

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Department für Kardiologie und Angiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger -

**Effekte von ventrikulärer Stimulation und
Natriumkanalblockade auf die Dispersion der Repolarisation
und Rhythmusstörungen beim langen QT Syndrom Typ 3**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Willem-Alexander Ottenhof

aus Ahaus
Mai 2013

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

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

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. L. Fabritz

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. E. Schulze-Bahr

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Mai 2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Department für Kardiologie und Angiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger -
Referent: PD. Dr. med. L. Fabritz
Koreferent: Univ.- Prof. Dr. med. E. Schulze-Bahr

Zusammenfassung

Effekte von ventrikulärer Stimulation und Natriumkanalblockade auf die Dispersion der Repolarisation und Rhythmusstörungen beim langen QT Syndrom Typ 3

Willem-Alexander Ottenhof

Das lange QT-Syndrom 3 ist eine seltene ventrikuläre Repolarisationsstörung mit häufig letalem Ausgang schon im Kindesalter. Wir haben am Modell der genetisch veränderten Δ KPQ SCN5A knock-in Maus, einem knock-in Model des langen QT-Syndroms 3, Auswirkungen von ventrikulärer Stimulation und Mexiletin auf kardiale Ereignisse wie Arrhythmien, frühen Nachdepolarisationen (EADs) und Pausen in der Herzaktivität sowie Auswirkungen auf die Dispersion der Repolarisation untersucht.

Es zeigte sich bei isolierten, retrograd perfundierten transgenen SCN5A-TG Mäuseherzen nach mechanischer Induktion eines AV-Blockes ein Auftreten von EADs (16 von 18 Herzen) und repetitiven polymorphen ventrikulären Tachykardien vom torsade de pointes Typ (pVTs) (11/18).

Durch Stimuli bei physiologischen Frequenzen konnten Bradykardien vorgebeugt werden, die Aktionspotentialdauer (APD) und die Dispersion der APD konnten reduziert werden. EADs, Pausen und pVTs wurden vollständig unterdrückt. Plötzliche Frequenzsteigerungen führten zu einem vorübergehenden Anstieg der APD-Dispersion. Unter dem Zusatz von Mexiletin (4 μ g/l) konnte eine verlängerte Post-Repolarisations-Refraktärität nachgewiesen werden, das Auftreten von EADs und die APD konnten deutlich verringert werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl das fix-frequente Pacing als auch der Zusatz von Mexiletin Arrhythmien bei SCN5A-TG-Mäusen signifikant reduzieren konnten.

Tierversuchsgenehmigungen vom 08. Oktober 1999 und vom 21. März 2002

Aktenzeichen: 23.0835.1.0 (G61/99) und 50.0835.1.0 (G61/1999)

Tag der mündlichen Prüfung: 06.Mai 2013

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Effekte von ventrikulärer Stimulation und Natriumkanalblockade auf die Dispersion der Repolarisation und Rhythmusstörungen beim langen QT Syndrom Typ 3“

im

Department für Kardiologie und Angiologie

Universitätsklinikum Münster

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Waltenberger

unter der Anleitung von

PD Dr. med. L. Fabritz

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Minden, 12. August 2013

Willem-Alexander Ottenhof

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Das SCN5A-Tg Maus Modell.....	6
2.2	Präparation des isolierten Mäuseherzen	6
2.3	Positionierung des Herzens	8
2.4	Retrograde Perfusion des Herzens	9
2.5	Wärmeregulation.....	11
2.6	Positionierung der Elektroden.....	12
2.7	Versuchsprotokoll	14
2.7.1	AV-Block	14
2.7.2	Stimulationsprotokoll	15
2.7.3	Fixfrequente Ventrikelstimulation.....	15
2.7.4	Plötzliche Frequenzsteigerung.....	16
2.7.5	Bestimmung der Effektiven Refraktärzeit.....	16
2.7.6	Zusatz von Mexiletin.....	16
2.7.7	Auswaschphase.....	17
2.8	Datenanalyse	17
2.8.1	Analyse des Monophasischen Aktionspotentials (MAP).....	17
2.8.2	Analyse von Arrhythmien	22
2.9	Statistik.....	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Bradykardie, EADs und Arrhythmien	23
3.2	Aktionspotential-Verlängerung und bradykardieabhängige gesteigerte Dispersionen	27
3.3	Stimulationseffekte.....	29
3.4	Der Effekt von Mexiletin	32
4	Diskussion	37
4.1	Hauptergebnisse.....	37
4.1.1	EKG-Veränderungen	37
4.1.2	Auswirkung der fixfrequenten Stimulation	37
4.1.3	Wirkungen von Mexiletin.....	38
4.2	Veränderte SCN5A-TG Herz-Physiologie, EADs und Arrhythmien	39
4.2.1	Veränderte Aktionspotentialdauer	39
4.2.2	Veränderte Dispersion der APD als proarrhythmischer Faktor.....	39
4.3	Spontane polymorphe ventrikuläre Tachykardien (pVT).....	40
4.4	Effekt der Stimulation.....	41
4.4.1	Auswirkung auf die APD, die Dispersion und auf EADs	41
4.5	Der Effekt einer Natrium-Kanal Blockade durch Mexiletin.....	44
4.6	Schlussfolgerung.....	45

5 Literaturverzeichnis	47
Danksagung	53
Lebenslauf	54
Anhang	I
A Abbildungsverzeichnis.....	I
B Tabellenverzeichnis.....	II
C Abkürzungsverzeichnis	III
D Veröffentlichte Manuskripte im Rahmen dieser Arbeit	IV
E Versuchsgenehmigungen.....	V

1 Einleitung

Das Lange-QT-Syndrom (Long-QT-syndrome, LQT) ist eine ventrikuläre Repolarisationsstörung mit gehäuftem plötzlichen Herztod aufgrund von Herzrhythmusstörungen. Bei Patienten mit langem QT-Syndrom treten insbesondere spezielle Herzrhythmusstörungen vom Typ „torsades de pointes“ (Spitzenumkehr-Tachykardien) auf [Dessertenne F et al., 1966].

Aufgrund der geringen Fallzahlen bei der Variante LQT – Syndrom 3 lassen sich neue antiarrhythmische Interventionen bei dieser Erkrankung nur sehr eingeschränkt klinisch überprüfen. Die Seltenheit der Erkrankungen macht es umso schwerer, valide Aussagen über die zugrunde liegenden Pathomechanismen oder etwaige spezifische Therapien machen zu können. Andererseits besteht beim langen QT Syndrom aufgrund der bekannten genetischen Defekte, die der Erkrankung zu Grunde liegen, eine berechtigte Hoffnung, dass in näherer Zukunft eine Genotyp-spezifische Behandlung bei einem Teil dieser Patienten durchgeführt werden kann. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Unterform LQT3 des LQT-Syndroms, welches lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen auslösen kann, am Modell untersucht.

Das Lange-QT-Syndrom verursacht eine Störung der elektrischen Erregungsrückbildung des Herzens. Bei dieser im Oberflächen-EKG nachweisbaren abnormen Veränderung kommt es zu einer pathologischen Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials und damit der QT-Zeit im EKG. Diese Verlängerung der QT-Zeit wird durch Veränderungen von Ionenströmen im Myokard verursacht und führt zu einer möglichen Triggerung von Herzrhythmusstörungen.

Klinisch relevant wird die Erkrankung durch auftretende Arrhythmien, speziell vom Typ Torsades de Pointes (TdP). Bei den Torsades de Pointes handelt es sich um polymorphe ventrikuläre Tachykardien, wobei die Kammerkomplexe kontinuierlich spindelförmig um die Nulllinie oszillieren [Dessertenne F et al., 1966]. Aufgrund der insuffizienten Pumpleistung des Herzens kommt es während dieser ventrikulären Tachykardien typischerweise zu vorübergehenden Synkopen, da Torsades de Pointes sich häufig selber terminieren. Letztendlich kann ein solcher Vorfall aber auch in einem plötzlichen Herztod resultieren, wenn die Torsades de Pointes in Kammerflimmern

degenerieren [Haverkamp W et al., 1993], [Garson A et al., 1993], [Haverkamp W et al., 1995].

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einem angeborenen, kongenitalen LQT-Syndrom und einer erworbenen, sekundären Form. Letztere wird durch repolarisationsverlängernde Medikamente wie zum Beispiel Kaliumkanal-blockierende Antiarrhythmika oder als Nebenwirkung von Antidepressiva, Diuretika oder Antihistaminika hervorgerufen und betrifft hauptsächlich ältere Menschen zwischen dem 5. und 6. Lebensjahrzehnt [Friedman MJ et al., 2003], [Witchel H et al., 2000].

Beim kongenitalen, angeborenen LQT-Syndrom sind das erstmals 1957 beschriebene, autosomal rezessiv vererbte Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom mit den Unterformen JNL 1-3 [Jervell A et al., 1957] und das erstmals 1963/1964 beschriebene, autosomal dominant vererbte Romano-Ward-Syndrom [Romano C et al., 1963] [Ward OC., 1964] zu unterscheiden.

Bis zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit wurden von dem autosomal-dominant vererbten Romano-Ward-Syndrom zwölf Unterformen (LQT 1-12) entdeckt und die dazugehörigen Genloci auf den jeweiligen mutierten Genen definiert [Roden DM et al., 1996], [Wu G et al., 2008], [Chen L et al., 2007], [Splawski I et al., 2004], [Medeiros-Domingo A et al., 2007], [Vatta M et al., 2006]. Für das Jervell-und-Lange-Nielsen Syndrom sind bisher zwei Gendefekte bekannt. [Chiang CE et al., 2000].

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein genetisches Modell, das eine bei Patienten mit langem QT-Syndrom 3 entdeckte Mutation des Gens SCN5A auf dem Chromosom 3p21 trägt. Dieses Gen codiert einen spannungsabhängigen Natrium-Kanal des Myokards. Durch die Mutation werden die Natrium-Ströme im Myokard so verändert, dass es zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer kommt [Jiang C et al., 1994], [George Jr. Al et al., 1995], [Wang Q et al., 1995].

Das LQT3-Syndrom kommt im Vergleich zu den Unterformen LQT1 oder LQT2 deutlich seltener vor. Im Gegensatz zu den anderen Unterformen ist die klinische Symptomatik aber oft schwerwiegender als bei anderen Varianten des LQT-Syndroms [Priori SG et al., 2003] und kann vor allem bei Kindern und jungen Adoleszenten zu schwerwiegenden Krankheitsbildern bis hin zum plötzlichen Herztod führen [Schwartz PJ et al., 1998], [Schwartz PJ et al., 2000], [Wedekind H et al., 2001].

Die Letalität bezogen auf die prozentuale Zahl der Ereignisse erscheint höher als bei den anderen Formen des LQT-Syndroms [Zareba W et al., 1998].

Die klinische Erfahrung in der Behandlung der LQT3-Patienten ist aufgrund der geringen Anzahl an Erkrankungen nur spärlich. Die Therapieempfehlungen bezüglich der Medikamentengabe sowie der Implantation von Schrittmachern und Defibrillatoren werden kontrovers diskutiert. Während zum Beispiel Patienten mit den Unterformen LQT1 und LQT2 von einer Therapie mit β -Blockern profitieren, ergibt sich für die Patienten mit dem LQT3-Syndrom dadurch kein nachweisbarer Nutzen [Moss AJ et al., 2000].

Charakteristisch für das LQT3-Syndrom ist ein Auftreten von Synkopen und kardialen Ereignissen vor allem in Ruhe- bzw. Bradykardiephasen. Studien haben gezeigt, dass ein Teil der Patienten, bei denen die SCN5A-Mutation vorliegt, vermutlich vor allem in Ruhephasen wie zum Beispiel beim Schlafen unter Bradykardien leiden, die in Verbindung mit einer verlängerten Repolarisation der Myokardzellen stehen, wodurch dann lebensgefährliche Arrhythmien ausgelöst werden können [Moss AJ et al., 1995], [An RH et al., 1998].

Bei einem anderen Teil der Patienten, vor allem bei Kindern, lässt sich unmittelbar vor Beginn von Herzrhythmusstörungen oder Synkopen ein möglicherweise funktioneller AV-Block nachweisen [Scott W et al., 1987], [van Hare GF et al., 1990], [Rosenbaum MB et al., 1991].

Vergleichend hierzu treten beim LQT2-Syndrom beispielsweise pathologische kardiale Ereignisse vor allem unter physischen oder psychischen Stressbedingungen so wie tachykarden Phasen auf [Schwartz PJ et al., 1995].

Zur Prävention von Bradykardien als auslösender Faktor von lebensbedrohlichen Arrhythmien wie zum Beispiel von Torsades de Pointes beim LQT3-Syndrom, wird eine genspezifische Therapie in Abgrenzung zu den anderen Unterformen des LQT-Syndroms mit anderen Genloci und anderen Pathomechanismen diskutiert [Schwartz PJ et al., 2001].

Aufgrund der erwähnten insuffizienten Datenlage bezüglich der Phänotypisierung und der genspezifischen Therapiemöglichkeiten ist das LQT3-Syndrom Gegenstand dieser Arbeit.

Um die Effekte von Bradykardien, von Interventionen bei frühen Nachdepolarisationen (early afterdepolarisations, EADs), Ventrikelektropien und TdP-ähnlichen ventrikulären Tachyarrhythmien beim LQT3-Syndrom zu erforschen, wurden intakte, schlagende Herzen von transgenen Mäusen mit einer knock-in Deletion des SCN5A^{Δ/+} (SCN5A-Tg) im Vergleich zu Wildtyp-Herzen untersucht. Bei den transgenen Mäusen fehlen dieselben Aminosäuren des KPQ-Gens (Lys-1505, Pro-1506, Gln-1507 zwischen den Domänen III und IV in der Natrium-Kanal α -Untereinheit) wie bei LQT3-Patienten [Bennett PB et al., 1995], [Dumaine R et al., 1996], [Wang DW et al., 1996], [Chandra R et al., 1998], [Nuyens D et al., 2001].

Um eine genauere Phänotypisierung der SCN5A-Tg-Mäuse durchführen zu können, werden die in der vorliegenden Arbeit intakten, schlagenden und perfundierten Mäuseherzen auf unterschiedliche elektro-kardiale Ereignisse hin untersucht und die Beobachtungen mit denen an Wildtyp-Geschwistertieren verglichen.

Um eine möglichst differenzierte Charakterisierung durchführen zu können, wurden unterschiedliche Fragestellungen in die Versuchsprotokolle eingegliedert.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit sollen zeigen, welche Auswirkungen ein iatrogener AV-Block auf Arrhythmien und Aktionspotentiale bei SCN5A-Tg Herzen hat. So sollen pathologische Auffälligkeiten wie zum Beispiel Arrhythmien, frühe Nachdepolarisationen oder Pausen in der Herzaktivität aufgezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem intakte, schlagende, retrograd perfundierte Mäuseherzen einer fixfrequenten Stimulation über einen Ventrikulkatheter ausgesetzt. Hierbei wird nun unter verschiedenen Stimulationsprotokollen die Aktionspotentialdauer gemessen und ihr Verhalten bei unterschiedlichen Stimulationsintervallen bis hin zur bradykarden Stimulationsfrequenz untersucht.

Ein weiteres Augenmerk wird in der vorliegenden Arbeit auf die Dispersion der Aktionspotentialdauer gelegt. Die Dispersion der Aktionspotentialdauer ist definiert als Differenz der längsten und der kürzesten Aktionspotential-Intervalle aller Ableitungen der Monophasischen Aktionspotentiale (MAP) [Fabritz L et al., 1994]. Sie ist dabei das Spiegelbild von regionalen Unterschieden der ventrikulären Repolarisationen und damit einhergehenden Instabilitäten im elektrischen System des Ventrikelmyokard [Yamaguchi M et al., 2003].

Eine verlängerte Dispersion ist ein mögliches diagnostisches EKG-Kriterium für das Vorliegen eines QT-Syndroms [Mönnig G et al., 2001]. Es soll gezeigt werden, wie sich die Dispersion der Aktionspotentialdauer unter fixfrequenter Stimulation sowie unter einer Bradykardiesimulation verhält.

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkungen des Natrium-Kanal-blockierenden Medikamentes Mexiletin. Es soll gezeigt werden, welche Auswirkungen die Zugabe des Medikamentes auf die Aktionspotentialdauer, die Dispersion der Aktionspotentialdauer, auf die effektive Refraktärzeit und die Arrhythmien hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll sein, eine differenzierte Phänotypisierung der SCN5A-TG-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypvarianten im Hinblick auf die oben genannten Charakteristika der elektrischen Herzaktivität zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Das SCN5A-Tg Maus Modell

Die Untersuchungen wurden an isolierten, zuvor explantierten und präparierten Herzen von Wildtyp-Mäusen (WT, n=19) und Δ KPQ-transgenen Mäusen (Δ KPQ-Tg, n=18), die Träger des mutierten Δ KPQ SCN5A Gens waren, durchgeführt. Tierversuche an Mäusen haben den Vorteil, dass etablierte Methoden zur Generierung von genetisch manipulierten Mäusen bestehen. Des Weiteren gleicht das Mausgenom dem des Menschen hinsichtlich der Größe und der Anzahl der Gene. Mäuse haben dank kurzer Generationszeiten von 2,5 bis 3 Monaten eine hohe Reproduktionsrate und außerdem eine geringe Lebenserwartung von 2,5 bis 3 Jahren. Daher lassen sich die Effekte einer Genmanipulation im Laufe der Entwicklung der Maus gut beobachten. Die Tiere in den vorliegenden Experimenten waren 12,5 bis 18,2 Wochen alt (Mittelwert 15,4 Wochen). Das Mausmodell wurde von Edward und Peter Carmeliet, K.U. Leuven, Belgien, zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Studie wird eine Kontrollgruppe von Wildtyp Geschwistertieren mit Δ KPQ SCN5A transgenen Mäusen verglichen. Die transgenen Mäuse sind Träger einer knock-in Deletion der Aminosäuresequenz 1505-1507 (KPQ) im kardialen Natriumkanal, die durch das SCN5A-Gen auf dem Chromosom 3p21 kodiert wird. Die durch diese Deletion hervorgerufene Verlängerung der QT-Zeit entspricht in heterozygoten Individuen ($SCN5A^{\Delta/+}$), bei autosomal dominantem Erbgang, dem LQT3-Syndrom. Sowohl der Entwurf als auch die Durchführung der Studie erfolgt streng nach den allgemeinen und lokalen Tierschutzrichtlinien [NIH publication No. 85-23, revised 1996].

