolarisation über ein Membranpotential von über  $-40$  mV ausgelöst und sorgt für einen Einwärtsstrom, welcher die Repolarisation der Zelle verlangsamt, die Plateauphase wesentlich aufrecht erhält und die Aktionspotentialdauer dadurch auf mehrere 100 ms verlängert.

Dem  $I_{Ca,L}$  kommt zudem die Schlüsselrolle in der Auslösung der elektromechanischen Kopplung zu. Dabei wird durch die calciumgetriggerte Calciumfreisetzung die Kontraktion eingeleitet. Es kommt zum Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Zytoplasma, diese werden an das Troponin T der Myofilamente gekoppelt und mit Hilfe von ATP eine Kontraktion veranlasst.

- **T-Typ Calciumkanal**

$I_{Ca,T}$  ist ein schnell aktivierender, transientser Calciumeinwärtsstrom, der bereits bei Depolarisation auf  $-70$ mV ausgelöst wird. Er spielt eine Rolle im Aktionspotential des AV-Knotens und des Reizleitungssystems. Eine funktionelle Rolle des T-Typ Calciumkanals im gesunden Vorhofmyokard des Menschen ist nicht nachgewiesen. Er wird allerdings bei verschiedenen myokardialen Erkrankungen exprimiert.

## **Spätrepolarisierende K<sup>+</sup>-Kanäle**<sup>8, 21</sup>

Die spätrepolarisierende Phase des Aktionspotentials ist geprägt durch die Abnahme der  $I_{Ca}$ -Leitfähigkeit mit einhergehender verstärkter K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit folgender Kanäle:

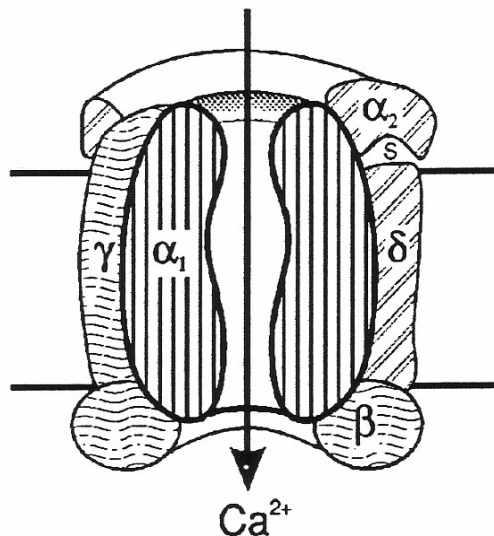
- **$I_{K1}$ :** Der Kaliumstrom, hat die Aufgabe, das Ruhemembranpotential wiederherzustellen und dieses aufrechtzuerhalten. In dieser Phase ist er der dominierende Auswärtsstrom. Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften der Einwärtsgleichrichtung ist  $I_{K1}$  während der Plateauphase nicht wirksam, da seine Aktivierung erst im negativen Membranbereich exponentiell zunimmt.

- **$I_{K(ACh)}$** : Dieser Ionenstrom wird durch Acetylcholin als Mediator der parasympathischen Stimulation an muskarinergen Rezeptoren ausgelöst. Er trägt zum Ruhemembranpotential bei und ist verantwortlich für die Hyperpolarisation bei vagaler Stimulation, was zu einem verkürzten Aktionspotential führt.

### **Ionentransportprozesse**<sup>24</sup>

- **$Na^+ - K^+$ -Pumpe**: Sie dient der Wiederherstellung der ionalen Zusammensetzung der Zelle und der Aufrechterhaltung des Membranpotentials durch transmembranäre Ionengradienten.
- **$Na^+ / Ca^{2+}$ -Austauscher**: Er führt zu einem auswärtsgerichteten (repolarisierenden) bzw. einwärtsgerichteten (depolarisierenden) Ionenstrom. Dies ist vom  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Gradienten und vom Membranpotential abhängig. Er dient dem Ziel einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ - Aufnahme während der Aufstrichphase und der  $Ca^{2+}$ -Elimination während der Repolarisationsphase, wobei die primäre Aufgabe in Kardiomyozyten in letzterem besteht.<sup>5</sup> Dabei werden 3  $Na^+$ -Ionen gegen 1  $Ca^{2+}$ -Ion ausgetauscht. Der  $Na^+ - Ca^{2+}$ -Austauscher kann bei seiner Aktivierung zu einer Nachdepolarisation der Zelle führen.

## 1.5 Aufbau und Eigenschaften des L-Typ Calciumkanals



**Abb. 4:** Schematischer Aufbau eines L-Typ Calciumkanals mit extrazellulärer  $\alpha_2$ -Untereinheit, transmembranären  $\alpha_1$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten und intrazellulärer  $\beta$ -Untereinheit<sup>23</sup>

Der Calciumkanal ist ein heteromeres Protein, welches sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt<sup>7</sup> (Abb. 4):

- $\alpha_{1c}$ -Untereinheit: Sie ist die porenbildende Untereinheit, die die Basalfunktion des Kanals steuert und als wichtigster pharmakologischer Ansatzpunkt zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalmodulation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten dient. Zudem ist die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit der Spannungssensor des Kanals.
- Die  $\alpha_2\delta$  (transmembranäre) und die  $\beta$  (zytoplasmatische)-Untereinheit können durch die Proteinkinase phosphoryliert werden, was der Möglichkeit einer Modulation des L-Typ Calcium-Kanals gleichkommt. Eine Phosphorylierung der Untereinheiten geschieht z.B. durch  $\beta$ -adrenerge oder  $\alpha$ -adrenerge Stimulation mit einhergehender Aktivierung von Proteinkinase A bzw. C. Insbesondere die Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit werden in der Literatur als die wichtigsten Modulatoren benannt, v.a. für die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik in Säugetierzellen.<sup>31</sup>

Auch zelluläre Mediatoren, wie die intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration und der pH-Wert haben Einfluss auf die Kanalfunktion.

## 2. Methodik

### 2.1 Patientencharakteristik

Die Einteilung der Patienten erfolgte in Gruppen mit und ohne Herzinsuffizienz, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass es sich bei beiden Gruppen um Patienten mit koronarer Herzkrankheit handelte.

Die Patienteneinteilung zur Gruppe Herzinsuffizienz erfolgte bei dieser Arbeit aus Gründen der Praktikabilität nach dem Kriterium der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), welche im Rahmen einer angiographischen Diagnostik vor der Herz-OP bestimmt wurde.

- Eine LVEF  $> 60\%$  wurde als Einschlusskriterium für Patienten mit normaler Herzleistung angesehen.
- Eine LVEF  $< 45\%$  wurde einer Herzinsuffizienz gleichgesetzt.
- Als weitere Vergleichsgruppen dienten Organspender mit normaler linksventrikulärer Funktion, die keine Herzerkrankung aufwiesen.

Als Ausschlusskriterien für beide Patientengruppen dienten:

- Stenosen oder Insuffizienzen der Mitral- oder Trikuspidalklappe, welche einen Ausprägung  $> \text{Grad I}$  aufwiesen.
- Vergrößerter linker oder rechter Vorhof des Herzens (Querdiameter  $> 45 \text{ mm}$ ), welcher im 4-Kammerblick während einer Echokardiographie ermittelt wurde.
- Behandlung mit Klasse I oder Klasse III Antiarrhythmika, chronische Einnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten innerhalb des vorhergehenden Jahres und der kurzfristige Gebrauch von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten innerhalb einer Woche vor OP.

- Jegliche Vorgeschichte von Vorhofflimmern oder persistierendem Vorhofflimmern. Es wurden pro Patient mindestens ein 24-Stunden Holter EKG und mehrere EKG-Streifen, welche zu verschiedenen Zeiten geschrieben wurden, auf Vorhofflimmern evaluiert. Desweiteren wurden Patienten mit einer Anamnese von paroxysmalen Tachykardien und anamnestischen Pulsunregelmäßigkeiten ausgeschlossen.
- Patienten mit Schilddrüsenhormonstörungen, bzw. Gabe von Schilddrüsenhormonen oder anderen Medikamenten, die in den Schilddrüsenstoffwechsel eingreifen.

Insgesamt wurden jeweils 10 Patienten in die LVEF>60% Gruppe und LVEF<45%-Gruppe eingeschlossen. Dabei war das mittlere Alter in beiden Gruppen vergleichbar und in beiden Gruppen dominierte das männliche Geschlecht (Tab. 1)

Mit Ausnahme der herzgesunden Organspender wurden alle Patienten einer aortocoronaren Bypass-OP aufgrund einer 2- bis 3-Gefäßerkrankung unterzogen.

Der rechtsatriale Vorhofdruck wurde an Hand des ZVD (zentral venöser Druck) quantifiziert, der linksatriale Druck durch den PCWP (pulmonal capillary wedge pressure). Beide wurden durch die Messung über den Swan-Ganz-Katheter direkt vor Beginn der OP erfasst. Sowohl beim ZVD als auch beim PCWP wurden erwartungsgemäß signifikant höhere Werte bei der Gruppe mit LVEF<45% gemessen ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,005$ ). Auch die Herzfrequenz war in der Gruppe der Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion signifikant höher ( $p=0,005$ ), bei den Altersangaben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Gabe aller herzwirksamen Medikamente wurde 24 Stunden vor OP-Beginn gestoppt.

Alle herzinsuffizienten Patienten (mit Ausnahme von Patient 6 und 7) bekamen als Basismedikation zumindest einen ACE-Hemmer und ein Diuretikum.

Bei der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten bestand eine Prävalenz von pulmonalen Erkrankungen, insbesondere von COPD (3 Patienten). Auf die dafür verordneten Medikamente wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht näher eingegangen. Es handelte sich hierbei ausschließlich um  $\beta$ -Sympathikomimetika, Steroide und Theophyllin-Präparate.

Die wichtigsten Patientendaten werden in den untenstehenden Tabellen dargestellt:

Pat. Nr.	Alter	ZVD	PCWP	Herzfrequenz	Medikamente
<b>LVEF &gt; 60%</b>					
1	66	8	9	66	β-Blocker, Nitrate
2	56	5	16	60	ACEI, β-Blocker, Nitrate
3	55	10	12	63	Nitrate
4	67	8	18	54	β-Blocker, Nitrate, CSEH, Benzo
5	65	3	14	62	β-Blocker, Nitrate
6	82	-	-	67	β-Blocker, Nitrate, Diuretika, CSEH
7	56	4	12	71	ACEI, Nitrate, Diuretika
8	70	-2	14	85	Nitrate, CSEH
9	77	5	15	58	Nitrate, CSEH
10	66	3	-	58	Nicht bekannt
Mittelwert	66	4,9	13,8	64,3	
STD	9,3	3,6	2,8	8,8	
<b>LVEF &lt; 45%</b>					
1	74	10	30	75	β-Blocker, Nitrate, Diuretika
2	71	10	22	65	ACEI, β-Blocker
3	-	17	16	70	ACEI, β-Blocker, Diuretika
4	65	12	20	84	Diuretika, CSEH, Steroide
5	62	10	18	77	ACEI, β-Blocker, Nitrate, Diuretika
6	-	11	20	80	β-Blocker, Nitrate, CSEH
7	69	12	21	68	β-Blocker, Nitrate, CSEH
8	62	10	25	90	ACEI, β-Blocker, Nitrate
9	55	3	12	83	ACEI, Diuretika
10	63	10	-	80	ACEI, β-Blocker, Nitrate, Diuretika
Mittelwert	65,1	10,5	20,4	76,9	
STD	6,0	3,4	5,2	7,8	

**Tab. 1:** Auflistung von wichtigen kardiovaskulären Parametern und der Medikation der Patientengruppen LVEF > 60% u. < 45%  
 ACEI: Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor; CSEH: Cholesterin Synthese Enzym-Hemmer;  
 ZVD: zentral venöser Druck; PCWP: pulmonal capillary wedge pressure; Benzo: Benzodiazepin; STD: Standardabweichung

Pat. Nr.	Kardiale Erkrankung	Sonstige Erkrankungen	Kardiovaskuläre Risikofaktoren
<b>LVEF &gt; 60%</b>			
1	3 Ge-KHK	-	Dyslip.; fam. Risiko
2	3 Ge-KHK	-	-
3	3 Ge-KHK	Verschuß linke Carotis	Nikotin; Hyperlip.
4	2 Ge-KHK	Strumektomie	Nikotin; Hyperlip.
5	KHK+ AS	-	Adipositas
6	3 Ge-KHK	Hepatitis B	-
7	3 Ge-KHK	-	Diabetes Typ II, Hyperchol.
8	3 Ge-KHK	-	Nikotin; Hyperchol.
9	3 Ge-KHK	pAVK	Nikotin; Hyperlip.; fam. Risiko
10	3 Ge-KHK	-	Hyperchol; fam. Risiko
<b>LVEF &lt; 45%</b>			
1	3 Ge-KHK	-	Diabetes Typ II
2	3 Ge-KHK	Nierenzell-Ca; Apoplex	Hyperchol.
3	3 Ge-KHK	pAVK, COPD	Nikotin; Hyperlip.; fam. Risiko
4	3 Ge-KHK	COPD; Niereninsuffizienz	Nikotin, Hyperuri.; Hyperchol.
5	3 Ge-KHK	pAVK;	Nikotin; Hyperchol.
6	AI; keine KHK	-	Hyperchol.
7	3 Ge-KHK	pAVK; COPD	Nikotin; Hyperchol.
8	3 Ge-KHK	Niereninsuffizienz	-
9	3 Ge-KHK	-	Diabetes Typ I
10	3 Ge-KHK	Niereninsuffizienz;	Nikotin; Hyperchol.; Diab. Typ II

**Tab. 2:** Auflistung von kardialen Erkrankungen, sonstigen Erkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren der Patienten der Patientengruppen LVEF>60% u. <45%

3 Ge-KHK : koronare 3- Gefäßerkrankung; 2 Ge-KHK : koronare 2- Gefäßerkrankung

AS : Aortenstenose; AI : Aorteninsuffizienz; Dyslip = Dyslipoproteinämie;

Hyperchol.: Hypercholesterinämie; fam. Risiko: familiäres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen; Hyperuri.: Hyperurikämie;

Hep. B: Hepatitis B; pAVK: peripher-arterielle Verschlusskrankheit; COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung; Nierenzell-Ca.: Nierenzell-Karzinom;



## **2.2 Entnahme und Transport der Gewebeproben**

Die Entnahme von atrialem Gewebe erfolgte in Form von Herzohrpräparaten während einer offenen herzchirurgischen Operation mit Thorakotomie, wie sie in der Regel bei einer aortocoronaren Bypassoperation durchgeführt wird. Um die Herz-Lungen-Maschine anzuschließen, wurde eine Inzision in das rechte atriale Gewebe vollzogen und dabei ein Teil des rechten Vorhofohrs entfernt. Dadurch wird ein Zugang zur Kanülierung des rechten Vorhofs geschaffen.

Das verwendete atriale Präparat der Organspender wurde aus der lateralen Wand des linken Herzvorhofes entnommen, da bei diesem Eingriff der rechte Vorhof des Spenders komplett transplantiert, aber ein Teil des linken Atriums abpräpariert wird.

Die durch die oben erwähnten Prozeduren gewonnenen Gewebeproben konnten, je nach Qualität, Quantität und Patientencharakteristik, zur Isolation von atrialen Kardiomyozyten verwendet werden. Diese wurden im OP sofort in eine vorgekühlte, präoxygenierte,  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung gegeben und innerhalb von 30 min in unser Labor transportiert.

Die Entnahme der Gewebeproben wurde mit dem Einverständnis der Patienten durchgeführt und stand im Einklang mit den Forderungen der Deklaration von Helsinki.

## **2.3 Zellisolierung**

### **2.3.1 Einleitung**

Mittels Patch-Clamp Technik wurde eine einzelne isolierte Zelle einer kapazitäts-kompensierten Spannungsklemme zugeführt, welche deren spannungsabhängige transembranäre Ionenströme messen kann. Die elektrischen Verhältnisse können somit kontrolliert und praktisch beliebig variiert werden. Des Weiteren können das extra- und intrazelluläre Milieu der Zelle verändert und genau kontrolliert werden.

Um einzelne Kardiomyozyten zu erhalten, müssen diese zuerst aus dem Zellverband isoliert werden. Die Zellisolierung ist ein aufwändiger Prozess, auf den im Folgenden eingegangen wird.

