

Diplomarbeit

**Modifikation arrhythmogener Effekte von
Gallensäuren durch Peptide am humanen
Vorhofmyokard**

eingereicht von

Sandra Harenkamp

Mat.Nr.: 0533409

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

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

Dr. Peter Rainer

München, den.....

Eidesstattliche Erklärung

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

München, den

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Diplomarbeitsbetreuer, Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Dirk von Lewinski für die großartige Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Er nahm sich immer Zeit, wenn es um die Klärung offener Fragen ging und verstand es, Studenten zu motivieren und für die Kardiologie zu begeistern. Ein weiterer Dank gilt Dr. Peter Rainer für hilfreiche Tipps und die gewissenhafte Korrektur meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch meinen Laborkollegen Dr. med. univ. Bernhard Doleschal, Uwe Primessnig und Dr. med. univ. Markus Wallner für das kollegiale Arbeitsklima. Insbesondere Dr. med. univ. Bernhard Doleschal unterstützte mich bei technischen Fragen der Messanlage. Des Weiteren möchte ich Dr. med. univ. Marie-Sophie Huber für die Einführung in die Handhabung der Messanlage danken.

Natürlich möchte ich an dieser Stelle auch Univ.-Prof. Dr. med. Burkert Mathias Pieske, dem Abteilungsleiter der Kardiologie, der die kardiologische Grundlagenforschung in Graz möglich macht, meinen Dank bekunden.

Ausserdem danke ich Ao. Univ.-Prof. Dr. med. univ. Ameli Yates und Ao. Univ.-Prof. Dr. med. univ. MA. MSc. Heinrich Mächler, für die Bereitstellung der Vorhofproben. Danke auch an Eva-Maria Gutschi für die zuverlässige und rasche Bestellung von zusätzlich benötigten Materialien.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich während meiner gesamten Studienzeit immer gefördert und unterstützt haben. Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund bedanken, der jederzeit für mich da war und mir den Rücken gestärkt hat.

Schlussendlich danke ich meinen Freunden, auf die ich immer zählen konnte und die meine Studienzeit in Graz sehr bereichert haben.

Inhaltsverzeichnis

Glossar und Abkürzungen	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung	XII
Abstract.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Myokardiale Kontraktion und Relaxation.....	1
1.1.1 Elektromechanische Koppelung.....	1
1.1.2 Besonderheiten der elektromechanischen Koppelung im Vorhofmyokard	2
1.2 Vorhofflimmern.....	3
1.2.1 Definition und Epidemiologie des Vorhofflimmerns.....	3
1.2.2 Ätiologie und Pathophysiologie des Vorhofflimmerns.....	4
1.3 Intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP).....	7
1.3.1 Epidemiologie und Definition der ICP.....	7
1.3.2 Pathogenese der ICP.....	7
1.3.3 Protektive pharmakologische Interventionen gegen ICP.....	9
1.4 Herzinsuffizienz.....	10
1.4.1 Epidemiologie und Definition der Herzinsuffizienz.....	10
1.4.2 Pathogenese der Herzinsuffizienz und wichtige Zusammenhänge zwischen Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern.....	10
1.5 Hypothesen und Ziele der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Beschreibung der Gewebeproben.....	15
2.2 Transport und Präparation des Herzgewebes.....	16
2.2.1 Kardioplegie.....	16
2.2.2 Transport.....	17
2.2.3 Materialien.....	18
2.2.4 Präparation der Muskelstreifen.....	18
2.3 Beschreibung der Messanlage.....	19
2.4 Versuchsprotokoll.....	22
2.4.1 Versuchsablauf.....	22
2.4.2 Pharmakologische Substanzen.....	23
2.4.3 Messprotokolle.....	25
2.4.4 Spezifische Probleme der Experimente am Vorhofmyokard.....	28
2.5 Auswertung.....	28
2.5.1 Computergestützte Datenerhebung.....	28
2.5.2 Manuelle Datenerhebung der AEKs.....	29
2.5.3 Statistische Auswertung.....	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Beschreibung der verwendeten Trabekel.....	30
3.2 Vergleich der beiden Gallensäuren TCA und UDCA.....	31
3.2.1 Arrhythmieentwicklung.....	31
3.2.2 Kraftentwicklung.....	33
3.3 Senkung der Arrhythmieschwelle durch Angiotensin II.....	35
3.3.1 Vergleich der Arrhythmiewirkungen.....	35
3.3.2 Kraftentwicklung.....	36
3.4 Blockade des AKT-Signalweges durch Wortmannin.....	38

3.4.1 Arrhythmieentwicklung.....	38
3.4.2 Kraftentwicklung.....	40
3.5 Blockade der CamKinase II durch KN-93.....	41
3.5.1 Arrhythmieentwicklung.....	41
3.5.2 Kraftentwicklung.....	43
4 Diskussion.....	46
4.1 Die Auswirkungen von TCA und UDCA auf den Rhythmus.....	46
4.2 Senkung der Arrhythmieschwelle durch Angiotensin II.....	49
4.2.1 Die Entwicklung von AEKs durch Angiotensin II und TCA.....	49
4.2.2 Die Kraftentwicklung durch AT II.....	51
4.3 Blockade des AKT – Signalweges durch Wortmannin.....	52
4.3.1 Wortmannin und dessen Auswirkungen auf den Rhythmus.....	52
4.3.2 Beeinflussung der Kontraktionskraft durch Wortmannin.....	53
4.4 Blockade der CamKinase II durch KN-93.....	53
4.4.1 Kardiale Wirkungen der CamK II.....	53
4.4.2 Auswirkungen der CaMK II - Blockade auf den Rhythmus.....	54
4.4.3 Auswirkungen durch KN-93 auf die Kontraktionskraft der Muskelstreifen	55
4.5 Klinische Relevanz.....	55
5 Limitationen.....	57
5.1 Auswahl der Gallensäuren.....	57
5.2 Methodik.....	57
5.3 Auswertung.....	57
5.4 Statistische Power.....	58
Anhang.....	59
A Literaturverzeichnis.....	59
B Anleitung der verwendeten Programme „Settingdatei_TFall50/90“ in Labchart	67
B.1 Beschreibung der Programme.....	67
B.2 Schrittweise Anleitung zur Anwendung.....	67
B.3 Probleme bei der Auswertung mit der Makrodatei.....	69
C Tabellenanhang.....	70
D Curriculum Vitae.....	76

Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AEK	Arrhythmische Extrakontraktion
AKE	Aortenklappenersatz
AKT	Proteinkinase B
AP	Aktionspotential
ARB	Angiotensin – Rezeptor - Blocker
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Angiotensin-Rezeptor
AT _{1/2} R	Angiotensin Typ 1/2 – Rezeptor
BDM	2,3-Butanedione-Monoxime
BMI	Body Mass Index
CA	Cholic acid
Ca ²⁺	Kalzium
[Ca ²⁺] _i	intrazellulärer Kalziumgehalt
CABG	Coronary artery bypass graft
CamK II	Calmodulin - abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodeoxycholic acid
CICR	Ca ²⁺ - induced Ca ²⁺ - release
Da	Dalton
DAD	delayed afterdepolarisation
DAG	Diacylglycerin
dF/dt _{max}	maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit, in [mN/mm ² /s]
dF/dt _{min}	maximale Kraftabfallsgeschwindigkeit, in [mN/mm ² /s]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	diastolische Kraft (diastolic tension), in [mN/mm ²]
EAD	early afterdepolarisation
EF	Ejektionsfraktion
F _{dev}	entwickelte Kraft (Force), in [mN/mm ²]
G _i – Protein	inhibitorisches G – Protein

GS	Gallensäure
Hz	Herz (Einheit)
ICP	Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, Intrahepatische Schwangerschaftscholestase
I.E.	Internationale Einheit
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
j-SR	junktionales sarkoplasmatisches Retikulum
KHK	koronare Herzerkrankung
L _{max}	Länge des Muskels bei maximaler Kraftentwicklung
m	männlich
M	mol/l
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
Mm	Musculi (Muskeln)
MW	Molekulargewicht (relative Molekülmasse)
Na ⁺	Natrium
NIE	negativ inotroper Effekt
NCX	Na ⁺ / Ca ²⁺ - Exchanger
nj-SR	nicht - junktionales sarkoplasmatisches Retikulum
p	Wert des gepaarten TTests im Vergleich zum Ausgangswert derselben Messung
p _#	Wert des ungepaarten TTests im Vergleich zum entsprechenden Wert der Kontrollmessung
PBC	primäre biliäre Zirrhose
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIE	positiv inotroper Effekt
PKB	Proteinkinase B
PLB	Phospholamban
RA(A)S	Renin-Angiotensin(-Aldosteron)-System
RT50	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation (relaxation time), in [ms]
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

SERCA	SR Ca ²⁺ - ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum; im Text auch verwendet für „sarkoplasmatisch“
ST	systolische Kraft (systolic tension), in[mN/mm ²]
STABW	Standardabweichung
TCA	Taurocholsäure
TPT	Zeitdauer bis zur maximal entwickelten Kraft (time to peak tension), in [ms]
TT90	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 90%igen Relaxation in [ms]
UDCA	Ursodeoxycholic acid
VHF	Vorhofflimmern
w	weiblich
*	signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert (meist L _{max} , bei Abb. 3.5: AT+0, Abb. 3.9: +AT, Abb. 3.14: +Wo, Abb. 3.19: +KN)
#	signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle gleicher Konzentration

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Ca ²⁺ -Stoffwechsel in einem Ventrikelmyozyten; aus {{27 Bers,D.M. 2002}}.....	2
Abb. 1.2: Drei Arten von atrialem remodelling aus {{55 Alessie,M. 2002}}.....	6
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des RAAS.....	11
Abb. 1.4: Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz.....	12
Abb. 2.5: Herzohr mit Mm pectinati aus dem rechten Vorhof {{141 Doleschal, B. 2010}}.....	15
Abb. 2.6: Präparation des Herzohres in der Präparationsschale {{141 Doleschal, B. 2010}}.....	19
Abb. 2.7: Messanlage mit vier Einheiten {{141 Doleschal, B. 2010}}.....	20
Abb. 2.8: Einzelne Messeinheit („Kanal“) der Viereranlage {{141 Doleschal, B. 2010}}.....	21
Abb. 2.9: Schematischer Aufbau des 2-Kammer Badsystems {{141 Doleschal, B. 2010}}.....	21
Abb. 2.10: Trabekel in der Messanlage fixiert.....	22
Abb. 2.11: Originalregistrierung des Versuchsablaufs bis L _{max} (sh.101123-vh; Ch 2).....	23
Abb. 2.12: Originalregistrierung AT II-Kontrolle mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Stimulation (sh.101124AT-vh, Ch 1).....	27
Abb. 2.13: Originalregistrierung AT II + TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Stimulation	27
Abb. 2.14: Originalregistrierung TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Schritten (sh.101202-vh, Ch 1).....	27
Abb. 2.15: Originalregistrierung Wortmannin + TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Schritten (sh.101123-vh, Ch 2).....	28
Abb. 3.16: Basale Kraftentwicklung der verwendeten Trabekel bei L _{max} vor Substanzgabe.....	31
Abb. 3.17: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA (links) und UDCA (rechts) bei 1Hz und 0,5 Hz bei steigender Konzentration.....	32
Abb. 3.18: Originalregistrierung der Entstehung von Arrhythmien bei 100µM TCA (deutliche AEKs sind mit Asterisken (*) gekennzeichnet) (sh.101201-vh, Ch1)....	33
Abb. 3.19: Kraftentwicklung: Vergleich der GS-Kontrolle (unbehandelte Muskeln, oben) mit TCA (links) und UDCA (rechts) bei 1Hz und 0,5 Hz bei steigender Konzentration.....	34
Abb. 3.20: Entwicklung von Arrhythmien durch AT und AT+TCA bei steigender TCA-Konzentration bei 1Hz (links) und 0,5 Hz (rechts).....	36
Abb. 3.21: Originalregistrierung der Entstehung von Arrhythmien bei 1mM TCA nach Präinkubation mit 3nM AT II (deutliche AEKs bei jedem Schlag), (sh.101122AT-vh, Ch 2).....	36
Abb. 3.22: Kraftentwicklung durch Angiotensin bei 1Hz und 0,5 Hz.....	37
Abb. 3.23: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach ATII – Applikation (sh.100510AT-vh, Ch 3).....	37
Abb. 3.24: Vergleich der Kraftentwicklung durch AT vs. AT+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts).....	38
Abb. 3.25: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA vs. Wortmannin+TCA bei 1 Hz (links) und 0,5 Hz (rechts).....	39
Abb. 3.26: Originalregistrierung der Arrhythmieentwicklung bei Wortmannin+TCA; AEKs sind mit Askerisken (*) gekennzeichnet (sh.101124-vh, Ch 3).....	40

Abb. 3.27: Kraftentwicklung durch Wortmannin bei 1Hz und 0,5 Hz.....	40
Abb. 3.28: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach Wortmannin-Applikation (sh.101130-vh, Ch 2).....	41
Abb. 3.29: Vergleich der Kraftentwicklung durch TCA vs. Wortmannin+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts).....	41
Abb. 3.30: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA vs. KN-93+TCA bei 1 Hz (links) und 0,5 Hz (rechts).....	42
Abb. 3.31: Originalregistrierung der Arrhythmieentwicklung bei KN-93+TCA; AEKs sind mit Askerisken (*) gekennzeichnet (sh.100511, Ch 3).....	43
Abb. 3.32: Kraftentwicklung durch KN-93 bei 1Hz und 0,5 Hz.....	43
Abb. 3.33: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach KN-93 – Applikation (sh.101130-vh, Ch 3).....	44
Abb. 3.34: Vergleich der Kraftentwicklung durch TCA vs. KN-93+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts).....	45
Abb. 4.35: Der durch AT II ausgelöste IP3-vermittelte Ca ²⁺ -Ausstrom aus dem SR	50
Abb. 4.36: IP3 vermittelte Entstehung von AEKs.....	51
Abb. 4.37: Wirkungen der CamK II am Kardiomyozyten; aus {{116 Bers,D.M. 2005}}.....	54

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Patientendaten (*Anzahl der Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion).....	16
Tab. 2.2: Medikamentöse Therapie.....	16

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel der Arbeit:

Lebererkrankungen, wie zum Beispiel die intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP) gehen mit hohen systemischen Gallensäure-Spiegeln einher. Die Effekte von Gallensäuren (GS) auf humane Kardiomyozyten sind weitgehend ungeklärt. Eine Erhöhung der GS im maternalen Serum bleibt für die Mutter oft ohne ernste Konsequenzen. Jedoch besteht der Verdacht, dass GS beim Feten Herzrhythmusstörungen auslösen und damit zum intrauterinen Fruchttod führen können {{73 Glantz,A. 2004;71 Arrese,M. 2006; 69 Lammert,F. 2000}}.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, ob (1) Gallensäuren am menschlichen Vorhofgewebe Arrhythmien auslösen, (2) welche zellulären Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten und (3) protektive, pharmakologische Interventionen zu testen.

Material und Methoden:

Die Experimente wurden an isolierten, humanen Muskeltrabekeln des rechten Herzohres durchgeführt, die von Patienten mit Sinusrhythmus im EKG während einer Bypass- oder Klappenersatzoperation entnommen wurden. Die Muskelstreifen wurden bei 37°C mit Tyrodelösung umspült und auf die Länge der maximalen Kraftentwicklung gedehnt. Die einzelnen Messintervalle fanden jeweils bei einer elektrischen Stimulation von 1 Hz und 0,5 Hz statt.

Untersucht wurde vor allem die Arrhythmie- und Inotropieentwicklung der Trabekel durch die Gallensäuren Taurocholsäure (TCA) und Ursodesoxycholsäure (UDCA) bei steigender Konzentration (10 μM bis 1000 μM). Des Weiteren wurden die Wechselwirkungen des Peptidhormons Angiotensin II (3 nM), des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Inhibitors Wortmannin (0,1 μM) und des Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMK II) -Blockers KN-93 (10 μM) mit TCA analysiert.

Ergebnisse:

Anhand dieser Experimente konnte am Vorhofmyokard keine signifikante Arrhythmieentwicklung durch TCA oder UDCA festgestellt werden. TCA bewirkte eine Kraftminderung, die allerdings hier noch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle war. Angiotensin II verursachte einen positiv inotropen Effekt ($p < 0,02$) und initiierte mit 1 mM TCA eine Kumulation der Arrhythmien ($p_{\#} < 0,04$). Die Blockade der CaMK II durch KN-93 und der PI3K durch Wortmannin zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Arrhythmieentwicklung im Vergleich zur TCA-Kontrolle. Bei Wortmannin konnte ein negativ inotroper Effekt nachgewiesen werden ($p < 0,02$).

Schlussfolgerung:

Die proarrhythmogene Wirkung auf das menschliche Vorhofmyokard durch TCA und UDCA konnte nicht bewiesen werden. Angiotensin II steigerte die Inzidenz der Gallensäure-induzierten Arrhythmien nur bei der höchsten getesteten TCA-Konzentration. Weder Wortmannin, noch CaMK II konnten Arrhythmien signifikant verhindern.

Abstract

Background:

Liver diseases like intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) can cause high systemic bile acid levels. The effects of bile acids on human cardiomyocytes remain largely unknown. Elevated levels of bile acids in the maternal serum have minor consequences for the mother, however reports suggest it may be deleterious to the fetus {{73 Glantz,A. 2004;71 Arrese,M. 2006; 69 Lammert,F. 2000}}.

Aims of this project were (1) to clarify whether bile acids may trigger arrhythmias in human cardiac tissue, (2) to provide insights to underlying cellular mechanisms and (3) to develop a pharmacological strategy, which may prevent the onset of bile acid-triggered arrhythmias.

Methods and Material:

The experiments were performed on isolated human trabeculae of right atrial appendages derived from patients undergoing cardiac valve or bypass surgery. The muscle strips, perfused by Tyrode's solution of 37 degrees, were paced at 1.0 or 0.5 Hz and stretched until they gained their maximum of force development.

Appearance of arrhythmias and developed force of the muscle strips induced by the bile acid taurocholic acid (TCA) and the bile acid ursodeoxycholic acid (UDCA) in increasing concentrations (10 μ M to 1000 μ M) were analysed. Furthermore, interactions between the peptide hormone angiotensin II (3 nM), the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-inhibitor wortmannin (0.1 μ M) and the calmodulin-dependent kinase II (CaMK II)-blocker KN-93 (10 μ M) with TCA were investigated.

Results:

These experiments could not prove that TCA or UDCA trigger arrhythmias in human atrial tissue. TCA caused a reduction of contractile force which was not significant compared to the control-group. Angiotensin II effected an increase of contractile force ($p < 0.02$) and initialised a cumulative arrhythmogenic effect together with 1 mM TCA ($p_{\#} < 0.04$). The inhibition of PI3K by wortmannin and CaMK II by KN-93 did not alter the incidence of arrhythmias. Wortmannin provoked a decrease of contractile force ($p < 0.02$).

Conclusion:

The proarrhythmogenic effect of TCA und UDCA on human atrial tissue could not be proven. Angiotensin II enhanced the incidence of bile acid-induced arrhythmias only at the highest tested concentration of TCA. Neither wortmannin, nor KN-93 could avoid arrhythmias.

1 Einleitung

1.1 Myokardiale Kontraktion und Relaxation

1.1.1 Elektromechanische Koppelung

Als elektromechanische Koppelung wird die Umwandlung eines elektrischen Signals in eine mechanische Antwort bezeichnet. Übertragen auf die Physiologie des Herzens stellt dies den Mechanismus von elektrischer Stimulation und darauffolgender Kontraktion des Muskels dar.

Die elektrische Erregung des Herzens nimmt ihren Anfang im Sinusknoten und breitet sich innerhalb weniger Millisekunden über das Reizleitungssystem auf das Arbeitsmyokard aus. Dort wird daraufhin ein Aktionspotential (AP) initiiert. Nachdem ein initialer Na^+ -Einstrom die Depolarisation der Zellmembran (Sarkolemm) ausgelöst hat (Aufstrichphase), folgt eine partielle Repolarisation durch das kurzzeitige Öffnen von Kaliumkanälen. Anschließend öffnen sich spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridin – Rezeptoren) in der Plasmamembran und Ca^{2+} strömt aus dem Extrazellulärraum (T-Tubuli) ins Zellinnere (Plateauphase). Dieser im Vergleich eher geringe Ca^{2+} -Einstrom, triggert die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Bindung an dessen Freisetzungsproteine, den Ryanodinrezeptoren (RyR). Dadurch steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-7} M auf bis zu 10^{-5} M an. Dieser Vorgang wird auch als „ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release“ (CICR) {{27 Bers,D.M. 2002;29 Fabiato,A. 1983}} bezeichnet.

Das intrazelluläre, freie Kalzium bindet an das Myofilamentprotein Troponin C, was eine Konformationsänderung des Troponinkomplexes bewirkt. Die Lage des Tropomyosins wird auf den Aktinfilamenten verändert, so dass Aktin und Myosin eine Querbrückenverbindung eingehen können. Durch mehrere hintereinander folgende Abscherbewegungen der Myosinköpfe entlang der Aktinfilamente kommt es zur Muskelkontraktion {{92 Speckmann, E.J. 2008}}.

In der Diastole dissoziiert das Ca^{2+} wieder vom Troponin C ab. Damit es zur Relaxation kommen kann, muss die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder gesenkt werden. Dies geschieht auf 4 Wegen: das meiste Ca^{2+} (70%) wird unter Energieverbrauch durch die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), 28% durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

Exchanger (NCX) und nur 1% werden durch die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter aus der Zelle herausbefördert {{27 Bers,D.M. 2002}}. In Abbildung 1.1 ist der Ca^{2+} -Stoffwechsel, welcher für die Kontraktion (rote Pfeile) und Relaxation (grüne Pfeile) essentiell ist, anschaulich dargestellt.

