

Funktionelle und arrhythmogene Effekte von Gallensäuren am humanen Vorhofmyokard

eingereicht von

Uwe Primessnig

Mat.Nr.: 0633174

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie / Universitätsklinik für

Innere Medizin

unter der Anleitung von

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Dirk von Lewinski

Dr. Peter Rainer

Graz, am

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwende habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

(Unterschrift)

Vorwort

„Wer sich vornimmt, Gutes zu wirken, darf nicht erwarten, dass die Menschen ihm deswegen Steine aus dem Weg räumen, sondern muss auf das Schicksalshafte gefasst sein, dass sie ihm welche in den Weg rollen.“

Albert Schweizer, dt. Arzt und Philosoph (1875-1965)

Nachdem ich im September 2006 das Auswahlverfahren für das Medizinstudium in Graz erfolgreich bestanden habe, konnte ich im Oktober des gleichen Jahres mit dem Studium beginnen. Nach Erlangen der theoretisch-naturwissenschaftlichen Grundlagen konnte ich mich in den folgenden Semestern voll und ganz den menschlichen Funktionen, deren Störungen und Behandlungsmöglichkeiten hingeben und ein umfangreiches Wissen auf dem Gebiet der Medizin erwerben. Schon während der ersten Jahre meines Medizinstudiums stellten das Herzkreislaufsystem und insbesondere das Herz selbst einen besonderen Reiz für mich dar. Im Zuge eines freien Studienmoduls fiel dann die Entscheidung, meine Diplomarbeit an der Klinischen Abteilung für Kardiologie zu schreiben.

Im November 2009 konnte ich unter der Anleitung von Herrn Ass. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski und Herrn Dr. Peter Rainer mit meiner experimentellen Arbeit im Muskelstreifenlabor der klinischen Grundlagenforschung an der Abteilung für Kardiologie beginnen. Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten im Labor und der Auswertung der Daten sowie des Niederschreibens meiner Ergebnisse konnte ich im April 2011 meine Diplomarbeit abschließen. Aufgrund meiner Tätigkeit im grundlagenwissenschaftlichen Labor der Kardiologie sowie der zahlreichen Journal Clubs, an denen ich während meiner Zeit als Diplomand teilnehmen konnte, wurde mein Interesse und meine Begeisterung für die Forschung geweckt, so dass ich mich entschlossen habe, nach Abschluss meines Medizinstudiums im August 2011 ein Ph.D. Studium anzuschließen um in Zukunft als klinisch tätiger Kardiologe mit fundierter grundlagenwissenschaftlicher Ausbildung tätig werden zu können.

Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Ass. Prof. PD Dr. Dirk von Lewinski für die Überlassung des spannenden Themas für meine Diplomarbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während der kompletten Zeit bedanken. Durch sein enormes fachliches Wissen und seine Begeisterung für die Wissenschaft konnte er mich stets motivieren und mir die Faszination der Grundlagenforschung näher bringen ohne dabei jemals den Bezug zur Klinik zu verlieren. Bei Fragestellungen und Problemen stand er jederzeit sehr hilfsbereit zur Verfügung und schaffte es immer eine Lösung für meine Fragen zu finden.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Peter Rainer bedanken, der mir am Beginn meiner Tätigkeit im Labor den Umgang mit den unterschiedlichen Messgeräten und den Versuchsablauf beigebracht hat. Des Weiteren unterstützte er mich bei der Auswertung meiner Messergebnisse und konnte mir mit zahlreichen guten Ratschlägen immer weiterhelfen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Bernhard Doleschal, Frau Sandra Harenkamp sowie Herrn Dr. Markus Wallner für die kollegiale Zusammenarbeit und das gute Klima während der zahlreichen gemeinsamen Stunden im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Mächler und Frau Prof. Dr. Amelie Yates von der Herzchirurgie für die Bereitstellung der Vorhofproben ganz herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Burkert Pieske, dem Leiter der Kardiologie in Graz, welcher durch seine fachliche Expertise und seinen großartigen Einsatz erst die experimentelle kardiologische Grundlagenforschung in Graz ermöglicht hat.

Zum Schluss möchte ich mich natürlich noch ganz herzlich bei meiner Familie, meiner Freundin sowie bei meinen Freunden für die unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft während meines ganzen Studiums bedanken.

Zusammenfassung

Einleitung

Klinische Befunde legen nahe, dass hohe systemische Gallensäurespiegel - wie sie zum Beispiel bei der Intrahepatischen Schwangerschaftscholestase vorkommen - zu Arrhythmien führen können. Die arrhythmogenen Effekte der Gallensäuren konnten bereits in in-vitro Studien an neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Auswirkungen von erhöhten Gallensäure-Konzentrationen auf das menschliche Herz und die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind allerdings noch weitgehend ungeklärt.

Methoden

Isolierte humane atriale Herzmuskeltrabekel; modifizierte bikarbonathaltige Tyrode Lösung, 11.2 mM Glukose, 2.5 mM Ca^{2+} , 37°C, pH 7.4; Elektrische Stimulation mit 1 Hz und 0.5 Hz. Es wurde das Auftreten von Arrhythmien (AEC) nach Verabreichung von den beim Menschen dominierenden primären Gallensäuren (Taurin- und Glycin- konjugierte Cholsäure und Chenodeoxycholsäure) in steigenden Konzentrationen (10 μM -1mM, n=60) analysiert. Des Weiteren Bestimmung der absoluten Refraktärzeiten durch Ankoppelungsversuche mit stetig abnehmendem Stimulationsintervall nach Inkubation mit Taurocholsäure, (n=16) um auf die Veränderungen der Aktionspotentialdauer schließen zu können. Außerdem wurde der L-Typ Ca^{2+} -Kanal mit Diltiazem gehemmt und mit BayK8644 aktiviert (1 μM , n=8 bzw. 1 μM , n=10). Schlussendlich wurde noch der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) im reverse mode durch KB-R7943 gehemmt (5 μM , n=11).

Ergebnisse

Es konnten keine Arrhythmien bei Konzentrationen $\leq 30\mu\text{M}$ und 1 Hz Stimulation beobachtet werden. Steigende Gallensäure Konzentrationen führten zu Arrhythmien, insbesondere bei 0.5 Hz Stimulation (11 \pm 2.85 AECs/min vs. keine AECs bei der Kontrolle, $p < 0.01$). Betreffend die verschiedenen Konjugationen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der arrhythmogenen Potenz der Gallensäuren gezeigt werden. Nach einer Auswaschphase der Gallensäure konnte die Rückbildung der Arrhythmien gezeigt werden.

Die absoluten Refraktärzeiten in Anwesenheit von 0.3mM und 1mM Taurocholsäure nahmen auf $165\pm 9\text{ms}$ und $174\pm 12\text{ms}$ im Vergleich zur Kontrolle $157\pm 11\text{ms}$ zu ($p<0.05$ und $p<0.01$). Die Blockade des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit Diltiazem führte zu einer Erhöhung der Arrhythmie-Inzidenz während die Aktivierung mit BayK8644 Arrhythmien vollständig unterdrücken konnte. Die Blockade des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) im reverse mode durch KB-R7943 führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Arrhythmie-Inzidenz im Vergleich zur Kontrolle.

Diskussion

Das menschliche Vorhofmyokard entwickelt nach Zugabe von Gallensäuren dosis- und frequenzabhängige Arrhythmien, welche allerdings unabhängig von der jeweiligen Konjugation der Gallensäure auftreten. Die Zunahme der absoluten Refraktärzeiten nach TCA Inkubation weisen auf eine Verlängerung des Aktionspotentials hin, welche gemeinsam mit der Frequenzabhängigkeit für „Early Afterdepolarizations“ als Ursache der Arrhythmien sprechen. Die Aktivität des L-Typ Ca^{2+} -Kanals korreliert invers mit der Arrhythmie-Inzidenz, was für eine Rolle von Ca^{2+} als second messenger und nicht für eine direkte Wirkung auf die Elektromechanische Koppelung spricht. Ebenso spricht der inverse Effekt der Gallensäure TCA am NCX für die Rolle des Ca^{2+} als second messenger und nicht für eine direkte Beeinflussung der Elektromechanischen Koppelung.

Schlüsselwörter: Gallensäuren, Arrhythmien, Ca^{2+} , Aktionspotentialdauer, absolute Refraktärzeit, humanes multizelluläres Vorhofmyokard, L-Typ Ca^{2+} -Kanal, BayK8644, Diltiazem, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, , KB-R7943

Abstract

Background

Clinical evidence indicates that high bile acid levels may induce arrhythmias. Recently, *in vitro* studies on rat cardiomyocytes confirmed this arrhythmogenic effect. The consequences of elevated bile acid concentrations on human cardiac tissue, however, remain unknown.

Methods

Human atrial endocardial trabeculae; modified Tyrode's solution; 37°C, pH 7.4; 2.5mM Ca²⁺; electrical stimulation with 1 and 0.5Hz. Analysis of the appearance of arrhythmic extra contractions (AEC) after administration of the predominant human primary bile acids (glycin- and taurin conjugated cholic- and chenodeoxycholic acid) in different concentrations (10µM–1mM, n=60). Analysis of the absolute refractory period using decreased stimulation intervals and preincubation with taurocholic acid (n=16). Modulation of the L-type calcium channel (LTCC) with Diltiazem and BayK8644 (1µM, n=8 and 10, respectively). Inhibition of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) reverse mode with KB-R7943 (5µM, n=11).

Results

No arrhythmias were observed at concentrations ≤30µM at 1Hz stimulation. Increasing bile acid concentrations caused AECs, particularly at 0.5Hz stimulation (11±2.85 AECs/min vs. no AECs at control conditions, p<0.01, exemplary data for 0.3mM taurocholic acid). There was no significant difference in the arrhythmogenic potential between the tested bile acids. Arrhythmias were fully reversible by switching to bile acid free perfusate.

The absolute refractory period in the presence of 0.3mM and 1mM taurocholic acid was increased to 165±9ms and 174±12ms vs. 157±11ms in control trabeculae (p<0.05 and p<0.01, respectively).

Inhibition of the LTCC with Diltiazem increased the occurrence of AECs while activation with BayK8644 abolished them (up to 0.3mM, p<0.05 and p<0.01, respectively). Blocking the NCX with KB-R7943 increased the occurrence of AECs too.

Conclusions

Human atrial myocardium develops arrhythmias upon bile acid administration, at concentrations that are dose- and frequency dependent, reversible and lie within the pathophysiologic range. The increase in absolute refractory period could point towards prolonged action potential duration; together with the observed rate dependency this indicates early afterdepolarizations as a trigger. However, the unexpected behavior upon LTCC modulation and NCX inhibition challenges this idea and makes further clarification using electrophysiological approaches necessary.

Key words: bile acids, arrhythmias, Ca^{2+} , action potential alterations, absolute refractory period, human multizellular atrial myocardium, L-Typ Ca^{2+} -Kanal, BayK8644, Diltiazem, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, KB-R7943

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	ii
Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Glossar und Abkürzungen	xi
Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Morphologische Grundlagen des Myokards	1
1.2 Myokardiale Kontraktion und Relaxation	4
1.2.1 Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität	4
1.2.2 Die elektromechanische Koppelung	8
1.3 Arrhythmien	12
1.3.1 Vorhofflimmern	13
1.4 Gallensäuren	17
1.4.1 Physiologie	17
1.4.2 Pathophysiologie	19
1.5 Fragestellungen	21
1.6 Hypothesen	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Untersuchtes Gewebe	23
2.2 Transport und Präparation	24
2.2.1 Kardioplegie	24
2.2.2 Transport	25
2.2.3 Präparation der Muskelstreifen	25
2.3 Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktion	26
2.3.1 Beschreibung des Messstandes	26
2.3.2 Versuchsablauf	29

2.4	Anlage zur Messung der absoluten Refraktärzeiten.....	30
2.5	Lösungen und Substanzen.....	30
2.5.1	Tyrodelösung.....	30
2.5.2	BDM-Tyrodelösung.....	31
2.5.3	Pharmakologische Substanzen	31
2.6	Versuchsprotokolle.....	32
2.6.1	Messprotokoll 1:.....	32
2.6.2	Messprotokoll 2:.....	33
2.6.3	Messprotokoll 3:.....	33
2.7	Auswertung	34
2.7.1	Computergestützte Datenerhebung.....	34
2.7.2	Manuelle Auswertung der Originalregistrierung.....	34
2.7.3	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Frequenzabhängige arrhythmogene und funktionelle Effekte von Gallensäuren am menschlichen Vorhofmyokard	36
3.1.1	Taurocholsäure (TCA)	36
3.1.2	Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA).....	37
3.1.3	Glycocholsäure (GCA).....	38
3.1.4	Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA)	40
3.2	Einfluss der unterschiedlichen Konjugation der Gallensäuren auf die arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften des Vorhofgewebes	41
3.3	Einfluss der Gallensäure TCA auf die absoluten Refraktärzeiten am isolierten Vorhofmuskelstreifen.....	43
3.4	Die Rolle des L-Typ-Kalziumkanals bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren	45
3.4.1	BayK8644	45
3.4.2	Diltiazem.....	48

3.5	Die Rolle des Natrium/Kalzium-Austauscher bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren	50
3.5.1	KB-R7943	50
4	Diskussion	53
4.1	Wirkung der Gallensäuren auf die Kontraktionskraft des menschlichen Vorhofmuskelgewebes.....	55
4.2	Gallensäure-induzierte Arrhythmien am adulten humanen atrialen Herzmuskelgewebe	57
4.2.1	Einfluss der Gallensäure-Konjugation auf die Entstehung von Arrhythmien	57
4.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Gallensäure-induzierten Arrhythmien	58
4.2.3	Frequenzabhängigkeit der Gallensäure-induzierten Arrhythmien	59
4.3	Wirkungsmechanismus der Gallensäure-induzierten Arrhythmien am adulten humanen Vorhofmyokard	60
4.3.1	Einfluss der Gallensäure TCA auf die Aktionspotentialdauer des adulten humanen atrialen Herzmuskelgewebes	61
4.3.2	Einfluss der Gallensäure TCA auf den L-Typ-Ca ²⁺ Kanal.....	62
4.3.3	Einfluss der Gallensäure TCA auf den Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger.....	63
4.4	Zusammenfassung.....	65
5	Literaturverzeichnis	66
6	Lebenslauf.....	77

Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	arrhythmic extra contractions
AHA	American Heart Association
AKE	Aortenklappenersatz
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APD	Aktionspotentialdauer
AR	Adrenorezeptoren
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikulär
BDM	2,3-Butandion-Monoxim
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _o	extrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CA	Cholsäure
CABG	Coronary artery bypass graft
CaMKII	Calmodulin abhängige Kinase II
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung (Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release)
dF/dt _{max}	maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit
dF/dt _{max}	maximale Relaxationsgeschwindigkeit
dP/dt	Druckanstiegsgeschwindigkeit
DT	diastolische Kraft (diastolic tension)
EF	Ejektionsfraktion
ESC	European Society of Cardiology
ET	Endothelin
F	entwickelte Kraft
FSM	Frank-Starling-Mechanismus
GCA	Glycocholsäure

GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
Hz	Hertz
IC50	Konzentration, bei der halbmaximale Hemmung erreicht wird
ICP	Intrahepatische Schwangerschaftscholestase
I.E.	Internationale Einheit
IK1	K ⁺ -Strom
IK,Ach	acetylcholinaktivierter K ⁺ -Strom
K ⁺	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
Lmax	Länge des Muskels, bei der die Kraftentwicklung maximal ist
LTCC	L-Typ- Ca ²⁺ -Kanal
M	mol/l
m	männlich
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
ml	Milliliter
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
MW	Molekulargewicht
Na ⁺	Natrium
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
PDE III	Phosphodiesterase III
PLB	Phospholamban
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
RAS	Renin Angiotensin Aldosteron
RT50	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation, (relaxation time)
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Ca ²⁺ ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (Sarcoendoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase)
SFR	Slow Force Response
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ST	systolische Kraft (systolic tension)

Tab.	Tabelle
TCA	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
Tn	Troponin
TT ₉₀	Zeit von Beginn bis zur 90%igen Relaxation, (total time)
TPT	Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraft, (time to peak tension)
UCDA	Ursodeoxycholsäure
VHF	Vorhofflimmern
w	weiblich

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	1
Abbildung 2	3
Abbildung 3	11
Abbildung 4	15
Abbildung 5	18
Abbildung 6	23
Abbildung 7	26
Abbildung 8	27
Abbildung 9	28
Abbildung 10	30
Abbildung 11	36
Abbildung 12	37
Abbildung 13	38
Abbildung 14	38
Abbildung 15	39
Abbildung 16	39
Abbildung 17	40
Abbildung 18	41
Abbildung 19	42
Abbildung 20	42
Abbildung 21	45
Abbildung 22	45
Abbildung 23	46
Abbildung 24	47
Abbildung 25	47
Abbildung 26	48
Abbildung 27	48
Abbildung 28	49
Abbildung 29	49
Abbildung 30	50
Abbildung 31	51
Abbildung 32	51
Abbildung 33	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	12
Tabelle 2	24
Tabelle 3	27
Tabelle 4	30
Tabelle 5	44

1 Einleitung

1.1 Morphologische Grundlagen des Myokards

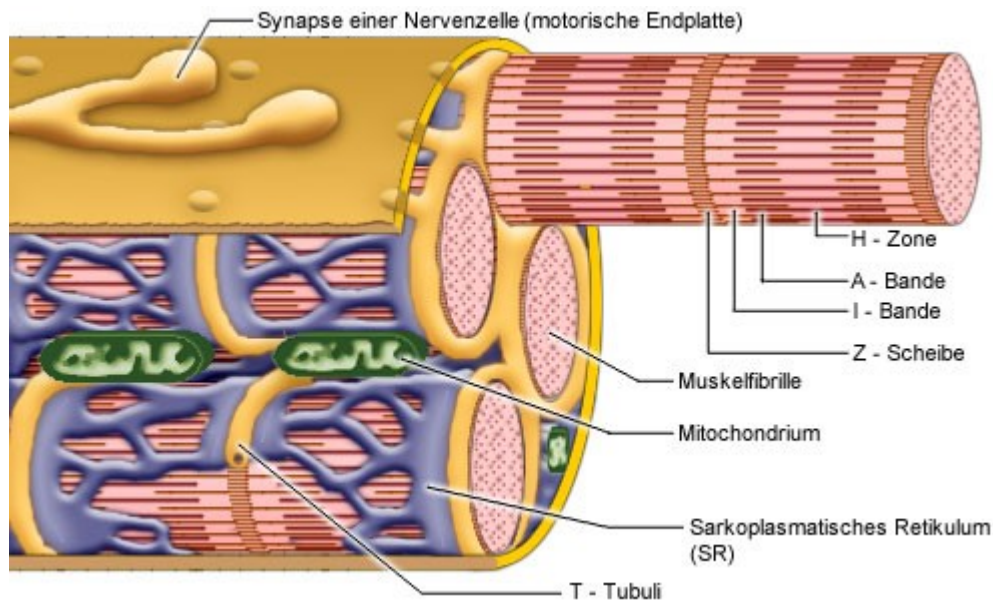


Abbildung 1: Modell einer Herzmuskelzelle

<http://www.lukashensel.de>

Die Herzmuskelzelle

Das menschliche Herz ist ein funktionelles Synzytium aus Herzmuskelzellen die über sogenannte Nexus miteinander verbunden sind. Innerhalb dieser Verbindungen befinden sich Poren (Gap Junctions), über welche die Zellen kommunizieren können.

Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau eines Kardiomyozyten. Im Vordergrund stehen zunächst zwei tubuläre Strukturen. Die T-Tubuli, welche Einfaltungen des Sarkolemms darstellen und die L-Tubuli. Diese stellen eine Organelle von zentraler Bedeutung für den Calciumstoffwechsel dar, das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Dabei ist auf die enge Beziehung der beiden Strukturen hinzuweisen, welche vor allem beim Vorgang der elektromechanischen Koppelung zum Tragen kommt. Des Weiteren sind auf der Abbildung Mitochondrien zu erkennen, welche rund 33 % des Zellvolumens ausmachen und die Zentren der Energiegewinnung über die Atmungskette darstellen.

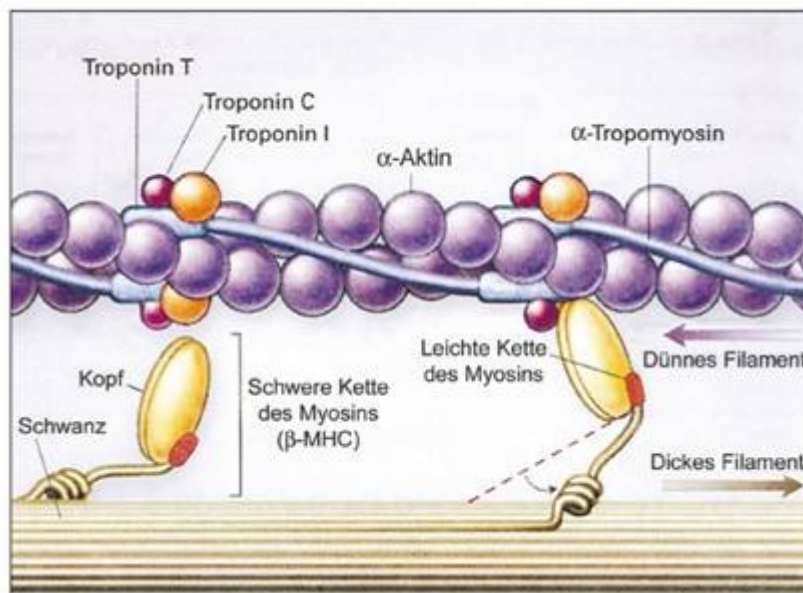
Die Zellkompartimente

Das **Sarkolemm** enthält neben anderen Kanälen den L-Type- Ca^{2+} -Kanal, an dem sich auf der extrazellulären Seite eine Bindungsstelle für Diltiazem und Bay K8644 befindet (1). Während eines Aktionspotentials kann durch ihn Ca^{2+} in das Zellinnere strömen. Außerdem sind diverse Rezeptoren in die Membran integriert, darunter nehmen vor allem die β -Rezeptoren eine wichtige Rolle ein. Innerhalb der Membran befinden sich die G-Proteine (G_s und G_i), welche die in Nähe des Sarkolemm befindliche Adenylatzyklase stimulieren bzw. hemmen können. Für den Ca^{2+} -Transport sind des Weiteren der elektrogene $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (3 Na^+ gegen 1 Ca^{2+}) und die Ca^{2+} -ATPase, die vor allem zur Calciumelimination aus der Zelle während der Diastole beitragen soll, von großer Bedeutung. Die Na^+/K^+ -ATPase (3 Na^+ gegen 2 K^+) sorgt maßgeblich für die Na^+ -Homöostase und die Sicherung des Membranpotentials.

Das **Sarkoplasmatische Retikulum (SR)** bildet die longitudinalen L-Tubuli des Herzens, die in unmittelbarer Nähe zum Sarkolemm in Form der terminalen Zisternen enden und stellt den größten Ca^{2+} -Speicher der Zelle dar. In seiner Membran ist ein Ca^{2+} -Freisetzungskanal lokalisiert, welcher die Freisetzung von Ca^{2+} während der Systole ermöglicht. Da er durch Ryanodin gehemmt werden kann, wird er auch Ryanodinrezeptor genannt. Er befindet sich hauptsächlich im Bereich der terminalen Zisternen und damit in direkter räumlicher Beziehung zu den sarkolemmalen Ca^{2+} -Kanälen. Für die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR ist die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a) verantwortlich, die bei Verbrauch von einem ATP zwei Ca^{2+} -Ionen in das SR transportiert. An sie angelagert sind das Regulatorprotein Phospholamban und im Vorhof zusätzlich das homologe Strukturprotein Sarcolipin, welche die Ca^{2+} -ATPase in unphosphoryliertem Zustand hemmen. Diese Hemmung entfällt, wenn Phospholamban durch eine Calmodulin-abhängige Proteinkinase phosphoryliert wird. Ein wichtiges Enzym in diesem Zusammenhang ist die Phosphodiesterase, welches sowohl in freier Form im Zytosol als auch gebunden am SR vorkommt. Unter den bekannten Isoformen dieses Enzyms ist in humanen Kardiomyozyten die PDE III die vorherrschende Form.

Die **Kontraktile Proteine (Myofilamente)** setzen sich aus einem dünnen Filament (Aktin, Troponin, Tropomyosin) und einem dicken Filament (Myosin) zusammen. Das zum dünnen Filament gehörige Troponin (Tn) lässt sich wiederum in drei Untereinheiten gliedern. Das Troponin C mit seinen vier Bindungsstellen für Calcium, das Troponin T als strukturelles Bindeglied zum Tropomyosin und das Troponin I als Regulatorprotein für Troponin C.

Abb. 2 veranschaulicht den Aufbau der Myofilamente.



Seidman et al

Abbildung 2: Aufbau der Myofilamente (Aktin und Myosin)

1.2 Myokardiale Kontraktion und Relaxation

Die **Kontraktilität** ist charakterisiert durch den vom Herzen in der Systole aufgebauten Druck bei definiertem enddiastolischem Volumen. Direkten Messungen ist die Kontraktilität nur schwer zugänglich, jedoch gibt es vielerlei Indikatoren für Veränderungen der Kontraktilität, wovon für in vivo Messungen die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt) und für in vitro Messungen die Kontraktionskraft (F) als die Zuverlässigsten angesehen werden können.

