

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik C  
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Breithardt -

**Der Effekt parasympathischer Stimulation  
auf die Entstehung von Arrhythmien  
beim langen QT-Syndrom Typ 3**

INAUGURAL – Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Dierk Damke  
aus Petershagen

2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Kirchhof

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Meißner

Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2009

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

Referent: Prof. Dr. med. P. Kirchhof

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Meißner

### **ZUSAMMENFASSUNG**

*Der Effekt parasympathischer Stimulation  
auf die Entstehung von Arrhythmien  
beim langen QT-Syndrom Typ 3*

Dierk Damke

Das lange QT-Syndrom ist eine seltene aber schon im frühen Lebensalter auftretende und zu letalen Arrhythmien führende Kardiomyopathie. Nach sporadischen klinischen Beobachtungen scheint eine parasympathische Stimulation beim langen QT-Syndrom Typ 3 pathophysiologisch das Auftreten einer Bradykardie und das Auftreten von Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes zu begünstigen. Dieses haben wir am Model der genetisch veränderten  $\Delta$ KPQ SCN5A Knock-in Maus, die das lange QT-Syndrom Typ 3 zeigt, untersucht.

Bei frei laufenden  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren traten unter parasympathischer Stimulation durch Carbachol (0,5 mg/ kg KG i.p.) Bradykardien und nachfolgende Bigemini und TdP ( $p < 0,05$  vs. Baseline und vs. WT) auf. Unter Atropin (0,5 mg/ kg KG i.p.) traten keine Arrhythmien auf. Am isolierten, schlagenden  $\Delta$ KPQ SCN5A Herz konnte gezeigt werden, dass unter Carbachol primär keine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer auftritt. Es kommt aber zu einer Bradykardie und in Folge dieser tritt eine frequenzbedingte Verlängerung der APD auf ( $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine parasympathische Stimulation beim langen QT-Syndrom Typ 3 Arrhythmien provoziert. Wesentlich für die Provokation von Arrhythmien ist der bradykardisierende Effekt der parasympathischen Stimulation. Eine parasympatholytische Medikation oder antibradykarde Stimulation können helfen, Torsade de Pointes in Notfallsituationen beim Patienten mit dem langem QT-Syndrom Typ 3 zu beenden.

*Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2009*

Die Genehmigung der Tierversuche wurde am 13.01.2005 ausgestellt und am 10.12.2007 verlängert vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Az G83/2004).

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	4
2.1 Versuchstiere	4
2.2 Medikamente	5
2.3 Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens	5
2.3.1 Präoperative Vorbereitung der Mäuse	5
2.3.2 Herzexplantation	6
2.3.3 Präparation	6
2.3.4 Perfusion	6
2.3.5 Versuchsaufbau	7
2.3.6 Fluss- und Temperaturmessung	10
2.3.7 Ableitung der Signale	10
2.3.8 Auswertung	11
2.3.9 Protokolle	13
2.4 Das Oberflächenkardiogramm	15
2.4.1 Die Ableitung des EKG	15
2.4.2 Auswertung	17
2.5 Telemetrie	18
2.5.1 Der Transmitter	19
2.5.2 Die Implantation des Transmitters	20
2.5.3 Die Telemetrieaufzeichnung	21
2.5.4 Medikamenteninjektion	22
2.5.5 Auswertung	22
2.6 Statistik	22

3. Ergebnisse	23
3.1 Die Telemetrie	23
3.2 Versuche am isolierten Herzen	26
3.2.1 Konzentrationsfindung	26
3.2.2 Arrhythmien	27
3.2.3 Pausen	29
3.2.4 Fixfrequente Stimulation	30
3.2.5 Spontane ventrikuläre Zykluslängen und APDs	33
3.3 Das Elektrokardiogramm unter Narkose	36
3.3.1 Arrhythmien	36
3.3.2 Zeiten und Intervalle im EKG	38
4. Diskussion	41
4.1 Bradykardie als Ursache für Torsade de Pointes Arrhythmien	41
4.2 Atropin als Antiarrhythmikum beim langen QT-Syndrom 3	44
4.3 Limitationen	44
4.4 Schlussfolgerungen	45
4.5 Klinische Aspekte	45
Literaturverzeichnis	47
Abkürzungen	56
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	58
Danksagung	60

Lebenslauf	61
Anhang	I
A. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit	I
B. Werte der spontanen Zykluslängen (Langendorff)	III
C. Werte der spontanen APDs (Langendorff)	IV
D. Werte der fixfrequenten Stimulation (Langendorff)	V
E. Arrhythmien (Langendorff)	VII
F. Werte aus dem Oberflächen-EKG	VIII
G. Die verschiedenen Protokolle der LD-Versuche	X
H. Genehmigung der Tierversuche	XIII



# 1. Einleitung

Das lange QT-Syndrom wurde erstmals 1957 von Jervell und Lange-Nielsen im Zusammenhang mit Taubstummheit bei einer schwedischen Familie beschrieben [24]. Im Elektrokardiogramm fielen eine verlängerte QT-Zeit und eine abnorme T-Wellen-Morphologie auf. Ein Großteil der Kinder (3 von 4) der Familie verstarb am plötzlichen Herztod. Dieses Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Im weiteren wurde 1963 durch Romano et. al [40] und 1964 durch Ward [55] das autosomal dominant vererbte Romano-Ward-Syndrom beschrieben, welches in mehreren Varianten auftritt [39]. Außerdem sind diverse erworbene Formen des langen QT-Syndroms entdeckt worden, welche durch Medikamente hervorgerufen werden [21].

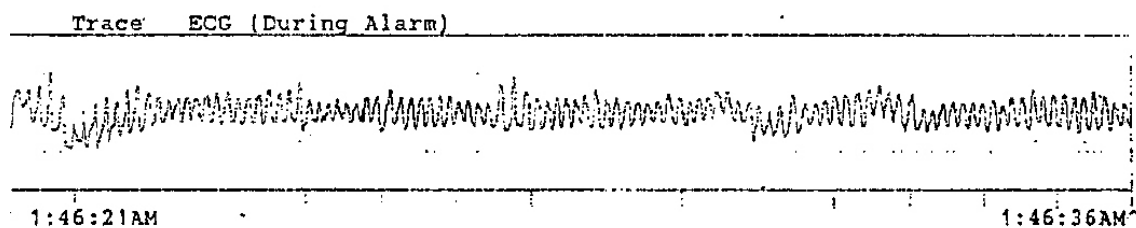
<i>Syndrom</i>	<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	<i>Kanal</i>
<b>Romano-Ward Syndrom (autosomal dominant)</b>			
LQT 1	11p15.5	KCNQ1 (KVLQT1)	$I_{KS}$
LQT 2	7q35-36	KCNH2 (HERG)	$I_{KR}$
LQT 3	3p21-24	SCN5A	$I_{Na}$
LQT 4	4q25-27	Ankyrin B	
LQT 5	21q22.1-22	KCNE1 (minK)	$I_{KS}$
LQT 6	21q22.1-22	KCNE2 (MIRP1)	$I_{KR}$
LQT 7	12q23.2	KCNJ2	$I_{K1}$
LQT 8	LQT 1-7 ausgeschlossen		
<b>Jervell and Lange-Nielsen Syndrom (autosomal rezessiv)</b>			
JNL 1	11p15.5	KCNQ1	$I_{KS}$
JNL 2	21q1-22	KCNE1	$I_{KS}$
JNL 3	JNL 1+2 ausgeschlossen		

**Abbildung 1.1: Übersicht und genetische Klassifizierung über die angeborenen langen QT-Syndrome (modifiziert nach Haverkamp, 2007) [20].**

*$I_{K1}$ : einwärtsgerichteter Kalium-Gleichrichterstrom;  $I_{Kr}$ : schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kalium-Gleichrichterstroms  $I_K$ ;  $I_{Ks}$ : langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kalium-Gleichrichterstroms  $I_K$ ;  $I_{Na}$ : schneller Natrium-Einwärtsstrom.*

Dem angeborenen langen QT-Syndrom 3 (LQT-Syndrom 3) liegt eine Mutation im SCN5A-Gen für den kardialen Natriumkanal zugrunde [18, 25, 54]. Charakteristisch für dieses Syndrom ist eine verlängerte Aktionspotenzialdauer der Kardiomyozyten, eine

verlängerte QT-Zeit im Oberflächenkardiogramm und ein erhöhtes Risiko für Synkopen und den plötzlichen Herztod durch ventrikuläre Arrhythmien [42]. Die frequenzkorrigierte QT-Zeit ist bei Trägern der Mutation auf über 440 ms verlängert, vor allem bei niedriger Herzfrequenz. Bei einer Verlängerung auf über 500 ms fallen die Patienten in eine Hochrisikogruppe [30, 44]. Die Verlängerung kommt durch eine verlängerte Repolarisationsphase und das daraus resultierende verlängerte ventrikuläre Aktionspotenzial zustande [13]. Diese elektrophysiologischen Veränderungen sind die Ursache für Synkopen und einen Teil der plötzlichen Herztode bei sonst gesunden Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen, die durch polymorphe ventrikuläre Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes (TdP) verursacht werden. Diese Form der Arrhythmie zeichnet sich dadurch aus, dass sich die Morphologie des QRS-Komplexes kontinuierlich um die isoelektrische Linie dreht mit einer oszillierenden Amplitude [5, 22]. Speziell die Patienten mit dem LQT 3 Syndrom, im Vergleich zu den anderen langen QT-Syndromen, versterben häufiger und vor allem auch jünger, im Kindesalter oder jungen Erwachsenenalter, an den Arrhythmien [17, 47, 56].



**Abbildung 1.2: Torsade de Pointes**

*Torsade de Pointes bei einem 9 Wochen alten Säugling mit dem langen QT-Syndrom 3, während des Schlafes aufgetreten [56]*

Arrhythmien sind beim LQT-Syndrom 3 nicht so häufig wie bei anderen LQT-Syndromen, sie sind jedoch, wenn sie auftreten, wesentlich häufiger letal [57]. Weiterhin treten die kardialen Ereignisse, im Gegensatz zu den anderen Formen des LQT-Syndroms, beim LQT-Syndrom 3 vor allem in Ruhe und während des Schlafes auf [46]. Dieser Sachverhalt wird jedoch nur in wenigen klinischen Observationen beschrieben. Das Problem für die Betroffenen könnte eine Bradykardie zu diesen Zeiten sein [32] beziehungsweise ein funktioneller AV-Block vor dem Auftreten von Arrhythmien, der in einigen wenigen Fällen beobachtet wurde [41, 48, 52]. Daher profitieren Patienten mit einem LQT-Syndrom 3 auch möglicherweise eher nicht von

der medikamentösen Standardtherapie des LQT-Syndroms, dem  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten [31, 43]. Ein möglicher Grund könnte die  $\beta$ -Blocker induzierte Bradykardie sein oder die direkte myokardiale  $\beta$ -adrenerge Reaktion. Auf der Basis einzelner klinischer Beobachtungen [45] und experimenteller Daten [14] wird angenommen, dass das Vorbeugen einer Bradykardie als eine Gen-spezifische Therapie beim LQT-Syndrom 3 angesehen werden kann.

Wir postulieren, dass eine Veränderung der autonomen Innervation des Herzens durch parasympathische Stimulation zu einer Bradykardie führt, zu einer Verlängerung des Aktionspotenzials und damit der QT-Zeit im EKG und vor allem auch zu Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes und in ihrer Folge zum plötzlichen Herztod bei Menschen mit LQT-Syndrom 3.

Da es bisher lediglich klinische Einzelbeobachtungen gibt, die eine Bradykardie in Ruhe oder während des Schlafes als auslösenden Mechanismus von Torsade de Pointes beim LQT-Syndrom 3 belegen, soll in der vorliegenden Arbeit der Effekt der parasympathischen Stimulation am Herzen der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus in vivo und in vitro, am isolierten Herz, untersucht werden. Dabei soll besonders der These nach einem Bradykardie induzierten Auftreten von Arrhythmien, speziell vom Typ der Torsade de Pointes, und möglichen auslösenden Mechanismen nachgegangen werden.

Dazu sollen durch die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Tritt eine Bradykardie induzierte Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und der QT-Zeit bei der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus unter parasympathischer Stimulation mit Carbachol auf?
- Treten Bradykardie induziert Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes unter parasympathischer Stimulation auf?
- Treten Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes bei der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus nicht auf, wenn eine Bradykardie, durch Blockade des Parasympathikus mit Atropin, verhindert wird?

## 2. Materialien und Methoden

Da die Datenlage in Bezug auf klinische Studien zum Thema wegen der geringen Inzidenz und des oft plötzlichen Versterbens vieler Patienten schlecht ist und es lediglich wenige klinische Beobachtungen gibt, griffen wir auf das Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus zurück. Dieses Modell zeigt die klinischen Eigenschaften des LQT Syndroms 3 wie die verlängerte ventrikuläre Repolarisation, die intrinsische Bradykardie und die Bradykardie induzierten Arrhythmien im isolierten Herz [14, 36].

### 2.1 Versuchstiere

Sowohl der Entwurf als auch die Durchführung der Versuche erfolgt streng nach den allgemeinen und lokalen Richtlinien des Tierschutzes „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH publication No. 85-23, revised 1996). Genehmigt wurden die Tierversuche am 13.01.2005 und die Genehmigung verlängert am 10.12.2007 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen G83/2004.

In der durchgeführten Studie wurden  $\Delta$ KPQ SCN5A-transgene Mäuse (TG) und eine Kontrollgruppe entsprechender Wildtyp Geschwistertiere (WT) verglichen.

Die transgene Maus trägt eine Knock-in Deletion der Aminosäuresequenz 1505-1507 (KPQ) im kardialen Natriumkanal, die durch das SCN5A-Gen auf Chromosom 3p21 codiert wird. Diese Deletion verursacht eine autosomal dominant vererbte Verlängerung der QT-Zeit, welche in heterozygoten Individuen ( $SCN5A^{\Delta/+}$ ) dem LQT-Syndrom Typ 3 entspricht. Die Verlängerung der QT-Zeit tritt vor allem bei niedriger Herzfrequenz in Erscheinung, wie sie auch physiologischerweise in Ruhe oder während des Schlafes auftritt. Assoziiert mit der QT-Verlängerung treten vermehrt letale polymorphe ventrikuläre Arrhythmien von Typ der Torsade de Points auf. Vererbt wird das SCN5A-Gen nach Mendel. Das heißt Nachkommen treten in einem Verhältnis ein homozygot gesundes zu zwei heterozygot kranken zu einem homozygot vor der Geburt, in der Embryonalphase, verstorbenen Individuen auf [36].

## 2.2 Medikamente

Zur parasympathischen Stimulation des Herzens nahmen wir das Carbachol (Carbaminoylcholin), ein Strukturanalogon des Acetylcholins, welches hauptsächlich an den muskarinergen Acetylcholinrezeptor bindet und somit als direktes Parasympathomimetikum wirkt. Außerdem hat es zusätzlich in vivo noch eine geringe indirekte Wirkung durch Hemmung der Cholinesterase.

Als Parasympatholytikum nutzten wir Atropin ((±)-Hyoscyamin). Dieses wirkt als kompetitiver Antagonist am muscarinergen Acetylcholinrezeptor.

## 2.3 Elektrophysiologische Untersuchung des isolierten Herzens

### 2.3.1 Präoperative Vorbereitung der Mäuse

Zu Beginn der Untersuchung werden die Mäuse gewogen und anschließend werden 2 Gramm pro Kilogramm Körpergewicht Urethane zur letalen Narkose und 250 IE Natrium-Heparin (Liquemin®), 1:1 verdünnt mit 0,9%iger Natriumchloridlösung, intraperitoneal mit einer Kanüle (27 G, 0,4 mm Durchmesser) injiziert.

Im Anschluss wird ein 12-Kanal EKG, mit den drei bipolaren Extremitätenableitungen nach Einthoven, den drei unipolaren nach Goldberger und den sechs Brustwandableitungen nach Wilson und zeitgleich ein einminütiges digitales 6-Kanal EKG, entsprechend den Extremitätenableitungen, abgeleitet. Hierzu werden vier Drahtschlingen (Elektroden) an den vier, mit Elektrodengel versehenen, Extremitäten befestigt. Die sechs Brustwandelektroden sind in einen an den Brustkorb der Maus angepassten Kunststoffblock eingelassen. Sie werden mit etwas Elektrodengel versehen und manuell an den zuvor rasierten Thorax zur Aufnahme des EKG fixiert. - Die genaue Beschreibung der Methode erfolgt weiter unten im Text.

Die Tiefe der Narkose wird vor der Herzexplantation durch eine Schmerzstimulation überprüft. Dazu wird der Zwischenzehenraum der Maus an den Hinterbeinen mit einer Pinzette gequetscht. Bei noch vorhandenem Schmerzreiz wird die Narkose durch weitere fraktionierte Urethangaben vertieft bis Schmerzfreiheit besteht.

Die narkotisierte Maus wird im Anschluss auf einer Styroporplatte mit vier Kanülen (27 G, 0,4 mm Durchmesser), an den Beinen in Rückenlage fixiert und auf einer Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur stabil zu halten.

### 2.3.2 Herzexplantation

Zur Entnahme des Herzens wird ein kurzer medianer Längsschnitt unterhalb des Processus xiphoideus mit einer scharfen Schere gesetzt, der dann zu beiden Seiten, jeweils kaudal des Zwerchfells, nach lateral fortgesetzt wird. Danach wird das Zwerchfell von der ventralen Thoraxwand gelöst und die Rippen beidseits, jeweils in der Medioaxillarlinie, nach kranial hin durchtrennt, um die Thoraxwand komplett nach kranial hin wegklappen zu können. Eventuelle Verwachsungen werden dabei mit der Schere gelöst.

Das Herz wird zusammen mit der Lunge und den restlichen Mediastinalstrukturen aus dem Situs entnommen, indem die Gefäße, Nerven und sonstigen Strukturen oberhalb und unterhalb des Herzens durchtrennt werden.

### 2.3.3 Präparation

Das entnommene Gewebe wird sofort nach der Entnahme aus dem Situs in eine Petrischale mit oxygeniertem und heparinisiertem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) gegeben, welcher sich ebenfalls auf der Wärmeplatte befindet.

Innerhalb dieses Gefäßes und ständig unterhalb der Oberfläche der Lösung befindlich wird das Herz präpariert. Dazu werden die Lunge und die groben mediastinalen Strukturen mit einer feinen spitzen Schere abgetrennt. Die Aorta wird von dem periaortalen Bindegewebe befreit und auf etwa 2 bis 3 mm eingekürzt. Die so frei präparierte Aorta wird auf eine Kanüle (Durchmesser 1,3 mm) aufgezogen und mit einem chirurgischen Faden (Seide, 4-0) auf dieser fixiert. Das Ende der Kanüle muss sich distal der Aortenklappe in der Aorta befinden, um im weiteren die retrograde Perfusion der Aorta und die Perfusion der Koronargefäße zu gewährleisten.

### 2.3.4 Perfusion

Das Herz wird während des Versuchs in der Langendorff-Apparatur retrograd über die Aorta und die Koronarien mit einer Nährlösung, dem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB), bei einem voreingestellten Perfusionsdruck von  $110 \pm 5$  mm/ Hg perfundiert, die resultierende Flussrate beträgt bei diesem Druck  $2,4 \pm 0,1$  ml/ min.

		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Natriumchlorid	NaCl	118,00 mmol/ l	118,00 mmol/ l	118,00 mmol/ l
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	24,88 mmol/ l	24,88 mmol/ l	24,88 mmol/ l
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO	41,18 mmol/ l	41,18 mmol/ l	41,18 mmol/ l
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,55 mmol/ l	5,55 mmol/ l	5,55 mmol/ l
Natriumpyruvat	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	2,00 mmol/ l	2,00 mmol/ l	2,00 mmol/ l
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	0,83 mmol/ l	0,83 mmol/ l	0,83 mmol/ l
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1,80 mmol/ l	1,80 mmol/ l	1,80 mmol/ l
Kaliumchlorid	KCl	4,70 mmol/ l	3,52 mmol/ l	2,32 mmol/ l

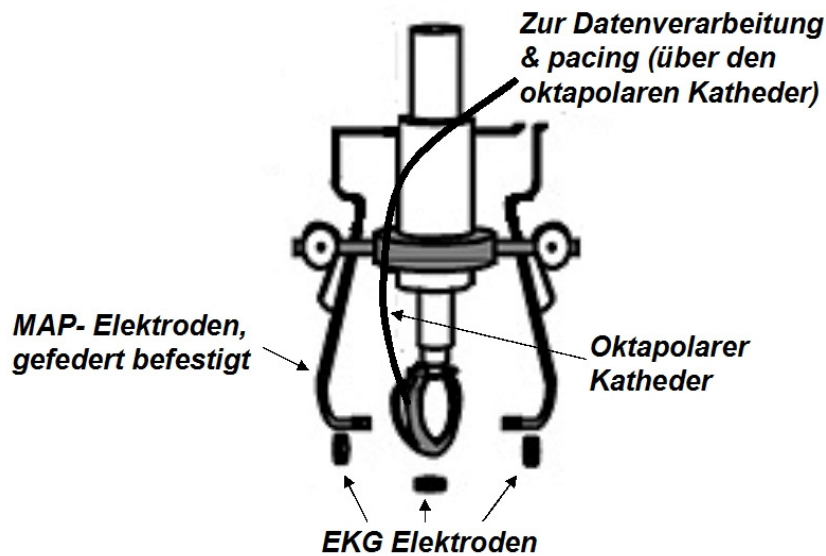
**Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers**

*Grundlage der Lösungen ist jeweils bidestilliertes Wasser. Abgewogen wurden die einzelnen Chemikalien auf einer Analysenwaage (Typ ABS120-4, Kern & Sohn, Balingen, Germany). A entspricht einer Zusammensetzung mit einer Kaliumkonzentration von 5,9 mmol/ l KHB, B entspricht 4,7 mmol/ l KHB, C entspricht 3,5 mmol/ l KHB.*

Entsprechender Fluss und Druck werden über eine Rollerpumpe (Reglo Digital, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany) aufgebaut. Die Lösung wird kontinuierlich mit einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid (Carbogen) aufgesättigt. Mittels Salzsäure (HCl 1 mmol/ l) beziehungsweise Natronlauge (NaOH 1 mmol/ l) erfolgt die Feineinstellung des pH-Wertes des Puffers auf einen Wert zwischen 7,35 und 7,45. Um eine konstante Temperatur gewährleisten zu können, wird die KHB-Lösung in einem doppelwandigen, 1000 ml fassenden Gefäß (Radnoti Glas Technology INC., Monrovia, CA, USA) von 43°C warmen Wasser umspült, welches in einem Kreislaufsystem durch einen Durchlauferhitzer (Lauda, Lauda-Königshofen, Germany) erwärmt wird. Die resultierende Temperatur an der Herzoberfläche während der Versuche beträgt  $34,9 \pm 0,1$  °C.