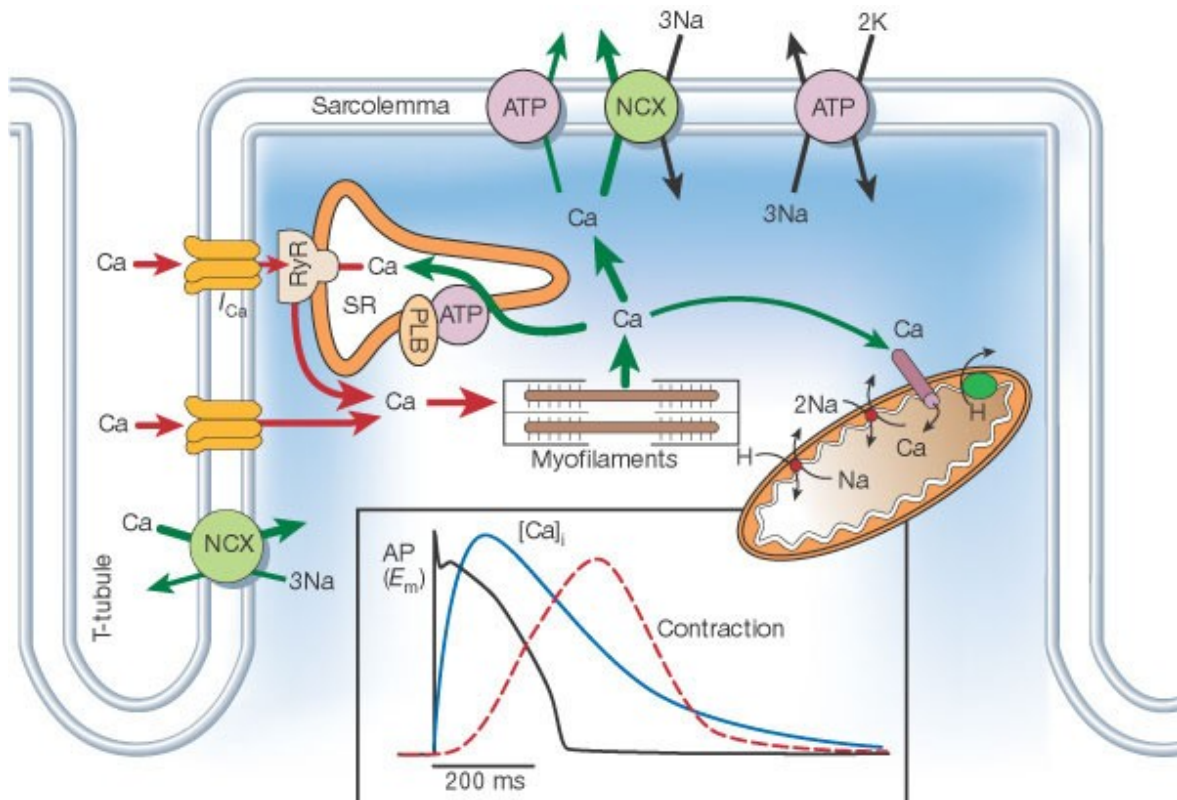


Abb. 1.1: Ca^{2+} -Stoffwechsel in einem Ventrikelmyozyten; aus {{27 Bers,D.M. 2002}}

1.1.2 Besonderheiten der elektromechanischen Koppelung im Vorhofmyokard

Vorhof und Ventrikel sind im Grunde ähnlich aufgebaut. Das Ventrikelmyokard besteht aus einem regelmäßigen T- und L-Tubulussystem. Jede Myofibrille ist von einem Röhrenchensystem umschlossen, welches longitudinal zur Myofibrille angeordnet ist (L-System). Als besondere Differenzierungsform des glatten endoplasmatischen Retikulums stellen die L-Tubuli (entsprechen dem SR) den größten Ca^{2+} -Speicher der Zelle dar. Das transversale Röhrenchensystem, die T-Tubuli, sind Einstülpungen des Sarkolemms und verlaufen transversal zu den Myofibrillen. An den sogenannten Dyaden, die sich aus den T-Tubuli und den Terminalzisternen des SR zusammensetzen, findet der im vorherigen Kapitel erläuterte Kalziumstoffwechsel statt {{47 Fawcett,D.W. 1969}}.

Der wesentliche Unterschied von Vorhof- und Ventrikelmyokard in Bezug auf die elektromechanische Koppelung besteht in der Tatsache, dass das Vorhofmyokard weniger entwickelte T-Tubuli und zwei Arten von SR besitzt: das periphere junctional-SR (j-SR) und das zentral gelegene non-junctional-SR (nj-SR). Beide Typen des atrialen SR enthalten RyR-Kalziumkanäle {{43 Kockskamper,J. 2001;46 Blatter,L.A. 2003}}.

Die CICR beginnt in der Vorhof- ebenso wie in der Ventrikelzelle mit einem Ca^{2+} -Einstrom über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die jedoch im Vorhof zunächst die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem j-SR bewirkt. Dies führt zu einer peripheren, ringförmigen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die sich durch die CICR in Richtung Zentrum ausbreitet und so auch die Freisetzung aus dem nj-SR induziert. Diese heterogene Änderung der Kalziumkonzentrationen in der Vorhofzelle könnte die Entstehung von Arrhythmien begünstigen {{46 Blatter,L.A. 2003;43 Kockskamper,J. 2001}}.

Weiters ist anzumerken, dass das Aktionspotential von Vorhofmyozyten kürzer ist, als das der Ventrikelmyozyten und somit auch kürzere Refraktärzeiten aufweist.

1.2 Vorhofflimmern

1.2.1 Definition und Epidemiologie des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern (VHF) ist eine supraventrikuläre Herzrhythmusstörung mit ungeordneten, insuffizienten Vorhofaktionen {{33 Levy,S. 2003}}, die in einem Frequenzbereich von $350\text{-}600\text{ min}^{-1}$ liegen. Die Einteilung in fünf verschiedene Formen erfolgt hauptsächlich auf Basis der Dauer der Arrhythmie:

- 1) Erstmals diagnostiziertes VHF: ohne Berücksichtigung der Dauer der Episode oder der Schwere der Symptome
- 2) Paroxysmales VHF: selbstlimitierend innerhalb von 48 Stunden
- 3) Persistierendes VHF: Episode dauert länger als sieben Tage an oder muss per Kardioversion oder Medikation beendet werden
- 4) Langdauernd persistierendes VHF: anhaltend seit mindestens einem Jahr

- 5) Permanentes VHF: das VHF wird von Arzt und Patient akzeptiert und keine Therapie fortgeführt; sollte eine Therapie eingeleitet werden, erfolgt eine Umbenennung in Form 4)

{{49 European Heart Rhythm Association 2010}}

Vorhofflimmern ist die Häufigste unter den Herzrhythmusstörungen und verantwortlich für eine hohe Morbidität und Mortalität {{48 Bosch,R.F. 2002}}.

1-2% der gesamten Bevölkerung und über sechs Millionen Menschen in Europa leiden unter dieser Erkrankung. Es wird erwartet, dass sich diese Zahlen in den nächsten 50 Jahren sogar verdoppeln {{51 Go,A.S. 2001;50 Stewart,S. 2001}}. Generell sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Die Prävalenz steigt mit dem Alter von <0,5% unter den 40-50-jährigen auf 5-15% unter den 80-jährigen {{49 European Heart Rhythm Association 2010}}.

Diagnosen wie Bluthochdruck, Herzklappenerkrankungen, koronare Herzerkrankung (KHK), symptomatische Herzinsuffizienz, verschiedene Formen von Kardiomyopathien, Diabetes mellitus und das Fehlen regelmäßiger physischer Betätigung gehen häufig mit der Rhythmusstörung einher. Risikofaktoren für die Entstehung von Vorhofflimmern sind hauptsächlich die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Niereninsuffizienz, Schilddrüsenfunktionsstörungen und vorhergehende thromboembolische Ereignisse (50% davon sind Schlaganfälle) {{52 Nabauer,M. 2009}}. Klinisch äußert sich das Vorhofflimmern meist als Herzklopfen, Atemnot, Brustschmerzen, Schwindel oder Müdigkeit. Oft bleiben die Symptome jedoch auch aus.

Mögliche Komplikationen bestehen vor allem in thromboembolischen Ereignissen, Herzinsuffizienz, linksventrikulärer Dysfunktion und deren Folgen {{49 European Heart Rhythm Association 2010}}.

1.2.2 Ätiologie und Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Über die Pathogenese des Vorhofflimmerns wird seit langer Zeit diskutiert. Aufgrund der offensichtlichen Komplexität des Entstehungsmechanismus gibt es immer neue Ansätze, durch die versucht wird, die Pathophysiologie vollständig aufzuklären.

Im Folgenden sind die zwei Haupthypothesen dargestellt.

1) Fokale Mechanismen

Fokale, hochfrequente Vorhoferregungen, meist in der Grenzzone zwischen Pulmonalvenen und linkem Vorhof lokalisiert, kommen als Triggerfaktoren für Vorhofftachyarrhythmie und den re-entry-Mechanismus in Frage. Kürzere Refraktärzeiten und eine plötzliche Änderung in der Ausrichtung der Myofibrillen werden für das vermehrte Auftreten tachykarder Erregungen in dieser Region verantwortlich gemacht {{57 Atonza,F. 2007;58 Belhassen,B. 2004; 49 European Heart Rhythm Association 2010}}.

2) „Multiple wavelet hypothesis“

Multiple Kreiserregungen im Vorhof treffen auf wieder erregbares Gewebe und erhalten sich somit selbst aufrecht (re-entry) {{59 Jalife,J. 2003;49 European Heart Rhythm Association 2010}}.

Auf zellulärer Ebene sind kontraktile, elektrische und strukturelle Veränderungen (remodelling) gleichzeitig Ursache und Folgeerscheinung, die sich durch anhaltendes Vorhofflimmern manifestieren und gegenseitig verstärken: „AF begets AF“ {{53 Wijffels,M.C. 1995}}. Je länger das VHF besteht, desto niedriger ist die Chance, wieder einen normalen Sinusrhythmus zu erreichen.

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die verschiedenen Arten des remodellings auf:

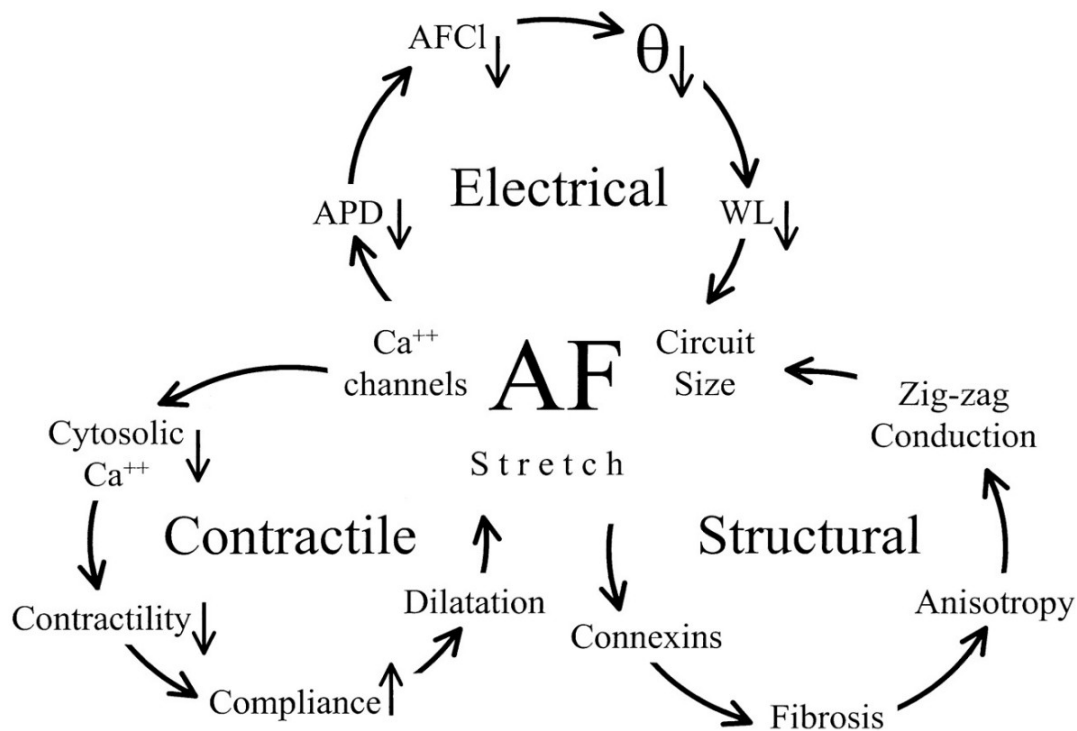


Abb. 1.2: Drei Arten von atrialem remodelling aus {{55 Allessie,M. 2002}}

Die oberste Schleife in Abbildung 1.2 veranschaulicht den Kreislauf des elektrischen remodellings, welches sich bereits in den ersten Tagen des VHF einstellt. Durch die hohe Stimulationsfrequenz entwickelt sich ein intrazellulärer Ca^{2+} -overload, der den Ca^{2+} -Einstrom durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle hemmt und eine Verkürzung der AP-Dauer (APD) und der Refraktärzeit bewirkt. Das Gewebe ist schneller wieder erregbar und die Größe und Anzahl der Kreiserregungen steigt (re-entry-Mechanismus).

Die Blockade des Ca^{2+} -Einstroms bewirkt wiederum einen Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welcher zusammen mit der Überdehnung des Gewebes für die geringere Kontraktionskraft und die daraus resultierende Dilatation des Vorhofs verantwortlich (contractile remodelling und structural remodelling) ist.

Aufgrund der hohen Frequenz beginnt nach Wochen bis Monaten die Fibrosierung des Gewebes (structural remodelling; siehe rechter Kreislauf in Abb. 1.2) mit Störungen der elektrischen Fortleitung (electrical remodelling; siehe oberer Kreislauf in Abb. 1.2). Alle diese Faktoren tragen selbst wieder zum Erhalt des VHF bei {{55 Allessie,M. 2002;56 De Jong,A.M. 2010; 53 Wijffels,M.C. 1995; 60 Sun,H. 2001}}.

1.3 Intrahepatische Schwangerschaftscholestase (ICP)

1.3.1 Epidemiologie und Definition der ICP

Die Inzidenz der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP), beträgt in Europa 1% {{ Williamson,C., Geenes,V. 2009}}. Die höchste Rate von Betroffenen kann jedoch in Chile und Bolivien mit 6-27% und Schweden mit 1-1,5% verzeichnet werden {{73 Glantz,A. 2004}}.

ICP tritt hauptsächlich im dritten Trimenon der Schwangerschaft auf und ist durch Pruritus (Hautjucken), abnorme Leberfunktionstests und bis zu 100-facher Erhöhung der primären Gallensäuren im maternalen Serum (Normwert: <10 µg/l; >10 µg/l pathologisch) {{140 Zimmermann, R. 2003}}, die innerhalb einer Woche wieder Normwerte erlangen können, gekennzeichnet {{75 Gorelik,J. 2002}}. Als weitere Symptome können Ikterus (Gelbsucht) und Fett-Malabsorption auftreten.

Die ICP ist eine reversible Form der Cholestase und bildet sich üblicherweise innerhalb von vier Wochen nach der Geburt zurück. Obwohl ICP ohne schwere Konsequenzen für die Mutter einhergeht, können die erhöhten Gallensäurewerte im maternalen Serum in das fetale Blut übergehen und gefährlich für das ungeborene Kind werden. In 19-60% der Fälle kommt es zu einer Frühgeburt, in 22-33% zu Asphyxie und in 2% sogar zum intrauterinen Fruchttod. Es gibt Hinweise, dass diese Komplikationen durch eine fetale Herzrhythmusstörung ausgelöst werden können {{69 Lammert,F. 2000;76 Williamson,C. 2001}}.

1.3.2 Pathogenese der ICP

Primäre Gallensäuren (Cholsäure, CA und Chenodesoxycholsäure, CDCA) werden in der Leber durch Oxidation von Cholesterin synthetisiert und nach Passieren des enterohepatischen Kreislaufs zu sekundären Gallensäuren (Desoxycholsäure und Lithocholsäure) umgewandelt. Beide, primäre sowie sekundäre Gallensäuren werden entweder mit Taurin oder mit Glycin konjugiert und in der Gallenblase gespeichert.

Durch die Beeinträchtigung der Transportfunktion für Gallensäuren (GS) über die Zellmembran der Hepatozyten bei einer intrahepatischen Cholestase oder durch Obstruktion der Gallengänge, dringen die GS in den Blutkreislauf ein.

Normalerweise finden sich bei schwangeren Frauen eher primäre GS, die mit Glycin konjugiert sind, während bei Schwangeren mit ICP die Konjugate mit Taurin überwiegen. Dadurch sinkt der Glycin/Taurin-Quotient im Serum von 1,4 auf 0,8 ab {{70 Gorelik,J. 2004}}.

Bis heute ist die Entstehung der ICP nicht genau aufgeklärt. Wie aus zahlreichen Untersuchungen hervorgeht, sind vermutlich eine genetisch determinierte Überempfindlichkeit gegenüber Östrogen oder dessen Metabolite und Mutationen oder Polymorphismen einiger hepatobiliären Transportproteine an der Pathogenese beteiligt {{71 Arrese,M. 2006}}.

J. Gorelik und C. Williamson untersuchten die Wirkung von mit Taurin konjugiertem Cholat (Salz der Cholsäure) anhand eines in vitro Modells von ventrikulären Rattenkardiomyozyten hinsichtlich Rhythmus, Kontraktionsamplitude und Zellvernetzung. Die Ergebnisse zeigten bereits Arrhythmien und eine Reduktion der Kontraktionskraft ab einer Konzentration von 0,1 mM Taurocholat. Nach Gabe von 3 mM Taurocholat erfolgte die Zerstörung der Zellverbände und die einzelnen Zellen schlugen asynchron. Alle Veränderungen erwiesen sich als reversibel, wobei die Myokardzellen nach 3 mM Taurocholat eine niedrigere Kontraktionsfrequenz besaßen {{70 Gorelik,J. 2004}}. Ein Grund für die negative Inotropie und Bradykardie könnte die veränderte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR sein {{75 Gorelik,J. 2002}}.

Eine andere Forschungsgruppe aus Israel zeigte bereits 1987, ebenfalls an ventrikulären Rattenkardiomyozyten, eine konzentrationsabhängige Verkürzung des APs durch GS bei gleichbleibenden Parametern wie Ruhemembranpotential, Amplitude und maximale Anstiegsgeschwindigkeit des APs. Des Weiteren wurde eine Verringerung des Einstroms durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und eine leichte Erhöhung des K^+ -Ausstroms aus den Zellen beobachtet {{72 Binah,O. 1987;68 Kotake,H. 1989}}.

Eine neue Theorie über die Entstehung fetaler Arrhythmien durch Gallensäuren wurde 2010 veröffentlicht. Diese Hypothese besagt, dass TCA als partieller Agonist an muskarinischen M2-Rezeptoren von neonatalen Rattenkardiomyozyten bindet, G-Protein-gekoppelt durch Aktivierung der Adenylylcyclase die intrazelluläre cAMP-Konzentration senkt und dadurch Arrhythmien auslöst {{79 Sheikh Abdul Kadir,S.H. 2010}}.

1.3.3 Protektive pharmakologische Interventionen gegen ICP

Da ICP eine ernst zu nehmende Erkrankung darstellt und schwerwiegende Folgen haben kann, wird kontinuierlich nach einer geeigneten therapeutischen Strategie gesucht. Die etablierteste Therapie ist zur Zeit jene mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) {{71 Arrese,M. 2006}}.

UDCA ist eine tertiäre, natürlich vorkommende, hydrophile GS (Entstehung durch Transformation von sekundären GS in Darm oder Leber) {{80 Gerok, Huber, Meinertz, Zeidler 2007}}. Diese Substanz gilt als first-line Therapie gegen die primäre biliäre Zirrhose (PBC). In mehreren klinischen Studien wurden signifikante Besserungen des Pruritus, des Bilirubins und der Transaminasen beobachtet. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch nach wie vor unklar. Möglicherweise schützt die hydrophile GS die Gallengänge vor den Schäden durch hydrophobe GS und stimuliert deren Exkretion {{69 Lammert,F. 2000;71 Arrese,M. 2006; 78 Paumgartner,G. 2002}}.

Bei Patientinnen mit ICP ist besonders TCA um das Zwei- bis Fünffache gesteigert. Somit ist der CA/CDCA-Quotient auf etwa 4:1 erhöht {{69 Lammert,F. 2000; }}. UDCA stellt vermutlich wieder ein physiologisches CA/CDCA-Gleichgewicht her. Die spezielle, kardioprotektive Wirkung ist wahrscheinlich auf eine Membranstabilisierung durch UDCA direkt {{111 Desai,M.S. 2010;143 Perez,M.J. 2009}}, oder eine Verhinderung der Apoptose, hervorgerufen durch hydrophobe GS, zurückzuführen {{77 Gorelik,J. 2003}}. Eine andere Erklärung für den kardioprotektiven Effekt ist der Anstieg von ATP durch UDCA {{77 Gorelik,J. 2003}}.

Während der Therapie traten in wenigen Fällen Nebenwirkungen in Form einer leichten Diarrhoe bei der Mutter auf. Ungewollte Auswirkungen auf den Feten durch eine UDCA-Behandlung konnten bisher nicht festgestellt werden {{77 Gorelik,J. 2003; 69 Lammert,F. 2000}}.

Nach neuesten Erkenntnissen existieren direkte GS-Transporter, die TGR5-Rezeptoren, an humanen Kardiomyozyten {{111 Desai,M.S. 2010}}. Die zellulären Wirkmechanismen sind jedoch nach wie vor unklar.

1.4 Herzinsuffizienz

1.4.1 Epidemiologie und Definition der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Herzerkrankungen überhaupt. Allein in Deutschland sind derzeit 1,2 Millionen Menschen betroffen. Die mittlere Überlebenszeit liegt unter fünf Jahren. Inzidenz und Prävalenz steigen mit dem Alter, so ist die Herzinsuffizienz heutzutage die am häufigsten gestellte klinische Diagnose von Patienten über 75 Jahren. Im Gegensatz zu Frauen haben Männer ein um 50-75% höheres Erkrankungsrisiko {{91 Berdel, W.E. 2004}}.

Definiert ist die Herzinsuffizienz als Unvermögen des Herzens, das anfallende Blutvolumen in den Kreislauf zu transportieren. Als Folge entsteht entweder ein Rückstau in den Körperkreislauf (Rückwärtsversagen), ein Vorwärtsversagen mit niedrigem Herzminutenvolumen oder eine Kombination aus Beidem. Weiters wird zwischen einer diastolischen und einer systolischen Funktionseinschränkung unterschieden. Einer systolischen Herzinsuffizienz liegt meist eine regionale oder globale Kontraktilitätsstörung zugrunde, die zur Erniedrigung der Ejektionsfraktion führt. Eine diastolische Herzinsuffizienz resultiert hauptsächlich aus einem anhaltend hohen Blutdruck. Dadurch kommt es zur Linksventrikelhypertrophie und durch das steifere Myokard zu einer Relaxationsstörung. Es besteht somit ein erhöhter Füllungsdruck bei erhaltener systolischer Funktion und eine adäquate Füllung des linken Ventrikels kann nicht mehr gewährleistet werden {{91 Berdel, W.E. 2004;92 Speckmann, E.J. 2008}}. In der Folge sinkt das Herzzeitvolumen (anfangs besonders bei Belastung) und Symptome der Herzinsuffizienz treten auf.

1.4.2 Pathogenese der Herzinsuffizienz und wichtige Zusammenhänge zwischen Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern

Zu den Hauptursachen der Herzinsuffizienz zählen Hypertonie, koronare Herzerkrankung (KHK) und Myokarditis. Diese Erkrankungen führen durch die Verminderung funktionellen Myokards zu einer herabgesetzten Kontraktilität und das Herzzeitvolumen sinkt. Um den Blutfluss durch den Kreislauf aufrecht erhalten zu können, werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt.