Physiologischerweise kann die Kontraktilität durch folgende Prozesse gesteigert werden (positive Inotropiemechanismen): α - und β -adrenerge Stimulation, Frequenzinotropie und endogene Peptide. Darüber hinaus trägt Dehnung über den Frank-Starling Mechanismus zur Regulation der Auswurfleistung des Herzens bei.

1.2.1 Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität

Frank-Starling-Mechanismus:

Dieser Mechanismus beschreibt die unmittelbare Zunahme der Kontraktionskraft bei akuter Dehnung des Myokards.

In einem bestimmten Bereich führt eine Zunahme der Vordehnung des Herzmuskels zu einer Steigerung der entwickelten Muskelspannung. Da sich der Zeitpunkt der maximalen Spannungsentwicklung nicht verändert, nimmt die Geschwindigkeit der Spannungsentwicklung zu (dP/dt). Dies bedeutet, dass bei akut erhöhter Volumenbelastung der Ventrikel (preload), das Herz automatisch reagiert, indem es das Schlagvolumen erhöht. Die Erhöhung beruht u.a. auf der durch die Dehnung per se erhöhten Ca^{2+} -Empfindlichkeit der kontraktilen Proteine(2). Die Folge ist eine stärkere Kontraktilität. Bei erhöhter Druckbelastung des linken Ventrikels (afterload) nimmt zuerst das Schlagvolumen ab. Da der rechte Ventrikel vorerst nicht betroffen ist, wird weiterhin das gleiche Schlagvolumen in den linken Ventrikel gepumpt. Die Vorlast steigt damit und der linke Ventrikel kann nun gegen den erhöhten Widerstand dasselbe Schlagvolumen auswerfen.

Dadurch ist das Herz in der Lage, bei Volumenbelastung ein größeres Volumen gegen den gleichen Widerstand bzw. bei Druckbelastung ein konstantes Volumen

gegen den erhöhten Widerstand zu fördern und damit das Herzzeitvolumen dem venösen Rückstrom und dem peripheren Widerstand anzupassen.

Die physiologische Bedeutung des Frank-Starling-Mechanismus besteht somit im Abgleichen der Schlagvolumina von rechtem und linkem Ventrikel. Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigten, dass er auf einer Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine beruht (2,3).

Frequenzinotropie:

Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit des gesunden Myokards, auf eine Erhöhung der Frequenz mit einer Steigerung der Kraft zu reagieren. Die Frequenzinotropie wurde von Bowditch 1871 erstmals am Froschherzen beschrieben. Am Albino-Kaninchen konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bei unterschiedlicher Herzfrequenz und unterschiedlichem diastolischem Membranpotential verändert ist. Je höher die Frequenz umso langsamer kommt es zum Abfall des Ca^{2+} -Stroms und somit zu einem erhöhtem Ca^{2+} -Transienten in der Zelle (4). Die Frequenzinotropie ließ sich auch im humanen Vorhof nachweisen und beruht auf einer Zunahme des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten durch Anstieg des transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstroms, der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und des SR- Ca^{2+} -Gehalts (5,6). Diese frequenzabhängige Zunahme der Kontraktionskraft über einen physiologischen Frequenzbereich von 30 bis 180 Schlägen pro Minute beim Menschen (0,5Hz bis 3 Hz) nennt man auch eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung.

Im Detail laufen folgende Prozesse ab: Sowohl der Na^+ -Kanal (7,8) als auch der Ca^{2+} -Kanal (9) reagieren auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz mit einer Erhöhung ihrer Aktivität, wodurch die Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme nach intrazellulär zunehmen. Die ansteigende Natriumkonzentration $[\text{Na}^+]_i$ führt zu einer Verlangsamung bis Umkehr (reverse mode) des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, wodurch während der Depolarisation noch mehr Calcium in die Zelle transportiert werden kann. Durch den erhöhten Ca^{2+} -Influx kommt es zu einer stärkeren Beladung des SR, das dadurch auch mehr Calcium freisetzen kann. Letztlich bewirkt dies eine Zunahme der Ca^{2+} -Transienten, die anhand von Ca^{2+} -Indikatoren gemessen werden können (10-12). Durch die größere Menge an Calcium kann die Kontraktionskraft des Herzens über den Weg der elektromechanischen Koppelung gesteigert werden.

Des Weiteren stellt die Frequenzinotropie einen wichtigen Anpassungsmechanismus des gesunden Herzens während körperlicher Belastung dar.

Sympathoadrenerge Stimulation:

Eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei körperlicher Belastung bewirkt eine Freisetzung von Noradrenalin, das am Herzen α - und β -adrenerge Rezeptoren stimuliert. Dies führt über eine Steigerung der Herzfrequenz und eine Erhöhung der myokardialen Kontraktilität zu einem erhöhten kardialen Output. Durch die Stimulation der Adrenorezeptoren (AR) kommt es zu einer gesteigerten Signaltransduktion. Der AR gehört zu den 7-transmembran-Domänen-Rezeptoren und ist G-Protein gekoppelt (G-Protein-Coupled-Receptor). Im Herzen dominiert dabei der β_1 Subtyp (75-80%). Durch die Bindung kommt es zur Dissoziation des G-Proteins in G_α und G_β . Diese Untereinheiten aktivieren die Adenylatzyklase, welche die Biosynthese von cAMP katalysiert. Durch erhöhtes cAMP kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A, welche zur Phosphorylierung von diversen Funktionsproteinen führt. Die Phosphorylierung von sarkolemmalen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen führt zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms. Das in der Membran des SR lokalisierte Protein Phospholamban stimuliert im phosphorylierten Zustand die SERCa²⁺-ATPase, wodurch die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR beschleunigt wird (13). Die Phosphorylierung des SR- Ca^{2+} -Freisetzungskanals (Ryanodin-Rezeptor) trägt zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bei (14). Die genannten Effekte haben alle zur Folge, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Transient in der Systole ansteigt und sind somit Grundlage der positiv inotropen Wirkung. Auch α_1 -Adrenorezeptoren vermitteln im humanen Herzen einen starken Anstieg der entwickelten Kraft. Dieser beruht im Vorhof auf einer Zunahme des MLC2a-Phosphorylierungsgrades durch Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) (15). Im Ventrikel scheint die Phosphorylierung der MLC2v dagegen nicht an dem α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt beteiligt zu sein (15).

Endogene Peptide:

Eine Reihe von endogenen Peptiden moduliert die Herzaktionen. Zu den wichtigsten herzaktiven Peptiden gehören Endothelin I und Angiotensin II. Beide werden bei Druck- und/oder Volumenbelastung z.B. bei Herzinsuffizienz freigesetzt (16). Dem Endothelin I, ein von Yanagisawa et al. 1988 entdecktem Peptid, wird sowohl eine positive als auch eine negative Inotropie am Herzen beigemessen, wobei sich hier Vorhof und Ventrikel unterscheiden. Meyer M. beschrieb, dass Endothelin im menschlichen Vorhof über den ET(a)-Rezeptor die PKC aktiviert, die in Folge den Na^+/H^+ -Austauscher aktiviert (17). Des Weiteren kommt es zur erhöhten myofibrillären Ca^{2+} -Empfindlichkeit. Die positiv inotrope Wirkung des Endothelins am menschlichen Myokard ist im Wesentlichen an den ET(a)-Rezeptor gebunden (18) und ist am Vorhof stärker ausgeprägt als am Ventrikel (19). Am Maus Herzen wurde der negativ inotrope Effekt über die Aktivierung des ET(b)-Rezeptors, über die Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und über die Abnahme des Ca^{2+} -Transienten beschrieben (20). Die Effekte von Endothelin I sind jedoch stark speziesabhängig (21). Auch für Angiotensin II konnte am rechten Vorhof eine positiv inotrope Wirkung gezeigt werden (22). Sie wird über AT1-Rezeptoren, nicht aber über AT2-Rezeptoren vermittelt (23). Dagegen fehlt im Ventrikel eine solche positiv inotrope Wirkung des Angiotensin II (22). Als Antwort auf Dehnung können humane Vorhofmyozyten außerdem das Peptid ANP freisetzen (24). Humanes ANP wird als Prohormon synthetisiert und in den Vorhofmyozyten in Granula gespeichert um nach seiner Freisetzung über spezifische Rezeptoren seine Wirkung zu entfalten. (25).

1.2.2 Die elektromechanische Koppelung

Grundlage der Pumpfunktion des Herzens ist eine koordinierte Kontraktion und Relaxation der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Die Kontraktion der Vorhöfe leistet einen Beitrag von bis zu 20 % zum enddiastolischen Blutvolumen innerhalb der Ventrikel. Dieser Beitrag steigt mit zunehmendem Alter sowie unter Stressbedingungen. Die elektromechanische Kopplung ist die Umsetzung von Aktionspotentialen in Kontraktionen des Herzens, was zur Austreibung des Schlagvolumens führt. Dabei spielt Ca^{2+} die entscheidende Rolle (6,26). Der Zusammenhang zwischen Kontraktionskraft und extrazellulärem Ca^{2+} wurde erstmals 1883 von Ringer beschrieben. Die Aufklärung des genauen funktionellen Zusammenhanges gelang im Jahr 1975 durch A und F Fabiato. Im Folgenden wird ein Überblick über die der elektromechanischen Kopplung zugrunde liegenden Mechanismen gegeben:

Calciumeinstrom:

Ein Kontraktionszyklus beginnt durch ein fortgeleitetes Aktionspotential, das die Zellmembran (das Sarkolemm) depolarisiert. Dadurch steigt die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen sarkolemmalen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren) mit der Folge eines transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstroms in das Zellinnere (6,27). Dieser Vorgang stellt den entscheidenden Schritt bei der elektromechanischen Kopplung in Herzmuskelzellen dar (6,28). Zusätzlich gelangt eine geringe Menge Ca^{2+} über den NCX in die Zelle (29,30). Die dadurch im Zytosol befindliche Ca^{2+} -Menge besitzt allein nur eine mäßige Bedeutung für die entwickelte Kontraktionskraft (31). Der Anteil in Bezug auf die gesamte an der Kontraktion beteiligte Ca^{2+} -Menge variiert je nach Spezies und in Abhängigkeit anderer Faktoren. Im Rattenventrikel beträgt der Anteil etwa 10 %, im humanen Ventrikel etwa 40 % (32). Das über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und den NCX in das Zytosol gelangte Ca^{2+} bindet an die terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), das den bedeutendsten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher darstellt.

Calcium induzierte Calcium Freisetzung:

In den terminalen Zisternen des SR sind Ca^{2+} -sensitive Ca^{2+} -Freisetzungsproteine lokalisiert, die als Ryanodin-Rezeptoren (RyR) bezeichnet werden, da sie spezifisch das Pflanzenalkaloid Ryanodin binden. Die RyR bestehen aus 4

identischen Untereinheiten, die gemeinsam eine Kanalfunktion aufweisen. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen entlang des Sarkolemm und den RyR an den terminalen Zisternen des SR kommt es durch die lokale Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung zu einer sehr schnellen Aktivierung der RyR (33,34). Es resultiert eine in Relation zum transsarcolemmalen Ca^{2+} -Einstrom deutlich größere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol (26,31,35). Das von extrazellulär stammende Ca^{2+} dient somit als Auslöser („Trigger- Ca^{2+} “) für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Dadurch steigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von diastolisch etwa 10^{-7} mol/l auf systolisch etwa 10^{-6} mol/l.

Auslösung der Kontraktion:

Das im Zytosol vorhandene Ca^{2+} bindet an das Troponin C, das vier Bindungsstellen für Ca^{2+} besitzt (36). Durch die Bindung von Ca^{2+} erfährt der Troponin-Tropomyosin-Komplex eine Konformationsänderung, welche zu einer Aufhebung der inhibitorischen Wirkung des Regulatorproteins Tropomyosin auf das kontraktile Protein Aktin führt. Dadurch werden die Querbrückenbindungsstellen von Aktin und Myosin freigegeben. Dies führt zu einer Abscherbewegung der Myosinköpfe entlang der Aktinfilamente, wodurch die eigentliche Kontraktion zu Stande kommt. Die im Myosinköpfchen lokalisierte Myosin-ATPase hydrolysiert dabei pro Querbrückenzyklus ein ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat. Das ATP wird zur Ablösung des Myosinköpfchens benötigt. Dieser Vorgang stellt einen wesentlichen energieverbrauchenden Mechanismus der Herzmuskelzelle dar. Durch mehrere Querbrückenzyklen hintereinander erfolgt eine Muskelverkürzung und somit die eigentliche Muskelkontraktion.

Relaxation:

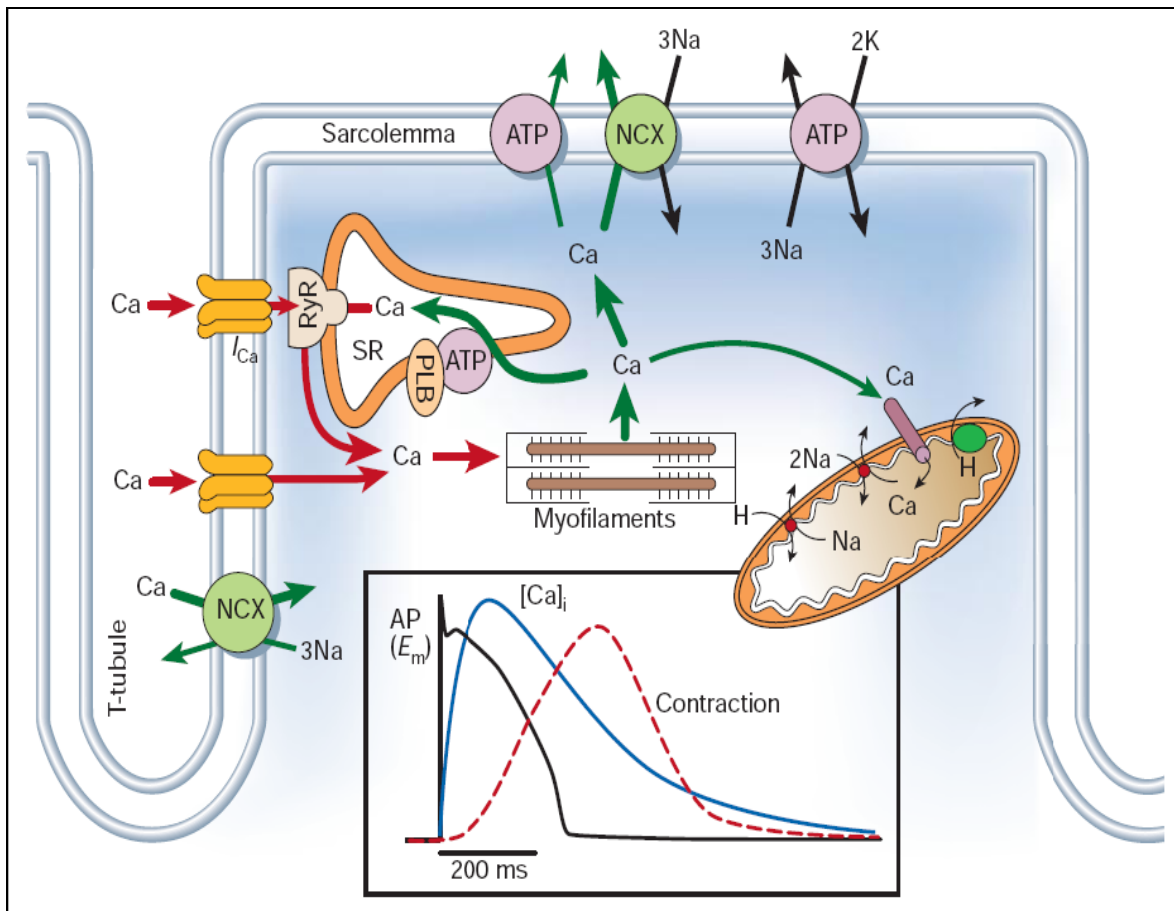
In der Diastole dissoziiert das Ca^{2+} vom Troponin C ab und wird über verschiedene Mechanismen aus dem Zytosol eliminiert. Der größte Teil (etwa 60-90 %) wird über die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) zurück in das SR gepumpt (6,37). Die Aktivität der SERCA 2a wird durch das Regulatorprotein Phospholamban (PLB) beeinflusst. Dephosphoryliert ist PLB nicht-kovalent an die SERCA2a gebunden und inhibiert diese (38,39). Durch eine cAMP-abhängige oder eine Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase wird PLB phosphoryliert und ändert seine Konformation, so dass der hemmende Einfluss auf die SERCA2a

aufgehoben und diese enthemmt wird (40,41). Durch die gesteigerte Pumpaktivität der SERCA2a kommt es zu einer vermehrten Ca^{2+} -Beladung des SR (42). In geringerer Ausprägung sind außerdem der sarkolemmale NCX (etwa 25 %) sowie die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase am Export des Ca^{2+} beteiligt (43-45). Mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration vermindert sich gleichsam die Zahl der Querbrückenbindungen und das Herz relaxiert. Anschließend kann der Kontraktionszyklus von vorne beginnen. Eine Übersicht über den Ca^{2+} -Zyklus bei der elektromechanischen Kopplung zeigt **Abb. 3**.

Unterschiede zwischen Vorhof und Ventrikel:

Für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bestehen im Vergleich von Ventrikel- und Vorhofgewebe wichtige Unterschiede: Zum einen sind Vorhofmyozyten kleiner und vor allem dünner als Ventrikelzellen. Außerdem wird die Ausprägung des SR als wichtigsten intrazellulärem Ca^{2+} -Speicher im Vorhof deutlich von jenem in Ventrikelmyozyten übertroffen. In Ventrikelmyozyten ist das SR in Form longitudinaler Tubuli (L-Tubuli) mit terminalen Zisternen angeordnet. Durch eine nahezu simultane Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR in den gesamten Ventrikelmyozyten besitzt diese einen homogenen Charakter (46). Im Vorhof sind dagegen sowohl das T-Tubulus- als auch das L-Tubulus- System deutlich geringer ausgeprägt (47,48). Hier finden sich zwei Formen von SR. Einerseits existiert ein junktionales SR, das nahe dem Sarkolemm liegt. Andererseits gibt es eine nicht-junktionale Form von SR, die zentral lokalisiert ist und sphärische Aussackungen (korbuläres SR) besitzt (47,49,50). RyR finden sich in beiden SR-Formen (49,51). Im Rahmen der CICR erfolgt zuerst die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem subsarkolemmalen SR (52,53). Es resultiert ein peripherer Ring erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]$ -Ionen, der nach zentral diffundiert und anschließend die zusätzliche Freisetzung von Ca^{2+} aus dem nicht-junktionalen SR induziert (53). Die Ca^{2+} -Freisetzung besitzt daher in Vorhofmyozyten keinen homogenen Charakter. Dies könnte somit begünstigend für die Entstehung von Arrhythmien sein. Auf funktioneller Ebene unterscheiden sich humane Vorhof- und Ventrikelmyozyten ebenfalls voneinander: Im Vorhofmyokard verlaufen sowohl die Kontraktion als auch die Relaxation schneller als im Ventrikel (54). Dies beruht möglicherweise neben kürzeren Aktionspotentialen und Ca^{2+} -Transienten auf einer rascheren Ca^{2+} -Elimination während der Diastole aus dem Zytosol (5,55). Hierfür könnten eine verminderte

Phospholamban- und eine ausgeprägte SERCA-Expression in Vorhofmyozyten maßgeblich sein (56).



Aus Bers; Nature 415:198

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Zyklus bei der elektromechanischen Kopplung. Während eines Aktionspotentials gelangt Ca^{2+} über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach intrazellulär und induziert über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) die Freisetzung einer größeren Ca^{2+} -Menge aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieses Ca^{2+} bindet an die Myofilamente. Es wird anschließend – moduliert durch Phospholamban (PLB) – hauptsächlich von der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in das SR zurück transportiert sowie über den NCX und sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase-Pumpen aus dem Zytosol eliminiert. Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Wege der zytosomatischen Ca^{2+} -Erhöhung in dem Kardiomyozyten (rote Pfeile). Die grünen Pfeile hingegen markieren die Hauptmechanismen der Ca^{2+} -Eliminierung aus dem Zytosol. Die eingeschobene Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von Aktionspotential, Ca^{2+} -Transienten und darauffolgender Muskelkontraktion.

1.3 Arrhythmien

Der Herzrhythmus ist ein wesentlicher Steuerungsmechanismus für die bedarfsgerechte Funktion des muskulären Pumporgans „Herz“. Die Störung der Erregungsbildung bzw. der Erregungsleitung im Herzen bezeichnet man als Arrhythmien. Die klinische Bedeutung von Herzrhythmusstörungen kann von einer harmlosen Normabweichung bis zum lebensbedrohlichen Ereignis oder gar plötzlichen Herztod reichen. Die Ursachen von Rhythmusstörungen können vielfältig sein. Häufig auftretende und anhaltende Arrhythmien können durch metabolische Schädigung (Hypoxie, Azidose, Elektrolytstörungen, Substratmangel, Kälte und Medikamentenwirkungen), eine strukturelle Schädigung (Vernarbung, Hypertrophie und Entzündung) oder aber angeborene Strukturanomalien des Herzens und seines Reizleitungssystem auftreten. Neben der Unterteilung in Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen ist vor allem die Unterscheidung zwischen bradykarden und tachykarden Rhythmusstörungen von enormer klinischer Relevanz. **Tab. 1** zeigt die wichtigsten tachykarden und bradykarden Rhythmusstörungen. Des Weiteren muss man zwischen Rhythmusstörungen des Vorhofes und des Ventrikels unterscheiden, wobei hier vor allem die Ventrikulären Tachykardien sowie das Vorhofflimmern von besonderer klinischer Bedeutung sind.

<u>Bradykarde Herzrhythmusstörungen</u>	<u>Tachykarde Herzrhythmusstörungen</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Sinusbradykardie • Sinusbradyarrhythmie • Sick-Sinus-Syndrom • Sinuatriale Blockierungen und Sinusarrest • Karotissinus Syndrom • Atrioventrikuläre Blockierungen • Interventrikuläre Schenkelblöcke • Bradykardes Vorhofflimmern 	<ul style="list-style-type: none"> • Sinustachykardie • Sinustachyarrhythmie • AV-Knoten-Reentry-Tachykardie • AV-Reentry-Tachykardie • Vorhofflattern • Tachykardes Vorhofflimmern • Supraventrikuläre Extrasystolen • Ventrikuläre Extrasystolen • Ventrikuläre Tachykardie • Kammerflattern • Kammerflimmern

Tabelle 1: Arrhythmien

1.3.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist weltweit die häufigste klinisch relevante anhaltende Herzrhythmusstörung im Erwachsenenalter und zugleich diejenige Form, die am häufigsten zur Hospitalisierung führt (57,58). Jeder vierte Erwachsene über 40 Jahre hat das Risiko, im Laufe seines Lebens eine Vorhofflimmer-Episode zu erleiden (59). Vorhofflimmern tritt bei Menschen unter 65 Jahren vergleichsweise selten auf. Die Häufigkeit steigt mit zunehmendem Alter und liegt bei über 80-Jährigen bei 10 % (60). In ganz Europa sind rund 4,5 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen (61). In Österreich gibt es Schätzungen zufolge etwa 130.000 Menschen, die an Vorhofflimmern erkrankt sind (Jahrestagung 2009, Österreichische Kardiologische Gesellschaft). Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre tachykarde (300-600 Erregungen/min) Herzrhythmusstörung mit schneller, irregulärer Vorhofaktivierung und progredienter Verschlechterung der Vorhof-Kontraktilität („atrial stunning“). Die Kammeraktion ist bei intaktem AV-Knoten unregelmäßig und schnell. Daher spricht man auch von „Tachyarrhythmia absoluta“. Vorhofflimmern kann in verschiedenen Formen auftreten. Je nach Dauer und Verlauf der Vorhofflimmer-Episoden spricht man von paroxysmalem (in Anfällen auftretend), persistierendem (länger fortbestehend) und permanentem Vorhofflimmern (62).

- Paroxysmales Vorhofflimmern: Die Flimmer-Episode dauert von 2 Minuten bis höchstens 7 Tage und endet von selbst.
- Persistierendes Vorhofflimmern: Das Vorhofflimmern hält länger als 7 Tage an und endet nicht spontan. Es kann durch ärztliche Behandlung (medikamentöse oder elektrische Kardioversion) beendet werden.
- Permanentes Vorhofflimmern: Eine Kardioversion ist nicht mehr möglich. Das Vorhofflimmern bleibt dauernd bestehen.