### **2.3.2 Isolierungsprotokoll von atrialen Kardiomyozyten**

Die verwendete Isolationstechnik orientiert sich an einem bewährten Schema von Amos et al.<sup>1</sup> und wurde von unserer Forschungsgruppe modifiziert. Um Einzelzellen aus einem Gewebsverband isolieren zu können, wurden folgende Schritte durchgeführt:

Nach kurzer Aufbewahrung des Gewebes in einer gekühlten, calciumfreien Tyrode-Lösung (siehe 2.4) mit kontinuierlicher Oxygenierung, wurde dieses unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Skalpell und einer Pinzette in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerteilt, wobei zuvor das sichtbare Fett- und Bindegewebe vom Muskelgewebe abgetrennt und verworfen wurde.

Die erhaltenen Stücke wurden daraufhin zweimal für jeweils fünf Minuten mit der (bereits erwähnten) calciumfreien Tyrode-Lösung unter Beachtung einer kontinuierlichen Oxygenierung gewaschen, mit dem Ziel der Auswaschung des Calciums aus den Zellen. Eine calciumfreie Lösung ist notwendig, um während der Isolierung calciumabhängige Kontraktionen zu vermeiden, welche insbesondere durch die Zerstörung der gap junctions und dem dadurch bedingten Einstrom des Calciums ausgelöst werden können. Ein weiterer Grund für eine Kontraktur der Zellen ist eine energetische Unterversorgung, welche zu einer Calciumüberladung führt. Diese wurde durch die Kühlung und Depolarisation der Zellen mit Hilfe der kardioplegen Aufbewahrungslösung weitgehend reduziert. Nach der Isolation mußte jedoch für physiologische Messungen Calcium wieder langsam zugeführt werden.

Als nächster Schritt folgte die enzymatische Verdauung der Gewebestückchen mit Hilfe von Kollagenasen und Proteasen über einen Zeitraum von ca. 40 min. Dazu wurden die Gewebestücke in eine calciumfreie, präoxygenierte Enzymlösung von ca. 40 ml gegeben, welche auf ca. 35-37 °C temperiert, kontinuierlich mit Sauerstoff begast und mit einem Magnetrührer kontinuierlich durchmischt wurde. An Enzymen enthielt die Lösung 375 IU/ml Kollagenase (Type I, Sigma), 2 IU/ml Protease (Type 24, Sigma) und 1 mg/ml Rinderserumalbumin. Das Prinzip dabei beruht auf einer Auflockerung des Bindegewebes mit Hilfe von Kollagenasen und Spalten von interzellulären Bindegewebsbrücken durch Proteasen. Da dadurch eine Glättung der Zelloberfläche erreicht wird (Abbau der Glykokalyx), die das Andocken der Glasmikroelektrode an der Zellmembran erleichtert, wird eine oberflächliche Alteration der Zellen in Kauf genommen.

Nach 40 min Inkubationszeit unter der Enzymlösung wurden mittels einer Pipette Proben aus der Lösung entnommen und mikroskopisch untersucht. Der erste Schritt der Inkubation mit den Enzymen war abgeschlossen, sobald im Mikroskop erste freie schwimmende Kardiomyozyten erkennbar waren.

Als nächstes wurde die Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei ca. 1000 Umdrehungen/min für ca. 1min zentrifugiert. Der Überstand der Enzymlösung wurde anschließend sofort abdekantiert. Das verbleibende Gewebe wurde in eine frische Enzymlösung mit 200-300 IU/ml Kollagenase Typ I gegeben, ggf. wurde 1mg/ml Albumin hinzugefügt, falls nur zerstörte Zellen freigesetzt wurden.

Der zweite Schritt der Inkubation war vergleichbar mit dem ersten. Die Lösung wurde wieder erwärmt und oxygeniert, wobei alle 10 min eine Probe der Enzymlösung mikroskopisch auf vitale Kardiomyozyten hin untersucht wurde.

Sobald diese in guter Qualität (kantig, quergestreift) nachweisbar waren, wurde die Enzymlösung von den verbleibenden Gewebeteilen abdekantiert und zentrifugiert (400 Umdrehungen/min für ca. 1min mit langsamer Dezeleration). Daraufhin wurde der Bodensatz an Zellen nochmals abdekantiert und die abgetrennte Enzymlösung dem Gewebe wieder zugegeben, während der Bodensatz mit präoxygenierter, calciumfreier „KB“-Lösung und 1mg/ml Albumin vermischt und im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert wurde (Albumin hemmt die verbleibenden Enzyme und wirkt antioxidativ). Dieser Zyklus wurde alle 10 Minuten wiederholt, solange vitale Kardiomyozyten nachweisbar waren.

Vor einer Messung mußten die Zellen vorsichtig auf Raumtemperatur erwärmt werden, was mindestens eine halbe Stunde in Anspruch nahm.

## 2.4 Messlösungen

Die Zusammensetzungen aller verwendeten Lösungen sind in der untenstehenden Tabelle zusammengestellt.

- Bei der **Tyrode Lösung** handelt es sich um die calciumfreie Elektrolytlösung, welche für den Transport und die Isolation der Zellen verwendet wurde.
- **KB-Lösung** diente zur Aufbewahrung der Zellen und wird auch als „kardioplege Lösung“ bezeichnet, da sie natrium- und calciumfrei ist und die Zellen durch eine hohe Kaliumkonzentration depolarisiert.

- **Externe Messlösung:**  
Badlösung, mit der die Zellen zur Gleichstrommessung superfundiert wurden
- **Interne Messlösung:**  
Lösung zur Füllung der Patchpipette zur Calciumstrommessung, die in die Zelle diffundiert und dadurch das Intrazellulärmilieu bestimmt

Um zu verhindern, dass neben dem Calciumstrom auch Natrium- und Kaliumströme gemessen wurden, wurde bei der Herstellung der internen u. externen Messlösung nach folgenden Prinzipien vorgegangen (siehe Tabelle 3):

1. Ersetzen von Kalium durch Caesium (Cs), wobei Cs zusätzlich Kaliumkanäle blockiert
2. Ersetzen von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{TEA}^+$ , das zusätzlich Kaliumkanäle blockiert
3. Einsatz von 4-AP als zusätzlicher Kaliumkanalblocker in der externen Lösung

In mM	Tyrode Lösung	KB-Medium	Ex. Lösung	Int. Lösung
NaCl	135	—	—	—
KCl	5,4	25	—	—
MgCl <sub>2</sub>	1,0	—	1	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33	—	—	—
Taurin	—	10	—	—
Glutaminsäure	—	70	—	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	10	—	—
EGTA	—	0,5	—	15
TEA <sup>+</sup>	—	—	136	—
Mg <sup>2+</sup> -ATP	—	—	—	3
CsCl-	—	—	20	133
CaCl <sub>2</sub>	—	—	1,2	—
4-AP	—	—	3	—
HEPES	10	—	10	10
Glucose	10	22	10	10
pH	7,4 (NaOH)	7,4 (KOH)	7,2 (CsOH)	7,2 (CsOH)

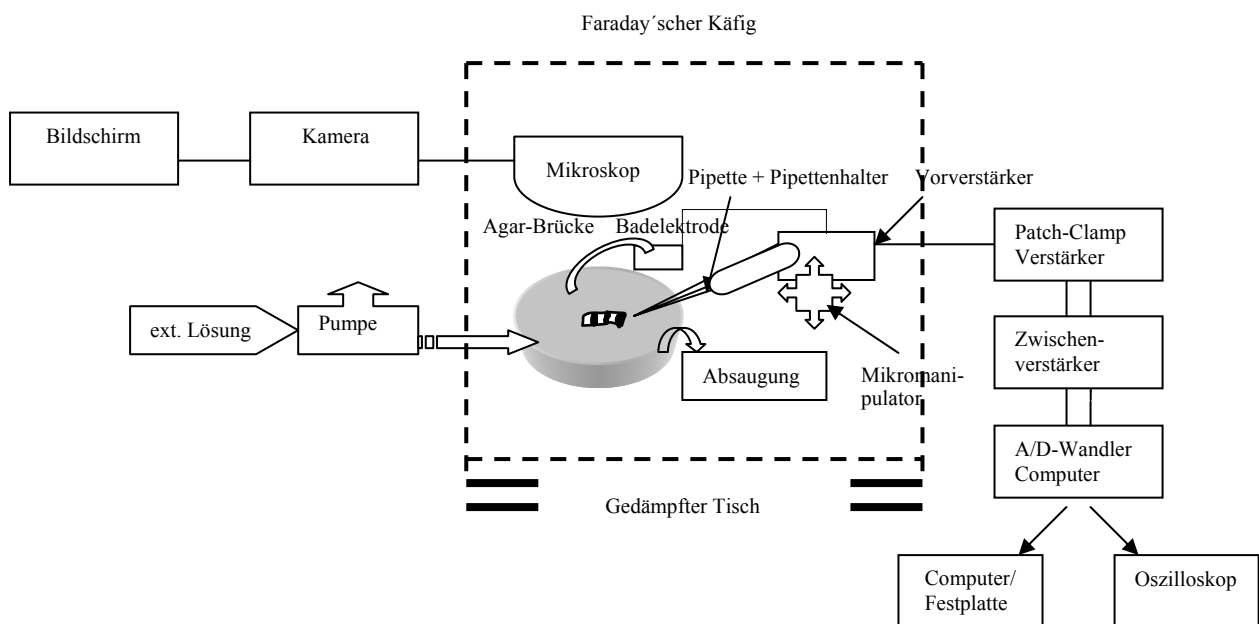
HEPES= Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure; 4-AP= 4-Aminopyridin; EGTA=Ethylenglycoltetraacetat;  
TEA<sup>+</sup>=Tetraethylammonium-Chlorid

**Tab. 3:** Verwendete Lösungen für die Messung des Calciumstroms

## 2.5 Versuchsaufbau

### 2.5.1 Patch-Clamp Aufbau

Folgender Aufbau wurde für die elektrophysiologischen Messungen mittels Patch-Clamp Technik verwendet:



**Abb. 5:** Schematischer Patch-Clamp Aufbau. Agar-Brücke: mit Agar und Elektrolyt gefüllte Glasbrücke; Bad-Elektrode: Referenzelektrode (Silber-Silberchlorid); ext. Lösung: Externe Messlösung (siehe 2.4)

- Inversionsmikroskop (Typ Leica ILM, Wetzler, Deutschland): Um das Aufsetzen der Mikropipette auf die Zelle steuern zu können, ist eine gute Optik notwendig. Das Inversionsmikroskop bot zudem viel Platz über dem Mikroskop-Tisch für die Badperfusion und den Mikromanipulator mit der Pipette. Die Fokussierung erfolgte durch die Auf- u. Abbewegung des Objektivs, der Messtisch blieb fixiert. Der Anschluss an eine Kamera und einen Bildschirm ermöglichte eine Überwachung der Zellintegrität während den Messungen.
- Schwingungsgedämpfter Tisch: Schutz vor Vibrationen während der Versuchsdurchführung.

- Der Faradaysche Käfig schirmte das Versuchsareal vor elektromagnetischen Interferenzen von außen ab.
- Mechanischer Mikromanipulator: Dabei handelte es sich um eine Vorrichtung, welche im Mikrometerbereich steuerbar ist und für das Aufsetzen der Patchpipette auf die ca. 10-20 x 80-200µm große Zelle verwendet wurde. Daran befestigt war ein Pipettenhalter mit einem Silber/Silberchlorid-Elektrodendraht und einer Gummimanschette zur luftdichten Befestigung der Pipette.  
Das Innere der Pipette konnte durch ein Schlauchsystem an der Gummimanschette unter Über- oder Unterdruck gesetzt werden, wodurch die Pipettenspitze freigespritzt und Zellmembranen angesaugt werden konnten. Dazu wurde an diesem Schlauch ein Dreiwegehahn und eine 10 ml Spritze angebracht.  
Der am Mikromanipulator befindliche Vorverstärker war durch ein Kabel mit dem Verstärker verbunden, der sich außerhalb des Faradayschen Käfigs befand.
- Messkammer: Dazu diente ein Petrischälchen aus Plexiglas mit 35 mm Durchmesser, welches in die vorgefertigte Öffnung des Mikroskoptisches eingesetzt wurde. In das Schälchen wird eine Kunststoffmesskammer mit 0,3 ml Kapazität eingesetzt, welche an ihren Enden zwei gefräste Löcher für den Zu- und Ablauf der Superperfusion besaß.
- Elektronische Komponenten:
  - a) Vorverstärker: Der am Mikromanipulator angeschlossene Vorverstärker dient insbesondere der Rauschunterdrückung und der Messung des Stromsignals.
  - b) Verstärker und Stimulator: Filterfunktion und Signalverstärkung durch das EPC9-System (Heka Instruments, Lambrecht, Deutschland), welches sowohl Messungen im Strom- als auch im Spannungsklemmmodus („current u. voltage-clamp“) möglich machte.  
Zusätzlich wurden ein Tiefpass-Filter (low-pass) und ein Hochpass-Filter (high-pass) verwendet, da der interne Patch-Clamp-Filter eine flache Filtercharakteristik aufweist.

- c) AD/DA-Wandler: Abwandlung des kontinuierlichen analogen Signals in digitale Zahlenwerte zur Aufzeichnung und Speicherung der Daten.
- d) Messdatenbearbeitung online: Mit Hilfe dieser Software und des EPC9-Verstärkers war eine vollautomatische Kompensation von kapazitiven artifiziellen Strömen und des Serienwiderstandes möglich.
- e) Datenspeicherung und graphische Datenanalyse: Mit der Software Pulse/Pulse fit des gleichnamigen Herstellers, wurde auf einem Apple Macintosh Power Mac die Datenerfassung, Darstellung und Datenanalyse durchgeführt. Als Speichermedien wurden eine externe Festplatte und ein Zip-Laufwerk verwendet.

### **2.5.2 Patch-Pipette**

Die Patch-Pipette stellte eine Glasmikroelektrode dar, die aus Borosilikatglaskapillaren (Typ GC 150T-10, Clark Electromedical Instruments, Kent, England) hergestellt wurde.

### **2.5.3 Puller**

Die Herstellung der Glasmikroelektroden erfolgte mit einem vollautomatischen Puller (DMZ-Universal Puller von WZ). Der Puller verfügt über ein dreistufiges Programm mit der Möglichkeit der Einstellung aller Zug-Parameter (Hitze, Zugdauer, Zugkraft, Verzögerung), welche die aufgeheizten Glaskapillaren zu den entsprechenden Glasmikroelektroden auseinander zieht (Öffnungsdurchmesser von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  und elektrischen Widerständen zwischen 2-3  $\text{M}\Omega$ , wenn diese mit Elektrolytlösung gefüllt wurden). Zum Schluss erfolgt noch ein „Fire-Polishing“, d. h. eine kurze Erhitzung der Elektrodenspitze um die Ecken der Elektrodenspitze nochmals abzurunden.

### **2.5.4 Badelektrode**

Als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode verwendet, die in ein Töpfchen mit der Pipettenlösung getaucht wurde, damit Pipetten und Badelektrode von der gleichen Elektrolytlösung umgeben werden. Das Töpfchen mit der Referenzelektrode wurde über eine mit Elektrolyt und Agar gefüllte Glaselektrode elektrisch leitend mit der Badlösung verbunden.

## **2.6 Versuchsdurchführung**

### **2.6.1 Positionierung und Auswahl der Zellen (Vorbereitung)**

Die atrialen Kardiomyozyten, die aus der Aufbewahrungslösung, dem KB-Medium (s.o.), in die Messkammer pipettiert worden waren, wurden dort 10-15 Minuten liegengelassen, um das Absetzen und Anhaften auf dem Boden der Petrischale zu gewährleisten. Eine Superperfusion (externe Messlösung) wurde mit ca. 1,5 ml/min durchgeführt und mit einem gut abgeschirmten Peltierelement auf ca.  $35^{\circ}\text{C}\pm 1$  temperiert.

Wichtig ist, dass nur Kardiomyozyten untersucht wurden, welche folgende Eigenschaften besaßen:

- sichtbare Querstreifung
- kantige Enden
- eine glatte, blasenfreie Oberfläche
- keine sichtbaren Kontraktionen

### **2.6.2 Einsatz der Pipette und des Pipettenhalters**

Beim Einsetzen der Pipette in den Pipettenhalter des Mikromanipulators wurde eine Berührung der Elektrode durch die Pipette vermieden, da sich sonst mikrometergroße Silberchloridsplitter durch die Abscherung vom Elektrodendraht bilden könnten, die die Pipettenspitze verunreinigen.