Zum einen wird durch den erhöhten myokardialen Füllungsdruck der sogenannte Frank-Starling-Mechanismus ausgelöst: bei erhöhter Vorlast (preload) und somit

gesteigertem enddiastolischen Druck wird die Kontraktionskraft verstärkt und folglich das Schlagvolumen erhöht.

Weitere wichtige Mechanismen zur Kompensation der erniedrigten Herzleistung sind neben der Erhöhung des Endothelin- und Katecholaminspiegels die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). In Abbildung 1.3 ist das RAAS schematisch dargestellt.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

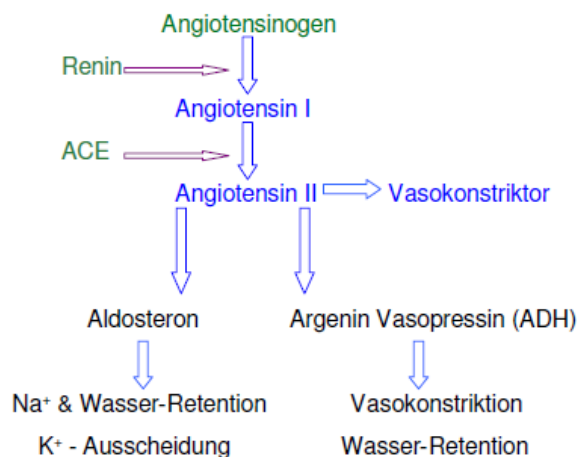


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des RAAS

Das von der Leber und dem Fettgewebe synthetisierte Angiotensinogen wird durch Katecholamine, erniedrigten Nierenperfusionen, niedriges NaCl, niedriges AT II oder niedriges ANP (atrial natriuretic peptide) von der Proteinase Renin in Angiotensin I gespalten. Durch das angiotensin-converting-enzyme (ACE) entsteht aus Angiotensin I Angiotensin II. Das Peptidhormon Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und inhibierend auf die Reninfreisetzung (negative Rückkoppelung) durch das antidiuretische Hormon (ADH) Vasopressin. Zusätzlich ist Angiotensin II ein wichtiger Stimulator für die Aldosteronbildung in der Nebenniere. Die Wirkungen von Aldosteron sind primär Na⁺-Retention und K⁺-Ausscheidung.

Zusammenfassend wirkt Angiotensin II direkt (vasokonstriktorisch) und indirekt (über ADH und Aldosteron durch Flüssigkeitsretention) blutdrucksteigernd, vermittelt durch spezifische AT₁R (Angiotensin-Typ1-Rezeptoren) in der Nebenniere und der glatten Muskulatur {{92 Speckmann, E.J. 2008;91 Berdel, W.E. 2004}}.

Dies ist der Grund, warum der Angiotensin II - Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht ist. Als Folge der andauernden Aktivierung des RAAS sind die AT II-Rezeptoren ebenfalls dereguliert {{93 Alves,A.J. 2010}}.

Diese Mechanismen verstärken auch strukturelle Veränderungen, wie Hypertrophie und remodelling, unter anderem durch die Hormone Angiotensin II und Aldosteron, was zu Vorhofflimmern führen kann (s. Abb. 1.4).



Abb. 1.4: *Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz*

Möglicherweise wird das Vorhofflimmern auch durch Angiotensin II direkt am Myokard begünstigt. Viele Forschungsgruppen beschäftigten sich mit der Wirkung von AT II auf die Entwicklung von Arrhythmien. Bereits vor zehn Jahren konnte an Hunden nachgewiesen werden, dass Angiotensin II durch Verkürzung der myokardialen Refraktärzeit Arrhythmien auslöst {{97 Nakashima,H. 2000}}.

Eine Untersuchung an humanem Vorhofgewebe zeigte, dass eine dauerhafte Blockade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) das Auftreten von Vorhofflimmern verringert. Eine Erklärung wäre die Reduktion des atrialen remodellings (insbesondere der Fibrosierung).

Zunächst wurde jedoch die proarrhythmische Wirkung von AT II am Vorhof analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass Angiotensin II konzentrationsabhängig (1-1000 nmol/l) positiv inotrope und proarrhythmogene Effekte aufweist. Über die Zugabe von unspezifischen ATR-Antagonisten (Saralasin), AT₁R-Antagonisten (Irbesartan) und AT₂R-Antagonisten (PD123319) wurde gezeigt, dass die direkte proarrhythmische Wirkung von AT II ausschließlich durch AT₁R erfolgt und sich durch Antagonisierung dieser verhindern lässt {{84 von Lewinski,D. 2008}}. Eine

mögliche Ursache der AT II-induzierten AEKs am Vorhofmyokard könnte die erhöhte RYR-gesteuerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR sein {{94 Gassanov,N. 2006}}.

Sollte die Entstehung von AEKs wie bei Endothelin ebenfalls mit dem IP_3 -Signalweg gekoppelt sein {{95 Kockskamper,J. 2008}}, könnte durch die IP_3 -gesteuerte sarkoplasmatische Ca^{2+} -Freisetzung der NCX aktiviert, eine Membrandepolarisation ausgelöst werden und dadurch AEKs in Form von delayed afterdepolarisations (DADs) entstehen {{84 von Lewinski,D. 2008}}. Die Begriffe der DADs und EADs (early afterdepolarisations) können folgendermaßen erklärt werden:

EAD = frühe Nachdepolarisation, die vor der vollständigen Repolarisation auftritt

DAD = späte Nachdepolarisation, welche nach der Repolarisation der Zelle zum Ruhemembranpotential entsteht {{96 Marban,E. 1986}}

Beide Arten von Arrhythmien werden durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ begünstigt. Der Grund für die Entstehung von EADs wird hauptsächlich im Ca^{2+} -Einstrom durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vermutet {{96 Marban,E. 1986}}, während DADs wahrscheinlich auf ein Ca^{2+} -Leck aus dem SR zurückzuführen sind {{116 Bers,D.M. 2005}}. Weiters scheint auch eine hohe Stimulationsrate DADs durch den dadurch resultierenden intrazellulären Ca^{2+} -overload zu fördern {{144 Paavola,J. 2007}}.

Alle diese Erkenntnisse könnten zu einem neuen Ansatz in der pharmakologischen Therapie und Prophylaxe des Vorhofflimmerns bei herzinsuffizienten Patienten beitragen.

1.5 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Die intrahepatische Schwangerschaftscholestase geht mit erhöhten Gallensäurespiegeln im maternalen Serum einher und kann beim Fetus zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen. Wie bereits viele Versuche an tierischen und humanen Zellen gezeigt haben, lösen Gallensäuren (insbesondere TCA) bei Myokardzellen Arrhythmien aus. Besonders gefährdet sind Menschen, die an Herzinsuffizienz leiden, da diese einen erhöhten Endothelin- und Angiotensinspiegel im Blut haben, und somit eine erniedrigte Reizschwelle für das Auftreten von AEKs aufweisen.

In dieser Arbeit wird die Arrhythmogenität der Gallensäure UDCA untersucht, die bereits als arrhythmie-protective Substanz diskutiert wird.

In weiteren Versuchsreihen wird die Wechselwirkung zwischen AT II und TCA anhand von Myokardtrabekeln analysiert. Die Arrhythmieschwelle wird mit AT II gesenkt, so dass Arrhythmien auch schon bei eher physiologischen Konzentrationen der Gallensäuren (hier TCA) induzierbar sind und eine mögliche Kumulierung der AEKs eintritt.

Zusätzlich werden weitere Substanzen in Wechselwirkung mit TCA getestet, um die noch weitgehend ungeklärten zellulären Wirkmechanismen der Gallensäuren zu erforschen. So ist noch umstritten, ob Wortmannin oder KN-93 die arrhythmie-auslösende Wirkung von TCA auf den Vorhof hemmen können.

Bei allen oben aufgeführten Experimenten werden mehrere Parameter miteinbezogen, jedoch liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung von Arrhythmien.

Die zugrunde liegenden Hypothesen dieser Arbeit sind im Folgenden noch einmal zusammengefasst:

- 1) Es besteht ein Unterschied in der Arrhythmogenität zwischen den verschiedenen Gallensäuren UDCA und TCA.
- 2) AT II senkt die Arrhythmieschwelle (Herzinsuffizienzmilieu), so dass durch Zugabe von TCA Arrhythmien vermehrt auftreten.
- 3) Die PI3K (Akt) ist an der Arrhythmogenese beteiligt und eine Blockade durch Wortmannin wirkt protektiv.
- 4) Die CamK II ist an der Arrhythmogenese beteiligt und eine Blockade durch KN-93 wirkt protektiv.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Gewebeproben

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gewebe stammte ausschließlich aus dem humanen Vorhofmyokard. Bei einer Bypassoperation oder einem Herzklappenersatz ist die Adaptation an eine Herz-Lungenmaschine notwendig. Während der Kanülierung des venösen Schenkels zur Ableitung des Blutes aus dem rechten Vorhof in die Herz-Lungenmaschine wurde intraoperativ aus dem rechten Vorhof (Atrium dextra) der obere dreieckige Teil, das Herzohr (Auricula dextra) herausgeschnitten. In diesem befanden sich die für die Experimente relevanten Trabekel (Mm pectinati, Abb.2.1).

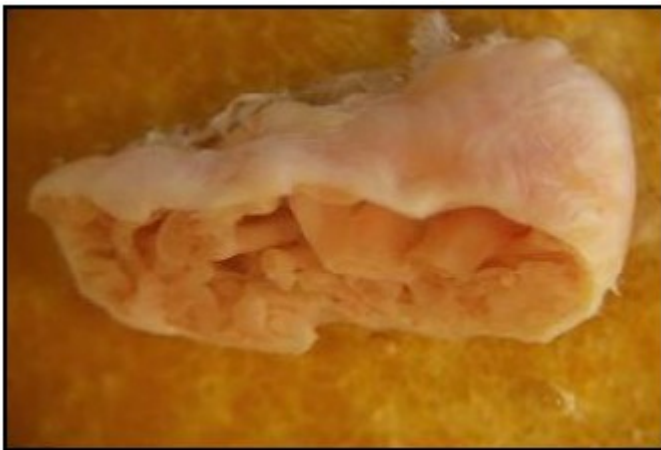


Abb. 2.5: Herzohr mit Mm pectinati aus dem rechten Vorhof {{141 Doleschal, B. 2010}}

Über eine weitere Kanülierung der Aorta wurde das oxygenierte Blut dem Kreislauf wieder zugeführt. Die Operationen fanden in der klinischen Abteilung für Herzchirurgie der Medizinischen Universität Graz statt, nachdem alle Patienten ihre Einwilligung zur Entnahme und Verwendung des Myokardgewebes gegeben hatten. Geprüft und genehmigt wurden die Untersuchungen von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz.

Insgesamt wurden Herzohren von 50 Patienten mit Sinusrhythmus, unter anderem für Pilotmessungen, präpariert. Trabekel, die nach Einhängen in die Muskelstreifenanlage vor Substanzgabe arrhythmische Extraktionen (AEKs) aufwiesen oder weniger als $3,5 \text{ mN/mm}^2$ Kraft erreichten, wurden ausgeschlossen.

Absolute Ausschlusskriterien für die Verwendung von Trabekeln waren HIV-, Hepatitis B- oder C-Infektionen der Patienten.

Für die Experimente wurden 71 Muskeltrabekel von insgesamt 26 Patienten untersucht. Die Größe der Herzohren variierte stark, betrug aber durchschnittlich ca. 2cm x 1cm x 1cm. In Tabelle 2.1 sind die operativen Eingriffe und weitere Patientenmerkmale aufgeführt.

Operativer Eingriff	Anzahl	mittleres Alter \pm STABW	W	M	mittlerer BMI \pm STABW	mittlere EF in % \pm STABW	Anzahl EF<50%*
CABG	19	70,0 \pm 10,7	5	14	28,6 \pm 3,3	60,4 \pm 10,9	2
AKE	4	60,0 \pm 15,6	0	4	28,4 \pm 4,0	61,7 \pm 2,9	0
CABG, AKE	3	77,3 \pm 6,7	1	2	24,0 \pm 1,0	63,3 \pm 2,9	0

Tab. 2.1: Patientendaten (*Anzahl der Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion)

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die medikamentöse Therapie der Patienten, deren Vorhofmyokard für diese Arbeit verwendet wurde. Ausführliche Informationen über Vorerkrankungen und Risikofaktoren können dem Tabellenanhang entnommen werden (siehe Kapitel C).

Medikamente	Anzahl	in %
Betablocker	17	65
Diuretika	13	50
ACE-Hemmer	20	77
Ca ²⁺ - Antagonisten	5	19
AT ₁ - Rezeptorblocker (ARB)	1	4
Aldosteronantagonisten	1	4
Digitalispräparate	0	0
Statine	22	85
Thrombozytenaggregationshemmer	5	19
Gesamtanzahl der Patienten	26	100

Tab. 2.2: Medikamentöse Therapie

2.2 Transport und Präparation des Herzgewebes

2.2.1 Kardioplegie

Zum Schutz des Myokardgewebes während des Transportes vom Operationssaal ins Labor für Grundlagenforschung der Kardiologie und während der Präparation wurde es direkt nach der Entnahme in eine kardioplege Lösung gelegt. Zur Herstellung dieser Lösung wurde Tyrodelösung (ohne Altinsulin) mit 2,3-

Butanedione-Monoxime (BDM) versetzt. Die BDM-Konzentration betrug 30 mM (entsprechend 3,0 g/l).

Die chemische Phosphatase BDM blockiert die Querbrückeninteraktionen zwischen Aktin und Myosin reversibel {{7 Blanchard,E.M. 1990;8 Perreault,C.L. 1992}} und senkt die Ansprechbarkeit der kontraktilen Proteine für Ca^{2+} {{9 Gwathmey,J.K. 1991}}. Ausserdem bewirkt BDM in höheren Konzentrationen (>5 mM) eine Reduktion des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten {{10 Fryer,M.W. 1988;7 Blanchard,E.M. 1990}}, wobei die Ca^{2+} -Sensitivität von Troponin C nicht vermindert wird {{9 Gwathmey,J.K. 1991}}. Weiters wird die Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum durch BDM nicht herabgesetzt {{11 Phillips,R.M. 1996}}. Membranpotential und Aktionspotentialverlauf bleiben ebenfalls unbeeinflusst {{10 Fryer,M.W. 1988}}.

Während des Transports, der Präparation und der Lagerung des Myokards wirkt BDM kardioprotektiv. Aufgrund des mechanischen Stresses bei der Präparation kommt es zum Teil zu einem hohen Ca^{2+} -Einstrom in das Gewebe. Die Entstehung einer Kontraktur kann durch BDM verhindert werden {{12 Mulieri,L.A. 1989}}. Des Weiteren wird der ATP-Verbrauch durch Myosin durch die Hemmung der Querbrückeninteraktion reduziert. Die Blockierung der Querbrückeninteraktion durch BDM erfolgt konzentrationsabhängig. Die Kraftentwicklung des Arbeitsmyokards wird bei einer BDM-Konzentration von 30 mM vollständig inhibiert {{8 Perreault,C.L. 1992}}. Folglich dient die kardioplege BDM-Lösung - besonders bei zusätzlicher Kühlung - als Schutz für die Funktion der Muskeltrabekel {{13 Fagbemi,O.S. 2001}}.

Zur Oxygenierung und Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 wurde die mit BDM versetzte, bikarbonathaltige Tyrodelösung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast.

2.2.2 Transport

Unmittelbar nach der Entnahme des Myokardgewebes im Operationssaal wurde es in einen sterilen Einwegbecher transferiert, welcher die bereits präoxygenierte und gekühlte BDM-Lösung enthielt. Die Zeitspanne bis zum Eintreffen in das Labor betrug ca. 10 Minuten. Dort wurde die Probe erneut mit Carbogen begast und die BDM-Lösung erneuert.

2.2.3 Materialien

Folgende Materialien wurden für Transport, Präparation und Einhängen der Muskeltrabekel in die Messanlage verwendet:

Einwegbecher	Fa. Sarstedt AG, Urinbecher 100 ml
Einwegpipette	Fa. Sarstedt AG, Transferpipette 5 ml
Mikroschere	Fa. Storz Augeninstrumente, Typ 23140
Mikropinzette	Fa. Aesculap Typ BD 331R, Typ 329R
Stereomikroskop	Fa. Zeiss AG, 10x Vergrößerung

Tyrodellösung:

Die Tyrodellösung, mit der die eingehängten Muskeltrabekel umspült wurden, bestand aus einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung mit folgender Zusammensetzung:

NaCl	127 mM
KCl	2,3 mM
NaHCO ₃	25 mM
MgSO ₄	0,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,3 mM
CaCl ₂	0,2 mM (initial 0,2 mM, dann schrittweise Steigerung auf 2,5 mM)
Glukose	11,2 mM
Altinsulin	5 I.E./l

2.2.4 Präparation der Muskelstreifen

In einer Präparationsschale, welche die frische, gekühlte BDM-Lösung enthielt, wurden die Trabekel unter einem Stereomikroskop mit zehnfacher Vergrößerung mit Hilfe von mikrochirurgischen Pinzetten und Scheren vorsichtig herauspräpariert (Abb. 2.2). Für die späteren Messungen wurden insbesondere lange, unverzweigte Trabeculae carneaе mit einem Durchmesser von $<0,8 \text{ mm}^2$ freigelegt. Bei einer größeren Querschnittsfläche besteht die Gefahr einer Hypoxie im Inneren des Trabekels {{14 KOCH-WESER,J. 1963}}. Während der Isolation der Muskelstreifen wurde besonders darauf geachtet, eine Überdehnung oder

überflüssige, mechanische Beanspruchung zu vermeiden. Trotz erschwerter Präparationsbedingungen wurde auf eine Fixierung des Gewebes verzichtet, um eine zusätzliche Traumatisierung zu verhindern. Die bereits isolierten Muskeltrabekel wurden nacheinander mit einer Einwegpipette vorsichtig von der Präparationsschale in einen sterilen Einwegbecher mit präoxygenierter BDM-Lösung überführt.

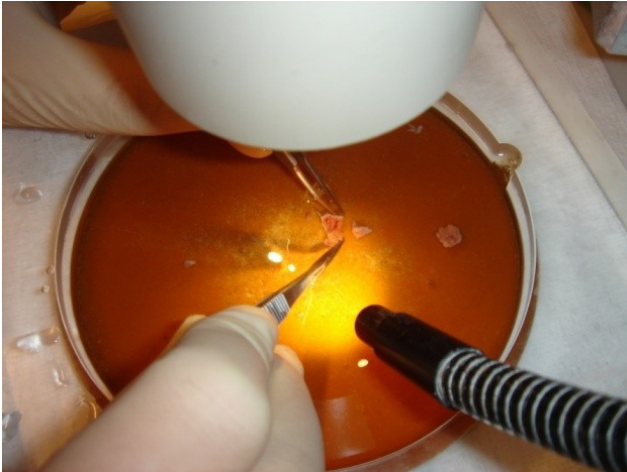


Abb. 2.6: Präparation des Herzohres in der Präparationsschale {{141 Doleschal, B. 2010}}

2.3 Beschreibung der Messanlage

Die Messanlage (Muscle Tester ORG) der Firma Scientific Instruments (Heidelberg) bestand aus vier Messeinheiten, die eine simultane Untersuchung von vier verschiedenen Muskeltrabekeln möglich machte. Die einzelnen Komponenten der Anlage sind im Folgenden aufgeführt:

- 1 Einzelne Messeinheit („Kanal“) der Viereranlage
- 2 Temperaturregler
- 3 Stimulationseinheit
- 4 Gasanschluss des Labors (Carbogen)
- 5 Stereomikroskop
- 6 Power Lab (Datenerfassung und -analyse)
- 7 Computer mit Labchart - Software

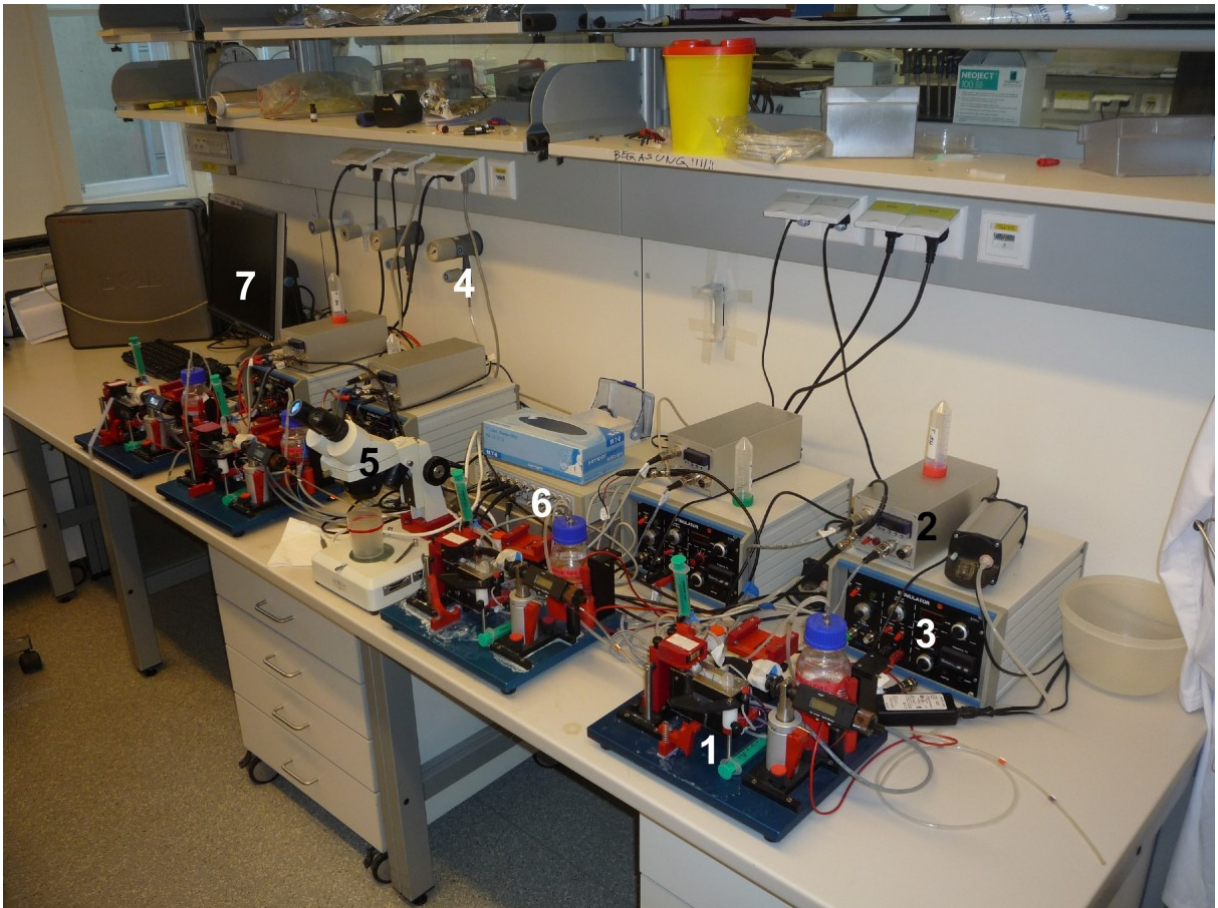


Abb. 2.7: Messanlage mit vier Einheiten {{141 Doleschal, B. 2010}}

Eine einzelne Messeinheit ist in Abb. 2.4 dargestellt. Das zentrale Element stellt das 7 ml fassende Badsystem aus Teflon, bestehend aus Haupt- und Nebenkammer, dar (Abb. 2.5). In die Hauptkammer ragten zwei 0,1 mm dünne Platinnadeln, die je an einer Kanüle befestigt waren. Die rechte Kanüle war mit der Mikrometerschraube und die Linke mit dem Kraftsensor verbunden. Auf die Nadeln konnte ein Muskelstreifen an seinen beiden Enden eingehängt werden. Mit Hilfe von zwei Aluminiumplatten und darin enthaltenen Heizelementen, die mit dem Temperaturregler verbunden waren, wurde das Organbad auf 37°C erwärmt. Zur Oxygenierung und Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde die Tyrodelösung in der Hauptkammer, durch die mit ihr verbundenen Nebenkammer, begast. Die Regulierung des Gasflusses erfolgte zum Einen durch einen Hahn am Gasanschluss des Labors und zum Anderen durch eine Schraube zur Feineinstellung direkt neben dem Badsystem. Die optimale Gaszufuhr bestand dann, wenn möglichst viel Gas eingebracht und die Oberfläche der Tyrode

möglichst ruhig war. So wurde der Trabekel optimal umspült, ohne dass die Aufzeichnung der Kontraktionen gestört wurde.