Die häufigste Ursache für die Entstehung von Vorhofflimmern stellt die hypertensive Herzerkrankung dar (63,64). Weitere bekannte Risikofaktoren sind ein fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Herzinsuffizienz (65), koronare Herzkrankheit (KHK), Mitralinsuffizienz, Mitralstenose, Hyperthyreose, Elektrolytstörungen, Lungenembolien und eine Familiengeschichte für Vorhofflimmern (66-68). Klinisch äußert sich Vorhofflimmern vor allem durch Palpitationen und Dyspnoe (63). Des Weiteren

können Schwindel, Synkopen, Müdigkeit, Schlafstörungen, Angstgefühl, Polyurie (Wirkung des Atrialen Natriuretischen Peptids, ANP) und unregelmäßigen Puls mit Pulsdefizit in Erscheinung treten. Allerdings bleiben etwa 70 Prozent der Vorhofflimmer-Attacken für die Patienten unbemerkt (69,70).

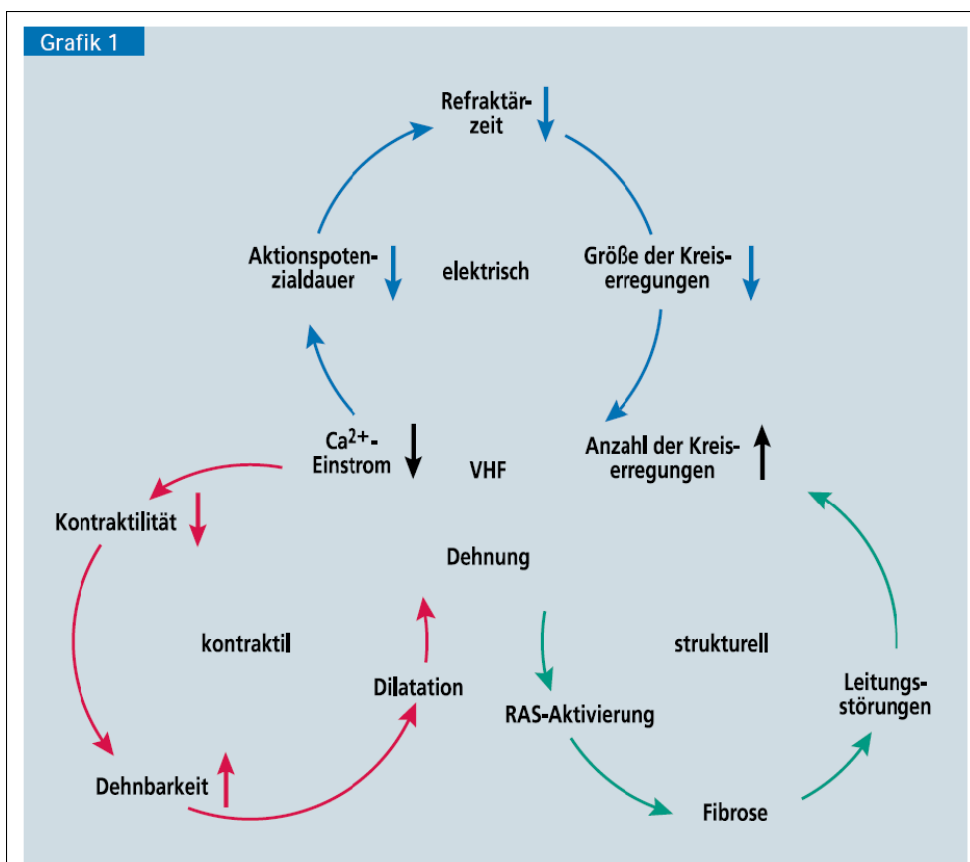
Die gefürchtetste Komplikation des Vorhofflimmerns geht durch die Bildung von Vorhoffthromben mit der Entstehung arterieller Embolien aus (71). So ist das Vorhofflimmern die wichtigste Ursache für einen ischämischen Apoplex bei Patienten über dem 75. Lebensjahr (72). Neben dem 5-fach erhöhten Schlaganfallrisiko besteht zusätzlich ein 4-fach erhöhtes Herzinsuffizienzrisiko und ein 2-fach erhöhtes Risiko für Demenz und Tod (61).

Über den pathophysiologischen Mechanismus von Vorhofflimmern wird seit über 100 Jahren diskutiert, und die Diskussion ist noch nicht abgeschlossen. Die zwei wesentlichen Hypothesen sind (73):

- eine sich selbst perpetuierende, aus multiplen Kreiserregungen bestehende Arrhythmie („multiple wavelet reentry“)(74)
- fokale Vorhofaktivierungen, die aufgrund ihrer hohen Frequenz nicht auf alle Vorhofabschnitte 1:1 fortgeleitet werden können („fibrillatory conduction“) (75)

Eine wesentliche Eigenschaft von VHF ist, wie sich in Tierexperimenten zeigt, dass sich künstlich hervorgerufenes VHF selbst erhält und im Laufe der Zeit immer weniger auf pharmakologische Kardioversionsversuche anspricht. Die derzeitigen Theorien über die Pathophysiologie des VHF werden in einem Kleeblattmodell (65) **Abb. 4** dargestellt, das die elektrischen, kontraktile und strukturellen Veränderungen bei VHF zusammenfasst. Die hochfrequente atriale Erregung beim VHF induziert als ersten Schritt innerhalb von Tagen ein reversibles elektrisches Remodeling (blaues Kleeblatt). Remodeling ist definiert als alle während des Vorhofflimmerns auftretenden Phänomene, die zur Aufrechterhaltung von VHF beitragen (76). Die frequenzbedingte Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms während schneller Stimulation verursacht eine Ca^{2+} -Überladung der atrialen Myokardzellen. Damit verbunden ist die Inaktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Einstroms (77-79). Zusätzlich kommt es zur verminderten Expression des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, zur Erhöhung des einwärts gleichrichtenden K^+ -Stroms (IK1) (80,81), und des acetylcholinaktivierten K^+ -Stroms (IK,Ach) (80,82) sowie zur Verminderung des transienten K^+ -Auswärtsstroms (83,84). In Summe resultiert

daraus eine Verkürzung der Aktionspotenzialdauer (APD) (78,85,86) und der Refraktärzeit (87). Dies stabilisiert das VHF, indem die Erregungswellenlänge verkürzt wird. Andererseits wird durch die schnelle Folge an Erregungen auch der schnelle Na^+ -Einstrom zunehmend inaktiviert, was wiederum die Leitungsgeschwindigkeit sinken lässt („Vorhofflimmern bedingt Vorhofflimmern“) (85). Der verminderte Ca^{2+} -Einstrom hat auch eine Hypokontraktilität zur Folge (kontraktiler Remodeling; rotes Kleeblatt) (88). Diese Schwäche der Vorhofmuskulatur begünstigt neben einer Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit und der damit verbundenen thromboembolischen Komplikationen eine Überdehnung der Vorhöfe. Diese zunehmende Vergrößerung der Vorhöfe setzt schlussendlich strukturelle irreversible Umbauprozesse in Gang (strukturelles Remodeling; grünes Kleeblatt) (65). Es kommt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) verbunden mit Fibrosierung. Dies führt zu einer nachhaltigen Reizleitungsstörung in den Vorhöfen und unterstützt die Stabilisierung und das Neuauftreten von Kreis-erregungen.



Aus Schotten; Dtsch. Ärzteblatt 25:1743

Abbildung 4: Kleeblattmodell der Entstehung, Aufrechterhaltung und Verstärkung von Vorhofflimmern

Die Therapie des Vorhofflimmerns richtet sich nach den Empfehlungen der ACC, AHA und ESC und verfolgt verschiedene Ziele. Erste Maßnahmen bei Vorhofflimmern mit schneller Überleitung sind eine Normalisierung der Kammerfrequenz (mit Digitalis, β -Blocker oder Verapamil) sowie eine Antikoagulation zur Thrombembolieprophylaxe (89). An zweiter Stelle steht der Versuch einer medikamentösen oder elektrischen Kardioversion zur Konversion des Vorhofflimmerns in einen Sinusrhythmus (69). Daneben ist die kausale Behandlung der Grunderkrankung von Bedeutung (90). In klinischer Erprobung sind außerdem eine Reihe von nichtmedikamentösen Verfahren zur Rezidivprophylaxe wie die Pulmonalvenenablation oder die zirkumferentielle Hochfrequenzablation von Ektopieherden im Vorhof.

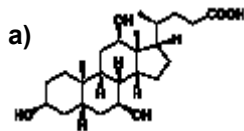
1.4 Gallensäuren

1.4.1 Physiologie

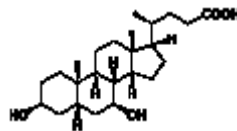
Gallensäuren gehören zur Gruppe der Steroide und sind ein wichtiges Endprodukt des Cholesterinstoffwechsels. Die in der Leber produzierten Gallensäuren unterstützen einerseits die Fettverdauung im Darm und andererseits ermöglichen sie durch Mizellenbildung fettlösliche Stoffe aus dem systemischen Kreislauf in den Darm abzuführen.

Bildung der Gallensäuren:

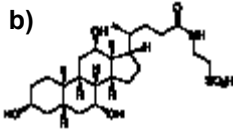
In den Hepatozyten der Leber wird Cholesterin durch Hydroxylierungsreaktionen und oxidative Verkürzung zu den primären Gallensäuren abgebaut. Die wichtigsten Gallensäuren sind Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA). Diese liegen in der Galle nicht frei, sondern als konjugierte Gallensäuren vor. Ein zytoplasmatisches Enzym ist dafür verantwortlich, dass die beiden primären Gallensäuren mit Taurin oder Glycin konjugiert werden. Aufgrund des alkalischen pH-Wertes der Galle liegen die Gallensäuren hauptsächlich als deren Anionen in Form von Gallensalzen vor. Die konjugierten Gallensäuren Taurocholsäure (TCA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) sowie Glycocholsäure (GCA) und Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) werden im Darm von Bakterien zu sekundären Gallensäuren umgewandelt. Die tertiären Gallensäuren entstehen durch Umwandlung der sekundären Gallensäuren in der Leber oder im Darm. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Synthese der Gallensäuren ist die Hydroxylierung des Cholesterins in der 7 α -Position durch eine Cytochrom-P₄₅₀-abhängige, mischfunktionelle Oxidase der Hepatozyten. Deren Aktivität wird durch die über das Pfortaderblut zur Leber zurückfließende Menge der Gallensäuren reguliert. Durch dieses negative Feedback wird der Gallensäurepool relativ konstant gehalten. **Abb. 5** zeigt die wichtigsten Gallensäuren.



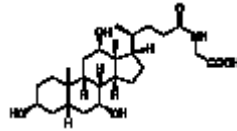
Cholsäure



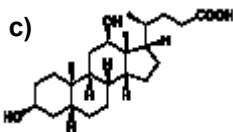
Chenodeoxycholsäure



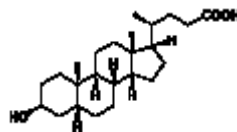
Taurocholsäure



Glycocholsäure



Desoxycholsäure



Lithocholsäure

Abbildung 5: a) Primären Gallensäuren b) Konjugierten Gallensäuren c) Sekundären Gallensäuren

Zusammensetzung der Galle:

Galle ist eine wässrige Lösung von Gallensäuren (67%), Phospholipiden (22%), Proteinen (4,5%), Cholesterin (4%), konjugiertem Bilirubin (0,3%) und Elektrolyten.

Sekretion der Galle:

Die von den Hepatozyten gebildete Galle wird in die zwischen ihnen verlaufenden Kanalikuli sezerniert (kanalikuläre Galle). Die Galle läuft zum Periportalfeld und von hier zwischen den Läppchen in den Ductus interlobulares (duktuläre Galle). Hier finden Resorptions- und Sekretionsprozesse mit Modifizierung der Galle statt. In der Gallenblase wird die Galle nochmals konzentriert und bevorratet. Die Ausscheidung in den Darm erfolgt dann nach physiologischen Reizen (Nahrungsaufnahme) durch Vermittlung verschiedener Hormone.

Enterhepatischen Kreislauf:

Der Gallensäurepool von ca. 2-5 g durchläuft den enterohepatischen Kreislauf drei- bis zehnmal täglich. Nach der Dekonjugation der Gallensäuren durch Bakterien erfolgt eine fast vollständige Resorption im terminalen Ileum und Aufnahme in die Leber aus dem Pfortaderblut. Nur ca. 0,5 g täglich werden über den Stuhl ausgeschieden und müssen deshalb neu synthetisiert werden.

Aufgaben der Galle:

Die Galle ist einerseits verantwortlich für die Emulgierung von Lipiden im Dünndarm durch die Bildung von Mizellen sowie für die Aktivierung der Pankreaslipase. Andererseits ist sie für die Ausscheidung von überflüssigem Cholesterin, Phospholipiden und fettlöslichen Medikamenten in Form von Mizellen verantwortlich. Dabei umhüllen Gallensäuren hydrophobe Substanzen und richten ihren eigenen hydrophilen Teil nach außen. Dadurch ist die Mizelle im wässrigen Milieu der Galle löslich. Zusätzlich ist die Galle für die Hemmung der Magensekretion und die Cholesterinsynthese im Dünndarm zuständig.

1.4.2 Pathophysiologie

1.4.2.1 Cholestase

Als Cholestase bezeichnet man den Rückstau von Gallensäuren, Bilirubin und anderen Bestandteilen der Galle durch einen verminderten oder fehlenden Abfluss der Galle in den Darm. Man unterscheidet prinzipiell zwei Formen. Auf der einen Seite die extrahepatische Cholestase, bei der in den meisten Fällen eine mechanische Behinderung in den Gallenwegen durch Steine, Tumoren oder narbige Einziehungen vorliegt. Auf der anderen Seite können Virushepatitiden, Arzneimittel und Giftstoffe Ursache einer intrahepatischen Cholestase sein.

Die klinischen Leitsymptome sind Ikterus, Pruritus, Braunverfärbung des Urins, entfärbter heller Stuhl, Xanthelasmen, Steatorrhoe, Meteorismus, Gewichtsverlust und Hypovitaminosen. Die Diagnose einer Cholestase kann sonographisch und laborchemisch gestellt werden. Im Labor ist eine Erhöhung des direkten Bilirubins, der alkalischen Phosphatase sowie der Gamma-GT nachweisbar.

1.4.2.2 Intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP)

Die intrahepatische Schwangerschaftscholestase betrifft zirka 0,1 % - 1,5 % der schwangeren Frauen in Europa, wobei der Anteil in südamerikanischen Ländern wie Bolivien oder Chile bis auf 15,6 % ansteigt. Vorwiegend treten die typischen klinischen Symptome wie zum Beispiel Pruritus im letzten Trimenon der Schwangerschaft auf (91-96). Für die Mütter ist die intrahepatische Schwangerschaftscholestase bis auf den unangenehmen Pruritus weitgehend ungefährlich. Für den ungeborenen Fetus allerdings stellt sie eine große Gefahr dar. Sie trägt wesentlich zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität des Feten bei und führt vorwiegend zu einer gesteigerten Frühgeburtenrate (19-60%), fetalen Stresssituationen (22-33%) und intrauterinen Tot (2%) (92,96-98). Die Ursachen für die intrahepatische Schwangerschaftscholestase sind weitgehend unbekannt, so wird einerseits eine familiäre Veranlagung wie auch eine hormonelle Ursache diskutiert (96). Bei der Intrahepatischen Schwangerschaftscholestase steigen die Gallensäurespiegel um das 10 bis 100 fache an und die physiologische Zusammensetzung der Gallensäuren ist verändert. Die Cholsäure ist dabei stärker erhöht als die Chenodeoxycholsäure, was zu einer Veränderung des Verhältnisses der beiden Gallensäuren führt. Außerdem ist das Verhältnis der Glycin-konjugierten Gallensäuren zu den Taurin-konjugierten Gallensäuren erhöht. Erste Behandlungsversuche haben gezeigt, dass die Therapie mit Ursodeoxycholsäure (UDCA) die physiologischen Beziehungen zwischen den Gallensäuren wiederherstellt und dass die fetalen Überlebenschancen steigen (98,99). Die intrahepatische Schwangerschaftscholestase stellt somit ein interessantes Modell dar um die Effekte von hohen Gallensäurespiegeln auf den Kardiomyozyten zu untersuchen. Aufgrund der klinischen Beobachtungen gibt es Hinweise, dass erhöhte Gallensäurewerte bei der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase zu Herzrhythmusstörungen der Feten und dadurch zu einer erhöhten intrauterinen Komplikationsrate führen (100-102). Es konnte auch schon an in vitro Tiermodellen gezeigt werden, dass Gallensäuren an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten Arrhythmien auslösen können (103-105). Vor allem für die primär konjugierte Gallensäure TCA, welche bei der ICP erhöht ist, konnte in in-vitro Versuchen an isolierten Kardiomyozyten verschiedene Effekte auf die Kontraktion nachgewiesen werden (99,104-107).

1.5 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen geklärt werden.

- 1.) Zeigen Gallensäuren auch am adulten humanen Vorhofmyokard arrhythmogene Effekte?
- 2.) Zeigen sich durch die Zugabe von Gallensäuren funktionelle Effekte am adulten humanen Vorhofmyokard?
- 3.) Gibt es zwischen den Gallensäuren einen Unterschied hinsichtlich ihrer arrhythmogenen Potenz? Ist diese von der Konjugation der Gallensäuren abhängig?
- 4.) Besteht eine Frequenzabhängigkeit der arrhythmogenen Effekte von Gallensäuren?
- 5.) Führen Gallensäuren am humanen Herzmuskelgewebe zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer und dadurch zur Entstehung von Arrhythmien?
- 6.) Welche Rolle spielt der L-Typ-Kalziumkanal bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren?
- 7.) Welche Rolle spielt der Natrium/Kalzium-Austauscher bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren?

1.6 Hypothesen

- A) Gallensäuren führen in pathophysiologischen Konzentrationen zu Arrhythmien im humanen atrialen Vorhofmuskelgewebe.

- B) Gallensäuren bewirken am humanen Myokardgewebe eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer und aufgrund der dadurch erhöhten Refraktärzeiten wird die Entstehung von Arrhythmien gefördert.

- C) Die Aktivierung des L-Typ-Kalziumkanals durch BayK8644 führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums und aufgrund dessen zu einer Steigerung der Arrhythmien.

- D) Die Hemmung des L-Typ-Kalziumkanals durch Diltiazem führt zu einer Verminderung des intrazellulären Kalziums und daher zu einer Senkung der arrhythmogenen Effekte am humanen Vorhofmyokard.

- E) Die Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers im „reverse mode“ durch KB-R7943 führt zu einer Reduktion der Arrhythmien aufgrund einer Verminderung des intrazellulären Kalziumangebotes.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Gewebe

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten Experimente wurden an isolierten humanen Vorhoftrabekeln durchgeführt. Das Vorhofgewebe stammte von Patienten, die sich einer Bypass-Operation und/oder einer Herzklappenersatz-Operation unterziehen mussten. Intraoperativ, während des Kanülierungsschrittes, der dem Anschluss des Patienten-Kreislaufes an die Herz-Lungen-Maschine dient, wurde der dreieckige obere Teil des rechten Vorhofes (rechtes Herzohr, Auricula dextra), in dem sich Trabekel (Mm. pectinati) befinden, herausgeschnitten. Die Größe des gewonnenen Herzohres betrug ca. 6-12mm x 6-12mm. **Abb. 6** zeigt ein rechtes Herzohr.

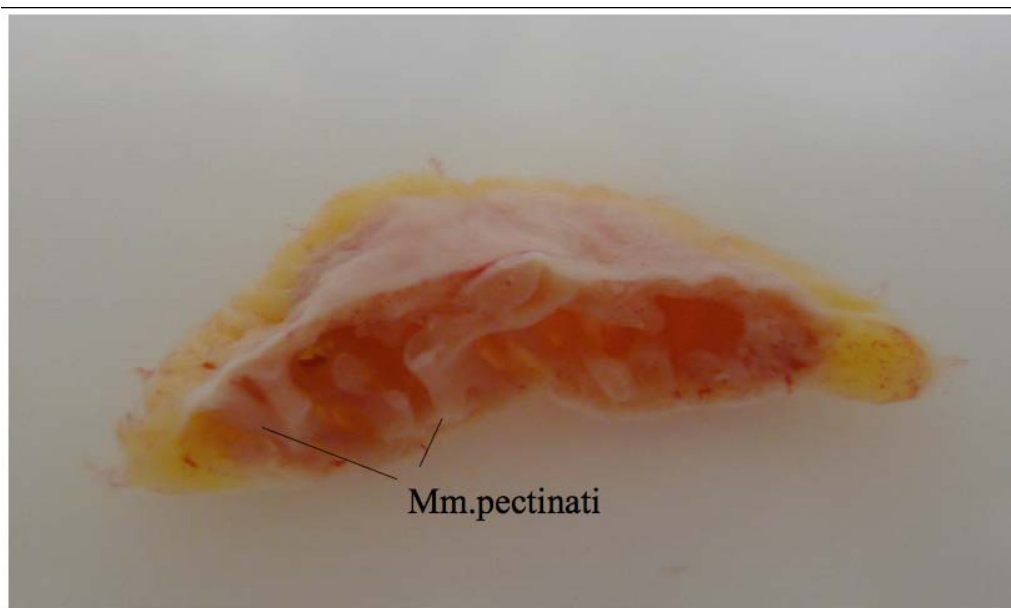


Abbildung 6: Herzohr des rechten Vorhofes.

Die Operationen wurden an der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie an der Universitätsklinik Graz durchgeführt. Alle Patienten gaben ihre Einwilligung zur Entnahme und Verwendung von Myokardproben für wissenschaftliche Zwecke. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen

Universität Graz geprüft und genehmigt. **Tab. 2** zeigt einen Überblick über die Daten aller Patienten, denen Vorhofgewebe entnommen wurde.

Operativer Eingriff	Patientenanzahl	Mittleres Alter (+/-STAB)	W	M	EF in % (+/-STAB)	SR	Kein SR
CABG	31	67,75 (9,17)	12	19	55,4 (4,98)	30	1
AKE	13	57,54 (15,31)	5	8	53,10 (8,79)	13	0
CABG + AKE	15	72,53 (11,32)	6	9	48,93 (4,87)	14	1
Summe	59	65,81 (13,76)	24	35	53,10 (6,58)	57	2

Tabelle 2 Überblick Patientendaten: CABG...Coronary artery bypass graft; AKE...Aortenklappenersatz; EF...Ejektionsfraktion; SR...Sinusrhythmus

2.2 Transport und Präparation

Verwendete Materialien: Einwegbecher, Schere, Pinzette, Mikro-Schere, Mikro-Pinzette, Einwegpipette, Stereomikroskop.

2.2.1 Kardioplegie

Um das Gewebe vor hohen Energieverlusten während des Transportes ins Labor und der Präparation zu schützen, wurde es nach der Entnahme sofort in eine kardioplege Lösung gelegt. Zur Herstellung dieser Lösung wurde Tyrode mit 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) versetzt. Die BDM-Konzentration betrug 30 mmol/l. BDM ist eine Phosphatase, die die Querbrückeninteraktionen zwischen Aktin und Myosin reversibel hemmt (108,109) und die Ansprechbarkeit der kontraktilen Proteine für Kalzium herabsetzt (110). Desweiteren wird durch BDM in höheren Konzentrationen (> 5 mmol/l) der $[Ca^{2+}]_i$ - Transient reduziert (110,111). Die Sensitivität von Troponin C für Kalzium wird dagegen nicht vermindert (110).

Auch die Aufnahme von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) wird durch BDM nicht reduziert (112). Ebenfalls unbeeinflusst bleiben Membranpotential und

der Verlauf von Aktionspotentialen (111). BDM wirkt während Transport, Präparation und Lagerung des Myokards kardioprotektiv.

Bei der Präparation von Myokardgewebe kommt es aufgrund des mechanischen Stresses z.T. zu einem hohen Ca^{2+} -Einstrom in das Gewebe. BDM verhindert hier die Entstehung einer Kontraktur (113). Außerdem wird durch die Hemmung der Querbrückeninteraktion der ATP-Verbrauch durch Myosin reduziert. Die Inhibition der Querbrückeninteraktion durch BDM ist konzentrationsabhängig. Die myokardiale Kraftentwicklung wird bei einer BDM-Konzentration von 30 mmol/l vollständig blockiert (109). Somit kann eine kardioplege BDM-Lösung die Funktion der Muskelstreifenpräparate insbesondere bei zusätzlicher Kühlung schützen (114). Die mit BDM versetzte Tyrodelösung wurde zur Oxygenierung und pH-Wert-Einstellung auf pH 7,4 mit Carbogen (Oxymix) (95% O_2 , 5% CO_2) begast.

2.2.2 Transport

Der Transport des Vorhofgewebes ins Labor erfolgte unmittelbar nach der Entnahme in einem sterilen Einwegbecher. Dieser enthielt mit Carbogen präoxygenierte, BDM-haltige Tyrode. Die Zeitspanne von der Entnahme bis zum Eintreffen im Labor betrug ca. 5 Minuten.