### 2.3.5 Versuchsaufbau

Das auf der Kanüle fixierte Herz wird sofort, ohne nennenswerten Zeitverlust nach der Präparation in die Langendorff-Apparatur (Apparatus Isolated Heart, Typ 1, Hugo-Sachs, Typ 844, March-Hugstetten, Germany) eingehängt und somit kontinuierlich perfundiert.



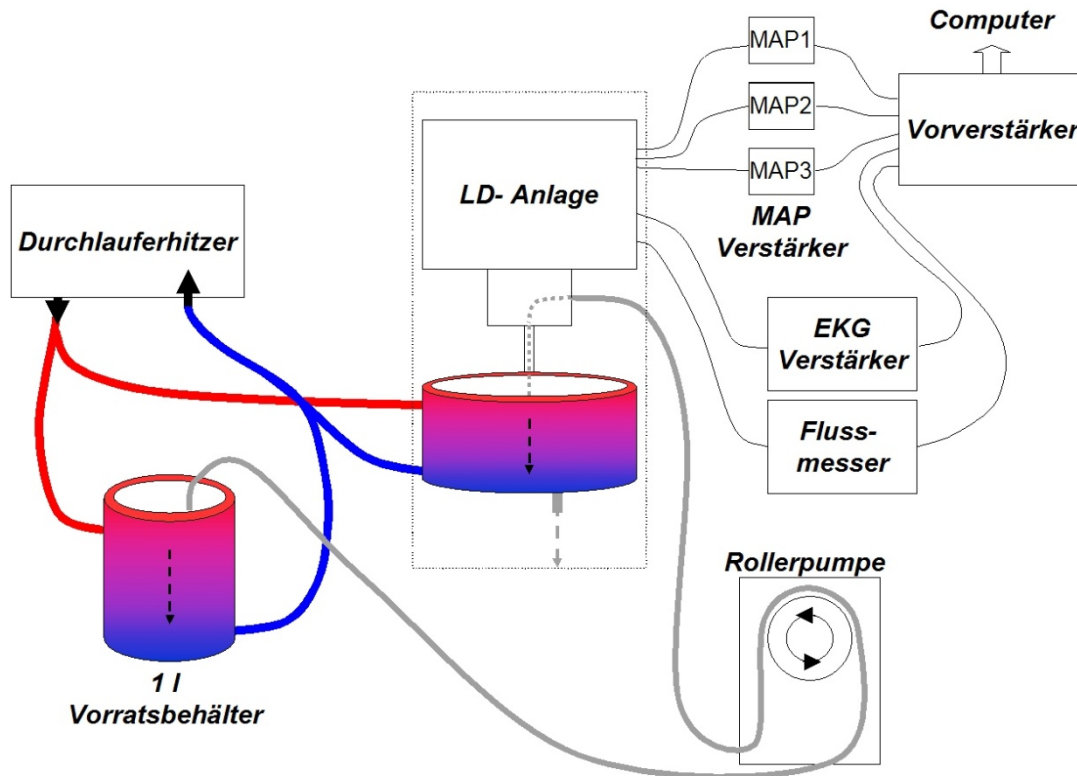
**Abbildung 2.1: Das Herz in der Langendorff-Apparatur (modifiziert nach Fabritz et. al, 2003) [13]**  
*Die drei MAP-Elektroden sind jeweils gefedert befestigt, um einen optimalen Anpressdruck zu gewährleisten. Die EKG-Elektroden sind in einem Schwamm gelagert und so verschaltet, dass sie drei EKG-Ableitungen entsprechen. Der oktapolare Katheter ist durch ein Loch im rechten Atrium in diesen und weiter in den rechten Ventrikel eingeführt.*

Die Apparatur besteht aus einem Plexiglasgehäuse in dem die notwendigen Komponenten zur Perfusion des Herzen verarbeitet sind, inklusive der Möglichkeit einer Einstellung des Perfusionsdruckes über eine Stellschraube und der damit verbundenen Druckmembran. Außerdem befinden sich in, beziehungsweise an dem Gehäuse Möglichkeiten zur Fixierung der verschiedenen Katheter und Elektroden, zur Aufzeichnung der verschiedenen Signale. Auch die Langendorff-Apparatur besitzt eine doppelwandige Außenwand, welche in dem Kreislaufsystem mit dem 43°C warmen Wasser durchspült wird, um ein Auskühlen des Herzens zu verhindern.

Um den linken Ventrikel vor einem zu hohen Druck und Volumen, durch eventuell zurückfließende Nährlösung über die Aortenklappe zu schützen, wird zur Entlastung die Stahlnadel einer Injektionskanüle (27 G, 0,4 mm Durchmesser) im Bereich des linken Apex cordis durch das Myokard in den linken Ventrikel eingestochen. Um einen Katheter in den rechten Vorhof, beziehungsweise weiter in den rechten Ventrikel einführen zu können, wird in den rechten Vorhof mit einer feinen Schere ein kleines,



etwa 2 mm messendes Loch geschnitten, wobei auf jeden Fall der Sinusknoten, der atrioventrikuläre Knoten (AV) und auch die Koronarien zu schonen sind.



**Abbildung 2.2: Langendorff-Versuchsanordnung**

*Das erwärmte Wasser (rot) fließt vom Durchlauferhitzer zum Vorratsbehälter und der Langendorff-Apparatur, erwärmt diese Komponenten und fließt abgekühlt (blau) zurück zum Durchlauferhitzer. Die erwärmte KHB-Lösung (grau) wird durch die Rollerpumpe aus dem Vorratsbehälter in die Langendorff-Apparatur gepumpt. Die alte Lösung fließt durch eine Öffnung im Boden der Anlage ab.*

*Die abgeleiteten Signale werden gefiltert, verstärkt und umgewandelt und dann an den Computer zur Speicherung und Auswertung weitergeleitet.*

Über einen Dreiwegehahn in der Zuleitung zur Langendorff-Apparatur und einen Perfusor (B. Braun, Melsungen, Germany) besteht die Möglichkeit der KHB-Lösung verschiedene Substanzen wie zum Beispiel Medikamente oder besonderer Elektrolyte zuführen zu können. Eine andere Möglichkeit dazu besteht darin, dass der KHB-Lösung entsprechende Substanzen gleich beim Anrühren zugesetzt werden.

### 2.3.6 Fluss- und Temperaturmessung

Die Messung des Perfusionsflusses erfolgt automatisch über einen Flussmesser (Transit time flowmeter modul, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany), dieser zeigt den Fluss zum einen digital an, zum anderen kann eine kontinuierliche Aufzeichnung über den PC und die Software LabVIEW<sup>®</sup> erfolgen. Die Temperatur wird mit einem digitalen Thermometer (Peak tech<sup>®</sup> 5115, H.- G. Lau GmbH, Ahrensburg, Germany) an der Herzoberfläche gemessen.

### 2.3.7 Ableitung der Signale

Über das Loch in der Wand des rechten Vorhofs wird mit einer Pinzette ein 2,0 French oktapolarer, elektrophysiologischer Mauskatheter (CIB'ER MOUSE; NuMED, Inc., Hopkinton, N.Y., USA) über den Vorhof, durch die Trikuspidalklappe bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die Elektroden an diesem Katheter haben eine Größe von 0,5 mm und ebenfalls einen Abstand zueinander von jeweils 0,5 mm. Über diesen Katheter können entweder intrakardiale Signale aus Vorhof oder Kammer abgeleitet, oder entsprechende Strukturen über einen universal 2-Kanal Stimulator (Rissel Medizintechnik, Münster, Germany), stimuliert werden.

Über Ag-AgCl-Elektroden, die sich in kleinen feuchten Schwämmen befinden, werden von epikardial Signale abgeleitet, die einem Elektrokardiogramm entsprechen. Diese Signale werden von einem EKG-Verstärker mit einer Bandbreite von 0,1 bis 300 Hz (ECG-Amplifier, Hugo Sachs, March-Hugstetten, Germany) verstärkt und gefiltert.

Direkt von der Herzoberfläche werden drei monophasische Aktionspotenziale (MAPs) kontinuierlich und simultan abgeleitet. Dieses kann je nach Protokoll von den verschiedenen Strukturen des Herzens geschehen. Die Signale werden durch spezielle MAP-Katheter, die an speziellen gefederten Halterungen befestigt sind, aufgezeichnet und jeweils über einen Vorverstärker (MAP-Preamplifier, EP Technologies, Sunnyvale, CA, USA) verstärkt. Um gute MAP-Signale zu erhalten, müssen diese Katheter möglichst senkrecht auf den entsprechenden Herzabschnitten, auf das Epikard aufgesetzt werden und es muss ein geeigneter sanfter Anpressdruck vorhanden sein.

Verarbeitet werden die Signale über einen DC-gekoppelten Vorverstärker (Modell 2000, EP Technologies Inc., San Jose, CA, USA). Aufgezeichnet werden sie digital mit

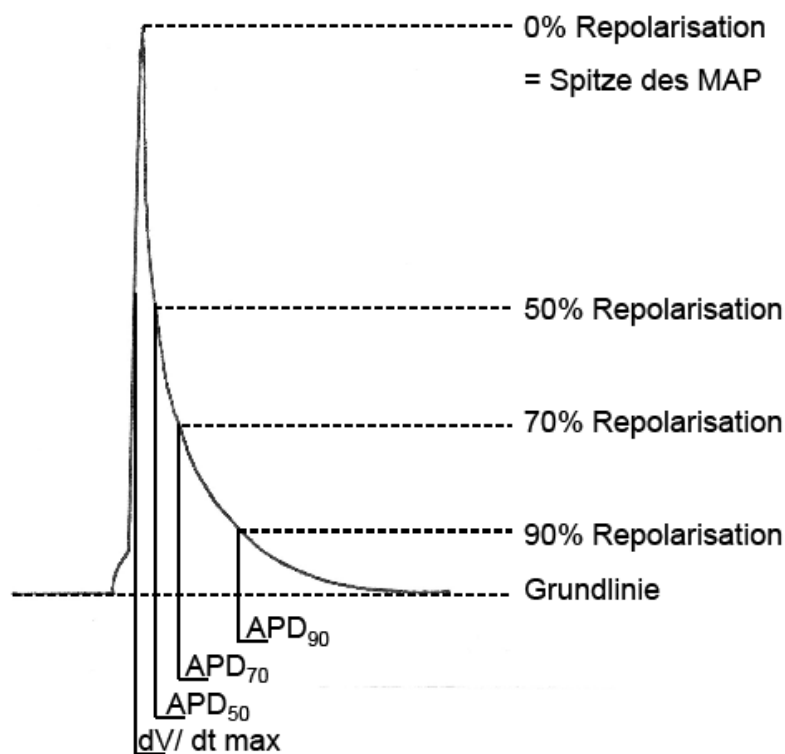
einer speziell auf die monophasischen Aktionspotenziale der Maus angepassten halb automatischen Software (LabVIEW<sup>®</sup>, Version 5.0, 1998) [15].

### 2.3.8 Auswertung

Die Auswertung erfolgt offline, ebenfalls halb automatisch, mit der oben genannten Software (LabVIEW<sup>®</sup>, Version 5.0, 1998). Es werden zum einen einzelne monophasische Aktionspotenziale (MAPs) ausgewertet und zum anderen die gesamte Aufzeichnung im Hinblick auf Arrhythmien, Pausen und andere Auffälligkeiten von geblindeten Untersuchern durchgesehen.

Die einzelnen MAPs, die ausgewertet werden sollen, müssen bestimmten Kriterien entsprechen, um eine korrekte und reproduzierbare Auswertung zu gewährleisten. Zu diesen Kriterien zählen: eine stabile Baseline, ein schneller Aufstrich ohne Umkehr oder Negativitätsbewegung mit einer Dauer von unter 2 ms und einer Amplitude von über 1 mV und eine schnelle frühe Repolarisation [13, 27].

Die Auswertung der MAPs bei fixfrequenter Stimulation umfasst die Bestimmung der Aktionspotenzialdauer (APD) bei einer Repolarisation von 50%, 70% und 90% der maximalen Depolarisation, in Millisekunden [27]. Der Startpunkt der Messung wird automatisch und zusätzlich visuell kontrolliert und eventuell manuell korrigiert an die Stelle der höchsten Aufstrichgeschwindigkeit des MAPs gesetzt. Als Beginn der Repolarisation (0%) wird, wegen der speziellen Morphologie des MAPs der Maus ohne Plateau der Peak des MAPs angenommen. 100% Repolarisation entspricht der elektrischen Diastole [19]. Zu den Zeitpunkten an denen das Herz stimuliert wird kann zusätzlich eine Aktivierungszeit gemessen werden. Diese entspricht der Zeitspanne vom Beginn des Stimulationsartefakts bis zur Stelle der höchsten Aufstrichgeschwindigkeit des MAPs. Die gemessenen Daten werden automatisch gespeichert und können im weiteren in einer Tabellenkalkulation (EXCEL<sup>®</sup>, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) geöffnet und weiter analysiert werden.



**Abbildung 2.3: Das monophasische Aktionspotenzial der Maus**

*Das MAP zeichnet sich aus durch einen schnellen Aufstrich, eine Spitze, dessen Amplitude höher als 1 mV sein sollte und eine zügige Repolarisation, um dann eine stabile isoelektrische Baseline zu erreichen..*

Weiterhin kann aus den gemessenen Daten die Dispersion der Dauer der Aktionspotenziale errechnet werden. Diese entspricht der Differenz der maximalen und minimalen Aktionspotenzialdauer, bei entsprechender Repolarisation, der drei zeitgleich abgeleiteten MAPs [26].

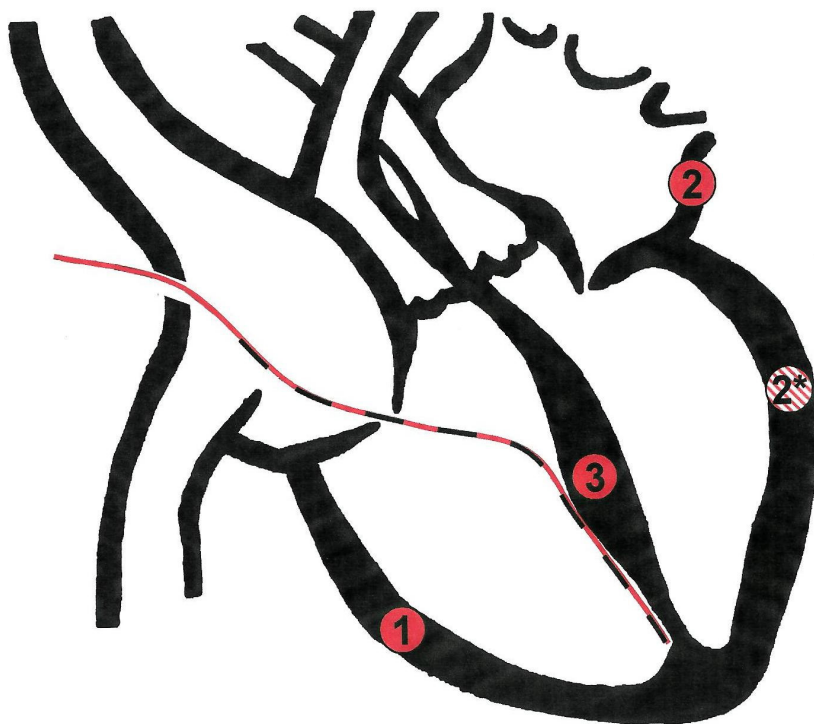
Entsprechend der Auswertung der MAPs bei fixfrequenter Stimulation wird auch die Auswertung der MAPs bei spontaner Herzaktion durchgeführt. Die Messungen werden jeweils, wenn gute Signale vorhanden sind, circa 5 Minuten (4 bis 8 Minuten) nach Beginn der Aufzeichnung, beziehungsweise Beginn der Medikamenteninfusion durchgeführt.

Die Messung der spontanen Zykluslängen erfolgt jeweils von Peak zu Peak der einzelnen MAPs. Ein Baselinewert wird in der Signalaufzeichnung nach 5 min Stabilisation gemessen und die Werte bei Medikamentengabe jeweils nach 5 Minuten Medikamenteninfusion.

Um stabilere Werte zu erhalten, werden jeweils drei MAPs beziehungsweise drei Zykluslängen ausgemessen und daraus der Mittelwert (Median) berechnet.

Zur Auswertung der Arrhythmien und Pausen werden die einzelnen Aufzeichnungen erneut mithilfe der Software LabVIEW<sup>®</sup> danach durchsucht. Dabei wird zwischen spontanen und induzierten Arrhythmien unterschieden, wobei induzierte Arrhythmien denen entsprechen, die während der Stimulation auftreten. Andererseits wird zwischen den verschiedenen Arrhythmieformen wie monomorphen oder polymorphen (Torsade de Pointes artigen) ventrikulären Tachykardien ( $\geq 5$  Beats), frühen Nachdepolarisationen (early after depolarisations: EADs), Bigemini und Salven (3 und 4 Beats) unterschieden. Außerdem wird nach Pausen größer gleich 10 Sekunden Dauer gesucht.

### 2.3.9 Protokolle



**Abbildung 2.4: Schema der Elektrodenplatzierung**

*MAP auf dem rechten Ventrikel (1); MAP2 auf dem linken Vorhof (2) oder auf dem linken Ventrikel (2\*); MAP3 auf dem Septum (3); oktapolarer Katheter durch die kleine Öffnung im rechten Vorhof und weiter durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel, im Bereich des Septums direkt unterhalb der Mitralklappe, um eine möglichst physiologische Reizleitung in den Ventrikeln zu gewährleisten.*

Bei den Untersuchungen werden MAPs vom rechten Ventrikel (MAP 1), vom linken Vorhof (MAP 2) und vom Septum (MAP 3) abgeleitet. Zusätzlich werden ein EKG und die Signale vom oktapolaren Katheter aufgezeichnet. Eine Modifikation dieser

Versuchsanordnung besteht darin das MAP 2 nicht vom linken Vorhof, sondern von der freien linken Ventrikelwand abzuleiten.

Jeder Versuch beginnt mit einer kurzen Stabilisierungsphase, in welcher das Herz lediglich in die Langendorff-Apparatur eingehängt ist und mit der KHB-Lösung (Kalium 5,9 mmol/ l) perfundiert wird. Im Anschluss daran wird eine kleine Öffnung für den oktapolaren Katheter in den rechten Vorhof geschnitten, die EKG-Elektroden und die einzelnen MAP-Katheter werden an das Herz angelegt und der oktapolare Katheter wird bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Nach der Einstellung guter Signale wird eine Baselineaufzeichnung von 5 Minuten Dauer angefertigt. Die beiden folgenden Protokolle sind Grundlagen, die im Verlauf der Versuchsreihen modifiziert werden, um die verschiedenen Konzentrationen von Carbachol und Kalium auszutesten und die Stimulationszyklen auf die Wesentlichen beschränken zu können.

1.) Zu Beginn wird eine Vorhofstimulation bei Kalium 5,9 mmol/ l durchgeführt, beziehungsweise eine Kammerstimulation beim Bestehen eines AV-Blocks. Im Anschluss wird Carbachol 0,1  $\mu$ mol bei Kalium 5,9 mmol/ l eingewaschen und es wird wieder stimuliert. Dann wird Carbachol 1  $\mu$ mol mit Kalium 5,9 mmol/ l eingewaschen, danach Kalium 4,7 mmol/ l und zum Schluss Carbachol 10  $\mu$ mol mit Kalium 5,9 mmol/ l und es wird jeweils stimuliert.

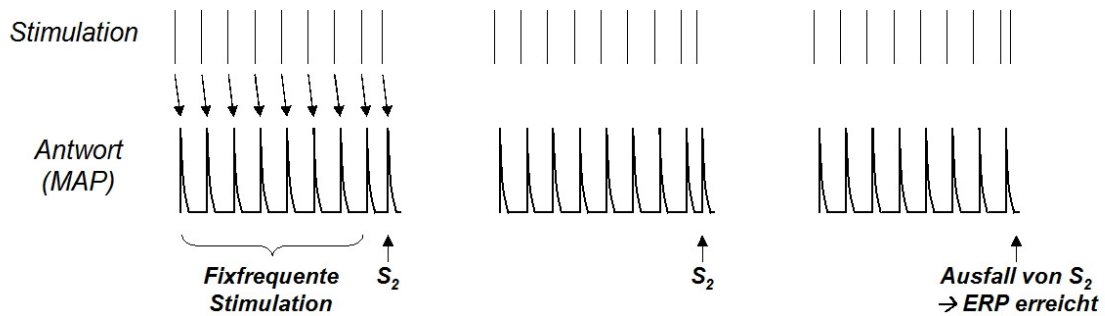
2.) Kurze Baselineaufzeichnung mit Kalium 4,7 mmol/ l. Danach Kalium 3,5 mmol/ l, dann Carbachol 0,1  $\mu$ mol mit Kalium 4,7 mmol/ l, dann Kalium 4,7 mmol/ l. Im Anschluss Carbachol 0,1  $\mu$ mol in Kalium 3,5 mmol/ l mit Stimulation, im weiteren Kalium 4,7 mmol/ l mit Stimulation, dann Carbachol 0,1 $\mu$ mol mit Kalium 4,7 mmol/ l mit Stimulation. Am Ende Kalium 3,5 mmol/ l mit Stimulation.

Vorhofstimulation: Bei der Vorhofstimulation wird der rechte Vorhof über den oktapolaren Katheter fixfrequent stimuliert und die Erregung wird an den linken Vorhof und an die Ventrikel weitergeleitet.

Kammerstimulation: Bei der Kammerstimulation wird der rechte Ventrikel über den oktapolaren Katheter fixfrequent stimuliert und die Erregung breitet sich über die Ventrikel aus.

Effektiv refraktäre Periode (ERP): Zur Bestimmung der ERP wird eine fixfrequente Stimulation durchgeführt, bis ein stabile Baseline besteht, und dann werden jeweils 8

Stimuli der entsprechenden Frequenz abgegeben und danach ein Extrastimulus ( $S_2$ ) mit einem immer kürzer werdenden Intervall um 2 ms, ausgehend von 64 ms bei der Kammerstimulation und 46 ms bei der Vorhofstimulation. Beim Ausfall der Reaktion auf  $S_2$  ist die ERP erreicht.