Die Pipetten wurden nur einmal verwendet und mit leichtem Überdruck in die Badlösung eingetaucht, um Verschmutzungen der Spitze von außen zu minimieren.

### **2.6.3 Messung der Zellen im whole-cell-mode (Ganzzelleableitung) mittels Patch-Clamp-Technik**

Unter whole-cell-mode versteht man folgende Patch-Clamp-Technik:<sup>20</sup>

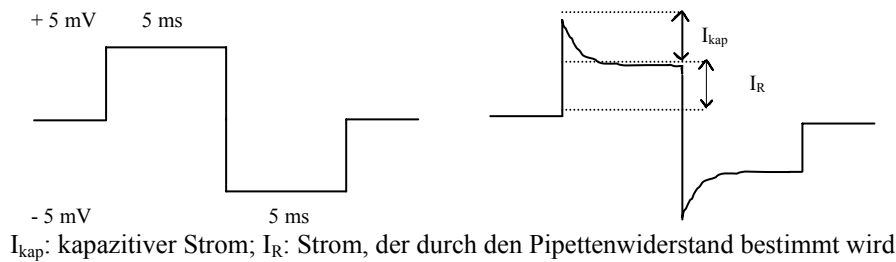
Der Pipettenwiderstand wurde kontinuierlich durch einen biphasischen 5 mV Testpuls automatisch rechnergestützt berechnet, der 20x pro Sekunde abgegeben wurde. Dadurch konnte der Membranwiderstand bzw. Pipettenwiderstand mit Hilfe des durch die Testpulse hervorgerufenen Stroms  $I_R$  nach folgender Formel berechnet werden:  $R = U/I_R$  (Abb. 6).



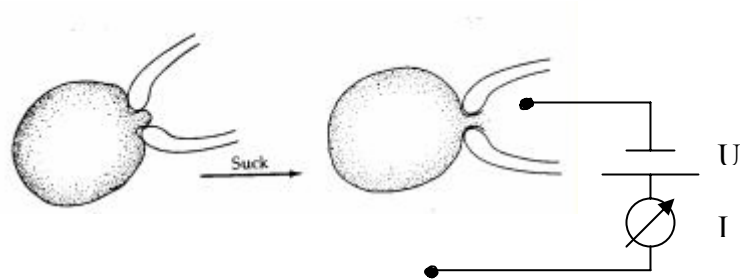
Nach Näherung der Zellpipette an die Zellmembran wurde eine Berührung der Zellmembran mit Hilfe der Mikrometerschraube oder durch vorsichtiges Ansaugen langsam herbeigeführt. Dies zeigte sich in einem plötzlichen Anstieg des Pipettenwiderstandes auf mehrere hundert  $M\Omega$ .

### Testpuls

### Ströme $I_R$ u. $I_{kap}$



**Abb. 6:** Bildliche Darstellung des Testpulses und der entsprechenden Ströme während der Patch-Clamp Ganzzelleableitung



**Abb. 7:** Patch-Clamp-Technik im whole-cell-mode: Einreißen der Zelle durch einen Saugstoß mit Hilfe einer Mikropipette. Messung der Potentialdifferenz zwischen der Pipette intrazellulär und der Badelektrode extrazellulär.

Durch weiteres Ansaugen legt sich die Membran der Zelle durch Unterdruck an die Innenseite der Mikropipette an, so dass der elektrische Widerstand zwischen Membran und Pipette idealerweise auf  $> 1 G\Omega$  ansteigen kann, ein sogenannter Gigaseal. Dieser eingesogene Membranfleck lässt sich durch einen Saugstoß einreißen, ohne das Anhaften der Membran zu beeinträchtigen (Abb. 7) Bleibt das Gigaseal erhalten, - dies ist bei einem stabilen langstreckigen Membrankontakt mit der Mikroelektrode gegeben, was zu vernachlässigbaren kleinen Leckströmen führt - hat man Zugang zum Zytoplasma und besitzt die Möglichkeit der Kontrolle der transmembranären Spannung (**voltage clamp**).

Auf diese Weise lassen sich die intrazellulären Ionenverhältnisse verändern bzw. resultierende Ionenströme messen. Nach Einriss der Zellmembran wurde mit der Messung der Calciumströme erst nach einer Wartezeit von 5 Minuten begonnen, um einen Ausgleich der internen Messlösung mit dem Zytoplasma zu erreichen. Nach vorherigen Experimenten hat sich gezeigt, dass der  $I_{Ca}$  nach Einreißen der Zellmembran zunächst zunimmt und nach einer fünfminütigen Phase ein Plateau erreicht auf dem er in einem Zeitraum von 15 Minuten nur um 6-10% abnimmt. In diesem Zeitraum wurden alle Messprotokolle durchgeführt.

Der kapazitive Stromanteil wurde automatisch und kontinuierlich rechnergestützt errechnet, angezeigt und während der Patch-Clamp Messungen jeweils automatisch subtrahiert. Der kapazitive Strom wird ganz überwiegend durch die Kapazität der gesamten äußeren Zellmembran einer Zelle bestimmt (Abb. 6). Die Kapazität der Zellmembran korreliert gut mit der Zelloberfläche und wurde deshalb als Maß für die Zellgröße angenommen. Wichtig zu erwähnen ist, dass der Serienwiderstand der Elektrode automatisch teilkompensiert wurde, da er einen möglichst kleinen Widerstand zur Zelle haben soll, weil beide in Reihe geschaltet sind. Der Gesamtwiderstand soll sich auf die Zelle entfalten.

Zur Messung des Calcium-Stromes wurde die Zellkapazität zu 100% kompensiert, die seriellen Widerstände elektrisch zu 50 bis 80%.

Die Membranströme wurden bei einer Aufzeichnungsrate von 20 kHz von analogen in digitale Signale umgewandelt und bei 5 kHz gefiltert. Danach wurden die Daten auf der Festplatte des Power Macs zur weiteren Analyse gespeichert.

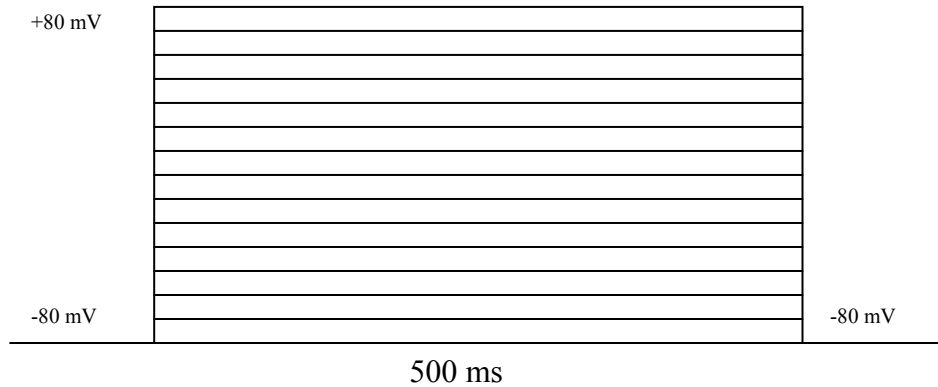
Zellen mit signifikanten Leckströmen wurden trotz einer möglichen elektrischen Leckstromkompensation nicht zur Messung herangezogen.

## 2.7 Messprotokolle und Stromkurven

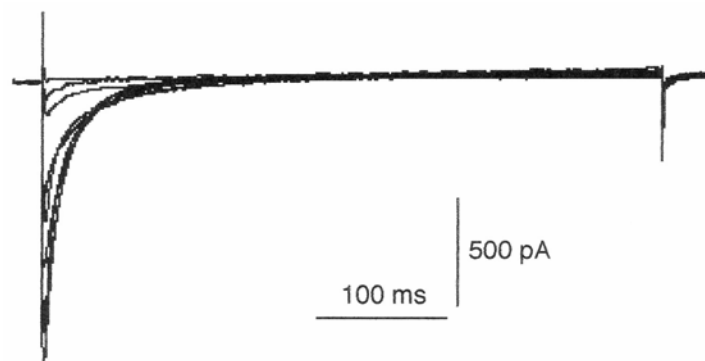
### 2.7.1 Spannungsabhängigkeit

#### a) Spannungsabhängige Aktivierung

**A**



**B**



**Abb. 8:** Typisches Pulsbeispiel zur Bestimmung der spannungsabhängigen Aktivierung des Calciumstroms

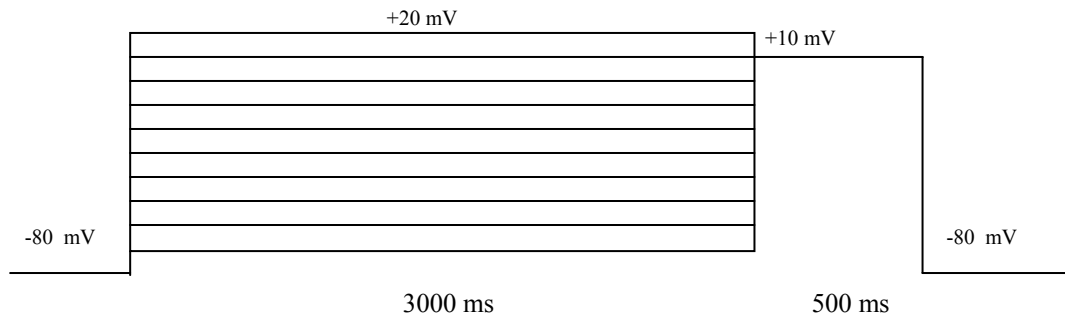
**A:** Der Testpuls wurde in 10 mV-Schritten von  $-70$  mV auf  $+80$  mV erhöht. Nach 500ms wurde der Spannungspuls wieder auf seinen Ausgangswert zurückgeklemmt. Die Pause zwischen den Testpulsen betrug 5 s.

**B:** Beispiel von übereinandergelegten Calciumströmen bei obigem Messprotokoll in A. Es handelte sich um einen atrialen Kardiomyozyten des Patienten Nr.3 (LVEF $>60\%$ ), siehe Tabelle 1 und 2.

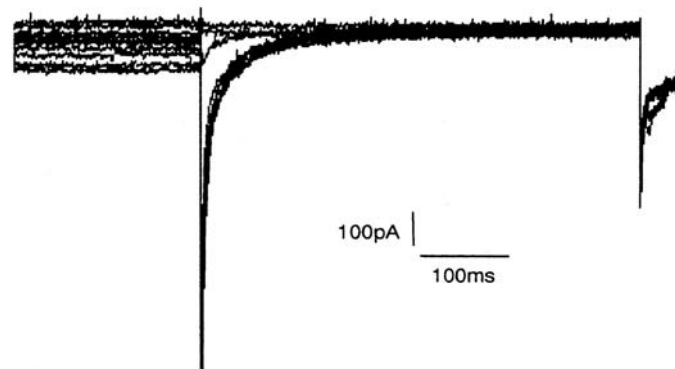
Beim Messprotokoll des Calciumstroms zur Charakterisierung der spannungsabhängigen Aktivierung wurde der Testpuls in 10 mV-Schritten von  $-70$  mV auf  $+80$  mV erhöht (insgesamt 15 Pulse). Die Pause zwischen 2 Pulsen betrug 5 Sekunden. Der erste registrierte Strompuls konnte bei einer Membranspannung von  $-20$  mV, das Maximum des Calciumeinwärtsstromes bei ca.  $+10$  bis  $+30$  mV gemessen werden (Abb.8).

## b) Spannungsabhängige Inaktivierung

**A**



**B**



**Abb. 9:** Typisches Pulsbeispiel zur Bestimmung der spannungsabhängigen Inaktivierung des Calciumstroms  
**A:** Nach depolarisierenden Präpuls wurde die Zelle auf +10 mV geklemmt. Zwischen den einzelnen Testpuls betrug die Pause 5 s.  
**B:** Typisches Beispiel der übereinandergelagerten Calciumströme -bei den Spannungspuls in A- einer Zelle des Patienten Nr. 9 (LVEF>60%), siehe Tabelle 1 und 2.  
Dargestellt sind die Ströme bei depolarisierenden Testpuls nach +10 mV. Die langen depolarisierenden Präpulse sind links abgeschnitten.

Das Messprotokoll zur Charakterisierung der spannungsabhängigen Inaktivierung bestand aus zwei Teilen:

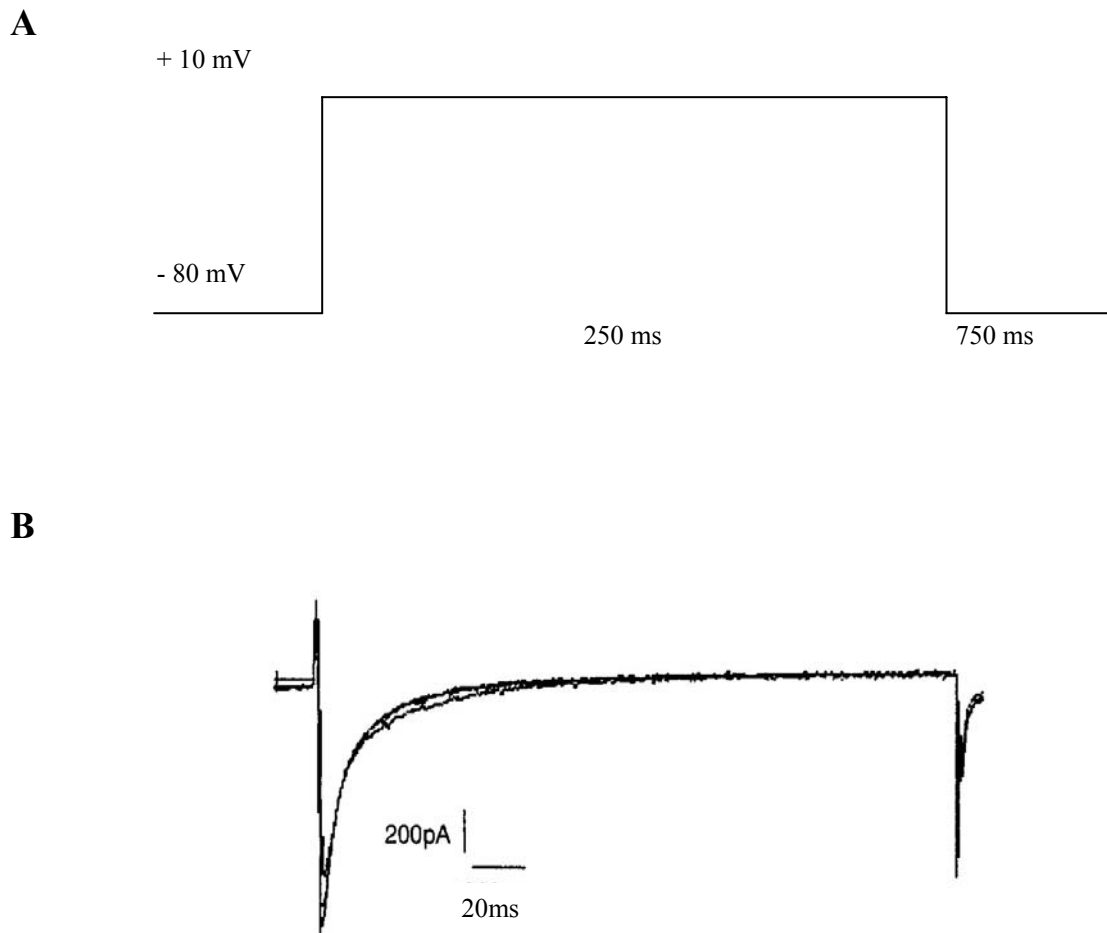
1. Das Ruhemembranpotential wurde durch einen depolarisierenden Präpuls mit einer Dauer von 3000 ms in 10mV Schritten beginnend von -80 mV schrittweise auf +20 mV erhöht.
2. Die nachfolgende Aktivierung des Calcium-Stroms erfolgte durch die anschließende Klemmung der Spannung auf +10mV über einen Zeitraum von 500 ms. Dabei ergab sich eine deutliche Abnahme des Calciumstroms ab einem Präpotential von -30 mV. Ab einem Präpuls von 0 mV war ein Calciumstrom nicht mehr nachweisbar.