2.2.3 Präparation der Muskelstreifen

Die Isolierung der Muskelstreifen aus dem rechten Herzohr erfolgte durch vorsichtige Präparation mit mikrochirurgischen Pinzetten und Scheren in kardiopleger Lösung. Unter Verwendung eines Stereomikroskopes mit zehnfacher Vergrößerung wurde das Gewebe nach möglichst langen und unverzweigten Trabeculae carneae durchsucht. Es wurden insbesondere Trabekel mit einer Querschnittsfläche $< 0,7 \text{ mm}^2$ gesucht (das bedeutet bei rundem Querschnitt einen Durchmesser unter 1mm). Bei einer Querschnittsfläche von mehr als $0,7 \text{ mm}^2$ besteht die Gefahr, dass die Trabekel im Inneren hypoxisch werden (115,116). Die Trabekel wurden mit mikrochirurgischen Scheren frei präpariert und mittels einer Transferpipette aus der Präparationsschale in einen sterilen Einwegbecher mit präoxygenierter BDM-haltiger Tyrodelösung überführt. Bei der Isolation wurde stets darauf geachtet, die Muskelstreifenpräparate nicht zu dehnen oder

anderweitig zu traumatisieren. Trotz erschwerter Präparationsbedingungen am unfixierten Präparat, wurde auf eine Fixierung des Gewebestückes mit Nadeln am Grund der Präparierschale verzichtet. Danach wurden Muskelstreifen mindestens 10 Minuten in BDM-haltiger Tyrodelösung gekühlt gelagert, damit sie sich von dem mechanischen Stress der Präparation erholen konnten.

2.3 Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktion

2.3.1 Beschreibung des Messstandes

Abb. 7 zeigt die wichtigsten Komponenten der Anlage zur Messung der kontraktiven Funktion von Trabekeln, **Abb. 8** zeigt das Organbad im Detail. Die Anlage ermöglicht die simultane Messung der isometrischen Kontraktion von vier Herzmuskelstreifenpräparaten. Sie wurde in Kooperation mit der Fa. Scientific Instruments, Heidelberg, aufgebaut. Die wichtigsten Bestandteile der Anlage sind in **Tab 3** aufgelistet.



Abbildung 7: Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktion: (1) Rollenpumpe, (2) Stimulationseinheit, (3) Vorratsgefäße, (4) Computerkontrolleinheit, (5) Organbäder, (6) Thermo-schreiber, (7) Heizung und Thermostat.

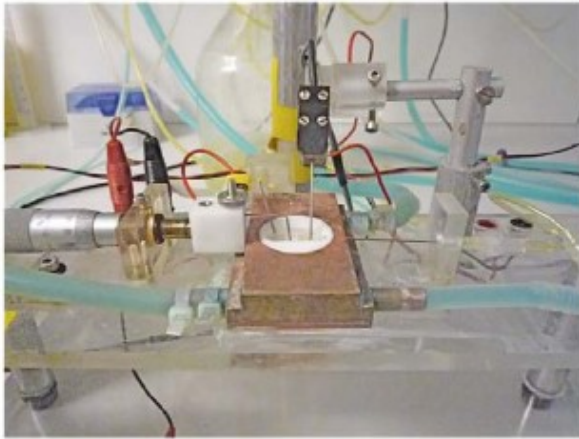


Abbildung 8: Organbad des Messstandes.

Bestandteil	Herstellungsfirma
Peristaltische Rollenpumpe	Fa. Ismatec, Typ ISM853
Mikrometerschraube	Fa. Mituyo, Japan
4-Kanal-Thermoschreiber	Fa. Graphtec, Mark VII WR3320
Basisgerät zur Messung der Kraft	Fa. Graphtec, Mark VII WR3320
Kraftaufnehmer	Fa. SI Heidelberg, Typ OPT1L
Stereomikroskop	Fa. SI Heidelberg, Typ KG3
Stimulationseinheit	Fa. Olympus, Taiwan, Typ SD30
Umwälzthermostat	Fa. SI, Heidelberg, Typ STM1
Thermometer	Fa. Conrad Electronic, Typ Voltcraft 302 K/J

Tabelle 3: Auflistung der Bestandteile des Messstandes

Abb. 9 zeigt schematisch und exemplarisch einen der vier Kreisläufe der Anlage. Das Organbad aus Teflon (Länge x Breite x Tiefe = 21 mm x 8 mm x 3 mm) stellte das zentrale Element der Versuchsanordnung dar. Durch peristaltische Rollenpumpen angetrieben wurde Tyrodelösung über Schläuche von einem Vorratsgefäß zum Organbad geleitet und von hier aus zurück ins Vorratsgefäß gepumpt. Bei einer Förderleistung der Pumpe von 5,7 ml/min wurde das Organbadvolumen (0,5 ml) so etwa alle 5 Sekunden ausgetauscht. Das Vorratsgefäß sowie die Schläuche waren doppelwandig und wurden im äußeren Lumen im Gegenstromprinzip mit Wasser auf 37°C erwärmt. Die Tyrodelösung wurde über eine Fritte im Vorratsgefäß ständig mit Carbogen begast. Zur

Reduktion der wärmebedingten Flüssigkeitsverdunstung wurde das Vorratsgefäß abgedeckt. Links neben dem Organbad war eine Mikrometerschraube und rechts ein optomechanischer Kraftaufnehmer installiert. Dieser erlaubte bei einem Wegbedarf von maximal 30 µm annähernd isometrische Versuchsbedingungen. Kraftaufnehmer und Mikrometerschraube reichten über eine Kanülenverlängerung bis ins Organbad. An beiden Kanülen war je eine 0,1 mm dünne Nadel angebracht. Auf diesen feinen Nadeln wurde der Muskelstreifen fixiert. Der Kraftaufnehmer war mit der Stimulationseinheit elektrisch verbunden und bildete zusammen mit der linken Aufhängung die Elektroden zur Stimulation der Muskelstreifen. Die vom Kraftaufnehmer ausgehenden Signale wurden sowohl auf einem 4-Kanal-Thermoschreiber als auch auf einem Personal Computer mit einem dafür entwickelten Modul der Software Labview® erfasst.

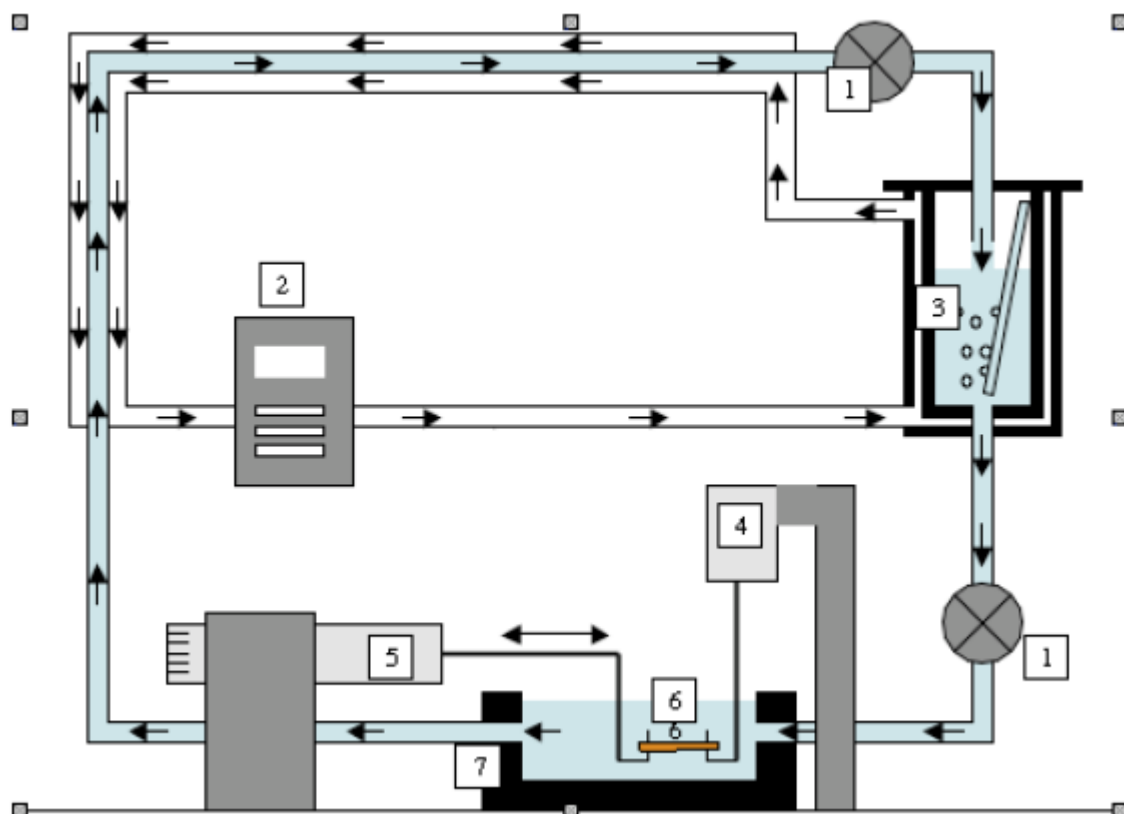


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Kreislaufs der Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktionen: (1) Rollenpumpen, (2) Heizung und Thermostat, (3) Doppelwandiges Vorratsgefäß mit Gasfritte, (4) Mechanischer Kraftaufnehmer, (5) Verstellbare Mikrometerschraube zur Abstandsregulierung der beiden Platinnadeln, (6) Herzmuskelstreifen, (7) Organbad.

2.3.2 Versuchsablauf

Vor Beginn des Versuches wurde das System des Pumpkreislaufs mehrfach mit Aqua dest. gespült. Zunächst wurden die auf 37°C erwärmten Reservoirgefäße mit jeweils 100 ml Tyrode-Lösung gefüllt. Die Pumpen wurden eingeschaltet, bis alle zu den Organbädern führenden Schläuche entlüftet waren. Die Trabekel wurden mit einer Transferpipette ohne Mitnahme von BDM-haltiger Tyrode-Lösung in die Organbäder überführt. Dort wurden sie unter Sicht durch ein Stereomikroskop mit zehnfacher Vergrößerung mit zwei mikrochirurgischen Pinzetten möglichst spannungsfrei („slack length“) an den Nadeln befestigt. Während dieses Vorgangs war die Zirkulation unterbrochen. Anschließend wurden die Pumpen wieder eingeschaltet. Die nach dem Einhängen ins Organbad von den Muskelstreifen ausgehende Spannung wurde als diastolischer Nullpunkt festgelegt.

Die Ca^{2+} -Konzentration der Tyrode-Lösung ($[\text{Ca}^{2+}]$) betrug initial 0,2 mmol/l. Sie wurde schrittweise auf 2,5 mmol/l erhöht. Durch die langsame Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration wurde einer Kontraktur des Muskels vorgebeugt. Unterdessen wurde mit der elektrischen Stimulation der Muskelstreifen begonnen. Bei einem Rechtecksignal von 5 ms und einer Frequenz von 1 Hz wurde die elektrische Spannung solange gesteigert, bis der Muskel erstmalig sichtbar kontrahierte (ca. 2-5 V). Dann wurde die Spannung um 20% dieser Schwellenspannung erhöht und für den gesamten Versuchsablauf bei diesem Wert belassen. Nach der Stabilisierung der Kontraktionskraft wurden die Trabekel schrittweise bis zur Länge mit der maximalen Kraftentwicklung (L_{max}) vorgedehnt. Mit Erreichen der maximalen Kraftentwicklung (L_{max}) begann das Messprotokoll. Vor Zugabe der diversen pharmakologischen Substanzen wurde eine Aufzeichnung der schlagenden Trabekel bei 1 Hz und bei 0,5 Hz für jeweils 1 Minute durchgeführt um einen unverfälschten Ausgangswert zu bekommen.

Abb. 10 zeigt eine Originalregistrierung bis zum Erreichen der maximalen Kraftentwicklung.

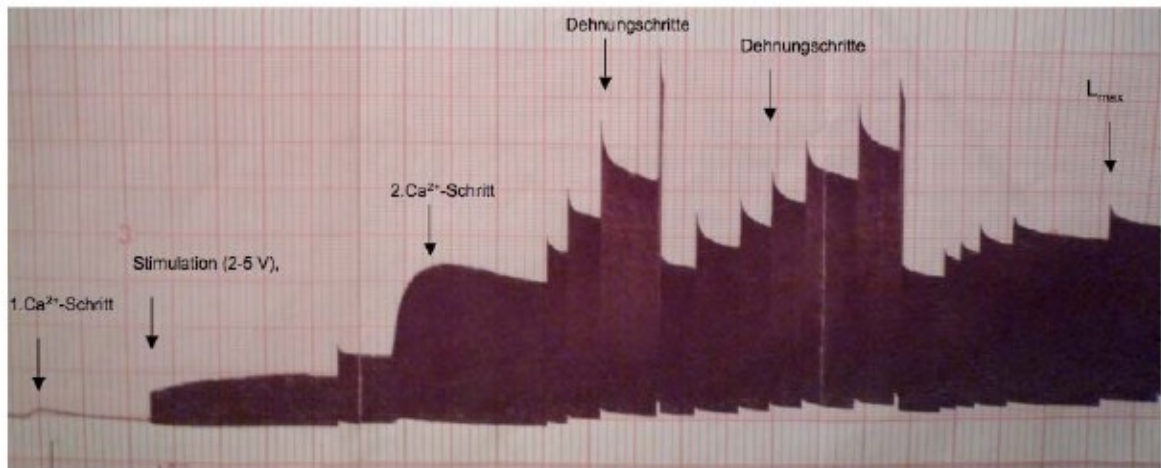


Abbildung 10: Originalregistrierung - Darstellung der Kraftzunahme bis zum Erreichen von L_{max} . 1. Ca^{2+} -Schritt: $100\mu l$; 2. Ca^{2+} -Schritt: $130\mu l$

2.4 Anlage zur Messung der absoluten Refraktärzeiten

Für die Messung der absoluten Refraktärzeiten der mit TCA inkubierten Vorhofmuskelstreifen wurde ein Stimulationsimpulsgenerator der Anlage zur Messung der isometrischen Kontraktion hinzu geschaltet. Mithilfe dieses Stimulationsimpulsgenerators konnte man über die indirekt messbare absolute Refraktärzeit auf das direkt am multizellulären Gewebe nicht messbare Aktionspotenzial schließen.

2.5 Lösungen und Substanzen

2.5.1 Tyrodelösung

Der Name der Lösung geht auf den amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode zurück. Im Rahmen dieser Arbeit entsprach die Tyrodelösung einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung. Als energetisches Substrat in der Tyrodelösung wurde Glukose in einer Konzentration von $11,2\text{ mmol/l}$ verwendet. Zusätzlich wurde diese Tyrodelösung noch mit 5 I.E. Insulin versetzt.

NaCl	KCl	NaHCO ₃	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	Glukose
127 mM	2,3 mM	25 mM	0,6 mM	1,3 mM	0,2 mM	11,2 mM

Tabelle 4: Standard Glukosetyrode

2.5.2 BDM-Tyrodelösung

Der normalen Standard Glukosetyrode wurde 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) in einer Konzentration von 30 mmol/l zugesetzt.

2.5.3 Pharmakologische Substanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

BayK8644:

BayK8644 ist ein Dihydropyridin-Derivat, das als Aktivator des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals gilt und einen nachgewiesenen positiv inotropen Effekt an Kardiomyozyten von Meerschweinchen, Ratten und Kälbern hat. (117,118). Auch am humanen Vorhofmyokard zeigt BayK8644 bei einer Konzentration von 1 μM eines 1 molaren Stammes einen positiv inotropen Effekt von zirka 20 bis 30 %. BayK8644 besitzt ein Molekulargewicht von 356.3 g/mol und wurde in DMSO gelöst. Die 1 molare Stammlösung wurde bei -20°C gelagert. Um eine Organbadkonzentration von 1 μM zu erreichen, wurden 100 μl der Stammlösung in 100 ml Tyrode-Lösung pipettiert.

Diltiazem:

Diltiazem ist ein Blocker des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Es hat ein Molekulargewicht von 414 g/mol und wurde in Aqua dest. gelöst um eine 10^{-2} Stammlösung zu erhalten. Um eine Organbadkonzentration von 1 μM zu erreichen, wurden 10 μl der Stammlösung in 100 ml Tyrode-Lösung pipettiert.

KB-R7943:

KB-R7943 hemmt den sarkolemmalen $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX). Von der kompletten Blockade des NCX im „reverse mode“ wurde bei einer Konzentration von 10 μM berichtet (119). Die IC_{50} von KB-R7943 beträgt 0,3-2,4 μM . Bei einer eingesetzten Konzentration von 5 μM KB-R7943 kann von einer selektiven Blockade des NCX im „reverse mode“ (Na^{+} -Efflux / Ca^{2+} -Influx) ausgegangen werden (120). KB-R7943 (MW: 427,5 g/mol, Bestellnummer: 1244) wurde von der Fa. Tocris (Ellisville, USA) in 50-mg-Einheiten bezogen. Es wurde in DMSO gelöst und als 10^{-2} molare Stammlösung bei -20°C gelagert.

Um eine Organbadkonzentration von 5 μM zu erreichen, wurden 50 μl der Stammlösung in 100 ml Tyrode-Lösung pipettiert.

2.6 Versuchsprotokolle

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu erreichen wurden an der Muskelstreifenanlage, welche 4 Kanäle besitzt, immer 4 Herztrabekel eines Herzohres gleichzeitig gemessen. Die Muskelstreifen wurden zunächst schrittweise gedehnt bis zum Erreichen der Länge, bei der sie ihre maximale Kraftentwicklung zeigten (L_{max}). Danach zeichnete man die aktuelle Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik sowie die einzelnen Muskelkontraktionen bei 1 Hz und 0.5 Hz für jeweils eine Minute mit einem 4-Kanal-Thermoschreiber als auch auf einem Personal Computer mit einem dafür entwickelten Modul der Software Labview® auf. Die Aufzeichnungen erfolgten in verschiedenen Schreibergeschwindigkeiten (500, 100, 50 mm/sec) des 4-Kanal-Thermoschreibers. Erst danach starteten die eigentlichen Experimente.

2.6.1 Messprotokoll 1:

Beim 1. Messprotokoll wurden die vier im Menschen am häufigsten und relevantesten vorkommenden Gallensäuren miteinander verglichen. Dazu gehören die Taurocholsäure (TCA), die Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA), die Glycocholsäure (GCA) und die Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA).

Nach Erreichen von L_{max} und der vorher beschriebenen Aufzeichnungen wurde jeweils eine der oben genannten Gallensäuren in ein Organbad mit einem Herzmuskelstreifen hinzugegeben. Die Dosis-Wirkungskurve wurde mit einer Konzentration von 10 μ M bis 1 mM durchgeführt. Nach jeweils 5, 10 und 15 Minuten wurden die aktuelle Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik sowie die einzelnen Muskelkontraktionen bei 1 Hz und 0.5 Hz für jeweils eine Minute mit einem 4-Kanal-Thermoschreiber als auch auf einem Personal Computer mit einem dafür entwickelten Modul der Software Labview® aufgezeichnet.

Die Aufzeichnungen erfolgten dabei in verschiedenen Schreibergeschwindigkeiten (500, 100, 50 mm/sec) des 4-Kanal-Thermoschreibers. Am Ende des Experimentes erfolgte noch eine wash-out Phase mit 100 ml Tyrode (2.5 mM Ca^{2+}).

2.6.2 Messprotokoll 2:

Beim 2. Messprotokoll wurde der Effekt des L-Typ-Ca²⁺-Kanal Aktivators BayK8644, des L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Blockers Diltiazem und des Na⁺/Ca²⁺-Kanal-Blockers KB-R7943 auf funktionelle und arrhythmogene Effekte von TCA miteinander verglichen. Das Messprotokoll wurde abermals mit 4 Herzmuskelstreifen durchgeführt. Trabekel 1 war der Kontrollmuskel, bei dem eine normale Dosis-Wirkungskurve mit der Gallensäure TCA gemessen wurde. Trabekel 2 wurde mit 1µM BayK8644 für 30 Minuten inkubiert, Trabekel 3 wurde mit 1µM Diltiazem ebenfalls für 30 Minuten inkubiert und Trabekel 4 wurde mit 5µM KB-R7943 auch für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde bei den drei Trabekeln jeweils eine Dosis-Wirkungskurve mit TCA durchgeführt. Die Konzentrationsschritte betragen 10µM, 30µM, 100µM, 300µM und 1mM. Nach einer 30 minütigen Inkubationsphase und des weiteren nach jedem Konzentrationsschritt wurden die aktuelle Kontraktionskraft und Kontraktionskinetik sowie die einzelnen Muskelkontraktionen bei 1 Hz und 0.5 Hz für jeweils eine Minute gemessen.

2.6.3 Messprotokoll 3:

Beim 3. Messprotokoll wurden die absoluten Refraktärzeiten in [ms] der einzelnen Herzmuskelstreifen durch Ankoppelungsversuche mit stetig abnehmendem Stimulationsintervall nach Inkubation mit Taurocholsäure gemessen. Zu Beginn wurden die einzelnen Trabekeln wieder bis zum Erreichen des „steady state“ bei L_{max} vorgedehnt. Danach wurde der Stimulationsimpulsgenerator an die Versuchsanordnung angeschlossen. Beginnend bei 600 ms wurde in 10 ms Schritten jeweils die Stimulationsintervalldauer kürzer und somit näher an den vorhergehenden Schlag angekoppelt, bis der letzte ausgelöste Impuls auf nicht mehr erregbares Herzmuskelgewebe traf.

Dies führte dann zu keiner weiteren Kontraktion der Herzmuskelstreifen und spiegelt somit die absolute Refraktärzeit dieser wieder. Dieser Versuchsablauf wurde jeweils einmal vor Inkubation mit der Gallensäure TCA sowie bei 300µM und 1000µM TCA durchgeführt.

2.7 Auswertung

2.7.1 Computergestützte Datenerhebung

Jeder Versuch wurde mit Hilfe der Software LabView® auf einem PC aufgezeichnet. Dabei wurden für jede Kontraktion folgende Parameter gemessen:

F	entwickelte Kraft (Force), ($F = ST - DT$)	[mN/mm ²]
DT	diastolische Kraft (diastolic tension)	[mN/mm ²]
ST	systolische Kraft (systolic tension)	[mN/mm ²]
TPT	Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraft (time to peak tension)	[ms]
RT ₅₀	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation (relaxation time)	[ms]
TT ₉₀	Zeit von Beginn bis zur 90%igen Relaxation (total time)	[ms]
dF/dt _{max}	maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit	[mN/mm ² /s]
dF/dt _{max}	maximale Relaxationsgeschwindigkeit	[mN/mm ² /s]

Zur besseren Vergleichbarkeit von Trabekeln unterschiedlichen Durchmessers wurden alle Daten der Kraft auf die Querschnittsfläche bezogen ([mN/mm²]).

2.7.2 Manuelle Auswertung der Originalregistrierung

Zusätzlich zur Computer-gestützten Datenerhebung wurden alle Versuche mit einem analogen Thermoschreiber (Fa. Graphtec) aufgezeichnet. Die Originalregistrierung des Schreibers konnte dann manuell ausgewertet werden. Insbesondere relative Werte im Sinne von Amplitudenverhältnissen sind durch die manuelle Auswertung am Originalmitschrieb ermittelt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden die aufgetretenen Arrhythmien innerhalb einer 1 minütigen Schreiberaufzeichnung händisch ausgezählt und ausgewertet.

2.7.3 Statistische Auswertung

Alle ermittelten Werte wurden in Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Veränderungen wurden mit dem Student-t-Test je nach Protokoll für ungepaarte oder gepaarte Stichproben auf Signifikanz geprüft. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Frequenzabhängige arrhythmogene und funktionelle Effekte von Gallensäuren am menschlichen Vorhofmyokard

3.1.1 Taurocholsäure (TCA)

Die Gallensäure Taurocholsäure (TCA) führt bei n=28 Trabekeln konzentrations- und frequenzabhängig zu Arrhythmien. Die arrhythmogenen Effekte bei einer Stimulation mit 1 Hz zeigen sich bei Konzentrationen von 10 μ M bis 1000 μ M, wobei sich bei niedrigen Konzentrationen bis 300 μ M nur vereinzelt Arrhythmien, hingegen bei Konzentrationen über 300 μ M vermehrt Arrhythmien nachweisen lassen. Die arrhythmogene Potenz von TCA ist bei der höchsten Konzentration (1000 μ M) statistisch signifikant ($p < 0.05$). Bradykarde Stimulation mit 0.5 Hz führt zu einer Steigerung der Arrhythmien. Es zeigen sich bereits ab einer Konzentration von 10 μ M statistisch signifikante ($p < 0.05$) arrhythmogene Eigenschaften der Gallensäure TCA. Hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften der Taurocholsäure haben sich keine statistisch signifikanten Änderungen gegenüber dem Ausgangswert gezeigt. Lediglich der bereits bekannte Effekt des „run down“ der Muskelstreifen nach längerer Experimentendauer konnte beobachtet werden. Auf Grund dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass die Taurocholsäure eine proarrhythmogene Potenz besitzt, jedoch zu keiner Änderung der Kontraktilität des humanen Vorhofmyokards führt (siehe **Abb. 12**). Die Originalregistrierungen in **Abb. 11** zeigen die konzentrationsabhängigen Arrhythmien der Gallensäure TCA bei 300 μ M und 1000 μ M nach jeweils 15 Minuten.