2.2 Präparation des isolierten Mäuseherzen

Den zu untersuchenden Mäusen wird ein Bolus von 250 IE Natrium-Heparin (Liquemin®) intraperitoneal zwischen die Dünndarmschlingen zur Resorption appliziert, um eine vorzeitige Thrombembolisation während der Herzexplantation zu

verhindern. Die Anästhesie der Mäuse erfolgt mit Urethane in einer Konzentration von 2g/kg KG, das ebenfalls intraperitoneal zwischen die Dünndarmschlingen injiziert wird. Als Nachweis der ausreichenden Anästhesie dient die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes mit einer Pinzette. Sollte dieser nach circa 5 Minuten noch auslösbar sein, so ist eine zusätzliche Gabe von Urethane notwendig (0,07ml derselben Konzentration, danach erneute Überprüfung der Anästhesie). Während des Anästhesievorgangs wird die Maus ständig vor eine Infrarot-Wärmelampe gehalten, um ein Absinken der Körperkerntemperatur möglichst zu verhindern.

Die Maus wird in Anästhesie zur Präparation auf einer temperierten Wärmeplatte fixiert. Vor der Explantation des Herzens wird ein digitales 6-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG; CORINA, GE Hellige Marquette Medical Systems, Freiburg, Germany, Software benutzeradaptiert für Mäuse-EKG) sowie ein analoges 12-Kanal-EKG (Siemens Megacart, Siemens Erlangen, Germany) angefertigt. Die Extremitätenableitungen nach Einthoven I, II, III und nach Goldberger aVR, aVL und aVF werden digital abgeleitet. Analog werden zusätzlich die Brustwandableitungen V₁–V₆ aufgezeichnet.

Der Peritonealraum wird mittels medianer Laparatomie mit einer scharfen Schere eröffnet. Am Xiphoid wird eine mediale Zwerchfellinzision angelegt und unter Sicht auf das schlagende Herz und mit ausreichendem Sicherheitsabstand beidseits nach lateral entlang der Rippenbögen erweitert. Es erfolgt die Durchtrennung der Rippen entlang der Medioaxillarlinie nach kranial bis die ventrale Thoraxwand in ausreichendem Abstand zum Herzen und den Abgängen der großen Gefäße unter Durchtrennung des Sternums entfernt werden kann.

Nun wird das gesamte Herz-Lungen-Kompartiment explantiert und unmittelbar danach in einen vorher bereitgestellten Behälter mit heparinisierte, ca. 37°C warme Pufferlösung (Krebs-Henseleit Pufferlösung, Tab. 2.1) getaucht. Es werden die Lungenlappen, die Lungenarterien und -venen sowie der Herzbeutel entfernt. Der Aortenstumpf wird so präpariert, dass alle Gefäßabgänge entfernt sind und der Stumpf bis zum Abgang aus dem linken Ventrikel auf 2-3mm ohne Bindegewebe freiliegt.

Nun wird die Aorta auf eine Perfusionskanüle (27 Gauge Durchmesser) aufgezogen und mit einem Seidenfaden (metric 1.5, USP 4/0) befestigt und so fixiert, dass die Koronargefäße retrograd perfundiert werden (Abbildung 2.1).

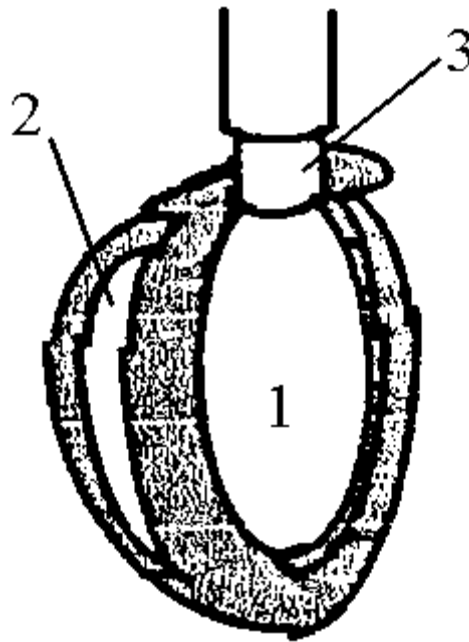


Abbildung 2.1: Schematische Skizze des Querschnitts durch das präparierte Herz. Legende: **1** linker Ventrikel, **2** rechter Ventrikel, **3** präparierter Aortenstumpf, mit aufzogener Perfusionskanüle

2.3 Positionierung des Herzens

Das zuvor präparierte Mäuseherz wird nun senkrecht an der Perfusionskanüle hängend in einen Langendorff-Apparat (Apparatus Isolated Heart, Size 1, Hugo-Sachs Elektronik, Type 844, March-Hugstetten, Germany) installiert. Die retrograde Perfusion (siehe Abschnitt 2.4) wird sichergestellt, die Messkatheter zur Bestimmung des Monophasischen Potentials (MAP) und des EKG's werden in Position gebracht (siehe Abschnitt 2.6). Der genaue Versuchsaufbau ist zum einen der Abbildung 2.2 und zum anderen den folgenden Kapiteln in den Erläuterungen der wichtigsten Gesichtspunkte des experimentellen Aufbaus zu entnehmen.

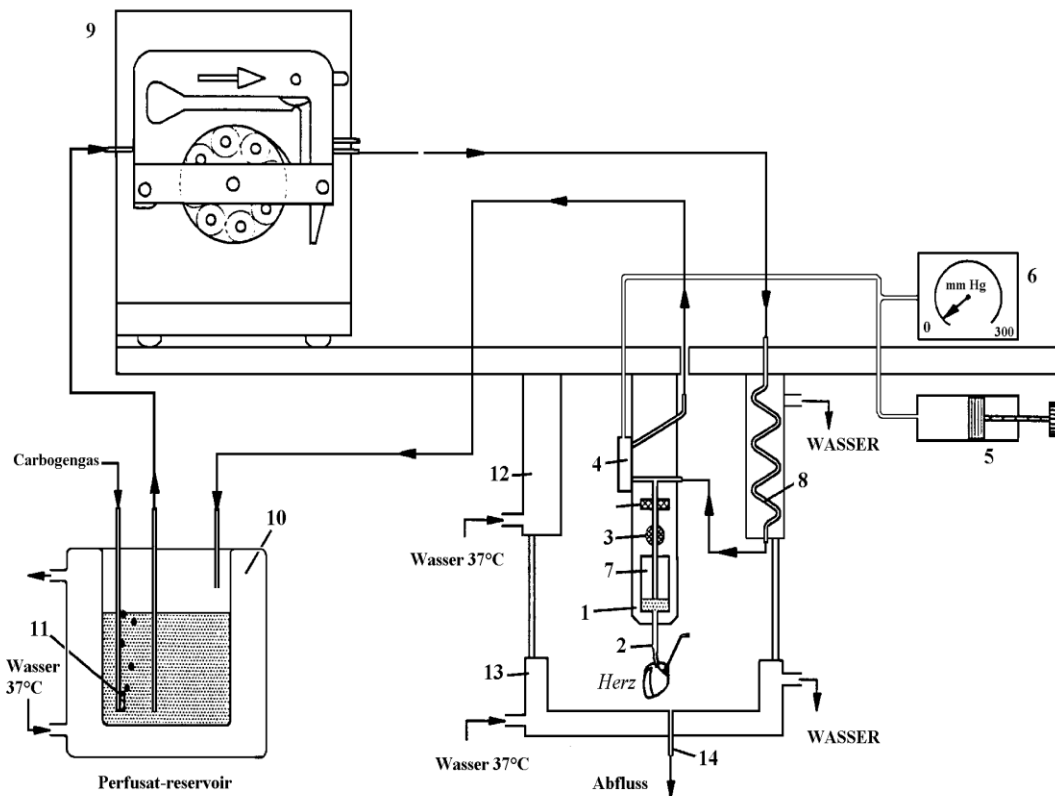


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; Bedienungsanleitung Hugo Sachs Elektronik, Germany; Legende: **1** Aortenblock, **2** Aortenkanüle, **3** Absperrhahn, **4** Flusswiderstand-Einstellung des Perfusionsdruckes, **5** Spindelspritze zum Einstellen des Flusswiderstandes, **6** Zeigermanometer zur Anzeige des eingestellten Drucks am Flusswiderstand, **7** Windkessel-Luftvolumen zur Nachbildung der Compliance der Aorta, **8** Wärmetauscher im Oberteil der Herzkammer, **9** Schlauchpumpe, **10** Perfusat-Vorratsgefäß – doppelwandig – temperiert mit Zu- und Abflüssen, **11** Gasfritte zur Begasung des Perfusats, **12** Oberteil der doppelwandigen Herzkammer – temperierbar, **13** Unterteil der doppelwandigen Herzkammer – temperierbar – herunterklappbar, **14** Ablaufrohrchen zum Abfluss des abtropfenden Efluats

2.4 Retrograde Perfusion des Herzens

Schon vor Beginn der Anästhesie der Maus und Explantation des Herzens sollte eine ausreichende Menge (circa 1,5 Liter pro Versuchreihe) einer Krebs-Henseleit-Pufferlösung zur späteren Perfusion hergestellt worden sein.

Die chemische Zusammensetzung des Perfusats ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen. Alle Zusätze werden auf einer Waage abgewogen, die bis auf vier Nachkommastellen geeicht ist (Typ ABS 120-4, Kern&Sohn, Balingen-Frommern, Germany). Grundlage

der Perfusionslösung ist bi-destilliertes Wasser (Aqua-Bidestillata, Waldeck GmbH Münster, Germany).

Tabelle 2.1: Chemische Zusammensetzung der Krebs-Henseleit Pufferlösung

	g / L	mmol / L
NaCl	6,896	118,00
Na HCO₃	2,090	24,88
KH₂ PO₄	0,161	1,18
Glucose x H₂O	1,100	5,55
Na - Pyruvat	0,220	2,00
MgSO₄ x 7 H₂O	0,205	0,83
CaCl₂ x 2 H₂O	0,265	1,80
KCL	0,350	4,70

Die Lösung wird nach Fertigstellung nochmals gefiltert (Faltenfilter, Marcherey-Nagel GmbH, Düren, Germany), um keine eventuell vorhandenen groben Verunreinigungen in die Perfusionsleitungen gelangen zu lassen. Abschließend wird die Lösung in einen ausreichend dimensionierten, doppelwandigen Vorratsbehälter gegeben (Radnoti Glas Technology INC., Monrovia, CA, USA). Zum Äquilibrieren der Pufferlösung wird Carbogengas (5 Vol.% CO₂, 95 Vol.% O₂) verwendet. Eine regelbare Rollenpumpe (Reglo Digital, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany) befördert das Perfusat in die Langendorff-Apparatur. Der Zufluss wird über einen Flussmesser (Transit time flowmeter modul, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) gemessen. Der Zuflussdruck über die Perfusionskanüle zur Aorta wird bei 100-110 mmHg und über die Pumpenleistung bei einer durchschnittlichen, konstanten Durchflussrate von 4-7 ml/min gehalten. Es erfolgt eine druckkonstante Perfusion. Um einen besseren Durchfluss der Pufferlösung durch das Herz zu gewährleisten, wird die Nadel einer kleinen Injektionskanüle (BD Microlance, Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Germany) von der Herzspitze her transmyokardial in den linken Ventrikel eingeführt. Dadurch kann die Lösung besser aus dem Ventrikel abfließen.

2.5 Wärmeregulation

Aufgrund des geringen Organvolumens ist das Herz sehr gefährdet, starken Temperaturschwankungen zu unterliegen. Dies würde sich negativ auf die Qualität der abgeleiteten Signale und die mögliche Versuchsqualität auswirken, da die Funktionalität des Herzens vor allem bei zu niedriger Temperatur stark abnimmt. Aus diesem Grunde müssen verschiedene Maßnahmen getroffen werden, um das Herz bei einer konstanten Temperatur von ca. 36 ± 1 °C zu halten.

Schon bei der Präparation muss darauf geachtet werden, dass die Maus und danach auch die Präparationsbehälter auf einer Wärmeplatte liegen.

Die Perfusionslösung wird in einem doppelwandigen Vorratsgefäß (Radnoti Glas Technology INC., Monrovia, CA, USA) gelagert, dessen Volumen zwischen Außen- und Innenwand von ca. 37 °C warmen Wasser durchspült wird (Abb. 2.2). Dadurch erwärmt sich das Perfusat, schon bevor es in die Langendorff-Apparatur gepumpt wird. Die Erwärmung erfolgt über einen regelbaren Durchlauferhitzer (Lauda ecoline 003, Lauda-Königshofen, Germany).

Eine weitere Anpassung der Temperatur des Perfusats erfolgt innerhalb der Langendorff-Apparatur über einen Wärmetauscher (Abb. 2.2, Punkt 8). Die Herzkammer, in der das isolierte Mäuseherz frei hängt, ist ebenfalls temperiert. Das Oberteil und das herunterklappbare Unterteil sind doppelwandig und der Zwischenraum mit 37 °C warmen Wasser durchspült. Der Heizkreislauf, mit dem das Vorratsgefäß des Perfusats sowie die verschiedenen Komponenten der Langendorff-Apparatur beheizt werden, wird ebenfalls durch die oben genannte Rollenpumpe parallel betrieben. Das Wasser des Heizkreislaufes wird im Wärmeaustauschprinzip in einem Heizbad erwärmt, über welches die Temperatur des Heizkreislaufes geregelt werden kann. Die ausreichende Temperaturregulation wird durch Messung der Temperatur der Lösung, welche zuvor das Herz verlassen hat, überprüft, da anzunehmen ist, dass das Herzgewebe dieselbe Temperatur hat, wie das Perfusat. Dies geschieht mittels einem digitalen Thermometer (Peak tech 5115, Lau GmbH, Ahrensburg, Germany).

Da die Überwachung der Temperatur von Bedeutung für das qualitative Ergebnis des Versuchs ist, erfolgt diese direkt nach Aufhängen des Herzens, sowie während der

Versuchsdauer. Dadurch kann die Temperatur des Herzens in der Versuchsanlage gegebenenfalls ständig optimiert werden.

2.6 Positionierung der Elektroden

Ein octopolarer Katheter (CIB'ER Mouse, NuMed Inc., Hopkinton, N.Y., USA, Elektrodenbreite:0,5mm, Elektrodenabstand:0,5mm) wird im rechten Vorhof und im rechten Ventrikel des Herzens positioniert. Hierzu wird mit einer scharfen Schere und einer kleinen Pinzette ein kleines Loch mit einer Größe von circa 1 mm² in das Myokard des rechten Vorhofes geschnitten. Bei korrekter Lage des Katheters können sowohl Signale vom Vorhof- als auch vom Ventrikelmyokard abgeleitet werden. Eine getrennte Stimulation dieser Bereiche ist dann ebenfalls möglich (Abb. 2.4).

Die Ableitung der elektrischen Herzaktion erfolgt mittels Ag-AgCl-Elektroden über ein Gewebepad-EKG. Die Signale werden mit einem EKG-Verstärker mit einer Bandbreite von 0,1 bis 300 Hz (ECG-Amplifier, Hugo Sachs, March-Hugstetten, Germany) gefiltert und vorverstärkt. Darüber hinaus werden kontinuierlich drei monophasische Aktionspotentiale (MAP) simultan epikardial vom rechten Ventrikel und vom septalen Bereich des linken Ventrikels sowie von der linksventrikulären freien Wand abgeleitet und mittels eines MAP-Vorverstärkers (MAP-Preamplifier Model No.300, EP Technologies, Sunnyvale, CA, USA) verstärkt. Die Katheterspitzen sind federnd gelagert, sodass ständig ein konstanter senkrechter Kontaktdruck zwischen Katheterspitze und Epikard besteht, um eine gleich bleibende Ableitung des MAP über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten (Abb. 2.3). Über einen DC-gekoppelten Vorverstärker werden die Signale verarbeitet (Modell 2000, EP Technologies Inc., San Jose, CA, USA) und mit einer halbautomatischen, speziell adaptierten Software (LabVIEW 5.0, National Instruments, Texas) aufgezeichnet [Franz MR et al. 1995].