Die Stimulierung der Muskelstreifen erfolgte durch die Stimulationseinheit, die mit der rechten Aufhängung verbunden war. Rechte und linke Aufhängung fungierten zusammen als Elektroden.

Da die linke Aufhängung mit dem Kraftaufnehmer verbunden war, wurden die Kontraktionen von diesem registriert, die Signale mit Power Lab erfasst und mit dem Computerprogramm Labchart aufgezeichnet.

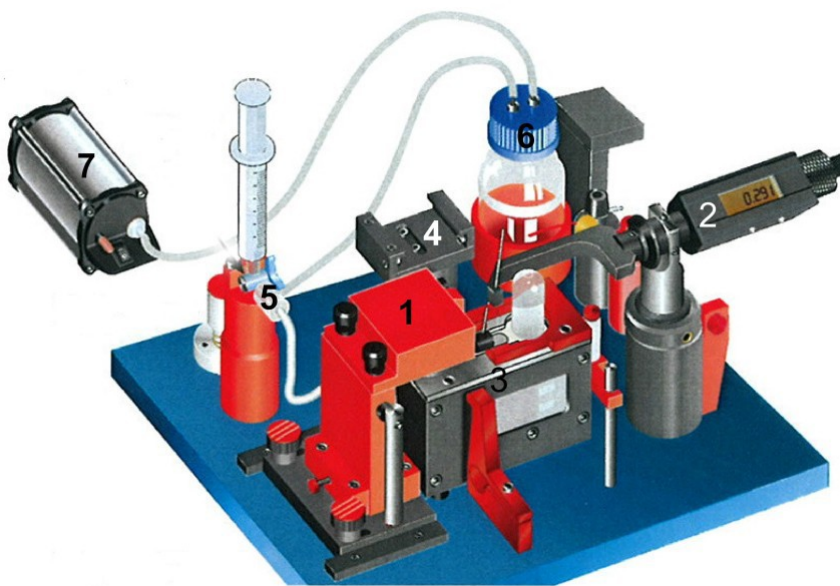


Abb. 2.8: Einzelne Messeinheit („Kanal“) der Viereranlage {{141 Doleschal, B. 2010}}
 1) Kraftaufnehmer, 2) Mikrometerschraube, 3) Badsystem mit Heizplatten, 4) Stativ für Stereomikroskop, 5) 2-Wegehahn, 6) Absaugflasche, 7) Pumpe

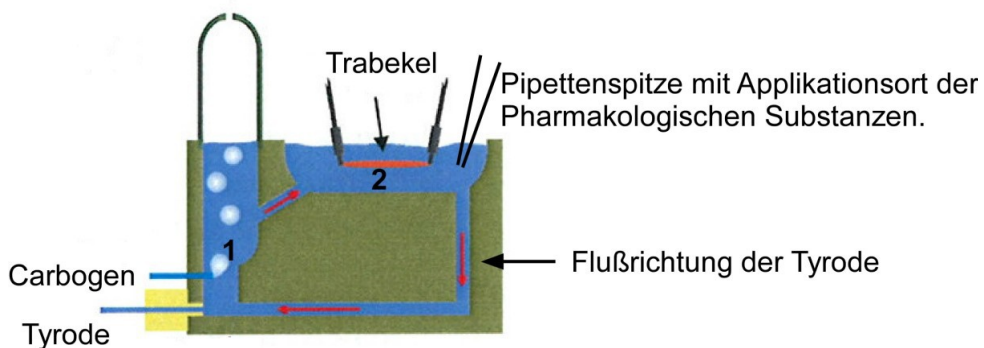


Abb. 2.9: Schematischer Aufbau des 2-Kammer Badsystems {{141 Doleschal, B. 2010}}
 1) Nebenkommer, 2) Hauptkommer

2.4 Versuchsprotokoll

2.4.1 Versuchsablauf

Vor Beginn eines Experiments wurde das Badsystem mit 7 ml Tyrode befüllt, die optimale Begasung eingestellt und das Organbad wie oben beschrieben auf 37°C erwärmt. Die Muskelstreifen wurden mit Hilfe einer Einmalpipette nacheinander in zwei verschiedene sterile Einmalurinbecher mit Tyrodelösung ohne BDM pipettiert, in welchen sie kurz belassen wurden. Dadurch konnte die kardioplege BDM-Lösung ausgewaschen werden.

Zum Einhängen der Trabekel in die Anlage musste das Badsystem zuerst nach unten gedrückt und befestigt werden. Anschließend konnte ein Tischchen, das in der Mitte eine Einkerbung aufwies, über das Organbad montiert werden. Das Stereomikroskop wurde auf das dafür vorgesehene Stativ geschoben. Nun konnte ein einzelner Trabekel in einem kleinen Tropfen Tyrode mit der Einmalpipette in die Einkerbung des Tischchens getropft werden.

Das Einhängen des Trabekels auf die Platinnadeln erfolgte mit zwei Pinzetten, wobei darauf geachtet wurde, das Gewebe spannungsfrei zu fixieren („slack length“) und so wenig wie möglich zu traumatisieren. Zum Schluss wurde das Tischchen entfernt und das Badsystem wieder in seine ursprüngliche Position gebracht, so dass die Platinnadeln mit dem Gewebe frei in der Tyrodelösung hingen (s. Abb. 2.6).

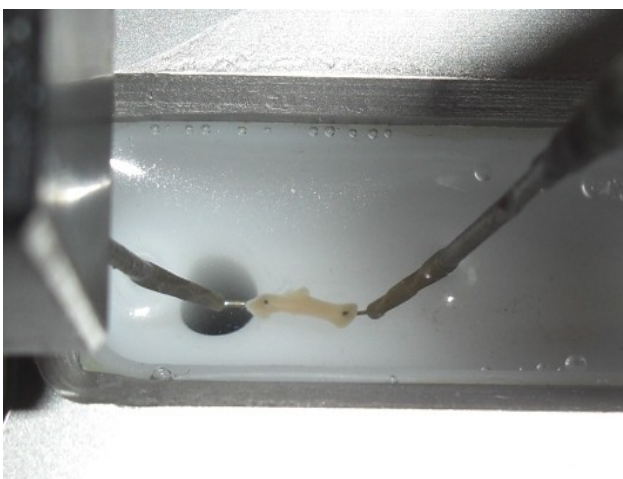


Abb. 2.10: Trabekel in der Messanlage fixiert

Die Ausgangslänge der Muskelstreifen nach dem Einhängen wurde als diastolischer Nullpunkt festgelegt. Die Ca^{2+} -Konzentration der Tyrode wurde in zwei Schritten erhöht und die Lösung somit auf eine Badkonzentration von 2,5 mM gebracht. Da die Ca^{2+} -Stammlösung 1 M betrug wurde zuerst 7,1 μl und schließlich 9,0 μl Ca^{2+} in 7 ml Tyrode gegeben (entsprechend 1,2 mM, bzw. 2,5 mM). Nach der ersten Ca^{2+} -Gabe von 7,1 μl erfolgte die Stimulation der Trabekel mit 1 Hz. Die Spannung wurde bei einem Rechteckimpuls von 5 ms so lange gesteigert, bis der Muskel das erste Mal sichtbar kontrahierte (ca. 2,5-3,5 mV). Diese sogenannte Schwellenspannung wurde um weitere 20% erhöht und bis zum Ende des Versuchs belassen.

Nachdem sich die Kontraktionskraft stabilisiert hatte, wurden die Trabekel anhand der Millimeterschraube schrittweise bis zu ihrem Kraftmaximum (L_{\max}) gedehnt. Abbildung 2.7 zeigt eine Originalregistrierung des Versuchsablaufs bis zum Zeitpunkt von L_{\max} . Anschließend begann das Messprotokoll. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Schlauchsystem zunächst mit destilliertem Wasser, dann mit Ethanol, schließlich mit 30%iger Essigsäure und zum Schluss wiederum mit destilliertem Wasser durchgespült.

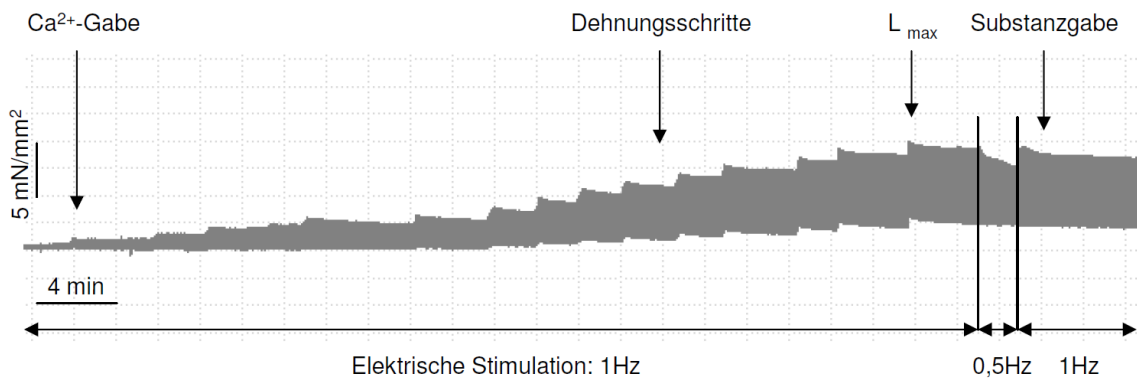


Abb. 2.11: Originalregistrierung des Versuchsablaufs bis L_{\max} (sh. 101123-vh; Ch 2)

2.4.2 Pharmakologische Substanzen

Ursodesoxycholsäure (UDCA)

Bezeichnung: Ursodeoxycholic acid, Sodium Salt, Cat. No. 672305

Firma: Calbiochem

MW: 414,6

UDCA ist eine natürliche, tertiäre, beim Menschen nur in Spuren vorkommende, Gallensäure, die in der Therapie von kleinen Gallensteinen und Lebererkrankungen eingesetzt wird. 1 g des Salzes wurde mit 8040 μl zweifach destilliertem Wasser gemischt, auf je 320 μl fassende Aliquots verteilt und bei -20°C gelagert. Die Zielkonzentration dieser Stammlösung I betrug somit 300 mM. Um Badkonzentrationen von 10; 30; 100; 300 und 1000 μM zu erreichen, wurden nacheinander 2,3; 4,7; 16,3; 46,7 und 163,3 μl der Stammlösung I in 7 ml Tyrodelösung pipettiert.

Taurocholsäure (TCA)

Bezeichnung: Taurocholic acid sodium salt; T4009

Firma: Sigma-Aldrich

MW: 2100

Taurocholsäure (TCA) ist eine mit Taurin konjugierte primäre, hydrophobe Gallensäure. Zur Herstellung einer 300 mM Stammlösung I wurden 5 g TCA in 30 997 μl zweifach destilliertem Wasser gelöst, in 320 μl große Aliquots gefüllt und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Beginn eines Experimentes wurde durch Verdünnung (1:10) mit Tyrodelösung eine 30 mM Stammlösung II erstellt. Durch Pipettieren von 2,3; 4,7; 16,3; 46,7 und 163,3 μl in 7 ml Tyrodelösung ergaben sich Badkonzentrationen von 10; 30; 100; 300 und 1000 μM .

Angiotensin II (AT II)

Bezeichnung: Angiotensin II human, Cat. No. A9525

Firma: Sigma-Aldrich

MW: 1046,18

AT II ist ein Peptidhormon und besteht aus acht Aminosäuren (Oktapeptid). Im menschlichen Organismus greift es an den AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren an und wirkt hauptsächlich vasokonstriktorisch. Um eine Stammlösung I von 3 mM herzustellen, wurde 1 mg des Salzes mit 955,8 μl zweifach destilliertem Wasser vermischt, auf je 15 μl fassende Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Kurz vor Beginn eines Experiments wurde eine Stammlösung II mit einer Konzentration von 10 μM angesetzt. Um eine Zielkonzentration von 3 nM zu erreichen, wurde 2,1 μl der Stammlösung II in 7 ml Tyrodelösung pipettiert.

Wortmannin

Bezeichnung: W1628 Wortmannin

Firma: Sigma-Aldrich

MW: 428,43

Wortmannin ist ein hoch zellpermeables Antibiotikum, das aus dem Pilz *Penicillium funiculosum* gewonnen wird {{19 Korzybski, Tadeusz 1978}}. Es wirkt inhibierend auf die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und deren Effektor Proteinkinase B - auch als Akt bezeichnet. Weiters hemmt Wortmannin die „myosin light chain kinase“ (MLCK) {{15 Nakanishi,S. 1992}} und verhindert die Wiederherstellung der Funktionstüchtigkeit von Kalzium- und Kaliumkanälen {{17 Xie,L.H. 1999;16 Cardenas,M.E. 1998; 18 Stein,R.C. 2001}}.

Um eine 1 mM Stammlösung herzustellen, wurde 1 mg Wortmannin in 2336 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst, auf je 15 μ l fassende Aliquots verteilt und bei -20°C gelagert. Durch Zugabe von 0,7 μ l der Stammlösung in 7 ml Tyrode ergab sich eine Badkonzentration von 0,1 μ M.

KN-93

Bezeichnung: KN-93, Cat. No. 422711

Firma: Calbiochem

MW: 599

KN-93 ist ein spezifischer Inhibitor der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamK II). Durch Mischen von 1 mg KN-93 mit 1669,4 μ l zweifach destilliertem Wasser ergab sich eine 1 mM Stammlösung. Die Zielkonzentration von 10 μ M wurde durch Zugabe von 70 μ l der Stammlösung in 7 ml Tyrode erreicht. Da KN-93 lichtempfindlich ist, wurden die Versuche in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

2.4.3 Messprotokolle

Nachdem die Muskeln bis zum Erreichen ihres Kraftmaximums L_{max} gedehnt worden waren, begann das Messprotokoll. Alle Trabekel wurden zunächst für jeweils eine Minute mit 1 Hz (Simulation des physiologischen Herzschlags) und anschließend mit 0,5 Hz stimuliert, da sich entwickelnde Arrhythmien bei 0,5 Hz

früher und besser zu sehen sind. Anschließend erfolgten die pharmakologischen Interventionen:

Versuchsprotokoll 1: Dosis – Wirkungskurve von Ursodesoxycholsäure (UDCA)

Die schrittweise Erhöhung der UDCA-Konzentration im Badsystem auf 10; 30; 100; 300; 1000 μM erfolgte durch direktes Pipettieren von 2,3; 4,7; 16,3; 46,7 und 163,3 μl der pharmakologischen Substanz in die Hauptkammer. Jeweils 15 min nach Konzentrationserhöhung wurden die Trabekel auf eventuell aufgetretene AEKs bei 1 Hz und 0,5 Hz untersucht.

Zum Auswaschen der Gallensäure wurde die mit UDCA versetzte Tyrodelösung mit einer 10 ml Spritze über das Schlauchsystem abgesaugt und durch frische, bereits begaste Tyrodelösung wieder aufgefüllt. Um unnötige Schäden zu vermeiden befanden sich die Muskelstreifen maximal drei Sekunden an der Luft. Das Auswaschen zeigte eine mögliche Reversibilität der Wirkung der pharmakologischen Substanz auf das Muskelgewebe. Nach Stabilisierung der Kontraktionskraft („steady state“) wurden die Trabekel hinsichtlich AEKs bei 1 Hz und 0,5 Hz erneut analysiert.

Versuchsprotokoll 2: Angiotensin II

Bei dieser Versuchsreihe wurden zwei Muskelstreifen miteinander verglichen:

Trabekel 1: AT II (Kontrolle)

Trabekel 2: AT II +TCA

Um eine Zielkonzentration von 3 nM AT II in beiden Organbädern zu erhalten, wurde je 2,1 μl AT II appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte die Analyse von auftretenden AEKs bei 1 Hz und 0,5 Hz. Anschließend wurde zu einem der beiden Trabekel schrittweise (nach demselben Schema wie im Versuchsprotokoll 1 beschrieben) TCA pipettiert und die Ergebnisse mit jenen des entsprechenden Kontrollmuskels ohne TCA-Intervention verglichen. Die Analyse der AEKs erfolgte bei beiden Muskeln zu denselben Zeitpunkten. In den Originalregistrierungen (Abb. 2.8 und 2.9) sind die genauen Abläufe von beiden Experimenten dargestellt.

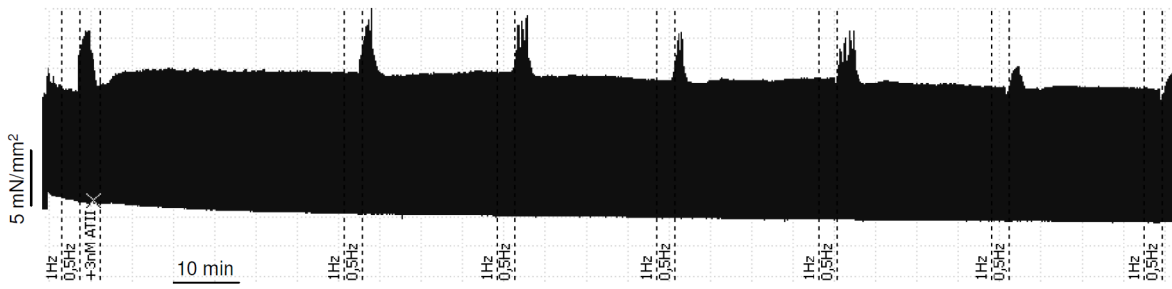


Abb. 2.12: Originalregistrierung AT II-Kontrolle mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Stimulation (sh.101124AT-vh, Ch 1)

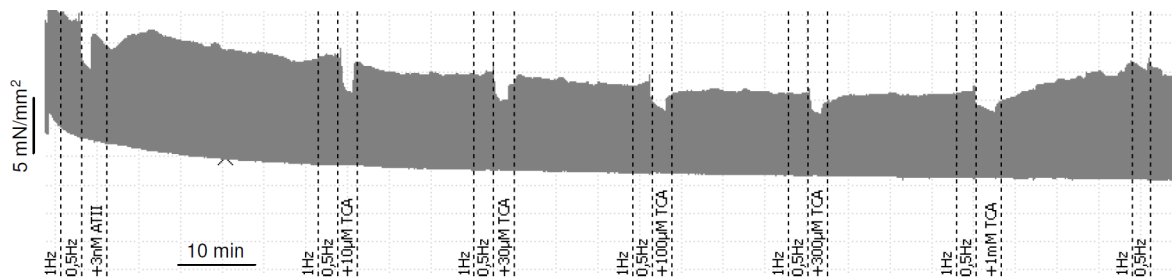


Abb. 2.13: Originalregistrierung AT II + TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Stimulation (sh.101124AT-vh, Ch 3)

Versuchsprotokoll 3: Wortmannin

Wie in Versuchsprotokoll 2 wurden bei den Experimenten mit Wortmannin ebenfalls zwei Trabekel verglichen. Hier wurde allerdings zunächst nur zu einem der beiden Muskelstreifen 0,7 µl Wortmannin (Zielkonzentration 0,1 µM) appliziert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit und Analyse der AEKs, erfolgte die schrittweise (alle 15 Minuten) Konzentrationserhöhung von TCA (10 µM bis 1000 µM) in beiden Badsystemen.

Trabekel 1: TCA (Kontrolle)

Trabekel 2: Wortmannin + TCA

In den Originalregistrierungen (Abb. 2.10 und 2.11) sind die genauen Abläufe von beiden Experimenten dargestellt.

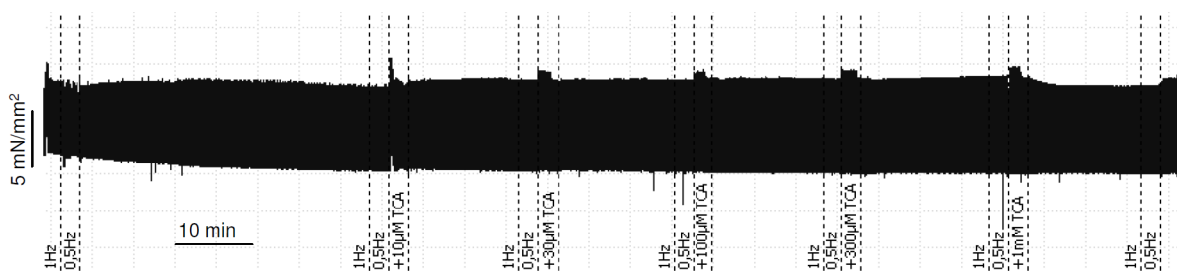


Abb. 2.14: Originalregistrierung TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Schritten (sh.101202-vh, Ch 1)

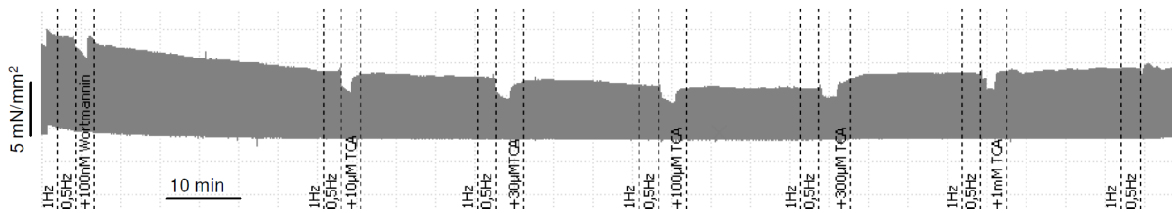


Abb. 2.15: Originalregistrierung Wortmannin + TCA mit 1 Hz- und 0,5 Hz-Schritten (sh.101123-vh, Ch 2)

Versuchsprotokoll 4: KN-93

Der Versuchsablauf mit KN-93 verlief analog zu Versuchsprotokoll 3, mit dem Unterschied, dass statt Wortmannin 70 μl KN-93 appliziert wurde (Badkonzentration: 10 μM).