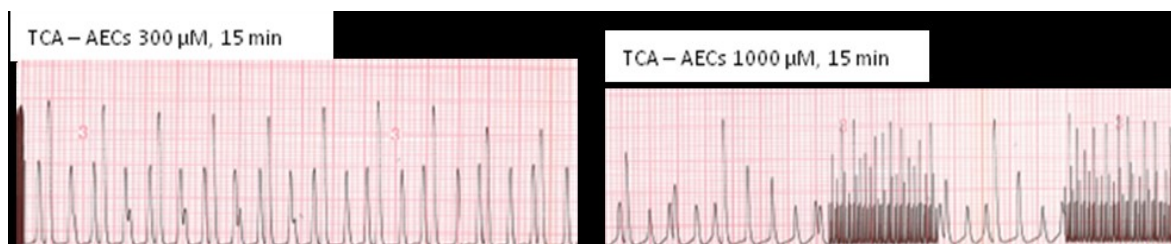


Abbildung 11: Originalregistrierungen vom 11.08.2009, 1 Trabekel bei 300 μ M bzw. 1000 μ M nach 15 Minuten Inkubation mit TCA. Steigerung der arrhythmogenen Effekte der Gallensäure TCA bei höheren Konzentrationen (1000 μ M) im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen (300 μ M).

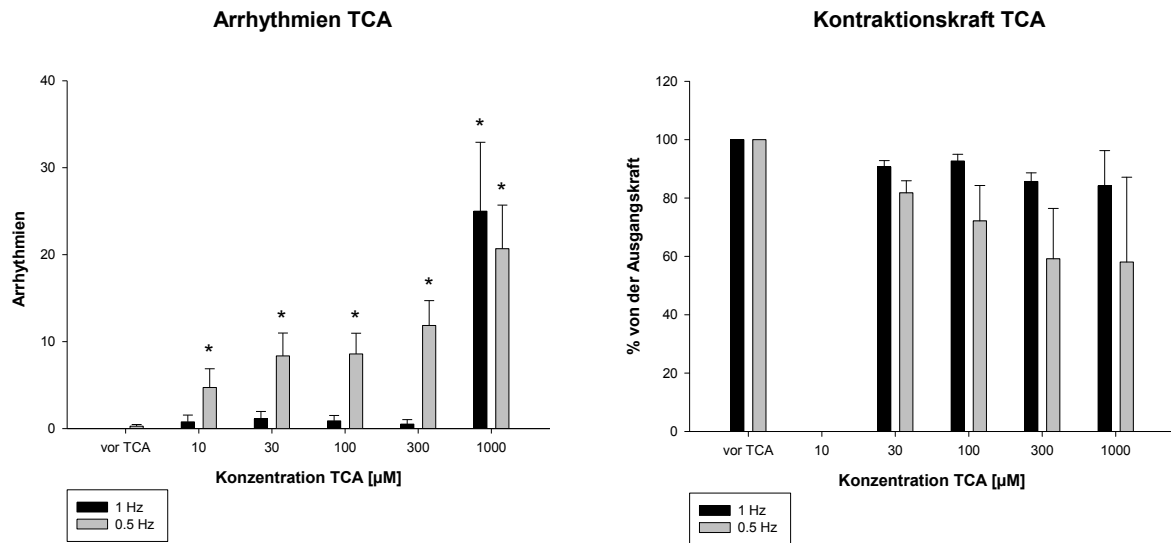


Abbildung 12: Konzentrations- und frequenzabhängigen arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften der Taurochenodeoxycholsäure am humanen adulten Vorhofgewebe.

3.1.2 Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA)

Die Gallensäure Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) löst bei $n=17$ Trabekeln konzentrations- und frequenzabhängig Arrhythmien am humanen Vorhofgewebe aus. Mit einer Stimulation von 1 Hz zeigen sich statistisch signifikante Arrhythmien ($p<0.05$) bei den Konzentrationen $300\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M}$. Hingegen führen niedrigere Konzentrationen ($10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) der Gallensäure TCDCA zu keinen signifikanten arrhythmogenen Effekten. Bradykarde Stimulation mit 0.5 Hz führt bereits ab einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ TCDCA zu Arrhythmien. Allerdings zeigt sich eine statistische Signifikanz ($p<0.05$) erst bei einer Konzentration von $1000\mu\text{M}$. Betreffend der Kontraktilitätsänderung durch die Zugabe von Taurochenodeoxycholsäure konnten keine statistisch signifikanten Änderungen gegenüber der Ausgangskraft gezeigt werden (siehe **Abb. 14**). Auch bei diesen Muskelstreifenexperimenten konnte der physiologische „run down“ Effekt der Kontraktionskraftentwicklung der Trabekel nachgewiesen werden, welcher unabhängig von den Gallensäuren zu Stande kommt. Daraus leitet sich ab, dass die Gallensäure TCDCA ebenfalls proarrhythmogene Eigenschaften besitzt und keine Änderung der Kontraktilität der Herzmuskelstreifen bewirkt.

Abb. 13 zeigt eine Originalregistrierung, welche die arrhythmogene Potenz der Gallensäure TCDCA bei einer Konzentration von 300µM nach 15 Minuten darstellt.

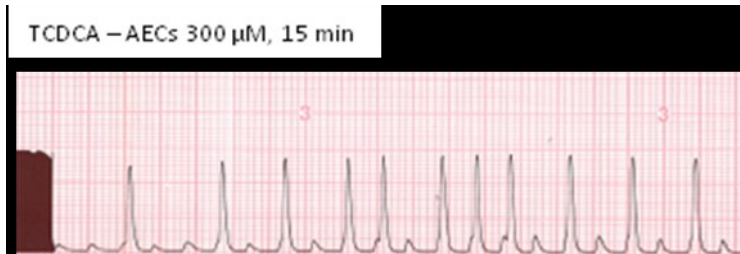


Abbildung 13: Originalregistrierungen vom 04.09.2009, 1 Trabekel. Bei einer Konzentration von 300µM zeigen sich nach 15 Minuten Inkubation mit TCDCA Arrhythmien.

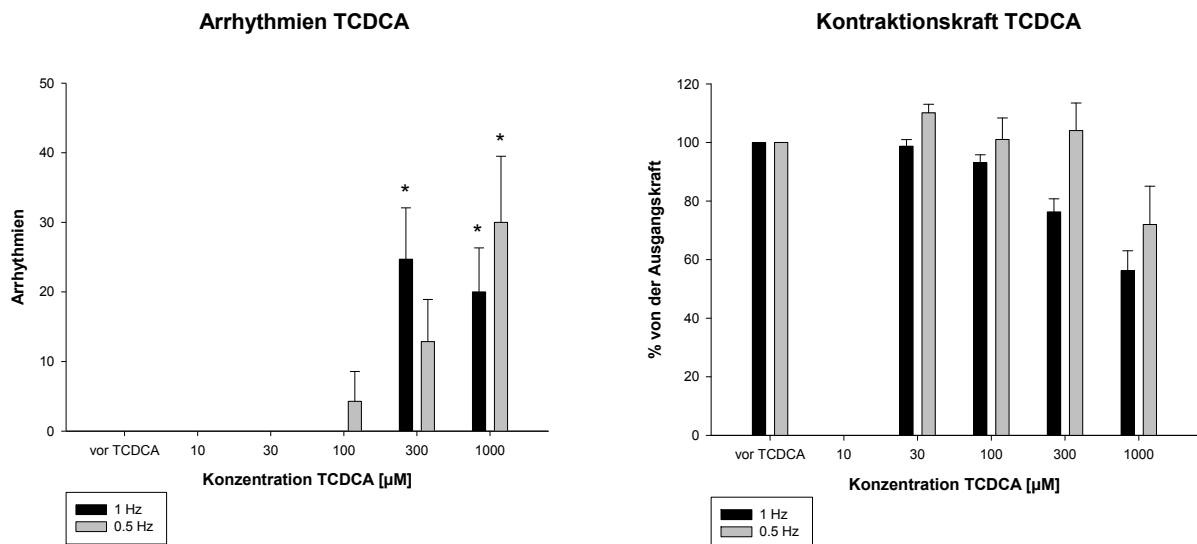


Abbildung 14: Konzentrations- und frequenzabhängigen arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften der Taurochenodeoxycholsäure am humanen adulten Vorhofgewebe.

3.1.3 Glycocholsäure (GCA)

Die Gallensäure Glycocholsäure führt bei n=9 Trabekeln konzentrations- und frequenzabhängig zu arrhythmogenen Effekten am humanen Herzgewebe. Bei einer Stimulation mit 1 Hz treten Arrhythmien ab einer Konzentration von 300µM auf, diese werden bei 1000µM statistisch signifikant ($p < 0.05$). Die Stimulation mit 0.5 Hz löst bereits ab 100µM GCA arrhythmogene Effekte aus, diese werden bei

300µM und 1000µM statistisch signifikant ($p < 0.05$). Die Gallensäure Glycocholsäure bewirkt bis zu einer Konzentration von 300µM keine statistisch signifikante Änderung der Kontraktionskraft gegenüber der Ausgangskraft. Bei einer Konzentration von 1000µM GCA kommt es bei einer Stimulation von 1 Hz zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Kontraktilität der Muskelstreifen. Dieser Effekt beruht vermutlich auf dem direkt toxischen Effekt der Gallensäure Glycocholsäure auf den humanen atrialen Muskelstreifen. Ansonsten entspricht die Kraftreduktion dem physiologischen „run down“ der Muskelstreifen. Daraus folgt, dass die Gallensäure GCA eine proarrhythmogene Potenz besitzt. Zusätzlich kommt es bei einer Konzentration von 1000µM und einer Stimulation mit 1 Hz zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionskraft (siehe **Abb. 16**). Die Originalregistrierung in **Abb. 15** zeigt die arrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäure GCA bei einer Konzentration von 300µM nach 15 Minuten Inkubation.



Abbildung 15: Originalregistrierungen vom 02.10.2009, 1 Trabekel. Bei einer Konzentration von 300µM zeigen sich nach 15 Minuten Inkubation mit GCA Arrhythmien.

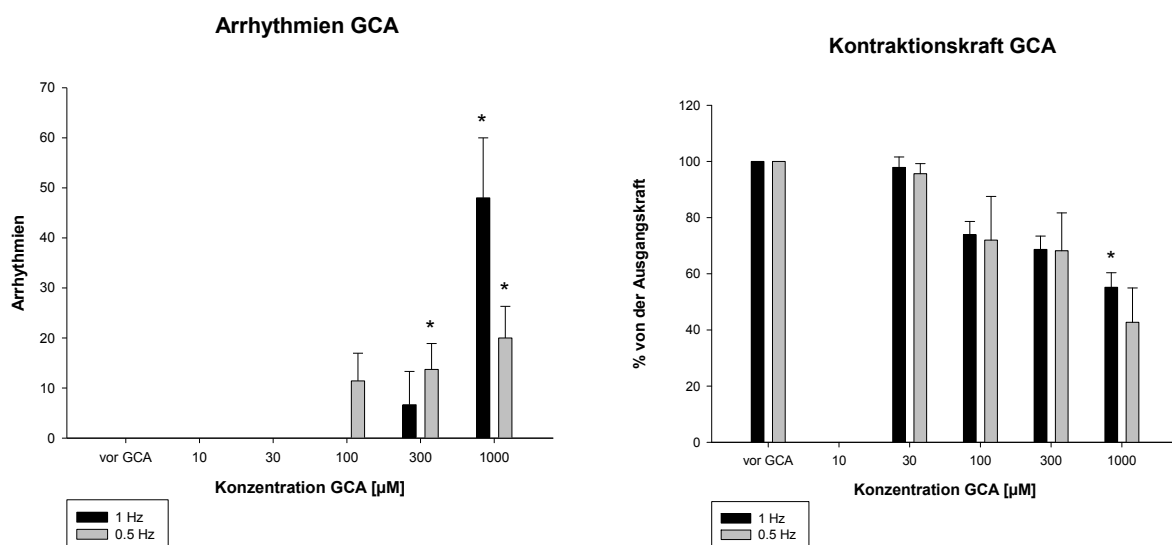


Abbildung 16: Konzentrations- und frequenzabhängigen arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften der Glycocholsäure am humanen adulten Vorhofgewebe

3.1.4 Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA)

Die Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure bewirkt bei n=6 Trabekeln konzentrations- und frequenzabhängig arrhythmogene Effekte am humanen adulten Vorhofgewebe. Bei einer Stimulation mit 1 Hz kommt es ab einer Konzentration von 300µM zu Arrhythmien, welche bei einer Konzentration von 1000µM zunehmen. Bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz kommt es bereits ab einer Konzentration von 100µM GCDCA zu arrhythmogenen Effekten, welche auch bei höheren Konzentrationen (300µM, 1000µM) erhalten bleiben. Die arrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäure GCDCA erreichen sowohl bei einer Stimulation mit 1 Hz als auch bei einer Stimulation mit 0.5 Hz keine statistische Signifikanz. Es ist jedoch ein deutlicher Trend der arrhythmogenen Potenz der Gallensäure zu erkennen. Die Wirkung der Glycochenodeoxycholsäure auf die Kontraktilität der Muskelstreifen unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von der Glycocholsäure. Bei einer Konzentration von 1000µM kommt es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Kraftentwicklung gegenüber der Ausgangskraft. Ansonsten entspricht der Kraftverlust dem physiologischen „run down“ der Muskelstreifen (siehe **Abb.18**). Dem zu Folge ergeben sich auch für die Gallensäure GCDCA konzentrationsabhängige proarrhythmogene Eigenschaften bei nur geringer Wirkung auf die Kontraktilität. In der **Abb. 17** sind die arrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäure GCDCA bei einer Konzentration von 300µM nach 15 minütiger Inkubation gezeigt.



Abbildung 17: Originalregistrierungen vom 22.09.2009, 1 Trabekel. Bei einer Konzentration von 300µM zeigen sich nach 15 Minuten Inkubation mit GCDCA Arrhythmien.

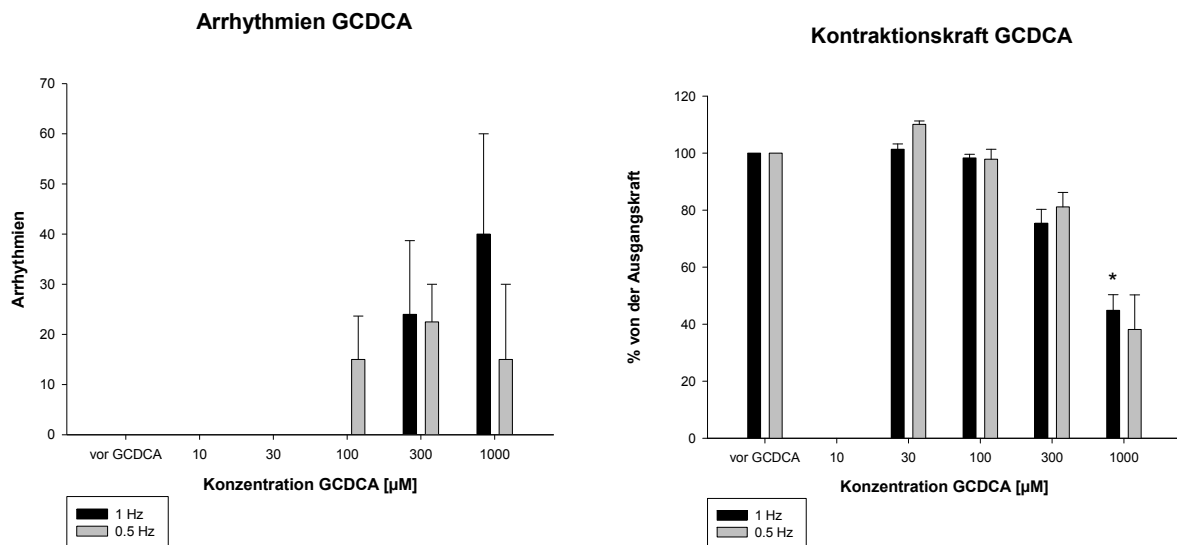


Abbildung 18: Konzentrations- und frequenzabhängigen arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften der Glycochenodeoxycholsäure am humanen adulten Vorhofgewebe

3.2 Einfluss der unterschiedlichen Konjugation der Gallensäuren auf die arrhythmogenen und funktionellen Eigenschaften des Vorhofgewebes

Die für die Herzmuskelstreifenexperimente verwendeten Gallensäuren sind entweder mit Taurin (TCA, TCDCA) oder Glycin (GCA, GCDCA) konjugiert. **Abb. 19** zeigt den Einfluss der unterschiedlich konjugierten Gallensäuren auf die Arrhythmogenität des humanen Vorhofmyokards. **Abb. 20** stellt den Einfluss der verschieden konjugierten Gallensäuren auf die Kontraktilität des Herzmuskelgewebes dar. Betrachtet man zuerst den Einfluss der unterschiedlichen Konjugation der Gallensäuren auf die konzentrationsabhängigen arrhythmogenen Eigenschaften des Vorhofgewebes, so kommt man zum Schluss, dass es weder bei einer Stimulation mit 1 Hz noch bei einer bradykarderen Stimulation mit 0.5 Hz einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschieden konjugierten Gallensäuren gibt. Lediglich bei einer Konzentration von 300µM und einer Stimulation mit einem 1 Hz zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gallensäuren TCDCA und GCDCA gegenüber TCA, welche

allerdings durch die im Vergleich zu Stimulation mit 0.5 Hz geringe Anzahl an Arrhythmien bei der Gallensäure TCA bedingt sind. Hinsichtlich des Einflusses der verschiedenen konjugierten Gallensäuren auf die Kontraktilität des atrialen Herzmuskelgewebes ist zu sagen, dass auch hier kein grundlegender Unterschied zwischen den Gallensäuren besteht.

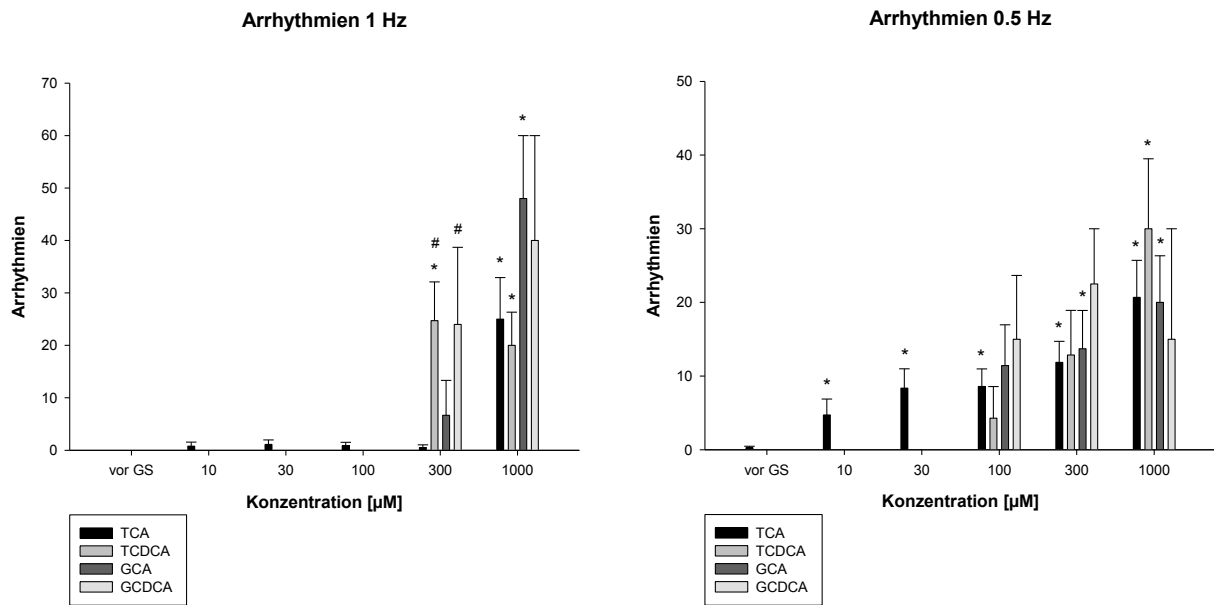


Abbildung 19: Einfluss der unterschiedlichen Konjugation der Gallensäuren mit Taurin und Glycin bei einer Stimulation mit 1 Hz und 0.5 Hz auf die arrhythmogenen Eigenschaften des humanen atrialen Myokards.

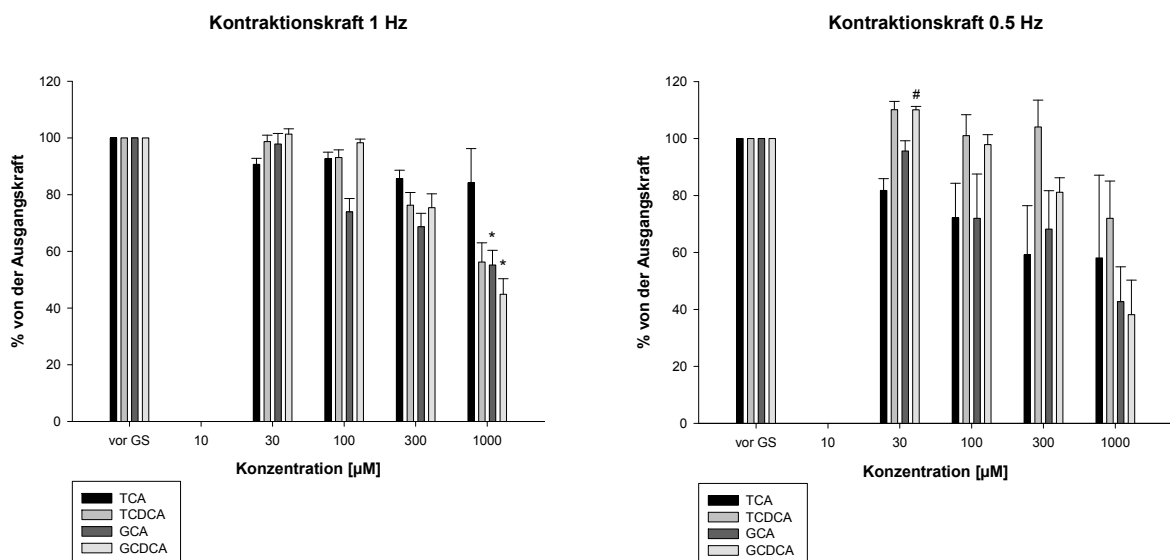


Abbildung 20: Einfluss der unterschiedlichen Konjugation der Gallensäuren mit Taurin und Glycin bei einer Stimulation mit 1 Hz und 0.5 Hz auf die kontraktile Eigenschaften des Vorhofmyokards.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die verwendeten Gallensäuren (TCA, TCDCA, GCA, GCDCA) in pathophysiologischen Konzentrationen eine arrhythmogene Potenz besitzen, welche bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz stärker ausgeprägt ist als bei einer Stimulation mit 1 Hz. Außerdem zeigen die Experimente mit humanen atrialen Muskelstreifen, dass die Gallensäuren keinen negativ inotropen Effekt per se besitzen und somit die Kontraktilität des Herzmuskelgewebes unbeeinflusst von den Gallensäuren bleibt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied in den arrhythmogenen und funktionellen Effekten zwischen den verschiedenen konjugierten Gallensäuren mit Taurin und Glycin besteht.

Aufgrund der vorliegenden Daten und der Literatur zu den arrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäuren wurde die Gallensäure TCA ausgewählt um in den folgenden Experimenten die Kontrollgruppe darzustellen. Es soll nun gezeigt werden, welchen Einfluss eine Stimulation beziehungsweise eine Blockade des L-Typ-Kalzium Kanals sowie die Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers auf die Entstehung der Arrhythmien durch Gallensäuren hat.

3.3 Einfluss der Gallensäure TCA auf die absoluten Refraktärzeiten am isolierten Vorhofmuskelstreifen

Um den Einfluss der Gallensäure TCA auf die absoluten Refraktärzeiten der Vorhofmuskelstreifen zu messen wurden n=18 Ankoppelungsversuche mit stetig um 10 ms abnehmenden Stimulationsintervall beginnend bei 600 ms durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden jeweils die nachfolgenden Schläge näher an den zuvor stattgehabten Schlag angekoppelt. Solange bis eine komplette Kontraktion ausgefallen ist. Dieses Zeitfenster entspricht der absoluten Refraktärzeit der Herzmuskelstreifen. Nach Erreichen des steady state bei L_{max} wurde zuerst eine Kontrollmessung ohne TCA durchgeführt. Anschließend wurden zuerst 300 μ M und danach 1000 μ M TCA hinzugefügt und jeweils die Refraktärzeiten bestimmt. Die absoluten Refraktärzeiten in Anwesenheit von 0.3mM und 1mM Taurocholsäure nahmen auf 168 \pm 9ms und 172 \pm 12ms im Vergleich zur Kontrolle 157 \pm 11ms zu ($p < 0.05$ und $p < 0.01$).

Tab. 5 zeigt im Einzelnen die jeweils gemessenen absoluten Refraktärzeiten in ms vor TCA Gabe und nach 300µM sowie 1000µM TCA. In **Abb. 21** stellt sich die statistisch signifikante Verlängerung der absoluten Refraktärzeiten nach 300µM (von 157±11ms auf 168±9ms; p<0.05) sowie nach 1000µM TCA (von 157±11ms auf 172±12ms; p<0.01) gut dar.