Die Pause zwischen den einzelnen Testpuls betrug 5 Sekunden (Abb.9).

## 2.7.2 Messung der Frequenzabhängigkeit des Calciumstroms

### a) Calciumstrom bei 1 Hz

Die Dauer des Testpulses bei den verschiedenen Frequenzen wurde so konzipiert, dass sie der bekannten atrialen Aktionspotentialdauer bei diesen Frequenzen nahe kommt.



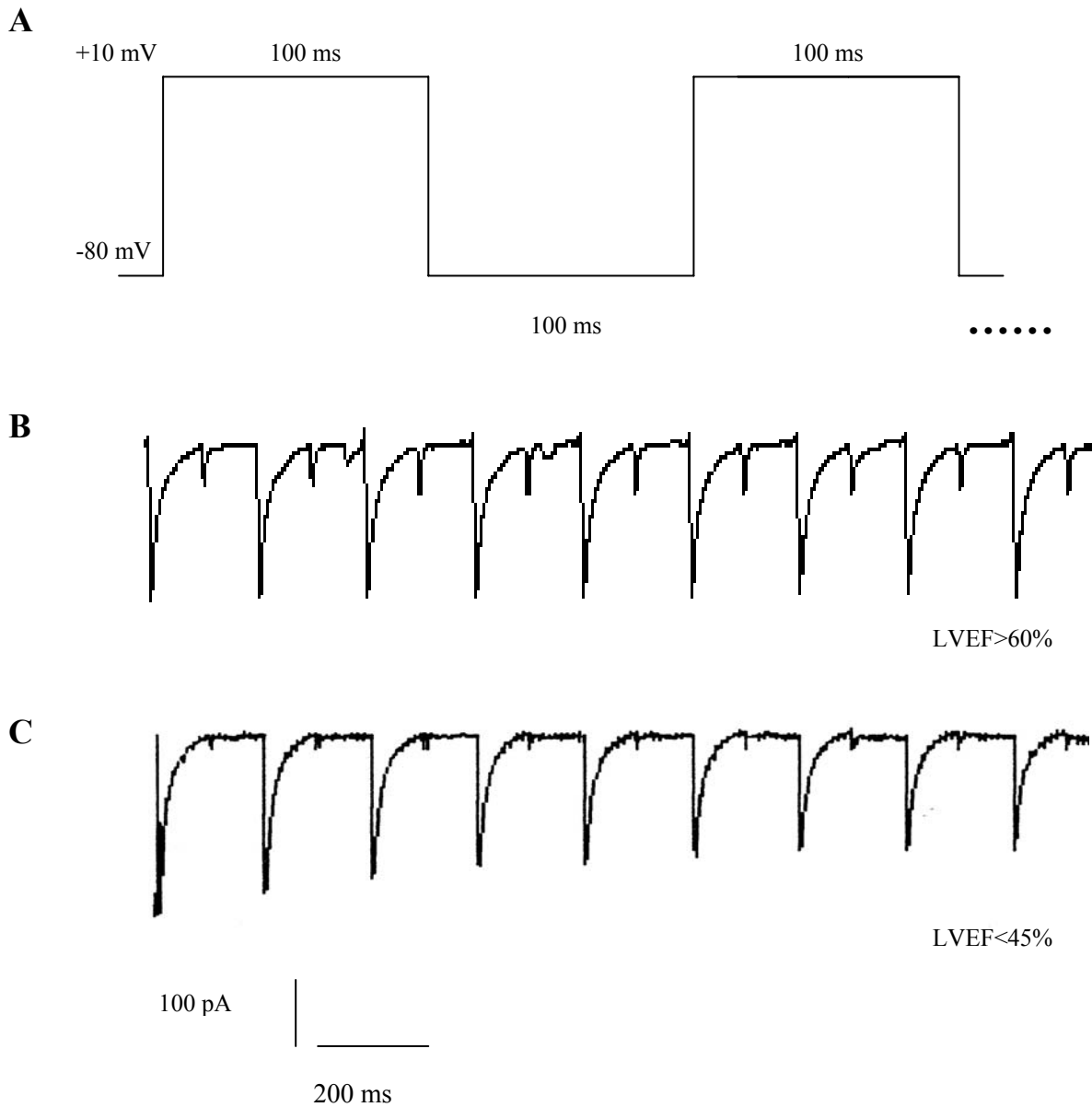
**Abb. 10:** Pulsbeispiel zur Bestimmung des Calciumstroms bei 1 Hz

**A:** Die Zelle wurde ausgehend von  $-80$  mV auf  $+10$  mV geklemmt. Zwischen den 20 Testpulsen betrug die Pause 750ms.

**B:** Beispiel der übereinandergelegten Calciumströme der Testpulse Nr.1, 10 und 20 - bei den Spannungspulsen in 10A- einer Zelle des Patienten Nr. 4 (LVEF<45%), siehe Tabelle 1 und 2

Vom Ruhemembranpotential von  $-80$  mV wurde die Zelle für 250 ms auf  $+10$  mV depolarisiert. Dieser Puls wurde mit einer Frequenz von einem Hertz appliziert. Es wurden insgesamt 20 Pulse durchgeführt, was ausreichte, um einen steady-state des Calciumstroms zu erreichen (Abb. 10).

**b) Calciumstrom bei 5 Hz**



**Abb. 11:** Pulsbeispiel zur Bestimmung des Calciumstroms bei 5 Hz

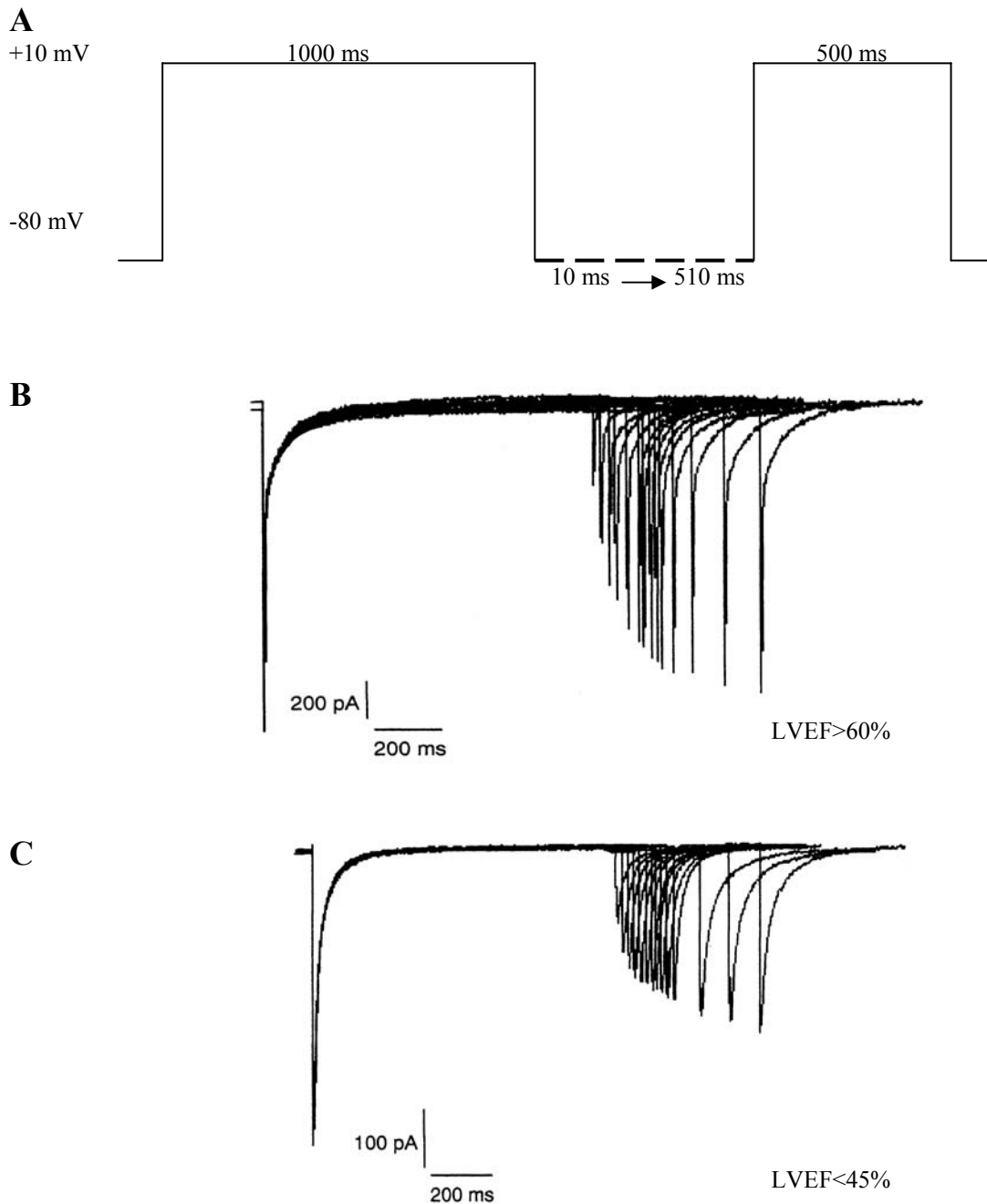
**A:** Die Zelle wurde vom Ruhemembranpotential von  $-80$  mV auf  $+10$  mV geklemmt und danach wieder auf  $-80$  mV repolarisiert. Dies wurde innerhalb eines Pulsprotokolls 8x wiederholt.

**B:** Beispiel für die neunmalige Auslösung eines Calciumstroms nach obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 8 mit LVEF  $> 60$  %.

**C:** Beispiel für die neunmalige Auslösung eines Calciumstroms nach obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 2 mit LVEF  $< 45$  %.

Vergleichbar mit dem Pulsprotokoll von 1 Hz wird von  $-80$  mV auf  $+10$  mV über einen Zeitraum von 100 ms depolarisiert. Danach wurde für 100 ms wieder auf  $-80$  mV repolarisiert. Dieses wurde innerhalb eines Pulsprotokolls 8x wiederholt (Abb. 11).

### 2.7.3 Die Erholung des Calciumstroms von der Inaktivierung



**Abb. 12:** Pulsbeispiel zur Bestimmung der Erholung des Calciumstroms von der Inaktivierung

**A:** Nach Depolarisation der Zelle auf +10 mV (Präpuls) wurde in einer variablen Zeitspanne die Zelle wieder auf -80 mV repolarisiert, um wieder auf +10 mV geklemmt zu werden

**B:** Beispiel für die Überlagerung von Calciumströmen bei obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 6 mit LVEF > 60%

**C:** Beispiel für die Überlagerung von Calciumströmen bei obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 4 mit LVEF < 45%

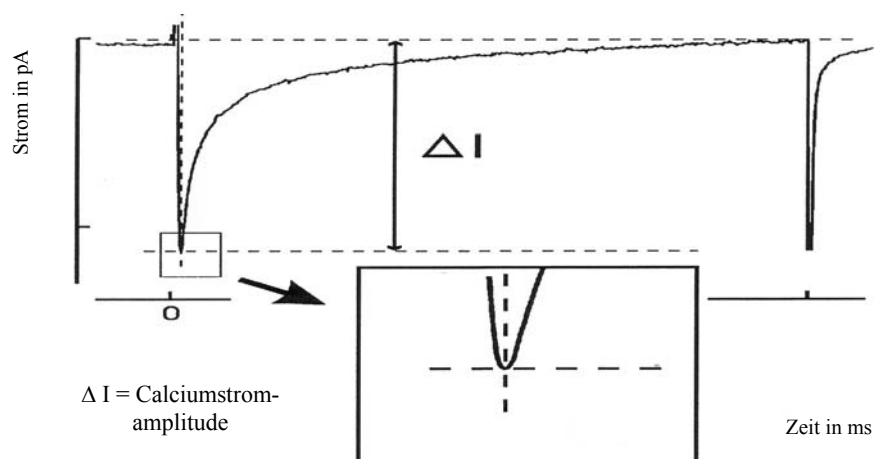
Nach der Depolarisation der Zelle von  $-80$  mV auf  $+10$  mV für  $1000$  ms wurde in einer variablen Zeitspanne von  $10$  ms bis  $510$  ms die Zelle wieder auf  $-80$  mV repolarisiert, um danach wieder für  $500$  ms auf  $+10$  mV depolarisiert zu werden. Das Ziel dieses Messprotokolls war es, die Erholung des Calciumstroms nach Inaktivierung durch die vorhergehende Depolarisation zu messen und die Stromgröße des ersten Calciumstroms (erste Depolarisation) mit der des zweiten Stroms (zweite Depolarisation) zu vergleichen. Die Zeitabstände zwischen den Depolarisationsphasen wurden zuerst in Schritten von  $20$  ms, ausgehend von  $10$  ms, pro Puls verlängert und ab einer Pause von  $210$  ms um  $100$  ms je Puls verlängert. Dieses Doppelpulsprotokoll wurde alle  $10$ s wiederholt (Abb. 12).

Je länger das Zeitintervall zwischen den beiden Pulsen, umso mehr hatte sich der Calciumstrom während des zweiten Pulses erholt. Bei schrittweiser Verlängerung des Zeitintervalls kam es zu einem langsamen Anstieg der Calciumstromamplitude mit zwei Zeitkonstanten, worauf in der Datenanalyse nochmals näher eingegangen wird.

## 2.8 Datenanalyse

Die Messung der Calciumstromamplitude erfolgte mit dem Heka-Puls Software Programm.

Sie wurde, wie an Hand des in Abb. 13 angegebenen Beispiels dargestellt, folgendermaßen ausgemessen:



**Abb. 13:** Graphische Calciumstromauswertung mit der HEKA-Software

Die elektrische Zellkapazität verhält sich direkt proportional zur Zelloberfläche und korreliert daher mit der Zellgröße. Um die Variabilität der Stromamplituden hinsichtlich der Zellgröße



zu kompensieren, wurden die Amplituden in Stromdichten umgerechnet, die man erhält, indem der absolute Strom durch die Zellkapazität geteilt wird [Einheit: pA/pF].

Der spannungsabhängige Calciumstrom während eines rechteckigen, depolarisierenden Testpulses inaktiviert in Form einer zeitabhängigen, biexponentiellen Funktion, die mit Hilfe der Heka-Software Puls fit approximiert wurde. Die Berechnung geschah nach folgender Gleichung:

$$I(t) = I_{\text{off}} + I_{\text{fast}} * e^{-t/\tau_{\text{fast}}} + I_{\text{slow}} * e^{-t/\tau_{\text{slow}}}$$

t = Zeit,  $I_{\text{off}}$  = nicht inaktivierender Strom,  $\tau_{\text{fast}}$  u.  $\tau_{\text{slow}}$  sind die exponentiellen Zeitkonstanten der korrespondierenden, schnell und langsam absinkenden Calciumstromanteile  $I_{\text{fast}}$  und  $I_{\text{slow}}$ .

Beim Messprotokoll 1 Hz wurden jeweils der 9. und 10. Puls und der 19. und 20. Puls gemessen und durch den ersten Puls dividiert:

$$\frac{\text{n-ter Testpuls}}{\text{1. Testpuls}} \times 100 \% = I(n)$$

Dadurch errechnet sich das prozentuale Verhältnis zum ersten Puls. Das gleiche Prinzip zur Erfassung der erforderlichen Daten für die statistische Auswertung wurde bei 5 Hz durchgeführt, wobei jedoch der 8. und 9. Puls verwendet wurden.

Für die Messprotokolle der spannungsabhängigen Inaktivierung und der spannungsabhängigen Aktivierung wurden die Daten der Patienten zuerst „normalisiert“, bevor sie gemittelt wurden. Unter Normalisierung versteht man den Vorgang, dass in einer Datenreihe der absolut größte Strom gleich 100% gesetzt wird. Die übrigen Werte werden im prozentualen Verhältnis zum größten Wert gesetzt.

Ähnlich wurde auch beim Messprotokoll der Erholung von der Inaktivierung vorgegangen. Der erste Calciumstrom eines Pulses wird mit dem zweiten, abhängig von der Zeitdauer der Repolarisation ausgelösten Calciumstrom in Verhältnis gesetzt und der prozentuale Zahlenwert des ersten zum zweiten Strom berechnet.