Trabekel 1: TCA (Kontrolle)

Trabekel 2: KN-93 + TCA

2.4.4 Spezifische Probleme der Experimente am Vorhofmyokard

Im Gegensatz zu Ventrikelgewebe ist Vorhofmyokard besonders anfällig für Arrhythmien. Circa 50% der Muskelstreifen wurden während der Vordehnung auf L_{\max} bei einer Stimulation von 1 Hz arrhythmisch. Diese wurden von den Messungen ausgeschlossen.

2.5 Auswertung

2.5.1 Computergestützte Datenerhebung

Jeder Versuch wurde mittels PowerLab (Fa. AD Instruments) registriert und mit Hilfe von LabChart (Fa. AD Instruments) am Computerbildschirm visualisiert. Auf diese Weise konnten arrhythmische Trabekel oder Muskelstreifen, die bei L_{\max} weniger als 3,5 mN/mm^2 erreichten, unmittelbar ausgetauscht werden. Zur Vergleichbarkeit von Trabekeln unterschiedlichen Durchmessers wurden alle Kraftdaten auf die Querschnittsfläche bezogen ($[\text{mN}/\text{mm}^2]$).

Folgende Parameter wurden mittels Labchart – Analyseprogramm analysiert:

F_{dev} entwickelte Kraft (Force), ($F = ST - DT$) $[\text{mN}/\text{mm}^2]$

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]
dF/dt _{max}	maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit	[mN/mm ² /s]
dF/dt _{min}	maximale Kraftabfallsgeschwindigkeit	[mN/mm ² /s]
RT50	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 50%igen Relaxation (relaxation time)	[ms]
TT90	Zeit vom Kraftmaximum bis zur 90%igen Relaxation (twitch timing)	[ms]

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Programm zur automatischen Datenauswertung entwickelt. Da es nicht möglich war, TT90 parallel zu den restlichen Daten zu analysieren, wurde für diesen Parameter ein zusätzliches Makro erstellt. Die genaue Anleitung ist im Anhang in Kapitel B zu finden.

2.5.2 Manuelle Datenerhebung der AEKs

Die auf dem Computer gespeicherten Versuche konnten in LabChart jederzeit abgerufen werden. Mittels split view wurden zwei verschiedene Aufzeichnungsgeschwindigkeiten gewählt: „horizontal scaling 1000:1“ diente zur groben Orientierung innerhalb der Messung und im „horizontal scaling 20:1“ wurden die einzelnen AEKs pro Minute jeweils bei 1 Hz und bei 0,5 Hz manuell ausgezählt. Als AEKs wurden zusätzliche Ausschläge zwischen den stimulierten Kontraktionen bezeichnet.

2.5.3 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 (Ausnahme in Kapitel 3.1: statistische Ermittlung der p-Werte mit ANOVA). Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der verwendeten Trabekel

Für die Experimente wurden 71 Muskeltrabekel von insgesamt 26 Patienten verwendet. Die Größe der Herzohren betrug ca. 2cm x 1cm x 1cm und jene der Trabekel ca. 0,6 mm x 2,0 mm. Die Einschlusskriterien für die Verwendung der Muskeln war ein Sinusrhythmus im EKG der Patienten vor Entnahme der Probe. Trabekel, die nach Einhängen in die Muskelstreifenanlage noch vor Substanzgabe arrhythmische Extraktionen (AEKs) aufwiesen oder nach den Dehnungsschritten weniger als 3,5 mN/mm² Kraft entwickelt hatten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Ausgangspunkt aller Experimente war der Zeitpunkt nach Dehnung auf L_{max}.

Insgesamt wurden 6 Gruppen von Trabekeln untersucht und miteinander verglichen:

- 1) Trabekel, die nur mit TCA behandelt wurden (n=11)
- 2) Trabekel, die nur mit UDCA behandelt wurden (n=11)
- 3) Trabekel, die nur mit AT behandelt wurden (n=12)
- 4) Trabekel, die mit AT und später mit TCA behandelt wurden (n=15)
- 5) Trabekel, die mit Wortmannin und später mit TCA behandelt wurden (n=10)
- 6) Trabekel, die mit KN-93 und später mit TCA behandelt wurden (n=12)

Abbildung 3.1 zeigt die entwickelten Kontraktionskräfte der Trabekel (F_{dev}) bei L_{max} vor Substanzgabe. Die basale Kraftentwicklung betrug für die Trabekel, die nur mit TCA behandelt wurden $11,46 \pm 1,42$ mN/mm², für die UDCA-Gruppe $9,22 \pm 1,43$ mN/mm², für die Experimente mit AT alleine $13,08 \pm 1,82$ mN/mm², für die AT+TCA-Gruppe $10,36 \pm 1,27$ mN/mm², für die mit Wortmannin+TCA behandelten Trabekel $10,03 \pm 1,56$ mN/mm² und diejenigen mit KN-93+TCA $9,66 \pm 1,17$ mN/mm². Ein signifikanter Unterschied der basal entwickelten Kontraktionskraft ($p < 0,05$) bestand zwischen keiner der Gruppen, so dass ein Vergleich untereinander möglich war. Während mehreren Messungen wurde ein leichter negativ inotroper Effekt beobachtet, der sich allerdings nicht signifikant von der

jeweiligen substanzfreien Kontrolle unterschied. Diese Wirkung ist physiologisch und wird als „rundown“ bezeichnet.

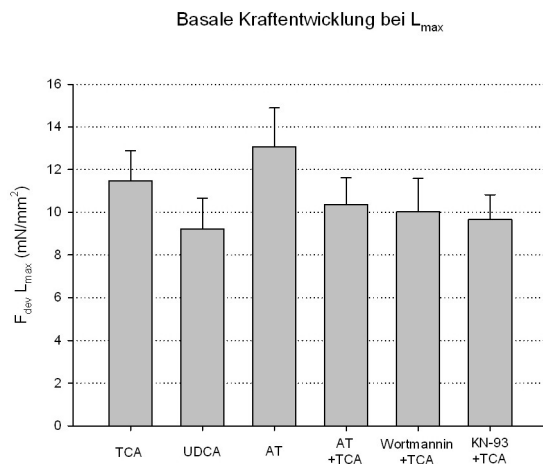


Abb. 3.16: Basale Kraftentwicklung der verwendeten Trabekel bei L_{max} vor Substanzgabe

3.2 Vergleich der beiden Gallensäuren TCA und UDCA

3.2.1 Arrhythmieentwicklung

Bezüglich der arrhythmogenen Wirkung wurde die primäre, hydrophobe GS TCA bereits von mehreren Forschungsgruppen anhand von Tiermodellen analysiert {{72 Binah,O. 1987;75 Gorelik,J. 2002; 70 Gorelik,J. 2004; 68 Kotake,H. 1989; 76 Williamson,C. 2001}}. UDCA, eine tertiäre GS dagegen, wird heute in der Therapie gegen PBC eingesetzt. Die zellulären Mechanismen und die daraus resultierenden direkten Effekte auf das humane Vorhofgewebe sind allerdings noch unklar.

Anhand einer Dosis-Wirkungskurve sollen die Wirkungen von TCA (n=11) und UDCA (n=11) bezüglich der Entwicklung von Arrhythmien mit einer GS-freien Kontrollgruppe bei 1 Hz und 0,5 Hz-Stimulation verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Muskelstreifen einer steigenden Konzentration von UDCA, bzw. TCA (10; 30; 100; 300; 1000 μ M) ausgesetzt und jeweils nach 15 min bei 1 Hz und 0,5 Hz analysiert.

Wie die Abbildung 3.2 zeigt, löste TCA ab einer Konzentration von 10 μ M bei 0,5 Hz Arrhythmien aus ($0,27 \pm 0,27 \text{ min}^{-1}$; n.s.), die bis 1000 μ M anstiegen ($4,00 \pm 3,30 \text{ min}^{-1}$; n.s.). Im Einzelnen zeigten sich bei 1 von 11 Muskeln bei 10 μ M (0,5 Hz) und bei 3 von 11 Muskeln ab 100 μ M (1 Hz) erstmals AEKs.

Eine signifikante, konzentrationsabhängige Steigerung bestand nicht. Das Maximum der AEKs bestand bei 100 μM und 1 Hz ($12,00 \pm 7,24 \text{ min}^{-1}$; n.s.), wobei bei weiterer Konzentrationssteigerung die Arrhythmiewirkung sank. Allerdings generierten 7 von 11 Muskelstreifen überhaupt keine AEKs.

Die Applikation von UDCA löste erst ab 1000 μM und 1 Hz ($1,10 \pm 1,10 \text{ min}^{-1}$; n.s.) und ab 300 μM bei 0,5 Hz ($2,73 \pm 2,73 \text{ min}^{-1}$; n.s.) AEKs aus. Bei 300 μM (0,5 Hz) entwickelte 1 von 11 Muskeln die ersten AEKs und bei 1000 μM zeigte ebenfalls jeweils ein Trabekel bei 1 Hz und 0,5 Hz AEKs. 8 von 11 Trabekeln entwickelten überhaupt keine Arrhythmien.

Durch Wechsel auf GS-freie Tyrode erwiesen sich die AEKs bei 1 Trabekel sowohl bei 1 Hz, als auch bei 0,5 Hz als reversibel. Ein Muskelstreifen wurde bei 1 Hz und 2 weitere Trabekel bei 0,5 Hz erstmals nach dem wash-out arrhythmisch, was vermutlich auf die Belastung durch die Erneuerung der Tyrodelösung zurückzuführen und keine Wirkung der einzelnen Substanzen ist.

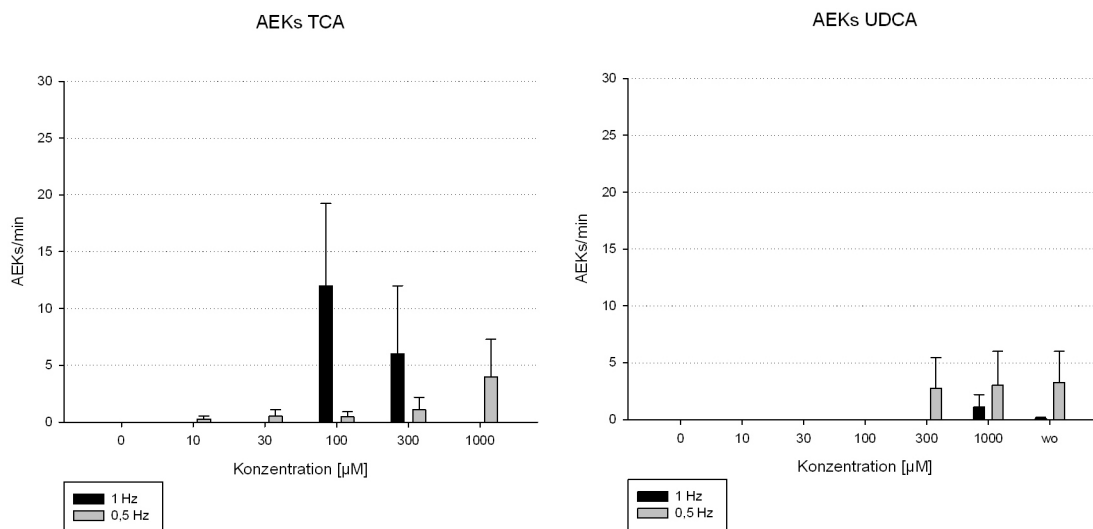


Abb. 3.17: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA (links) und UDCA (rechts) bei 1 Hz und 0,5 Hz bei steigender Konzentration

In Abbildung 3.3 ist die Arrhythmieentwicklung bei 100 μM TCA zu sehen. Nach 3,5 min traten bei diesem Trabekel die ersten Arrhythmien auf, die während der Analyse, die 15 min nach Applikation erfolgte (Pfeil bei 1 Hz), 12 AEKs min^{-1} bei 1 Hz und 5 AEKs min^{-1} bei 0,5 Hz ergab. In der vergrößerten Ansicht ist ein Ausschnitt während der 1 Hz Stimulation dargestellt, in der zwei deutliche Extraktionen zu sehen sind.

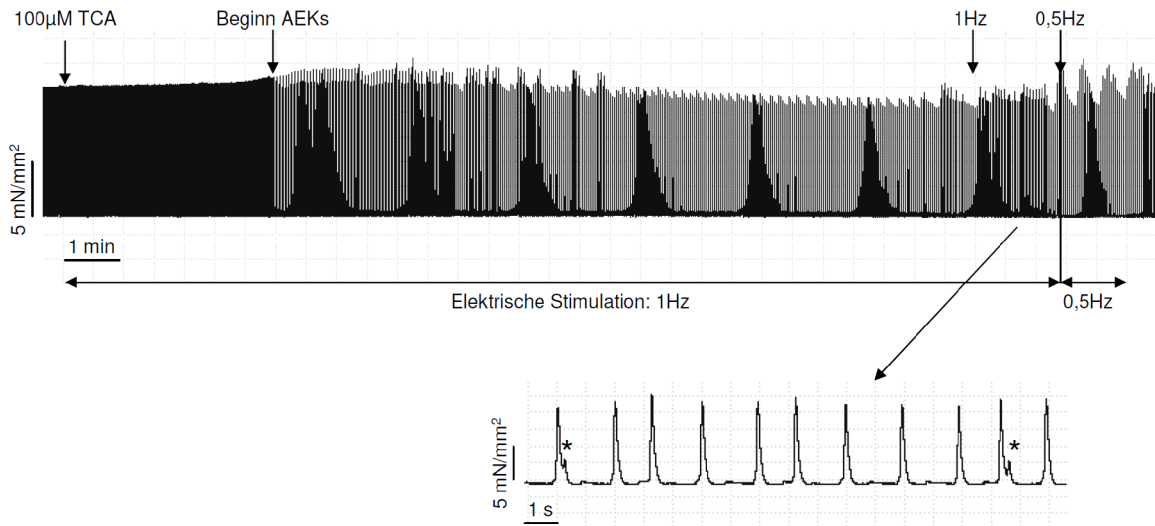


Abb. 3.18: Originalregistrierung der Entstehung von Arrhythmien bei 100 μ M TCA (deutliche AEKs sind mit Asterisken (*) gekennzeichnet) (sh.101201-vh, Ch1)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass weder TCA, noch UDCA arrhythmogen wirken, da die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind.

3.2.2 Kraftentwicklung

TCA (n=11) und UDCA (n=11) wurden zusätzlich hinsichtlich der Kraftentwicklung analysiert. Der Verlauf wird in Abbildung 3.4 gezeigt. TCA bewirkte zwar einen höheren Kraftverlust im Vergleich zu den GS-freien Kontrollmuskeln (n=12), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Nach Zugabe von UDCA wurde bei 10 μ M bis 100 μ M ein physiologischer rundown beobachtet. Bei einer Badkonzentration von 300 μ M UDCA zeigte sich jedoch bei 9 von 11 Muskeln eine kurzzeitige Zunahme der Kontraktionskraft. Der Mittelwert steigerte sich somit von $86,38 \pm 4,54\%$ auf $100,67 \pm 4,98\%$ der Ausgangskraft bei 1 Hz und von $91,95 \pm 5,85\%$ auf $110,48 \pm 7,69\%$ der Ausgangskraft bei 0,5 Hz. Im Vergleich zu den GS-freien Kontrollmuskeln war bei 300 μ M ein signifikanter Kraftunterschied von +12,59% bei 1 Hz ($p_{\#}<0,02$) und von +19,90% bei 0,5 Hz ($p_{\#}<0,03$) zu verzeichnen.

Bei weiterer Konzentrationserhöhung stellte sich wiederum der physiologische Kraftverlust ein. Der washout am Ende der Messung bewirkte keine weitere Veränderung. Die restlichen kinetischen Parameter, wie TPT, dF/dt_{max} , dF/dt_{min} , RT50, TT90 blieben bis auf die Relaxationszeiten von beiden Substanzen unbeeinflusst. RT50, bzw. TT90 sanken bei 1 mM TCA und 0,5 Hz von 106,71 ms

(vor TCA-Applikation) auf 82,36 ms, bzw. von 233,31 ms auf 180,25 ms ($p < 0,01$). Durch UDCA-Applikation zeigten sich keine signifikanten Verkürzungen der Relaxationszeiten.

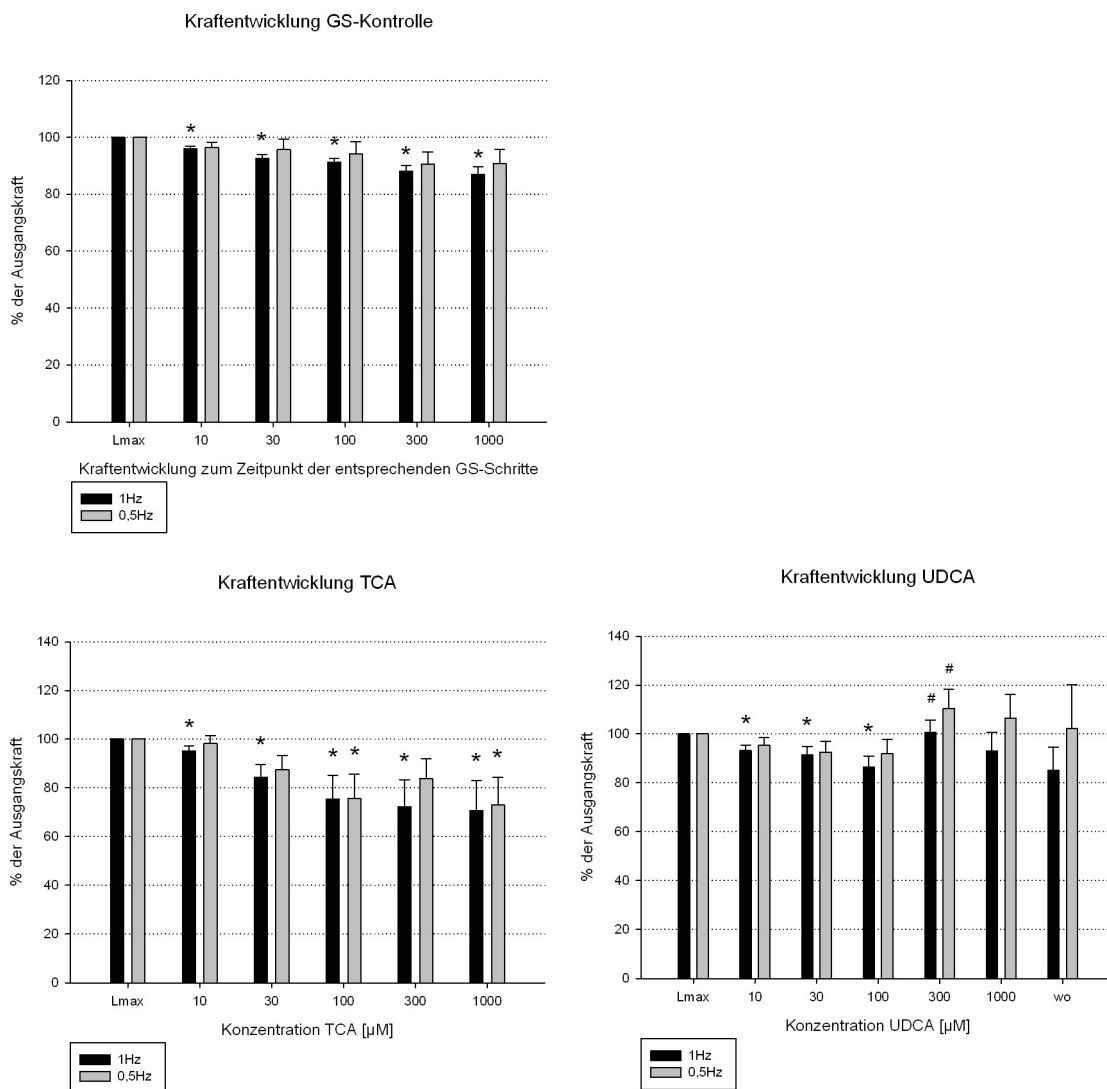


Abb. 3.19: Kraftentwicklung: Vergleich der GS-Kontrolle (unbehandelte Muskeln, oben) mit TCA (links) und UDCA (rechts) bei 1Hz und 0,5 Hz bei steigender Konzentration

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die GS keine beachtenswerten Auswirkungen auf die Kraftentwicklung haben.

3.3 Senkung der Arrhythmieschwelle durch Angiotensin II

3.3.1 Vergleich der Arrhythmiewirkungen

Mehrere Untersuchungen haben ergeben, dass hohe Angiotensin II-Spiegel Arrhythmien am humanen Myokard auslösen {{84 von Lewinski,D. 2008;97 Nakashima,H. 2000; 89 Zhao,Z. 2011}}. Die direkte Wirkung auf die Myokardzellen ist jedoch nach wie vor umstritten.

In dieser Arbeit soll durch AT II ein proarrhythmogenes Milieu geschaffen werden, um z. B. die neurohumorale Dysregulation bei Herzinsuffizienz zu simulieren. Durch eine 30-minütige Inkubationszeit mit 3 nM AT II soll die Schwelle für Arrhythmien gesenkt werden, so dass TCA eine zusätzliche Erhöhung der AEKs bewirkt. Insgesamt wurden 27 Trabekel mit AT II präinkubiert, wovon 15 anschließend zusätzlich mit TCA in steigender Konzentration behandelt wurden.

Wie Abbildung 3.5 zeigt, löste AT II alleine bei 1 Hz noch keine AEKs aus. Nach der stufenweisen Erhöhung auf 1000 μM TCA folgte allerdings eine signifikante Arrhythmieentwicklung von $17,73 \pm 6,92 \text{ min}^{-1}$ ($p < 0,03$), auch im Vergleich zur AT-Kontrolle ($p_{\#} < 0,04$). Abbildung 3.6 zeigt einen Trabekel, der mit AT II präinkubiert wurde, bei 1000 μM TCA. 1,5 min nach Erreichen von 1000 μM TCA generierten sich erstmals Arrhythmien bei 1 Hz. In der vergrößerten Darstellung ist ein Teil der Analysephase nach 15 min bei 1 Hz (Beginn jeweils mit Pfeil 1 Hz und 0,5 Hz gekennzeichnet) zu sehen. Hier traten AEKs nach jeder Kontraktion auf, also 60 min^{-1} .