Messung der absoluten Refraktärzeiten [ms]

Exp. Nr.	Kontrolle	300uM TCA	1000uM TCA
Refraktär 1	100	100	120
Refraktär 2	160	170	180
Refraktär 3	190	190	200
Refraktär 4	180	180	200
Refraktär 5	220	arr	arr
Refraktär 6	130	140	150
Refraktär 7	120	190	220
Refraktär 8	100	150	160
Refraktär 9	140	170	arr
Refraktär 10	100	110	120
Refraktär 11	130	150	160
Refraktär 12	90	100	100
Refraktär 13	250	280	arr
Refraktär 14	130	130	200
Refraktär 15	220	220	AEC
Refraktär 16	200	200	220
Refraktär 17	180	180	200
Refraktär 18	210	210	arr

Tab. 5: Absolute Refraktärzeiten in ms bei Kontrolle sowie nach 300µM und 1000µM TCA

Refraktärmessungen

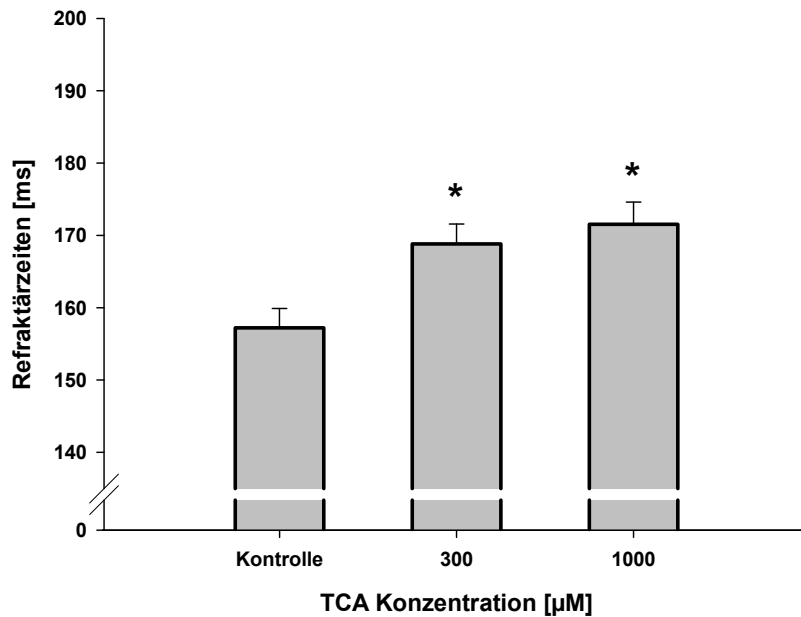


Abb. 21: Refraktärzeitmessungen

3.4 Die Rolle des L-Typ-Kalziumkanals bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren

3.4.1 BayK8644

Die Substanz BayK8644 ist ein Aktivator des L-Typ-Kalziumkanals. Nach einer 30 minütigen Inkubation mit 1 µM BayK8644 zeigte sich ein Stimulationsfrequenz-unabhängiger positiv inotroper Effekt von 20 – 30 % am humanen Vorhofmyokard (siehe **Abb. 22**).

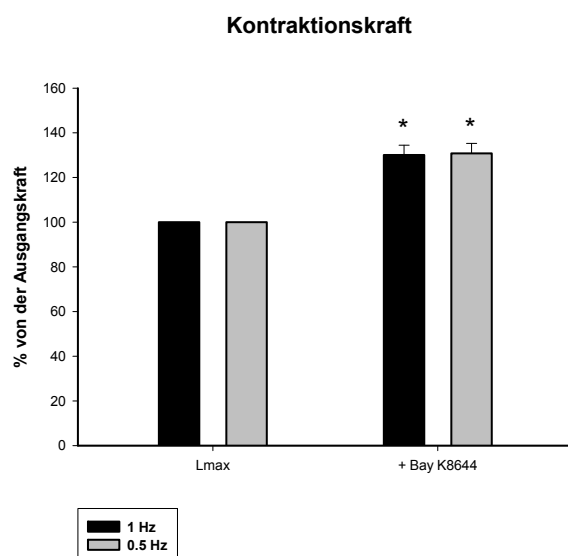


Abbildung 22: Positiv inotroper Effekt von BayK8644 am isolierten humanen Vorhofgewebe

Der Effekt durch den L-Typ-Kalzium-Aktivator BayK8644 auf das humane atriale Vorhofmyokard wurde an n=8 Trabekeln gezeigt. Durch die Stimulation des L-Typ-Kalzium-Kanals kam es bereits ab einer Konzentration von 10µM zum vollständigen Sistieren der durch Gallensäuren ausgelösten Arrhythmien; dieser Effekt blieb bis zu einer Konzentration von 1000µM bei einer Stimulation von 1 Hz aufrecht. Bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion (p<0.05) der arrhythmogenen Effekte nach Inkubation mit BayK8644 ab einer Konzentration von 100µM im Vergleich zu den TCA-Kontrollstreifen (siehe **Abb. 23**). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit BayK8644 keinerlei Einfluss auf die Kontraktionskraft der isolierten atrialen Muskelstreifen hat (siehe **Abb. 24**). Zusammenfassend betrachtet kommt man zum Schluss, dass es durch die Stimulation des L-Typ-Kalzium-Kanals mit der Substanz BayK8644 entgegen der Hypothese zu einer signifikanten Reduktion der durch Gallensäuren ausgelösten arrhythmogenen Effekte am isolierten humanen Vorhofmyokard kommt. Außerdem ist die inotrope Antwort auf TCA durch die Vorinkubation mit BayK8644 nicht verändert.

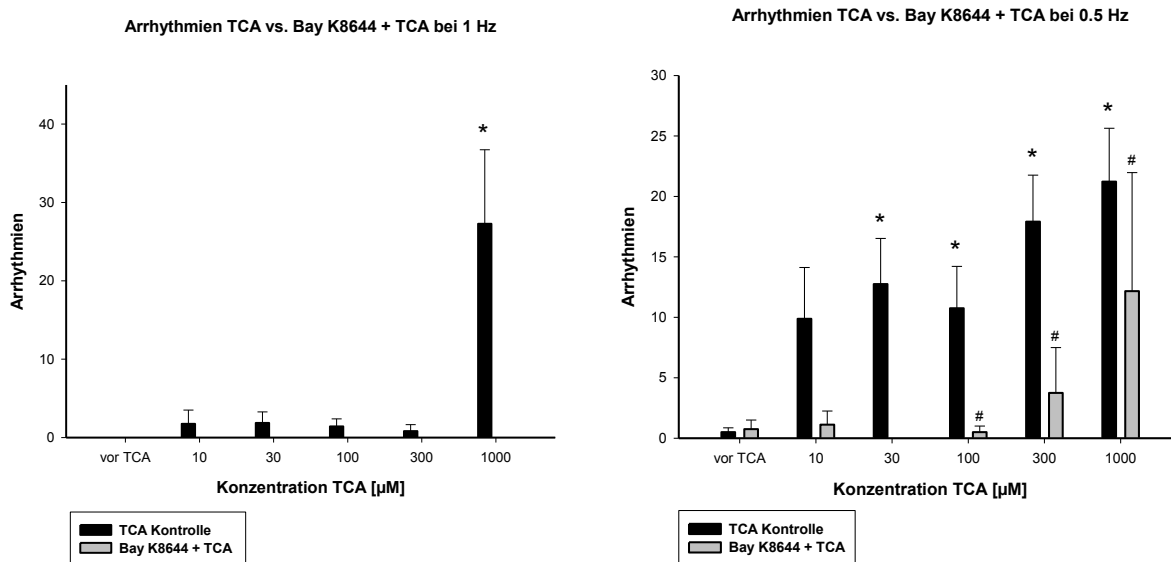


Abbildung 23: Einfluss des L-Typ-Kalzium-Kanal Aktivators BayK8644 auf die Entstehung von Arrhythmien im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

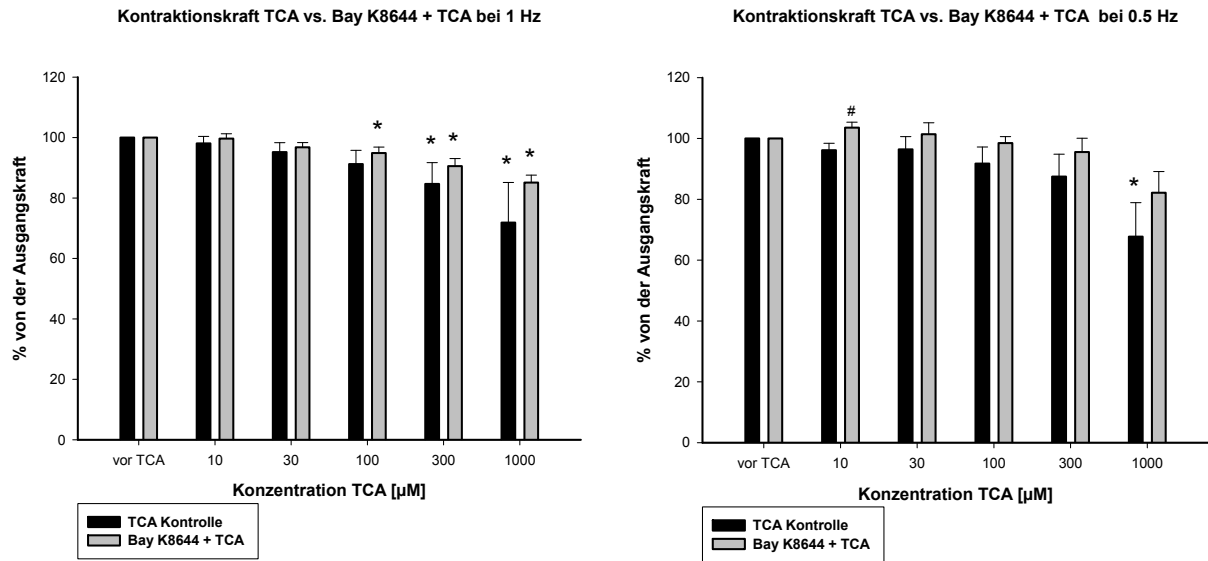


Abbildung 24: Einfluss des L-Typ-Kalzium-Kanal Aktivators BayK8644 auf die Kontraktionskraft im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

Abb. 25 stellt den Effekt der L-Typ-Kalzium Kanal Stimulation durch BayK8644 gegenüber dem TCA-Kontrollmuskel jeweils bei einer Konzentration von 300 μM nach 15 Minuten dar.

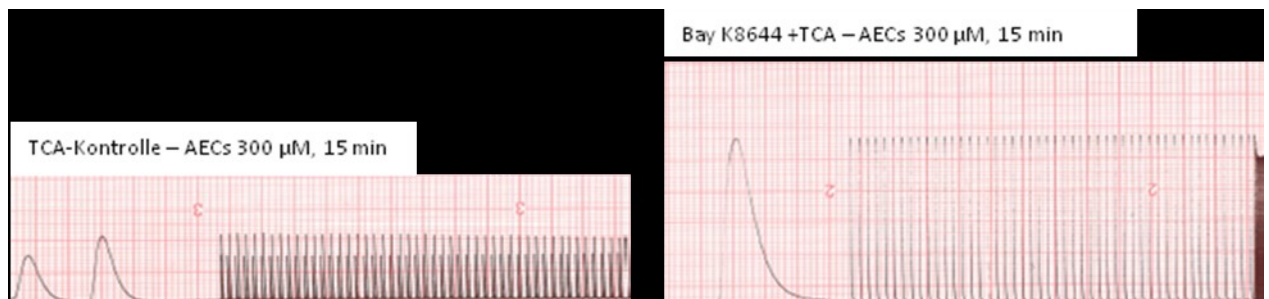


Abbildung 25: Originalregistrierungen vom 05.02.2010, 2 Trabekel. Der TCA-Kontrollmuskelstreifen zeigt bei 300 μM nach 15 Minuten Arrhythmien. Der BayK8644 + TCA Trabekel zeigt bei 300 μM nach 15 Minuten keine Arrhythmien.

3.4.2 Diltiazem

Die Blockade des L-Typ-Kalziumkanals durch Inkubation mit 1 μM Diltiazem für 30 Minuten führt am isolierten humanen atrialen Herzmuskelstreifen zu einer Stimulationsfrequenz-unabhängigen Reduktion der Kontraktionskraft um 50 % (siehe **Abb. 26**).

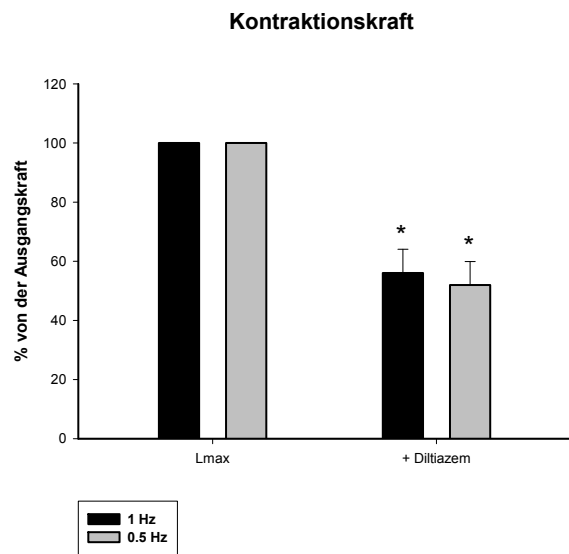


Abbildung 26: Negativ inotroper Effekt von Diltiazem am isolierten humanen Vorhofgewebe

Die Wirkung von Diltiazem konnte an n=10 isolierten atrialen Herzmuskelstreifen gezeigt werden. Die Inhibition des L-Typ-Kalziumkanals durch Diltiazem bewirkte bereits ab einer Konzentration von 10 μM TCA einen statistisch signifikanten Anstieg ($p < 0.05$) der Arrhythmien im Vergleich zu den TCA-Kontrollen bei einer Stimulation mit 1 Hz. Bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden (siehe **Abb. 27**).

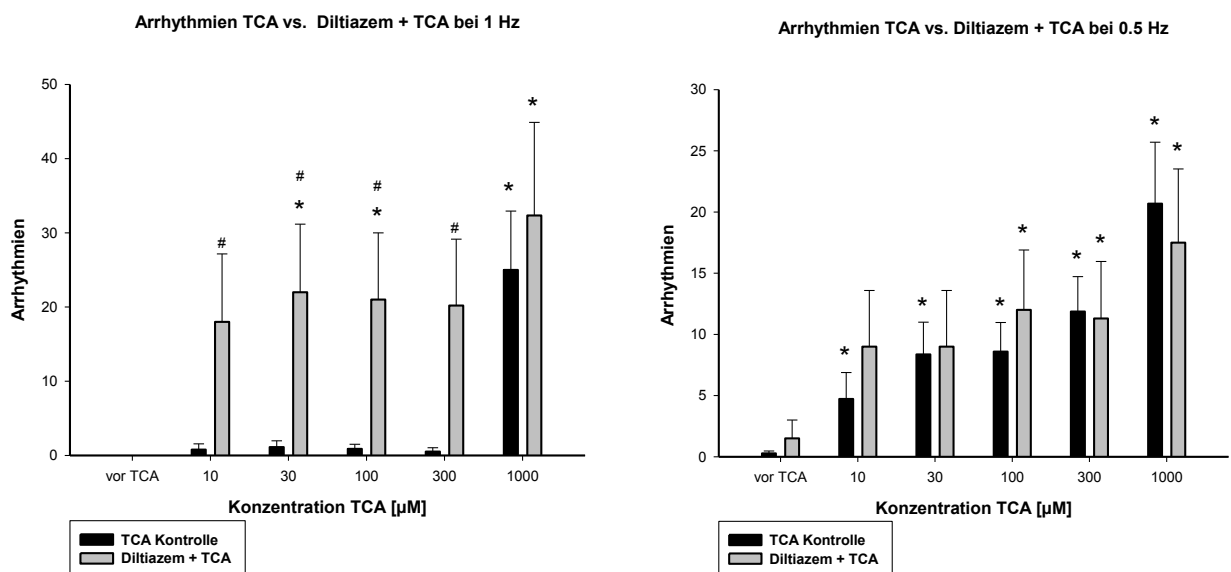


Abbildung 27: Einfluss des L-Typ-Kalzium-Kanal Blockers Diltiazem auf die Entstehung von Arrhythmien im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

Die Kontraktionskraft der Trabekel nimmt nach 30 minütiger Inkubation mit 1 μM Diltiazem kontinuierlich mit steigender Konzentration der Gallensäure TCA ab. Dieser Effekt scheint allerdings nicht direkt durch die Gallensäure bedingt zu sein, sondern vielmehr einen verzögerten Effekt durch die Diltiazem Präinkubation darzustellen (siehe **Abb. 28**). Zusammenfassend betrachtet kann man sagen, dass entgegen der Hypothese eine Blockade des L-Typ-Kalziumkanals mit Diltiazem zu einem signifikanten Anstieg der durch Gallensäuren bedingten arrhythmogenen Effekte am isolierten humanen Vorhofmyokard führt.

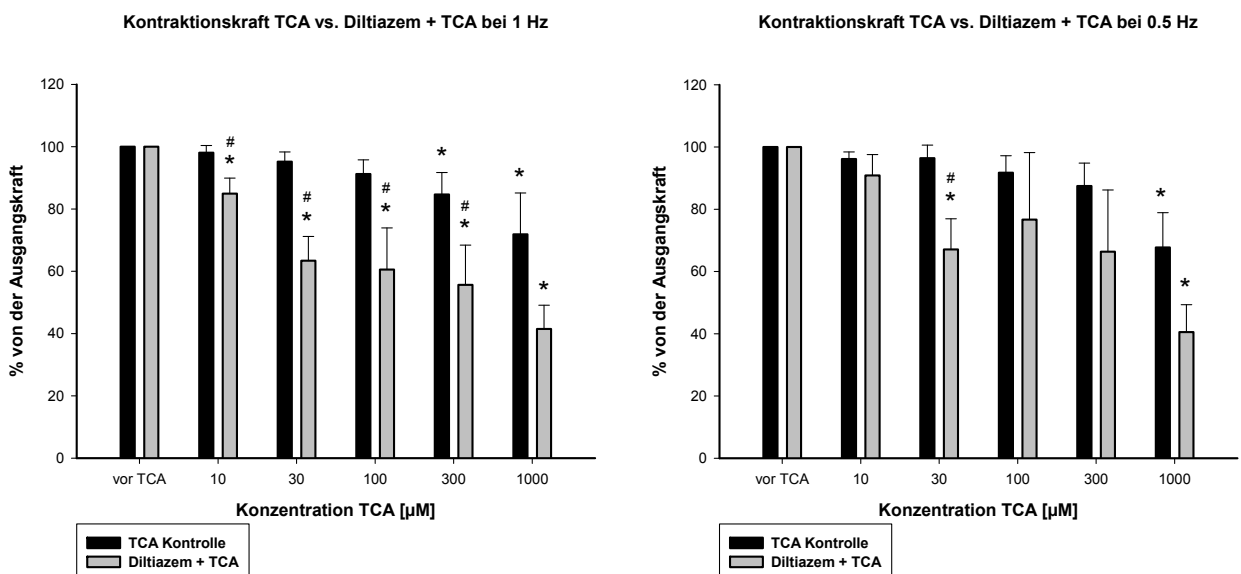


Abbildung 28: Einfluss des L-Typ-Kalzium-Kanal Blockers Diltiazem auf die Änderung der Kontraktionskraft im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

Abb. 29 zeigt die arrhythmogene Wirkung der Gallensäure TCA nach Inkubation mit Diltiazem bei einer Konzentration von 300 μM nach 15 Minuten.

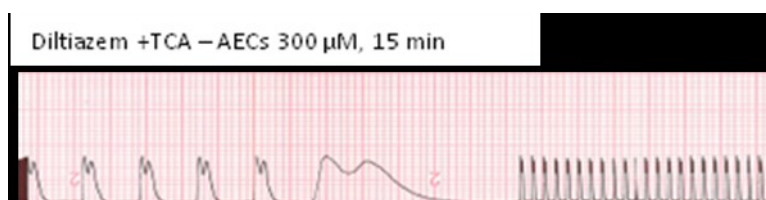


Abbildung 29: Originalregistrierungen vom 03.03.2010, 1 Trabekel. Diltiazem + TCA Trabekel bei 300 μM nach 15 Minuten zeigt Arrhythmien.

3.5 Die Rolle des Natrium/Kalzium-Austauscher bei der Induktion der Arrhythmien durch Gallensäuren

3.5.1 KB-R7943

Die Inkubation mit 5 μM KB-R7943 bewirkt durch die Blockade des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers im „reverse mode“ einen Stimulationsfrequenz-unabhängigen negativ inotropen Effekt von 10 – 20 % am isolierten humanen Vorhofgewebe (siehe **Abb. 30**).

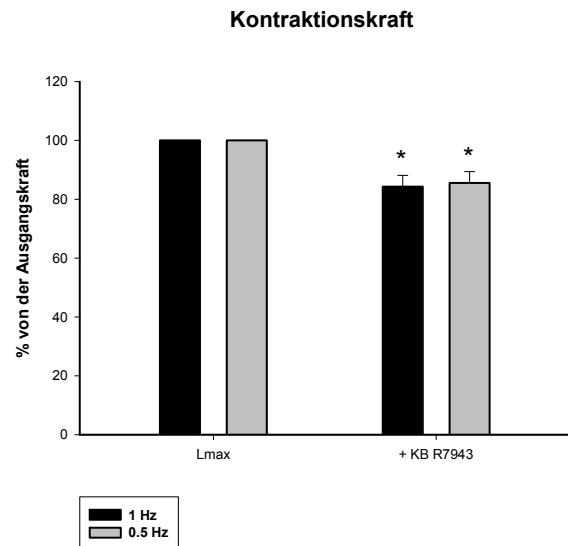


Abbildung 30: Negativ inotroper Effekt von KB-R7943 am isolierten humanen Vorhofgewebe

Der Effekt durch die Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers im „reverse mode“ mit KB-R7943 konnte an n=11 Herzmuskelstreifen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0.05$) der arrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäuren bei den mit KB-R7943 präinkubierten Herzmuskelstreifen im Vergleich zu den TCA-Kontrollmuskelstreifen bei den Konzentrationen 30 μM , 100 μM und 300 μM mit einer Stimulation von 1 Hz. Bei der höchsten Konzentration mit 1000 μM kam es auch ohne Inkubation des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers zu einer hohen Zahl von Arrhythmien, so dass kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Des Weiteren zeigte sich auch bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz kein Anstieg der arrhythmogenen Potenz durch Blockade des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers (siehe **Abb. 31**). Bezogen auf die Kontraktionskraft bewirkte die Blockade mit KB-R7943 keine signifikante Änderung der TCA-induzierten Inotropie gegenüber der Ausgangskraft weder bei einer Stimulation mit 1 Hz noch bei bradykardere Stimulation mit 0.5 Hz (siehe **Abb. 32**).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers im „reverse mode“ die Wahrscheinlichkeit von Arrhythmien mit einer Stimulation von 1 Hz zwischen 30µM und 300µM statistisch signifikant erhöht. Bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. Außerdem liefern die Experimente Aufschluss darüber, dass die Blockade des Na⁺/Ca²⁺ Austauschers keinen zusätzlichen Einfluss auf die Inotropie hat.