**Abbildung 2.5: Die Effektive refraktäre Periode (ERP) im Schema**

*Zur Bestimmung der ERP werden acht fixfrequente Stimulationen durchgeführt und im Anschluss daran eine vorzeitige Stimulation ( $S_2$ ). Die Zykluslänge der vorzeitigen Stimulation wird immer weiter verkürzt, bis die Reaktion darauf ausbleibt. An diesem Punkt ist die ERP erreicht.*

## 2.4 Das Oberflächenkardiogramm

### 2.4.1 Die Ableitung des EKG

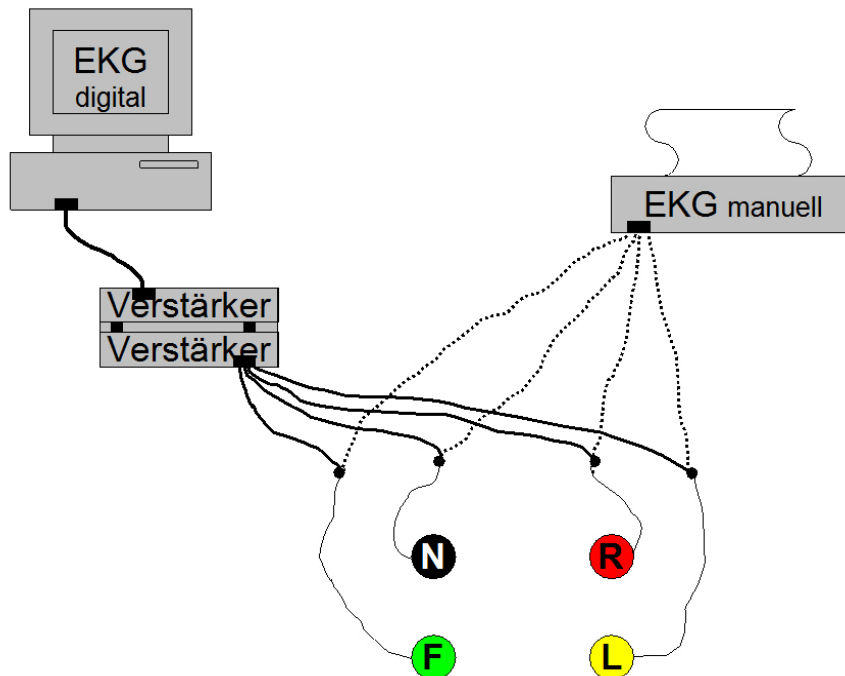
Die Ableitung des Oberflächenelektrokardiogramms erfolgt über ein manuelles 6-Kanal EKG (Siemens Megacart, Siemens, Erlangen, Germany) und ein digitales 6-Kanal EKG. Abgeleitet werden die drei bipolaren Extremitätenableitungen nach Einthoven (I, II, III) und die drei unipolaren nach Goldberger (aVL, aVR, aVF).

Das digitale EKG wird über einen ITF 16 EKG Verstärker (EMKA Technologies, Paris, France) und einen AC 246 EKG Verstärker (EMKA Technologies, Paris, France) verschaltet und mit einer speziellen Software (IOX Cardiology Research Software, Version 1.6.7.9, EMKA Technologies, Paris, France) aufgezeichnet.

Das manuelle EKG wird bei einer Papierlaufgeschwindigkeit von 100 mm/ s und einer Amplitudenhöhe von 20 mm/ mV geschrieben. Gefiltert werden die Signale mit einem 35 Hz Tremorfilter und einen 100 Hz Schwächungsfilter.

Zur EKG-Aufzeichnung werden die Mäuse mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (circa 2% Isofluran, 98% Sauerstoff), je nach Bedarf der Maus, narkotisiert. Nach dem Wirkeintritt des Anästhetikums werden die Mäuse auf dem Rücken gelagert, die

Extremitäten mit Elektrodengel versehen und die Schlaufenelektroden aus dünnem, weichem Stahldraht an diesen befestigt. Diese Elektroden sind sowohl mit dem manuellen als auch mit den Verstärkern des digitalen EKG verbunden.



**Abbildung 2.6: Ableitung des EKG**

*L= Bein links vorne, R= Bein rechts vorne, F= Bein links hinten, N= Bein rechts hinten*

Die Aufzeichnung des digitalen EKG beginnt etwa eine Minute vor der Carbacholinjektion, um eine Baselineaufzeichnung zu schreiben, und läuft bis zum Ende der Beobachtungszeit. Nach der einen Minute werden der Maus 0,5 mg/ kg Körpergewicht Carbachol intraperitoneal appliziert. Dieser Zeitpunkt wird im digitalen EKG durch einen elektronischen Kommentar gekennzeichnet, um diesen Zeitpunkt bei der Auswertung in der Aufzeichnung auffinden zu können. Vom manuellen EKG wird ein kurzer Baseline-Ausdruck angefertigt und nach der Injektion werden Ausdrücke von Auffälligkeiten und Veränderungen geschrieben. Es wird zehn Minuten lang die Wirkung des Carbachols beobachtet.

Falls die Maus beginnt unter der parasymphathischen Stimulation zu speicheln wird sie unter Beibehaltung der Elektrodenpositionen auf den Bauch umgelagert, um einer Aspiration vorzubeugen.



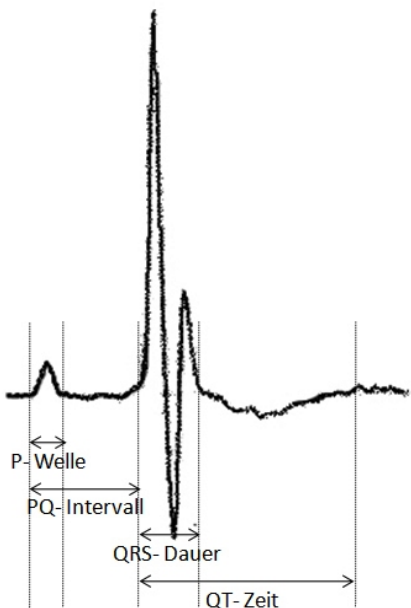
### 2.4.2 Auswertung

Die Auswertung der Oberflächen-EKGs erfolgt mit der Software „EcgAuto, Version 1.5.7.36“ (EMKA Technologies, Paris, France). Diese Software mittelt den Verlauf mehrerer Herzaktionen, um dadurch ein verbessertes Summenpotenzial zu erhalten. Anhand dieses Potenzials werden der Anfang, das Ende, der Hochpunkt und Tiefpunkt der P-Welle, die Baseline, Q, R, S, der Anfang der T-Welle, das Ende, der Hoch- und Tiefpunkt manuell festgelegt. Im Anschluss durchsucht das Programm die Aufzeichnung in vorgegebenen Intervallen automatisch nach den entsprechenden Mustern, um die Ergebnisse ausgeben zu können. Diese werden dann visuell nachkontrolliert und eventuell bei Bedarf korrigiert.

PR-Abstand	P bis R	ms
P-Dauer	Anfang P bis Ende P	ms
QRS-Dauer	Q bis S	ms
QT-Zeit	Q bis Ende T	ms
S bis Anfang T-Welle	S bis Anfang T	ms
T-Dauer	Anfang T bis Ende T	ms
RR-Abstand	R bis R	ms
Herzfrequenz	$60000 / (R \text{ bis } R)$	Schläge/min

**Tabelle 2.2: Werte aus dem EKG**

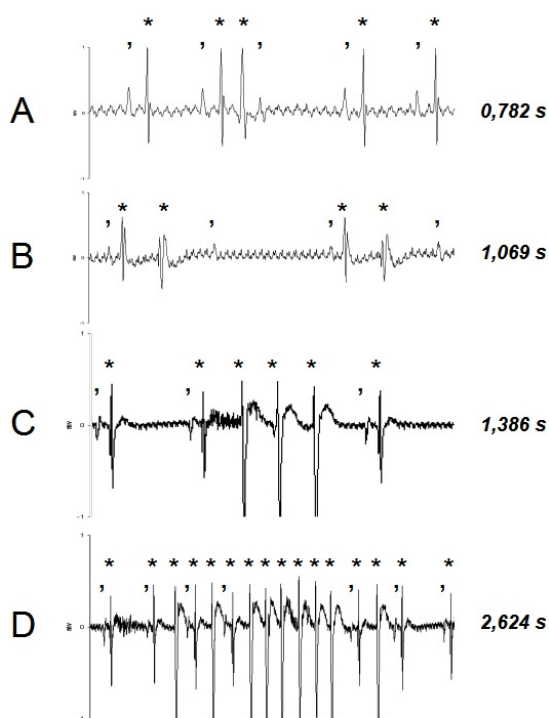
*Durch das Programm bestimmte Parameter aus dem digital aufgezeichneten EKG.*



**Abbildung 2.7: Das EKG der ΔKPQ SCN5A Maus**

Diese Auswertung kann für alle sechs EKG-Ableitungen separat durchgeführt werden. Die ausgegebenen Ergebnisse werden in einer externen Datei gespeichert und können in einer Tabellenkalkulation (EXCEL<sup>®</sup>, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) geöffnet und analysiert werden.

Zusätzlich werden die einzelnen EKG-Aufzeichnungen manuell nach Extrasystolen, Bigemini, Salven (3 und 4 Beats) und ventrikulären Tachykardien ( $\geq 5$  Beats) durchsucht, jeweils ab dem Zeitpunkt der Carbacholinjektion.



**Abbildung 2.8: Beispiele für ventrikuläre Arrhythmien im EKG**

A. Extrasystole; B. Bigemini; C. Salve; D. Ventrikuläre Tachykardie (VT)

\* ventrikuläre Herzaktion (QRS-Komplex), ' atriale Herzaktion (P-Welle)

## 2.5 Telemetrie

Die Radiotelemetrie dient der Erfassung des EKG-Signals einer lebendigen Maus in ihrem „natürlichen“ Umfeld, ohne direkte menschliche Einwirkung beziehungsweise während spezieller Tests. Dazu wird der Maus ein Transmitter implantiert, der die Potenzialänderungen am Herzen aufnimmt und dann über Funkwellen an ein Empfängersystem sendet. Dazu befindet sich der Käfig in dem sich die Maus befindet auf einer Platte, dem Transponder. Von diesem ausgehend werden die Signale über eine

Input-Matrix gefiltert und digitalisiert zu einem Computer weitergeleitet, welcher die Daten speichert und die Funktion der Transponder überwacht. Über eine Output-Matrix werden die Daten schließlich zu einem zweiten Computer geleitet, an welchem die Elektrokardiogramme mit einer speziellen Software (IOX, Version 1.8.9.4, EMKA Technologies, Paris, France) mit einer Rate von 1000 Hz aufgezeichnet und gespeichert werden.

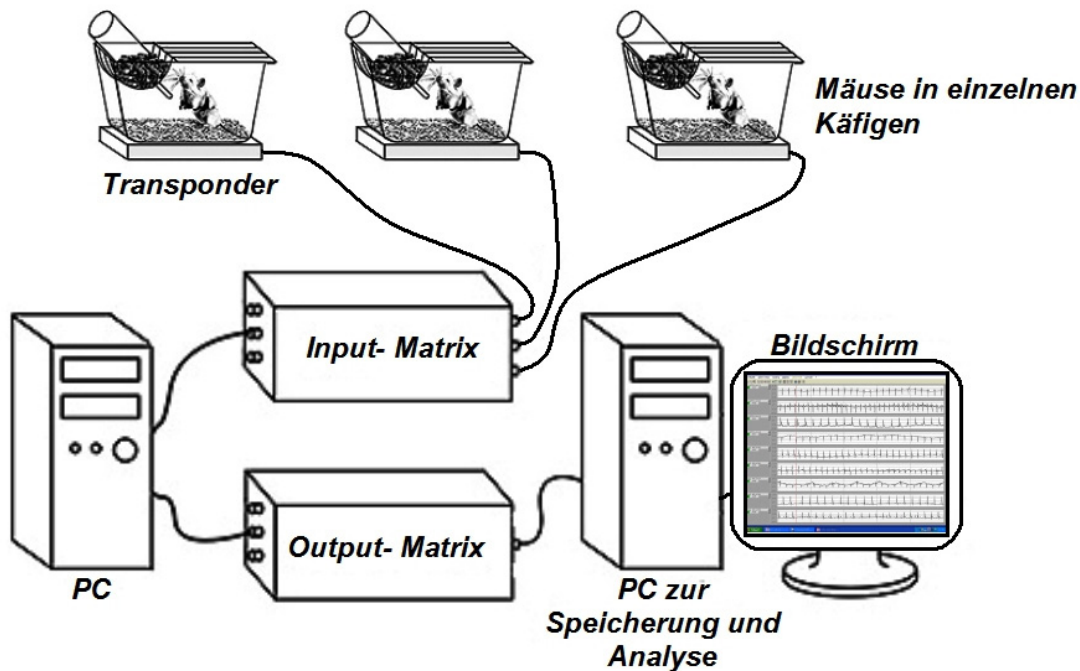


Abbildung 2.9: Aufbau der Telemetrieanlage

### 2.5.1 Der Transmitter

Der EKG-Transmitter hat ein Volumen von  $1 \text{ cm}^3$  und ein Gewicht von 4 g. Er besteht aus einer Batterie, einem Signalverstärker und der Sendeeinheit für die Radiofrequenzsignale. Ummantelt ist er von bioverträglichem Kunststoff. Vom Transmitter gehen zwei Elektroden aus. Diese bestehen aus jeweils 7 cm langen rostfreien, flexiblen Stahldrähten, die ebenfalls mit Kunststoff ummantelt sind: Die rote Elektrode ist negativ, die weiße Elektrode positiv gepolt. An- und Ausschalten lässt sich der Transmitter mithilfe eines Magneten, die Funktionsfähigkeit lässt sich mit einem normalen Radio kontrollieren. An dem Transmitter befinden sich zwei Fixierpunkte, um ihn in der Maus zu fixieren.

### 2.5.2 Die Implantation des Transmitters

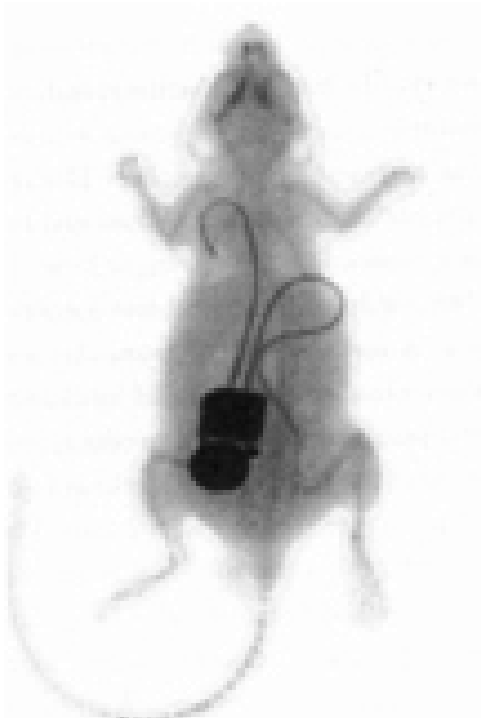
Zur Durchführung der Operation werden die Mäuse in eine Isofluran-Inhalationsnarkose versetzt (2% Isofluran, 98% Sauerstoff). Die Narkosetiefe wird, wie oben bereits beschrieben, durch den Zwischenzehenreflex geprüft. Zur Operationsvorbereitung wird das Operationsgebiet (der Bauch) rasiert und mittels Enthaarungscreme komplett von Haaren befreit.

Die Bauchdecke wird über einen medianen Bauchschnitt auf etwa 2 cm Länge eröffnet und anschließend werden zwischen der Muskulatur und dem subkutanen Fettgewebe zwei Kanäle für die Kabel des Transmitters präpariert, einer in Richtung der vorderen rechten Extremität und einer in Richtung auf den unteren Teil des linken Rippenbogens. Im Anschluss wird die Bauchhöhle durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Über diesen Zugang wird der Transmitter vorsichtig in der Bauchhöhle platziert, mit den Transmitterkabeln nach kaudal und den Fixierpunkten nach ventral zur Bauchdecke zeigend. Die Elektroden des Transmitters werden innerhalb der Bauchhöhle in einer Schleife gelegt und dann links und rechts circa 2 mm unterhalb des Schnittes in der Muskulatur nach subkutan geführt (rot (-) gleich rechts; weiß (+) gleich links). Der Transmitter wird durch die zwei Fixierpunkte an der Muskulatur mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene, 3-0) befestigt und im Anschluss wird die Muskulatur mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Elektroden werden auf die erforderliche Länge eingekürzt und die Enden mit Silikonkappen verschlossen, sodass ein kurzes Stück Elektrode zur Registrierung der Signale frei bleibt, die Gefahr der Perforation von Gewebe jedoch nicht besteht. Das rote Kabel wird durch den vorbereiteten subkutanen Kanal bis zur rechten Achselhöhle vorgeschoben und an der lateralen Bauchmuskulatur mit einer Einzelknopfnahnt fixiert. Mit dem anderen Kabel wird auf der linken Seite entsprechend verfahren, das Ende sollte im Bereich des kaudalen linken Rippenbogens liegen. Um einer Exsikkose vorzubeugen, werden in das Operationsfeld intraoperativ circa 2 ml Sterofundin gegeben. Die Hautnaht wird zum Ende der Operation mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, 5-0) fortlaufend verschlossen und mit handelsüblichem Sprühpflaster versehen, um Infektionen vorzubeugen.

Die reine Operationszeit vom Hautschnitt bis zur Hautnaht beträgt etwa 30 bis 35 min. Nach der Operation werden die Mäuse in der Aufwachphase wieder in ihren Käfig

gelegt und dieser auf einer Wärmeplatte gelagert und von Rotlicht bestrahlt. In der ersten Zeit nach der Operation wird die Maus kontinuierlich überwacht, zum einen nach dem klinischen Zustand und wenn es erforderlich ist über den Transmitter und die Telemetrie. Zusätzlich wird der Gewichtsverlauf kontrolliert.

Eine Schmerztherapie wird über 4 bis 5 Tage postoperativ mit 7mg/ kg Körpergewicht Ibuprofen im Trinkwasser oder in aufgeweichten Futterpellets durchgeführt. Bei Bedarf, wenn Infektionszeichen bestehen, wird zusätzlich über 3 Tage eine antimikrobielle Therapie mit Enrofloxacin subkutan (5mg/ kg Körpergewicht/ Tag) durchgeführt. Nach Abschluss der Wundheilung, nach circa 2 Wochen können Belastungstests durchgeführt werden.



**Abbildung 2.10: Röntgenaufnahme der Maus nach Transmitterimplantation**

### 2.5.3 Die Telemetrieaufzeichnung

Die Aufzeichnung der Radiofrequenztelemetrie entspricht der zweiten Ableitung der unipolaren Extremitätenableitung nach Einthoven (rechter Arm → linker Rippenbogen) und entspricht damit am ehesten der elektrischen Herzachse. Es gibt somit die besten Signale.

Die Dauer der Aufzeichnungen kann den Erfordernissen angepasst werden. Es können Langzeitaufzeichnungen über 24 Stunden oder mehr angefertigt werden, um ein

Tagesprofil zu erhalten. Es können aber auch Aufzeichnungen unter chronischer Medikamenteneinnahme oder auch kurze Stresstests unter physischen Stress oder unter akuter Medikamenteneinwirkung angefertigt werden.

#### 2.5.4 Medikamenteninjektion

Zur Untersuchung der Wirkung von Medikamenten werden die Tiere in ihren Käfigen mindestens 2 Stunden vor Versuchsbeginn auf die Transponderplatten gestellt, um sich an die neue Situation zu gewöhnen. Nach der Adaptationszeit werden sie 15 Minuten unter Telemetrieaufzeichnung in ihren Käfigen beobachtet. Dann werden sie für die Dauer der Injektion aus ihrem Käfig herausgenommen, erhalten 0,5 mg/ kg Körpergewicht Carbachol beziehungsweise 0,5 mg/ kg Körpergewicht Atropin intraperitoneal injiziert und werden sofort wieder zurück in den Käfig gesetzt. Eine halbe Stunde lang werden die Mäuse klinisch und über die Radiotelemetrie überwacht und Auffälligkeiten und Aktivitätsmuster der Mäuse werden dokumentiert. Im Anschluss wird die Aufzeichnung der Herzaktionen für weitere mindestens 4 ½ Stunden fortgesetzt.

#### 2.5.5 Auswertung

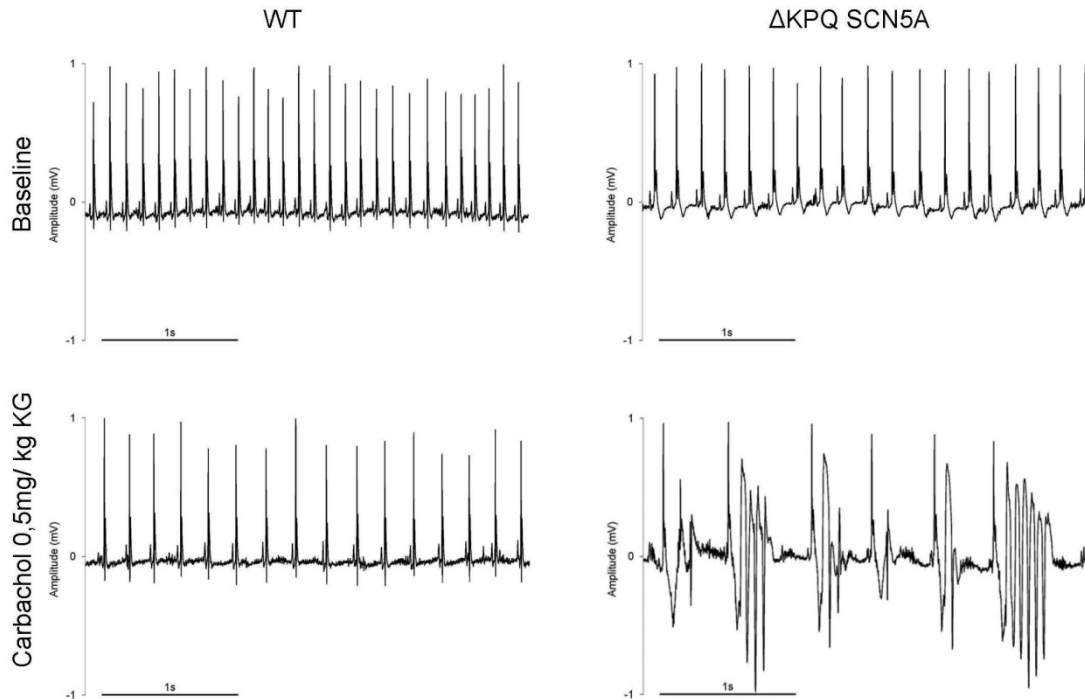
Die Auswertung der digitalen Telemetrieaufzeichnungen erfolgt mit der Software „EcgAuto, Version 1.5.7.36“ (EMKA Technologies, Paris, France) entsprechend der Auswertung des Oberflächen-EKG.