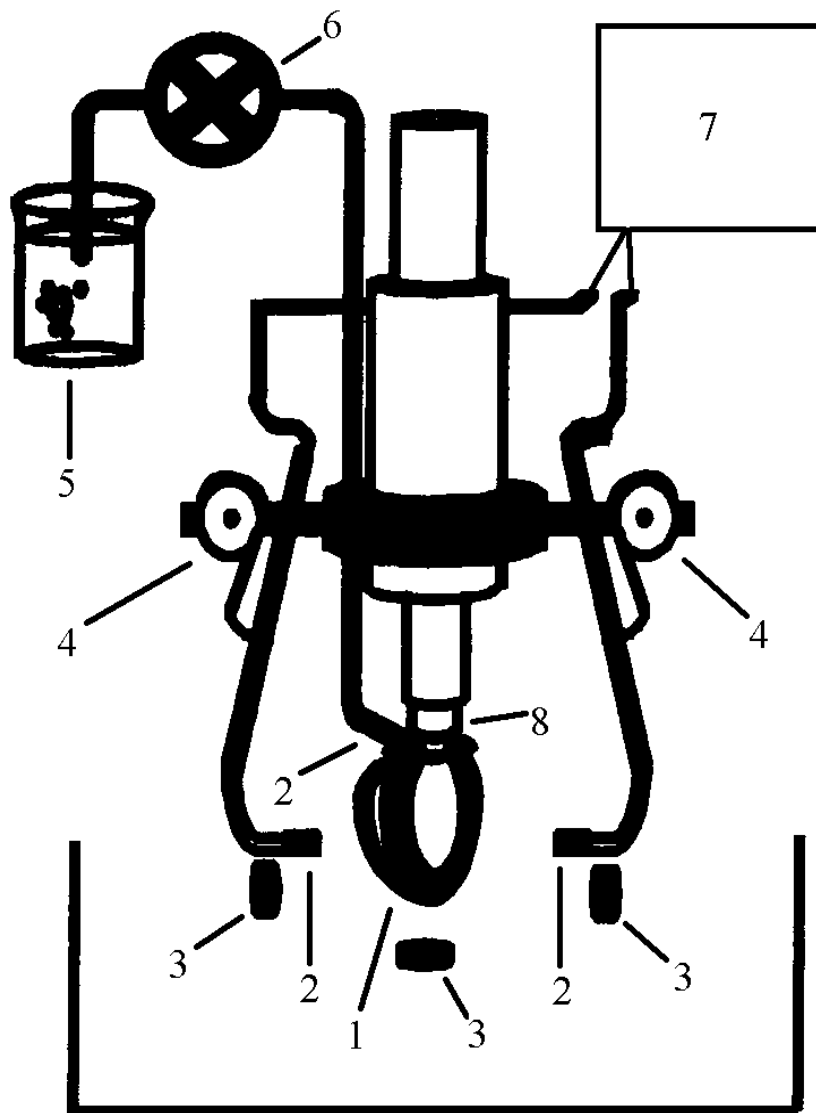


Abbildung 2.3: Schematische Übersichtsskizze des Aortenblockes mit der retrograd perfundierten Aorta, Legende: **1** retrograd perfundiertes, senkrecht am Aortenstumpf hängendes Herz, **2** MAP-Katheter (hier nicht am Herzen aufliegend), **3** Gewebepol-EKG-Elektroden, **4** Federlagerung der MAP-Katheter für ständig gleichmäßigen Anpressdruck, **5** Perfusat-Vorratsbehälter, **6** Schlauchpumpe, **7** EDV-Aufzeichnungseinheit bestehend aus MAP-Vorverstärker und PC zur Datenspeicherung

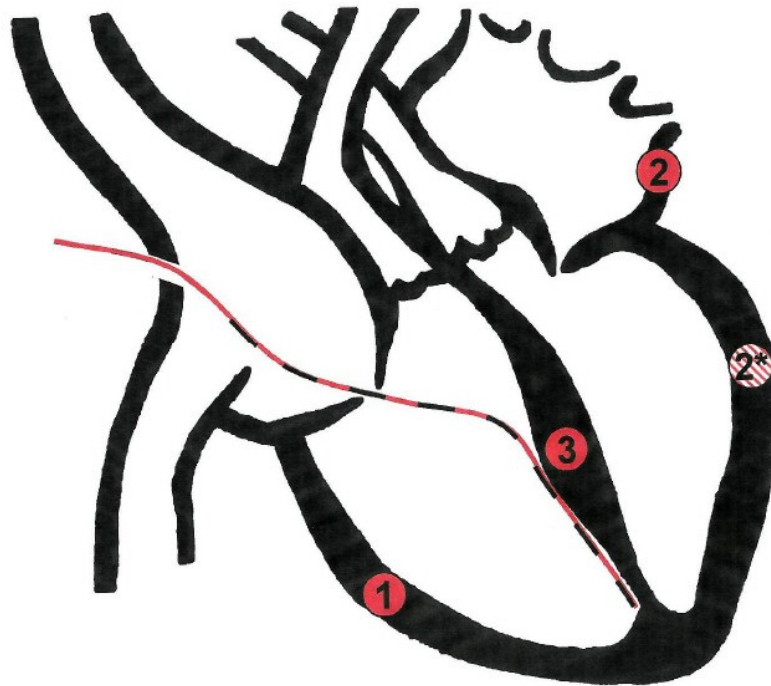


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Lage des octopolaren Katheters im rechten Ventrikel, Legende: 1 rechte Ventrikelwand, 2* linker Ventrikel, 2 linker Vorhof, 3 Septum

2.7 Versuchsprotokoll

Nachdem das Herz wie oben beschrieben in den Langendorff-Apparat installiert worden ist, werden die Temperatur des austretenden Perfusats und die Durchflussmenge überprüft und eine Zeitspanne von 5-10 Minuten abgewartet. Weiterhin wird die Signalqualität durch entsprechendes Anpassen der Katheterpositionen sichergestellt (siehe Abschnitt 2.6, Positionierung der Elektroden), damit diese während der darauf folgenden Versuchsreihen möglichst konstant und von guter Qualität ist.

2.7.1 AV-Block

Nach dieser Eingewöhnungszeit wird nun ein AV-Block induziert, um die elektrischen Eigenschaften der Ventrikel bei langsamen Frequenzen beobachten zu können. Dazu wird durch das vorher präparierte Loch im rechten Vorhof eine feine spitze chirurgische

Pinzette eingeführt und das septale Gewebe im Bereich des Anulus Fibrosus mit dezentem Druck gequetscht. Nun wird die Stabilität des AV-Blockes, der sich durch eine entkoppelte atriale und ventrikuläre Aktivität im EKG darstellt, für weitere 5 Minuten überprüft und gegebenenfalls durch die oben beschriebene Vorgehensweise nochmals sichergestellt.

2.7.2 Stimulationsprotokoll

Mittels eines experimentellen Stimulationsgerätes (Universal 2-Kanal-Stimulator, Rissel-Medizintechnik, Münster, Germany) wird über den octopolaren Katheter ein Stimulationsprotokoll durchgeführt. Zu Beginn der Versuchsreihe wird die Stimulationsschwelle bestimmt. Dabei wird die minimale Stromstärke ermittelt, bei der es noch zu einer Überleitung des Stromreizes vom Katheter zum Myokard kommt (der Schwellenwert liegt bei den Versuchen zwischen 0,03 und 0,26 mA). Für die darauf folgende Versuchsreihe wird die doppelte Stromstärke verwendet, um sicherzustellen, dass es während der Stimulation ständig zu einer Überleitung des Stimulationsimpulses kommt.

Die Stimulationsschwelle kann sich während des Versuches ändern. Gegebenenfalls muss die Stromstärke dann wie oben beschrieben neu eingestellt werden, wenn die Stimulationsreize nicht mehr auf das Myokard übergeleitet werden.

2.7.3 Fixfrequente Ventrikelstimulation

Nun wird eine fixfrequente Ventrikelstimulation durchgeführt. Mit Zykluslängen von 100-, 200-, 300-, 400- und 600ms wird der rechte Ventrikel über den octopolaren Katheter mit jeder einzelnen Zykluslänge jeweils 90 Sekunden lang ohne zwischenzeitliche Pausen stimuliert. Oft ist ein Pacing mit einer Zykluslänge von 600ms nicht möglich, da die Eigenfrequenz des Ventrikels über dieser Stimulationsfrequenz liegt. Nach dem fixfrequenten Pacing erfolgt eine erneute Bestimmung der Stimulationsschwelle und ggf. eine Angleichung der Stromstärke (s.o.).

2.7.4 Plötzliche Frequenzsteigerung

Im Anschluss daran wird eine plötzliche Frequenzsteigerung simuliert. Hierzu wird das Myokard erst 15 Sekunden mit niederfrequenten Impulsen stimuliert. Danach erfolgt eine plötzliche Frequenzsteigerung und das Herz wird 90 Sekunden mit einer wesentlich schnelleren Frequenz stimuliert. Diesen Vorgang wiederholt man mit verschiedenen Frequenztreppen, die sich wie folgt zusammensetzen: Niederfrequentes Pacing mit 600ms für 15 Sekunden, dann direktes Umschalten auf eine Frequenz von 200ms. Dasselbe führt man mit Frequenztreppen von 400ms auf 100ms und von 300ms auf 100ms durch. Bei zu hoher Eigenfrequenz des Ventrikels ist eine Stimulation mit 600ms nicht möglich (siehe auch 2.7.3).

2.7.5 Bestimmung der Effektiven Refraktärzeit (ERP)

Zum Abschluss dieses Versuchteils wird die effektive Refraktärzeit (effective refractory period, ERP) bestimmt. Dazu wird das Myokard mit einer fixfrequenten Zykluslänge von 200ms stimuliert und nach einer definierten Anzahl von Stimuli (ca. 100) wird ohne Pause ein einzelner Stimulus in sehr kurzem Abstand an den vorherigen abgegeben. Wird dieser Stimulus auf das Myokard übertragen und lässt sich im MAP/EKG eine Ventrikelaktivität ableiten, so sind die Myokardzellen schon wieder erregbar. Daraufhin wird wiederholt nach einer bestimmten Anzahl von fixfrequenten Stimuli ein Stimulus mit immer kürzer werdendem Abstand abgegeben (Verkürzung jeweils um 2 ms). Bei einem bestimmten Zeitabstand zwischen dem vorletzten und dem sehr schnell darauf folgenden letzten Stimulus wird die Erregung nicht mehr auf das Myokard übertragen. Dies ist die effektive Refraktärzeit, bei der die Myokardzellen noch nicht wieder erregbar sind.

2.7.6 Zusatz von Mexiletin

Im zweiten Teil des Versuches wird der Perfusionslösung Mexiletin (Boehringer Ingelheim, Mexitil®) in einer Konzentration von 4µg/l zugesetzt. Mexiletin ist ein schnell dissoziierender Natriumkanalblocker (Lidocaintyp). Es hemmt den schnellen Natriumeinstrom und damit schnell aufeinander folgende Aktionspotentiale. Als Folge

davon nehmen Erregungsleitungsgeschwindigkeit und Erregbarkeit der Myokardzellen ab.

Es hat sich bewährt, einen weiteren doppelwandigen und beheizten Vorratsbehälter mit einer Mexilitinlösung in der Konzentration von $4\mu\text{g/l}$ vorzubereiten. Auch hier wird zunächst ca. 5 Minuten abgewartet, damit das Perfusat mit Mexiletin komplett das Herzgewebe durchsetzen kann. Sollte in dieser Zeit kein Eigenrhythmus des Herzens existieren, so wird das Herz mit einer Zykluslänge von 600ms stimuliert. Danach wurde das Stimulationsprotokoll, wie in den Punkten 2.7.2 bis 2.7.5 beschrieben wiederholt.

2.7.7 Auswaschphase

Der dritte Teil des Versuches besteht aus der Auswaschphase. Dazu wird das Mäuseherz wieder mit der ursprünglichen Perfusionslösung (Tab.2.1) ohne Mexiletinzusatz durchspült. Dabei wird über zehn Minuten lang das Auf- bzw. Wiederauftreten von Arrhythmien beobachtet und dokumentiert.

2.8 Datenanalyse

2.8.1 Analyse des monophasischen Aktionspotentials (MAP)

Die epikardial vom Myokard abgeleiteten und vorverstärkten monophasischen Aktionspotentiale werden mittels eines Analyse-Programms (LabVIEW 5.0, National Instruments, Texas, USA) digital aufgezeichnet und sind nach Beendigung des Experimentes in Echtzeit abrufbar. Die Auswertung der aufgezeichneten monophasischen Aktionspotentiale erfolgt ebenfalls computergestützt.

Um qualitativ vergleichbare Ergebnisse bei der Untersuchung der MAP-Signale zu erreichen, werden folgende Qualitätskriterien bei der Auswertung limitierend berücksichtigt:

Es muss eine stabile isoelektrische Linie und eine gleich bleibende MAP-Morphologie gegeben sein. Weiterhin sollte das einzelne MAP charakterisiert sein durch einen schnellen Aufstrich ohne negative Spikes. Die Amplitude des MAP muss mindestens

1 mV betragen und die erste schnelle Repolarisationsphase muss ohne eine frühzeitige Plateaubildung erfolgen (Abb. 2.5 und 2.6).

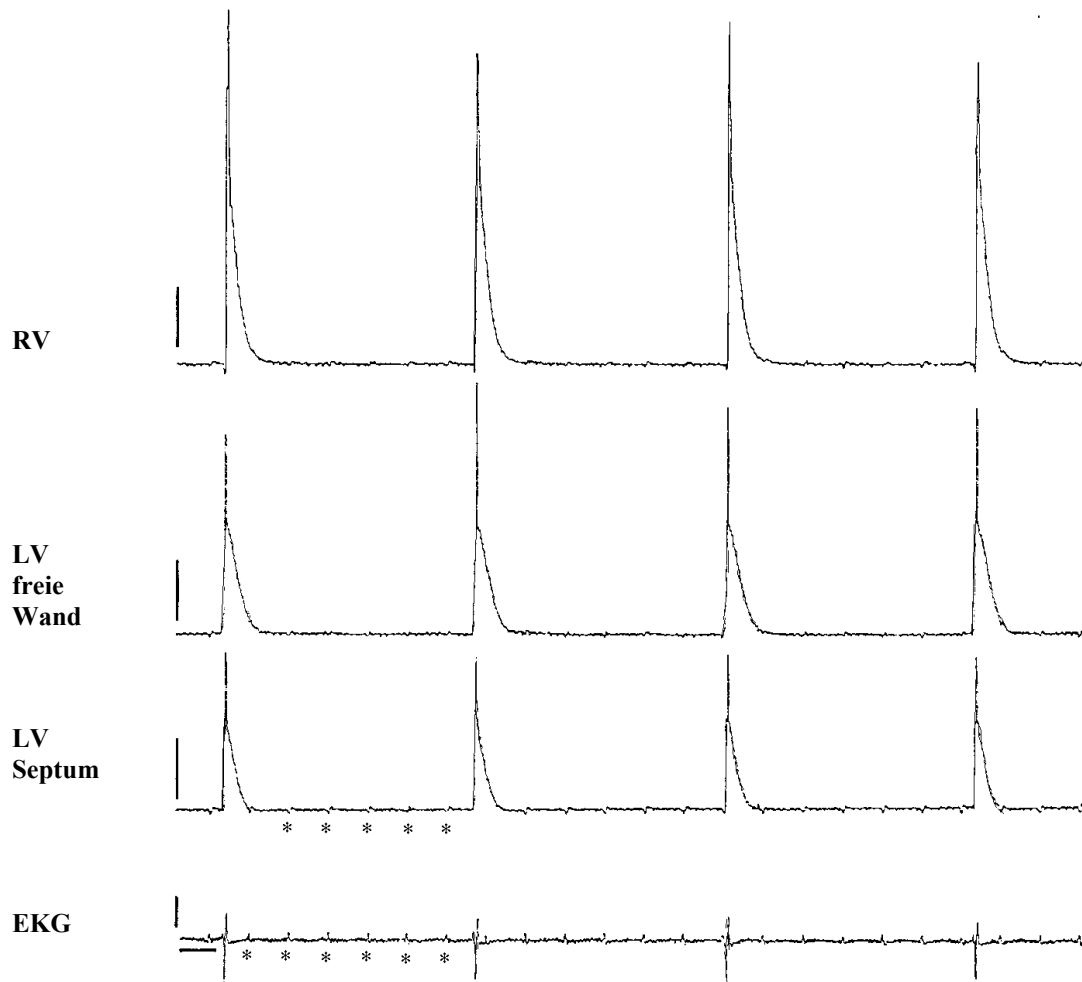


Abbildung 2.5: Simultane Originalaufzeichnung der drei MAP's und des EKG's bei bestehendem AV-Block. **RV:** MAP des rechten Ventrikels, **LV freie Wand:** Ableitung eines MAP vom Bereich der freien Wand des linken Ventrikels, **LV Septum:** Ableitung eines MAP vom septalen Bereich des linken Ventrikels. Die Sternchen (*) markieren die Vorhofaktivität. Die Kalibrierungsbalken markieren 1mV Amplitude und 100ms Aufzeichnungsdauer

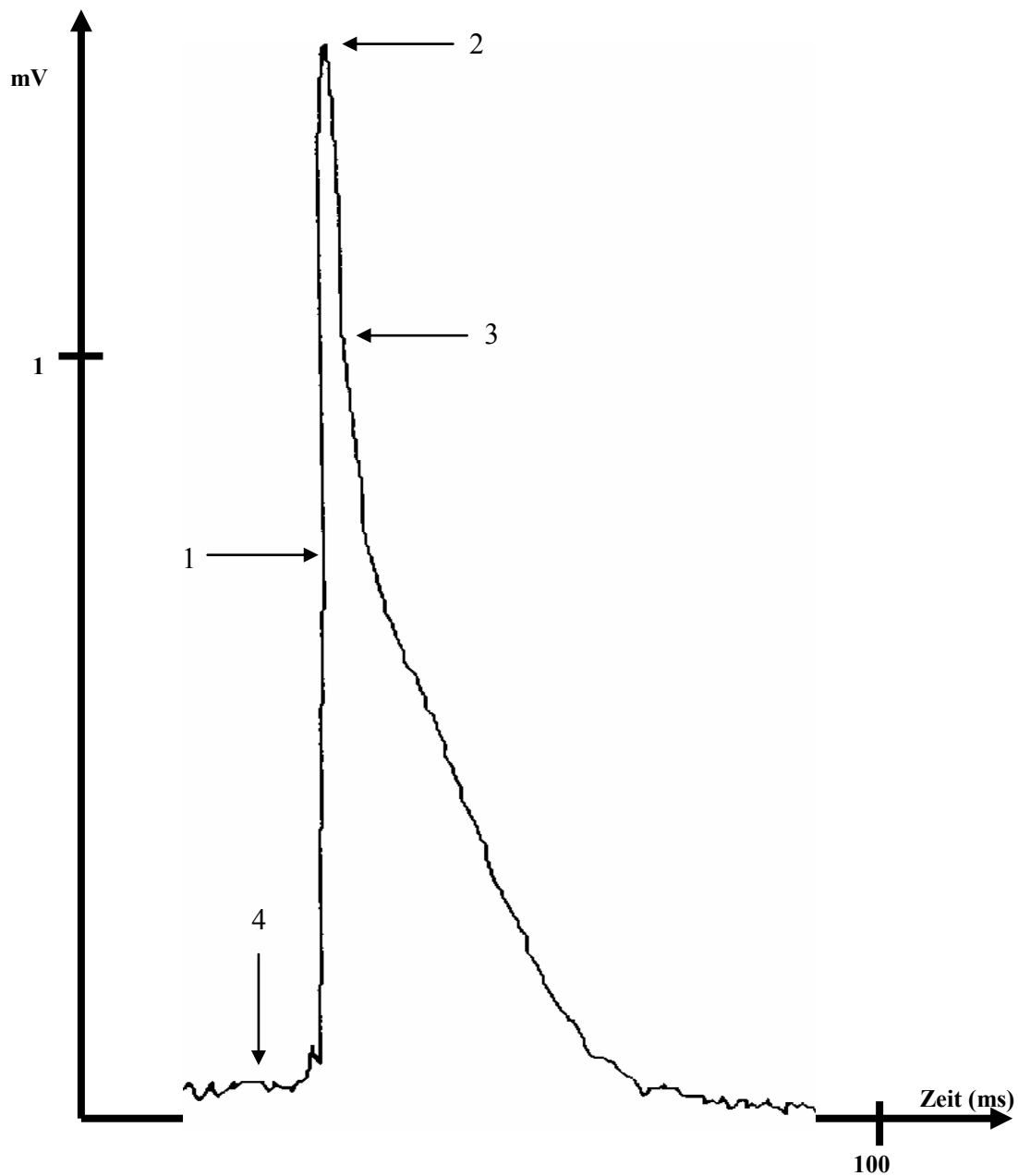


Abbildung 2.6: Originalaufzeichnung eines epikardialen MAPs. Legende: **1** schneller Aufstrich, **2** Amplitudenspitze von über 1mV, definiert als 0% der Repolarisation **3** zügige Repolarisationsphase ohne vorzeitige Plateaubildung, **4** stabile isoelektrische Linie (hier mit 50 Hz Artefakten), definiert als 100% der Repolarisation

Analysiert wurden folgende Parameter des MAP's:

Es wird die Aktionspotentialdauer (APD) bei 50%, 70% und 90% der Repolarisation des MAPs gemessen. Die maximale Amplitude des MAP-Aufstriches wird dabei als 0%

der Repolarisation definiert. Die elektrische Diastole, in der sich keine elektrophysiologische Aktivität am Myokard ableiten ließ, wurde als Punkt der 100%-igen Repolarisation definiert.