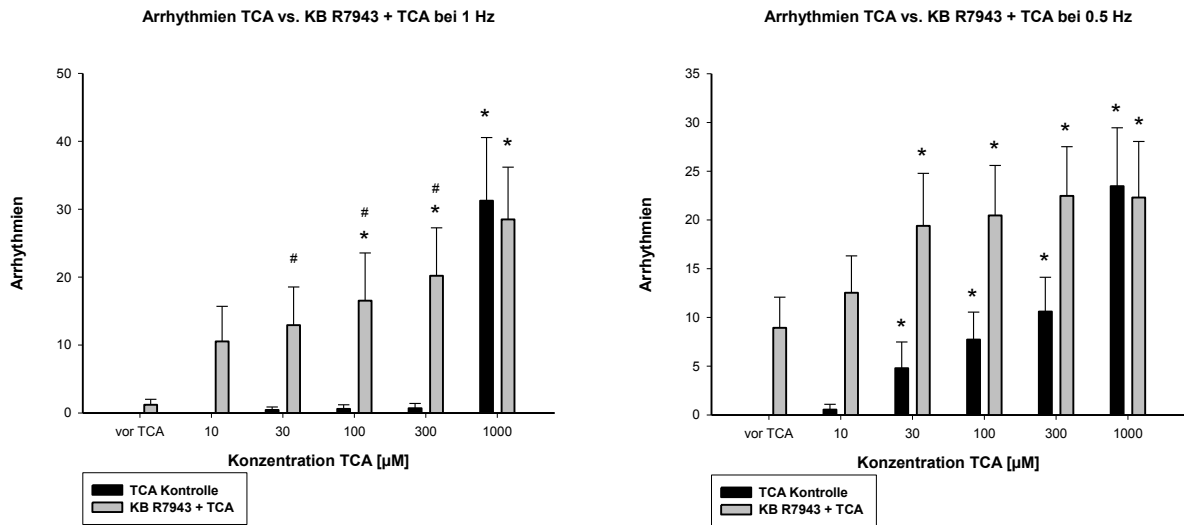


Abbildung 31: Einfluss der Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers im „reverse mode“ durch KB-R7943 auf die Entstehung von Arrhythmien im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

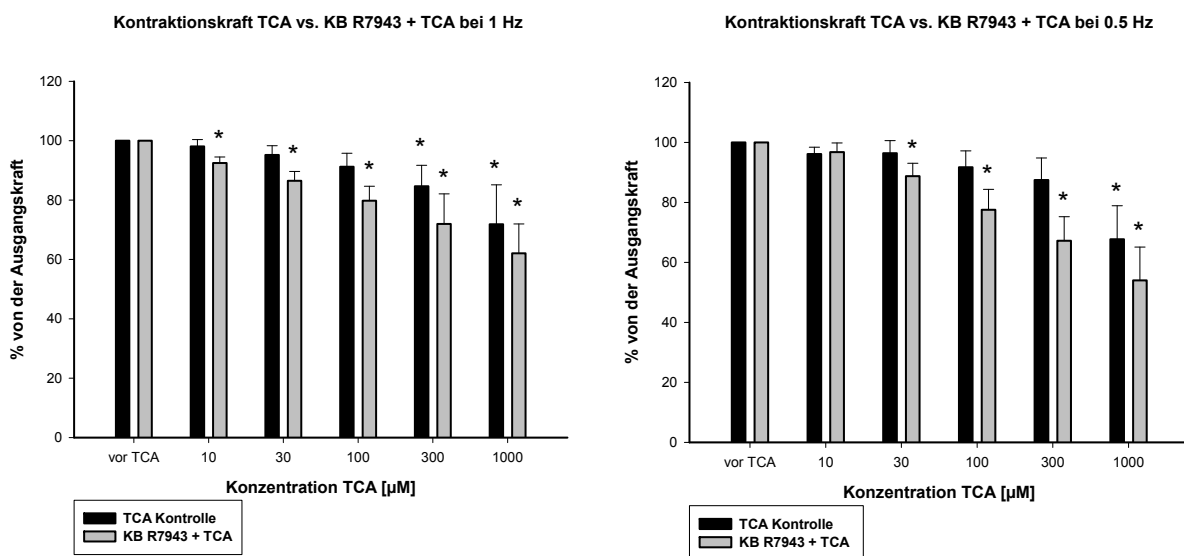


Abbildung 32: Einfluss der Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers im „reverse mode“ durch KB-R7943 auf die Änderung der Kontraktionskraft im Vergleich zu TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 1 Hz und 0.5 Hz.

Die Originalregistrierungen in **Abb. 33** zeigen die Verstärkung der arrhythmogenen Eigenschaften durch Blockade des Natrium/Kalzium Austauschers mit KB-R7943 im Vergleich zu den TCA-Kontrollmuskelstreifen bei 300 μ M und 1000 μ M nach 15 Minuten.

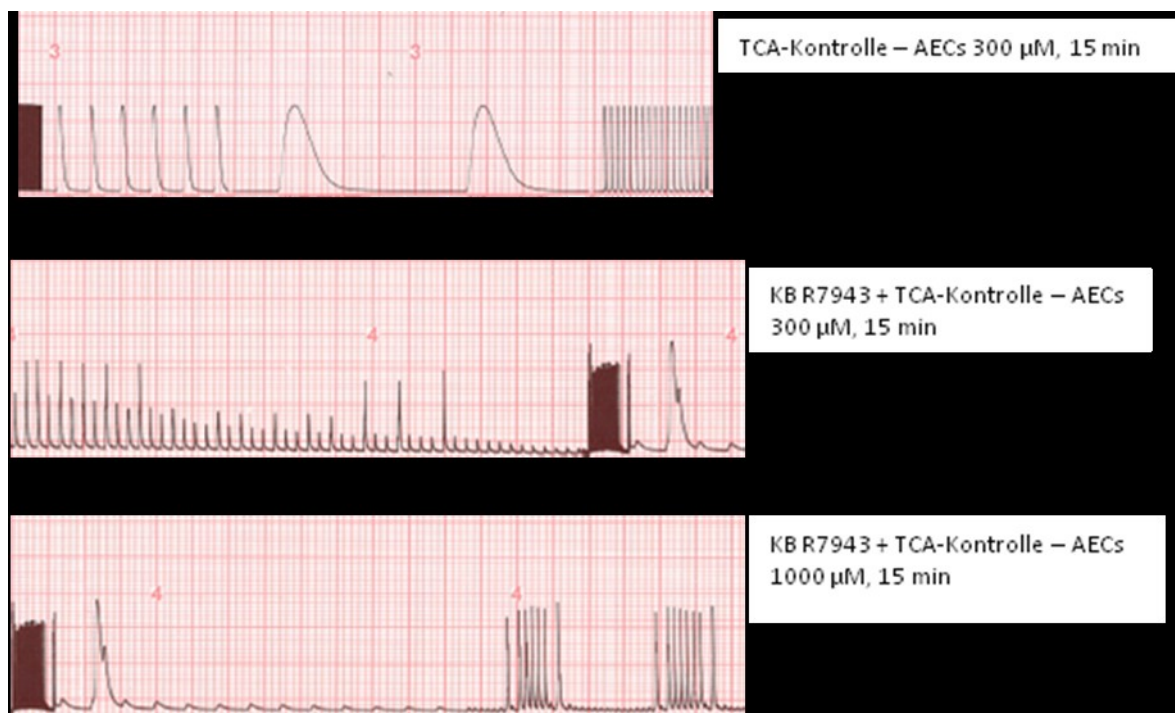


Abbildung 33: Originalregistrierungen vom 30.03.2010, 2 Trabekel. TCA-Kontroll Trabekel bei 300 μ M nach 15 Minuten zeigt keine Arrhythmien. KB-R7943 + TCA Trabekel bei 300 μ M nach 15 Minuten zeigt Arrhythmien; bei 1000 μ M Verstärkung der arrhythmogenen Effekte.

4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen Herz- und Lebererkrankungen ist vor allem für die hämodynamischen Auswirkungen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz auf die Leber bekannt. Dieses als Stauungsleber bekannte Krankheitsbild wird vor allem durch ein Versagen des rechten Ventrikels hervorgerufen. Weitaus weniger gut sind die Folgen von Lebererkrankungen auf die Funktion des Herzens erforscht. Insbesondere der Zusammenhang zwischen hohen systemischen Gallensäure-Spiegeln bei Cholestase und deren Auswirkungen auf die Kardiomyozyten sind beim Menschen weitgehend unbekannt.

Ein interessantes Modell zur Erforschung von erhöhten Gallensäure-Spiegeln auf das menschliche Herz stellt die intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP) dar. Bei der ICP werden systemische Gallensäure-Spiegel von bis zu 1mM gemessen, was um das 100 fache höher ist als unter physiologischen Bedingungen und somit eine Störung der natürlichen Homöostase darstellt (104). Diese Erkrankung verläuft für die Mutter meist ohne ernst zu nehmende Komplikationen – bis auf den massiven Pruritus, jedoch kann es zu schwerwiegenden Folgen für den Fetus bis hin zum intrauterinen Fruchttod in 2 % der Fälle kommen (91,92). Derzeit gibt es klinische Hinweise dafür, dass Herzrhythmusstörungen in einem großen Teil der Fälle für die intrauterinen Komplikationen der Feten bei Frauen mit Schwangerschaftscholestase verantwortlich sind (100-102).

Kürzlich wurde durch in vitro Experimente gezeigt, dass Gallensäuren an isolierten Rattenkardiomyozyten Arrhythmien auslösen können (103-105). Insbesondere wurde die Wirkung von Taurin (TCA, TCDCA) und Glycin (GCA, GCDCA) konjugierten primären Gallensäuren auf die neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht, da diese bei der Intrahepatischen Schwangerschaftscholestase vermehrt nachgewiesen worden sind. Auch unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper gehören die vier genannten primären Gallensäuren zu den häufigsten ihrer Art und spielen eine wichtige Rolle im Gallensäurestoffwechsel des Menschen (106).

Der Einfluss der Gallensäuren auf das Herzmuskelgewebe konnte noch in weiteren Studien nachgewiesen werden. Die primäre Gallensäure TCA, eine mit Taurin konjugierte und bei der ICP erhöhte Gallensäure zeigte in Einzelzellversuchen unterschiedliche Effekte im Kontraktionsverhalten. So beobachtete man bei Versuchen an sinuatrialen Knoten von Kaninchen die Entwicklung von Bradykardien, wohingegen man bei Experimenten an isolierten Rattenkardiomyozyten die Entstehung von Tachykardien bis hin zum Flimmern und irreversiblen Asystolien zeigen konnte. Die dafür zugrunde liegenden Mechanismen konnten bisweilen noch nicht vollständig aufgeklärt werden (121,122).

Ein weiterer Anhaltspunkt für den direkten Zusammenhang zwischen pathophysiologisch erhöhten Gallensäure-Spiegeln im menschlichen Körper und dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen konnte durch die massenspektroskopische Bestimmung der Gallensäure-Gesamtkonzentration in Serumproben von 138 Patienten mit Herzinsuffizienz und entweder mit Vorhofflimmern oder ohne Vorhofflimmern gezeigt werden. Die Untersuchung der Serumproben ergab, dass in der Gruppe von herzinsuffizienten Patienten mit Vorhofflimmern erhöhte systemische Gallensäure-Spiegel nachgewiesen werden konnten. Hingegen in der Gruppe von herzinsuffizienten Patienten ohne Vorhofflimmern lagen die Werte der systemisch gemessenen Gallensäurewerte deutlich darunter. Außerdem konnte keine signifikante Korrelation bezüglich Alter, Geschlecht und Komorbidität festgestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass bei herzinsuffizienten Patienten mit Vorhofflimmern signifikant erhöhte systemische Gallensäure-Gesamtkonzentrationen unabhängig von Alter, Geschlecht und Komorbiditäten vorliegen (123).

Diese Daten erhärten den Verdacht, dass systemisch erhöhte Gallensäure-Spiegel, wie sie zum Beispiel bei der Schwangerschaftscholestase vorkommen, direkten Einfluss auf die Entstehung von Arrhythmien am menschlichen Herzmuskelgewebe haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Gallensäuren am menschlichen Herzmuskelgewebe sowohl im Bezug auf die Entstehung von Arrhythmien und der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen als auch die Beeinflussung des Kontraktionsverhaltens untersucht.

4.1 Wirkung der Gallensäuren auf die Kontraktionskraft des menschlichen Vorhofmuskulgewebes

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Gallensäuren auf die Kontraktionskraft (Inotropie) am humanen Vorhofmyokard mittels Muskelstreifenexperimenten untersucht. Hierzu wurden primäre Gallensäuren (CA/CDCA) verwendet, welche entweder mit Taurin (TCA/TCDCA) oder mit Glycin (GCA/GCDCA) konjugiert waren. Unterschiedliche Konzentrationen (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M) sowie Stimulationsfrequenzen (1 Hz und 0.5 Hz) wurden getestet.

Die durchgeführten Muskelstreifenexperimente (n=60) konnten, unabhängig von der jeweiligen Konjugation der Gallensäure, keinen statistisch signifikanten Unterschied im Kontraktionsverhalten zwischen den mit Gallensäure behandelten und den ohne Gallensäure behandelten Muskelstreifen zeigen. Lediglich die Dauer des Experiments hatte einen geringen Einfluss auf die Kontraktionskraft der Muskelstreifen. So zeigte sich mit zunehmender Dauer des Versuchs eine allmähliche Abnahme der Kontraktionskraft. Dieser beobachtete Effekt wird jedoch nicht auf die Wirkung der Gallensäuren per se zurückgeführt, sondern ist aufgrund des Vorhofmuskulgewebes und der langen Versuchsdauer erklärbar. Das beobachtete Verhalten der Vorhofmuskulstreifen wird in der Literatur als physiologischer „run down“ Effekt bei langen Versuchsabläufen beschrieben.

Eine Ausnahme im Bezug auf das beschriebene Kontraktionsverhalten konnte man bei der höchsten Konzentration (1mM) der mit Glycin konjugierten Gallensäuren (GCA/GCDCA) beobachten. Hier zeigte sich eine plötzliche starke Reduktion der Kontraktionskraft, welche möglicherweise durch einen direkt toxischen Effekt der Gallensäuren bei extrem hoher Konzentration bedingt ist.

Aufgrund der Tatsache, dass der Effekt von Gallensäuren auf das menschliche Herz in der Literatur noch nicht beschrieben wurde muss man zu Vergleichszwecken Daten von anderen Tiermodellen und den dort beschriebenen Effekten von Gallensäuren auf das Herz heranziehen.

Binah et al untersuchte den Effekt von primären und sekundären Gallensäuren auf das Kontraktionsverhalten von isolierten ventrikulären Rattenkardiomyozyten sowie auf ventrikuläre Muskelstreifen. Er konnte zeigen, dass Gallensäuren, unabhängig von ihrer Konjugation, in Konzentrationen wie sie bei Cholestase vor

kommen sowohl an isolierten ventrikulären Rattenkardiomyozyten sowie auch an ventrikulären Muskelstreifen einen negativ inotropen Effekt aufweisen. Er führte diese Effekte der Gallensäuren unter anderem auf eine Veränderung der ventrikulären Aktionspotentialdauer zurück (121).

Joubert et al beschrieb in seiner Arbeit, dass Gallensäuren einen negativ chronotropen Effekt am intakten atrialen Rattenmyokard haben wohingegen er keinen negativ inotropen Effekt nachweisen konnte. Er begründete seine Ergebnisse damit, dass Gallensäuren keinen direkten Einfluss auf die Ionenkanäle an Herzmuskelzellen aufweisen würden, sondern über einen membrangebundenen Mechanismus wirken (121).

Eine mögliche Erklärung für die beiden unterschiedlichen Effekte von Gallensäuren am Rattenmyokard liegt darin begründet, dass Joubert atriales Rattenmyokard verwendete wohingegen Binah in seinen Versuchen ausschließlich ventrikuläres Herzmuskelgewebe benutzte. Des Weiteren verwendete Joubert deutlich höhere Gallensäurekonzentrationen als Binah in seinen Versuchen, was den negativ chronotropen Effekt der Gallensäuren erklären könnte (121).

Stellt man die Ergebnisse der Muskelstreifenexperimente mit humanen atrialen Herzmuskelgewebe mit den Daten von Joubert und Binah in Bezug so liegt die Erklärung für die unterschiedlichen beobachteten Ergebnisse womöglich darin begründet, dass es sowohl speziesabhängige Unterschiede in den zellulären Eigenschaften des Herzmuskelgewebes zwischen Menschen und Ratten gibt wie auch Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Herzmuskelgewebe. Des Weiteren haben die unterschiedlich verwendeten Gallensäure Konzentrationen einen Einfluss auf die Kontraktionskraftveränderungen am Myokard.

4.2 Gallensäure-induzierte Arrhythmien am adulten humanen atrialen Herzmuskelgewebe

Neben dem Einfluss der Gallensäuren auf das Kontraktionsverhalten des humanen Vorhofgewebes wurde auch die arrhythmogene Potenz der verschiedenen konjugierten primären Gallensäuren auf menschliche Vorhofmuskelstreifen anhand von Muskelstreifenexperimenten untersucht. Hierzu wurden ebenfalls die oben genannten vier Gallensäuren (TCA/TCDCA/GCA/GCDCA) in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M) sowie mit verschiedenen Stimulationsfrequenzen (1 Hz und 0.5 Hz) getestet.

Die durchgeführten Muskelstreifenexperimente (n=60) konnten zeigen, dass die vier unterschiedlich konjugierten primären Gallensäuren allesamt am humanen Vorhoftrabekeln zu Arrhythmien führen.

4.2.1 Einfluss der Gallensäure-Konjugation auf die Entstehung von Arrhythmien

In den beschriebenen Muskelstreifenexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von Arrhythmien am adulten humanen Vorhofmuskelgewebe unabhängig von der jeweiligen Konjugation der primären Gallensäuren mit Taurin oder Glycin auftreten.

Im Gegensatz zu den Messungen am adulten humanen Herzmuskelgewebe konnte Gorelik et al zeigen, dass bei in vitro Versuchen Taurin-konjugierte Gallensäuren an neonatalen Rattenkardiomyozyten einen stärkeren proarrhythmogenen Effekt aufgewiesen haben als Glycin-konjugierte Gallensäuren mit den gleichen Konzentrationen. Außerdem konnte Gorelik et al zeigen, dass die arrhythmogenen Effekte von Glycin-konjugierten Gallensäuren nach einer Auswaschphase vollständig reversibel waren, wohingegen Trabekeln mit Taurin-konjugierten Gallensäuren auch nach einer Auswaschphase immer noch vereinzelte Arrhythmien zeigten (106).

Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse liegt womöglich in der Tatsache, dass die Konjugation der primären Gallensäuren mit Taurin oder Glycin an neonatalen Rattenkardiomyozyten einen anderen Stellwert besitzt als diese es bei adulten humanen Vorhofgewebe tut.

Als mögliche Ursachen für den unterschiedlichen Effekt der Gallensäurekonjugation auf die Entstehung von Arrhythmien können einerseits die verschiedenen verwendeten Spezies, wie auch das unterschiedlich verwendete Gewebe – auf der einen Seite Kulturen von Rattenkardiomyozyten und auf der anderen Seite intakte humane Vorhofmuskelstreifen – sowie auch die Verwendung von neonatalen Zellen auf der einen Seite und adulten Gewebe auf der anderen Seite in Frage kommen.

4.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Gallensäure-induzierten Arrhythmien

Die Muskelstreifenexperimente zeigten außerdem, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Arrhythmien und den unterschiedlich gewählten Konzentrationen der Gallensäuren gibt. So traten bei niedrigen Gallensäurekonzentrationen von 10µM bis 100µM nur vereinzelte Extraschläge auf. Hingegen konnte bei Konzentrationen von 300µM und 1000µM der Gallensäuren ein statistisch signifikantes Auftreten von Arrhythmien im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Gallensäure Zugabe beobachtet werden.

Dieser konzentrationsabhängige Effekt der Gallensäure induzierten Arrhythmien am adulten humanen Vorhofgewebe konnte auch von Gorelik et al an isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten gezeigt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Gallensäure induzierten Effekte (vor allem Taurin konjugierter Gallensäuren) nach maximalen Konzentrationen von 1 mM nicht mehr vollständig reversibel waren (104).

Als mögliche Erklärung für die dosisabhängige Gallensäuren Wirkung auf die Entstehung von Arrhythmien an isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten wurde von Gorelik et al eine Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase durch die Gallensäuren angenommen. Dies geschieht, indem die Gallensäure TCA zu einer Verlangsamung der diastolischen Depolarisation und dadurch zu einer Verlängerung des Ca^{2+} Einstromes sowie des zeitabhängigen K^+ Ausstromes aus der Zelle führt. Zusätzlich beschreibt Gorelik et al, dass die Gallensäure TCA einen Stimulus für die Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten darstellt. Aufgrund der vermehrten

Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR würde die Arrhythmieeigung der Kardiomyozyten steigern und somit die erhöhte Arrhythmieinzidenz erklären (104).

4.2.3 Frequenzabhängigkeit der Gallensäure-induzierten Arrhythmien

Anhand der durchgeführten Muskelstreifenexperimente konnte gezeigt werden, dass die Gallensäure induzierten Arrhythmien am adulten humanen atrialen Myokard eine starke Frequenzabhängigkeit aufweisen. Bei niedriger (bradykarder) Stimulationsfrequenz mit 0.5 Hz kam es zum Auftreten von deutlich mehr Arrhythmien als bei einer Stimulation mit 1 Hz bei gleichen Konzentrationsverhältnissen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es bei bradykarder Stimulation unter Gallensäurewirkung nicht nur zu einer deutlichen Erhöhung der Arrhythmieinzidenz kam, sondern dass die aufgetretenen Arrhythmien auch deutlich an Stärke zugenommen haben im Vergleich zu einer Stimulationsfrequenz mit 1 Hz.

Gorelik et al konnte zeigen, dass Taurocholsäure unterschiedliche Effekte an isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten aufweist. Einige der Zellen wurden nach TCA Zugabe bradykard, andere wiederum entwickelten Tachykardien bis hin zu irreversiblen Flimmern und anschließender Asystolie der Zellen. Gorelik et al begründete dieses unterschiedliche Verhalten der Rattenkardiomyozyten nach TCA Gabe durch den Verlust des intakten Netzwerkes zwischen den einzelnen Zellen sowie den Verlust der Synchronität untereinander wie auch durch individueller Störungen innerhalb der Zellen, welche eine kontrollierte Kontraktion nicht mehr zuließen (104).

4.3 Wirkungsmechanismus der Gallensäure-induzierten Arrhythmien am adulten humanen Vorhofmyokard

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Gallensäuren am adulten humanen Vorhofmuskelgewebe zu dosis- und frequenzabhängigen Arrhythmien führen können, welche jedoch unabhängig von der jeweiligen Konjugation der Gallensäuren auftreten. Außerdem wurde gezeigt, dass die verwendeten Gallensäuren keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktionskraftveränderung am adulten humanen Vorhofmyokard aufweisen.

In einem nächsten Schritt sollten die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Gallensäure Wirkung am adulten humanen atrialen Herzmuskelgewebe aufgeklärt werden. Basierend auf den Daten von Gorelik et al, welche in ihrer Arbeit über Gallensäure induzierte Arrhythmien an isolierten neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten zeigen konnte, dass die Gallensäure TCA einerseits zu einer Veränderung der Membrandepolarisation der isolierten Kardiomyozyten führt und andererseits Einfluss auf die Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der isolierten Rattenkardiomyozyten besitzt (104) wurde in die vorliegenden Arbeit der Einfluss der Gallensäure TCA auf die Aktionspotentialdauer einerseits und auf die beiden wichtigsten Ca^{2+} abhängigen Ionenkanäle (L-Typ- Ca^{2+} Kanal und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) der Kardiomyozyten von adulten humanen Vorhofmuskelgewebe andererseits untersucht.

4.3.1 Einfluss der Gallensäure TCA auf die Aktionspotentialdauer des adulten humanen atrialen Herzmuskelgewebes

Bei der Entstehung von Arrhythmien spielen Änderungen der Aktionspotentialdauer eine wichtige Rolle. Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Aktionspotentialänderungen. Auf der einen Seite „Early Afterdepolarizations“ (EADs) und auf der anderen Seite „Delayed Afterdepolarizations“ (DADs). EADs werden durch eine Beeinflussung des L-Typ- Ca^{2+} Kanals ausgelöst wohingegen DADs vor allem mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) in Verbindung gebracht werden (124-126).

Vor allem eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer wirkt sich positiv auf die Entwicklung von Arrhythmien aus. Um den Einfluss der Gallensäure TCA auf die Aktionspotentialdauer am multizellulären Vorhofmuskelgewebe des Menschen untersuchen zu können, musste man sich einer Ersatzmessgröße bedienen, da die Messung der Aktionspotentialdauer direkt am multizellulären Gewebe im Rahmen der Diplomarbeit technisch nicht durchführbar war. Daher wurde die absolute Refraktärzeit als indirekte Messgröße für die Aktionspotentialdauer an den Herzmuskelstreifen herangezogen. Es zeigte sich, dass es nach Zugabe von $300\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M}$ TCA zu einer statistisch signifikanten Zunahme der absoluten Refraktärzeiten auf $168\pm 9\text{ms}$ bei $300\mu\text{M}$ und $172\pm 12\text{ms}$ bei $1000\mu\text{M}$ im Vergleich zur Kontrolle $157\pm 11\text{ms}$ ($p < 0.05$ und $p < 0.01$) kam. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Gallensäure TCA zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer am multizellulären Vorhofmuskelgewebe führt und daher bei der Entstehung von Arrhythmien eine Rolle spielt.

4.3.2 Einfluss der Gallensäure TCA auf den L-Typ-Ca²⁺ Kanal

Der von Gorelik et al beschriebene direkte Effekt der Gallensäure TCA auf die Ca²⁺ induzierte Ca²⁺ Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der isolierten Rattenkardiomyozyten und der damit verbundenen Arrhythmien (104) kann entweder über den L-Typ-Ca²⁺ Kanal (LCCT) oder aber über den Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) der Kardiomyozyten vermittelt sein. Da die Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch die Gallensäure TCA sowie die Frequenzabhängigkeit der Gallensäure induzierten Arrhythmien bei bradykarder Stimulation mit 0.5 Hz am adulten humanen multizellulären Vorhofmuskelgewebe allerdings am ehesten für Veränderung der Aktionspotentialdauer im Sinne von „Early Afterdepolarizations“ (EADs) sprechen und diese durch den L-Typ-Ca²⁺ Kanal vermittelt werden (125,126), wurde zuerst der Einfluss der Gallensäure TCA auf den L-Typ-Ca²⁺ Kanal untersucht.

Es erfolgte eine Blockade des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM Diltiazem sowie eine Aktivierung des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM BayK8644.