## 2.9 Statistik

Für die Beurteilung auf statistische Signifikanz der Unterschiede der Calciumströme zwischen den Patientengruppen wurden die Messungen an allen Zellen eines Patienten gemittelt. Um die individuellen Schwankungen bei der Messung eines Kardiomyozyten auszugleichen, mussten mindestens 2 Zellen eines Herzohres zur Beurteilung herangezogen werden (in der vorliegenden Studie wurden 2-6 Zellen gemessen). Jede vierte Isolation von atrialen Kardiomyozyten brachte nicht genug vitale Zellen hervor, um eine Auswertung oder Messung durchführen zu können.

Bei allen Werten wurde der Mittelwert  $\pm$ SEM (Standardfehler) angegeben:

### SEM (Standardfehler)

Der Standardfehler (SEM) wurde bei einer Versuchsanzahl von  $n > 3$  zusätzlich zum Mittelwert angegeben und wurde durch folgende Formel ermittelt:  $SEM = STD / \sqrt{n}$ .

Wobei STD für die Standardabweichung steht.

### t-Test

Um zu klären, ob zwischen verschiedenen Ergebnissen ein statistisch signifikanter Unterschied besteht, wurde der t-Test nach „Student“ angewandt, wenn die Werte den Test für eine Normalverteilung erfüllen. Ansonsten wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon verwendet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angesetzt.

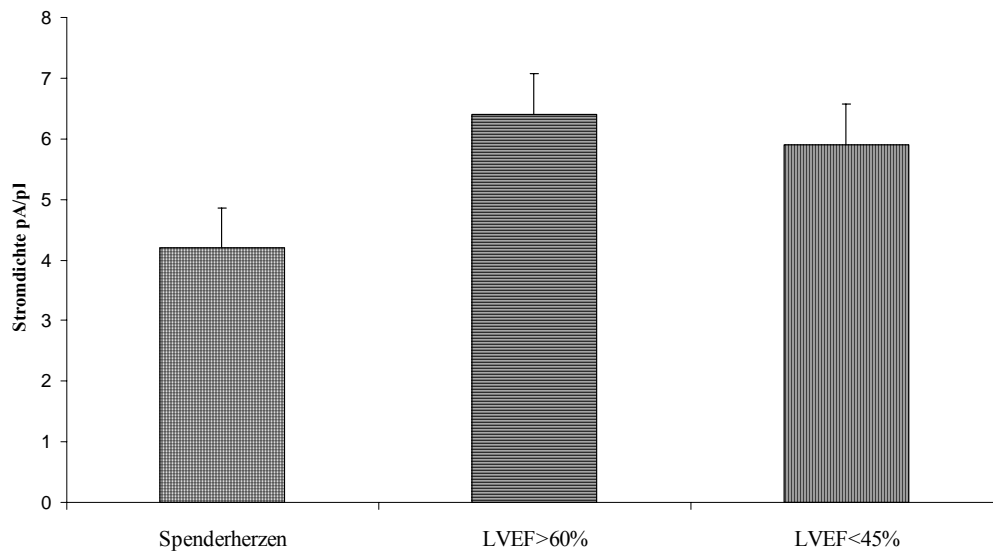
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Calciumstromgrößen

Die absolute Größe der Calciumströme war in den beiden Patientengruppen LVEF>60% und LVEF<45% nicht unterschiedlich. Ebenso waren die Zellgrößen, wie sie sich indirekt aus der Zellkapazität ergaben, in den Patientengruppen mit und ohne Herzinsuffizienz vergleichbar groß (Tab. 4).

	Spenderherzen	LVEF>60%	LVEF<45%
Mittelwert $I_{Ca}$ max. in pA	534,25 ± 105,4	550,9 ± 59,6	589,8 ± 65,6
Zellkapazität in pF	127 ± 17,7	86 ± 9,3	100,1 ± 13,8
Patienten	3	10	10
Zellen	6	30	32

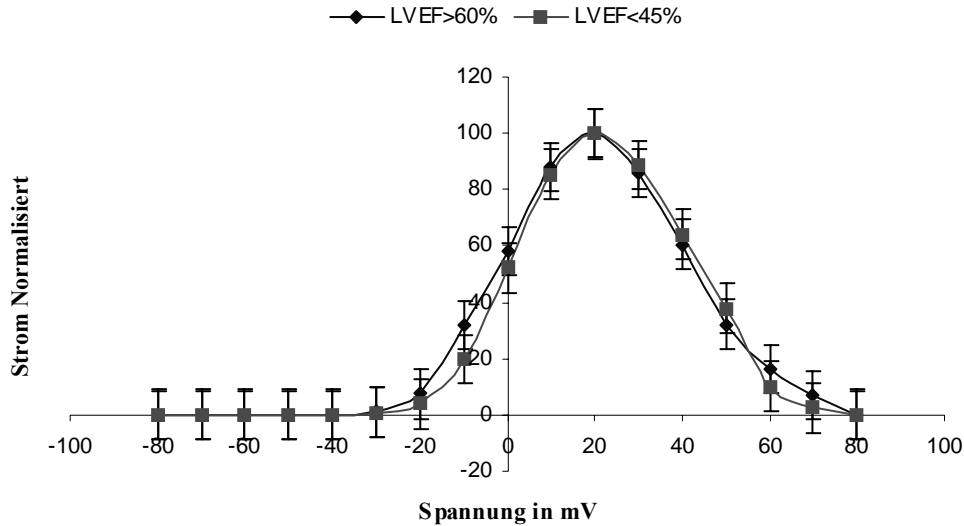
**Tab. 4:** Vergleich der gemittelten maximalen Calciumströme und der durchschnittlichen Zellkapazität der Gruppen LVEF>60%, <45% und der Spenderherzen.  $I_{Ca}$  max. : Maximaler, absoluter Calciumeinwärtsstrom im Zeitverlauf bestimmt bei depolarisierenden Pulsen nach +20 mV bei der Untersuchung der spannungsabhängigen Aktivierung.



**Abb. 14:** Graphischer Vergleich der gemittelten maximalen Calciumstromdichten ± SEM der Gruppen LVEF>60%, <45% und der Spenderherzen

Die mittleren Calciumstromdichten betragen 4,2 pA/pF bei den Spenderherzen, 6,4 pA/pF bei LVEF>60% und 5,9 pA/pF bei LVEF<45% (Abb. 14). Damit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen mit und ohne Herzinsuffizienz und den Spenderherzen.

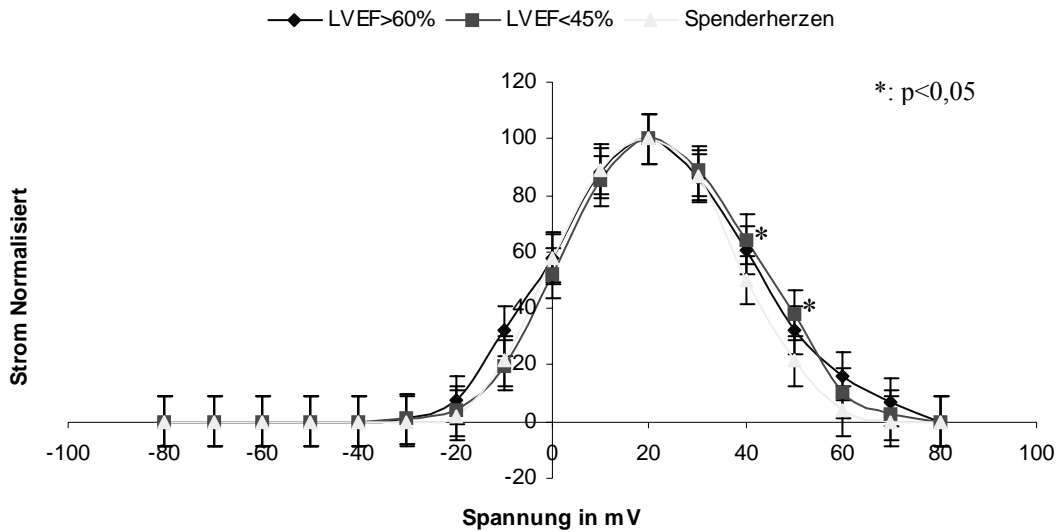
### 3.2 Spannungsabhängigkeit



**Abb. 15:** Vergleich der Strom-Spannungsbeziehung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF > 60% und LVEF < 45% in Abhängigkeit der Testpulse mit schrittweiser Erhöhung von  $-80$  bis  $+80$  mV, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-80$  mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 8)

Für die Auswertung waren aus der Gruppe LVEF > 60% 32 Zellen verwertbar, aus der Gruppe LVEF < 45% 30 Zellen und aus der Spendergruppe 6 Zellen.

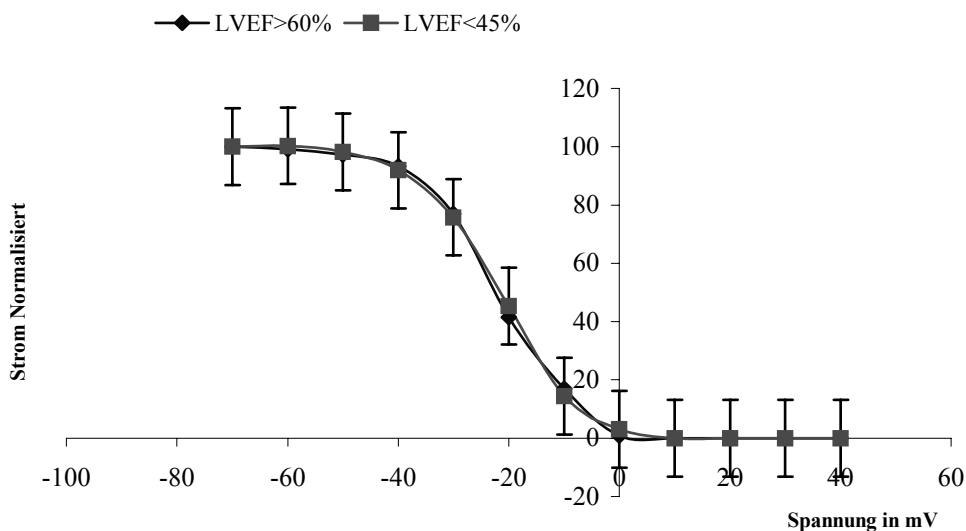
Die Messdaten der beiden ersten Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit (Abb. 15). Die ersten Anzeichen eines Calciumstromes ergaben sich bei  $-20$  mV. In der Tendenz aktivierte der Calciumstrom bei den herzinsuffizienten Patienten spannungsabhängig etwas verzögert im Vergleich zu der Gruppe der Patienten mit LVEF > 60%. Das Maximum der Calciumströme lag jeweils bei  $+20$  mV, wobei die Herzsuffizienten eine größere Bandbreite hinsichtlich dieses Kriteriums zeigten. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen wurden die Zahlen der Patientengruppen bei  $+20$  mV auf 100 normalisiert. Die sich ergebende Kurve zeigte annäherungsweise die Form der Gauß'schen Glockenkurve.



**Abb. 16:** Vergleich der Strom-Spannungsbeziehung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60%, LVEF<45% und der Spenderherzen in Abhängigkeit des Testpulses mit schrittweiser Erhöhung von  $-80$  bis  $+80$  mV, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-80$  mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 8)

Im Vergleich mit der Gruppe der Herzspender ergaben sich kleine Unterschiede gegenüber der LVEF<45% und der LVEF>60% Gruppe. Aufgrund der geringen Zellzahl ( $n=6$ ) in der Herzspendergruppe, sind die Ergebnisse des statistischen Tests nicht aussagekräftig.

### 3.3 Inaktivierung

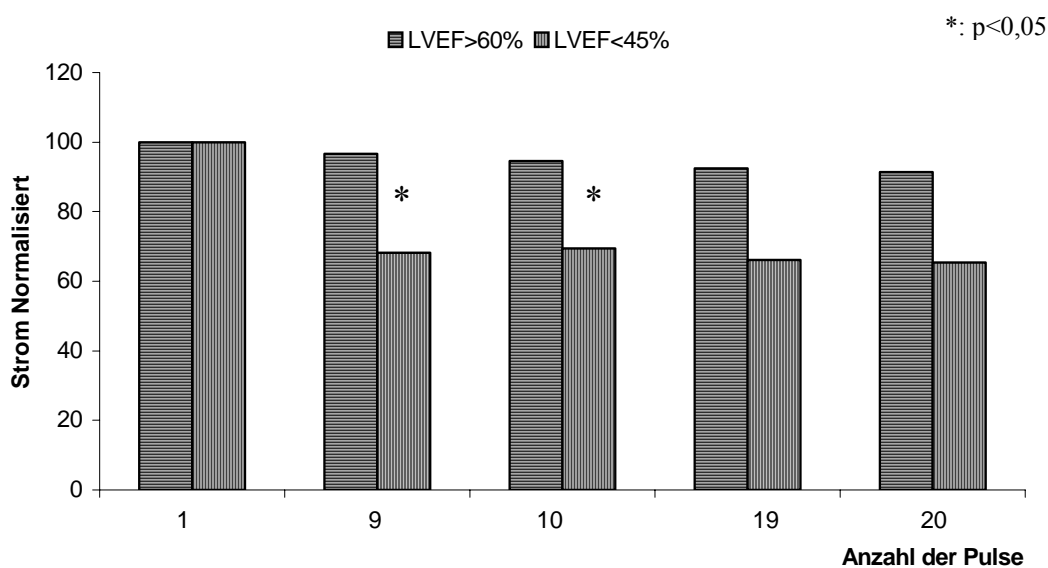


**Abb. 17:** Vergleich der spannungsabhängigen Inaktivierung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit des Präpulses von  $-70$  mV bis  $+40$  mV mit nachfolgender Depolarisation auf  $+10$  (Pulsprotokoll siehe Abb. 9).

Auch die spannungsabhängige Inaktivierung zeigte zwei fast deckungsgleiche Kurven der beiden Patientengruppen, welche einen S-förmigen Verlauf aufwiesen. Eine Auslösung des Calciumstromes bei einem Präpulspotential bis  $-40$  mV war fast ohne eine Abschwächung des auslösbaren Calciumstromes möglich.

Ab einem Präpulspotential von  $0$  mV ergaben sich durch die nachfolgende Depolarisation keine Calciumströme mehr.

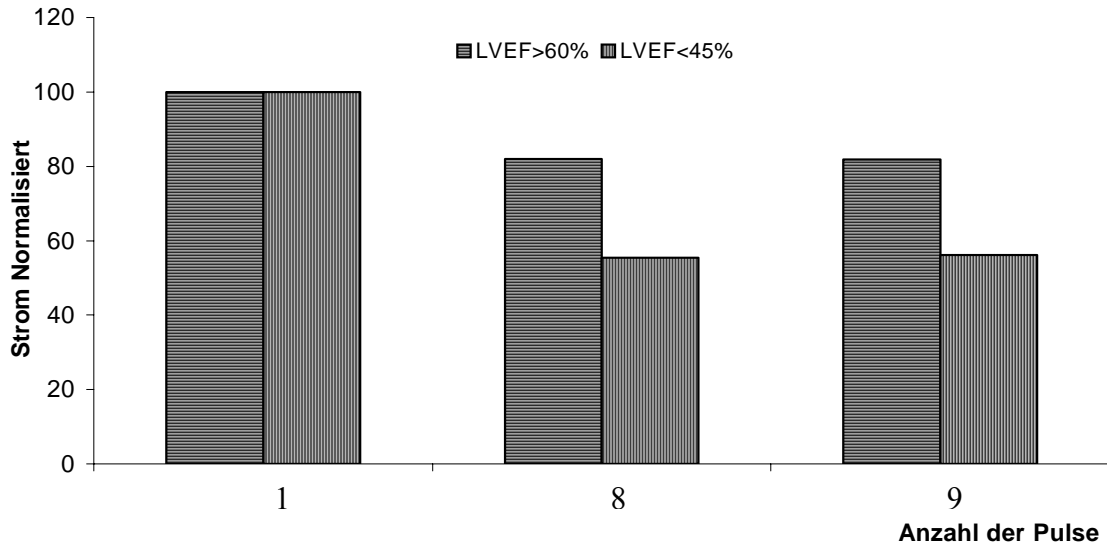
### 3.4 Frequenzabhängige Ströme bei 1 Hz



**Abb. 18:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF > 60% und LVEF < 45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 1 Hz nach 1, 9, 10, 19 und 20 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von  $-80$  mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 10)

Bei Stimulation mit 1 Hz zeigte sich ein signifikanter Unterschied der relativen frequenzabhängigen Stromabnahme zwischen den beiden Gruppen mit und ohne Herzinsuffizienz. Während in der LVEF > 60%-Gruppe der Calciumeinwärtsstrom nach 20 Pulsen auf ca. 91 % des Ausgangswertes absank, lag er bei der LVEF < 45%-Gruppe nur noch bei 65% (Abb. 18). Bereits bei Puls 9 und 10 ( $p=0,029$  bzw.  $p=0,047$ ) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden (Abb. 18).