Die Aktivierungszeit wird gemessen als die Verzögerung zwischen dem Stimulationsimpuls beim rechtsventrikulären Pacing und dem messbaren Aufstrich (Phase 0) des Aktionspotentials. Der Durchschnitt der Werte von drei epikardialen MAPs (rechter Ventrikel, linker Ventrikel freie Wand, linker Ventrikel septal) gilt als Messgröße (Abb. 2.5, 2.6 und 2.7) zum Vergleich zwischen verschiedenen Versuchen. So werden Variationen, die durch leicht unterschiedliche anatomische Lage der Katheter entstehen können, in der Auswertung minimiert.

Weiterhin wird die Dispersion der Repolarisation aus der Differenz zwischen der maximalen und der minimalen APD bei jeweils 50%, 70% und 90% der Repolarisation der drei simultan aufgezeichneten MAP's ausgerechnet.

Bei der Frequenzadaption untersuchte man die APD bei 50%, 70% und 90% der Repolarisation der ersten 100 Schläge nach der plötzlichen Frequenzsteigerung. Die Ergebniswerte von APD, Aktivierungszeit und Frequenzadaption wurden von der Auswertungssoftware (LabVIEW 5.0, National Instruments, Texas, USA) direkt zur weiteren Verarbeitung in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft, Excel 2000) übertragen.

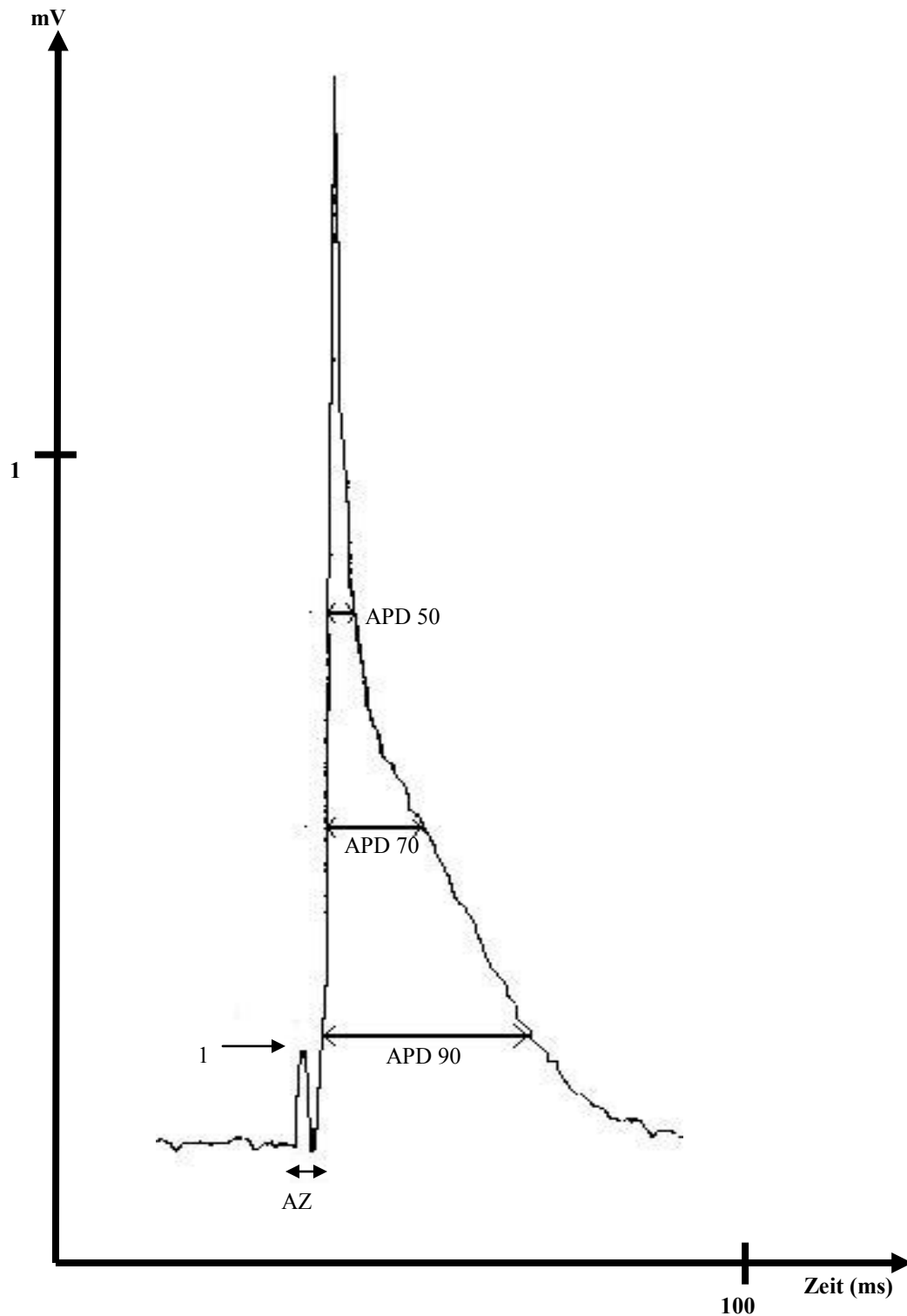


Abbildung 2.7: Originalaufzeichnung eines epikardialen MAP: 1 Stimulationsartefakt, AZ Aktivierungszeit (Zeitraum von Beginn der Stimulation bis Stelle der höchsten Aufstichgeschwindigkeit des MAP, APD 50 -70 -90 Anzeige des Messbereichs der Aktionspotentialdauer am jeweiligen Zeitpunkt (% der Repolarisation).

2.8.2 Analyse von Arrhythmien

Alle aufgezeichneten Daten werden während und nach dem Versuch auf arrhythmische Herzaktivitäten untersucht. Frühe Nachdepolarisationen (early afterdepolarisations, EAD's), Bigeminus, Triplets, Quadruplets sowie monomorphe und polymorphe ventrikuläre Tachykardien und Torsades de Pointes (TdP) sind Gegenstand dieser Beobachtungen. Sollten Arrhythmien auftreten, so wurde nach dem Versuch computergestützt und unter manueller Kontrolle die Zykluslänge der einzelnen Herzschläge ausgemessen.

2.9 Statistik

Statistische Analysen werden mittels eines JMP-Software-Packages (SAS Institute, USA) durchgeführt. Für kontinuierliche Parameter bei verschiedenen Zykluslängen bei WT-Herzen und SCN5A-Tg-Herzen mit und ohne Mexiletin werden gepaarte und ungepaarte t-Tests, einfaktorielle Varianzanalysen (analysis of variance, ANOVA) und Varianzanalysen für multifaktorielle Vergleiche und repetitive Messungen verwendet. Mit Hilfe des exakten Fisher-Tests werden die Häufigkeiten des Auftretens von Arrhythmien verglichen. Die Werte im Text werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (mean \pm S.E.M) dargestellt. Dabei wurde das Signifikanzniveau α mit $p < 0,05$ festgelegt. Alle signifikanten Unterschiede werden im Text mit einem Sternchen (*) versehen.

3 Ergebnisse

3.1 Bradykardie, EADs und Arrhythmien

Die Blockierung des AV-Knotens (AV-Block) rief bei SCN5A-Tg Mäusen eine wesentlich ausgeprägtere Bradykardie hervor als bei den Wildtypen. Die spontane Zykluslänge betrug nach AV-Blockierung 532 ± 60 ms bei SCN5A-Tg Mäusen ($n = 18$) gegenüber 284 ± 48 ms bei Wildtypen (Abb. 3.1-3.3, $n = 19$, $p < 0,050$).

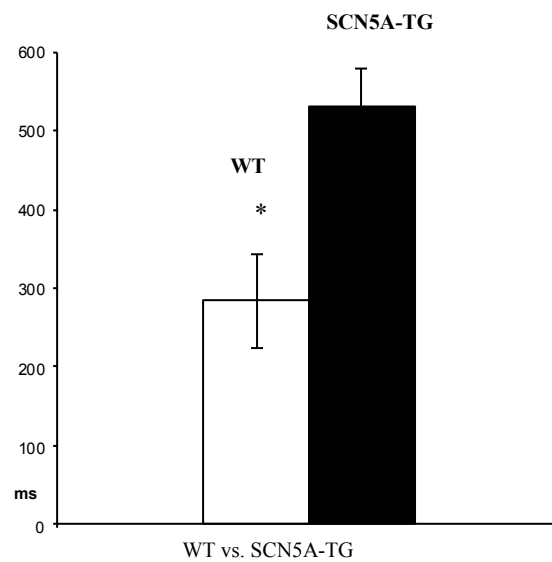


Abbildung 3.1: Durchschnittliche Zykluslänge nach AV-Blockierung bei Wildtyp-Mäusen und SCNA5-TG-Mäusen im Vergleich

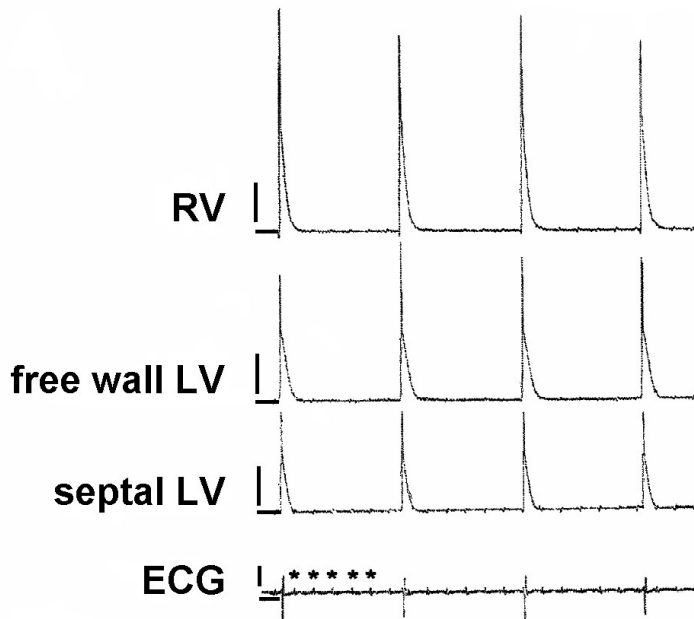


Abbildung 3.2: Simultane Aufnahme von epikardialen MAPs vom rechten Ventrikel (RV), vom freien Bereich der freien linksventrikulären Wand (free wall LV) und septalen Bereich des linken Ventrikels (septal LV) sowie Ableitung I des Gewebebad-EKGs (ECG) eines spontan schlagenden WT-Herzens nach AV-Block. Die Sterne (*****) beschreiben 5 aufeinander folgende P-Wellen im EKG. Die Kalibrierungsbalken beschreiben 1mV und 100ms

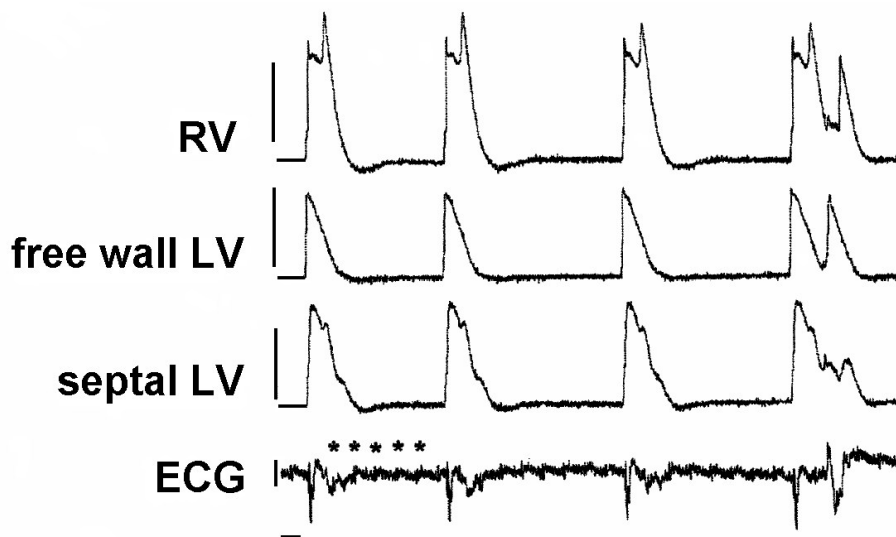


Abbildung 3.3: Simultane Aufnahme von epikardialen MAPs des rechten Ventrikels (RV), der freien linksventrikulären Wand (free wall LV) und des septalen Bereichs sowie der Ableitung I des EKG (ECG) eines spontan schlagenden SCN5A-Tg Herzen nach AV-Block. Die Sterne (*****) beschreiben 5 aufeinanderfolgende P-Wellen im EKG. Die Kalibrierungsbalken beschreiben 1mV und 100ms.

Nach Induktion des AV-Blockes traten EADs bei 16 und wiederholte pVTs bei 11 von 18 SCN5A-Tg Herzen (mit AV-Block) auf, jedoch bei keinem von 19 Wildtyp-Herzen (Abbildung 3.4, $p < 0,05$). EADs traten in allen drei Messbereichen, am häufigsten jedoch im Bereich des rechten Ventrikels (13/16 Herzen) auf. Im Vergleich dazu entstanden EADs bei 4/16 Herzen an der freien Wand des linken Ventrikels und bei 3/16 Herzen im linksventrikulären septalen Bereich. Auch in der Summe traten EADs in diesen beiden Bereichen seltener auf als im Bereich des rechten Ventrikels ($p < 0,05$).

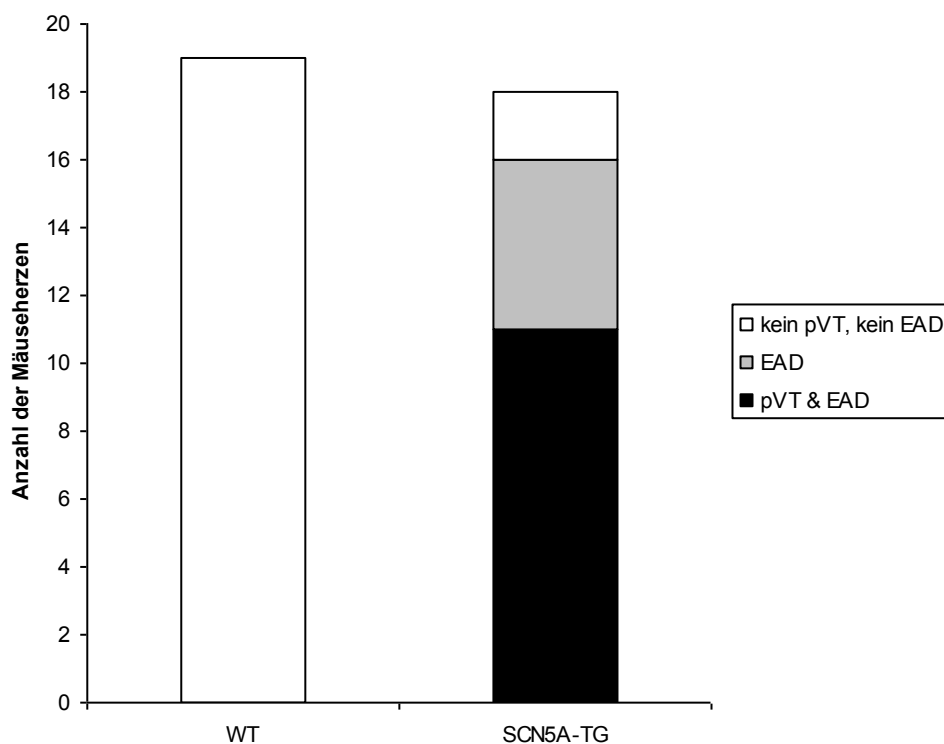


Abbildung 3.4: Das Auftreten von pVTs in WT- und SCN5A-Tg Herzen. Gezeigt ist die Anzahl der Herzen ohne EAD (weiß), nur mit EADs (grau) und mit EADs+ pVTs (schwarz) für jeden einzelnen Genotyp ($p < 0,05$, für WT gegenüber SCN5A-TG).

EADs und getriggerte Ektopien entstanden nur nach AV-Knoten Blockade oder vorzugsweise nach langer Zyklusdauer: Bei 10 von 11 Herzen mit pVTs gingen Pausen von mehr als 1000ms den Episoden von pVTs voraus.