### 2.6 Statistik

Die statistische Testung der einzelnen Ergebnisse nach Genotypen oder auch nach den verschiedenen Carbacholkonzentrationen erfolgt durch den gepaarten beziehungsweise ungepaarten Student'schen t-Test (EXCEL<sup>®</sup>, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) bei quantitativen Merkmalen und den exakten Fisher Test bei qualitativen Merkmalen. Ein Unterschied wird als signifikant anerkannt, wenn  $p < 0,05$ . Alle Ergebnisse qualitativer Merkmale wurden in der Form Mittelwert plus/ minus Standardabweichung angegeben.

### 3. Ergebnisse

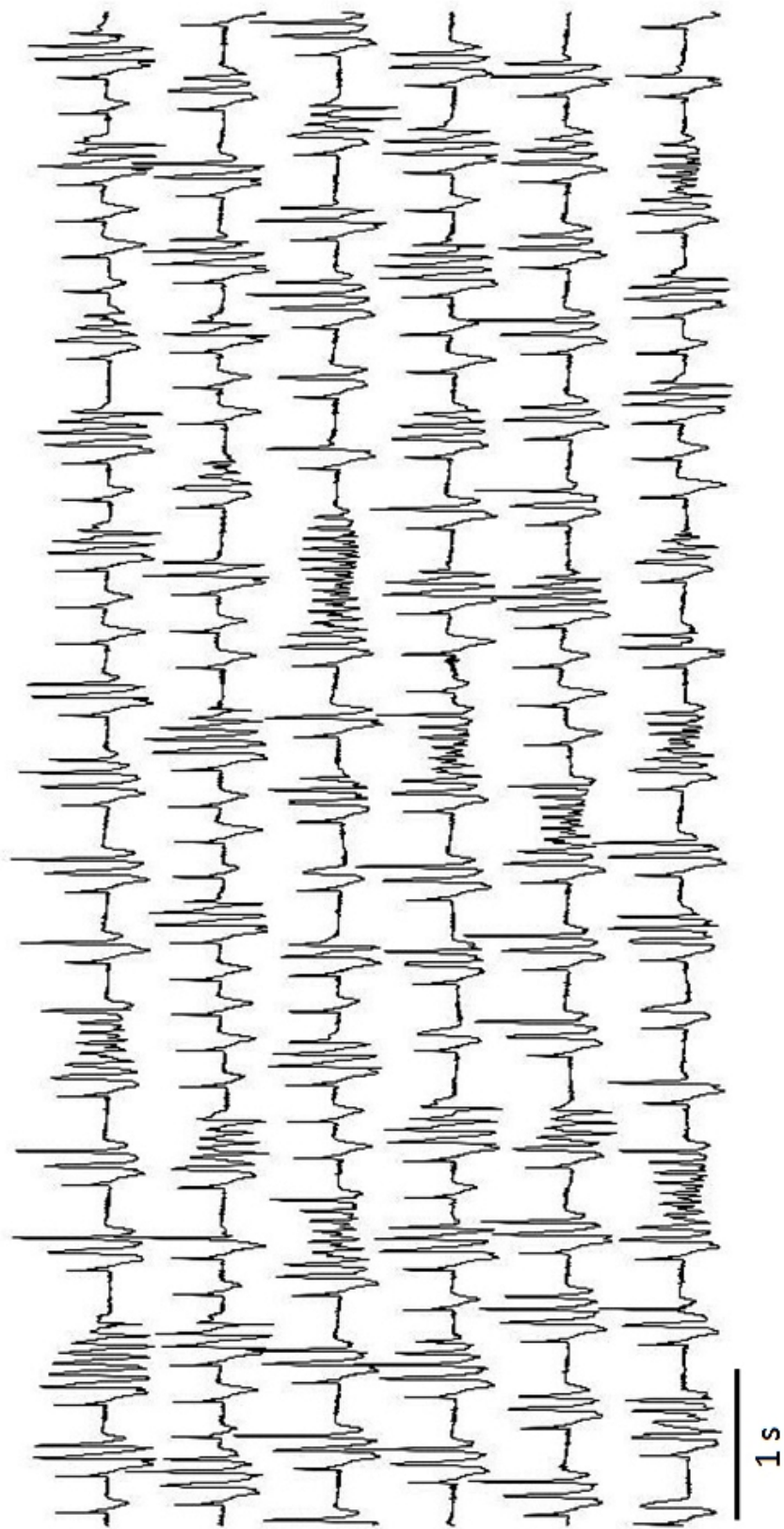
#### 3.1 Die Telemetrie



**Abbildung 3.1: Telemetrieaufzeichnung**

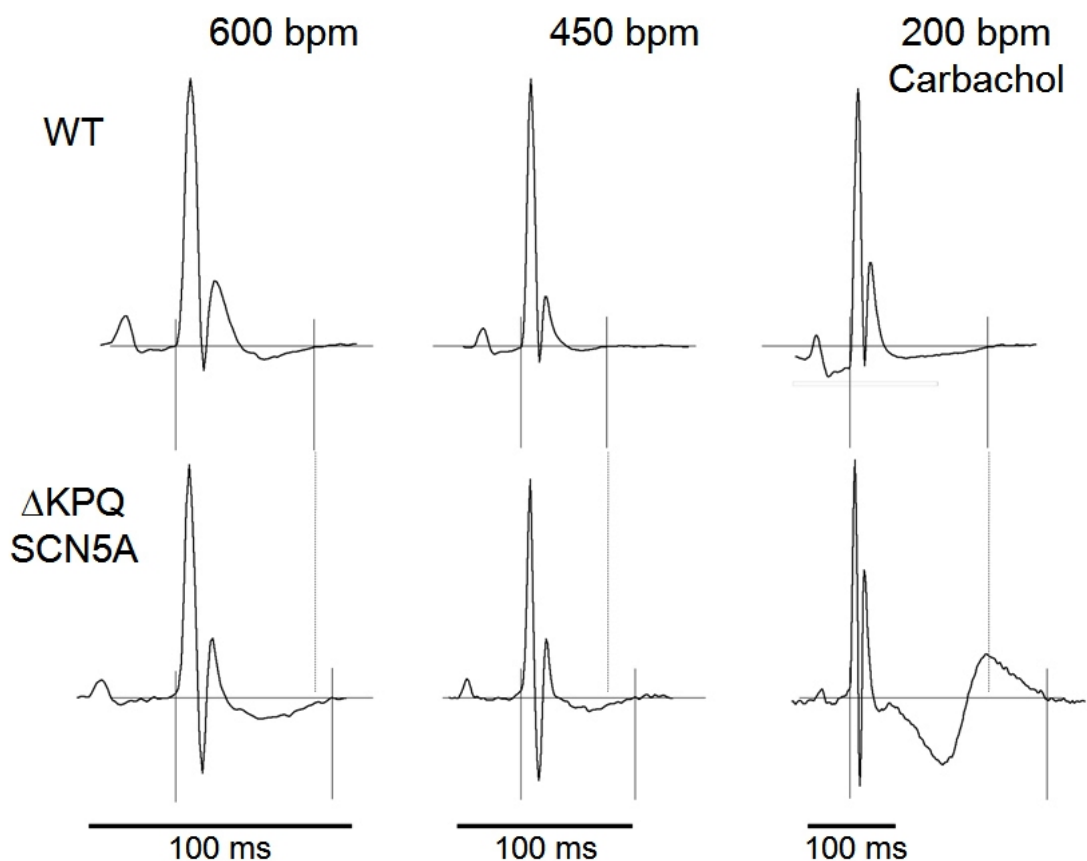
*Telemetrieaufzeichnung der WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Tiere, jeweils Baseline und unter Carbachol 0,5mg/kg Körpergewicht i.p.*

Unter 0,5 mg/ kg Körpergewicht Carbachol, intraperitoneal injiziert, zeigen  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäuse in der Telemetrie deutlich mehr Bigemini und Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes als WT Mäuse ( $p < 0,05$ ). Baseline und auch unter Carbacholwirkung zeigt kein wildtyp Tier höhergradige Arrhythmien (0 von 8), sondern lediglich gelegentliche Extrasystolen, bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren zeigen Baseline ebenfalls 0 von 8 Tieren höhergradige Arrhythmien, unter Carbachol treten diese jedoch bei 8 von 8 Tieren auf.



**Abbildung 3.2:** Torsade de Pointes artige Arrhythmie einer  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus in der Telemetrie  
*Eine Arrhythmie vom Typ der Torsade de Pointes von 10s Dauer per Line bei einer  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus in der Telemetrie.*





**Abbildung 3.3: Der Effekt der Herzfrequenz und von Carbachol auf die QT-Zeit**  
 Die QT-Zeit bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A unter verschiedenen Herzfrequenzen und Carbacholwirkung in der Telemetrie

Während der Telemetrieaufzeichnung sind die QT-Zeiten bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Tieren verlängert im Vergleich zu den wildtyp Tieren, vor allem bei niedriger Herzfrequenz. Unter Carbacholwirkung sind eine QT-Zeit Verlängerung und eine abnorme T-Wellen-Morphologie deutlich zu erkennen, wobei ebenfalls zu erkennen ist, dass unter Carbachol die Herzfrequenz deutlich verlangsamt ist.

0,5 mg/ kg KG Atropin, intraperitoneal injiziert, bewirkte bei den wildtyp Tieren einen Anstieg der Herzfrequenz von  $445 \pm 40$ / min auf  $717 \pm 16$ / min. Bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Tieren stieg die Herzfrequenz von  $439 \pm 29$ / min auf  $699 \pm 14$ / min. Es traten unter Atropinmedikation bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Tieren keine Arrhythmien auf.

### 3.2 Versuche am isolierten Herzen

Es wurden insgesamt 62 Mäuse in der Langendorff-Apparatur untersucht, davon 34 ΔKPQ SCN5A Mäuse und 28 wildtyp Mäuse.

	ΔKPQ SCN5A		WT	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
	<b>34 Mäuse</b>		<b>28 Mäuse</b>	
	<i>15 Mäuse</i>	<i>19 Mäuse</i>	<i>14 Mäuse</i>	<i>14 Mäuse</i>
Ø Körpergewicht (g)	<b>34,5 ± 1,0</b>		<b>35,5 ± 0,9</b>	
	<i>37,9 ± 0,4</i>	* <i>32,2 ± 0,2</i>	<i>36,3 ± 0,4</i>	<i>34,6 ± 0,3</i>
Ø Herzgewicht (mg)	<b>199,8 ± 5,6</b>		<b>206,4 ± 7,2</b>	
	<i>219,4 ± 2,5</i>	* <i>186,1 ± 1,2</i>	<i>219,3 ± 2,9</i>	<i>191,4 ± 1,9</i>
Ø Alter (Wochen)	<b>27,6 ± 2,5</b>		<b>29,9 ± 3,6</b>	
	<i>28,8 ± 0,8</i>	<i>26,7 ± 0,8</i>	<i>22,6 ± 0,7</i>	* <i>38,2 ± 1,8</i>

**Tabelle 3.1: Übersicht der untersuchten Mäuse in der Langendorff-Apparatur**

*Körper-, Herzgewicht und Alter sind jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. \* p < 0,05 weiblich vs. männlich*

In den verschiedenen Auswertungen tauchen nicht immer alle untersuchten Mäuse auf, da einzelne Aufzeichnungen dann im Hinblick auf den entsprechenden Aspekt nicht auswertbar waren oder die Protokolle abwichen.

	ΔKPQ SCN5A	WT
Nach Arrhythmien ausgewertet	<b>31</b>	<b>26</b>
Fixfrequente Stimulation ausgewertet	<b>20</b>	<b>17</b>
Spontane Zykluslängen ausgewertet	<b>32</b>	<b>27</b>
Spontane APDs ausgewertet	<b>26</b>	<b>22</b>

**Tabelle 3.2: Anzahl der ausgewerteten Versuche in den verschiedenen Kategorien**

In den folgenden Auswertungen tauchen n-Zahlen auf, welche teilweise größer sind als die Anzahl der Tiere, dieses lässt sich dadurch erklären, dass in einzelnen Protokollen ein Herz mit verschiedenen Carbacholkonzentrationen untersucht wurde und somit in der entsprechenden Auswertung mehrmals vorkommt.

#### 3.2.1 Konzentrationsfindung

Zur Austestung der geeigneten Konzentrationen von Kalium im Krebs-Henseleit-Puffer (Kalium 3,5 bis 5,9 mmol/ l) und Carbachol (0,1 bis 10 μmol) wurden die einzelnen

Versuche im Laufe der Versuchsreihe durch kontinuierliche Auswertung angepasst und modifiziert.

Bei 22 wildtyp (WT) und 22  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen (TG) Tieren wurden Messungen unter Kalium 5,9 mmol/l durchgeführt, bei 17 WT und 21 TG unter Kalium 4,7 mmol/l und bei 6 WT und 12 TG unter Kalium 3,5 mmol/l. Carbachol 0,1  $\mu$ mol unter Kalium 5,9 mmol/l erhielten 5 WT und 5 TG. Carbachol 1  $\mu$ mol 22 WT und 22 TG und Carbachol 0,1  $\mu$ mol 8 WT und 12 TG, jeweils unter Kalium 5,9 mmol/l. 7 WT und 4 TG Herzen wurden mit Carbachol 10  $\mu$ mol unter Carbachol 4,7 mmol/l perfundiert, 6 WT und 12 TG mit Carbachol 0,1  $\mu$ mol unter Kalium 4,7 mmol/l und gleich viel Herzen mit Carbachol 0,1  $\mu$ mol unter Kalium 3,5 mmol/l.

Es hat sich herausgestellt, dass die verschiedenen Kaliumkonzentrationen im Bereich physiologischer Werte, von Niedrignormal bis Hochnormal, unter diesen Versuchsbedingungen zu keinem signifikanten Unterschied in den Aktionspotenzialen führen. Daher können in der Auswertung die Versuche mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen zusammengefasst werden.

Die verschiedenen Carbacholkonzentrationen zeigen Effekte, auf die in den einzelnen Auswertungen an entsprechender Stelle eingegangen wird.

Zur Begrenzung der Versuchszeit wurden die zu stimulierende Zykluslängen auf die, wie sich herausgestellt hat, Wesentlichen zwischen 100 und 200 ms beschränkt.

### 3.2.2 Arrhythmien

	Bigemini (>10 Zyklen)		Salven		spontane VT/VF	
	Baseline	Carbachol	Baseline	Carbachol	Baseline	Carbachol
Anzahl der Versuche	43	42	43	42	43	43
Anzahl der Versuche mit Arrhythmien	22	34	12	23	4	13
Anzahl der Versuche ohne Arrhythmien	21	8	31	19	39	30
Versuche mit Arrhythmien in %	<b>51,16%</b>	<b>80,95%</b>	<b>27,91%</b>	<b>54,76%</b>	<b>9,30%</b>	<b>30,23%</b>

**Tabelle 3.3: Arrhythmien bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäusen im Elektrokardiogramm**

*Aufgetretene Arrhythmien (Bigemini, Salven und spontane Torsade de Pointes-artige ventrikuläre Tachykardien oder ventrikuläres Flimmern) Baseline und unter Carbacholwirkung 0,1 bis 10  $\mu$ mol, absolut und prozentual. Jeweils  $p < 0,05$  Baseline vs. Carbachol*

Arrhythmien traten unter Carbacholwirkung bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren bei Konzentrationen von 0,1  $\mu$ mol, 1  $\mu$ mol und 10  $\mu$ mol signifikant häufiger auf als unter Baselinebedingungen. 22 von 43 Versuchen zeigten Baseline Bigemini von mindestens 10 Zyklen, dagegen traten unter Carbacholwirkung bei 34 von 42 Versuchen Bigemini auf ( $p < 0,01$ ).

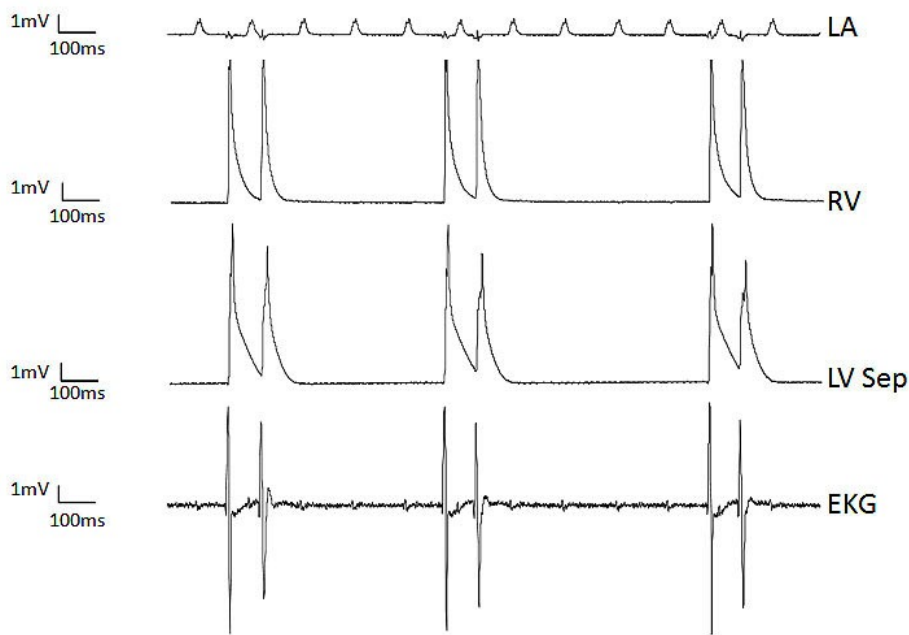
Salven waren Baseline bei 12 von 43 Versuchen, unter Carbachol bei 23 von 42 Versuchen zu beobachten ( $p < 0,05$ ). Spontane ventrikuläre Tachykardien vom Typ der Torsade de Pointes oder auch spontanes Kammerflimmern traten bei 4 von 43 Versuchen Baseline auf und bei 13 von 43 unter Carbachol ( $p < 0,05$ ) auf.

Im Folgenden sind zwei Beispiele für eine kurze polymorphe ventrikuläre Tachykardie und einer Episode von Bigemini am isolierten Herzen in der Langendorff-Versuchsanordnung dargestellt.



**Abbildung 3.4: Beispiel einer kurzen polymorphen VT am isolierten Herzen**

*Simultan aufgezeichnete Signale während einer kurzen polymorphen ventrikulären Tachykardie unter Carbachol bei einer  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Maus. LV= freie Wand des linken Ventrikels; LV Sep= linksventrikuläres Septum; EKG= Ableitung entspricht einem Elektrokardiogramm*



**Abbildung 3.5: Beispiel eines Bigeminus am isolierten Herz**

*Simultan aufgezeichnete Signale während eines Bigeminus unter Carbachol bei einer  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Maus. LA= Atrium links; RV= freie Wand des rechten Ventrikels; LV Sep= linksventrikuläres Septum; EKG= Ableitung entspricht einem Elektrokardiogramm.*

*Der Bigeminus tritt auf während einer Phase des kompletten atrioventrikulären Blockes (AV-Block  $\circ$ 3), da die Vorhofssignale in einer physiologischen Frequenz weiter laufen ohne Überleitung auf die Kammern.*

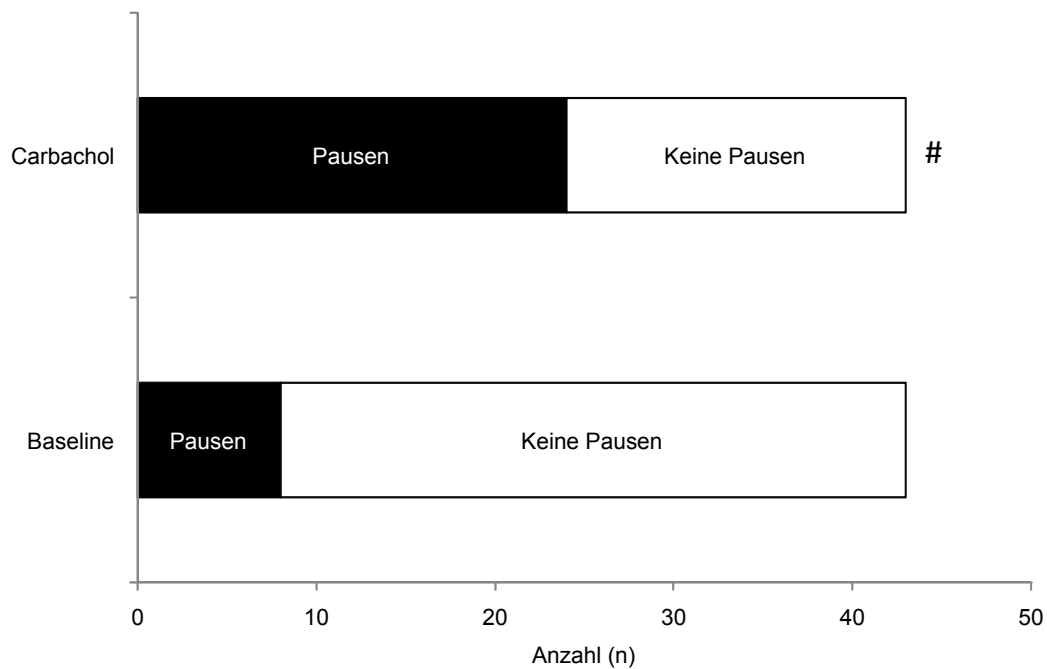
### 3.2.3 Pausen

Pausen mit einer Dauer von über 10 Sekunden zeigten sich am isolierten Herzen in der Langendorff-Apparatur bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäusen unter Kontrollbedingungen bei 8 von 43 Versuchen und unter Carbachol 0,1  $\mu$ mol bis 10  $\mu$ mol insgesamt bei 24 von 43 Versuchen ( $p < 0,01$ ).