### 3.5 Frequenzabhängige Ströme bei 5 Hz



**Abb. 19:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 5 Hz nach 1, 8 und 9 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -80 mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 11)

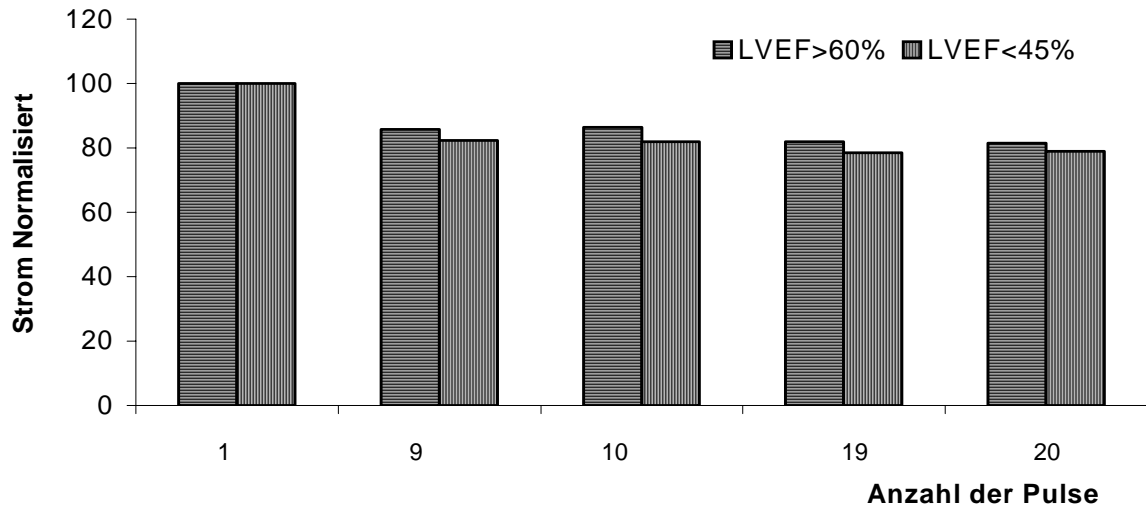
Die Messungen bei 5 Hz zeigten eine ähnliche Charakteristik wie die Messungen bei 1 Hz.

Auch hier nahm in der Gruppe der Herzinsuffizienten (LVEF<45%) der Calciumstrom signifikant stärker ab, als in der Vergleichsgruppe (bei LVEF>60%).

Nach neun Pulsen betrug der Calciumstrom bei LVEF>60% etwa 82% des Ausgangswertes, verglichen mit 56% bei LVEF<45% (Abb. 19). Es ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz der Werte.

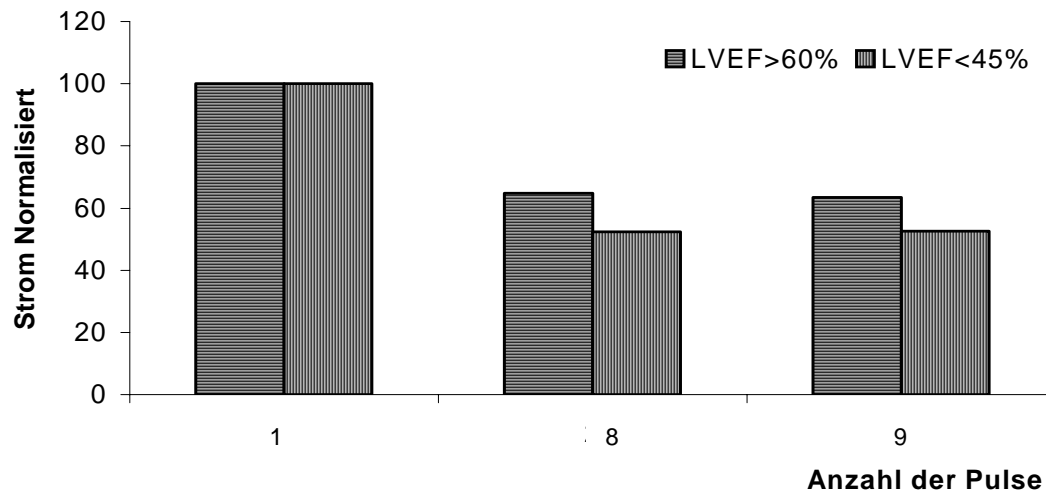
### 3.6 Frequenzstimulation bei erniedrigtem Ruhemembranpotential (-60mV)

#### a) Stimulation mit 1 Hz



**Abb. 20:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 1 Hz nach 1, 9, 10, 19 und 20 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -60 mV(Pulsprotokoll siehe Abb. 10)

#### b) Stimulation mit 5 Hz

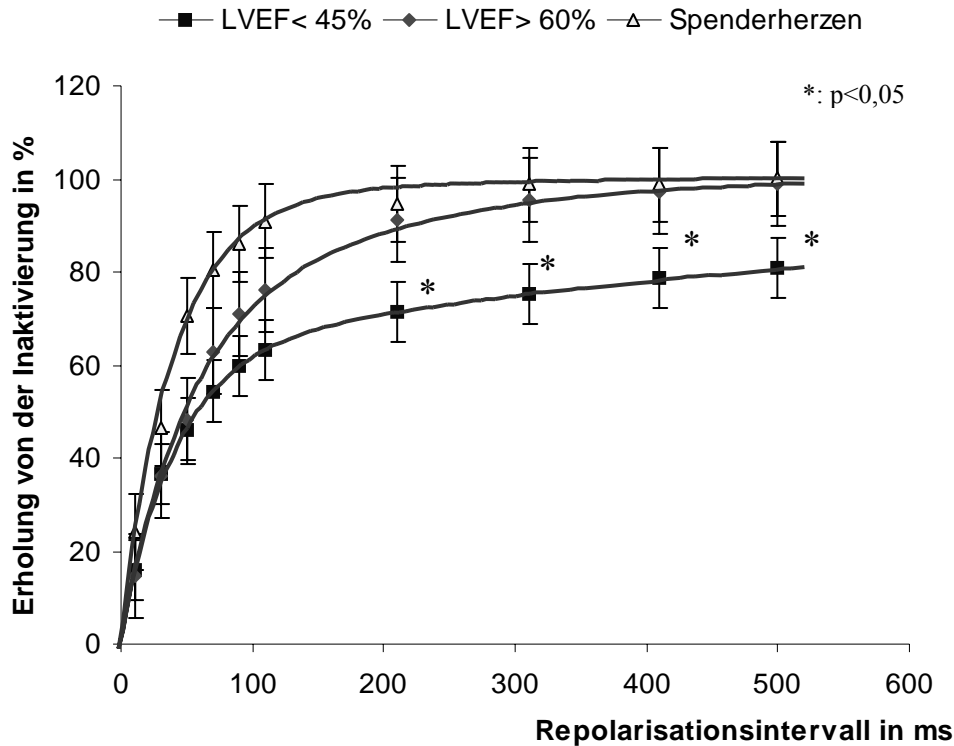


**Abb. 21:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 5 Hz nach 1, 8 und 9 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -60 mV(Pulsprotokoll siehe Abb. 11)

Bei einem Ruhemembranpotential von -60 mV ergaben sich bei Stimulation mit 1 Hz und 5 Hz keine signifikanten statistischen Unterschiede der Calciumströme. (Abb. 20 u. 21).



### 3.7 Erholung von der Inaktivierung („Recovery“)



**Abb. 22:** Vergleich der Erholung von der Inaktivierung der normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60%, LVEF<45% und der Spenderherzen in Abhängigkeit vom Repolarisationsintervall (10–510ms) in Bezug auf den Calciumstrom des Präpuls (Pulsprotokoll siehe Abb. 12)

Bei dieser Messung ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen LVEF>60% und LVEF<45% ab 200 ms Erholungszeit von der Inaktivierung durch den Präpuls. Zu diesem Zeitpunkt war eine Erholung von der Inaktivierung bei den Patienten mit LVEF>60% im Durchschnitt zu 88,0% versus 72,3% bei LVEF<45% erreicht. Diese signifikante Differenz zwischen den beiden Patientengruppen blieb auch bei einer Erholungszeitspanne von 500ms erhalten: 98,8% (LVEF>60%) versus 80,8% (LVEF<45%).

Die Schere zwischen der herzgesunden Spendergruppe und der Gruppe der Nicht-Herzinsuffizienten schien sich bei 500 ms nach Inaktivierung zu schließen: 101,9% versus 98,8% , d.h. der Calciumstrom der Spendergruppe hatte sich nach 500ms nicht nur vollständig erholt, sondern war sogar größer als der erste Calciumstrom.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Erholung von der Inaktivierung bei den Herzinsuffizienten langsamer als in der Gruppe ohne eingeschränkte Pumpleistung des Herzens erfolgte. Die Spendergruppe zeigte eine noch rapidere Erholung als beide Patientengruppen.

Die exponentiellen Kurven der Erholung von der Inaktivierung bestanden aus zwei Komponenten. Einer schnellen Phase der Erholung von der Inaktivierung, welche durch eine schnelle exponentielle Zeitkonstante  $\tau_1$  charakterisiert wird und einer langsameren Phase mit der Zeitkonstante  $\tau_2$ . Durch folgende Gleichung konnte dann mit Hilfe des  $\tau$  die jeweiligen Exponentialfunktionen der untersuchten Patientengruppen bestimmt werden. Diese wurden durch das HEKA Software Programm Pulse-fit berechnet:

$$F(t) = 100 - A_1 \exp [(-1)t / \tau_1] - A_2 \exp [(-1)t / \tau_2]$$

$\tau_1$ : schnelle exponentielle Zeitkonstante       $A_1$ : Stromanteil der schnellen Erholung

$\tau_2$ : langsame exponentielle Zeitkonstante       $A_2$ : Stromanteil der langsamen Erholung

t: Zeit [ms]

Für die Gruppen ergaben sich folgende  $\tau$ - und A-Werte:

	LVEF>60%	LVEF<45%	Spender
$\tau_1$ in ms	46	41	39
$\tau_2$ in ms	158	770	210
$A_1$	62	63	95
$A_2$	38	37	5

**Tab. 5:** Vergleich der Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und der Stromanteile  $A_1$  und  $A_2$  für die Erholung von der Inaktivierung

Die schnelle Phase  $\tau_1$  war bei allen Gruppen annähernd gleich. Anders war es bei der langsamen Phase  $\tau_2$ . Hier lagen zunächst die Gruppe der LVEF>60% und die Spendergruppe mit 158ms versus 210ms dicht beieinander, aber gegenüber einem  $\tau_2$  von 770ms der LVEF<45%-Fraktion ergab sich ein signifikanter Unterschied, welcher den wesentlichen Unterschied für die verlängerte Erholungszeit dieser Gruppe deutlich macht.

$A_1$  und  $A_2$  sind ein Maß für die prozentuale Erholung des Calciumstroms in Abhängigkeit von der jeweiligen Zeitkonstante.

## 4. Diskussion

Unsere Studie verglich den spannungsabhängigen, transmembranären Calciumeinwärtsstrom in atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit und ohne eingeschränkte LVEF. Die Calciumströme waren in ihrer Größe nicht verändert. Dagegen fanden sich signifikante Unterschiede in der Kinetik der Calciumströme, was sich in einer verminderten frequenzabhängigen Verfügbarkeit der Calciumströme in der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten äußerte. Die verminderte frequenzabhängige Verfügbarkeit der Calciumkanäle wurde einerseits in der reduzierten Stromgröße bei Frequenzstimulation (3.6) deutlich und andererseits auch in der verzögerten Erholung von der Inaktivierung (3.7).

### 4.1 Vergleich mit bisherigen Studien an humanen atrialen Kardiomyozyten

Studien der Elektrophysiologie des Calciumstromes in humanen atrialen Kardiomyozyten bei verschiedenen Herzerkrankungen, wie Herzinsuffizienz, wurden schon von verschiedenen Autoren durchgeführt<sup>28, 32</sup> und auch in Experimenten an Säugetierzellen<sup>29, 30</sup> untersucht.

Bei den oben erwähnten Messungen an humanen atrialen Kardiomyozyten wurden Präparate von dilatierten Vorhöfen verwendet. In beiden Fällen wurde eine signifikante Verminderung der Calciumstromdichte festgestellt. Auch andere Ionenströme, wie das  $I_{to}$  und das  $I_{kl}$  waren verändert, so dass der Verdacht von beiden Autoren geäußert wurde, dass Herzerkrankungen, die mit Dilatation der Vorhöfe verbunden sind, zu einer veränderten zellulären Elektrophysiologie führen.

Diese Aussagen sind aber durch heterogene Patientengruppen bezüglich Vorerkrankungen, Auftreten von Vorhofflimmern, unterschiedlicher Herzerkrankungen, welche zu einer rechtsatrialen Dilatation geführt haben und bezüglich chronischer Medikation, wie Calciumantagonisten, limitiert. In unseren Untersuchungen wurden dagegen nur Patienten ohne AV-Klappenitien und ohne Vorhofflimmern eingeschlossen, was zu einer relativ einheitlichen Patientengruppen führte.

Die Forschungsgruppe von Li et al.<sup>30</sup> konnte bei einer experimentell induzierten Herzinsuffizienz bei Hunden keine veränderte Kinetik des Calciumstromes finden, sie maßen aber eine deutlich reduzierte Calciumstromdichte (um ca. 30%). Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass das sich bei Herzinsuffizienz ergebende atriale remodeling nicht mit den

Vorgängen bei Vorhofflimmern vergleichbar war, da die Aktionspotentialdauer (APD) bei niedrigen Frequenzen unverändert und bei hohen Frequenzen verlängert war.

In unseren Ergebnissen wurde aber im Gegensatz zu den oben genannten Studien eine frequenzabhängig veränderte Calciumstromkinetik und eine unveränderte Calciumstromdichte in der Gruppe der Patienten mit eingeschränkter Herzleistung im Vergleich zu den Referenzgruppen gemessen. Zudem wurde bei vorherigen Messungen von Schreieck et al.<sup>37</sup> eine verstärkte frequenzabhängige Verkürzung der APD in humanen Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienten gemessen, was den Ansatzpunkt dieser Dissertation bildete. Die Unterschiede zu den Tierexperimenten mögen zum einen in Speziesunterschieden begründet liegen, andererseits in der Schwere der Herzinsuffizienz, die bei den Tiermodellen größer als bei unseren Patienten einzuschätzen ist.

Die APD-Verkürzung bei Vorhofflimmern beruhte nach mehreren Studien<sup>4, 38, 42, 47</sup> auf einer deutlichen Verminderung der Stromdichte von  $I_{Ca}$ , (je nach Studie zwischen 60-75%). Wenn ein dem atrialen remodeling bei Vorhofflimmern vergleichbarer Prozess auch in der atrialen Elektrophysiologie bei Herzinsuffizienz zu finden wäre, sollte dort auch eine Alteration der Calciumstromdichte zu messen sein. Aber bei der Studie von Skasa et al.<sup>38</sup> wurde deutlich, dass eine Verminderung der Stromdichte von  $I_{Ca,L}$  nur bei persistierendem, nicht aber bei paroxysmalem Vorhofflimmern festgestellt wurde. Das heißt, ein verminderter Calciumstrom ist nicht die Vorstufe, sondern die Folge von persistierendem Vorhofflimmern.