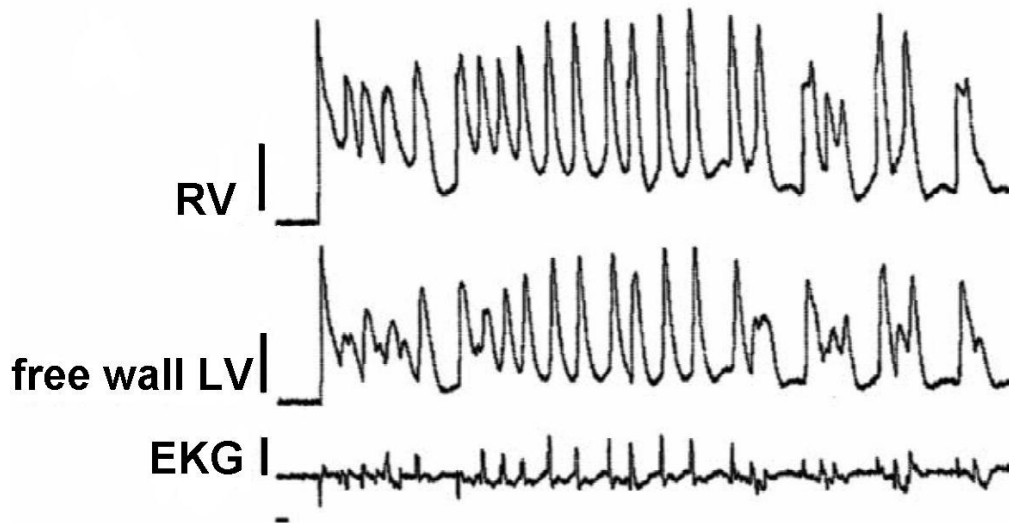


Abbildung 3.5: Repetitive ventrikuläre Ektopien und EADs in der Aufzeichnung des MAP des rechten Ventrikels (RV), des linken Ventrikels im Bereich der freien Wand (free wall LV) und im EKG.

Die durchschnittliche Zykluslänge während der ersten Hälfte des Arrhythmieereignisses betrug 137 ± 7 ms ($n=11$ Herzen) und war kürzer als die Zykluslänge des Vorhofrhythmus zur Zeit der Arrhythmie.

Während der pVTs waren die MAPs deutlich fraktioniert. Die Achse des QRS-Komplexes im EKG oszillierte wiederholt um die Grundlinie. Einer spontanen Terminierung der Arrhythmie ging die Verlängerung der Zykluslänge und ein geringerer Grad der Fraktionierung der MAPs und des EKGs voraus (Abbildung 3. 5 und 3. 6).

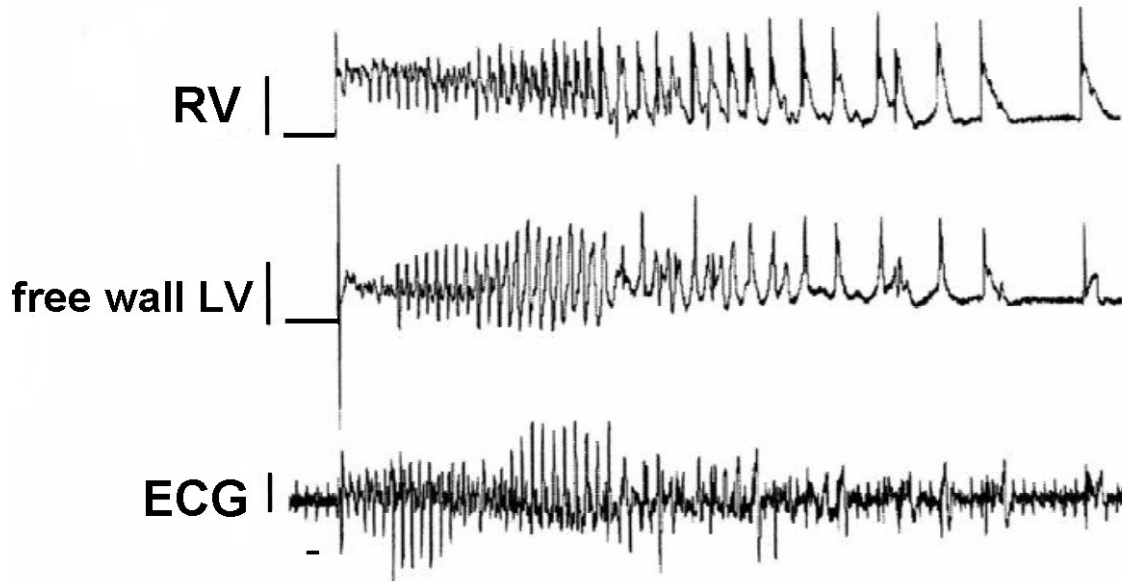


Abbildung 3.6: Epikardiale Aufzeichnung des MAP des rechten Ventrikels (RV), des linken Ventrikels im Bereich der freien Wand (free wall LV) und der Ableitung I des EKG während EAD-getriggter polymorpher ventrikulärer Tachykardie (pVTs) bei SCN5A-Tg Herzen. Die Kalibrierungsbalken beschreiben 1mV und 100ms. Die atriale Zykluslänge (erkennbar im EKG während der Ventrikelpausen) ist länger als die pVT-Zykluslänge (117 ± 2 ms gegenüber 124 ± 0 ms, $p < 0,05$)

Die Episoden der pVTs dauerten durchschnittlich $7,0 \pm 0,6$ Sekunden (im Bereich von 3,8 bis 9,4 Sekunden, $n=11$ Herzen) Gewöhnlich traten pVTs wiederholt nach Pausen in der Herzaktion von mehr als 1000ms auf.

3.2 Aktionspotential-Verlängerung und Bradykardie-abhängige gesteigerte Dispersion

Während fix-frequenter Stimulation mit einer Stimulationszykluslänge von 100 bis 400ms war die Aktionspotentialdauer (APD) bei SCN5A-Tg Herzen gegenüber WT-Herzen signifikant verlängert (Abbildung 3.7).

Während der Basis-Stimulation mit einer Zykluslänge von 100ms unterschied sich die durchschnittliche MAP-Dauer nicht signifikant zwischen den Ableitungsorten, obwohl Dispersion in einzelnen Herzen vorkam. Einzig bei längeren Stimulations-Zykluslängen

von 200ms und mehr stieg die Dispersion der APD bei SCN5A-Tg Herzen gegenüber WT – Herzen signifikant an (Abbildung 3.7).

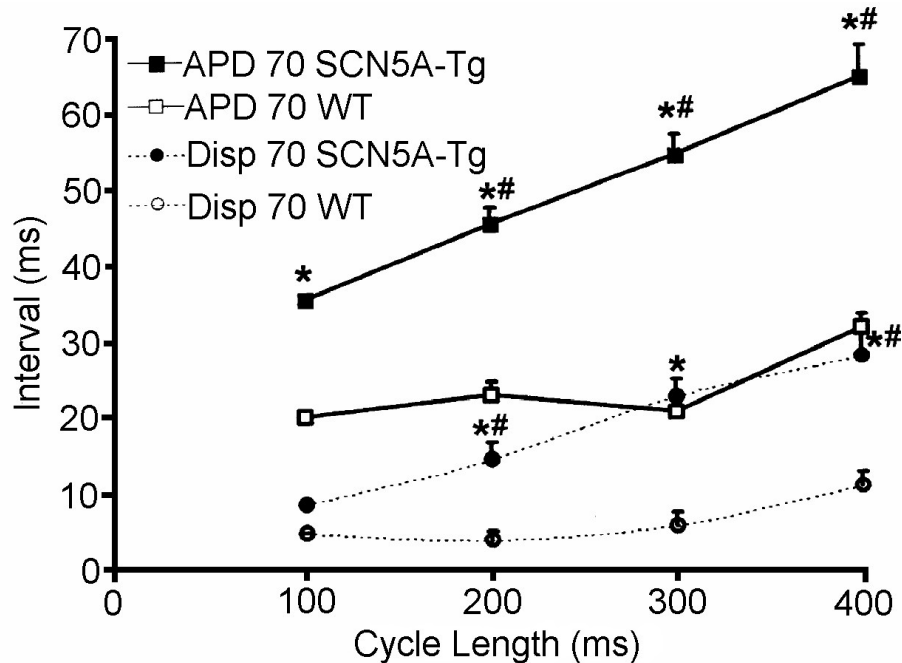


Abbildung 3.7: Gezeigt ist die durchschnittliche Aktionspotentialdauer der drei simultan aufgenommenen MAPs bei 70% der Repolarisation bei WT- (n=17) und SCN5A-TG Herzen (n=21) unter verschiedenen Stimulationszykluslängen. Die Kreuze (*) markieren signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Rauten (#) markieren signifikante Unterschiede von der Zykluslänge 100ms. Die Aktionspotentialdauer bei 50% und 90% der Repolarisation zeigte ähnliche Ergebnisse.

Direkt vor den Pausen beim kardialen Aktionspotential, die den pVTs vorausgegangen sind, war die APD und die APD-Dispersion bei SCN5A-Tg Herzen im Vergleich zu den Werten, die während eines normalen spontanen Rhythmus ohne darauf folgende pVT aufgezeichnet wurden, signifikant verlängert (APD70: 117 ± 5 ms gegenüber 51 ± 1 ms, $p < 0,05$, alle Werte wurden in den letzten 5 Schlägen vor einer pVT-Episode bzw. in 5 aufeinander folgenden Schlägen während eines spontanen Rhythmus ohne darauf folgende pVT gemessen). Die Zykluslänge des Ventrikelrhythmus war ebenfalls direkt vor den pVT-Episoden erhöht (654 ± 86 ms vor TdP gegenüber 466 ± 33 ms bei SCN5A-Tg Herzen ohne TdP, $p = 0,04$).

3.3 Stimulationseffekte

Rechtsventrikuläre Stimulation unterdrückte bei neun von neun Herzen vollständig alle EADs und pVTs, wenn sie während einer Periode von repetitiven pVTs eingesetzt wurde. Die Stimulation mit einer Zykluslänge von 100-200ms war dabei wesentlich potenter als die Stimulation mit einer höheren Zykluslänge von 300 bis 600 ms. Wenn die Stimulation mit einer konstanten Zykluslänge von 100-200ms vor dem Eintreten von pVTs eingesetzt wurde, so konnte bei 49 von 50 SCN5A-Tg Herzen das Auftreten von pVTs unterdrückt werden. Die Stimulation ist bei der Arrhythmieprävention so effektiv gewesen, dass Pausen während der Stimulationsprotokolle vermieden wurden, um die Protokolle vollständig ohne das zwischenzeitliche Auftreten von pVTs durchführen zu können.

Während der ersten Schläge nach der plötzlichen Frequenzbeschleunigung entwickelten sich bei 9 von 18 SCN5A-Tg Herzen transient für eine sehr kurze Periode (zumeist nur wenige Sekunden) EADs und regionale APD-Alternans (Abbildung 3.8 und 3.9).

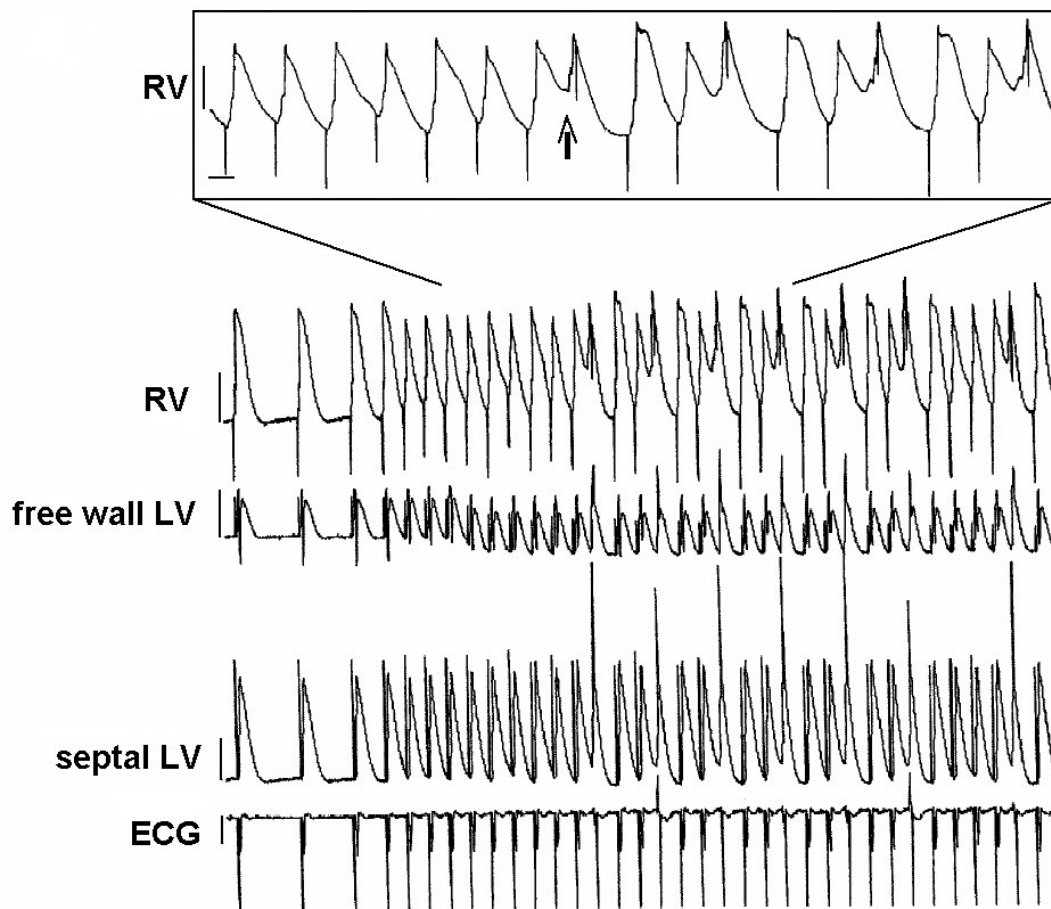


Abbildung 3.8: Rechtsventrikuläres (RV), linksventrikuläres septales (septal LV) und freiwandiges (free wall LV) MAP und Gewebepad-EKG während der plötzlichen Frequenzbeschleunigung (600-200ms Stimulationszykluslänge). Die Aktionspotentiale in RV und LV waren verlängert und EADs traten im RV-MAP auf. Die Aktivierung erfolgte vor dem Stimulationsimpuls (Pfeil im Bildausschnitt). Der Bildausschnitt zeigt eine Vergrößerung der RV-MAP Aufzeichnung. Die Kalibrierungsbalken markieren 100ms und 1mV.

Dies führte vorübergehend zu einer erhöhten Dispersion der Repolarisation. Die APD und die APD-Dispersion verringerten sich nach und nach während der unterstützenden schnellen Stimulation und erreichten ein Fließgleichgewicht („steady state“) unterhalb der Werte, die unter der Stimulation mit langen Zykluslängen gemessen wurden (Abbildung 3.9-3.11).

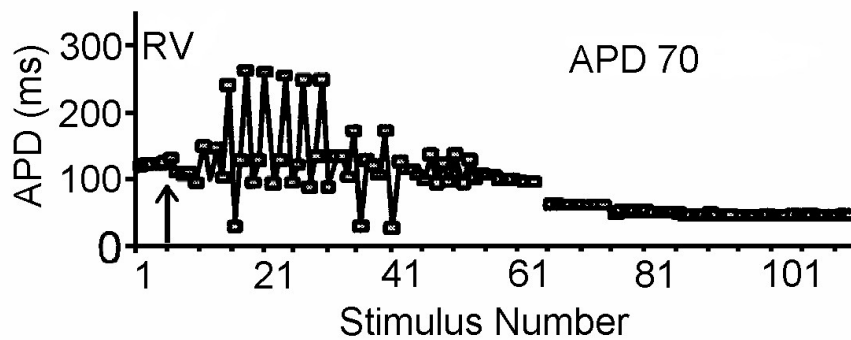


Abbildung 3.9: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation (APD70) gegenüber der Anzahl der Stimuli gemessen im rechtsventrikulären Bereich (RV). Der Pfeil beschreibt den Beginn der plötzlichen Frequenzbeschleunigung. Diese induziert einen vorübergehenden Anstieg der APD und zeigt regionale APD-Alternans (zum Vergleich auch Abbildung 3. 10). Die APD verkürzt sich stetig während der Stimulation und erreicht eine Steady State (Fließgleichgewicht) nach circa 100 Stimuli. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei APD50 gemacht

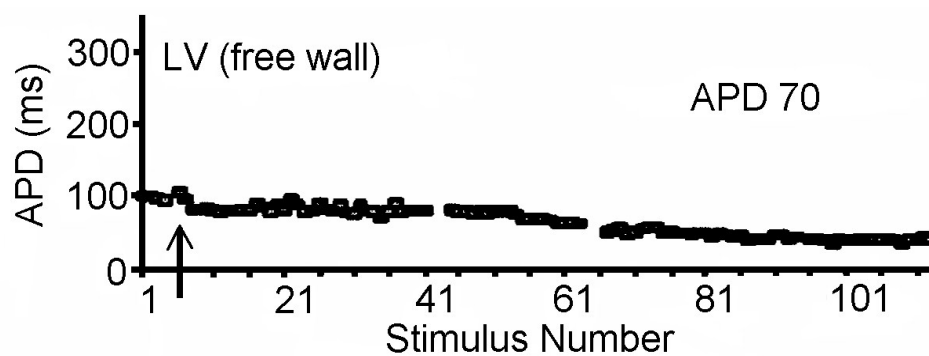


Abbildung 3.10: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation (APD70) gegenüber der Anzahl der Stimuli gemessen im linksventrikulären Bereich der freien Herzwand (LV free wall). Der Pfeil beschreibt den Beginn der plötzlichen Frequenzbeschleunigung. Diese induziert einen vorübergehenden Anstieg der APD. Im Vergleich zu APD70 im rechtsventrikulären Bereich zeigt sich hier keine regionale APD-Alternans (zum Vergleich Abbildung 3. 9). Die APD verkürzt sich stetig während der Stimulation und erreicht ein Steady State nach circa 100 Stimuli. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei APD50 gemacht.