	<i>Baseline</i>	<i>Carbachol</i>			insgesamt*
		0,1 $\mu$ mol	1 $\mu$ mol*	10 $\mu$ mol <sup>#</sup>	
Versuche	43	31	21	13	43
Pausen	8	11	11	7	24
keine Pausen	35	20	10	6	19
	<b>18,60%</b>	<b>35,48%</b>	<b>52,38%</b>	<b>53,85%</b>	<b>55,81%</b>

**Tabelle 3.4: Pausen bei  $\Delta$ KPQ SCN5A**

*Pausen mit einer Dauer von über 10 Sekunden am isolierten Herz bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren. <sup>#</sup>  $p < 0,05$  Carbachol vs. Baseline, \* $p < 0,01$  Carbachol vs. Baseline*



**Abbildung 3.6: Pausen über 10s Länge bei ΔKPQ SCN5A**  
 #  $p < 0,01$  Carbachol 0,1 bis 10 μmol vs. Baseline

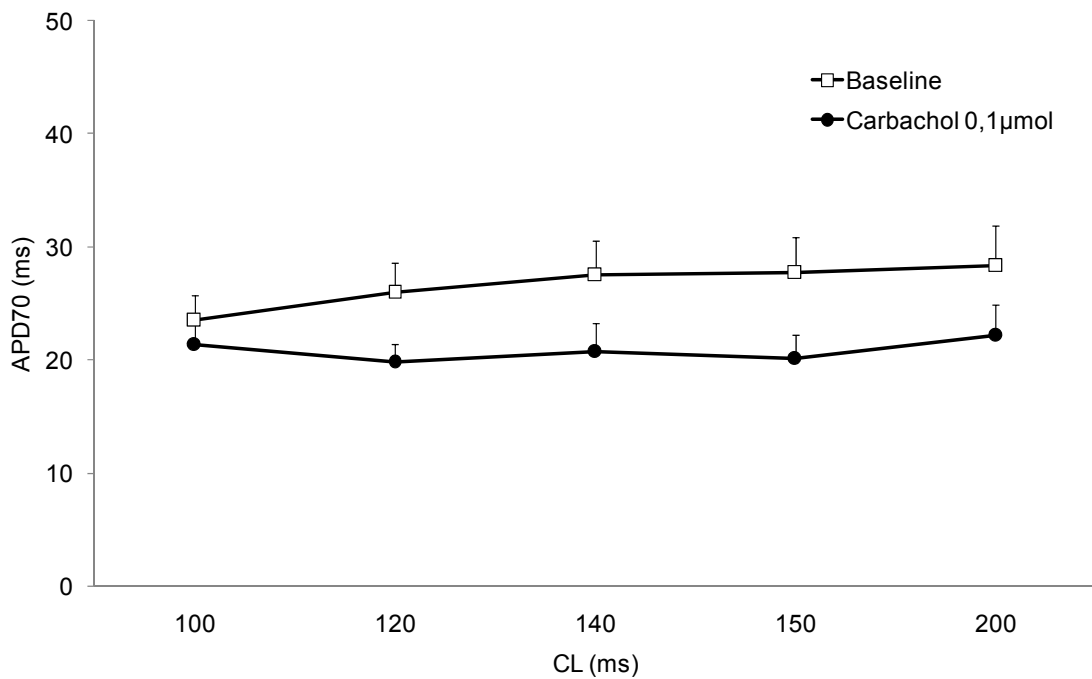
### 3.2.4 Fixfrequente Stimulation

Unter den Bedingungen der fixfrequenten Stimulation konnte bei den ΔKPQ SCN5A Herzen unter Carbacholwirkung keine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer festgestellt werden. Eher eine tendenzielle Verkürzung ist unter Carbachol aufgetreten.

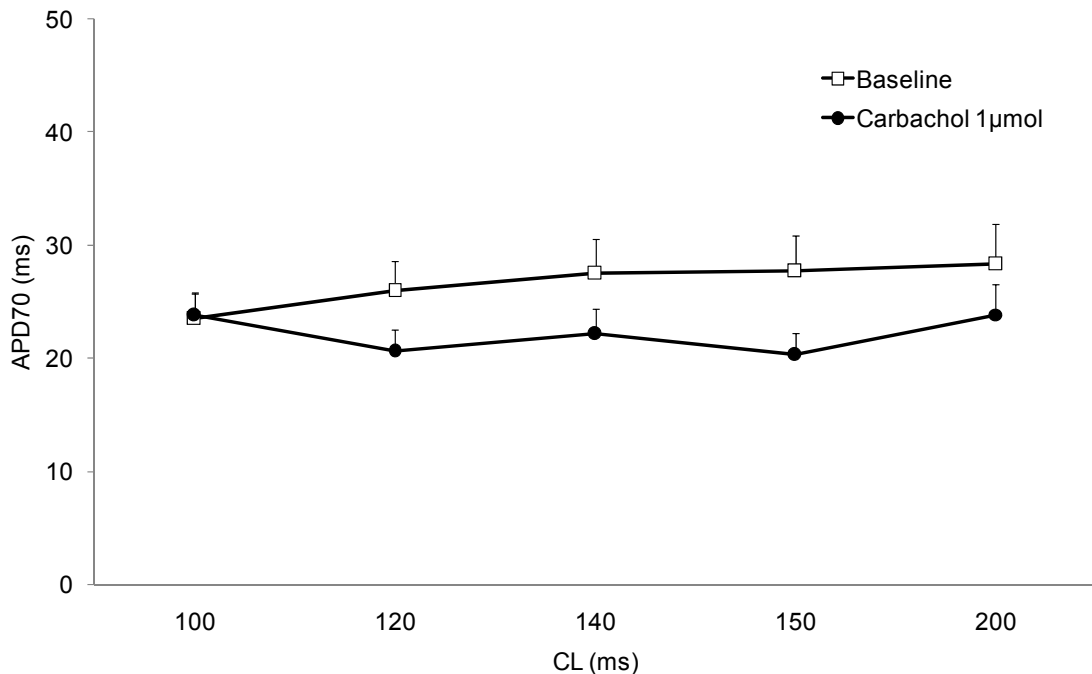
		100ms CL	120ms CL	140ms CL	150ms CL	200ms CL
ΔKPQ SCN5A	baseline	42 ms ± 3	46 ms ± 3	49 ms ± 4	49 ms ± 4	53 ms ± 5
	Carbachol 0,1 μmol	37 ms ± 4	37 ms ± 3#	40 ms ± 5	40 ms ± 4*	41 ms ± 3
	Carbachol 1 μmol	45 ms ± 2	42 ms ± 3	45 ms ± 3	42 ms ± 3	46 ms ± 4
<b>APD 90</b>						
WT	baseline	40 ms ± 2	40 ms ± 2	41 ms ± 2	42 ms ± 2	47 ms ± 3
	Carbachol 0,1 μmol	33 ms ± 2#	31 ms ± 3#	32 ms ± 2#	28 ms ± 2#	33 ms ± 3#
	Carbachol 1 μmol	42 ms ± 3	42 ms ± 3	44 ms ± 4	44 ms ± 4	46 ms ± 3
ΔKPQ SCN5A	baseline	24 ms ± 2	26 ms ± 3	28 ms ± 3	28 ms ± 3	28 ms ± 4
	Carbachol 0,1 μmol	21 ms ± 3	20 ms ± 2	21 ms ± 3	20 ms ± 2*	22 ms ± 3*
	Carbachol 1 μmol	24 ms ± 2	21 ms ± 2	22 ms ± 2	20 ms ± 2	24 ms ± 3
<b>APD70</b>						
WT	baseline	23 ms ± 2	23 ms ± 2	22 ms ± 2	22 ms ± 2	27 ms ± 2
	Carbachol 0,1 μmol	17 ms ± 1#	15 ms ± 2#	16 ms ± 1#	14 ms ± 0#	15 ms ± 2#
	Carbachol 1 μmol	23 ms ± 3	20 ms ± 2	19 ms ± 3	20 ms ± 3	20 ms ± 2

**Tabelle 3.5: APD70 und APD90 bei fixfrequenter Stimulation**

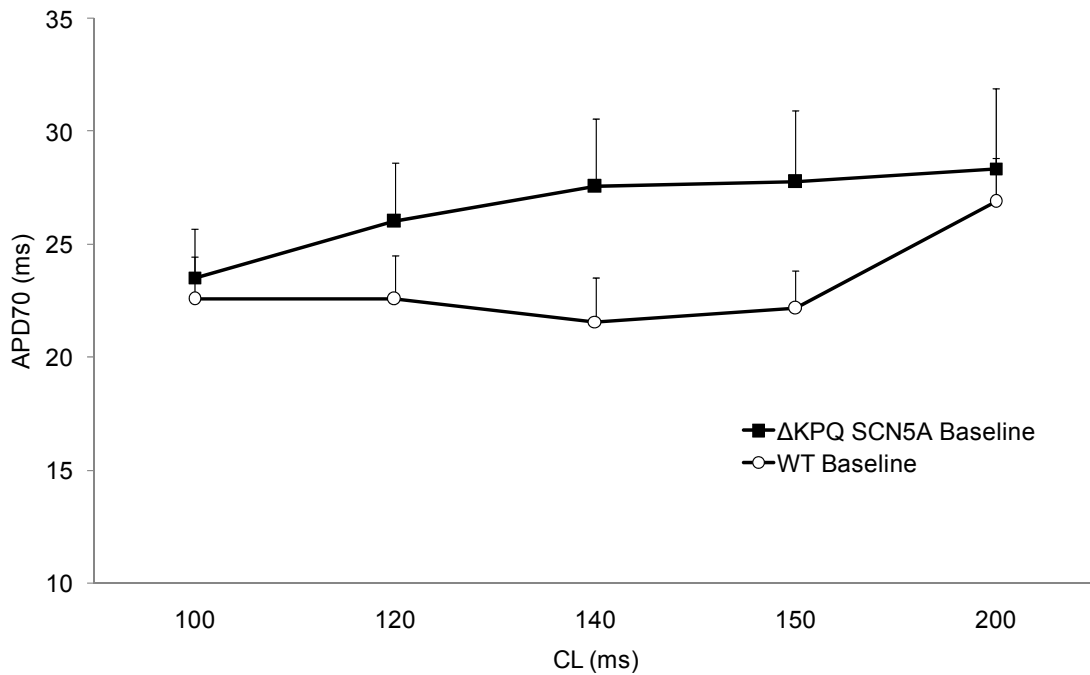
Dargestellt sind die APD70 und APD90 bei ΔKPQ SCN5A und WT Tieren, jeweils Baseline und unter Carbachol 0,1 μmol und Carbachol 1 μmol bei Zykluslängen von 100ms, 120ms, 140ms, 150ms und 200ms. Jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung, \*  $p < 0,05$  ΔKPQ SCN5A vs. WT; #  $p < 0,05$  Carbachol 0,1 oder 1 μmol vs. Baseline



**Abbildung 3.7: Fixfrequente Stimulation Carbachol 0,1µmol versus Baseline bei  $\Delta$ KPQ SCN5A**  
 Dargestellt ist die APD70 bei verschiedenen Zykluslängen. Unter Carbachol 0,1µmol ist die APD70 im Vergleich zu Baseline tendenziell verkürzt, aber nicht verlängert (jeweils  $p > 0,05$ ).

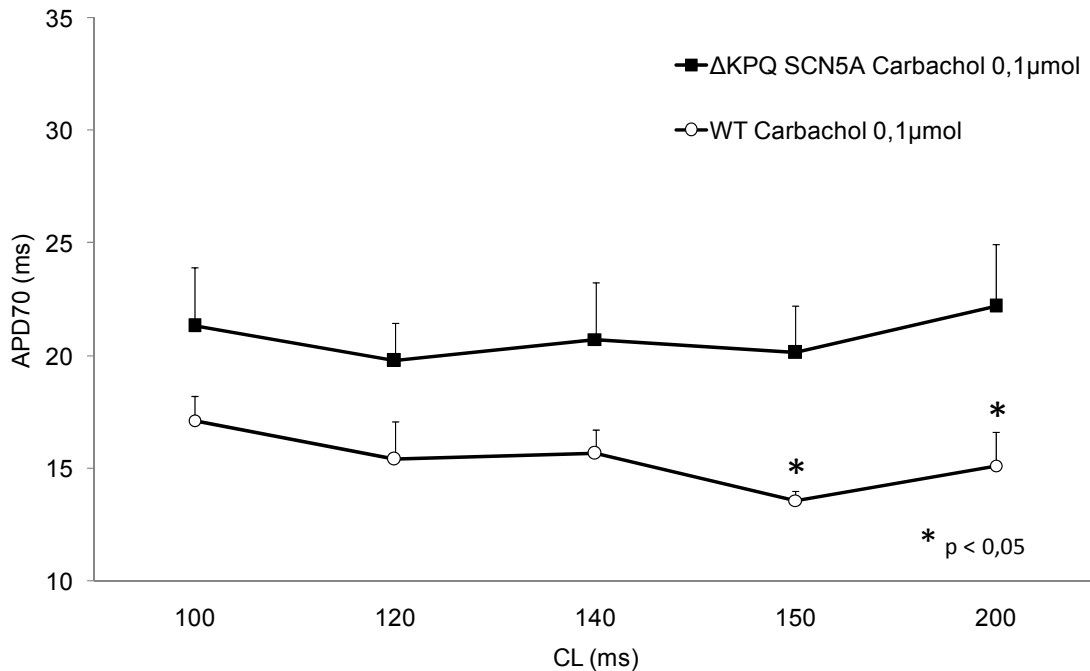


**Abbildung 3.8: Fixfrequente Stimulation Carbachol 1µmol versus Baseline bei  $\Delta$ KPQ SCN5A**  
 Dargestellt ist die APD70 bei verschiedenen Zykluslängen. Unter Carbachol 1µmol ist die APD70 im Vergleich zu Baseline tendenziell verkürzt, aber nicht verlängert (jeweils  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3.9: Fixfrequente Stimulation  $\Delta$ KPQ SCN5a versus WT, Baseline**

Dargestellt ist die APD70 bei kurzen Zykluslängen. Baseline haben die  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen eine tendenziell längere APD70 als die WT Herzen (jeweils  $p > 0,1$ ).



**Abbildung 3.10: Fixfrequente Stimulation  $\Delta$ KPQ SCN5a versus WT, Carbachol 0,1μmol**

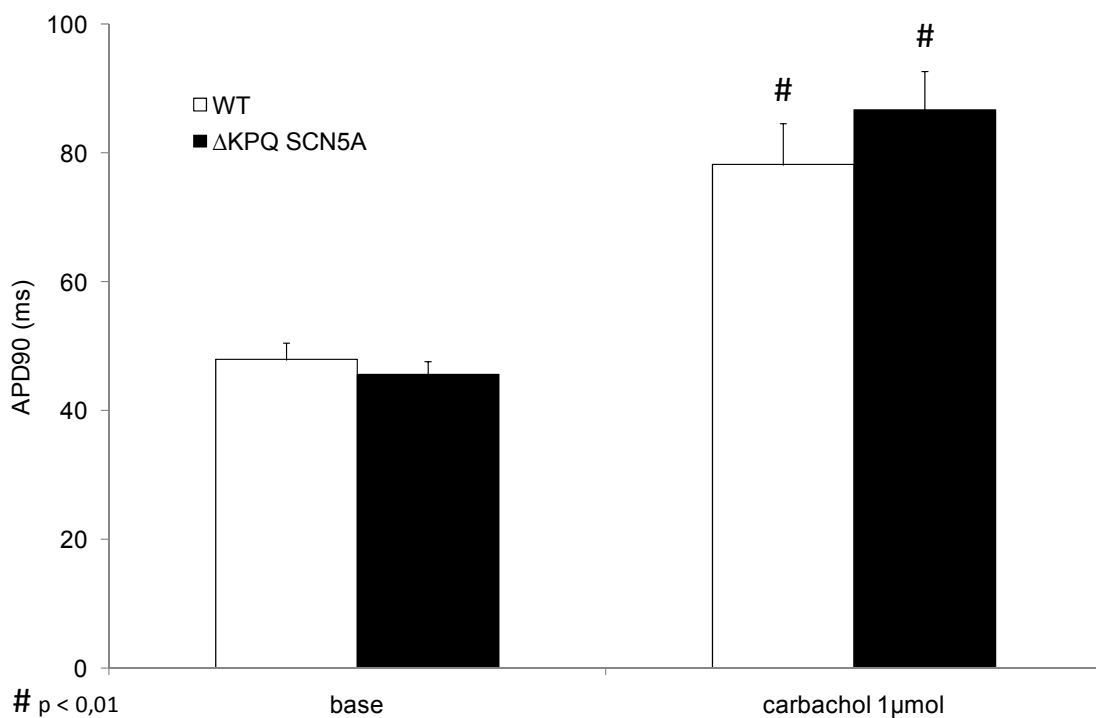
Dargestellt ist die APD70 bei kurzen Zykluslängen. Unter Carbachol 0,1μmol zeigen die  $\Delta$ KPQ SCN5A bei den Zykluslängen 100ms, 120, 140ms eine tendenziell längere APD70 als die WT Herzen ( $p > 0,05$ ), bei den Zykluslängen 150ms und 200ms eine signifikant längere APD70 ( $p < 0,05$ ).



Es wurden alle Versuche ohne AV-Block und daher bei relativ kurzen Zykluslängen durchgeführt. Bei sehr langsamen Zykluslängen ( $> 200$  ms) ist die Aktionspotenzialdauer sehr wohl verlängert. [14]

### 3.2.5 Spontane ventrikuläre Zykluslängen und APDs

Unter Kontrollbedingungen ist kein Unterschied der APD90 zwischen WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen zu erkennen,  $48 \pm 3$ ms versus  $46 \pm 2$ ms. 5 Minuten nach Beginn der Carbacholinfusion zeigen die transgenen Herzen unter Bradykardie eine tendenziell längere APD90 als die WT Herzen,  $78 \pm 6$ ms versus  $87 \pm 6$ ms. Dabei ist die Bradykardie nicht durch einen AV-Block getriggert.



**Abbildung 3.11: Spontane APD90 bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A**

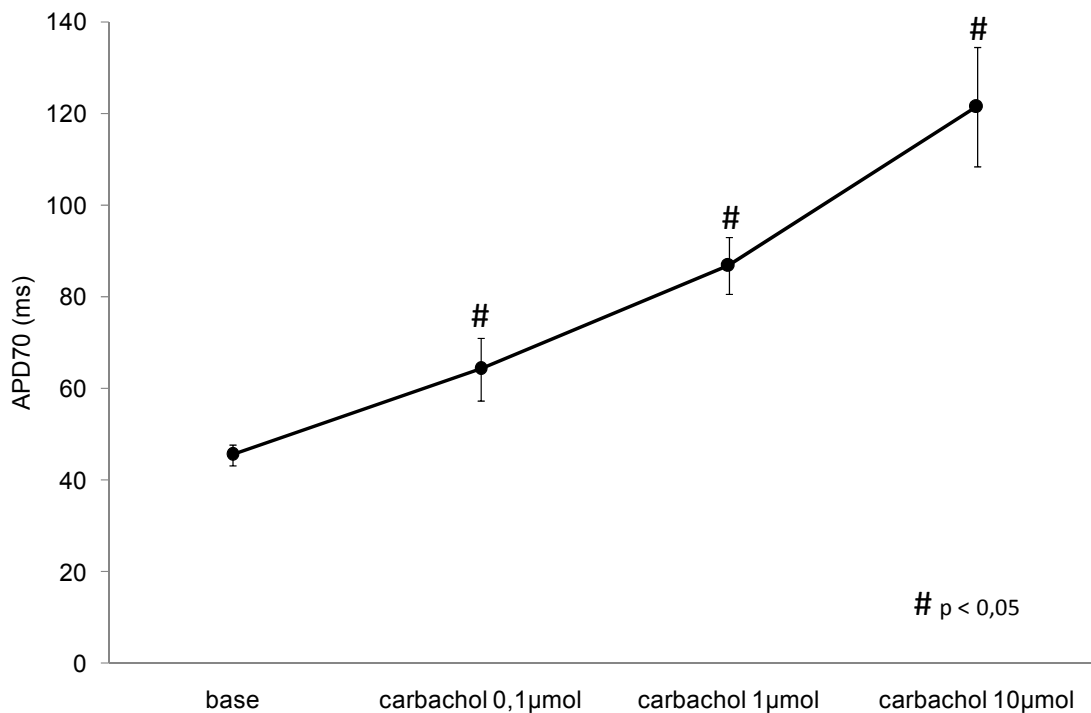
*Gezeigt ist die spontane APD90 Baseline und 5min nach Beginn der Carbacholinfusion 1  $\mu$ mol bei den WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen.*

Die Steigerung der APD90 bei den transgenen Herzen ausgehend von einem Baselinewert von 46ms beträgt unter Carbachol 0,1  $\mu$ mol 41%, unter Carbachol 1  $\mu$ mol 90% und unter Carbachol 10  $\mu$ mol 167%.

	APD90	Prozentualer Anstieg
Baseline	46 ± 2ms	0%
Carbachol 0,1µmol	64 ± 7ms	41%
Carbachol 1µmol	87 ± 6ms	90%
Carbachol 10µmol	121 ± 13ms	167%

**Tabelle 3.6: Anstieg der spontanen APD90 bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen**

Bei allen Herzen ist eine Zunahme der Zykluslängen unter Carbachol, 5min nach Beginn der Carbacholinfusion, zu beobachten. Diese Bradykardie ist nicht durch einen AV-Block getriggert. Die  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen zeigen eine baseline Zykluslänge von 233ms. Unter Carbachol 0,1µmol tritt eine Zunahme von 216% auf 737ms auf, unter Carbachol 1µmol eine Zunahme von 371% auf 1100ms und unter Carbachol 10µmol eine Zunahme von 406% auf 1182ms, jeweils ist  $p < 0,05$ . Die WT Herzen haben eine baseline Zykluslänge von 206ms. Die Steigerungen der Zykluslängen betragen bei Carbachol 0,1µmol 93% (auf 397ms), bei Carbachol 1µmol 162% (auf 540ms) und bei Carbachol 10µmol 205% (auf 627ms), jeweils mit  $p < 0,05$ .