Bei langsamerer Stimulation (0,5 Hz) entwickelten sich schon nach der Inkubation mit AT II alleine $7,42 \pm 3,87 \text{ AEKs min}^{-1}$ (n.s.). Eine signifikante Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert konnte erst nach Applikation von 1000 μM TCA beobachtet werden (0,5 Hz; $14,73 \pm 4,33 \text{ min}^{-1}$; $p < 0,02$).

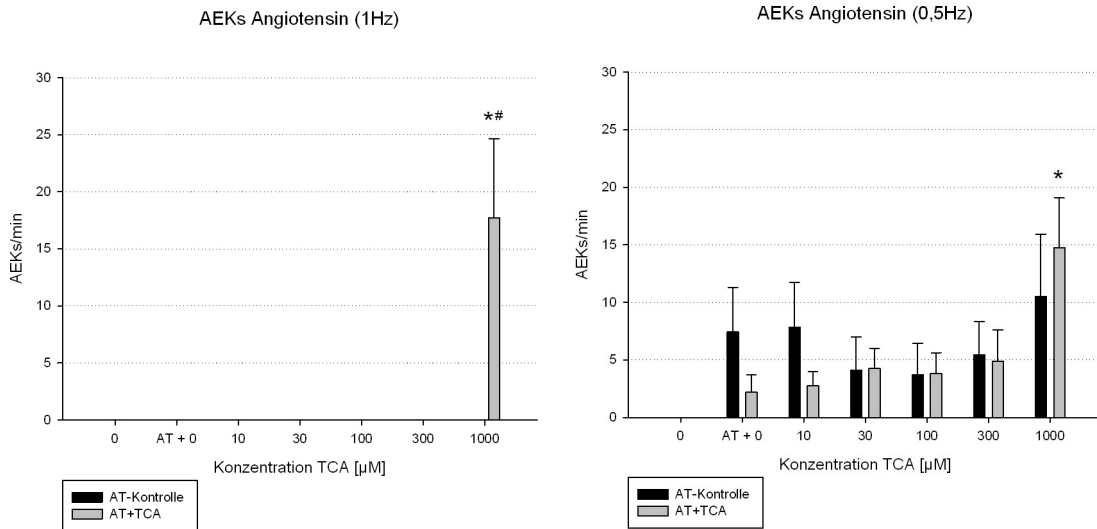


Abb. 3.20: Entwicklung von Arrhythmien durch AT und AT+TCA bei steigender TCA-Konzentration bei 1Hz (links) und 0,5 Hz (rechts)

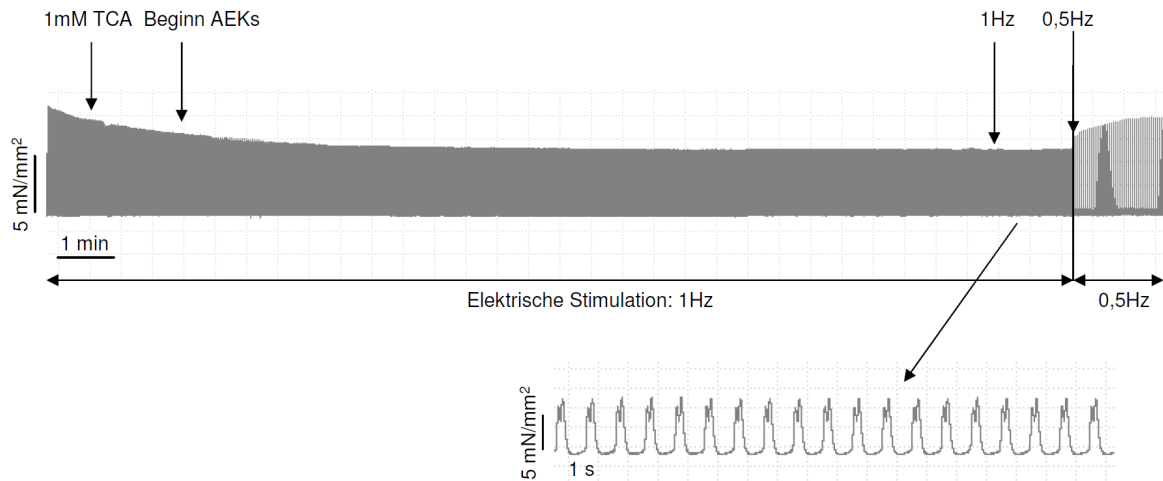


Abb. 3.21: Originalregistrierung der Entstehung von Arrhythmien bei 1mM TCA nach Präinkubation mit 3nM AT II (deutliche AEKs bei jedem Schlag), (sh.101122AT-vh, Ch 2)

3.3.2 Kraftentwicklung

Einige Forschungsarbeiten ergaben, dass AT II einen positiv inotropen Effekt auf das Myokard hat {{84 von Lewinski,D. 2008;108 Baker,K.M. 1989; 110 Moura,D. 1999}}. Diese These soll in dieser Arbeit bewiesen werden.

Abbildung 3.7 impliziert 27 Trabekel, die nach Gabe von 3 nM AT II einen eindeutig signifikanten Kraftanstieg von $12,98 \pm 3,1\%$ von L_{max} ($p < 0,0003$) bei 1 Hz und $13,99 \pm 4,91\%$ von L_{max} ($p < 0,01$) bei 0,5 Hz aufwiesen.

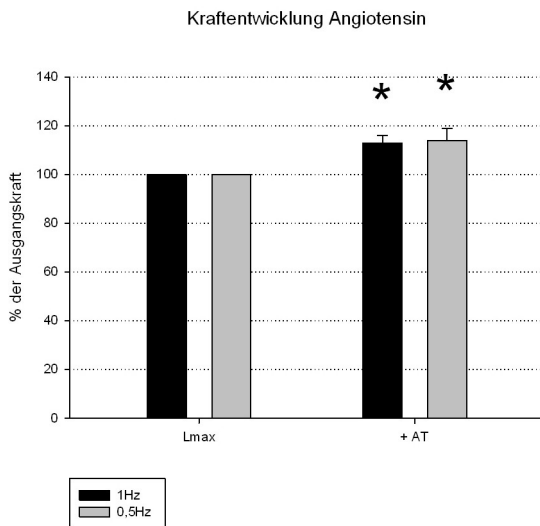


Abb. 3.22: Kraftentwicklung durch Angiotensin bei 1 Hz und 0,5 Hz

Den Kraftverlauf eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach Applikation von AT II zeigt Abbildung 3.8. Nach ca. zwei Minuten begann die Zunahme der Kontraktionskraft und steigerte sich von 6,45 mN/mm² auf 7,28 mN/mm² um 13% von L_{max}.

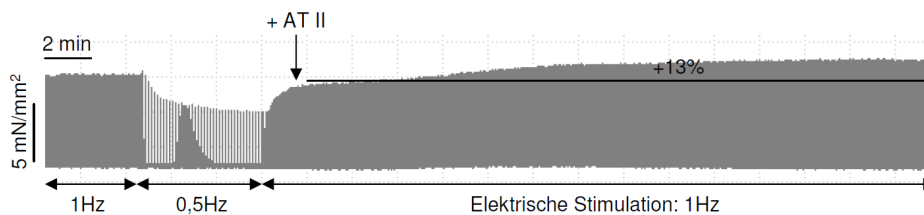


Abb. 3.23: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach ATII – Applikation (sh.100510AT-vh, Ch 3)

Die Kraftentwicklung von AT II + TCA wird in Abbildung 3.9 dargestellt. Erst ab 1000 μ M TCA war bei beiden Stimulationsfrequenzen ein signifikanter Kraftverlust zu beobachten (1 Hz; um $37,14 \pm 5,79\%$ der Kraft nach Beendigung der Inkubationszeit mit AT II, im Folgenden „+AT“ genannt; $p < 0,00002$), (0,5 Hz; $30,17 \pm 8,16\%$ von „+AT“; $p < 0,003$), der von der Größenordnung deutlich über dem physiologischen rundown lag. Bei 1 Hz wies der negativ inotrope Effekt sogar einen signifikanten Unterschied ($p_{\#} < 0,002$) im Vergleich zur AT-Kontrolle auf. Trotz der anfänglich positiv inotropen Wirkung von Angiotensin II (s. Abb. 3.7, 3.8) stellte sich nach Ende der Inkubation auch bei der AT-Kontrolle ein physiologischer rundown ein (s. Abb. 3.9).

Bezüglich der Relaxationszeiten änderten sich bei AT+TCA die Parameter RT50 und TT90 bei 1000 μM TCA. RT50 reduzierte sich von 93,74 ms auf 76,82 ms bei 1 Hz ($p < 0,002$) und von 101,03 ms auf 81,26 ms bei 0,5 Hz ($p < 0,003$). TT90 sank von 199,19 ms auf 162,68 ms bei 1 Hz ($p < 0,0002$) und von 230,24 ms auf 197,43 ms bei 0,5 Hz ($p < 0,03$). Im Vergleich zur AT-Kontrolle bestand bis auf TT90 bei 0,5 Hz ($p_{\#} < 0,04$) bei allen oben aufgeführten Parametern kein signifikanter Unterschied. Außerdem nahm die TPT bei AT+TCA bei 1000 μM TCA (1 Hz) von 84,01 ms auf 142,81 ms signifikant zu ($p < 0,0003$), wobei auch ein Unterschied zur AT-Kontrolle bestand ($p_{\#} < 0,01$). Die übrigen kinetischen Parameter (dF/dt_{max} , dF/dt_{min}) blieben weitgehend unverändert.

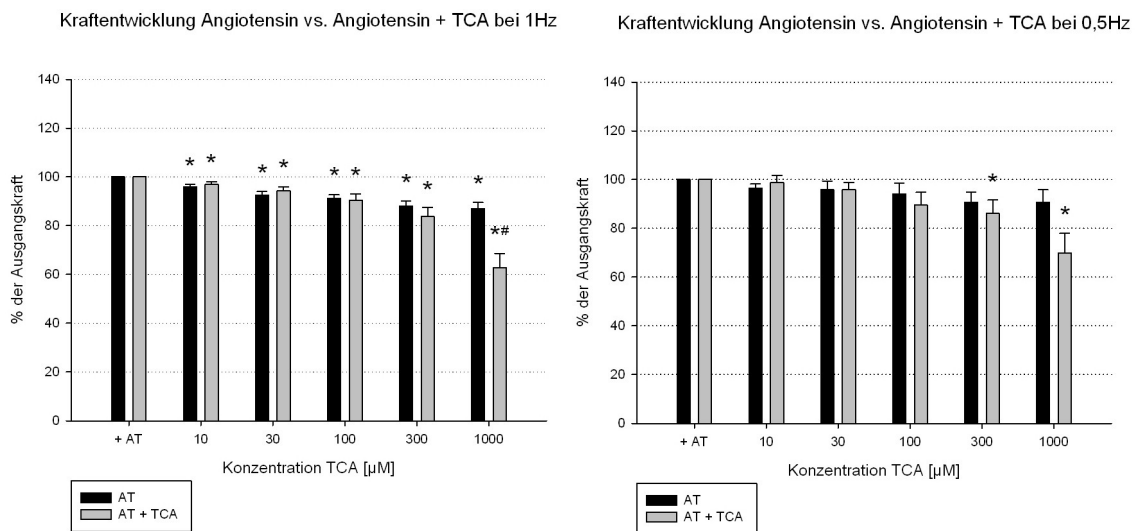


Abb. 3.24: Vergleich der Kraftentwicklung durch AT vs. AT+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts)

3.4 Blockade des AKT-Signalweges durch Wortmannin

3.4.1 Arrhythmieentwicklung

Wortmannin ist ein spezifischer Inhibitor der PI3K und hemmt somit auch deren Effektorprotein PKB (AKT). In einer Publikation von Desai et al. wurde gezeigt, dass die Behandlung von Kardiomyozyten von Mäusen mit TCA die PKB aktivierte {{111 Desai, M.S. 2010}}.

In dieser Arbeit wurde getestet, ob TCA-induzierte Arrhythmien durch PKB-Blockade mit Wortmannin verhindert werden könnten. In der Therapie gegen Gallensäure-induzierte Arrhythmien könnte Wortmannin so einen neuen Weg eröffnen.

In den durchgeführten Messungen wurde die Wirkung von Wortmannin+TCA und TCA alleine bezüglich der Entwicklung von AEKs, verglichen. Nachdem die 30-minütige Inkubationszeit mit 0,1 μM Wortmannin beendet war, wurde dem Vorhofgewebe TCA ($n=10$) in steigender Konzentration zugeführt und mit entsprechenden Trabekeln verglichen, die nicht mit Wortmannin präinkubiert worden waren ($n=11$).

Wie Abbildung 3.10 illustriert, zeigten sich bereits nach der Inkubation mit Wortmannin vor TCA-Gabe die ersten AEKs bei 1 Hz ($12,00 \pm 8,00 \text{ min}^{-1}$; n.s.). Ein signifikanter Unterschied zwischen Wortmannin+TCA und TCA bestand nicht. Es zeigte sich ein Trend, wonach insgesamt bei Wortmannin+TCA mehr AEKs auftraten als bei TCA alleine. Besonders war diese Tendenz bei 300 μM (Wortmannin+TCA: 1 Hz; $23,30 \pm 8,69 \text{ min}^{-1}$; n.s., bzw. 0,5Hz; $6,67 \pm 4,41 \text{ min}^{-1}$; n.s.), (TCA alleine: 1 Hz; $6,00 \pm 6,00 \text{ min}^{-1}$; n.s., bzw. 0,5 Hz; $1,10 \pm 1,10 \text{ min}^{-1}$; n.s.). Diese war jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant.

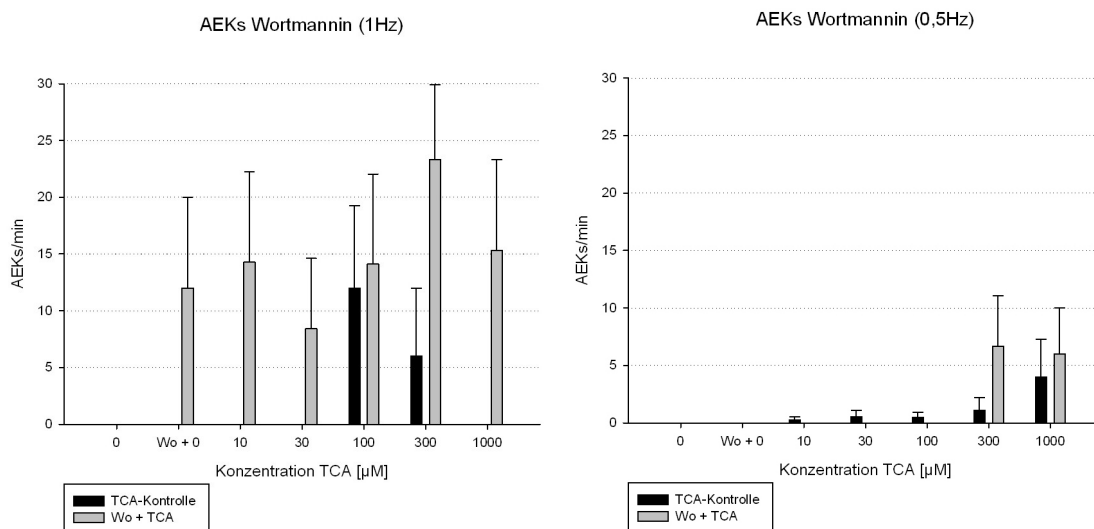


Abb. 3.25: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA vs. Wortmannin+TCA bei 1 Hz (links) und 0,5 Hz (rechts)

Abbildung 3.11 veranschaulicht die Arrhythmieentwicklung bei Wortmannin+TCA. Die Vergrößerung zeigt die einzelnen AEKs (60 min^{-1}), die erstmals bei 300 μM TCA auftraten. Ab der höchsten TCA-Konzentration von 1 mM kann der unregelmäßige Verlauf auch in der nicht vergrößerten Darstellung beobachtet werden.

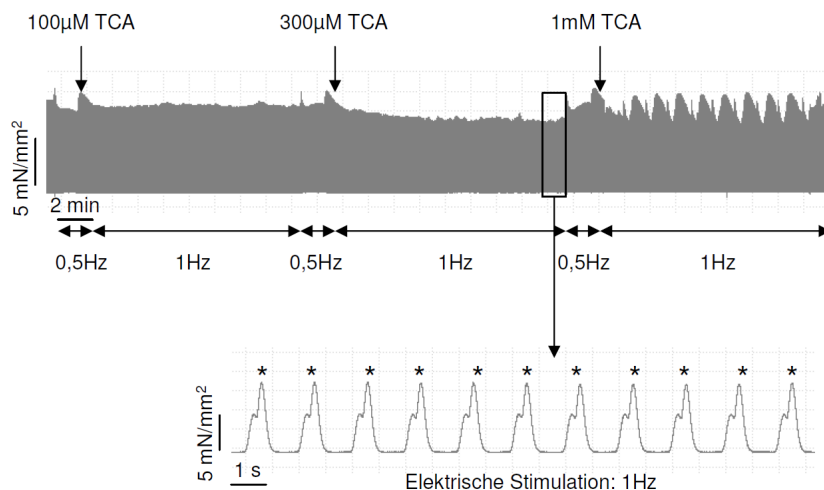


Abb. 3.26: Originalregistrierung der Arrhythmieentwicklung bei Wortmannin+TCA; AEKs sind mit Aserisken (*) gekennzeichnet (sh.101124-vh, Ch 3)

3.4.2 Kraftentwicklung

Auch der Einfluss von Wortmannin auf die Kontraktionskraft des isolierten Vorhofmyokards wurde getestet. Insgesamt wurden 21 Trabekel analysiert. Anhand der Abbildung 3.12 wird der deutliche Kraftverlust von $21,98 \pm 6,92\%$ von L_{\max} ($p < 0,02$) bei 1 Hz und $27,95 \pm 7,71\%$ von L_{\max} ($p < 0,01$) bei 0,5 Hz dargestellt.

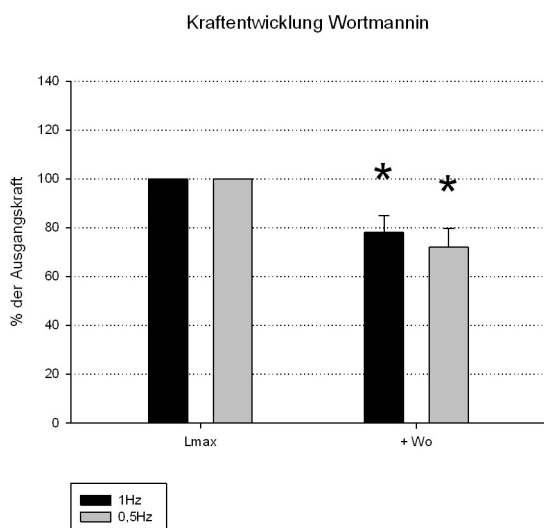


Abb. 3.27: Kraftentwicklung durch Wortmannin bei 1 Hz und 0,5 Hz

Auch in der Originalregistrierung (Abb. 3.13) ist die negativ inotrope Wirkung unmittelbar nach Beginn der 30-minütigen Inkubationszeit zu sehen. Dieser Trabekel verlor $32,49\%$ (von L_{\max}) an Kontraktionskraft. Der Wert sank von $12,91 \text{ mN/mm}^2$ bei L_{\max} auf $8,72 \text{ mN/mm}^2$ nach der Wortmannin-Inkubation.

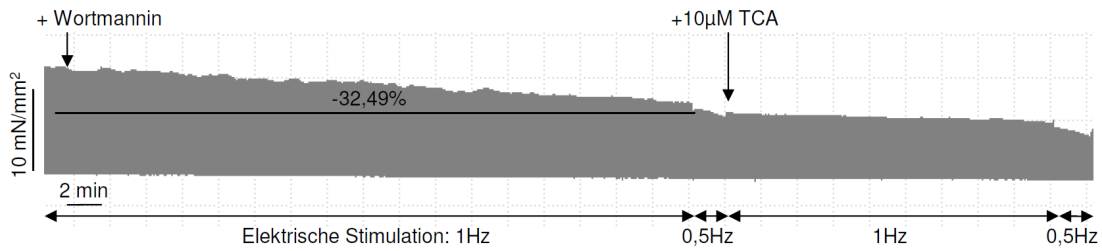


Abb. 3.28: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach Wortmannin-Applikation (sh.101130-vh, Ch 2)

In den Vergleichsmessungen von Wortmannin+TCA zu TCA zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Ausserhalb des physiologischen rundowns bestand bei Wortmannin+TCA nach Ablauf der Präinkubation keine Veränderung der Kontraktionskraft (s. Abb. 3.14). Weitere kinetische Parameter, wie TPT, dF/dt_{max} , dF/dt_{min} , RT50 und TT90 wurden durch Wortmannin nicht in beachtenswerter Weise verändert.

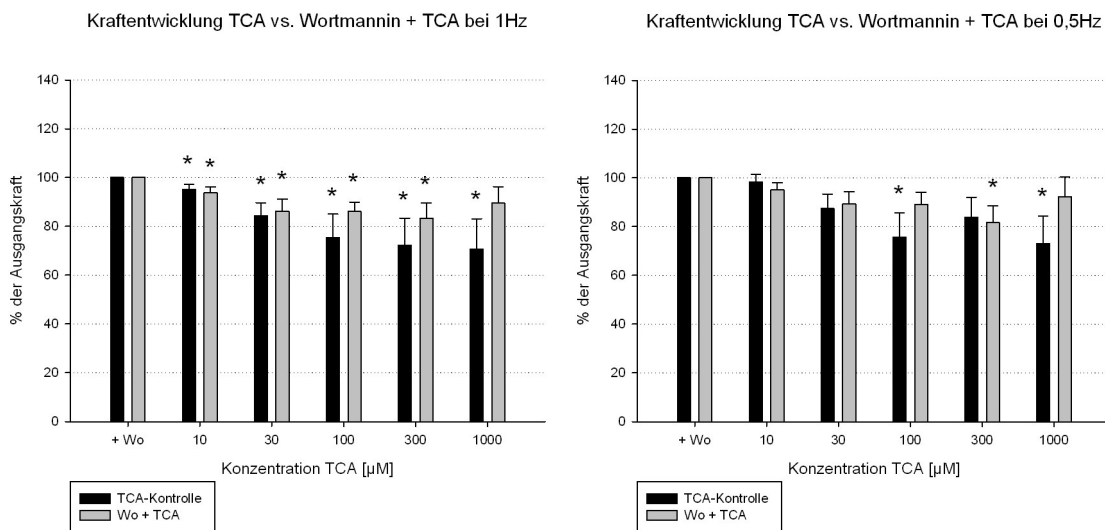


Abb. 3.29: Vergleich der Kraftentwicklung durch TCA vs. Wortmannin+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts)

3.5 Blockade der CamKinase II durch KN-93

3.5.1 Arrhythmieentwicklung

KN-93 ist ein Inhibitor der kardialen CamK II. Es wird vermutet, dass die Blockade der CamK II Arrhythmien verhindern kann {{112 Sag,C.M. 2009;116 Bers,D.M. 2005}}. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde getestet, ob die

Entwicklung TCA-induzierter AEKs durch die Behandlung mit KN-93 abgewendet werden könnten.