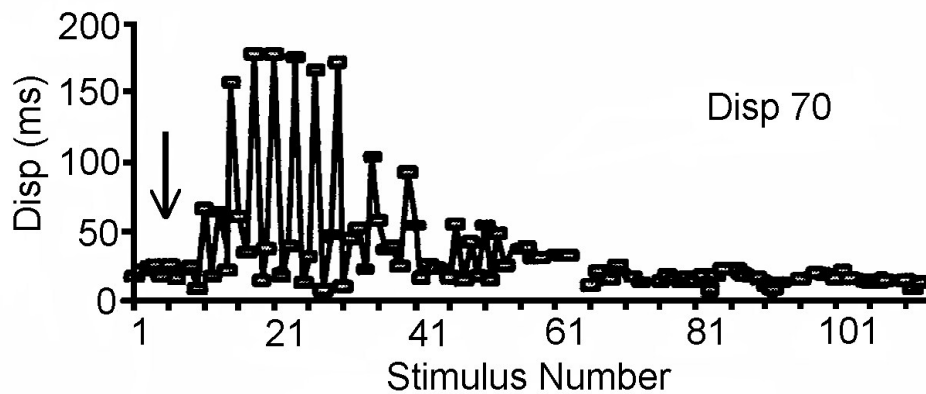


Abbildung 3.11: APD-Dispersion der drei MAPs bei 70% der Repolarisation (Disp70) aus der Abbildung 3. 9. Die plötzliche Frequenzsteigerung, gekennzeichnet durch den Pfeil, induzierte einen vorübergehenden Anstieg der APD-Dispersion. Nach diesem anfänglichen Anstieg verkürzte sich die Dispersion bei fortgeführter Stimulation.

3.4 Der Effekt von Mexiletin

Bei der Stimulation mit langen Zykluslängen von 400 bis 600ms verkürzte Mexiletin (4 μ g/ml) die APD bei SCN5A-Tg Herzen (Abbildung 3.13). Im Gegensatz dazu hat sich die APD bei der Stimulation mit kurzen Zykluslängen unter Mexiletin nicht signifikant geändert (Abbildung 3.12). Mexiletin verringerte die Differenz zwischen der längsten und der kürzesten Steady-State-APD von 53 auf 23ms bei 70% der Repolarisation (Abbildung 3.12, $p = 0,05$).

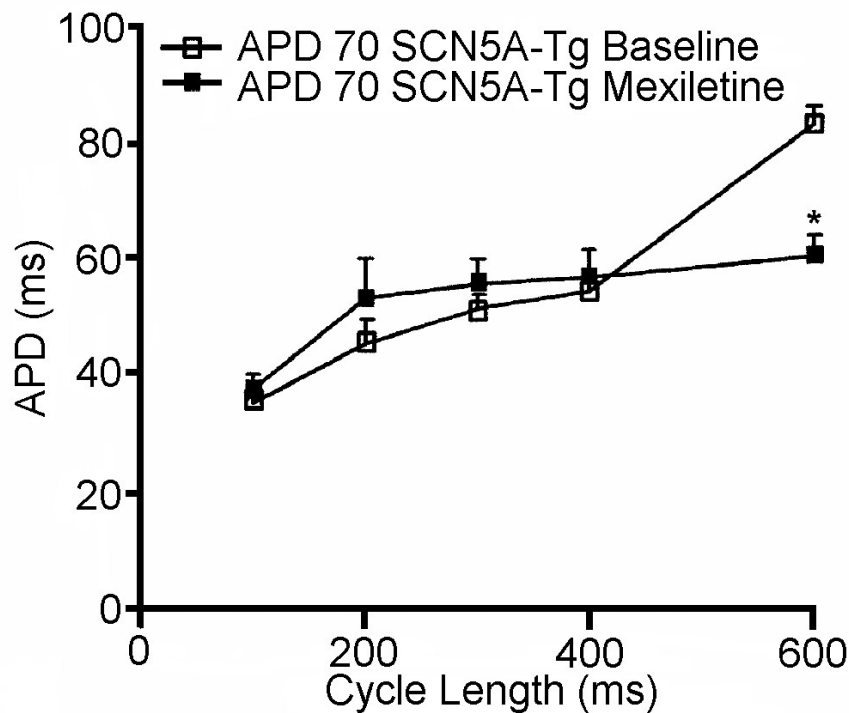


Abbildung 3.12: Durchschnittliche Aktionspotentialdauer (APD) bei 70% der Repolarisation (APD70) der drei MAPs während fix-frequenter Stimulation bei 100 bis 600 ms, ohne (baseline) und mit Mexiletin (n=17 Herzen pro Gruppe). Mexiletin reduziert die APD bei einer Stimulationsfrequenz von 600ms signifikant. Die Ergebnisse waren bei APD 50 und APD 90 ähnlich.

Unter Mexiletin verringerte sich außerdem das Auftreten von APD-Alternans und EADs während der plötzlichen Frequenzbeschleunigung. Außerdem wurde die vorübergehende Verlängerung der APD durch Mexiletin vermindert: Während der ersten 50 Schläge nach der plötzlichen Frequenzbeschleunigung von 600 auf 200ms Stimulationszykluslänge war die APD bei 50, 70 und 90% der Repolarisation in den rechts- und linksventrikulären MAPs unter Mexiletin kürzer als ohne (z.B. APD unter Mexiletin gegenüber Baseline: RV MAP 36,0 +/-0,3ms gegenüber 52,9 +/-0,4ms; freie Wand LV MAP 54,8 +/-0,2ms gegenüber 65,1 +/-0,3ms; LV septales MAP 41,7 +/-0,2 gegenüber 60,2 +/-0,4ms; für alle gilt $p < 0,05$). Während der nächsten 50 Schläge (Schlag 51 bis 100 nach der Frequenzsteigerung) verkürzte sich die APD weiter, sowohl mit als auch ohne Mexiletin. (APD baseline: RV MAP 44,2 +/-0,6ms; freie Wand LV MAP 46,5 +/- 1,0ms; LV septal 45,2 +/- 0,7ms; APD Mexiletin: 39,7 +/-0,3ms; 46,3 +/- 0,9ms; 38,8 +/-0,5ms; für alle gilt $p < 0,05$, Abbildungen 3.13-3.15).

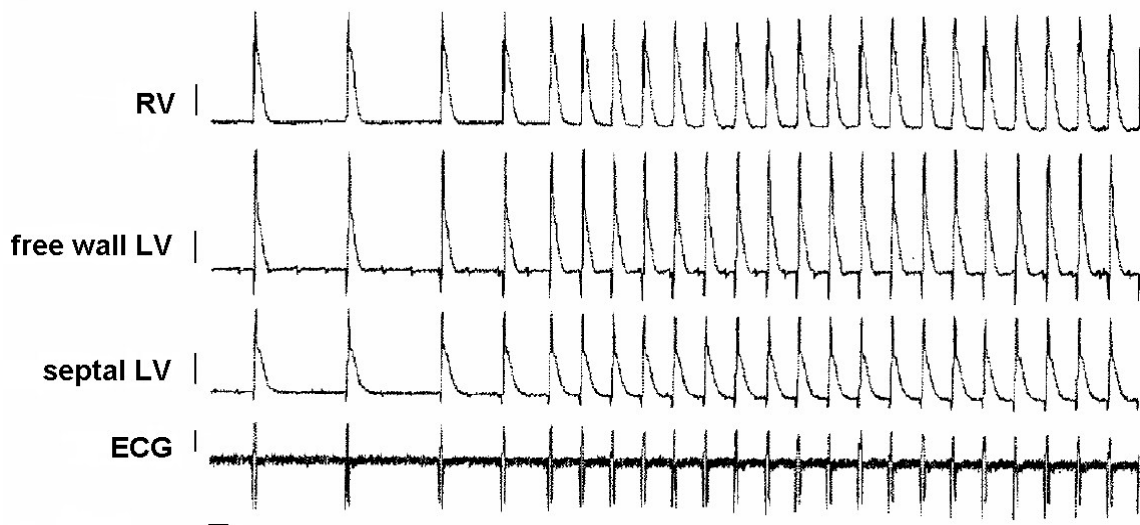


Abbildung 3.13: Rechtsventrikuläre (RV) und linksventrikuläre (septal LV und free wall LV) MAPs sowie ein Gewebepad-EKG während der plötzlichen Frequenzsteigerung (600-200ms) mit Mexiletin. Die Kalibrierungsbalken markieren 100ms und 1mV.

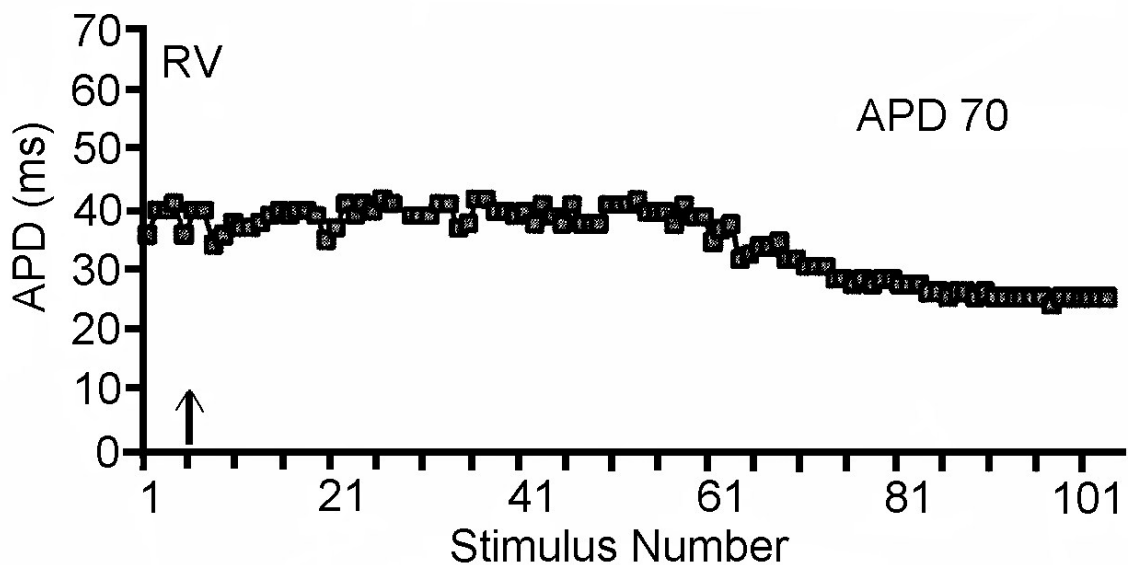


Abbildung 3.14: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation (APD70) gegenüber der Anzahl der Stimuli gemessen im rechtsventrikulären Bereich (RV). Werte aus dem Beispiel in Abbildung 3.13 unter Mexiletin. Verkürzung der APD70 in der zweiten Hälfte der ersten 100 Schläge nach plötzlicher Frequenzsteigerung.

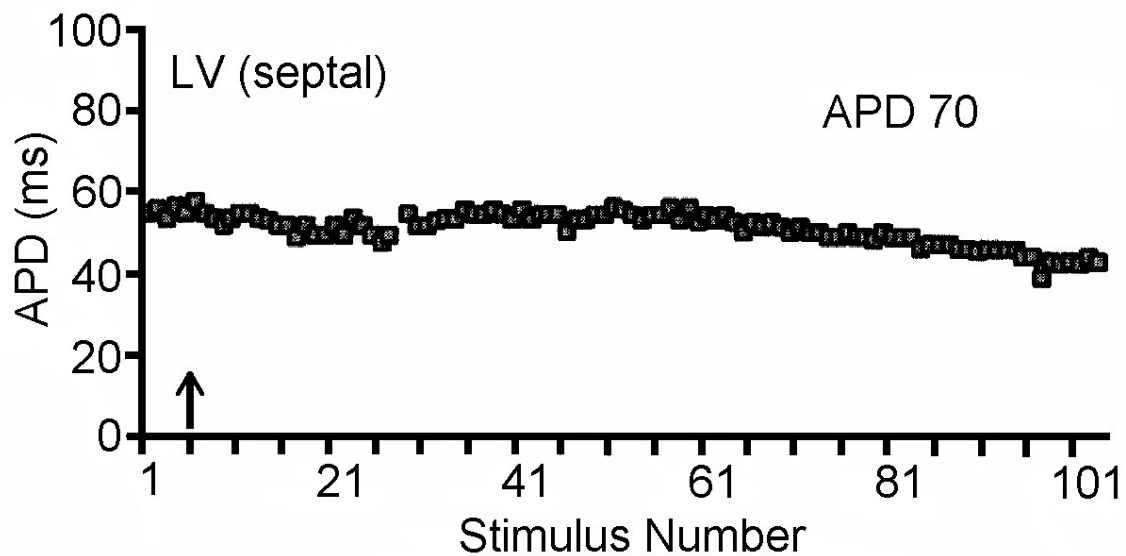


Abbildung 3.15: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation (APD70) gegenüber der Anzahl der Stimuli gemessen im linksventrikulären septalen Bereich (LV septal). Werte aus dem Beispiel in Abbildung 3.13 unter Mexiletin. Verkürzung der APD70 in der zweiten Hälfte der ersten 100 Schläge nach plötzlicher Frequenzsteigerung

Mexiletin verlängerte die ERP bei der zweifachen diastolischen Stimulationsschwelle von 55 ± 6 ms auf 91 ± 11 ms bei einer Stimulationszykluslänge von 200 ms ($p < 0,05$).

Daraus resultierte eine Steigerung des ERP/APD-Quotienten von $0,77 \pm 0,06$ auf $1,14 \pm 0,14$ ($p < 0,05$). Weiterhin führte Mexiletin zu einer Refraktärzeit von 7 ± 11 ms in der Post-Repolarisationsphase, welche ohne Mexiletin nicht signifikant vorhanden war (SCN5A-TG ohne Mexiletin: -19 ± 6 ms, $n=7$, $p < 0,05$). Die Werte für WT-Herzen zeigen denselben Trend, waren aber nicht signifikant (Refraktärzeit in der Post-Repolarisationsphase: WT ohne Mexiletin $-7,4 \pm 8,1$; WT mit Mexiletin $-1,6 \pm 7,6$). Die Aktivierungszeiten waren sowohl bei WT als auch bei SCN5A-Tg Herzen, insbesondere bei kurzen Stimulationszykluslängen, unter Mexiletin verlängert.

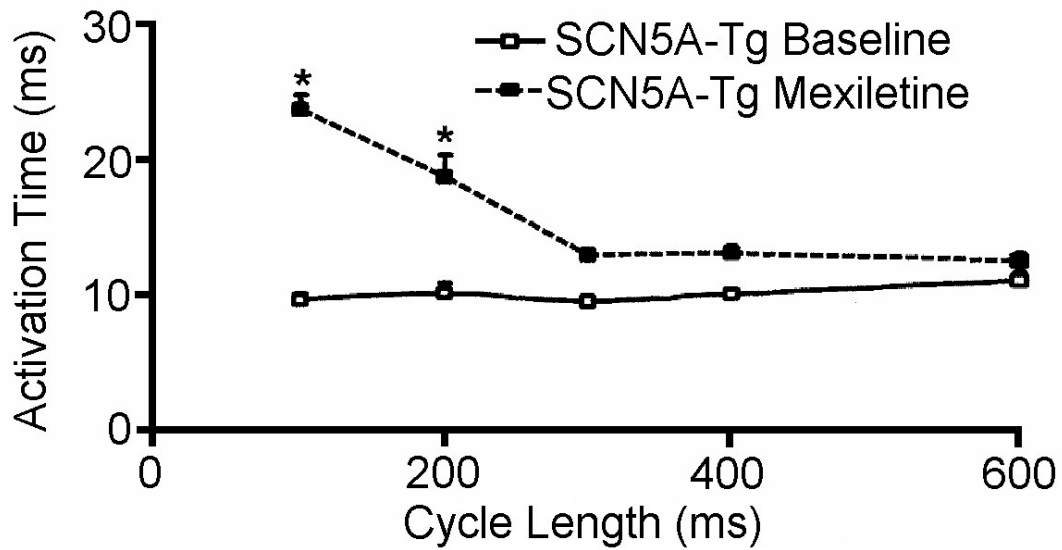


Abbildung 3.16: Durchschnittliche Aktivierungszeit der drei MAPs während fix-frequenter Stimulation mit Zykluslängen von 100-600ms. Mexiletin verlängerte die Aktivierungszeiten bei kurzen Stimulationszykluslängen von 100ms und 200ms signifikant (*) ($p < 0,05$)

Darüber hinaus verstärkte Mexiletin die intrinsische Bradykardie bei SCN5A-Tg Herzen und erhöhte die Stimulationsschwelle von $1,3 \pm 0,1$ auf $2,0 \pm 0,3$ mA ($p < 0,05$). Wenn Mexiletin während einer Periode von pVTs gegeben wurde, so wurden bei 4 von 5 SCN5A-Tg Herzen die Arrhythmien unterdrückt. Wenn Mexiletin vor dem Auftreten von pVTs gegeben wurde, so konnten nicht alle Episoden von pVTs verhindert werden. Bei 5 von 10 SCN5A-Tg Herzen, zu deren Perfusat Mexiletin hinzugefügt wurde, um die APD, die refraktäre Periode und die Aktivierungszeit zu analysieren, traten trotz des Mexiletin im Perfusat pVTs auf.

4 Diskussion

4.1 Hauptergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von transgenen Mäusen untersucht, die Träger eines mutierten (Δ -KPQ-SCN5A) und durch das SCN5A-Gen kodierten Natrium-Kanals im Myokard waren. Ebenso wurden diese phänotypischen Merkmale bei Wildtypvarianten ohne entsprechende Veränderung des genetischen Erbgutes betrachtet. Hierbei konnten Unterschiede in den EKG-Aufzeichnungen und den Auswirkungen des rechtsventrikulären Pacings gezeigt werden. Darüber hinaus wurden Wirkungen von schneller Stimulation und des Antiarrhythmikums Mexiletin auf antiarrhythmische Prozesse sowie pathologische EKG-Veränderungen in den unterschiedlichen Versuchsabschnitten aufgezeigt.

4.1.1 EKG-Veränderungen

In diesem hier in der Arbeit vorgestellten und untersuchten (Δ) KPQ SCN5A knock-in Maus Modell des LQT3-Syndroms waren einige eindeutige, signifikante Veränderungen des EKG ersichtlich. Auffallend war, dass den pVTs unterschiedliche Pathologika vorausgingen. So zeigte sich bei den transgenen, isolierten Mäuseherzen ein langsamer, intrinsischer ventrikulärer Rhythmus und die Aktionspotentialdauer war signifikant verlängert. Die Dispersion der Aktionspotentialdauer war deutlich gesteigert und kurz vor dem Auftreten von pVTs wurde ein gehäuftes Vorkommen von EADs gemessen.