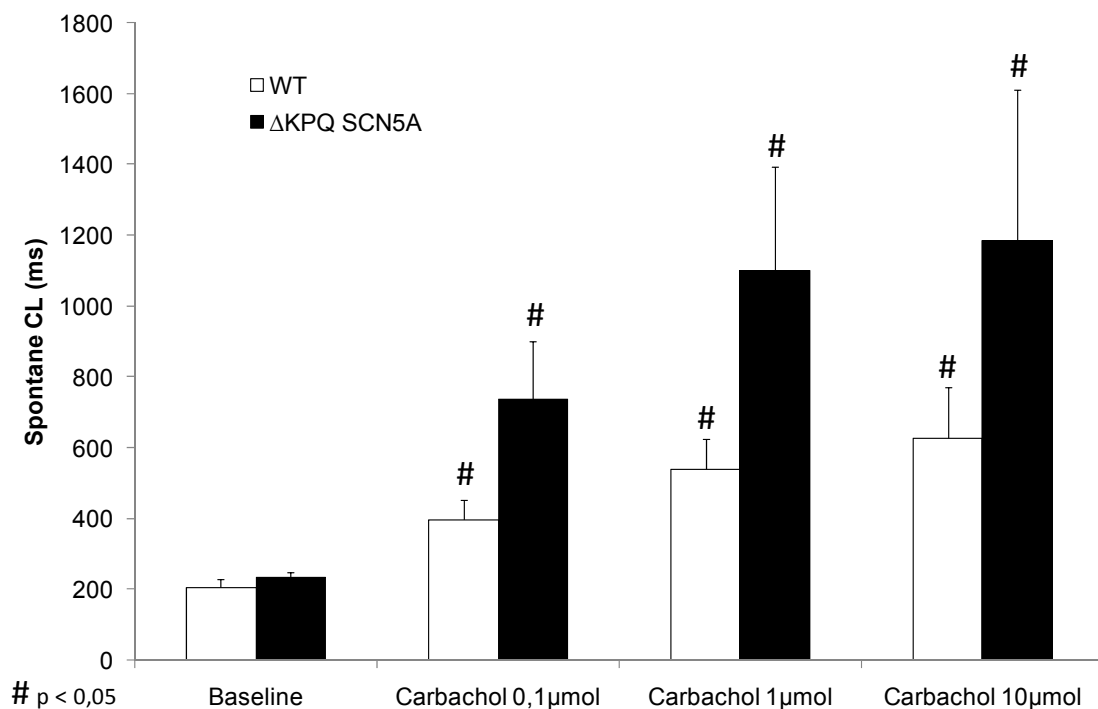


**Abbildung 3.12: Anstieg der spontanen APD90 bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen**

*Die spontane APD90 bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen Baseline und bei steigender Carbacholkonzentration 0,1 µmol bis 10µmol, #  $p < 0,05$*

Der Anstieg der Zykluslängen ist bei den transgenen Herzen bei den niedrigen Carbacholkonzentrationen tendenziell stärker ausgeprägt als bei den WT Herzen (Baseline vs. Carbachol 0,1µmol p = 0,06; vs. Carbachol 1µmol p = 0,09; vs. Carbachol 10µmol p = 0,29)

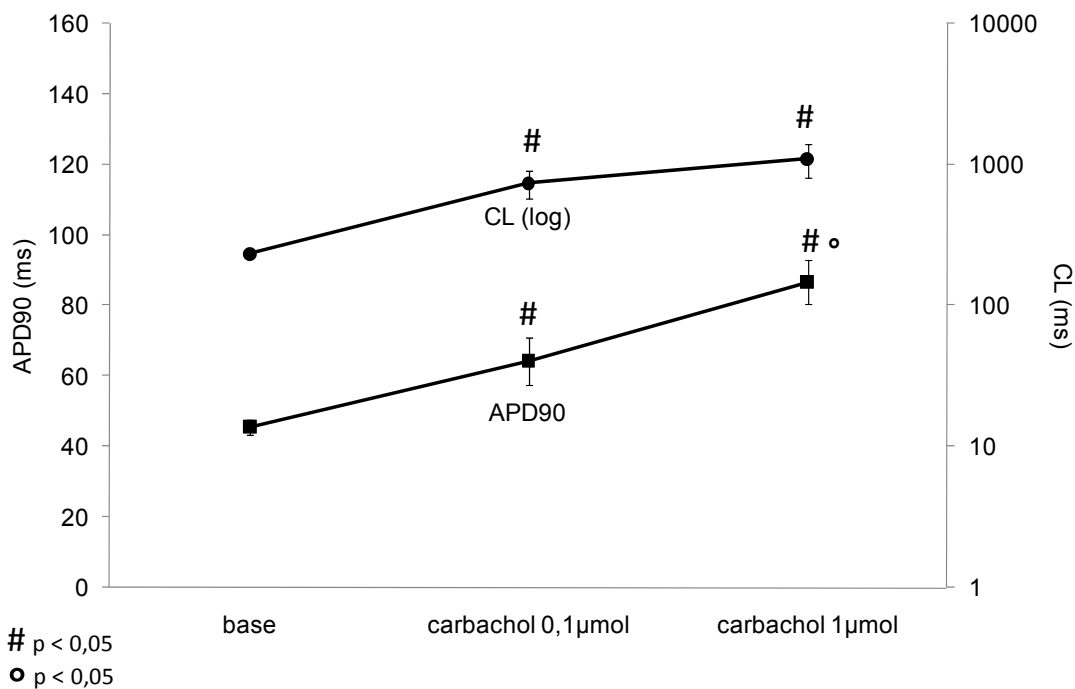
Zykluslängen über 5 Sekunden Dauer sind in dieser Berechnung nicht berücksichtigt, da bei diesen nicht mehr von regelmäßigen Herzaktionen ausgegangen werden kann, sondern sie kommen durch lange Pausen zustande.



**Abbildung 3.13: Spontane Zykluslängen**

*Dargestellt sind die spontanen Zykluslängen der ΔKPQ SCN5A und WT Herzen, jeweils Baseline, unter Carbachol 0,1µmol, 1µmol und 10µmol. # p < 0,05*

Die gemeinsame Betrachtung der Aktionspotenzialdauer und der Zykluslänge bei den ΔKPQ SCN5A Herzen zeigt eine Zunahme beider Parameter unter Carbachol 0,1µmol und Carbachol 1µmol (p < 0,05). Von Carbachol 0,1µmol zu 1µmol ist jeweils eine tendenzielle Zunahme zu erkennen.



**Abbildung 3.14: Spontane APD90 und Zykluslängen**

Der obere Graph zeigt die Zykluslängen, in logarithmischer Darstellung, der untere Graph zeigt die APD90. Beides jeweils Baseline, unter Carbachol 0,1 µmol und 1 µmol, # p < 0,05 Baseline vs. Carbachol 0,1 bzw. 1 µmol, ° p < 0,05 Carbachol 0,1 vs. 1 µmol.

### 3.3 Das Elektrokardiogramm unter Narkose

Es wurde an insgesamt 31 Tieren ein Elektrokardiogramm in Narkose abgeleitet. Darunter befanden sich 19 ΔKPQ SCN5A transgene Mäuse und 12 wildtyp Mäuse. In die Auswertung der Arrhythmien flossen die Ergebnisse von 17 transgenen und 11 Wildtyp Mäusen ein, in die der gemessenen Zeiten und Intervalle die Ergebnisse von 19 transgenen und 11 Wildtyp Tieren. Unterschiedliche Zahlen ergeben sich daher, dass nicht alle Aufzeichnungen für jede Auswertung geeignet waren.

#### 3.3.1 Arrhythmien

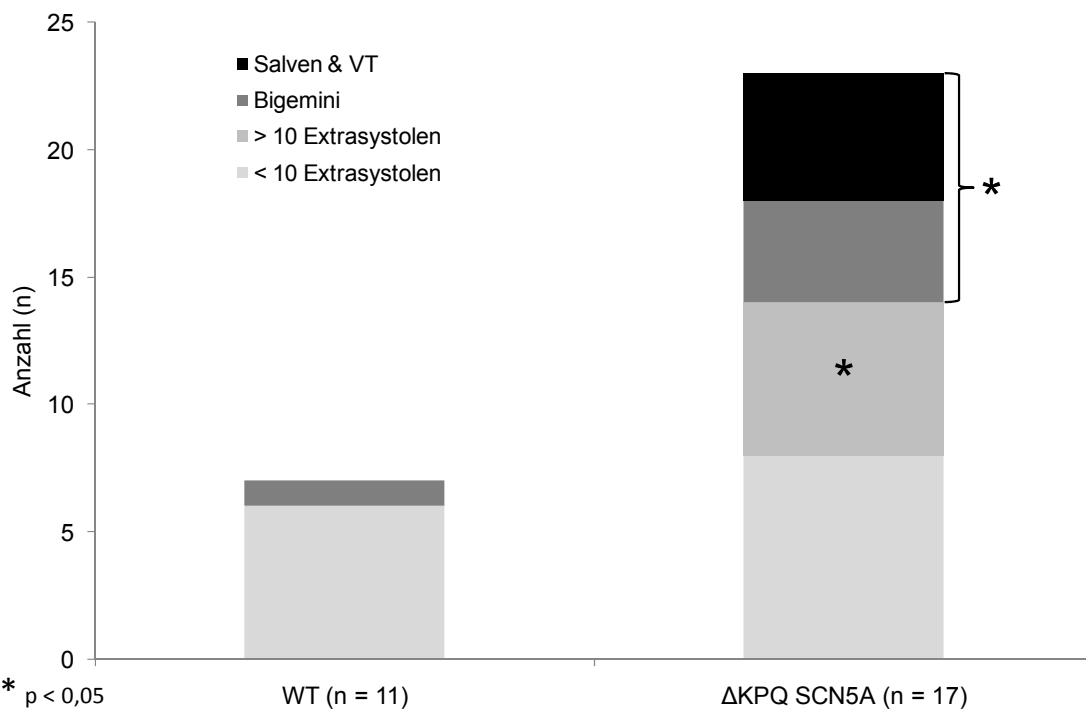
Nach der Injektion von 0,5mg/ kg Körpergewicht Carbachol zeigten Wildtyp und ΔKPQ SCN5A Tiere keinen deutlichen Unterschied bei dem Auftreten vereinzelter Extrasystolen, weniger als 10 Extrasystolen in den 10 min Aufzeichnung. Mehr als 10 Extrasystolen traten bei den ΔKPQ SCN5A signifikant häufiger auf (p < 0,05). Höhergradige Arrhythmien wie Bigemini, Salven und ventrikuläre Tachykardien zeigten die transgenen Tiere insgesamt häufiger als die Wildtyp Tiere (p < 0,05).

Während der kurzen Baselineaufzeichnung zu Beginn der Versuche traten in beiden Gruppen lediglich vereinzelte ventrikuläre Extrasystolen auf.

	< 10 Extrasystolen		> 10 Extrasystolen		Bigemini		Salven & VT	
	WT	$\Delta$ KPQ SCN5A	WT	$\Delta$ KPQ SCN5A	WT	$\Delta$ KPQ SCN5A	WT	$\Delta$ KPQ SCN5A
Anzahl der Mäuse	11	17	11	17	11	17	11	17
Anzahl der Arrhythmien	6	8	0	6	1	4	0	5
%	55%	47%	0%	35%	9%	24%	0%	29%

**Tabelle 3.7: Arrhythmien im EKG unter Carbachol 0,5mg/ kg KG**

*Arrhythmien bei  $\Delta$ KPQ SCN5A und WT Mäusen unter Isoflurannarkose in den 10 Minuten nach Carbacholinjektion.*



**Abbildung 3.15: Arrhythmien im EKG unter Carbachol 0,5mg/ kg KG**

*Aufgetretene Arrhythmien im EKG bei den WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren unter Isoflurannarkose in der Zeit 10min nach Carbacholinjektion.*

*\*  $p < 0,05$   $\Delta$ KPQ SCN5A vs. WT*



**Abbildung 3.16: Beispiel einer ventrikulären Tachykardie unter Carbachol im EKG**

*Eine ventrikuläre Tachykardie im EKG bei einer  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Maus unter Carbachol 0,5mg/ kg KG. Dargestellt sind die Ableitungen I, II, III, aVR, aVL, aVF. Ein Artefakt, hervorgerufen durch ein Atemzug ist markiert. Eingetragen sind die Zykluslängen in ms.*

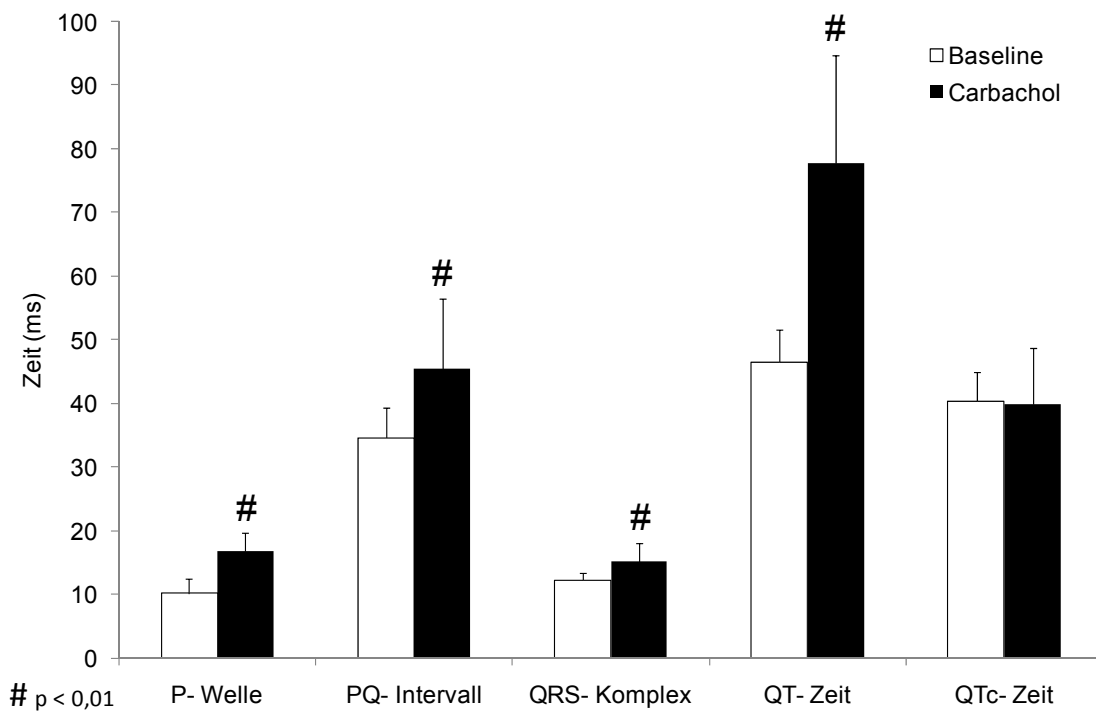
*↓ letzte P-Welle vor der Arrhythmie, \* letzter QRS-Komplex vor der Arrhythmie*

### 3.3.2 Zeiten und Intervalle im EKG

Die Gabe von 0,5mg/ kg KG Carbachol unter Isoflurannarkose führte zu einem signifikanten Anstieg der Länge der P-Welle, des PQ-Intervalls, der Länge des QRS-Komplexes und der QT-Zeit bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren ( $p < 0,01$ ). Gleichzeitig tritt eine signifikante Verlangsamung der Herzfrequenz auf ( $p < 0,01$ ).

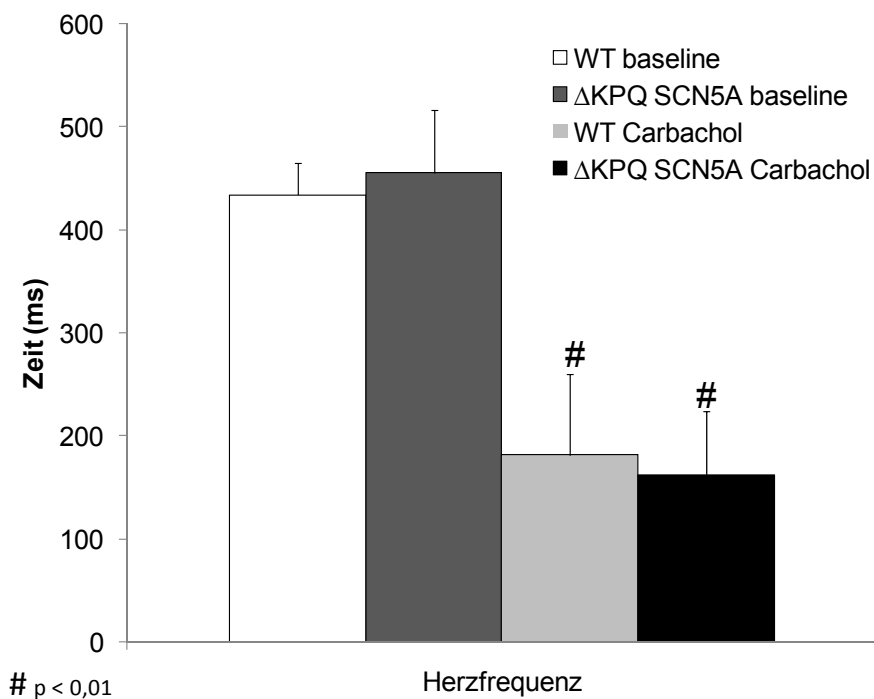
Die frequenzkorrigierte QT-Zeit (QTc) zeigt keinen Unterschied zwischen Baseline und Carbachol ( $p = 0,83$ ). Somit ist die Verlängerung der absoluten QT-Zeit mit der Verringerung der Herzfrequenz zu erklären.

Im Vergleich mit den Wildtyp Tieren zeigen die  $\Delta$ KPQ SCN5A Tiere keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Herzfrequenz und die QT-Zeit. In den Kontrollgruppen zeigen die  $\Delta$ KPQ SCN5A Tiere eine tendenziell höhere Herzfrequenz und unter Carbacholeinwirkung einen tendenziell stärkeren Abfall. Die QT-Zeiten sind jeweils tendenziell geringfügig verlängert bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A.



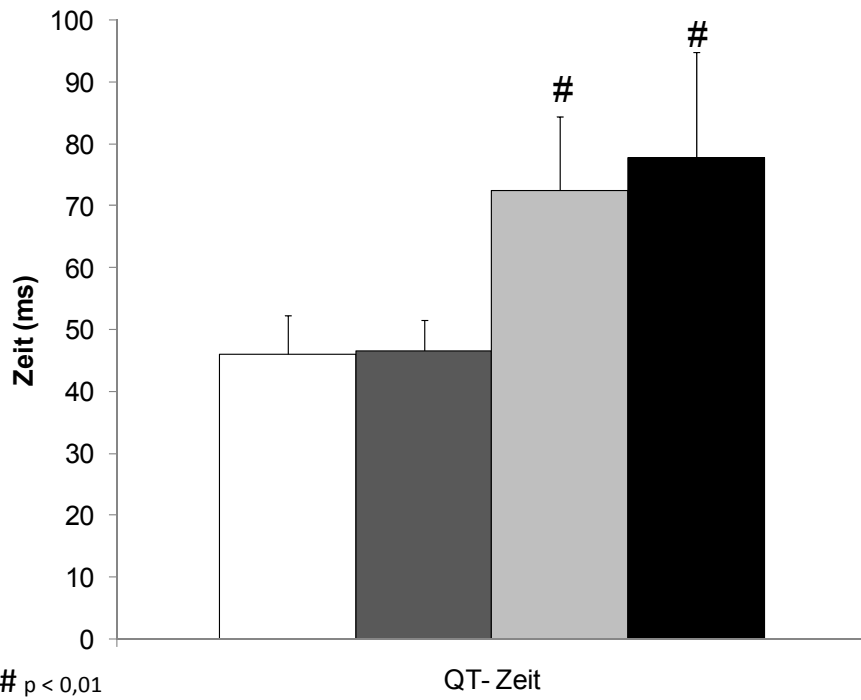
**Abbildung 3.17: Gemessene Zeiten im EKG bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A**

Gemessenen Zeiten im EKG in Isoflurannarkose Baseline und nach der Injektion von 0,5mg/ kg KG Carbachol, #  $p < 0,01$  Baseline vs. Carbachol



**Abbildung 3.18: Herzfrequenz bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren im EKG**

Vergleich der Herzfrequenzen im EKG in Isoflurannarkose Baseline und nach der Injektion von 0,5 mg/ kg KG Carbachol bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäusen, #  $p < 0,01$  Baseline vs. Carbachol



**Abbildung 3.19: QT-Zeit bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Tieren im EKG**

*Vergleich der QT-Zeit im EKG in Isoflurannarkose Baseline und nach der Infektion von 0,5 mg/kg KG Carbachol bei WT und  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäusen, # p < 0,01 Baseline vs. Carbachol*



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die parasymphatische Stimulation am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus, induziert durch das direkte Parasympathomimetikum Carbachol eine Bradykardie, vermehrte Bigemini und Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes bei frei laufenden Tieren verursacht. Dabei ist auffällig, dass nicht das ventrikuläre Aktionspotenzial des  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen an sich verlängert ist, sondern dass primär durch die parasymphatische Stimulation eine Verlängerung der ventrikulären Zykluslänge auftritt und dass es dadurch sekundär zu einer verlängerten Aktionspotenzialdauer kommt, welche frequenzabhängig ist.

Dieser Sachverhalt wird dadurch deutlich, da es bei den isolierten  $\Delta$ KPQ SCN5A Herzen zu keiner Verlängerung des ventrikulären Aktionspotenzials in Phasen der fixfrequenten Stimulation, im Bereich physiologischer Zykluslängen, unter Carbachol kommt. Die Dauer der spontanen ventrikulären Aktionspotenziale unter Carbachol ist jedoch signifikant verlängert im Vergleich zu Baselinebedingungen, wobei gleichzeitig auch die Zykluslängen der ventrikulären Aktionspotenziale signifikant verlängert sind. Dieses deutet darauf hin, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen der verlängerten Aktionspotenzialdauer und der verlängerten Zykluslänge gibt.

Weiterhin sahen wir in vivo unter Atropin eine Zunahme der Herzfrequenz und eine Verhinderung von Arrhythmien bei den  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Tieren.

### 4.1 Bradykardie als Ursache für Torsade de Pointes Arrhythmien

Eine Verlängerung des kardialen ventrikulären Aktionspotenzials und auch ein vermehrter später Natriumeinstrom ( $I_{Na}$ ) konnte bereits beim LQT-Syndrom 3 und am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus nachgewiesen werden [14, 36]. Auch wurde gezeigt, dass Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes beim LQT-Syndrom 3 bei extremer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotenzials und damit der QT-Zeit im Elektrokardiogramm auftreten, sodass dieses der entscheidende Faktor für die Entstehung von Arrhythmien zu sein scheint wie klinisch bereits angenommen [30].

Die Verlängerung des Aktionspotenzials hat wahrscheinlich folgende Ursache: Das Plateau des kardialen Aktionspotenzials wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle aufrecht erhalten. Die darauf folgende Repolarisation des Aktionspotenzials setzt dann ein, wenn der resultierende Auswärtsstrom (vor allem Kaliumausstrom) größer wird als der Einwärtsstrom (vor allem Natriumeinstrom). Beim LQT-Syndrom 3 tritt diese Situation der Repolarisation jedoch erst verspätet ein, da die  $\Delta$ KPQ SCN5A Mutation im kardialen Natriumkanal zu einem vermehrten späten Einstrom von Natrium ( $I_{Na}$ ) in die Zellen des Herzens führt. Dadurch kommt es zu einem späteren und verlangsamten Abfall des Plateaus und damit zu einer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotenzials, welches sich im Oberflächen-EKG durch eine Verlängerung der QT-Zeit zeigt [1]. Der späte  $I_{Na}$  bei der  $\Delta$ KPQ Mutation des LQT 3 Syndroms zeigt eine frequenzabhängige Kinetik. Bei höheren Frequenzen also kürzeren Zykluslängen wird der späte Natriumeinstrom kleiner und das Aktionspotenzial dadurch kürzer [16, 33]. Im Umkehrschluss würde bei niedrigen Frequenzen der  $I_{Na}$  ansteigen und das Aktionspotenzial länger werden.