## **4.2 Mögliche Erklärungen für die Veränderungen des Calciumstroms**

Der Anstieg des linksventrikulären Füllungsdruckes bei herzinsuffizienten Patienten hat indirekt auch den Anstieg des rechtsatrialen Druckes, des ZVD (zentralvenöser Druck) im rechten Vorhof zur Folge. Veränderte neurohumorale Bedingungen, wie die Erhöhung von Noradrenalin, Angiotensin und des ADH-Spiegels im Blut, könnten auch direkt auf den Vorhof wirken. Darüber hinaus führt die Herzinsuffizienz zu einem Anstieg der Herzfrequenz als Kompensationsmechanismus. Der Vergleich der Ruheherzfrequenz und des ZVD der beiden Patientengruppen unserer Studie macht deutlich, dass beide Parameter erwartungsgemäß bei LVEF<45% erhöht sind.

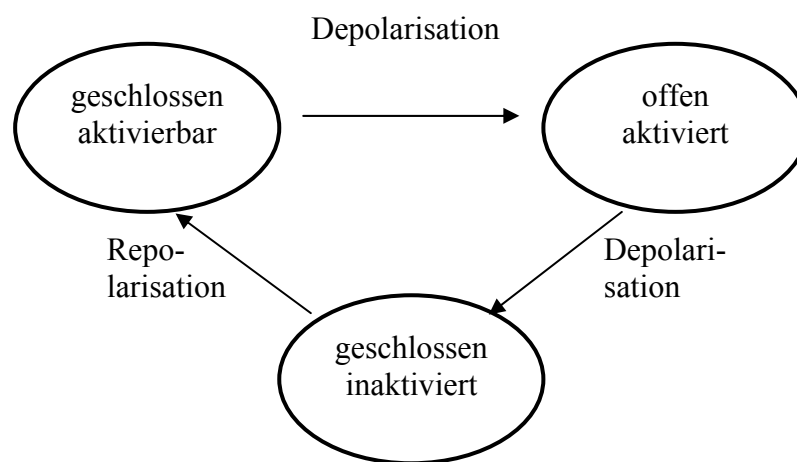
Es ist davon auszugehen, dass die veränderte Calciumstromkinetik - vergleichbar mit der verminderten Calciumstromdichte bei den atrialen remodeling Vorgängen bei Vorhofflimmern - mit der alterierten Expression der Calciumkanaluntereinheiten zusammen-

hängt, wobei bei veränderten kinetischen Eigenschaften insbesondere der transkriptionellen Verminderung der  $\beta$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle zukommen könnte. Diese hat einen modulatorischen Effekt auf die Amplitude des Calciumstroms in Kardiomyozyten<sup>43</sup>.

Eine Verminderung der Expression der  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (siehe Abb. 4) könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Calciumstromdichte haben<sup>6, 40</sup>, die in unserer Forschungsarbeit aber im Vergleich zwischen den Patientengruppen unverändert ist. Andere Studien ergaben allerdings keinen Unterschied der Proteinexpression dieser Untereinheit beim Vergleich zwischen Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern<sup>35</sup>. Zudem ist eine verminderte mRNA-Expression der  $\alpha_{2\delta}$ -Untereinheit und der  $\beta_b/\beta_c$ -Untereinheit bei Vorhofflimmern von Grammer et al.,<sup>19</sup> 2001 beschrieben worden.

Diese oben genannten Veränderungen könnten zu einer veränderten Calciumkanalöffnungswahrscheinlichkeit führen, was wiederum ein alteriertes kinetisches Verhalten der Calciumkanäle zur Folge haben könnte.

Die Calciumkanalöffnungswahrscheinlichkeit soll hier anhand eines vereinfachten Schemas der Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen erklärt werden:



**Abb. 23:** Vereinfachtes Schema der Aktivierung und Inaktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Kanalkinetik)<sup>43</sup>

Der Calcium-Kanal wechselt in mindestens 3 verschiedene Kanalzustände: offen aktiviert, geschlossen inaktiviert und geschlossen aktivierbar. Man rechnet damit, dass es ca. 3 geschlossen aktivierte und 4 geschlossen inaktivierte Kanalformen gibt.<sup>22</sup>

Der Wechsel erfolgt nach einer gewissen stochastischen Wahrscheinlichkeit, je nachdem durch welche Umstände der untersuchte Kanal aktiviert werden kann (Ausgangspotential, Größe der Spannungsänderung).

Bei Depolarisation eines atrialen Kardiomyozyten werden während des Einsetzens des Calcium-Stromes in der Plateau-Phase nicht alle Kanäle gleichzeitig offen aktiviert. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Offenzustandes des Calcium-Kanals. Addiert man Einzelströme der Calciumkanäle der Zelle in ihren unterschiedlich kurzen offenen Zuständen, so erhält man den typischen Stromkurvenverlauf als Summationsstrom.<sup>9</sup>

Nach der Phase der Aktivierung erfolgt zeitabhängig die Inaktivierung zuerst in den Zustand „geschlossen inaktiviert“, danach in den Zustand „geschlossen aktivierbar“. Der letzte Schritt wird auch als die Erholung von der Inaktivierung bezeichnet. Die frequenzabhängig bedingten kinetischen Unterschiede des Calciumstroms bei unseren untersuchten Gruppen könnten ihre Ursache in einer veränderten Anzahl von Calciumkanälen im „geschlossen aktivierbaren“ Zustand haben.

### **4.3 Klinische Bedeutung der Calciumstromalteration**

Wie bereits erwähnt, könnten die Veränderungen des Calciumeinwärtsstroms der LVEF<45% Gruppe zu einer Verkürzung der Plateauphase und damit der Aktionspotentialdauer bei höheren Frequenzen führen. Diese Beschleunigung der Repolarisation führt zu einer Verkürzung der Refraktärzeit, was wiederum die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Reentrytachykardien, als auch Vorhofflimmern erhöht.

Andererseits führt diese elektrophysiologische Veränderung zu einer verminderten Calciumüberladung der Zelle und stellt damit einen Schutz vor getriggelter Aktivität durch Nachdepolarisation des Kardiomyozyten dar.

Inwieweit die veränderte Kinetik des  $I_{Ca}$  tatsächlich zur Aktionspotentialverkürzung führt, ist noch zu untersuchen, da der  $I_{to1}$  und andere Kanäle, wie  $I_{K1}$  und  $I_{K(ACh)}$  auch eine Rolle für die veränderte Repolarisation in der Herzinsuffizienz spielen. Es besteht nach Yue et al.<sup>49</sup> ein Zusammenhang zwischen der Calciumstromdichte und dem  $I_{to1}$  in atrialen Kardiomyozyten von Hunden. Inwieweit dieser Zusammenhang auf den Menschen übertragbar ist, ist noch nicht geklärt.

Ein Ansatzpunkt für neuartige Medikamente wäre eine Modulation der Proteinbiosynthese der Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals mit dem Ziel der möglichen Normalisierung der Aktionspotentialdauer in atrialen Kardiomyozyten bei herzinsuffizienten Patienten.

Als weitere Möglichkeit sollte eine Optimierung der Basistherapie bei Herzinsuffizienz angestrebt werden, um die Remodelingvorgänge zu verhindern. Insbesondere könnte hier die systemische  $\beta$ -Blockertherapie eine erhöhte Ausschüttung von neurohumoralen Faktoren vermindern und einem kompensatorischen Anstieg der Herzfrequenz und des atrialen Füllungsdruckes entgegenwirken. Entsprechend ist eine  $\beta$ -Blockertherapie in der Lage, die Rezidivhäufigkeit von Vorhofflimmern nach Kardioversion zu reduzieren.<sup>26</sup>

#### **4.4 Limitationen der Untersuchung**

Die Aktionspotential- und  $I_{Ca}$ -Veränderungen bei herzinsuffizienten Patienten wurden aufgrund operationstechnischer Gegebenheiten nur an Zellen des rechtsatrialen Herzohres gemessen. Es ist bekannt, dass die Dichte von Calciumkanälen innerhalb des rechten Vorhofs schwankt, wie es in Untersuchungen an Kaninchen<sup>48</sup> und Hunden<sup>16</sup> festgestellt wurde. Durch weitere Studien konnte aber bewiesen werden, dass das rechte Herzohr in generalisierten elektrophysiologischen Veränderungen des Vorhofes, wie bei den „remodeling“-Vorgängen durch Vorhoftachykardie und Vorhofflimmern mit involviert ist.<sup>15, 42</sup>

Die Isolierungsmethode kann auch Einfluß auf die Verfügbarkeit der Calciumkanäle und damit auf die Calciumstromdichte haben, insbesondere bei  $I_K$ .<sup>49</sup> Für  $I_{Ca}$  ist bisher keine Studie zu dieser Thematik bekannt.

Wir versuchten die Patienten der jeweiligen Gruppen nach ähnlichen Kriterien auszuwählen, so dass weitgehend homogene Gruppen hinsichtlich Alter, Geschlecht und Grunderkrankung entstanden. Ungleichheiten in Betracht auf die Medikation und Begleiterkrankung konnten aufgrund der Einteilung in Patienten mit Herzinsuffizienz und Patienten ohne Einschränkung der Herzleistung nicht vermieden werden (siehe Tabelle 1 und 2). Die Behandlung mit  $\beta$ -Blockern betrug bei normaler LVEF 50% versus 82% bei LVEF<45% und bei ACE - Hemmern 20% versus 64%. Der dauerhafte Einsatz dieser Medikamente könnte vielleicht eine Auswirkung auf den Calciumstrom haben.

Mögliche Veränderungen des Calciumstromes können durch die Lagerung, den Transport und durch die Isolation des Herzwebes verursacht worden sein. Durch die Verwendung von calciumfreier Lösung kommt es zwar einerseits nicht zu einer Kontraktur der Zellen, andererseits führt dies jedoch zu einer Störung der Calciumhomöostase, da daraus eine Entleerung der Calciumspeicher im sarkoplasmatischen Retikulum resultiert.

Die Regulation der intrazellulären Calciumionen-Konzentration erfolgt neben den Calciumkanälen über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe und das sarkoplasmatische Retikulum. Diese sind notwendig, um die intrazelluläre Calciumkonzentration in der Herzvorhofzelle während der Ruhephase niedrig zu halten und sie während der Kontraktionsphase möglichst schnell ansteigen zu lassen. Die intrazelluläre Calciumkonzentration hat aber auch Einfluss auf die Kinetik des Calciumeinwärtsstroms durch die calciumabhängige Inaktivierung des  $I_{\text{Ca}}$ <sup>25,27</sup>.

Steigt der Calciumspiegel in der Zelle an, wird durch einen negativen Feed-Back-Mechanismus der maximale  $I_{\text{Ca}}$  vermindert. Dadurch wird einer möglichen irreparablen Schädigung der Zellen durch eine erhöhte Calciumkonzentration entgegengewirkt. Der Einfluß von Änderungen des intrazellulären Calciums wurde allerdings in unseren Experimenten durch den Einsatz eines intrazellulären Calciumpuffers, zugeführt über EGTA über die Patch-Pipette, abgefangen, oder zumindest erheblich gepuffert.

Um letztendlich zu zeigen, ob auch der Ausprägungsgrad einer Herzinsuffizienz mit den beobachteten Calciumkanalveränderungen korreliert, wäre die Untersuchung eines größeren Patientenpools angezeigt.



## 5. Schlussfolgerung

Die verminderte frequenzabhängige Verfügbarkeit des atrialen  $I_{Ca}$  bei herzinsuffizienten Patienten kann eine sich dadurch ergebende Verkürzung des Aktionspotentialplateaus und daraus resultierend der Aktionspotentialdauer in atrialen Kardiomyozyten miterklären.

Diese elektrophysiologischen Vorgänge geben eventuell Aufschluss über vorzeitige Veränderungen im Vorhof, welche über ein sogenanntes „atriales Remodeling“ das Auftreten von Vorhofflimmern erleichtern könnten. Hier wäre ein möglicher Ansatzpunkt zu finden, für die Erforschung neuer Medikamentengruppen, wie der Calciummodulatoren zur Verhinderung von Herzrhythmusstörungen.

Um eine klinische Übertragbarkeit dieser Ergebnisse zu überprüfen, wären Studien zur Messung der atrialen Refraktärzeit mittels monophasischer Aktionspotentiale bei Patienten sinnvoll.

Durch unsere Ergebnisse wird die Hypothese, dass Herzerkrankungen - insbesondere Herzinsuffizienz - Einfluß auf die zelluläre atriale Elektrophysiologie haben, bekräftigt und es ergeben sich Erklärungsmodelle, wie Vorhofflimmern beim herzinsuffizienten Patienten auftreten und aufrechterhalten werden könnten.

## 6. Zusammenfassung

Das elektrophysiologische Remodeling während Vorhofflimmern führt zu einer Verkürzung der Refraktärzeit und damit zu einer Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns. Um die Frage zu klären, ob auch Veränderungen in der atrialen Elektrophysiologie bei Patienten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Vorhofflimmern auftreten, wurden bei Patientengruppen im Sinusrhythmus mit oder ohne Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene der langsame Calciumeinwärtsstrom untersucht. Hierbei wurden rechtsatriale Herzohrpräparate von Patienten mit normaler linksventrikulärer (LVEF>60%, n=10) und eingeschränkter Auswurfraction (LVEF<45%, n=10) während einer aortocoronaren Bypass-Operation entnommen und zusätzlich mit gesunden atrialem Gewebe aus einer Herztransplantation verglichen. Der Calciumeinwärtsstrom wurde in den enzymatisch isolierten humanen atrialen Kardiomyozyten durch eine Ganzzelleableitung mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gemessen. Im Spannungsklemmmodus wurden durch depolarisierende Rechteckimpulse Calciumeinwärtsströme induziert und deren Erholungskinetik nach kompletter Inaktivierung sowie deren stimulationsfrequenzabhängige Größe untersucht. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede in der Kinetik der Calciumströme, was sich in einer verminderten frequenzabhängigen Verfügbarkeit der Calciumströme in der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten äußerte. Die dadurch sich ergebende Reduktion des Aktionspotentialplateaus könnte die Verkürzung des Aktionspotentials in atrialen Kardiomyozyten von herzinsuffizienten Patienten miterklären, was wiederum das Auftreten von Vorhofflimmern erleichtern könnte.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
ACEI	Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor
ACVB	aorto-coronarer Venenbypass
AI	Aorteninsuffizienz
APD <sub>90</sub>	Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation
AS	Aortenstenose
ASS	Acetylsalicylsäure
BPH	Benigne Prostata Hypertrophie
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CSEH	Cholesterin Synthese Enzym Hemmer
Dyslip.	Dyslipoproteinämie
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
I <sub>Ca</sub>	L-Typ Calciumstrom
I <sub>to</sub>	transienter K <sup>+</sup> -Auswärtsstrom
I <sub>K</sub>	verzögerter Auswärtsgleichrichterstrom mit 3 Komponenten im Atrium: I <sub>kur</sub> , I <sub>kr</sub> , I <sub>ks</sub>
I <sub>K1</sub>	Einwärtsgleichrichterstrom;
I <sub>K(ACh)</sub>	ACh abhängige Kaliumstrom
I <sub>Na</sub>	Natriumeinwärtsstrom
gen. Prädisp.	genetische Prädisposition
Hep B.	Hepatitis B
Hyperchol.	Hypercholesterinämie
Hyperuri.	Hyperurikämie
KB-Lösung	Aufbewahrungslösung für Kardiomyozyten
KHK	Koronare Herzerkrankung
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MI	Myokardinfarkt
LVEF>60%	Mittelwert der Daten bei LVEF>60%
LVEF<45%	Mittelwert der Daten bei LVEF<45%
Spenderherzen	Mittelwert der Daten der Spenderzellen
Nierenzell-Ca.	Nierenzell-Karzinom
PaVK	peripher-arterielle Verschlusskrankheit
PCWP	pulmonal capillary wedge pressure
SEM	Standardfehler
STD	Standardabweichung
TEA-CI <sup>-</sup>	Tetraethylammonium-Chlorid
ZVD	Zentral venöse Druck