Die Hypothese lautete, dass es durch die Blockade des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM Diltiazem und die damit verbundene Verminderung des intrazellulären Ca²⁺ zu einer Senkung der durch TCA verursachten Arrhythmien kommen sollte. Hingegen sollte eine Aktivierung des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM BayK8644 und die dadurch bedingte Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ zu einer Steigerung der Arrhythmien führen. Die Gallensäure Wirkung am adulten humanen Vorhofmuskelgewebe auf die Entstehung von Arrhythmien wäre somit über den L-Typ-Ca²⁺ Kanal vermittelt und es würden daher zahlreiche Möglichkeiten der therapeutischen Interventionen bestehen um das Auftreten der Arrhythmien zu verhindern.

Die Ergebnisse der durchgeführten Muskelstreifenexperimente widerlegten die postulierte Hypothese jedoch klar. So zeigte sich durch die Blockade des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM Diltiazem eine statistisch signifikante Erhöhung der durch die Gallensäure TCA verursachten Arrhythmien. Hingegen bewirkte eine Stimulation des L-Typ-Ca²⁺ Kanals mit 1µM BayK8644 ein fast vollständiges Sistieren der durch die Gallensäuren ausgelösten Arrhythmien.

Daraus ergibt sich der Schluss, dass die Aktivität des L-Typ-Ca²⁺ Kanals invers mit der Inzidenz der Gallensäure induzierten Arrhythmien am menschlichen Herz

korreliert. Daher ist eine direkte Wirkung der Gallensäuren über eine Aktivierung des L-Typ- Ca^{2+} Kanals am adulten humanen Vorhofmuskelgewebe als sehr unwahrscheinlich zu erachten und liefert nicht die Erklärung für die beschriebenen arrhythmogenen Effekte der Gallensäuren.

4.3.3 Einfluss der Gallensäure TCA auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Ca^{2+} Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von Kardiomyozyten besteht über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX). Da es neben den bereits beschriebenen Aktionspotentialänderungen im Sinne von „Early Afterdepolarizations“ (EADs) auch „Delayed Afterdepolarizations“ (DADs) gibt und diese in Verbindung mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger stehen wurde abschließend in dieser Arbeit der Einfluss der Gallensäure TCA auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger untersucht.

Es erfolgte eine Blockade des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) im „reverse mode“ durch $5\mu\text{M}$ KB-R7943.

Die Hypothese lautete, dass die Blockade des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) im „reverse mode“ durch $5\mu\text{M}$ KB-R7943 zu einer Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} führt und es somit zu einer Reduktion der durch TCA ausgelösten Arrhythmien kommt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Muskelstreifenexperimente konnten diese Hypothese allerdings ebenfalls eindeutig widerlegen. Es kam nicht wie angenommen zu einer Reduktion der Gallensäure induzierten Arrhythmien durch die Blockade des NCX sondern es zeigten sich statistisch signifikant mehr Arrhythmien als vor der Blockade des NCX im reverse mode.

Daraus kann man schließen, dass die proarrhythmogene Wirkung der Gallensäuren am menschlichen Herz auch nicht über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die proarrhythmogenen Eigenschaften der Gallensäuren am adulten humanen Vorhofmyokard weder durch eine Aktivierung des L-Typ- Ca^{2+} Kanals noch des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers vermittelt werden. Daher ist eher von einer unspezifischen membrangebundenen Wirkung der Gallensäuren am menschlichen Kardiomyozyten auszugehen. Über diese Wirkungsweise der Gallensäuren kann es zur Beeinflussung von intrazellulären Second Messenger Systemen kommen, welche ausschlaggebend für die Entwicklung der Arrhythmien sind.

Die Daten dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gorelik et al, welche eine direkte Beeinflussung der Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) an isolierten Rattenkardiomyozyten über den L-Typ- Ca^{2+} Kanal (LCCT) oder über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) beschrieben hatte (104).

Mögliche Erklärungsversuche für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in den verschiedenen verwendeten Modellen liegen. Einerseits wurde die Wirkung der Gallensäuren an isolierten Rattenkardiomyozyten getestet auf der anderen Seite wurde humanes multizelluläres Herzmuskelgewebe verwendet. Auch die Verwendung von neonatalen und adulten Gewebe sowie von einerseits ventrikulären und andererseits atrialen Herzmuskelgewebe könnte eine Rolle spielen.

4.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es durch Gallensäuren am adulten humanen multizellulären Vorhofmuskelgewebe zur Entwicklung von dosis- und frequenzabhängigen Arrhythmien kommt. Diese lassen sich auf eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch die Gallensäuren zurückführen. Ein direkter Einfluss der Gallensäuren über eine Aktivitätssteigerung Ca^{2+} transportierender Membranproteine (L-Typ- Ca^{2+} Kanal und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) konnte hingegen am menschlichen Herzmuskelgewebe nicht nachgewiesen werden womit am ehesten eine unspezifische membrangebundene Wirkung der Gallensäuren in Frage kommt. In diesem Zusammenhang könnte die Rolle des Ca^{2+} als second messenger eine wichtige Rolle spielen.

Kürzlich publizierte Daten zeigten, dass die Gallensäure induzierten Arrhythmien an neonatalen Rattenkardiomyozyten nicht wie angenommen über den L-Typ- Ca^{2+} Kanal oder den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger vermittelt werden, sondern über Muskarin M_2 Rezeptoren. Dabei üben Gallensäuren einen partiellen Agonismus an den M_2 Unterrezeptoren der Muskarin Rezeptoren aus (107).

Die Aufklärung der genauen Wirkmechanismen Gallensäure induzierter Arrhythmien am menschlichen Herzen und die Prüfung kontroversieller Befunde wird Gegenstand weiterer Studien sein.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Hering S, Savchenko A, Strubing C, Lakitsch M, Striessnig J. Extracellular localization of the benzothiazepine binding domain of L-type Ca²⁺ channels. *Mol Pharmacol* 1993 May;43(5):820-826.
- (2) Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. *Pflugers Arch* 2002 Dec;445(3):305-310.
- (3) Pieske B, Schlotthauer K, Schattmann J, Beyersdorf F, Martin J, Just H, et al. Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent regulation of contractility in isolated human myocardium. *Basic Res Cardiol* 1997;92 Suppl 1:75-86.
- (4) Mangoni ME, Fontanaud P, Noble PJ, Noble D, Benkemoun H, Nargeot J, et al. Facilitation of the L-type calcium current in rabbit sino-atrial cells: effect on cardiac automaticity. *Cardiovasc Res* 2000 Dec;48(3):375-392.
- (5) Maier LS, Barckhausen P, Weisser J, Aleksic I, Baryalei M, Pieske B. Ca(2+) handling in isolated human atrial myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Sep;279(3):H952-8.
- (6) Bers DM: *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force 2 Auflage*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001 .
- (7) Harrison SM, McCall E, Boyett MR. The relationship between contraction and intracellular sodium in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1992 Apr;449:517-550.
- (8) Boyett MR, Frampton JE, Harrison SM, Kirby MS, Levi AJ, McCall E, Milner DR, Orchard CH. The role of intracellular calcium, sodium and ph in rate-dependent changes of cardiac contractile force. In: "The interval-force relationship of the heart: Bowditch revisited", edited by Noble MIM and Seed WA Cambridge: Cambridge University Press 1992; 111-172 .
- (9) Piot C, Lemaire S, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S. High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 1996 Jan 1;93(1):120-128.
- (10) Morgan JP, Blinks JR. Intracellular Ca²⁺ transients in the cat papillary muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1982 Apr;60(4):524-528.
- (11) Gwathmey JK, Slawsky MT, Hajjar RJ, Briggs GM, Morgan JP. Role of intracellular calcium handling in force-interval relationships of human ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1990 May;85(5):1599-1613.

- (12) Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, et al. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995 Sep 1;92(5):1169-1178.
- (13) Frank K, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractility. *Ann Med* 2000 Nov;32(8):572-578.
- (14) Eisner DA, Diaz ME, O'Neill SC, Trafford AW. Physiological and pathological modulation of ryanodine receptor function in cardiac muscle. *Cell Calcium* 2004 Jun;35(6):583-589.
- (15) Grimm M, Haas P, Willipinski-Stapelfeldt B, Zimmermann WH, Rau T, Pantel K, et al. Key role of myosin light chain (MLC) kinase-mediated MLC2a phosphorylation in the alpha 1-adrenergic positive inotropic effect in human atrium. *Cardiovasc Res* 2005 Jan 1;65(1):211-220.
- (16) De Mello WC. Heart failure: how important is cellular sequestration? The role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Cell Cardiol* 2004 Aug;37(2):431-438.
- (17) Meyer M, Lehnart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C, et al. Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium--myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol* 1996 Jan-Feb;91(1):86-93.
- (18) Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, et al. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 1999 Apr 13;99(14):1802-1809.
- (19) Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, Bond M. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Feb 28;159(1):14-18.
- (20) Namekata I, Fujiki S, Kawakami Y, Moriwaki R, Takeda K, Kawanishi T, et al. Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008 Feb;376(6):385-395.
- (21) Bootman MD, Harzheim D, Smyrniak I, Conway SJ, Roderick HL. Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1. *Cell Calcium* 2007 Oct-Nov;42(4-5):489-501.
- (22) Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, et al. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation* 1993 Sep;88(3):1228-1237.

- (23) Holubarsch C, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Duis J, Pieske B, Ruf T, et al. Functional significance of angiotensin receptors in human myocardium. Significant differences between atrial and ventricular myocardium. *Eur Heart J* 1994 Dec;15 Suppl D:88-91.
- (24) Globits S, Frank H, Pacher B, Huelsmann M, Ogris E, Pacher R. Atrial natriuretic peptide release is more dependent on atrial filling volume than on filling pressure in chronic congestive heart failure. *Am Heart J* 1998 Apr;135(4):592-597.
- (25) Venugopal J. Cardiac natriuretic peptides--hope or hype? *J Clin Pharm Ther* 2001 Feb;26(1):15-31.
- (26) Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002 Jan 10;415(6868):198-205.
- (27) Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;51:367-384.
- (28) Callewaert G. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovasc Res* 1992 Oct;26(10):923-932.
- (29) Barcenas-Ruiz L, Beuckelmann DJ, Wier WG. Sodium-calcium exchange in heart: membrane currents and changes in $[Ca^{2+}]_i$. *Science* 1987 Dec 18;238(4834):1720-1722.
- (30) Gaughan JP, Furukawa S, Jeevanandam V, Hefner CA, Kubo H, Margulies KB, et al. Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H714-24.
- (31) Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983 Jul;245(1):C1-14.
- (32) Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006 Dec;21:380-387.
- (33) Wu QY, Feher JJ. Effect of ischemia and ischemia--reperfusion on ryanodine binding and Ca^{2+} uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1995 Sep;27(9):1965-1975.
- (34) Soeller C, Cannell MB. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res* 1999 Feb 19;84(3):266-275.
- (35) Izu LT, Wier WG, Balke CW. Evolution of cardiac calcium waves from stochastic calcium sparks. *Biophys J* 2001 Jan;80(1):103-120.
- (36) Gulati J, Scordilis S, Babu A. Effect of troponin C on the cooperativity in Ca^{2+} activation of cardiac muscle. *FEBS Lett* 1988 Aug 29;236(2):441-444.

- (37) Hasselbach W, Makinose M (1961): Die Kalziumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem Z* 333, 518-528.
- (38) James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989 Nov 2;342(6245):90-92.
- (39) Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG. Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1990 Jan 25;265(3):1702-1709.
- (40) Huggins JP, England PJ. Evidence for a phosphorylation-induced conformational change in phospholamban from the effects of three proteases. *FEBS Lett* 1987 Jun 8;217(1):32-36.
- (41) Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 1996 Dec;79(6):1059-1063.
- (42) Dhalla KS, Rupp H, Beamish RE, Dhalla NS. Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport due to excess catecholamines. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996 Jun;10 Suppl 1:231-238.
- (43) Bers DM, Bridge JH. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res* 1989 Aug;65(2):334-342.
- (44) Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998 Feb;37(2):279-289.
- (45) Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002 Aug;34(8):951-969.
- (46) Cheng H, Cannell MB, Lederer WJ. Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1994 Oct;428(3-4):415-417.
- (47) McNutt NS, Fawcett DW. The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle. *J Cell Biol* 1969 Jul;42(1):46-67.
- (48) Cordeiro JM, Spitzer KW, Giles WR, Ershler PE, Cannell MB, Bridge JH. Location of the initiation site of calcium transients and sparks in rabbit heart Purkinje cells. *J Physiol* 2001 Mar 1;531(Pt 2):301-314.
- (49) Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Ball WJ, Jr, Vaghy PL, et al. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol* 1995 May;129(3):673-682.

- (50) Fenoglio JJ, Jr, Pham TD, Hordof A, Edie RN, Wit AL. Right atrial ultrastructure in congenital heart disease. II. Atrial septal defect: effects of volume overload. *Am J Cardiol* 1979 Apr;43(4):820-827.
- (51) Jorgensen AO, Shen AC, Arnold W, McPherson PS, Campbell KP. The Ca²⁺-release channel/ryanodine receptor is localized in junctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *J Cell Biol* 1993 Feb;120(4):969-980.
- (52) Huser J, Lipsius SL, Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol* 1996 Aug 1;494 (Pt 3)(Pt 3):641-651.
- (53) Kockskamper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA. Activation and propagation of Ca(2+) release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J* 2001 Nov;81(5):2590-2605.
- (54) Skomedal T, Aass H, Osnes JB, Fjeld NB, Klingen G, Langslet A, et al. Demonstration of an alpha adrenoceptor-mediated inotropic effect of norepinephrine in human atria. *J Pharmacol Exp Ther* 1985 May;233(2):441-446.
- (55) Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996 Feb 15;491 (Pt 1)(Pt 1):31-50.
- (56) Boknik P, Unkel C, Kirchhefer U, Kleideiter U, Klein-Wiele O, Knapp J, et al. Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc Res* 1999 Jul;43(1):67-76.
- (57) Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 1995 Mar 13;155(5):469-473.
- (58) Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 1998 Oct 16;82(8A):2N-9N.
- (59) Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998 Sep 8;98(10):946-952.
- (60) Neuzner, J.e.a. 2007, "Vorhofflimmern. Vorhofflattern. Aktuelle Diagnostik und Therapie" in , 2. Auflage edn, Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp. S. 4.
- (61) Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). *Eur Heart J* 2006 Aug;27(16):1979-2030.

- (62) Levy S, Camm AJ, Saksena S, Aliot E, Breithardt G, Crijns H, et al. International consensus on nomenclature and classification of atrial fibrillation; a collaborative project of the Working Group on Arrhythmias and the Working Group on Cardiac Pacing of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Europace* 2003 Apr;5(2):119-122.
- (63) Levy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, et al. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation* 1999 Jun 15;99(23):3028-3035.
- (64) Healey JS, Connolly SJ. Atrial fibrillation: hypertension as a causative agent, risk factor for complications, and potential therapeutic target. *Am J Cardiol* 2003 May 22;91(10A):9G-14G.
- (65) Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002 May;54(2):230-246.
- (66) Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet* 2010 Mar;42(3):240-244.
- (67) Freestone B, L.G. 2003, "Epidemiology and costs of cardiac arrhythmias." in *Cardiac arrhythmias: a clinical approach.*, ed. Lip GYH, Godtfredsen J, eds., Mosby, Edinburgh, pp. 3-24.
- (68) Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):939-942.
- (69) Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye RL, et al. ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 2001 Oct 23;104(17):2118-2150.
- (70) Boodhoo LE, Mitchell AR, Sulke N. The clinical and electrophysiological implications of asymptomatic atrial fibrillation. *Minerva Cardioangiol* 2004 Dec;52(6):547-552.
- (71) Thibault B, Talajic M, Dubuc M, Guerra P, Gagne P, Roy D, et al. Thromboembolic events occur despite sinus rhythm maintenance in patients treated for atrial fibrillation: The Canadian Trial of Atrial Fibrillation experience. *Can J Cardiol* 2004 Feb;20(2):195-199.
- (72) Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and stroke : concepts and controversies. *Stroke* 2001 Mar;32(3):803-808.

- (73) Mewis, C., Neuberger, H.R. & Bohm, M. 2006, "Atrial fibrillation", *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946), vol. 131, no. 50, pp. 2843-54, quiz 2855-6.
- (74) Moe, G. 1962, "On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation", *Arch Int Pharmacodyn Ther*, vol. 140, pp. 183-188.
- (75) Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002 May;54(2):204-216.
- (76) Levy S, Sbragia P. Remodelling in atrial fibrillation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005 Apr;98(4):308-312.
- (77) Skasa M, Jungling E, Picht E, Schondube F, Luckhoff A. L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2001 Apr;96(2):151-159.
- (78) Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999 Oct;44(1):121-131.
- (79) Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999 Sep 3;85(5):428-436.
- (80) Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Villeneuve L, Hebert TE, et al. Characterization of a hyperpolarization-activated time-dependent potassium current in canine cardiomyocytes from pulmonary vein myocardial sleeves and left atrium. *J Physiol* 2004 Jun 1;557(Pt 2):583-597.
- (81) Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, et al. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001 Nov 20;104(21):2551-2557.
- (82) Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, et al. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005 Dec 13;112(24):3697-3706.
- (83) Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001 Nov;52(2):226-235.
- (84) Bosch RF, Scherer CR, Rub N, Wohrl S, Steinmeyer K, Haase H, et al. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I(Ca,L) and I(to) in rapid atrial pacing in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 2003 Mar 5;41(5):858-869.

- (85) Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995 Oct 1;92(7):1954-1968.
- (86) Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995 Mar 1;91(5):1588-1595.
- (87) Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003 May;98(3):137-148.
- (88) Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allesie M. Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* 2003 Mar 18;107(10):1433-1439.
- (89) Rockson SG, Albers GW. Comparing the guidelines: anticoagulation therapy to optimize stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2004 Mar 17;43(6):929-935.
- (90) L'Allier PL, Ducharme A, Keller PF, Yu H, Guertin MC, Tardif JC. Angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive patients is associated with a reduction in the occurrence of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2004 Jul 7;44(1):159-164.
- (91) Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology* 2004 Aug;40(2):467-474.
- (92) Lammert F, Marschall HU, Glantz A, Matern S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol* 2000 Dec;33(6):1012-1021.
- (93) Lammert F, Marschall HU, Matern S. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003 Apr;6(2):123-132.
- (94) Reyes H, Gonzalez MC, Ribalta J, Aburto H, Matus C, Schramm G, et al. Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in Chile. *Ann Intern Med* 1978 Apr;88(4):487-493.
- (95) Reyes H, Taboada G, Ribalta J. Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in La Paz, Bolivia. *J Chronic Dis* 1979;32(7):499-504.
- (96) Arrese M, Reyes H. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a past and present riddle. *Ann Hepatol* 2006 Jul-Sep;5(3):202-205.
- (97) Glantz A, Marschall HU, Lammert F, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2005 Dec;42(6):1399-1405.

- (98) Brites D, Rodrigues CM, Oliveira N, Cardoso M, Graca LM. Correction of maternal serum bile acid profile during ursodeoxycholic acid therapy in cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 1998 Jan;28(1):91-98.
- (99) Gorelik J, Shevchuk AI, Diakonov I, de Swiet M, Lab M, Korchev Y, et al. Dexamethasone and ursodeoxycholic acid protect against the arrhythmogenic effect of taurocholate in an in vitro study of rat cardiomyocytes. *BJOG* 2003 May;110(5):467-474.
- (100) Al Inizi S, Gupta R, Gale A. Fetal tachyarrhythmia with atrial flutter in obstetric cholestasis. *Int J Gynaecol Obstet* 2006 Apr;93(1):53-54.
- (101) Sant'Anna AM, Fouron JC, Alvarez F. Neonatal cholestasis associated with fetal arrhythmia. *J Pediatr* 2005 Feb;146(2):277-280.
- (102) Shand AW, Dickinson JE, D'Orsogna L. Refractory fetal supraventricular tachycardia and obstetric cholestasis. *Fetal Diagn Ther* 2008;24(3):277-281.
- (103) Abdul Kadir SH, Ali NN, Mioulane M, Brito-Martins M, Abu-Hayyeh S, Foldes G, et al. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med* 2009 Sep;13(9B):3730-3741.
- (104) Gorelik J, Harding SE, Shevchuk AI, Koralage D, Lab M, de Swiet M, et al. Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics. *Clin Sci (Lond)* 2002 Aug;103(2):191-200.
- (105) Williamson C, Gorelik J, Eaton BM, Lab M, de Swiet M, Korchev Y. The bile acid taurocholate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra-uterine fetal death in obstetric cholestasis. *Clin Sci (Lond)* 2001 Apr;100(4):363-369.
- (106) Gorelik J, Shevchuk A, de Swiet M, Lab M, Korchev Y, Williamson C. Comparison of the arrhythmogenic effects of tauro- and glycoconjugates of cholic acid in an in vitro study of rat cardiomyocytes. *BJOG* 2004 Aug;111(8):867-870.
- (107) Sheikh Abdul Kadir SH, Miragoli M, Abu-Hayyeh S, Moshkov AV, Xie Q, Keitel V, et al. Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoS One* 2010 Mar 15;5(3):e9689.
- (108) Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR. The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflugers Arch* 1990 Apr;416(1-2):219-221.
- (109) Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP. Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. *Am J Physiol* 1992 Aug;263(2 Pt 2):H503-10.

- (110) Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circ Res* 1991 Nov;69(5):1280-1292.
- (111) Fryer MW, Gage PW, Neering IR, Dulhunty AF, Lamb GD. Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase. *Pflugers Arch* 1988 Jan;411(1):76-79.
- (112) Phillips RM, Altschuld RA. 2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Dec 4;229(1):154-157.
- (113) Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 1989 Nov;65(5):1441-1449.
- (114) Fagbemi OS, Brack K, Golar S, Crisp D, Economides A. Electrophysiological and biochemical changes in rabbit hearts stored at 4 degrees C for 6 or 24 h. *Clin Sci (Lond)* 2001 Oct;101(4):367-376.
- (115) KOCH-WESER J. Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. *Am J Physiol* 1963 Mar;204:451-457.
- (116) Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM. Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol* 1981 Sep;241(3):H348-53.
- (117) Thomas G, Chung M, Cohen CJ. A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circ Res* 1985 Jan;56(1):87-96.
- (118) Finet M, Godfraind T, Khoury G. The positive inotropic action of the nifedipine analogue, Bay K 8644, in guinea-pig and rat isolated cardiac preparations. *Br J Pharmacol* 1985 Sep;86(1):27-32.
- (119) Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schafer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1868-76.
- (120) Perez NG, de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the Na⁺-Ca²⁺ exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res* 2001 Mar 2;88(4):376-382.
- (121) Binah O, Rubinstein I, Bomzon A, Better OS. Effects of bile acids on ventricular muscle contraction and electrophysiological properties: studies in rat papillary muscle and isolated ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987 Feb;335(2):160-165.
- (122) Kotake H, Itoh T, Watanabe M, Hisatome I, Hasegawa J, Mashiba H. Effect of bile acid on electrophysiological properties of rabbit sino-atrial node in vitro. *Br J Pharmacol* 1989 Oct;98(2):357-360.

(123) Rainer P, Huber M, Primessnig U, Sedej S, Halilbasic E, Kockskämper A, et al.

(124) Cranefield PF, Aronson RS. Torsade de pointes and other pause-induced ventricular tachycardias: the short-long-short sequence and early afterdepolarizations. *Pacing Clin Electrophysiol* 1988 Jun;11(6 Pt 1):670-678.

(125) January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 1989 May;64(5):977-990.

(126) Marban E, Robinson SW, Wier WG. Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J Clin Invest* 1986 Nov;78(5):1185-1192.

6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Uwe Primessnig
Geburtsdatum: 29/07/1986
Geburtsort: Bruck an der Mur
Staatsbürgerschaft: Österreich
Wohnort: Rembrandtgasse 11, A - 8010 Graz
E-Mail Adresse: uwe.primessnig@stud.medunigraz.at



Ausbildung:

Grundschule: Volksschule Allerheiligen im Mürztal	1993 – 1997
Gymnasium: BG/BRG Bruck an der Mur	1997 – 2005
Zivildienst: Österreichisches Rotes Kreuz	2005 – 2006
Ausbildung zum Rettungssanitäter	Februar 2006
Auswahlverfahren Humanmedizin Meduni Graz	September 2006
Beginn des Medizinstudiums an der Meduni Graz	Oktober 2006
Abschluss 1. Diplomprüfungszeugnis	Juli 2007
Ausbildung zum Notfallsanitäter mit Notfallkompetenzen	Jänner 2009
Diplomarbeit Klinische Abteilung für Kardiologie	Nov. 2009 – April 2011
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am ZMF	Februar 2011
Abschluss 2. Diplomprüfungszeugnis	März 2011
Famulaturen:	
Famulatur Innere Medizin LKH Bruck an der Mur	2007, 2009, 2010
Famulatur Innere Medizin Medizinische Universität Heidelberg	2010
Famulatur Anästhesiologie und Intensivmedizin Charite Berlin	2008
Famulatur Anästhesiologie Medizinische Universität Graz	2008
Famulatur Allgemeinmedizin	2009
Praktisches Jahr:	
Innere Medizin Deutsches Herzzentrum München	Februar – März 2011
Pädiatrie Medizinische Universität Graz	April – Mai 2011
Studienabschluss (voraussichtlich)	August 2011

Qualifikationen:

Sprachen: Deutsch, Englisch
Computer: ECDL, SPSS, SigmaPlot, Refworks