Die Wirksamkeit von Manipulationen am Herzen welche eine Bradykardie verhindert und damit auch die daraus resultierenden Arrhythmien, konnte bereits mehrfach belegt werden. Am intakten Herz der KPQ SCN5A Maus [14], an Zellen die den SCN5A-Defekt medikamentenbedingt zeigen [37] und beim Patienten [45] verkürzt antibradykardes Pacing im Bereich physiologischer Zykluslängen das Aktionspotenzial damit die QT-Zeit und verhindert Arrhythmien. Auch die Gabe des Adrenozeptoragonisten Orciprenalin zur direkten sympathischen Aktivierung oder die intrinsische Aktivierung des sympathischen Systems durch Stress am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus zeigen den gleichen Effekt [4, 9-12]. Noda et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit LQT-Syndrom 3 die QTc-Zeit Verlängerung unter Adrenalin nicht so stark ausgeprägt ist wie bei den Patienten mit LQT Syndromen Typ 1 oder 2 oder wie in der Kontrollgruppe. Unter steady state Bedingungen ist die QTc-Zeit im Vergleich zu Baseline sogar verkürzt [35].

Eine weitere Möglichkeit Arrhythmien beim LQT-Syndrom 3 vorzubeugen ist die direkte Blockade von Na-Kanälen. Unter Mexiletin konnte am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus [14] und in pharmakologischen Modellen des LQT-Syndroms 3 [37, 49] gezeigt werden, dass es zu einer Verkürzung der Aktionspotenzialdauer bei langen Zykluslängen und zu einer Reduktion von Arrhythmie kommt. Die direkte Na-Kanal Blockade führt jedoch beim LQT-Syndrom 3 als unerwünschte Wirkung zu einer intrinsischen Bradykardie und Leitungsverzögerungen, welche einen proarrhythmischen Effekt darstellen. Die Reduktion von Arrhythmien und eine Leitungsverzögerung konnte auch für Flecainid, einem weiteren Na-Kanal Blocker, beim LQT-Syndrom 3 am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus gezeigt werden [2, 6, 10].

Im Gegensatz dazu könnte der Effekt von  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten auf die Herzfrequenz und den AV-Knoten für die Bradykardie induzierten Torsade de Pointes beim LQT-Syndrom 3 verantwortlich sein, welche unter entsprechender Medikation auftreten. Diese medikamentenbedingt entstehende Bradykardie könnte zumindest teilweise erklären, warum  $\beta$ -Blocker oft nicht die Arrhythmien beim LQT 3 Patienten verhindern [4, 9-12, 29, 38, 51].

Wir konnten nun zeigen, dass es bei  $\Delta$ KPQ SCN5A Mäusen während Phasen mit geringer Herzfrequenz und damit langer Zykluslänge zu einer Verlängerung des ventrikulären Aktionspotenzials und zum vermehrten Auftreten von Arrhythmien kommt, wie es bereits für einzelne Patienten mit dem LQT 3 Syndrom zuvor gezeigt wurde [30]. Dieses wäre mit der Vermutung zu vereinbaren, dass der späte Natriumkanal Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes während Phasen der Bradykardie im  $\Delta$ KPQ SCN5A Mausmodell des LQT 3 Syndroms verursacht [45]. Auch die Kinetik des späten Natriumkanals passt zu dieser Vorstellung [16, 33], da es danach durch eine Verlängerung der Zykluslänge zu einem zunehmend vermehrten späten Natriumeinstrom kommt, der damit zu einem zunehmend verlängerten Aktionspotenzial führt. Weiterhin könnte zum Auftreten von Arrhythmie auch das verlängerte atriale Aktionspotenzial beitragen, welches zu einer veränderten atrialen Elektrophysiologie führen könnte [3, 7, 8].

## 4.2 Atropin als Antiarrhythmikum beim langen QT-Syndrom 3

Die *in vivo* beobachtete Zunahme der Herzfrequenz und Verhinderung von Arrhythmien bei der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus unter Atropinmedikation untermauert das zuvor Beschriebene, da unter Aufhebung des parasympathischen Stimulus ein entsprechend gegenteiliger Effekt auftritt. Durch den Wegfall der parasympathischen Stimulation überwiegt die sympathische Aktivität und führt zu antiarrhythmischen Effekten, wie sie bereits in transgenen [10, 23] und pharmakologischen [50] Modellen des LQT-Syndroms 3 unter Catecholaminen beschrieben wurden. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit einer direkten Wirkung des Atropins auf das Myokard.

## 4.3 Limitationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die  $\Delta$ KPQ SCN5A-Mutation müssen nicht unbedingt mit denen anderer Mutationen des Natriumkanals beim LQT-Syndrom 3 übereinstimmen. Bei diesen könnte es durchaus zu Abweichungen kommen, da bei anderen Varianten gegebenenfalls die entsprechenden Ionenkanäle eine etwas andere Kinetik aufweisen.

Weiterhin kann der proarrhythmische Effekt der parasympathischen Stimulation durch die ventrikuläre Bradykardie erklärt werden und scheint sogar der wichtigste Faktor für die Entstehung der Arrhythmien zu sein [13]. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es nicht andere zusätzliche Effekte gibt, die eventuell zusätzlich für die proarrhythmische Wirkung verantwortlich sind. Dieser Sachverhalt müsste in weiteren Studien noch überprüft werden.

Außerdem ist zu beachten, dass alle Ergebnisse in dieser Arbeit an dem Versuchstier ‚transgene Maus‘ erhoben wurden und nicht ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragen werden können, da einige erhebliche Unterschiede zwischen dem Herz des Menschen und dem der Maus bestehen [28]. Die vorliegenden Daten müssen daher durchaus kritisch betrachtet werden und können nicht einfach für die Klinik übernommen werden [34]. Aber zum Beispiel die ventrikuläre Aktionspotenzialdauer des schlagenden Mauseherzen scheint ein gleiches frequenzadaptierendes Verhalten zu zeigen wie das Herz des Menschen [53].

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Bisher gibt es lediglich klinische Einzelbeobachtungen die eine Bradykardie, in Ruhe oder während des Schlafes, als auslösenden Mechanismus von Torsade de Pointes beim LQT-Syndrom 3 belegen. Wir konnten nun in vivo, am Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus, zeigen das eine vagale Stimulation durch den direkten parasymphomimetischen Effekt des Carbachols eine signifikante Bradykardie auslöst. In Folge dieser kommt es am Herzen der  $\Delta$ KPQ SCN5A transgenen Maus zu einer extremen Verlängerung des ventrikulären Aktionspotenzials und damit zur Entstehung von Arrhythmien, speziell vom Typ der Torsade de Pointes. Somit kann der sicherste Schutz vor diesen Arrhythmien durch eine Verhinderung vagal ausgelöster Bradykardien erreicht werden. Dies konnten wir beispielhaft durch das parasympholytisch wirkende Atropin zeigen und wurde zuvor bereits für das antibradykarde Pacing gezeigt [14].

In Bezug auf die zu Beginn gestellten Fragen haben sich folgende Antworten ergeben:

- Bei der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus tritt unter Carbachol eine Bradykardie induzierte Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und der QT-Zeit auf.
- Bradykardie induziert treten Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes unter parasymphischer Stimulation auf.
- Durch Verhinderung von Bradykardie kann das Auftreten von Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes bei der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus verhindert werden.

#### 4.5 Klinische Aspekte

Trotz oben genannter Limitationen in Bezug auf das Modell der  $\Delta$ KPQ SCN5A Maus können folgende Überlegungen angestellt werden:

Die parasymphische Stimulation, zum Beispiel mittels Carbachol, könnte einen klinischen Test darstellen, um das LQT-Syndrom 3 zu diagnostizieren und von den anderen LQT-Syndromen unter klinischen Bedingungen abzugrenzen. Dabei ist darauf zu achten, dass eine parasymphische Stimulation für Patienten eine erhebliche Gefahr darstellt und möglichst vermieden werden sollte. Wenn es dennoch appliziert wird,

sollte dieses mit Pacing kombiniert werden, um einer extremen Bradykardie und damit der Gefahr einer möglichen Arrhythmie vorzubeugen. Zusätzlich sollte der Test immer nur unter Bereitschaft zur Defibrillation durchgeführt werden.

Einen weniger gefährlichen Test stellt, unter Beachtung entsprechender Kontraindikationen, das Belastungs-EKG dar. Bei diesem könnten unter Stress bei einem Patienten mit LQT-Syndrom 3 im Gegensatz zu anderen Formen des Syndroms eine Verkürzung der QT-Zeit auftreten und zur Diagnosefindung beitragen.

Eine parasympatholytische Medikation zum Beispiel mittels Atropin könnte ein wirksames Mittel zur Verhinderung von Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes beim LQT-Syndrom 3 darstellen durch die Verhinderung von Bradykardien.

Als Notfallmaßnahmen während Phasen mit extremer Bradykardie bei Patienten mit dem LQT-Syndrom Typ 3 könnten die  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten, die parasympatholytische Medikation durch Atropin oder das direkte antibradykarde Pacing im Bereich physiologischer Zykluslängen genutzt werden, um den potenziell letalen Arrhythmien vom Typ der Torsade de Pointes vorzubeugen oder diese sogar eventuell zu beenden.

## Literaturverzeichnis

1. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*. 376: 640
2. Blana A, Damke D, Volkery D, Kreienkamp N, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P, Fabritz L (2008) Flecainide reverses atrial action potential prolongation in the deltaKPQ SCN5A model of Long QT Syndrome 3. (Abstract) *Clin Res Cardiol* 97 Suppl 1.
3. Blana A, Fabritz L, Fortmueller L, Damke D, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2006) Atrial pathology in deltaKPQ-SCN5A long QT syndrome 3. (Abstract) *Eur Heart J* 27 Suppl 1: 724.
4. Damke D, Fabritz L, Laakmann S, Fortmüller L, Blana A, Waldeyer Chr, Kreienkamp N, Volkery D, Tekook M, Breithardt G, Carmeliet P, Carmeliet E, Kirchhof P (2007) Effect of parasympathetic stimulation on heart rate and rhythm in deltaKPQ-SCN5A mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) *Clin Res Cardiol* 96 Suppl 1
5. Dessertenne F (1966) La tachycardie ventriculaire de deux foyers opposes variables. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 59: 263-72.
6. Fabritz L, Blana A, Damke D, Theis K, Aleynichenko E, Volkery D, Kreienkamp N, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2008) Flecainide reverses atrial action potential prolongation in the DeltaKPQ SCN5a model of long QT Syndrom 3. (Abstract) *Europace* 10 Suppl 1: i39.
7. Fabritz L, Blana A, Fortmüller L, Volkery D, Damke D, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2006) Atrial alterations in  $\Delta$ KPQ-SCN5A hearts with long QT Syndrom 3. (Abstract) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 372 Suppl 1: 90.

8. Fabritz L, Blana A, Fortmüller L, Volkery D, Damke D, Zellerhoff S, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2006) Altered atrial electrophysiology in DeltaKPQ SCN5A hearts with long QT Syndrom 3. (Abstract) Europace. 8 Suppl 1: 155.
9. Fabritz L, Damke D, Blana A, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2007) Effect of parasympathetic stimulation on heart rate and rhythm in deltaKPQ-SCN5A mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) Europace. 9 Suppl 3: iii12
10. Fabritz L, Damke D, Emmerich M, Blana A, Kaufmann S, Fortmüller L, Laakmann S, Theis K, Aleynichenko E, Volkery D, Maier S, Franz MR, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2008) Effects of autonomic modulation on heart rate, ventricular repolarisation and torsade de pointes in ΔKPQ –SCN5A mice with Long QT- Syndrom. (submitted)
11. Fabritz L, Damke D, Laakmann S, Blana A, Fortmüller L, Tekook M, Volkery D, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2007) Effect of carbachol on atrial and ventricular rate and rhythm in delta KPQ- SCN5A mice with Long QT- Syndrom 3. (Abstract) Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 375 Suppl 1: 61
12. Fabritz L, Fortmüller L, Laakmann S, Volkery D, Damke D, Blana A, Emmerich M, Vogel M, Franz MR, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2006) Effect of  $\beta$ -adrenergic Stimulation or Parasympathetic Stimulation in deltaKPQ-SCN5A Mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) Circulation. 114: II\_234-II\_235.
13. Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Eckardt L, Mönnig G, Milberg P, Breithardt G, Haverkamp W (2003) Prolonged action potential durations, increased



- dispersion of repolarization, and polymorphic ventricular tachycardia in a mouse model of proarrhythmia. *Basic Res Cardiol.* 98: 25-32.
14. Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Nuyens D, Rossenbacker T, Ottenhof A, Haverkamp W, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P (2003) Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in DeltaKQPQ SCN5A (long QT3) mice. *Cardiovasc Res.* 57: 1085-93.
  15. Franz MR, Kirchhof PF, Fabritz CL, Zabel M (1995) Computer analysis of monophasic action potentials: manual validation and clinically pertinent applications. *Pacing Clin Electrophysiol.* 18: 1666-78
  16. Fredj S, Lindegger N, Sampson KJ, Carmeliet P, Kass RS (2006) Altered Na<sup>+</sup> channels promote pause-induced spontaneous diastolic activity in long QT syndrome type 3 myocytes. *Circ Res.* 99: 1225-32.
  17. Garson A Jr, Dick M 2nd, Fournier A, Gillette PC, Hamilton R, Kugler JD, van Hare GF 3rd, Vetter V, Vick GW 3rd (1993) The long QT syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation.* 87: 1866-72.
  18. George AL Jr, Varkony TA, Drabkin HA, Han J, Knops JF, Finley WH, Brown GB, Ward DC, Haas M (1995) Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet.* 68: 67-70.
  19. Gussak I, Chaitman BR, Kopecky SL, Nerbonne JM (2000) Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. *J Electrocardiol.* 33: 159-70.
  20. Haverkamp W (2007) Kongenitales Long-QT-Syndrom. *Herz* 32: 201-5

21. Haverkamp W, Haverkamp F, Breithardt G (2002) Medikamentenbedingte QT-Verlängerung und Torsade de pointes: Ein multidisziplinäres Problem. Dtsch Arztebl. 99; 28-29.
22. Haverkamp W, Hördt M, Chen X, Hindricks G, Willems S, Kottkamp H, Rotman B, Brunn J, Borggrefe M, Breithardt G (1993) Torsade de Pointes. Z Kardiol. 82: 763-74.
23. Head CE, Balasubramaniam R, Thomas G, Goddard CA, Lei M, Colledge WH, Grace AA, Huang CL (2005) Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in DeltaKPQ Scn5a mice. J Cardiovasc Electrophysiol. 16: 1329-40.
24. Jervell A, Lange- Nielsen F (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. Am Heart J. 54: 59-68.
25. Jiang C, Atkinson D, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, Timothy K, Taggart RT, Schwartz PJ, Vincent GM (1994) Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. Nat Genet. 8: 141-7.
26. Kirchhof PF, Fabritz CL, Zabel M, Franz MR (1996) The vulnerable period for low and high energy T-wave shocks: role of dispersion of repolarisation and effect of d-sotalol. Cardiovasc Res. 31: 953-62.
27. Knollmann BC, Katchman AN, Franz MR (2001) Monophasic action potential recordings from intact mouse heart: validation, regional heterogeneity, and relation to refractoriness. J Cardiovasc Electrophysiol. 12: 1286-94.
28. London B. (2001) Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. J Cardiovasc Electrophysiol. 12: 1089-91

29. Lupoglazoff JM, Cheav T, Baroudi G, Berthet M, Denjoy I, Cauchemez B, Extramiana F, Chahine M, Guicheney P (2001) Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res.* 89: E16-21.
30. Mönnig G, Eckardt L, Wedekind H, Haverkamp W, Gerss J, Milberg P, Wasmer K, Kirchhof P, Assmann G, Breithardt G, Schulze-Bahr E. (2006) Electrocardiographic risk stratification in families with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J.* 27: 2074-80.
31. Moss AJ (1998) Management of patients with the hereditary long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9: 668-74.
32. Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH (1995) ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation.* 92: 2929-34.
33. Nagatomo T, January CT, Ye B, Abe H, Nakashima Y, Makielski JC (2002) Rate-dependent QT shortening mechanism for the LQT3 deltaKPQ mutant. *Cardiovasc Res.* 54: 624-9.
34. Nerbonne JM. (2004) Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med.* 14: 83-93.
35. Noda T, Takaki H, Kurita T, Suyama K, Nagaya N, Taguchi A, Aihara N, Kamakura S, Sunagawa K, Nakamura K, Ohe T, Horie M, Napolitano C, Towbin JA, Priori SG, Shimizu W (2002) Gene-specific response of dynamic ventricular repolarization to sympathetic stimulation in LQT1, LQT2 and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Eur Heart J.* 23: 975-83.

36. Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compernelle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet P (2001) Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med.* 7: 1021-7.
37. Priori SG, Napolitano C, Cantù F, Brown AM, Schwartz PJ (1996) Differential response to Na<sup>+</sup> channel blockade, beta-adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the SCN5A and HERG defects present in the long-QT syndrome. *Circ Res.* 78: 1009-15.
38. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, Moncalvo C, Tulipani C, Veia A, Bottelli G, Nastoli J (2004) Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA.* 292: 1341-4.
39. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. *Circulation.* 94: 1996-2012.
40. Romano C, Gemme G, Pongiglione R (1963) Aritmie cardiache rare dell'età pediatrica. *Clin Pediatr.* 45: 658-683.
41. Rosenbaum MB, Acunzo RS (1991) Pseudo 2:1 atrioventricular block and T wave alternans in the long QT syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 18: 1363-6.
42. Salama G, London B (2007) Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol.* 578: 43-53.
43. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A (1975) The long Q-T syndrome. *Am Heart J* 89: 378-90.

44. Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R (2000) A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 343: 262-7.
45. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantù F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LS (1995) Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na<sup>+</sup> channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation.* 92: 3381-6.
46. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R (2001) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 103: 89-95.
47. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P (1998) Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med.* 338: 1709-14.
48. Scott WA, Dick M 2nd (1987) Two:one atrioventricular block in infants with congenital long QT syndrome. *Am J Cardiol.* 60: 1409-10.
49. Shimizu W, Antzelevitch C (1997) Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade des pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation.* 96: 2038-47.

50. Shimizu W, Antzelevitch C (2000) Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.*35: 778-86.
51. Ten Harkel AD, Witsenburg M, de Jong PL, Jordaens L, Wijman M, Wilde AA (2005) Efficacy of an implantable cardioverter-defibrillator in a neonate with LQT3 associated arrhythmias. *Europace.* 7: 77-84.
52. van Hare GF, Franz MR, Rogé C, Scheinman MM (1990) Persistent functional atrioventricular block in two patients with prolonged QT intervals: elucidation of the mechanism of block. *Pacing Clin Electrophysiol.* 13: 608-18.
53. Waldeyer C, Fortmueller L, Damke D, Blana A, Kreienkamp N, Volkery D, Breithardt G, Kirchhof P, Farbitz L (2008) Regional distribution and rate-dependence of action potential duration in 448 beating mouse hearts. Effects of genetic background, sex, and age. (Abstract) *European Heart Journal* 29 Suppl, 166-167
54. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 80: 805-11.
55. Ward OC (1964) A New Familial cardiac syndrome im children. *J Ir Med Assoc.* 54: 103-6
56. Wedekind H, Smits JP, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp MW, Bajanowski T, Borggreffe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan ZA, Wilde AA, Breithardt G, Haverkamp W (2001) De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation.* 104: 1158-64.
57. Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH, Hall WJ (1998)

Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. N Engl J Med. 339: 960-5.

## Abkürzungen

μmol	Mikromol
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
APD	aktion potential duration → Aktionspotenzialdauer
AV	atrioventrikulär
CL	Zykluslänge
cm	Centimeter
DC	Direct Current= Gleichstrom
EAD	Early after depolarisation
EKG/ ECG (engl.)	Elektrokardiogramm
ERP	Effektiv refraktäre Periode
G	Gauge
g	Gramm
Hz	Herz
IE	internationale Einheiten
I <sub>NA</sub>	Natriumstrom
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
l	Liter
LD	Langendorff
LQT	langes QT
MAP	monophasisches Aktionspotenzial
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute = Herzfrequenz)



PC	Personal Computer
TdP	Torsade de Pointes
TG	transgen
vs.	versus
VT	ventrikuläre Tachykardie
WT	wildtyp

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

<i>Abbildung 1.1: Übersicht und genetische Klassifizierung über die angeborenen langen QT-Syndrome (modifiziert nach Haverkamp, 2007) [20].</i>	1
<i>Abbildung 1.2: Torsade de Pointes</i>	2
<i>Abbildung 2.1: Das Herz in der Langendorff-Apparatur (modifiziert nach Fabritz et. al, 2003) [13].</i>	8
<i>Abbildung 2.2: Langendorff-Versuchsanordnung</i>	9
<i>Abbildung 2.3: Das monophasische Aktionspotenzial der Maus</i>	12
<i>Abbildung 2.4: Schema der Elektrodenplatzierung</i>	13
<i>Abbildung 2.5: Die Effektive refraktäre Periode (ERP) im Schema</i>	15
<i>Abbildung 2.6: Ableitung des EKG</i>	16
<i>Abbildung 2.7: Das EKG der <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Maus</i>	17
<i>Abbildung 2.8: Beispiele für ventrikuläre Arrhythmien im EKG</i>	18
<i>Abbildung 2.9: Aufbau der Telemetrieanlage</i>	19
<i>Abbildung 2.10: Röntgenaufnahme der Maus nach Transmitterimplantation</i>	21
<i>Abbildung 3.1: Telemetrieaufzeichnung</i>	23
<i>Abbildung 3.2: Torsade de Pointes artige Arrhythmie einer <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Maus in der Telemetrie</i>	24
<i>Abbildung 3.3: Der Effekt der Herzfrequenz und von Carbachol auf die QT-Zeit</i>	25
<i>Abbildung 3.4: Beispiel einer kurzen polymorphen VT am isolierten Herzen</i>	28
<i>Abbildung 3.5: Beispiel eines Bigeminus am isolierten Herz</i>	29
<i>Abbildung 3.6: Pausen über 10s Länge bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	30
<i>Abbildung 3.7: Fixfrequente Stimulation Carbachol 0,1 <math>\mu</math>mol versus Baseline bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	31
<i>Abbildung 3.8: Fixfrequente Stimulation Carbachol 1 <math>\mu</math>mol versus Baseline bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	31
<i>Abbildung 3.9: Fixfrequente Stimulation <math>\Delta</math>KPQ SCN5a versus WT, Baseline</i>	32
<i>Abbildung 3.10: Fixfrequente Stimulation <math>\Delta</math>KPQ SCN5a versus WT, Carbachol 0,1 <math>\mu</math>mol</i>	32
<i>Abbildung 3.11: Spontane APD90 bei WT und <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	33

<i>Abbildung 3.12: Anstieg der spontanen APD90 bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Herzen</i>	34
<i>Abbildung 3.13: Spontane Zykluslängen</i>	35
<i>Abbildung 3.14: Spontane APD90 und Zykluslängen</i>	36
<i>Abbildung 3.15: Arrhythmien im EKG unter Carbachol 0,5mg/ kg KG</i>	37
<i>Abbildung 3.16: Beispiel einer ventrikulären Tachykardie unter Carbachol im EKG.</i>	38
<i>Abbildung 3.17: Gemessene Zeiten im EKG bei den <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	39
<i>Abbildung 3.18: Herzfrequenz bei WT und <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Tieren im EKG</i>	39
<i>Abbildung 3.19: QT-Zeit bei WT und <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Tieren im EKG</i>	40

## Tabellen

<i>Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers</i>	7
<i>Tabelle 2.2: Werte aus dem EKG</i>	17
<i>Tabelle 3.1: Übersicht der untersuchten Mäuse in der Langendorff-Apparatur</i>	26
<i>Tabelle 3.2: Anzahl der ausgewerteten Versuche in den verschiedenen Kategorien</i>	26
<i>Tabelle 3.3: Arrhythmien bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Mäusen im Elektrokardiogramm</i>	27
<i>Tabelle 3.4: Pausen bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>	29
<i>Tabelle 3.5: APD70 und APD90 bei fixfrequenter Stimulation</i>	30
<i>Tabelle 3.6: Anstieg der spontanen APD90 bei <math>\Delta</math>KPQ SCN5A Herzen</i>	34
<i>Tabelle 3.7: Arrhythmien im EKG unter Carbachol 0,5mg/ kg KG</i>	37

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank dabei gilt:

Herrn Prof. Dr. Paulus Kirchhof, meinem Doktorvater, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation. Außerdem bedanke ich mich für die Erstbegutachtung dieser Arbeit.