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Frequenzabhängig veränderte Aktionspotentiale bzw. Aktionspotentialdauer von atrialen Kardiomyozyten:  
**A:** Typische Beispiele atrialer Aktionspotentiale eines Patienten mit LVEF>60% (oben) u. <45% (unten) bei 1Hz u. 3Hz steady-state Stimulation (Quelle: Schreieck et al., 1998)  
**B:** Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation von Patienten mit LVEF>60% u.<45% (Quelle: Schreieck et al., 1998), Mittelwerte  $\pm$  SEM
- Abb. 2:** Flußschema des atrialen Remodelings im Zusammenhang mit Vorhofflimmern und Herzerkrankung
- Abb. 3:** Schematische Darstellung eines Aktionspotentials mit den dazugehörigen Einwärts- und Auswärtsströmen im atrialen Kardiomyozyten
- Abb. 4:** Schematischer Aufbau eines L-Typ Calciumkanals mit extrazellulärer  $\alpha_2$ -Untereinheit, transmembranären  $\alpha_1$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten und intrazellulärer  $\beta$ -Untereinheit<sup>27</sup>
- Abb. 5:** Schematischer Patch-Clamp Aufbau. Agar-Brücke: mit Agar und Elektrolyt gefüllte Glasbrücke; Bad-Elektrode: Referenzelektrode (Silber-Silberchlorid); ext. Lösung: Externe Messlösung (siehe 2.4)
- Abb. 6:** Bildliche Darstellung des Testpulses und der entsprechenden Ströme während der Patch-Clamp Ganzzelleableitung
- Abb. 7:** Patch-Clamp-Technik im whole-cell-mode: Einreißen der Zelle durch einen Saugstoß mit Hilfe einer Mikropipette. Messung der Potentialdifferenz zwischen der Pipette intrazellulär und der Badelektrode extrazellulär.
- Abb. 8:** Typisches Pulsbeispiel zur Bestimmung der spannungsabhängigen Aktivierung des Calciumstroms  
**A:** Der Testpuls wurde in 10 mV-Schritten von -70mV auf +80mV erhöht. Nach 500ms wurde der Spannungspuls wieder auf seinen Ausgangswert zurückgeklemmt. Die Pause zwischen den Testpulsen betrug 5s.  
**B:** Beispiel von übereinandergelegten Calciumströmen bei obigem Messprotokoll in A. Es handelte sich um einen atrialen Kardiomyozyten des Patienten Nr.3 (LVEF>60%), siehe Tabelle 1 und 2.
- Abb. 9:** Typisches Pulsbeispiel zur Bestimmung der spannungsabhängigen Inaktivierung des Calciumstroms  
**A:** Nach depolarisierenden Präpulsen wurde die Zelle auf +10 mV geklemmt. Zwischen den einzelnen Testpulsen betrug die Pause 5s.  
**B:** Typisches Beispiel der übereinandergelagerten Calciumströme -bei den Spannungspulsen in A- einer Zelle des Patienten Nr. 9 (LVEF>60%), siehe Tabelle 1 und 2.  
Dargestellt sind die Ströme bei depolarisierenden Testpulsen nach +10mV. Die langen depolarisierenden Präpulse sind links abgeschnitten.

**Abb. 10:** Pulsbeispiel zur Bestimmung des Calciumstroms bei 1 Hz

**A:** Die Zelle wurde ausgehend von  $-80$  mV auf  $+10$  mV geklemmt. Zwischen den 20 Testpulsen betrug die Pause 750ms.

**B:** Beispiel der übereinandergelegten Calciumströme der Testpulse Nr.1, 10 und 20 - bei den Spannungspulsen in 10A- einer Zelle des Patienten Nr. 4 (LVEF<45%), siehe Tabelle 1 und 2

**Abb. 11:** Pulsbeispiel zur Bestimmung des Calciumstroms bei 5 Hz

**A:** Die Zelle wurde vom Ruhemembranpotential von  $-80$  mV auf  $+10$  mV geklemmt und danach wieder auf  $-80$  mV repolarisiert. Dies wurde innerhalb eines Pulsprotokolls 8x wiederholt.

**B:** Beispiel für die neunmalige Auslösung eines Calciumstroms nach obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 8 mit LVEF>60 %.

**C:** Beispiel für die neunmalige Auslösung eines Calciumstroms nach obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 2 mit LVEF<45%.

**Abb. 12:** Pulsbeispiel zur Bestimmung der Erholung des Calciumstroms von der Inaktivierung

**A:** Nach Depolarisation der Zelle auf  $+10$  mV (Präpuls) wurde in einer variablen Zeitspanne die Zelle wieder auf  $-80$  mV repolarisiert um wieder auf  $+10$  mV geklemmt zu werden.

**B:** Beispiel für die Übereinanderlagerung von Calciumströmen bei obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 6 mit LVEF>60%.

**C:** Beispiel für die Übereinanderlagerung von Calciumströmen bei obigem Pulsprotokoll des Patienten Nr. 4 mit LVEF<45%,

**Abb. 13:** Graphische Calciumstromauswertung mit der HEKA-Software

**Abb. 14:** Graphischer Vergleich der gemittelten maximalen Calciumstromdichten  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60%, <45% und der Spenderherzen

**Abb. 15:** Vergleich der Strom-Spannungsbeziehung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit der Testpulse mit schrittweiser Erhöhung von  $-80$  bis  $+80$  mV, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-80$ mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 8)

**Abb. 16:** Vergleich der Strom-Spannungsbeziehung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60%, LVEF<45% und der Spenderherzen in Abhängigkeit des Testpulses mit schrittweiser Erhöhung von  $-80$  bis  $+80$  mV, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-80$ mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 8)

**Abb. 17:** Vergleich der spannungsabhängigen Inaktivierung der gemittelten und normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit des Präpulses von  $-70$  mV bis  $+40$  mV mit nachfolgender Depolarisation auf  $+10$  (Pulsprotokoll siehe Abb. 9)

**Abb. 18:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 1 Hz nach 1, 9, 10, 19 und 20 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von  $-80$  mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 10)

- Abb. 19:** Vergleich der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 5 Hz nach 1, 8 und 9 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -80 mV (Pulsprotokoll, siehe Abb. 11)
- Abb. 20:** Vergleich der Graphiken der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 1 Hz nach 1, 9, 10, 19 und 20 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -60 mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 10).
- Abb. 21:** Vergleich der Graphiken der gemittelten und normalisierten Calciumströme der Gruppen LVEF>60% und LVEF<45% in Abhängigkeit von der Stimulation mit 5 Hz nach 1, 8 und 9 Pulsen ausgehend vom Ruhemembranpotential von -60 mV (Pulsprotokoll siehe Abb. 11)
- Abb. 22:** Vergleich der Erholung von der Inaktivierung der normalisierten Calciumströme  $\pm$  SEM der Gruppen LVEF>60%, LVEF<45% und der Spenderherzen in Abhängigkeit vom Repolarisationsintervall (10–510ms) in Bezug auf den Calciumstrom des Präpulses (Pulsprotokoll siehe Abb. 12)
- Abb. 23:** Vereinfachtes Schema der Aktivierung und Inaktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Kanalkinetik)<sup>43</sup>

## 9. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Auflistung von wichtigen kardiovaskulären Parametern und der Medikation der Patientengruppen LVEF > 60% u. < 45%
- Tab. 2:** Auflistung von kardialen Erkrankungen, sonstigen Erkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren der Patienten der Patientengruppen LVEF>60% u. <45%
- Tab. 3:** Verwendete Lösungen für die Messung des Calciumstroms
- Tab. 4:** Vergleich der gemittelten maximalen Calciumströme und der durchschnittlichen Zellkapazität der Gruppen LVEF>60%, <45% und der Spenderherzen.  $I_{Ca}$  max...: Maximaler, absoluter Calciumeinwärtsstrom im Zeitverlauf bestimmt bei depolarisierenden Pulsen nach +20 mV bei der Untersuchung der spannungsabhängigen Aktivierung.
- Tab. 5:** Vergleich der Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und der Stromanteile  $A_1$  und  $A_2$  für die Erholung von der Inaktivierung

## 10. Literatur

1. Amos G.J., Wettwer E., Metzger F., Li Q., Himmel H.M., Ravens U.:  
Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes.  
J. Physiology (1996); 491.1:31-50
  
2. Bean B.:  
Two kinds of calcium channels in canine atrial cells.  
J. Gen. Physiol. (1985);86:1-30
  
3. Benjamin E.J., Levy D., Vaziri S.M., D'Agostino R.B., Belanger A.J., Wolf P.A.:  
Independent risk factors for atrial fibrillation in a population based cohort.  
The Framingham Heart Study. JAMA (1994);271:840-4
  
4. Bosch RF, Zeng X., Grammer J.B., Popovic K., Mewis C., Kuhlkamp V.:  
Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation.  
Cardiovasc. Res(1999);44:121-31
  
5. Bridge J.H.B., Smolley J.R., Spitzer K.W.:  
The relationship between charge movements associated with  $I_{Ca}$  and  $I_{Ca-Na}$  in cardiac myocytes.  
Science (1990);248:376-8
  
6. Brundel B.J., van Gelder I.C., Henning R.H., Treinenburg A.E., Deelman L.E., Tieleman R.G., Grandjean J.G., van Gilst W.H., Crijns H.J.:  
Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation  
Cardiovasc. Res.(1999);42(2):443-54
  
7. Campbell D.L., Strauss H.C.:  
Regulation of calcium channels in the heart.  
Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.(1995);30:25-88

8. Carmeliet E.:

Potassium channels in cardiac cells.

Cardiovasc. Drugs Ther.(1992);6:305-12

9. Catterall W.A.:

Structure and function of voltage gated ion channels.

Trends Neuroscience (1993);16:500-10

10. Colatsky T.J., Follmer C.H., Starmer C.F.:

Channel specificity in antiarrhythmic drug action. Mechanism of potassium channel block and its role in suppressing and aggravating cardiac arrhythmias.

Circulation (1990);82:2235-42

11. Coraboeuf E., Carmeliet E.:

Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibres.

Pflugers Arch (1982);392:352-9

12. Coraboeuf E., Nargeot J.:

Electrophysiology of human cardiac cells.

Cardiovascular Res. (1993);27:1713-25

13. Courtemanche M., Ramirez R.J., Nattel S. :

Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodelling : insights from a mathematical model.

Cardiovascular Res. (1999);42(2):477-89

14. Escande D., Coulombe A., Faivre J.-F., Deroubaix E., Coraboeuf E. :

Two types of transient outward currents in adult human atrial cells.

Am. J. Physiol. (1987);252:H843-H850

15. Fareh S., Villemaire C., Nattel S.:

Importance of refractoriness heterogeneity in electrical remodeling by atrial tachycardia.(Abstract).

J. Am. Coll. Cardiol. (1998);31(Suppl. A):221A



16. Feng J., Yue L., Wang Z., Nattel S.:  
Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium.  
Circ. Res. (1998);83:541-51
  
17. Gettes L.S., Reuter H.:  
Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres.  
J. Physiol. (1974);240:703-24
  
18. Giles W.R., Imaizumi Y.:  
Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells.  
J. Physiol. (1988);405:123-45
  
19. Grammer J.B., Zeng X.R., Bosch R.F., Kuhlkamp V.:  
Atrial L-type Ca<sup>2+</sup>-channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor  
mRNAs in human atrial fibrillation.  
Bas. Res. Cardiol. (2001);96:82-90
  
20. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.:  
Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and  
Cell-free Membrane Patches.  
European Journal of Physiology (1981);391:85-100
  
21. Heidbuchel H., Vereecke J., Carmeliet E.:  
Three different potassium channels in human atrium.  
Circ. Res. (1990);66:1277-86
  
22. Hille B.:  
Ionic channels of excitable membranes.  
2nd ed. Sunderland Sinauer Assoc. Inc.,(1992)
  
23. Hofmann F., Biel M., Flockerzi V.:  
Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity.  
Annu. Rev. Neurosci. (1994);17:399-418

24. Isenberg G.:

Ca<sup>2+</sup> entry and contraction as studied in isolated bovine ventricular cells.

Z. Naturforsch. (1982);37:502-12

25. Kass R.S., Sanguinetti M.C.:

Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms.

J. Gen. Physiol. (1985);84:705-26

26. Kuehlkamp V., Schirdewan A., Stangl K., Homberg M., Ploch M., Beck O.A.:

Use of metoprolol CR/XL to maintain sinus rhythm after conversion from persistent atrial fibrillation: a randomized, double-blind, placebo-controlled study

J. Am. Coll. Cardiol. (2000);36(1):139-46

27. Lee K.S., Marban E., Tsien R.W.:

Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on membrane potential and intracellular calcium.

J. Physiol. (1985);364:395-411

28. Le Grand B., Hatem S., Deroubaix E., Couetil J. P., Coraboeuf E.:

Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria.

Cardiovasc. Res. (1994);28:548-56

29. Li D., Fareh S., Leung T.K., Nattel S.:

Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort.

Circulation (1999);100:87-95

30. Li D., Melnyk P., Feng J., Wang Z., Petrecca K., Shrier A., Nattel S.:

Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology.

Circulation (2000);101(22):2631-8

31. Nargeot J., Lory P., Richard S.:

Molecular basis of the diversity of calcium channels in cardiovascular tissues.

Eur. Heart J. (1997);18(Suppl. A):A15-A26

32. Ouadid H., Albat B., Nargeot J.:

Calcium currents in diseased human cardiac cells.

J. Cardiovasc. Pharmacol. (1995);25:282-91

33. Patlak J.B., Ortiz M.:

Slow currents through single sodium channels of adult rat heart.

J. Gen. Physiol. (1985);86:89-104

34. Sanguinetti M.C., Jurkiewicz N.K.:

Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup>-current.

J. Gen. Physiol. (1990):96:195-215

35. Schotten U., Haase H., Frechen D., Greiser M., Stellbrink C., Vazquez-Jimenez J.F., Morano I., Allessie M.A., Hanrath P.:

Protein expression of L-type Ca<sup>2+</sup> channel subunits is not reduced in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation.

PACE (2000);23:604.(abstract)

36. Schreieck J., Wang Y., Overbeck M., Schömig A., Schmitt C.:

Altered Transient Outward Current in Human Atrial Myocytes of Patients with reduced left ventricular function.

Journal of Cardiovascular Electrophysiology (2000);11:180-92.

37. Schreieck J., Wang Y., Zrenner B., Meisner H., Overbeck M., Schmitt C.:

Frequency-Dependent Shortening of Action Potentials in Human Atrial Myocytes from Patients with and without Heart Failure. (abstract).

Circulation (1998);99(suppl):I-234.

38. Skasa M., Jungling E., Picht E., Schondube F., Luckhoff A.:

L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation.

Bas. Res. Cardiol. (2001);96:151-9

39. Tseng G.-N., Hoffmann B.F.:

Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes.

Circ. Res. (1989); 64:633-47

40. Van Gelder I.C., Brundel B.J., Henning R.H., Treinenburg A.E., Tieleman R.G., Deelman L., Grandjean J.G., De Kam P.J., Van Gilst W.H., Crijns H.J.:

Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation.

J. Cardiovasc. Electrophysiol. (1999);10(4):552-60

41. Van Wagoner D.R., Lamorgese M., Kirian P.:

Calcium current density is reduced in atrial myocytes isolated from patients in chronic atrial fibrillation.

Circulation (1997);96(Suppl.): I-180

42. Van Wagoner D.R., Pond A.L., Lamorgese M., Rossie S.S., McCarthy P.M., Nerbonne J.M.:

Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation.

Circ. Res. (1999);85:428-36

43. Wei S.K., Colecraft H.M., De Maria C.D., Peterson B.Z., Zhang R., Kohout T.A., Rogers T.B., Yue D.T.:

Ca<sup>2+</sup> channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells.

Circ. Res. (2000);86(2):175-84

44. Weidmann S.:

The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system.

J. Physiol. (1955);127:213-24

45. Whalley D.W., Wendt D.J., Grant A.O.:

Basic Concepts in Cellular Cardiac Electrophysiology :

Part I: Ion Channels, Membrane Currents and the Action Potential.

PACE (1995);18:1556-73

46. Wijffels M.C., Kirchhof C.J., Dorland R., Allessie M.A.:

Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats.

Circulation (1995);92:1954-68

47. Workman A.J., Kane K.A., Rankin A.C.:

The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation.

Cardiovasc. Res. (2001);52:226-35

48. Yamashita T., Nakajima T., Hazama H. et al.:

Regional differences in transient outward current density and inhomogeneities of repolarization in rabbit right atrium.

Circulation (1995);92:3061-69

49. Yue L., Feng J., Gaspo R.:

Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation.

Circ. Res. (1997);81:512-25

50. Yue L, Feng J., Li G.R., Nattel S.:

Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: Properties and role of isolation methods.

Am. J. Physiol. (1996);270:H2157-H2168

51. Zygmunt A.C., Gibbons W.R.:

Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes.

Circ. Res. (1991);68:424-37