Darüber hinaus zeigte sich bei den transgenen Herzen nach manueller Induktion eines AV-Blockes eine deutlich ausgeprägtere intrinsische Bradykardie als bei Wildtypen.

4.1.2 Auswirkungen der fix-frequenten Stimulation

Bei den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Versuchsreihen wurden die frei hängenden perfundierten Mäuseherzen über einen rechtsventrikulären

Stimulationskatheter mit elektrischen Impulsen versehen. Entsprechend den jeweiligen Versuchsprotokollen unterlagen die Impulse stets einem regelmäßigen Intervall.

Während dieser fix-frequenten ventrikulären Stimulation konnten bei physiologischen Frequenzraten bezüglich der gemessenen Rhythmusstörungen ebenfalls signifikante Veränderungen aufgezeigt werden. Durch die in ihrer Frequenz gleichmäßig vorgegebenen Stimuli konnten Bradykardien vorgebeugt werden. Daraus ergab sich auch, dass zusätzlich die Aktionspotentialdauer und die Dispersion der APD in den SCN5A-TG signifikant reduziert wurden.

Ein weiterer Effekt des fix-frequenten rechtsventrikulären Pacing in SCN5A-TG war, dass EADs und ventrikuläre Arrhythmien während der Stimulation vollständig unterdrückt werden konnten.

Ein weiterer Bestandteil des Versuchsprotokolls waren plötzliche Frequenzsteigerungen während des kontinuierlichen Pacing. Hier konnte gezeigt werden, dass plötzliche Frequenzsteigerungen zu einem vorübergehenden Anstieg der APD-Dispersion in SCN5A-TG führten.

4.1.3 Wirkungen von Mexiletin

Die Versuchsprotokolle wurden in weiten Abschnitten einmal ohne die Zugabe des Natriumkanalblockers Mexiletin durchgeführt und anschließend, am gleichen Herzen, vergleichend mit dem Zusatz von Mexiletin wiederholt.

Unter dem Einfluss von Mexiletin konnte das Auftreten von Arrhythmien deutlich verringert werden. Zum einen beugt Mexiletin wahrscheinlich einer APD-Verlängerung vor allem bei langen Zykluslängen vor. Zum anderen bewirkt Mexiletin vermutlich, dass Post-repolarisations-Refraktärität entsteht und dass hierdurch das Auftreten von Arrhythmien signifikant gesenkt werden konnte. Die bei den transgenen Mäusen ohnehin schon ausgeprägtere intrinsische Bradykardie wurde durch die Zugabe von Mexiletin jedoch noch zusätzlich verstärkt.

4.2 Veränderte SCN5A-Tg Herz-Physiologie

4.2.1 Veränderte Aktionspotentialdauer

In der vorliegenden Studie konnte eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer an intakt schlagenden, frei hängenden und perfundierten Herzen von SCN5A-Tg-Mäusen nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien, bei denen jedoch lediglich einzelne isolierte Myokardzellen mit Mikroelektroden untersucht wurden und nicht das intakte Herz in vivo. Hier konnte ebenfalls eine verlängerte APD bei transgenen SCN5A-Myokardzellen im Vergleich zu den Wildtypvarianten nachgewiesen werden [Nuyens D et al., 2001].

In Studien mit Stimulationsversuchen ist dieser Effekt ebenfalls gezeigt worden. Es besteht vermutlich ein Zusammenhang mit einem gesteigerten späten Natrium-Einstrom im mutierten SCN5A-Kanal des Myokards. Die Amplitude dieses späten Natrium-Einstromes war bei kurzen Stimulationszykluslängen geringer als bei längeren und zeigte sich somit abhängig von der Stimulationsrate [Nagatomo T et al., 2002]. SCN5A-Tg Herzen zeigen in der vorliegenden Studie einen merklich verlangsamten intrinsischen ventrikulären Rhythmus nach Blockierung des AV-Knotens. Das könnte auf einen reduzierten frühen Natrium Einstrom oder einen gesteigerten späten Natrium-Einstrom zurückzuführen sein, was eine spontane Aktivierung von ventrikulären Schrittmacherzellen unterdrücken könnte [van den Berg MP et al., 2001].

4.2.2 Veränderte Dispersion der APD als pro-arrhythmischer Faktor

Während bradykarder Phasen war bei den SCN5A-Herzen die Dispersion der APD deutlich vergrößert. In anderen Studien und anderen Modellen, in denen an transgenen Herzen die unterschiedlichen regionalen Aktionspotentiale am Myokard im Blickpunkt standen, stellte sich heraus, dass die Steigerung der Dispersion der APD durch regionale Unterschiede bei den Depolarisationsströmen zu begründen sein könnte. Die gesteigerte Dispersion der Aktionspotentialdauer wurde dort als eindeutig pro-arrhythmischer Faktor beschrieben [Baker LC et al., 2000].

An einem Modell, bei dem das LQT3-Syndrom medikamentös mit ATX-II (Anemonia sulcata toxin), einer Substanz die die Funktion des myokardialen Natrium-Kanals

verändert, simuliert wurde, konnten ähnliche pro-arrhythmische Effekte der Bradykardie und der gesteigerten Dispersion der APD gezeigt werden [Shimizu W et al., 1997].

Vergleichend damit zeigen die Daten der vorliegenden Studie einen Zusammenhang zwischen Dispersion der APD, langen Zykluslängen und den im Versuch registrierten Arrhythmien. Eine gesteigerte Dispersion der APD trägt in diesem transgenen LQT3-Model zu spontanen Arrhythmien bei und intrinsische Bradykardien verstärken diese pro-arrhythmischen Effekte noch zusätzlich.

4.3 Spontane polymorphe ventrikuläre Tachykardien (pVT)

Bezüglich der spontan aufgetretenen polymorphen ventrikulären Tachykardien, die nach einem mechanisch induzierten AV-Block vorkamen, gab es zwischen den transgenen Herzen und den Wildtypvarianten markante Unterschiede. So traten nach mechanischer Blockierung der atrioventrikulären Leitungsbahnen bei mehr als der Hälfte der SCN5A-Tg Herzen pVTs auf, wohingegen bei WT-Hezen keine spontane ventrikuläre Tachykardie gemessen werden konnte.

Bei den in dieser Studie aufgezeichneten pVTs der transgenen Herzen ließen sich viele eindeutige typische Charakteristika festmachen, die mit denen von Torsades de Pointes beim LQT3-Syndrom bei Patienten vergleichbar waren. So traten Arrhythmien vornehmlich nach längeren Pausen in der Herzaktivität auf. Darüber hinaus gingen Ihnen frühe Nachdepolarisationen und eine gesteigerte Dispersion voraus. Die Episoden der Arrhythmien traten wiederholt auf und waren, charakteristisch für Torsades de Pointes, von polymorpher Natur mit wellenförmigen QRS-Axen, die spindelförmig um die Nulllinie oszillierten [Dessertenne F et al., 1966].

Obwohl eine detaillierte Aufzeichnung der Initialsequenzen der pVT-Episoden nicht im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen, lassen die gewonnenen Ergebnisse annehmen, dass die pVTs in diesem Modell durch frühe Nachdepolarisationen initialisiert wurden. Das Aufrechterhalten der polymorphen Tachykardien könnte auf dem Boden einer erhöhten Dispersion der APD über einen funktionalen Re-entry Mechanismus gewährleistet worden sein [Fabritz L et al., 2003].

Vergleichbar mit den vorliegenden Daten wurde bei Aufzeichnungen mit Mikroelektroden am isolierten Myokard des rechten Ventrikels in demselben Modell deutliche Veränderungen des Aktionspotentials, die einen pro-arrhythmischen Effekt haben, gezeigt. So wurden bei langen Zykluslängen eine drastische Aktionspotentialverlängerung in Verbindung mit gehäuft vorkommenden frühen Nachdepolarisationen beobachtet [Nuyens D et al., 2001]. In der vorliegenden Studie konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine heterogene Verlängerung des Aktionspotentials bei langen Zykluslängen bei intakten SCN5A-Tg Herzen die Dispersion der APD erhöhte. Dabei ermöglicht eine Steigerung der Dispersion ein funktionelles Re-entry und ist dadurch möglicherweise die Grundlage bei den SCN5A-TG Herzen für eine Aufrechterhaltung von pVTs.

4.4 Effekt der Stimulation

4.4.1 Auswirkung auf die APD, die Dispersion und auf EADs

In der vorliegenden Studie wurde das Ventrikelmyokard der isoliert perfundierten Mäuseherzen mittels eines experimentellen Stimulationsgerätes über einen in den rechten Vorhof eingeführten octopolaren Katheter fixfrequenten elektrischen Stimuli ausgesetzt. Hierbei konnten in den unter Stimulationsbedingungen aufgezeichneten Aktionspotentialen bei physiologischen Zykluslängen arrhythmie-hemmende Effekte nachgewiesen werden.

Baker LC et al. haben die Dispersion der APD als pro-arrhythmischen Faktor beschrieben. Wir konnten nachweisen, dass das Pacing des Ventrikelmyokards am intakt schlagenden SCN5A-TG Mäuseherz bei physiologischen Zykluslängen die Dispersion der APD im Vergleich zur Dispersion bei intrinsischer ventrikulärer Frequenz nach AV Block verringert hat. Darüber hinaus war die Aktionspotentialdauer bei physiologischen Zykluslängen signifikant verkürzt. Folglich ist die Ventrikelstimulation bei physiologischen Zykluslängen als Prävention vor ausgeprägten Rhythmusstörungen anzusehen, da das Auftreten von pVTs während des fixfrequenten Pacings erfolgreich verhindert werden konnte. Passend dazu zeigte sich unter der

Ventrikelstimulation eine Unterdrückung von frühen Nachdepolarisationen, die ebenfalls pro-arrhythmischen Charakter haben.

Zusammenfassend konnte das Pacing des Myokards somit das Auftreten von spontanen Arrhythmien verhindern als auch die Grundlage für funktionelle Re-entries, die zur Aufrechterhaltung von pVTs beitragen, reduzieren, indem die Dispersion der Repolarisation unter Stimulation verringert wurde. Der antiarrhythmische Effekt der Ventrikelstimulation ließ sich dadurch nachweisen, dass einige als eindeutig arrhythmiefördernde bekannte Veränderungen deutlich reduziert wurden.

Der kausale Mechanismus, dass die kurzen für ein Mäuseherz physiologischen Stimulationsintervalle zu einer Verringerung der pro-arrhythmischen Effekte führen, lässt sich vermutlich anhand von Ergebnissen anderer Studien herleiten. Wie schon oben beschrieben konnte eine Abhängigkeit des späten Natrium-Einstromes von der Stimulationszykluslänge beschrieben werden [Nagatomo T et al., 2002]. Die zykluslängenabhängige Reduktion des späten Natrium-Einstromes könnte eine Verkürzung des Aktionspotentials bei kurzen Zykluslängen hervorrufen und dabei auch die Dispersion der APD verringern. Anhand dieses Mechanismus wäre zu erklären, dass die Stimulation des Myokards bei physiologischen Zykluslängen zu einer Reduzierung der pro-arrhythmischen Effekte führt.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten sind vergleichbar mit denen anderer Untersuchungen. So wurde in einem intakten transgenen LQT3 Herz-Model, einem medikamenten-induzierten Zell-Model, welches den SCN5A-Defekt simuliert [Priori SG et al., 1996], eine QT-Verkürzung als Folge einer hochfrequenten Stimulation beschrieben. Auch bei Patienten, die an dem LQT3-Syndrom erkrankt waren, wurde dieses Phänomen dokumentiert [Schwartz PJ et al., 1995]. Aufgrund dessen sind auch Überlegungen zur praktischen therapeutischen Anwendung erfolgt. Bei LQT3-Patienten wird angenommen, dass sie einen spezifischen Benefit durch eine Stimulation zur Prävention von Bradykardien erhalten [Viskin S et al., 1999]. Bezüglich dieses Aspektes hat eine Studie in einer Familie, in der die Mutation des SCN5A Gens bekannt war und wo man deutliche Bradykardie-abhängige QT-Verlängerungen, sowie eine

erhöhte Inzidenz eines plötzlichen Herztodes festgestellt hat, gezeigt, dass sich eine Schrittmachertherapie als protektiv bewährt hat [van den Berg MP et al., 2001].

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen zum ersten Mal, welche genauen Auswirkungen eine Stimulation auf das Ventrikelmyokard beim intakt schlagenden SCN5A-Tg Herzen hat. So wurde unter dem ventrikulären Pacing die Dispersion der APD signifikant reduziert. Darüber hinaus konnten durch die myokardiale Stimulation in diesem transgenen LQT3-Model den frühen Nachdepolarisationen und den pVTs vorbeugt werden.

Wie aus den vorliegenden Daten zu entnehmen ist, zeigen die SCN5A-Tg Herzen eine deutliche intrinsische ventrikuläre Bradykardie nach mechanischer Induktion eines AV-Blockes. Während ausgeprägter Ruhephasen, wie zum Beispiel während des Schlafes, kommt es selbst bei vollkommen herzgesunden Menschen, vor allem bei Sportlern, ohne Nachweis einer genetisch oder organisch bedingten Herzrhythmusstörung, zu kurzen Episoden einer physiologischen Sinusbradykardie. Auch ein kurzzeitiger AV-Block mit 2:1 Überleitung und eintretendem Ersatzrhythmus kann unter physiologischen Umständen vorkommen [Kindermann W., 2000]. Diese Arrhythmien sind normalerweise aber asymptomatisch und haben unter normalen Umständen keinerlei pathologischen Charakter. Bei LQT3-Patienten dagegen könnten solche kurzen Episoden einer Bradykardie ausreichen, um eventuell frühe Nachdepolarisationen zu provozieren und somit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von pVTs zu erhöhen.

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass eine plötzliche Frequenzsteigerung bei der ventrikulären Stimulation zu einem vorübergehenden Anstieg der APD und der Dispersion der APD führte. Dieser Effekt ist auch in zuvor durchgeführten Versuchsreihen nachgewiesen worden [Nuyens D et al., 2001]. Es zeigt sich, dass eine plötzliche Frequenzsteigerung einen negativen Einfluss auf das Auftreten von pVTs haben könnte, da die Steigerungen der APD und der Dispersion der APD als arrhythmogene Eigenschaften beschrieben wurden. Aus diesen Erkenntnissen könnte man schließen, dass man bei einer präventiven Stimulationstherapie beim LQT3-Syndrom spezielle Schrittmacheralgorithmen wählen sollte, um den oben genannten arrhythmogenen Effekt ausschließen zu können.

4.5 Der Effekt einer Natrium-Kanal Blockade durch Mexiletin

Die vorliegende Studie zeigt den Effekt des Natriumkanalblockers (Lidocaintyp) Mexiletin, das über eine Hemmung des Natriumeinstromes bei der Myokardaktivität wirkt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Zugabe von Mexiletin die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von spontanen frühen Nachdepolarisationen bei langen Zykluslängen verringert wird. Dieser Effekt kommt durch die Verkürzung der APD durch das Medikament zustande. Darüber hinaus konnte eine Reduktion der vorübergehenden APD-Verlängerung als Folge einer plötzlichen Frequenzsteigerung bei ventrikulärer Stimulation beobachtet werden.

Ähnliche Effekte von Mexiletin auf die APD und die Dispersion der APD sind bei pharmakologischen LQT3-Modellen berichtet worden [Shimizu W et al., 1997], [Priori SG et al., 1996].

Vergleichbare Untersuchungen sind auch schon beim Menschen durchgeführt worden. So konnte eine Verkürzung des QT-Intervalls unter Mexiletin bei Patienten mit dem LQT3-Syndrom beobachtet werden [Schwartz PJ et al., 1995].

Unsere Studien reproduzierten diese Erkenntnisse in einem transgenen LQT3-Modell. Unter Mexiletin waren die refraktären Perioden, in denen eine erneute Erregung des Ventrikelmyokard noch nicht wieder möglich war, länger als die APD, was zu einer refraktären Post-Repolarisationsphase führte. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem anderer Natriumkanal-Blocker [Koller BS et al., 1995], [Kirchhof PF et al., 1998] und dem kombinierten Einsatz von Mexiletin und Sotalol [Lee SD et al., 1997].

Dieser antiarrhythmische Effekt einer Post-repolarisations-Refraktärität ist auch in anderen experimentellen Studien an Kaninchenherzen sowie auch in klinischen Studien gezeigt worden [Koller BS et al., 1995], [Kirchhof PF et al., 1998].

Insgesamt lässt sich der antiarrhythmogene Mechanismus der Post-repolarisations-Refraktärität dadurch erklären, dass es durch das Verhindern von Erregungen in der späten Repolarisationsphase des Aktionspotentials zu weniger spontanen ventrikulären Aktivitäten, die in Verbindung mit frühen Nachdepolarisationen stehen, kommen könnte. Die EADs werden durch die Refraktärität unterdrückt und die durch die frühen Nachdepolarisationen ausgelösten Arrhythmien somit verhindert.

Wenn man nun die ventrikuläre Stimulation der SCN5A-Tg Herzen mit der Zugabe von Mexiletin vergleicht, so lässt sich vermerken, dass Mexiletin in der vorliegenden Studie nicht alle pVTs verhindern konnte, während beim fixfrequenten Pacing keine pVTs vorkamen. Dies könnte eine mögliche Begründung in der bradykardiefördernden Wirkung von Mexiletin bei SCN5A-Tg Herzen finden.