Frau Dr. Larissa Fabritz danke ich ganz besonders für die viele Zeit in der sie mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt hat und die Präsentation meiner Ergebnisse auf Kongressen ermöglicht hat. Ihre fachlichen Ratschläge haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen und ich konnte mich bei Problemen immer an sie wenden.

Prof. Dr. Andreas Meißner aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin danke ich für seine Bereitschaft zur Zweitbegutachtung der Arbeit.

Nina Kreienkamp, Daniela Volkery, Marcel Tekook, Dr. Lisa Fortmüller und Sandra Laakmann danke ich für die gute Einarbeitung in das Laborleben und auch für die Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen und bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Außerdem möchte ich mich nochmal bei allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die nette Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern Friedhelm und Annette Danke danke ich für die selbstverständliche Unterstützung während der gesamten Ausbildung zum Arzt und während der Dissertation.



# Anhang

## A. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

### Artikel

Fabritz L, Damke D, Emmerich M, Blana A, Kaufmann S, Fortmüller L, Laakmann S, Theis K, Aleynichenko E, Volkery D, Maier S, Franz MR, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2008) Effects of autonomic modulation on heart rate, ventricular repolarisation and torsade de pointes in  $\Delta$ KPQ-SCN5A mice with Long QT- Syndrom. (submitted)

### Poster und Vorträge

Blana A, Damke D, Volkery D, Kreienkamp N, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P, Fabritz L (2008) Flecainide reverses atrial action potential prolongation in the deltaKPQ SCN5A model of Long QT Syndrome 3. (Abstract) Clin Res Cardiol 97 Suppl 1.

Blana A, Fabritz L, Fortmueller L, Damke D, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2006) Atrial pathology in deltaKPQ-SCN5A long QT syndrome 3. (Abstract) Eur Heart J 27 Suppl 1: 724.

Damke D, Fabritz L, Laakmann S, Fortmüller L, Blana A, Waldeyer Chr, Kreienkamp N, Volkery D, Tekook M, Breithardt G, Carmeliet P, Carmeliet E, Kirchhof P (2007) Effect of parasympathetic stimulation on heart rate and rhythm in deltaKPQ-SCN5A mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) Clin Res Cardiol 96 Suppl 1

Fabritz L, Blana A, Damke D, Theis K, Aleynichenko E, Volkery D, Kreienkamp N, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2008) Flecainide reverses atrial action potential prolongation in the DeltaKPQ SCN5A model of long QT Syndrom 3. (Abstract) Europace 10 Suppl 1: i39.

Fabritz L, Blana A, Fortmüller L, Volkery D, Damke D, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2006) Atrial alterations in  $\Delta$ KPQ-SCN5A hearts

with long QT Syndrom 3. (Abstract) Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 372 Suppl 1: 90.

Fabritz L, Blana A, Fortmüller L, Volkery D, Damke D, Zellerhoff S, Carmeliet E, Carmeliet P, Breithardt G, Kirchhof P (2006) Altered atrial electrophysiology in DeltaKPQ SCN5A hearts with long QT Syndrom 3. (Abstract) Europace. 8 Suppl 1: 155.

Fabritz L, Damke D, Blana A, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2007) Effect of parasympathetic stimulation on heart rate and rhythm in deltaKPQ-SCN5A mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) Europace. 9 Suppl 3: iii12

Fabritz L, Damke D, Laakmann S, Blana A, Fortmüller L, Tekook M, Volkery D, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2007) Effect of carbachol on atrial and ventricular rate and rhythm in delta KPQ- SCN5A mice with Long QT- Syndrom 3. (Abstract) Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 375 Suppl 1: 61

Fabritz L, Fortmüller L, Laakmann S, Volkery D, Damke D, Blana A, Emmerich M, Vogel M, Franz MR, Breithardt G, Carmeliet E, Carmeliet P, Kirchhof P (2006) Effect of  $\beta$ -adrenergic Stimulation or Parasympathetic Stimulation in deltaKPQ-SCN5A Mice with Long QT Syndrome 3. (Abstract) Circulation. 114: II\_234-II\_235.

Waldeyer C, Fortmueller L, Damke D, Blana A, Kreienkamp N, Volkery D, Breithardt G, Kirchhof P, Farbitz L (2008) Regional distribution and rate-dependence of action potential duration in 448 beating mouse hearts. Effects of genetic background, sex, and age. (Abstract) European Heart Journal 29 Suppl, 166-167

## B. Werte der spontanen Zykluslängen (Langendorff)

	$\Delta KPQ SCN5A$			WT				
	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)
Baseline	233	±	16	33	206	±	23	28
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	737	±	165	28	397	±	58	24
Carbachol 1 $\mu$ mol	1100	±	295	19	540	±	86	20
Carbachol 10 $\mu$ mol	1182	±	429	7	627	±	143	7

	p
<b><math>\Delta KPQ SCN5A</math></b>	
Baseline vs. Carbachol 0,1 $\mu$ mol	<b>0,0047</b>
Baseline vs. Carbachol 1 $\mu$ mol	<b>0,0031</b>
Baseline vs. Carbachol 10 $\mu$ mol	<b>0,0032</b>
<b>WT</b>	
Baseline vs. Carbachol 0,1 $\mu$ mol	<b>0,0161</b>
Baseline vs. Carbachol 1 $\mu$ mol	<b>0,0087</b>
Baseline vs. Carbachol 10 $\mu$ mol	<b>0,0065</b>
<b><math>\Delta KPQ SCN5A</math> vs. WT</b>	
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	0,0650
Carbachol 1 $\mu$ mol	0,0899
Carbachol 10 $\mu$ mol	0,2920

Werte aus dem student'schen t-Test (ungepaart)



### C. Werte der spontanen APDs (Langendorff)

APD90	$\Delta KPQ SCN5A$			WT				
	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)
Baseline	46	±	2	32	48	±	3	26
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	64	±	7	12	54	±	4	15
Carbachol 1 $\mu$ mol	87	±	6	17	78	±	6	14
Carbachol 10 $\mu$ mol	121	±	13	6	61	±	17	3

APD70	$\Delta KPQ SCN5A$			WT				
	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)	Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)
Baseline	27	±	2	30	27	±	2	27
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	34	±	5	12	28	±	3	14
Carbachol 1 $\mu$ mol	52	±	6	16	49	±	6	13
Carbachol 10 $\mu$ mol	72	±	11	5	37	±	17	3

prozentuale Steigerung	$\Delta KPQ SCN5A$		WT	
	APD90	APD70	APD90	APD70
Baseline vs. ...				
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	41%	29%	12%	3%
... Carbachol 1 $\mu$ mol	90%	96%	63%	81%
... Carbachol 10 $\mu$ mol	167%	173%	27%	35%

	p	
	APD90	APD70
<b><math>\Delta KPQ SCN5A</math></b>		
Baseline vs. Carbachol 0,1 $\mu$ mol	<b>0,0260</b>	0,1564
Baseline vs. Carbachol 1 $\mu$ mol	<b>0,0000</b>	<b>0,0011</b>
Baseline vs. Carbachol 10 $\mu$ mol	<b>0,0028</b>	<b>0,0212</b>
<b>WT</b>		
Baseline vs. Carbachol 0,1 $\mu$ mol	0,2832	0,8478
Baseline vs. Carbachol 1 $\mu$ mol	<b>0,0005</b>	<b>0,0047</b>
Baseline vs. Carbachol 10 $\mu$ mol	0,5875	0,7006
<b><math>\Delta KPQ SCN5A</math> vs. WT</b>		
Baseline	0,9170	0,9504
Carbachol 0,1 $\mu$ mol	0,2130	0,3037
Carbachol 1 $\mu$ mol	0,3650	0,7557
Carbachol 10 $\mu$ mol	0,0700	0,2313

Werte aus dem student'schen t-Test (ungepaart)

### D. Werte der fixfrequenten Stimulation (Langendorff)

		CL	100ms	120ms	140ms	150ms	180ms	200ms
ΔKPQ SCN5A APD90	Carbachol 0,1 μmol	Mittelwert (ms)	42	46	49	49	52	53
		STEM (ms)	3	3	4	4	5	5
		Anzahl (n)	14	15	14	15	13	14
	Carbachol 1 μmol	Mittelwert (ms)	37	37	40	40	42	41
		STEM (ms)	4	3	5	4	4	3
		Anzahl (n)	12	14	10	11	10	11
	Carbachol 10 μmol	Mittelwert (ms)	45	42	45	42	47	46
		STEM (ms)	2	3	3	3	4	4
		Anzahl (n)	14	15	14	17	11	12

		CL	100ms	120ms	140ms	150ms	180ms	200ms
ΔKPQ SCN5A APD70	Carbachol 0,1 μmol	Mittelwert (ms)	24	26	28	28	28	28
		STEM (ms)	2	3	3	3	4	4
		Anzahl (n)	14	15	14	15	13	14
	Carbachol 1 μmol	Mittelwert (ms)	21	20	21	20	23	22
		STEM (ms)	3	2	3	2	2	3
		Anzahl (n)	12	14	10	11	10	11
	Carbachol 10 μmol	Mittelwert (ms)	24	21	22	20	23	24
		STEM (ms)	2	2	2	2	2	3
		Anzahl (n)	14	15	14	17	11	13

		CL	100ms	120ms	140ms	150ms	180ms	200ms
WT APD90	Carbachol 0,1 μmol	Mittelwert (ms)	40	40	41	42	47	47
		STEM (ms)	2	2	2	2	3	3
		Anzahl (n)	13	13	11	11	7	8
	Carbachol 1 μmol	Mittelwert (ms)	33	31	32	28	28	33
		STEM (ms)	2	3	2	2	3	3
		Anzahl (n)	12	13	9	9	5	10
	Carbachol 10 μmol	Mittelwert (ms)	42	42	44	44	49	46
		STEM (ms)	3	3	4	4	4	3
		Anzahl (n)	12	12	7	7	8	9

		CL	100ms	120ms	140ms	150ms	180ms	200ms
WT APD70	Carbachol 0,1µmol	Mittelwert (ms)	23	23	22	22	27	27
		STEM (ms)	2	2	2	2	2	2
		Anzahl (n)	13	13	11	11	7	8
	Carbachol 1µmol	Mittelwert (ms)	17	15	16	14	14	15
		STEM (ms)	1	2	1	0	1	2
		Anzahl (n)	12	13	8	9	6	11
	Carbachol 10µmol	Mittelwert (ms)	23	20	19	20	22	20
		STEM (ms)	3	2	3	3	2	2
		Anzahl (n)	12	12	7	7	8	9

		p					
		CL 100ms	CL 120ms	CL 140ms	CL 150ms	CL 180ms	CL 200ms
<b><i>ΔKPQ SCN5A</i></b>							
Baseline vs. Carbachol 0,1µmol	APD90	0,2824	<b>0,0465</b>	0,1858	0,1022	0,1532	0,0837
	APD70	0,4831	0,0588	0,0987	0,0598	0,2047	0,1939
Baseline vs. Carbachol 1µmol	APD90	0,3888	0,3126	0,4080	0,1305	0,4211	0,3356
	APD70	0,9234	0,1211	0,1807	0,0641	0,2281	0,3401
<b><i>WT</i></b>							
Baseline vs. Carbachol 0,1µmol	APD90	<b>0,0435</b>	<b>0,0435</b>	<b>0,0040</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0030</b>	<b>0,0075</b>
	APD70	<b>0,0279</b>	<b>0,0088</b>	<b>0,0151</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0005</b>
Baseline vs. Carbachol 1µmol	APD90	0,6295	0,6295	0,5276	0,6334	0,7714	0,8505
	APD70	0,9612	0,3716	0,5333	0,5288	0,2435	<b>0,0484</b>
<b><i>ΔKPQ SCN5A vs. WT</i></b>							
Baseline	APD90	0,5386	0,1165	0,0993	0,1210	0,3877	0,3706
	APD70	0,7536	0,3180	0,1237	0,1484	0,6554	0,7317
Carbachol 0,1µmol	APD90	0,4325	0,1220	0,0575	<b>0,0196</b>	<b>0,0146</b>	0,0962
	APD70	0,1928	0,0622	0,0699	<b>0,0112</b>	<b>0,0042</b>	<b>0,0404</b>
Carbachol 1µmol	APD90	0,4633	0,9468	0,9055	0,6107	0,7884	0,9848
	APD70	0,7654	0,7476	0,4587	0,8964	0,8846	0,3340

Werte aus dem student'schen t-Test (ungepaart)

### E. Arrhythmien (Langendorff)

<i><math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i>		n insgesamt	n Arrhythmien	n keine Arrhythmien	% Arrhythmien
Bigemini (> 10 Zyklen)	Baseline	43	22	21	51,16%
	Carbachol	42	34	8	80,95%
Salven	Baseline	43	12	31	27,91%
	Carbachol	42	23	19	54,76%
spontane VT/ VF	Baseline	43	4	39	9,30%
	Carbachol	43	13	30	30,23%

<i>WT</i>		n insgesamt	n Arrhythmien	n keine Arrhythmien	% Arrhythmien
Bigemini (> 10 Zyklen)	Baseline	32	7	25	21,88%
	Carbachol	30	15	15	50,00%
Salven	Baseline	32	3	29	9,38%
	Carbachol	30	9	21	30,00%
spontane VT/ VF	Baseline	33	10	23	30,30%
	Carbachol	32	15	17	46,88%

	Bigemini (> 10 Zyklen)	p Salven	spontane VT/ VF
<i><math>\Delta</math>KPQ SCN5A</i> Baseline vs. Carbachol	<b>0,00571</b>	<b>0,01565</b>	<b>0,02829</b>
<i>WT</i> Baseline vs. Carbachol	<b>0,03303</b>	<b>0,05549</b>	0,20749
<i><math>\Delta</math>KPQ SCN5A vs. WT</i> Baseline	<b>0,01593</b>	0,07808	<b>0,03425</b>
Carbachol	<b>0,00964</b>	0,05422	0,15614

Werte aus dem exakten Fisher Test

F. Werte aus dem Oberflächen-EKG

		ΔKPQ SCN5A			
		Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)
P- Welle	Baseline	10,20	±	2,32	19
	Carbachol	16,76	±	2,91	19
PQ- Intervall	Baseline	34,65	±	4,72	19
	Carbachol	45,43	±	11,01	19
QRS- Komplex	Baseline	12,31	±	1,03	19
	Carbachol	15,15	±	2,89	19
QT- Zeit	Baseline	46,58	±	4,99	19
	Carbachol	77,82	±	16,99	19
QTc- Zeit	Baseline	40,41	±	4,51	19
	Carbachol	39,95	±	8,74	19
Herzfrequenz	Baseline	455,09	±	60,95	19
	Carbachol	162,44	±	60,95	19

		WT			
		Mittelwert (ms)	±	STEM (ms)	Anzahl (n)
P- Welle	Baseline	9,89	±	1,98	11
	Carbachol	14,73	±	3,19	11
PQ- Intervall	Baseline	34,53	±	4,58	11
	Carbachol	44,75	±	8,72	11
QRS- Komplex	Baseline	12,21	±	1,68	11
	Carbachol	14,89	±	2,43	11
QT- Zeit	Baseline	46,02	±	6,21	11
	Carbachol	72,52	±	11,87	11
QTc- Zeit	Baseline	39,04	±	4,97	11
	Carbachol	38,49	±	5,25	11
Herzfrequenz	Baseline	433,70	±	30,60	11
	Carbachol	181,23	±	78,56	11

	prozentuale Steigerung		p <sup>1</sup> TG vs. WT	p <sup>2</sup> TG drug vs. base	p <sup>2</sup> WT drug vs. base
	ΔKPQ SCN5A	WT			
P- Welle	64,27%	48,93%	0,0995	<b>0,0000</b>	<b>0,0011</b>
PQ- Intervall	31,10%	29,60%	0,8526	<b>0,0006</b>	<b>0,0007</b>
QRS- Komplex	23,02%	21,96%	0,8000	<b>0,0003</b>	<b>0,0025</b>
QT- Zeit	67,08%	57,61%	0,3257	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
QTc- Zeit	-1,12%	-1,40%	0,5718	0,8292	0,7514
Herzfrequenz	-64,31%	-58,21%	0,4742	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>

p<sup>1</sup>-Werte aus dem student'schen t-Test (ungepaart)

p<sup>2</sup>-Werte aus dem student'schen t-Test (gepaart)

## G. Die verschiedenen Protokolle der LD-Versuche

### Protokoll 1:

Carbachol 1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 13  $\pm$  1 Minute

Washout mit KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

### Protokoll 2:

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Carbachol 1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium bis Effekt sichtbar

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Carbachol 10  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium bis Effekt sichtbar

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Washout mit KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

### Protokoll 3:

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100,120 ms CL)

Carbachol 1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100,120 ms CL)

KHB-Lösung 4,7 mmol/ l Kalium für 5 Minuten

Carbachol 10  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium bis Effekt sichtbar

Ggf. bei noch guten Signalen Stimulation:

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100,120 ms CL)

Protokoll 4:

Carbachol 1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100,120 ms CL)

KHB-Lösung 4,7 mmol/ l Kalium für 5 Minuten

Vorhofstimulation (ERP 100, 120, 200 ms CL)

Carbachol 10  $\mu$ mol in KHB-Lösung 4,7 mmol/ l Kalium bis Effekt sichtbar

Vorhofstimulation (ERP 100, 120, 200 ms CL)

Protokoll 5:

Vorhofstimulation (100, 120, 200 ms)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (100, 120, 200 ms)

Carbachol 0,1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Carbachol 1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 5,9 mmol/ l Kalium für 10 Minuten

Vorhofstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (80, 100, 120, 140, 150, 180, 200, 300 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Protokoll 6:

Baselineaufzeichnung mit Kalium 4,7 mmol/ l (nicht 5,9 mmol/ l)

Kalium 3,5 mmol/ l KHB für 5  $\pm$  1 Minuten

Carbachol 0,1  $\mu$ mol in KHB-Lösung 4,7 mmol/ l Kalium für 5  $\pm$  1 Minuten

Kalium 4,7 mmol/ l KHB für 5  $\pm$  1 Minuten



Carbachol 0,1 µmol in KHB-Lösung 3,5 mmol/ l Kalium für 5 ± 1 Minuten

Vorhofstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Kalium 4,7 mmol/ l KHB für 5 ± 1 Minuten

Vorhofstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Carbachol 0,1 µmol in KHB-Lösung 4,7 mmol/ l Kalium für 5 ± 1 Minuten

Vorhofstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

Kalium 3,5 mmol/ l KHB für 5 ± 1 Minuten

Vorhofstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP 100, 120, 200 ms CL)

Bei bestehendem AV-Block: Kammerstimulation (100, 120, 140, 180, 200 ms CL plus ERP bei 100, 120, 200 ms CL)

## H. Genehmigung der Tierversuche

Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn  
Prof. Dr. Wilhelm Schmitz  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Universitätsklinikum Münster  
Domagkstr. 12  
48149 Münster

### Tierschutz

Verlängerungsanzeige zu genehmigungspflichtigen Versuchsvorhaben  
gem. § 8 Tierschutzgesetz  
Genehmigungsbescheid vom 13.01.2005  
Ihr Schreiben vom 03.12.2007

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,

die mit Datum vom 13.01.2005 erteilte Genehmigung zu dem Versuchsvorhaben mit dem Titel „**Kardiale Kontraktilität**“ wird hiermit wie folgt geändert:

1. Die erteilte Genehmigung wird um ein weiteres Jahr bis zum 31.12.2008 verlängert.

Ich weise darauf hin, dass gem. Ziff. 6.4.3 der Verwaltungsvorschriften zu § 8 TierSchG eine Genehmigung höchstens zweimal um je ein Jahr verlängert werden kann.

Im Übrigen bleibt der o. g. Genehmigungsbescheid unberührt.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

(Dr. Stettner)

Auskunft erteilt:

Herr Skoff

Direktwahl 02361/305-3478

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen 9.93.2.10.36.

G 83/2004

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen.

Datum: 10.12.2007

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 bis Haltestelle

„Siemensstraße“ oder mit Busli-

nie 235 bis Haltestelle „Blitzkuh-

lenstraße“ und 10 Min. Fußweg

in Richtung Trabrennbahn bis

Siemensstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED3333

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12