Nachdem 12 von insgesamt 23 Trabekeln mit 10 μM KN-93 30 min lang inkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von TCA in steigender Konzentration (10 μM bis 1000 μM). Anschließend wurden diese Muskelstreifen mit nur mit TCA behandelten Kontrollen ($n=11$) verglichen.

Während der Inkubationszeit mit KN-93 entwickelten sich keine Arrhythmien. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz und Anwesenheit von KN-93 bestanden bei 1 von 12 Trabekeln bei 30 μM TCA AEKs ($5,0 \pm 5,0 \text{ min}^{-1}$; n.s.), während bei der TCA-Kontrolle noch keine AEKS vorhanden waren. Bei 100 und 300 μM TCA+KN-93 allerdings zeigten sich vergleichsweise weniger AEKs (100 μM : $3,33 \pm 3,33 \text{ min}^{-1}$; n.s.; 300 μM : $5,00 \pm 5,00 \text{ min}^{-1}$; n.s.), als bei den reinen TCA-Messungen (100 μM : $12,00 \pm 7,24 \text{ min}^{-1}$; n.s.; 300 μM : $6,00 \pm 6,00 \text{ min}^{-1}$; n.s.). 2 von 12 Muskeln generierten erst bei 1000 μM TCA+KN-93 AEKs ($12,00 \pm 8,00 \text{ min}^{-1}$; n.s.), in der Kontrolle zeigten sich hier keine Arrhythmien. Bei weiteren 2 Trabekeln verschwanden die vorher entstandenen AEKs bei 1000 μM TCA wieder. Bei der langsameren Stimulation (0,5 Hz) konnten bei den mit KN-93 präinkubierten Trabekeln bis einschließlich 300 μM TCA keine Arrhythmien beobachtet werden. 4 von 12 Muskeln entwickelten bei 1000 μM TCA+KN-93 erstmals AEKs ($11,7 \pm 6,36 \text{ min}^{-1}$; n.s.). Im Vergleich dazu bestanden in der Kontrollgruppe bereits bei 10 μM AEKs ($0,27 \pm 0,27 \text{ min}^{-1}$; n.s.).

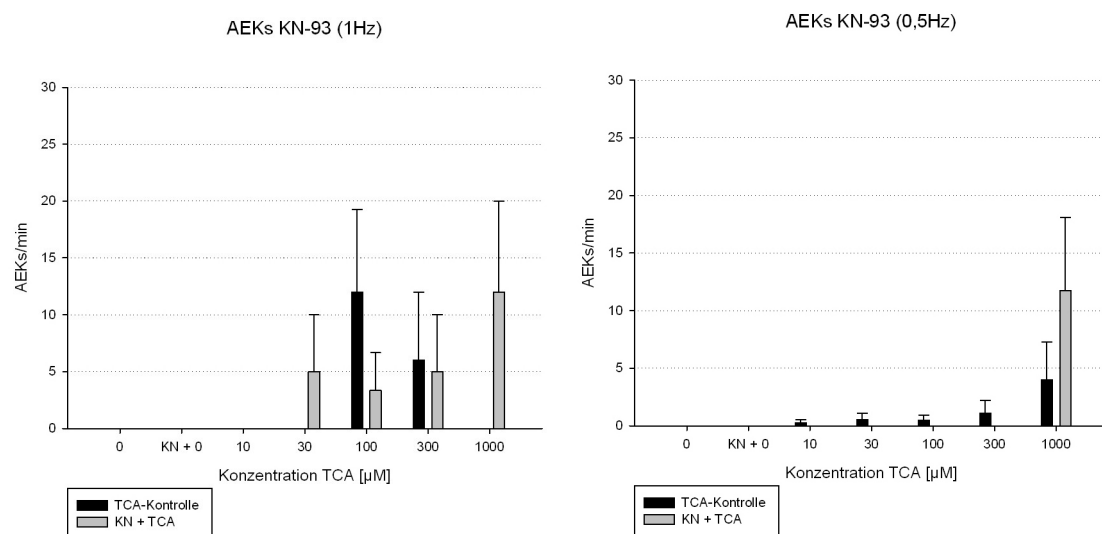


Abb. 3.30: Entwicklung von Arrhythmien durch TCA vs. KN-93+TCA bei 1 Hz (links) und 0,5 Hz (rechts)

In der folgenden Originalregistrierung (Abb. 3.16) ist die Arrhythmieentwicklung eines Trabekels bei 300 μM TCA mit vorheriger KN-93-Präinkubation dargestellt. Bei einer Stimulation von 1 Hz (s. vergrößerte Abbildung) sind erstmals AEKs bei jeder Kontraktion sichtbar (60 min^{-1}).

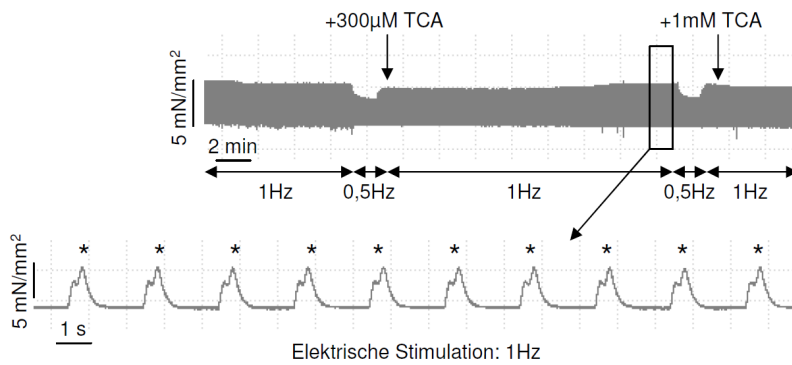


Abb. 3.31: Originalregistrierung der Arrhythmieentwicklung bei KN-93+TCA; AEKs sind mit Aserisken (*) gekennzeichnet (sh.100511, Ch 3)

3.5.2 Kraftentwicklung

Hinsichtlich der Entwicklung der Kontraktionskraft der Trabekel ($n=23$) zeigte sich durch KN-93 keine Veränderung außerhalb des physiologischen rundowns (s. Abb. 3.17). Der physiologische Kraftverlust betrug bei 1 Hz $12,38 \pm 8,69\%$ von L_{max} (n.s.) und bei 0,5 Hz $13,96 \pm 9,57\%$ von L_{max} (n.s.).

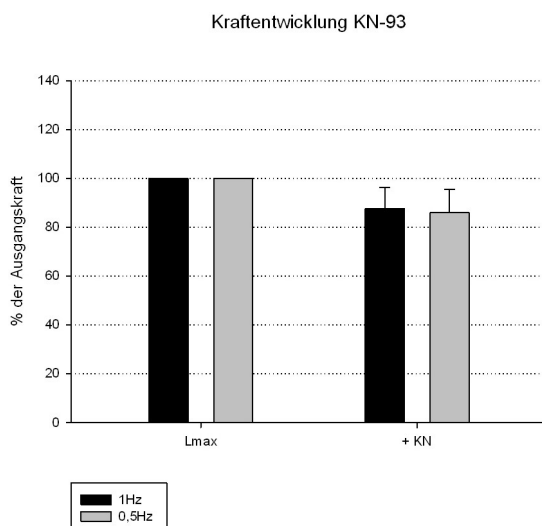


Abb. 3.32: Kraftentwicklung durch KN-93 bei 1 Hz und 0,5 Hz

Trotz der fehlenden Signifikanz des rundowns der Trabekel, die mit KN-93 präinkubiert wurden, kann der Kraftverlust von $14,31 \text{ mN/mm}^2$ auf $12,04 \text{ mN/mm}^2$ um $15,86\%$ von L_{max} anhand der folgenden Originalregistrierung beobachtet werden.

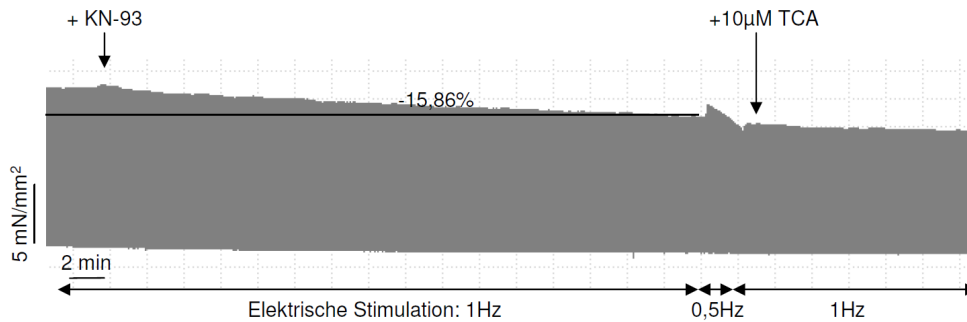


Abb. 3.33: Originalregistrierung des Kraftverlaufs eines einzelnen Muskelstreifens vor und nach KN-93 – Applikation (sh.101130-vh, Ch 3)

In Abbildung 3.19 wurde eine signifikant negativ inotrope Wirkung beider Messgruppen sichtbar. Bei $1000 \mu\text{M}$ TCA verringerte sich die Kraft von KN-93+TCA im Vergleich zum Ausgangswert bei 1 Hz um $29,50 \pm 4,42\%$ von der Kraft nach Beendigung der Inkubationszeit mit KN-93 (im Folgenden „+KN“ genannt) ($p < 0,0001$) und bei 0,5 Hz um $29,35 \pm 4,31\%$ von „+KN“ ($p < 0,0001$). Ein Unterschied zwischen KN-93+TCA vs. TCA bestand jedoch nicht.

Bezüglich der Relaxationszeiten änderten sich bei KN+TCA die Parameter RT50 und TT90 während der KN-93-Inkubation. RT50 reduzierte sich von $103,29 \text{ ms}$ auf $92,27 \text{ ms}$ bei 1 Hz ($p < 0,03$) und von $119,64 \text{ ms}$ auf $102,12 \text{ ms}$ bei 0,5 Hz ($p < 0,01$). TT90 sank von $215,78 \text{ ms}$ auf $191,04 \text{ ms}$ bei 1 Hz ($p < 0,007$) und von $258,91 \text{ ms}$ auf $215,63 \text{ ms}$ bei 0,5 Hz ($p < 0,006$). Außerdem erhöhte sich die TPT bei 1 Hz und $1000 \mu\text{M}$ TCA von $90,21 \text{ ms}$ auf $126,04 \text{ ms}$. Andere kinetische Parameter (dF/dt_{max} , dF/dt_{min}) blieben unbeeinflusst.

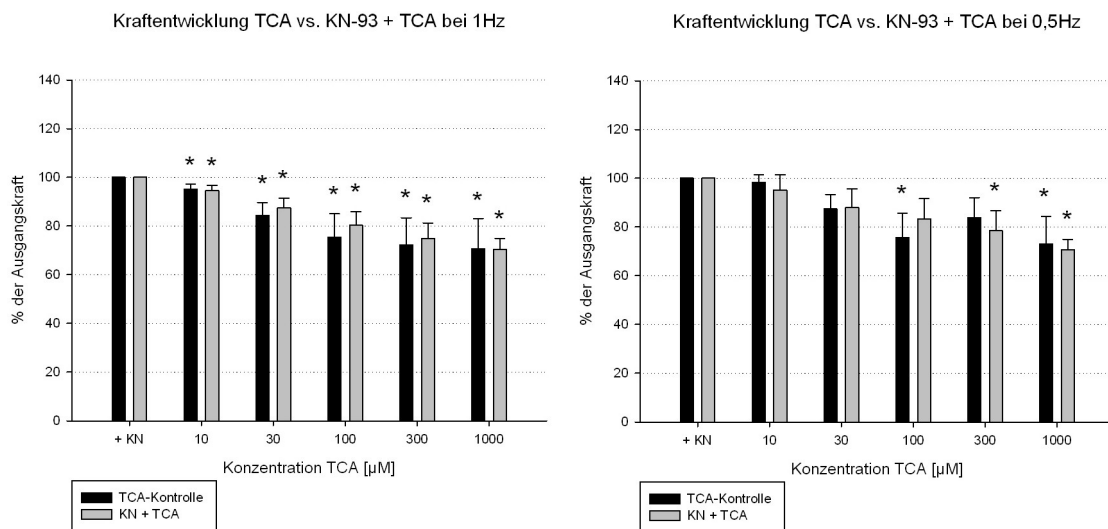


Abb. 3.34: Vergleich der Kraftentwicklung durch TCA vs. KN-93+TCA bei 1Hz (links) und 0,5Hz (rechts)

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Gallensäuren und der modifizierende Einfluss von Peptiden auf diese in multizellulären Muskelstreifenpräparaten des humanen Vorhofmyokards untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Auslösung von Arrhythmien gelegt.

Da in diesem Fall keine in vivo Versuche am Menschen durchgeführt werden können, bietet die Analyse von humanen Muskeltrabekeln eine gute Alternative zum Tiermodell. Der Vorteil im Vergleich zum Tiermodell besteht darin, dass diese Versuche direkt an humanem Vorhofmyokard durchgeführt wurden. Ergebnisse aus Tierexperimenten lassen sich teilweise nicht oder nur eingeschränkt auf humanes Gewebe übertragen.

Die Bedingungen wurden möglichst physiologisch gehalten (Bikarbonat-gepufferte Tyrodelösung, 37°C, pH-Wert 7,4), so dass sich die Situation des Muskelgewebes zu jener in vivo möglichst ähnlich darstellte.

Die vorliegenden Experimente dienen dazu, die schädigende, bzw. mögliche schützende Wirkung von bestimmten Gallensäuren (TCA, bzw. UDCA) auf Kardiomyozyten nachzuweisen. Durch Applikation von Substanzen wie AT II werden mögliche gemeinsame Angriffspunkte exploriert. Die Blockade von Arrhythmie-auslösenden Signalwegen durch Wortmannin oder KN-93 liefert weitere Informationen über die Wirkungsweise der GS.

4.1 Die Auswirkungen von TCA und UDCA auf den Rhythmus

Untersuchungen im Zusammenhang mit ICP stellten einen Zusammenhang zwischen den hohen maternalen GS-Spiegel und den Herzrhythmusstörungen des Feten her {{73 Glantz,A. 2004}}. Daraus erwuchs die Hypothese, dass bestimmte GS am humanen Myokard AEKs auslösen können. Als Hauptangriffspunkt der GS in Kardiomyozyten wird der G-Protein gekoppelte TGR5-Rezeptor vermutet {{111 Desai,M.S. 2010}}.

In einer Publikation von Gorelik et al. wurde die protektive Wirkung von UDCA gegen TCA-induzierte AEKs anhand von Rattenkardiomyozyten untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine UDCA-Präinkubation die Entwicklung von Arrhythmien verhinderte {{77 Gorelik,J. 2003}}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Arrhythmiewirkung der primären, hydrophoben GS TCA und der tertiären, hydrophilen GS UDCA in steigender Konzentration (10 μ M bis 1 mM) auf humane Muskelstreifen analysiert.

Sowohl TCA, als auch UDCA lösten AEKs aus, jedoch bestand statistisch kein signifikanter Unterschied zum GS-freien Zustand. Insgesamt kann gesagt werden, dass weder TCA, noch UDCA eine signifikant arrhythmogene Wirkung besitzen. Die Hypothese der protektiven Wirkung von UDCA direkt am Kardiomyozyten konnte somit mittels dieser Experimente nicht bestätigt werden, da diese GS alleine bereits Tendenzen zeigte, AEKs auslösen zu können und somit keinen schützenden Effekt zeigte.

Die bei tierischen Experimenten beobachtete schützende Wirkung von UDCA ist wahrscheinlich in erster Linie auf hepatische Effekte zurückzuführen, vor allem auf Protektion der Hepatozyten vor GS-induzierte Apoptose und Stimulation der hepatobiliären Sekretion {{78 Paumgartner,G. 2002;143 Perez,M.J. 2009}}.

Verschiedene Forschungsgruppen diskutierten Gründe, warum GS eine gewisse Tendenz aufweisen, AEKs zu triggern {{111 Desai,M.S. 2010;132 Iguchi,Y. 2011; 75 Gorelik,J. 2002; 79 Sheikh Abdul Kadir,S.H. 2010}}. Möglich wäre eine Einlagerung der GS in die Zellmembran von Kardiomyozyten und die daraus resultierende Membranstabilität {{111 Desai,M.S. 2010;143 Perez,M.J. 2009}}. Eine weitere Ursache wird in direkten TGR5-Rezeptor-vermittelten Mechanismen vermutet {{132 Iguchi,Y. 2011}}. Es erscheint möglich, dass durch Aktivierung dieses Rezeptors G-Protein-gekoppelt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, die AEKs hervorrufen können. Da die Entdeckung des TGR5-Rezeptors erst kürzlich erfolgte, können diesbezüglich noch keine spezifischeren Aussagen getroffen werden {{111 Desai,M.S. 2010;132 Iguchi,Y. 2011}}.

Die GS könnten jedoch auch den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR beeinflussen. Diese Beobachtung wurde in einer Messreihe von Gorelik et al. nach TCA-Applikation gemacht. Der erhöhte diastolische SR Ausstrom (Ca^{2+} -Leck) war sogar in Abwesenheit einer SR Ca^{2+} -Überladung vorhanden und könnte zu einem Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Ausstrom durch die RyR und/ oder zur Aktivierung des NCX mit darauffolgender Depolarisation geführt haben {{75 Gorelik,J. 2002}}.

Die neueste Theorie in Bezug auf GS-getriggerte AEKs ist die Hypothese des partiellen Agonismus am muskarinischen M_2 -Rezeptor. Ein durch TCA hervorgerufener Verlust der Synchronisation der Ca^{2+} -Ströme wurde in neonatalen

Rattenkardiomyozyten beobachtet. Die Blockade des M₂-Rezeptors verhinderte TCA-induzierte AEKs vollständig {{79 Sheikh Abdul Kadir,S.H. 2010}}.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass GS das AP beeinflussen, wie zum Beispiel die Verlängerung der Refraktärzeit in EADs resultieren könnte {{145 Primessnig, U. 2011}}.

Die zurzeit vorhandenen Erklärungsansätze für mögliche proarrhythmogene Tendenzen von TCA und UDCA sind im Folgenden noch einmal zusammengefasst:

- 1 Membranstabilität {{111 Desai,M.S. 2010;143 Perez,M.J. 2009}}
- 2 TGR5-Rezeptor-vermittelte Effekte {{132 Iguchi,Y. 2011}}
- 3 Veränderung des SR Ca²⁺-Ausstroms {{75 Gorelik,J. 2002}}
- 4 Partieller Agonismus am muskarinischen M₂-Rezeptor {{79 Sheikh Abdul Kadir,S.H. 2010}}
- 5 AP-Veränderungen {{145 Primessnig, U. 2011}}

Seitens der Inotropie kann festgehalten werden, dass TCA tendenziell negativ inotrop wirkt, wobei dieser Effekt statistisch nicht signifikant ist. Man kann somit nur von einer negativ inotropen Tendenz durch TCA ausgehen, welche auch in mehreren Publikationen beschrieben wurde. Bereits in den 80er Jahren durchgeführte Analysen von tierischem Myokard - vor allem von Ratten und Hasen - ergaben eine negativ inotrope Wirkung durch TCA {{72 Binah,O. 1987;68 Kotake,H. 1989}}. Die Hauptursache dieses Effektes wird im verminderten Ca²⁺-Einstrom durch die Zellmembran vermutet {{72 Binah,O. 1987;75 Gorelik,J. 2002; 68 Kotake,H. 1989}}.

UDCA dagegen zeigte bei 300µM einen positiv inotropen Effekt (PIE), die im Vergleich zum Ausgangswert nicht, jedoch im Vergleich zur GS-freien Kontrolle einen signifikanten (p_#<0,03) Unterschied aufweist. In in-vivo Studien wurde der Effekt von UDCA auf die Kontraktionskraft der Gallenblase untersucht. Es konnte eine Zunahme der Kontraktionskraft beobachtet werden {{133 Guarino,M.P. 2007;134 van de Heijning,B.J. 1999}}. Möglicherweise wird durch UDCA der Cholesterolgehalt der Plasmamembran von Myozyten und die Anzahl von schädigenden biochemischen Parametern durch oxidativen Stress (zum Beispiel

H₂O₂ und Katalaseaktivität) verringert {{134 van de Heijning,B.J. 1999;133 Guarino,M.P. 2007}}. Es ist nicht auszuschließen, dass diese zellulären Mechanismen auch am Myokard eine Rolle spielen und besonders bei 300 µM UDCA einen PIE ausüben.

Die Verkürzung der Relaxationsparameter RT50 und TT90 bei 1 mM TCA und 0,5 Hz sind angesichts der extrem hohen TCA-Konzentration am ehesten toxisch bedingt. UDCA scheint diesbezüglich eine weniger schädigende Wirkung auszuüben.

4.2 Senkung der Arrhythmieschwelle durch Angiotensin II

4.2.1 Die Entwicklung von AEKs durch Angiotensin II und TCA

An humanen Vorhoftrabekeln konnte bereits die pro-arrhythmogene Wirkung von Angiotensin II bei 100 nM gezeigt werden {{84 von Lewinski,D. 2008}}.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Muskelstreifen mit 3 nM AT II präinkubiert, um die Schwelle für Arrhythmien zu senken und das Milieu, das z. B. bei Herzinsuffizienz für erhöhte Arrhythmogenität verantwortlich ist, zu imitieren. Durch Zugabe von TCA wird eine Kumulation der AEKs erwartet.

Die niedrige AT-Konzentration allein löste nur bei einer Stimulation von 0,5 Hz AEKs aus. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der AT-Kontrolle und AT+TCA bestand erst bei der höchsten getesteten Konzentration von TCA. Eine kumulative Wirkung von AT+TCA lag bei den durchgeführten Messungen somit erst bei 1000 µM TCA vor.

Somit ist wahrscheinlich, dass Angiotensin und TCA unterschiedliche Angriffspunkte an Kardiomyozyten besitzen und eine Stimulation durch G_q-Protein-Agonisten wie AT II das arrhythmische Potential von GS nicht beeinflusst.

Wie im vorherigen Kapitel erläutert, wird unter anderem vermutet, dass sich TCA in die Zellmembran einlagert, diese destabilisiert und dadurch AEKs entstehen {{143 Perez,M.J. 2009;111 Desai,M.S. 2010}}.