In dieser Studie am intakten Herzen konnten wir den molekularen Effekt von Mexiletin auf zellulärer Ebene und das Öffnungsverhalten des mutierten Natrium Kanals nicht bestimmen. In geringen Konzentrationen blockieren Lidocain und Mexiletin bevorzugt die späten Öffnung des mutierten Δ KPQ Natrium Kanals [An RH et al., 1996], [Wang DW et al., 1997] ohne dass sich dabei die Charakteristik des Natriumeinstromes selber wesentlich verändert. Daraus kann man eventuell schließen, dass eine pharmakologische Verkürzung des Aktionspotentials bei Patienten mit LQT3-Syndrom möglich ist, ohne die Eigenschaften der Erregungsleitung ernsthaft zu stören [Bezzina CR et al., 2001]. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass Lidocain bei einer Mutation des Natriumkanals (R1623Q) beim LQT3 Syndrom eine Änderung im Schließverhalten des Kanals bewirkt. So wurde nachgewiesen, dass Lidocain dazu führt, dass es mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu einem Verbleib des Natriumkanals in einem geschlossenen Zustand kommt, ohne sich überhaupt zu öffnen und einen Natriumeinstrom zuzulassen [Kambouris NG et al., 2000]. Für Mexiletin hingegen konnte gezeigt werden, dass es den Natriumkanal vom geschlossenen in einen inaktiven Zustand überführt und dabei die Wahrscheinlichkeit von späten Öffnungen vermindert [Valdivia CR et al., 2002].

4.6 Schlussfolgerung

Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass eine Prävention von Bradykardien durch Schrittmacherstimulation pVTs in diesem SCN5A-Tg LQT3 Mäuseherz Model unterdrückte. Prinzipiell resultiert daraus, dass Patienten mit dieser Mutation von einer Schrittmachertherapie im Sinne einer Stimulierung bei physiologischen Zykluslängen unter Verwendung einer speziellen Einstellung zur Vermeidung von plötzlichen Frequenzsteigerungen profitieren könnten.

Mexiletin verursachte in diesem Model sowohl pro- als auch antiarrhythmische Effekte. Zwar überwogen die Wirkungen der Substanz zur Vermeidung von pVTs, im Vergleich zur ventrikulären Stimulation erschien die Effektivität zur Prävention von pVTs von Mexiletin nicht so gesichert wie bei einer Schrittmachertherapie.

Zur Übertragung der hier gewonnenen Ergebnisse auf klinische Anwendungsgebiete sind aber mehrfache Einschränkungen zu beachten. Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen einem Mäuseherz und einem menschlichen Herzen. Sie lassen sich nicht vergleichen im Bereich der Größe, der Repolarisationsströme und der Herzfrequenz. Aufgrund dessen darf man die Ergebnisse von Untersuchungen an transgenen Mäusen auch nur mit Vorsicht und sehr kritisch auf den Menschen und eventuelle klinische Anwendungsgebiete übertragen [London B., 2001].

Insgesamt betrachtet entsprechen die Ergebnisse der Versuche mit diesem transgenen LQT3-Model in der vorliegenden Arbeit durchaus den limitierten Beobachtungen bei Patienten. Die pathophysiologischen Beobachtungen die hier durchgeführt wurden, könnten eine Diskussionsgrundlage über die Indikation für das präventive Stimulieren zur Vermeidung von Bradykardien, Pausen oder plötzlichen Frequenzbeschleunigungen in bradykarden Phasen beim LQT3-Syndrom liefern.

5 Literaturverzeichnis

- An RH, Bangalore R, Rosero SZ, Kass RS** (1996) Lidocaine block of LQT-3 mutant - human Na⁺ channels. *Circ Res* 79: 103-108.
- An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M, Kass RS** (1998) Novel LQT-3 mutations affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ Res* 83: 141-146
- Baker LC, London B, Choi BR, Koren G, Salama G** (2000) Enhanced dispersion of Repolarisation and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circ Res* 86: 396-407
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George Jr. AL** (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376: 683-685
- Bezzina CR, Rook MB, Wilde AA** (2001) Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 49: 257-271
- Chandra R, Starmer CF, Grant AO** (1998) Multiple Effects of KPQ deletion mutation on gating of human cardiac Na⁺ channels expressed in mammalian cells. *Am J Physiol* 274: H1643-1654
- Chiang CE, Roden DM** (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 36: 1-12
- Dessertenne F** (1966) La tachycardie ventriculaire a deux foyers opposes variables. *Arch Mal Cœur* 59: 263-272
- Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, Kirsch GE** (1996) Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res* 78: 916-924
- El-Sherif N, Caref EB, Chinushi M, Restivo M** (1999) Mechanism of ventricular tachyarrhythmias in the long QT syndrome. *JACC* 33: 1415-1423
- 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
- Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Ottenhof A, Nuyens D, Rossenbacker T** (2003) Effect of pacing and mexiletine on dispersion of repolarisation and arrhythmias in ΔKPQ SCN5A (long QT3) mice”, *Cardiovascular Research* 57: 1085-1093

- 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
- Garson A, Dick M, Fournier A, Gillette PC, Hamilton R, Kugler JD, GF van Hare GF, Vetter V, Vick GW** (1993) The long QT-syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation* 87: 1866-1872
- George Jr. Al, 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⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet* 68: 67-70
- Gussak I, Chaitman BR, Kopecky SL, Nerbonne JM** (2000) Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. *J Electrocardiol* 33: 159-170
- Haverkamp W, Hördt M, Chen X, Hindricks G, Hindricks G, Willems G, Kottkamp H, Rotman B, Brunn J, Borggrefe M, Breithardt G** (1993) Torsade de pointes. *Z Kardiol* 82: 763-774
- Haverkamp W, Shenasa M, Borggrefe M, Breithardt G** (1995) Torsades de Pointes. In: Zipes DP, Jalife J (eds). *Cardiac Electrophysiology-From cell to bedside* (sec. Edition). WB Saunders Company, Philadelphia, 886-99
- Jervell A, Nielsen FL** (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT-interval, and sudden death. *Am Heart J* 54: 59-68
- Jiang C, Atkinson D, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, Timothy K, Taggart RT, Schwartz PJ, Vincent GM, Moss AJ, Keating** (1994) Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet* 8: 141-147.
- Kambouris NG, Nuss HB, Johns DC, Marban E, Tomaselli GF, Balsler JR** (2000) A revised view of cardiac sodium channel 'blockade' in the long-QT syndrome. *J Clin Invest* 105: 1133-1140
- Kindermann W** (2000) Das Sportherz. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51: 307-8
- Kirchhof PF, Fabritz CL, Franz MR** (1998) Post-repolarization refractoriness versus conduction slowing caused by class 1 antiarrhythmic drugs-antiarrhythmic and proarrhythmic effects. *Circulation* 97: 2567-2574
- Knollmann BC, Katchmann AN, Franz MR** (2001) Monophasic action potential recordings from intact mouse heart: validation, regional heterogeneity, and relation to refractoriness. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12: 1286-1294

- Koller BS, Karasik PE, Solomon AJ, Franz MR** (1995) Relation between repolarization and refractoriness during programmed electrical stimulation in the human right ventricle. Implications for ventricular tachycardia induction. *Circulation* 91: 2378-2384
- Lee SD, Newman D, Ham M, Dorian P** (1997) Electrophysiologic mechanism of antiarrhythmic efficacy of a sotalol and class 1a drug combination : elimination of reverse use dependence. *J Am Coll Cardiol* 29: 100-105
- Lei Chen, Michelle L. Marquardt, David J. Tester, Kevin J. Simpson, Michael J. Ackerman** (2007) Mutation of a A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Nat Acad Sci* 104: 20990-20995
- London B** (2001) Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12: 1089-1091
- Vatta M, Ackermann MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze E; Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA** (2006) Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 114: 2104-2112
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackermann MJ** (2007) SCN4B-encoded sodium channel 4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116: 134-142
- Mönnig G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Borggrefe M, Funke H, Toelle M, Kirchhof P, Assmann G, Breithardt G, Haverkamp W** (2001) Clinical value of electrocardiographic parameters in genotyped individuals with familial long QT syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 24: 406-415
- Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT, MacCluer JW, Timothy KW** (1995) T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 92: 2929-2934
- Moss AJ, Zareba W, Hall J, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Priori SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K, Towbin JA, Andrews ML** (2000) Effectiveness and Limitations of β -Blocker Therapy in Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* 101: 616-623
- Nagatomo T, January CT, Ye B, Abe H, Nakashima Y, Makielski JC** (2002) Rate-dependent QT shortening mechanism for the LQT3 Δ KPQ mutant. *Cardiovasc Res* 54: 624-629

- 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 acceleration or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med* 7: 1021-1027
- Priori SG, Napolitano C., Cantu F, Brown AM, Schwartz PJ** (1996) Differential response to Na⁺ 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: 1009-1015
- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Elena Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D** (2003) Risk stratification in the long-QT Syndrome. *N Engl J Med* 348: 1866-1874
- Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent** (1996) Multiple Mechanisms in the Long-QT Syndrome. *Circulation* 94: 1996-2012
- Romano C, Gemme G, Pongiglione R** (1963) Aritmie cardiache rare della pediatria: accessi per fibrillazione ventricolare parossistica. *Clin Ped* 45: 656-683
- Rosenbaum MB, Acunzo RS** (1991) Pseudo 2:1 atrioventricular block and T wave alternans in the long QT syndromes [editorial]. *J Am Coll Cardiol* 18: 1363-1366
- 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. *New Engl J Med* 343: 262-267
- Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LK, Colatsky TJ** (1995) Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation* 92: 3381-3386
- 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 AM, Toivonen L, W 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
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi M, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P** (1998) Prolongation of the QT interval in the sudden infant death syndrome. *New Engl J Med* 338: 1709-1714

- Scott W, Dick M** (1987) Two:one atrioventricular block in infants with congenital long QT syndrome. *Am J Cardiol* 60: 1409-1410
- 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: 2038-2047
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT**, (2000) Spectrum of Mutations in Long-QT Syndrome Genes: KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*;102;1178-1185
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe L, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K** (2004) Ca^v1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119: 19-31
- Valdivia CR, Ackerman MJ, Tester DJ, Wada T, McCormack J, Ye B, Makielski JC** (2002) A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cadivasc Res* 55: 279-289
- van den Berg MP, Wilde AA, Viersma JW, Brouwer J, Haaksma J, van der Hout AH, Stolte-Dijkstra I, Bezzina CR, van Langen IM, Beaufort-Krol G, Cornel JH, Crijns H** (2001) Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12: 630-636
- van Hare GF, Franz MR, Roge C, Scheinmann MM** (1990) Persistent functional atrioventricular block in two patients with prolonged QT intervals: elucidation of the mechanism of block. *Pace Pacing Clin Electrophysiol* 13: 608-618
- Viskin S. Long** (1999) QT syndromes and torsades de pointes. *Lancet* 354: 1625-1633
- Wang DW, Yazawa K, George Jr. AL, Bennett PB** (1996) Characterisation of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13200-13205
- Wang DW, Yazawa K, Makita N, George Jr. AL, Bennet PB** (1997) Pharmacological targeting of long QT mutant sodium channels. *J Clin Invest* 99: 1714-1720
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson J, Moss A, Towbin J, Keating M** (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80: 805-811
- Ward OC** (1964) A new familial cardiac syndrome in children. *J Irish Med Assoc* 54: 103-109

- Wedekind H, Smits JP, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp MW, Bajanowski T, Borggreffe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan ZA, Wilde AM, Breithardt G, Haverkamp W, (2001)** De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation* 104: 1158-1164
- Witchel H, Hancox J (2001)** Familial and acquired long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27: 753-766
- Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi L, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M (2008)** α -1- Syntrophin mutation and the long-QT syndrome-A Disease of sodium channel disruption, *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 1: 193-201
- Yamaguchi M, Shimizu W, Ino H, Terai H, Uchiyama K, Oe K, Mabuchi T, Konno T, Kaneda T, Mabuchi H (2003)** T-Wave peak-to-end interval and QT-dispersion in acquired long QT syndrome: a new index for arrhythmogenicity, *Clinical Science* 105: 671-676
- Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH, W. Hall WJ, Andrews ML, Napolitano C, Timothy K, Zhang L, Medina A, Jean W. MacCluer JW, (1998)** Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *New Engl J Med* 339: 960-965

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau PD. Dr. med. Larissa Fabritz und Herrn Prof. Dr. med. Paulus Kirchhof für die Überlassung des Themas und für die geduldige Unterstützung zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Daniela Volkery und Herrn Marcel Tekook danke ich herzlich für die unermüdliche Hilfe bei den Versuchsreihen im Tierlabor und bei der Auswertung der Versuchsergebnisse.

Anhang

A Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Querschnittes durch das präparierte Herz
- Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (Langendorff)
- Abbildung 2.3: Schematische Übersichtsskizze des Aortenblockes mit retrograd perfundiertem Herzen
- Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Lage des octopolaren Katheters im rechten Ventrikel
- Abbildung 2.5: Simultane Originalaufzeichnung der drei MAP's und des EKG bei bestehendem AV-Block
- Abbildung 2.6: Originalaufzeichnung des epikardialen MAP
- Abbildung 2.7: Originalaufzeichnung eines epikardialen MAP
- Abbildung 3.1: Zykluslänge nach AV-Blockierung bei WT-Mäusen und SCN5A-TG im Vergleich
- Abbildung 3.2: Simultane Aufzeichnung von epikardialen MAP's sowie des EKG bei WT-Herzen nach AV-Block
- Abbildung 3.3: Simultane Aufnahme von epikardialen MAP's sowie des EKG bei SCN5A-Tg-Herzen nach AV-Block
- Abbildung 3.4: Auftreten von pVT's in WT- und SCN5A-Tg-Herzen im Vergleich
- Abbildung 3.5: Repetitive ventrikuläre Ektopien und EAD's in MAP-Aufzeichnungen
- Abbildung 3.6: Epikardiale Aufzeichnung des MAP und des EKG bei pVT bei SCN5a-Tg-Herzen
- Abbildung 3.7: Durchschnittliche Aktionspotentialdauer der MAP bei 70% der Repolarisation bei WT- und SCN5A-Tg-Herzen
- Abbildung 3.8: MAP und EKG während der plötzlichen Frequenzbeschleunigung bei Stimulation (600-200ms)
- Abbildung 3.9: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation rechtsventrikulär während der Stimulation
- Abbildung 3.10: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation linksventrikulär während der Stimulation

Abbildung 3.11: Dispersion der Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation

Abbildung 3.12: Durchschnittliche Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation bei fix-frequenter Stimulation ohne und mit Zusatz von Mexiletin

Abbildung 3.13: MAP's und EKG bei plötzlicher Frequenzsteigerung (600-200ms) unter Mexiletin

Abbildung 3.14: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation rechtsventrikulär bei Stimulation unter Mexiletin

Abbildung 3.15: Aktionspotentialdauer bei 70% der Repolarisation linksventrikulär bei Stimulation unter Mexiletin

Abbildung 3.16: Durchschnittliche Aktivierungszeit der MAP's unter Stimulation ohne und mit Zusatz von Mexiletin

B Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemische Zusammensetzung der Krebs-Henseleit Pufferlösung

C Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
APD	Aktionspotentialdauer
AV	atrioventrikular
DC	Gleichstrom
EAD	Early after depolarisation
EKG	Elektrokardiogramm
ERP	Effektiv refraktäre Periode
G	Gauche
g	Gramm
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LQT	Langes QT
MAP	Monophasisches Aktionspotential
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunde
TdP	Torsades de Pointes
Tg	transgen
WT	Wildtyp

D Veröffentlichte Manuskripte im Rahmen dieser Arbeit

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 Δ KPQ SCN5A (longQT3) mice”, Cardiovascular Research 57: 1085-1093

E Versuchsgenehmigungen



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster, 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
 Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
 Institut für Pharmakologie und
 Toxikologie der
 Westf. Wilhelms-Universität Münster
 Domagkstraße 12

48149 Münster



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

Aktenzeichen
 23.0835.1.0 (G 61/99)

8. Oktober 1999

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

Bezug: Ihr Antrag vom 14.07.1999, hier eingegangen am 16.07.1999
 Ihr Ergänzungsschreiben vom 29.09.1999, hier eingegangen am
 01.10.1999

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

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,

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

- I. Bedeutung Calcium-regulierender Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums
- II. Bedeutung von Proteinphosphatase-Isoenzymen für die Kontraktilität und den Gefäßtonus
- III. Bedeutung cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren bei der Herzinsuffizienz
- IV. Bedeutung kardialer Adenosinrezeptoren.

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

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

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

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

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

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr

Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der WWU
Domagkstraße 12
48149 Münster

Herr

Prof. Dr. med. Joachim Neumann
Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der WWU
Domagkstraße 12
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31.10.2002.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

2.440 Mäuse.

Auflagen:

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

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

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

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

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

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

Rechtsbehelfsbelehrung:

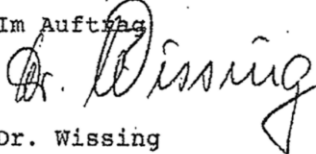
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

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

| Ich bitte um umgehende Rückgabe des Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Wissing

88 9 1055588 191 544:49 251 8355581 EMPFANGEN VON:++NOA NEDNVAJPKR 62:51 08-05-02 15:29



STB 556 - 22
1. Förderperiode

Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn
Prof. Dr. med. J. Neumann
Institut für Pharmakologie
und Toxikologie
des Universitätsklinikums Münster
Domagkstr. 12

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Telefax: 2115
Raum: 431
Ankunft erfüllt:
Frau Möllers
E-Mail:
imgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 61/1999)

48149 Münster

21. März 2002

Tierschutz;
Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

- I. Bedeutung Calcium-regulierender Proteine des sarkoplasmatischen Retikulum B1
- II. Bedeutung von Proteinphosphatase-Isoenzymen für die Kontraktilität und den Gefäßtonus B2
- III. Bedeutung cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren bei der Herzinsuffizienz B3
- IV. Bedeutung kardialer Adenosinrezeptoren. A7 (Vorbereitung)

Ihr Antrag vom 05.03.2002 – hier eingegangen am 13.03.2002

2. Förderperiode

Mein Genehmigungsbescheid vom 08.10.1999 - Az.: 23.0835.1.0 (G 61/99)

Sehr geehrter Herr Professor Neumann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BÖBL. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum 31. 10. 2003.

Herr Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz als Genehmigungsinhaber erhält eine Durchschrift dieses Bescheides.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

gez. Dr. Piontkowski

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de • zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:
Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf: Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz (Häuser A, B, C, H), Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W), Linie 15 bis Haltestelle Inselböden (Haus F), Linie 1 • 9 bis Haltestelle Königsweg (Haus D). Die Häuser S und T sind fußläufig 5 Min. vom H11 erreichbar.

16:51 0302 0303 15:31