Neben der elektromechanischen Koppelung kann eine Kontraktion im Myokard auch ohne Aktionspotential durch die pharmakomechanische Koppelung ausgelöst werden. Ein für diese Arbeit relevantes Beispiel dafür stellt der

sarkoplasmatische IP_3 -Rezeptor dar. Obwohl dieser Rezeptor im adulten Arbeitsmyokard im Vergleich zu RyR nicht reichlich vorhanden ist ($\sim 100:1$) {{129 Katz,A.M. 1996;130 Kockskemper,J. 2008}}, könnte dieser eine Ursache für die Entstehung von Arrhythmien sein.

Wie Abbildung 4.1 zeigt, wird die Signalkaskade durch extrazelluläre Botenstoffe wie (in diesem Fall) Angiotensin II oder alpha-adrenerge Agonisten {{129 Katz,A.M. 1996}} durch Bindung an G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren angeregt. Dadurch wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) umwandelt. IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor (IP_3R), so dass Ca^{2+} aus dem SR in den Intrazellulärraum ausströmt {{29 Fabiato,A. 1983;127 Nakayama,H. 2010}}. Calmodulin kann nun mit dem Ca^{2+} einen Komplex bilden und die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) stimulieren, welche die regulatorischen leichten Ketten (MLC) unter ATP-Verbrauch phosphoryliert und den Querbrückenmechanismus zwischen Aktin und Myosin auslöst {{92 Speckmann, E.J. 2008}}.

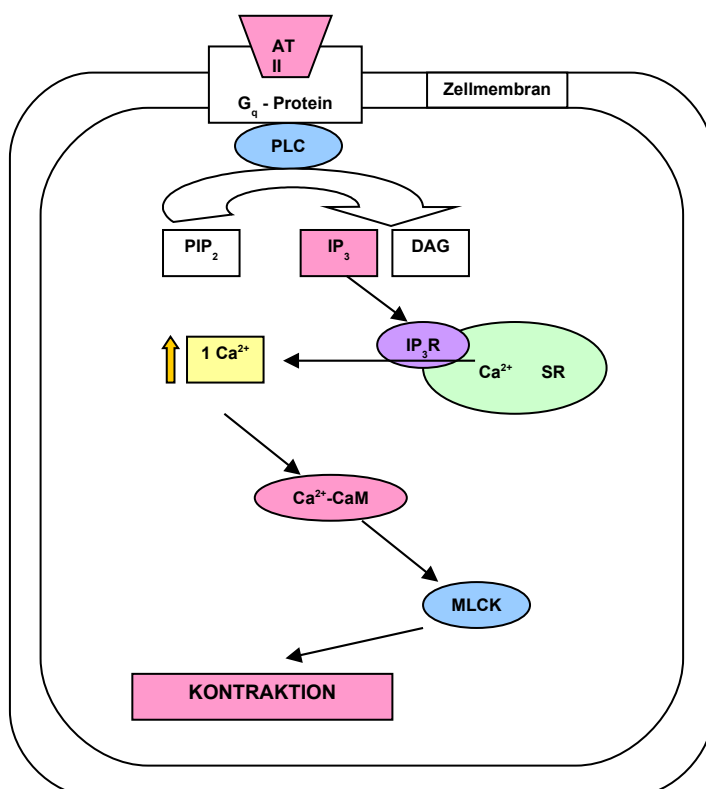


Abb. 4.35: Der durch AT II ausgelöste IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR

Die AT₁-vermittelte, pro-arrhythmogene Wirkung von Angiotensin II besteht wahrscheinlich in der Induktion von DADs {{84 von Lewinski,D. 2008}}:

Der IP₃-abhängige sarkoplasmatische Ca²⁺-Ausstrom bewirkt vermutlich einen größeren, RyR-vermittelten Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR, so dass der NCX ein Ca²⁺-Ion im Austausch mit drei Na⁺-Ionen aus der Zelle herauspumpt. Dieser Vorgang resultiert schließlich in einer Membrandepolarisation und der Entstehung von DADs {{127 Nakayama,H. 2010;29 Fabiato,A. 1983}} (s. Abb.4.2).

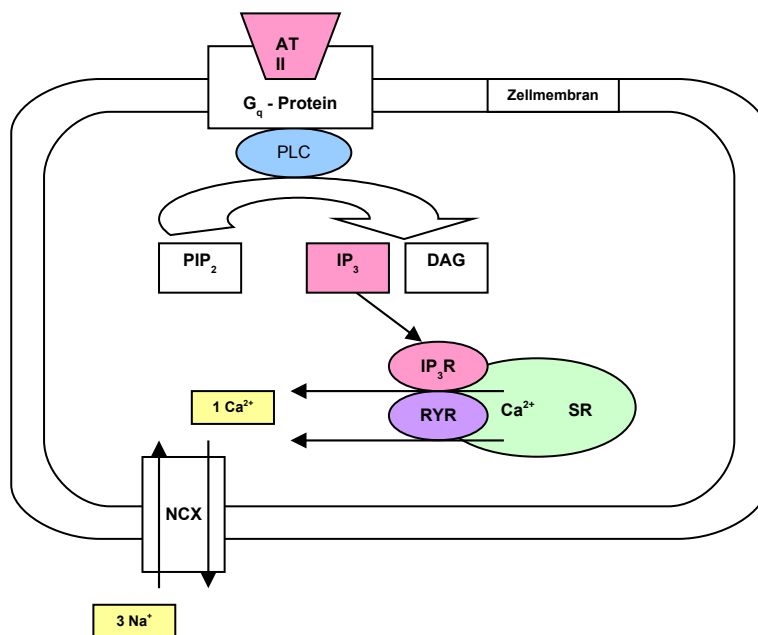


Abb. 4.36: IP₃ vermittelte Entstehung von AEKs

4.2.2 Die Kraftentwicklung durch AT II

Der positiv inotrope Effekt von AT II konnte in dieser Arbeit anhand der Analyse von Muskelstreifen bestätigt werden. Diese Wirkung beruht vermutlich auf dem Mitwirken der pharmakomechanischen Koppelung, die AT₁-vermittelt durch AT II ausgelöst wird. Der additive IP₃-abhängige Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR führt zusammen mit dem RyR-vermittelten Ca²⁺-Ausstrom zu einem gesteigerten intrazellulären Ca²⁺-Gehalt und somit zur Erhöhung der Kontraktionskraft. Interessanterweise sind im Vorhofgewebe verhältnismäßig mehr IP₃-Rezeptoren vorhanden, als im Ventrikel, was den statistisch signifikanten (p<0,01), großen PIE von Angiotensin II erklärt {{130 Kockskamper,J. 2008}}.

Zwischen TCA und AT II kann keine nennenswerte Interaktion bezüglich der Kraftentwicklung beobachtet werden. Die plötzliche negativ inotrope Wirkung bei 1 mM TCA ist vermutlich auf die toxische Wirkung der massiv supraphysiologischen TCA-Konzentration zurückzuführen.

4.3 Blockade des AKT – Signalweges durch Wortmannin

4.3.1 Wortmannin und dessen Auswirkungen auf den Rhythmus

Wortmannin ist ein Inhibitor der PI3K und deren Effektorprotein PKB (AKT). Von Desai et al. wurden die kardialen Auswirkungen der biliären Fibrose an Mäusen untersucht. Durch die künstlich gesteigerten TCA-Werte im Serum wurde AKT aktiviert. Bei den Tieren traten Störungen der kardialen Zellsignaltransduktion und des Rhythmus auf. Des Weiteren konnten strukturelle, funktionelle und energetische Veränderungen festgestellt werden {{111 Desai,M.S. 2010}}.

Da Wortmannin AKT blockiert, besteht die Frage, ob sich diese Effekte durch diese Substanz verhindern lassen. Die Intention der hier durchgeführten Experimente war dies zu prüfen.

Allerdings zeigte sich, dass die Inkubation durch Wortmannin alleine bereits Arrhythmien an den Muskelpräparaten auslöste und die Zugabe von TCA diesen Effekt teilweise verstärkte. Insgesamt traten bei Wortmannin+TCA mehr AEKs auf, als bei der TCA-Kontrolle. Diese Effekte waren jedoch nicht statistisch signifikant. Folglich ist es möglich, dass Wortmannin und TCA tendenziell unabhängig voneinander Rhythmusstörungen auslösen können.

Die möglichen Angriffspunkte von GS wurden in Kapitel 4.1 diskutiert. Die Wirkungsweise von Wortmannin bezogen auf die Arrhythmogenität ist noch nicht aufgeklärt. Anhand von Mäusen wurde bereits gezeigt, dass die Reduktion der PI3K zu einer gesteigerten Anfälligkeit für Arrhythmien führen kann. Ausserdem berichteten Pretorius und Mitarbeiter, dass die PI3K-Aktivität in Herzohren von Patienten mit Vorhofflimmern niedriger gewesen sei, als in jenen mit Sinusrhythmus {{139 Pretorius,L. 2009}}. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der PI3K durch Wortmannin allein eventuell Arrhythmien hervorrufen kann. Die Resultate der hier durchgeführten Experimente bekräftigen dies.

4.3.2 Beeinflussung der Kontraktionskraft durch Wortmannin

Der negativ inotrope Effekt (NIE), welcher in den vorliegenden Messungen nach Wortmannin - Applikation zu beobachten war, kann vermutlich durch die Blockade der MLCK und/ oder der Inhibierung der PI3K-Signalkaskade erklärt werden.

Die MLCK phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins, wodurch Myosin enthemmt, der Querbrückenmechanismus mit Aktin ausgelöst wird und eine Muskelkontraktion stattfinden kann. Wortmannin ist ein direkter Hemmstoff der MLCK {{15 Nakanishi,S. 1992}}. Es ist wahrscheinlich, dass die Blockade der MLCK durch Wortmannin ein Verlust der Kontraktionskraft bewirkt.

Des Weiteren ist es möglich, dass Wortmannin durch Blockade der PI3K die systolische Kraft mindert. An isolierten humanen Muskelstreifen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der PI3K den durch Insulin ausgelösten PIE verhindern kann. Der teilweise Ca^{2+} -abhängige PIE resultiert von einem verstärkten, umgekehrten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch und dem dadurch vermehrten SR Ca^{2+} -Gehalt {{138 von Lewinski,D. 2005}}. Wortmannin könnte durch Bremsen dieses Vorgangs den intrazellulären und SR Ca^{2+} -Gehalt vermutlich reduzieren, was sich auch auf die Kontraktionskraft auswirken würde.

4.4 Blockade der CamKinase II durch KN-93

4.4.1 Kardiale Wirkungen der CamK II

Die Calmodulin-abhängige Kinase II ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und kommt in ihrer δ -Isoform im Zytosol der Herzzelle vor {{112 Sag,C.M. 2009}}. Sie ist wesentlich an der Kalziumhomöostase beteiligt und spielt eine Rolle bei der elektromechanischen Koppelung {{112 Sag,C.M. 2009;114 Singh,M.V. 2009; 116 Bers,D.M. 2005}}. Bei kardialen Erkrankungen wie der ischämischen und dilatativen Kardiomyopathie oder nach Herzinfarkt ist die Expression der CamK II gesteigert {{112 Sag,C.M. 2009;114 Singh,M.V. 2009; 116 Bers,D.M. 2005}}.

Die Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels bewirkt eine Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen an das Calmodulin. Dieser nun hydrophobe Ca/Calmodulin-Komplex aktiviert die Cam-Kinase II, die zahlreiche intrazelluläre Proteine, die am Ca^{2+} -Stoffwechsel beteiligt sind (L-Typ- Ca^{2+} -/ Na^+ -Kanäle, RyR, Phospholamban) phosphoryliert {{113 Schulman,H. 1978;116 Bers,D.M. 2005}}.

Es wird vermutet, dass die CaMK II im Kardiomyozyten auf verschiedensten Wegen Arrhythmien auslösen kann (s. Abb. 4.3). So wäre es möglich, dass ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle EADs zur Folge hat. Auch könnte ein verstärkter Ca^{2+} -Einstrom die RyRs aktivieren, was in einer Membrandepolarisation durch NCX-Stimulation resultieren und zu DADs führen könnte. Diese Vorgänge würden den Ca^{2+} -Gehalt des SR herabsetzen und die Kontraktionskraft würde reduziert werden {{116 Bers,D.M. 2005;21 Bers,D.M. 2010}}.

Eine weitere Funktion der CaMK II ist die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), was die SERCA enthemmt und den SR Ca^{2+} -Gehalt erhöht. Dieser Effekt stellt eine andere Möglichkeit dar, indirekt durch Verstärkung des diastolischen SR Ca^{2+} -Lecks AEKs auslösen zu können {{21 Bers,D.M. 2010}}. Andererseits wird dadurch wiederum der Ca^{2+} -Verlust durch die RyRs ausgeglichen.

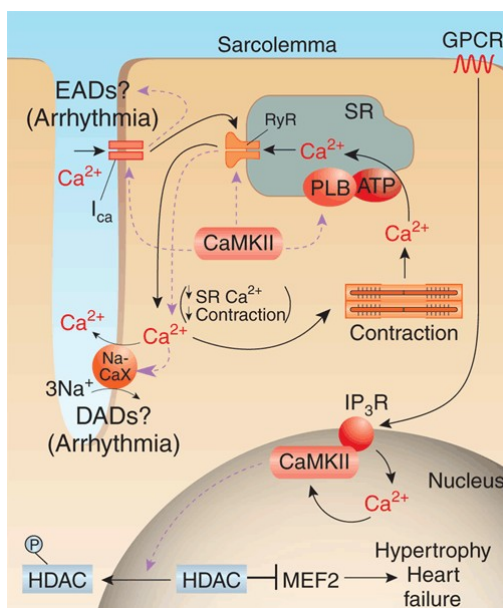


Abb. 4.37: Wirkungen der CamK II am Kardiomyozyten; aus {{116 Bers,D.M. 2005}}

4.4.2 Auswirkungen der CaMK II - Blockade auf den Rhythmus

KN-93 blockiert die Bindung von Calmodulin an die regulatorische Domäne der CaMK II und verhindert so ihre Aktivierung.

Nun liegt der Verdacht nahe, dass eine Blockade der CaMK II TCA-induzierte Arrhythmien verhindern könnte. Besonders Maier et al. beschäftigte sich mit dieser Fragestellung und konnte anhand von Mäusen zeigen, dass sich das SR Ca^{2+} -

Leck auch bei erhöhtem SR Ca^{2+} -Gehalt durch KN-93 signifikant reduzierte und Arrhythmien durch KN-93 in vivo und in vitro verhindert werden konnten {{112 Sag,C.M. 2009}}. Das sogenannte „diastolische SR Ca^{2+} -Leck“ wurde in diesem Zusammenhang bereits öfter beobachtet und man geht davon aus, dass es durch Aktivierung des NCX DADs auslöst (s. Abb. 4.3) {{116 Bers,D.M. 2005}}.

Die Hypothese der protektiven Wirkung durch KN-93 konnte anhand der hier durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden.

Ob eine Steigerung der KN-93-Konzentration einen Schutz vor AEKs bei so hohen TCA-Konzentrationen bietet, kann möglicherweise durch weitere Versuche geklärt werden.

4.4.3 Auswirkungen durch KN-93 auf die Kontraktionskraft der Muskelstreifen

Ausserhalb des physiologischen rundowns bestand bei den vorliegenden Messungen keine Veränderung der Kontraktionskraft der Trabekel durch Inhibierung der CaMK II mittels KN-93.

4.5 Klinische Relevanz

Bei vielen Menschen finden sich erhöhte Gallensäurespiegel im Blut. Diese sind nicht nur bei der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase, sondern auch bei anderen Lebererkrankungen, wie zum Beispiel der Leberzirrhose nachzuweisen. Die daraus resultierenden kardialen Folgen, insbesondere die fetalen Herzrhythmusstörungen bei der ICP, werden bereits seit längerer Zeit diskutiert.

Ob die GS UDCA, die schon als symptomatische Behandlung gegen die Folgen der Cholestase verwendet wird, Herzarrhythmien verhindern kann, ist noch unklar.

Der aktuelle therapeutische Effekt von UDCA liegt hauptsächlich im Schutz der Cholangiozyten vor der schädigenden Wirkung durch hydrophobe GS, der Stimulation der hepatobiliären Sekretion und der Protektion der Hepatozyten gegen die durch GS verursachte Apoptose begründet {{78 Paumgartner,G. 2002; }}.

In dieser Arbeit wurde erstmals die potentielle Fähigkeit von UDCA, Arrhythmien am humanen Vorhofmyokard auslösen zu können, gezeigt. Da noch keine

weiteren Publikationen existieren, die diese These direkt am Kardiomyozyten unterstützen oder widerlegen, sind diesbezüglich noch weitere Nachforschungen notwendig.

Die Theorie der protektiven Wirkung des PI3K-Inhibitors Wortmannin gegen TCA-induzierte Arrhythmien konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen AT II und TCA. Die Untersuchung der Arrhythmieentwicklung war einerseits notwendig, um die zellulären Wirkungswege der GS weiter zu erforschen und andererseits, um die Effekte auf GS-induzierte AEKs bei erhöhtem AT II-Spiegel zu untersuchen. Da der AT II-Spiegel im Serum von Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht ist, stellt dies eventuell einen zusätzlichen Risikofaktor bei der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen im Rahmen von Lebererkrankungen dar. Bei sehr hohen TCA-Konzentrationen ist eine Kumulation der Arrhythmien durch AT II und TCA durchaus möglich.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit die Wirkung von Gallensäuren auf das Vorhofmyokard direkt untersucht werden. Es zeigte sich 1) kein arrhythmogener Effekt von TCA, 2) kein Unterschied im Vergleich zu UDCA, 3) kein wesentlicher Einfluss auf die Inzidenz der GS-induzierten AEKs durch PI3K-Inhibition oder durch CaMK II. Somit wurden Hinweise für die weitere Erforschung der arrhythmogenen Potenz von Gallensäuren am Herzen gewonnen.

5 Limitationen

In dieser Arbeit wurde versucht, das Muskelgewebe so gut wie möglich zu schonen und in einem physiologischen Milieu zu untersuchen. Natürlich ist dies unter Laborbedingungen nur bedingt möglich.

Es wird weiters darauf hingewiesen, dass bezüglich der Auswahl der Gallensäuren, der Methodik der Durchführung der Versuche, der Messanlage, der Auswertung oder der statistischen power mögliche Unterschiede zum physiologischen Zustand, bzw. zu anderen Experimenten auftreten können. Im Folgenden werden diese Limitationen noch einmal genauer erläutert.

5.1 Auswahl der Gallensäuren

Im menschlichen Körper befindet sich ein „physiologischer Cocktail“ aus mehreren Gallensäuren. Da sich die Gallensäure TCA in Vorversuchen als besonders geeignet für die Experimente mit Muskelstreifen erwiesen hat, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich TCA verwendet.

5.2 Methodik

Auch während der Präparation und der Durchführung der Experimente wurde auf ein konstantes, physiologisches Milieu geachtet.

Allerdings konnte eine mögliche Irritation der Muskelstreifen, beispielsweise bei der Entnahme durch den Chirurgen, bei der Präparation und beim Einspannen in die Messanlage, nicht verhindert werden. Während des Messablaufes wurden Gaszufuhr, Stimulation und Temperatur nicht verändert. Es können jedoch minimale Schwankungen insbesondere der Gaszufuhr und dem davon abhängigen pH-Wert sowie der Temperatur nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

5.3 Auswertung

Bei der Auswertung wurden auch kleinere Extrakontraktionen zu den AEKs gezählt. Da die Grenze zwischen AEKs und Schwankungen der baseline jedoch fließend ist, könnten einzelne AEKs subjektiv unterschiedlich zu interpretieren

sein. Alle AEKs wurden jedoch nach einem Schema vom selben Beobachter ausgewertet.

5.4 Statistische Power

Aufgrund des komplexen experimentellen Aufbaus und der nur eingeschränkt verfügbaren Präparate wurde in der vorliegenden Arbeit pro Messprotokoll nur eine relativ geringe Anzahl an Experimenten durchgeführt. Weiters kann die teils erhebliche Variabilität im Patientengut (z.B. Geschlecht, Alter, Komorbiditäten) trotz konstant gehaltener experimenteller Bedingungen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Resultaten führen, sodass besonders bei kleinen Effekten eine grössere n-Zahl notwendig ist, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erreichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass großes Augenmerk auf den physiologischen Ablauf der Versuche gelegt wurde. In vitro Untersuchungen sind naturgemäß immer nur Annäherungen an die physiologischen Bedingungen im intakten Organismus. Trotz der teilweise nur als Trend beobachteten Ergebnisse liefert diese Arbeit wertvolle Hinweise, und stellt somit den Ausgangspunkt weiterer Studien dar.

Anhang

A Literaturverzeichnis

- Allessie, M., Ausma, J. & Schotten, U. 2002, "Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation", *Cardiovascular research*, vol. 54, no. 2, pp. 230-246.
- Alves, A.J., Eynon, N., Oliveira, J. & Goldhammer, E. 2010, "RAAS and adrenergic genes in heart failure: Function, predisposition and survival implications", *World journal of cardiology*, vol. 2, no. 7, pp. 187-197.
- Arrese, M. & Reyes, H. 2006, "Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a past and present riddle", *Annals of hepatology : official journal of the Mexican Association of Hepatology*, vol. 5, no. 3, pp. 202-205.
- Ärzte Zeitung 2006, *Therapie lindert Pruritus bei Schwangerschafts-Cholestase*, 10.10.2006 edn, Copyright © 1997-2010 by Ärzte Zeitung Verlags-GmbH, Springer Medizin, Deutschland.
- Atienza, F. & Jalife, J. 2007, "Reentry and atrial fibrillation", *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, vol. 4, no. 3 Suppl, pp. S13-6.
- Baker, K.M., Singer, H.A. & Aceto, J.F. 1989, "Angiotensin II receptor-mediated stimulation of cytosolic-free calcium and inositol phosphates in chick myocytes", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 251, no. 2, pp. 578-585.
- Belhassen, B., Glick, A. & Viskin, S. 2004, "Reentry in a pulmonary vein as a possible mechanism of focal atrial fibrillation", *Journal of cardiovascular electrophysiology*, vol. 15, no. 7, pp. 824-828.
- Berdel, W.E., Böhm, M., Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. & Schmiegel, W. (eds) 2004, *Innere Medizin*, 5. edn, Urban & Fischer Verlag München, Jena, Deutschland.
- Bers, D.M. 2010, "CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human", *Circulation research*, vol. 107, no. 9, pp. 1044-1046.
- Bers, D.M. 2008, "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes", *Annual Review of Physiology*, vol. 70, pp. 23-49.
- Bers, D.M. 2005, "Beyond beta blockers", *Nature medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 379-380.
- Bers, D.M. 2002, "Cardiac excitation-contraction coupling", *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 198-205.

- Binah, O., Rubinstein, I., Bomzon, A. & Better, O.S. 1987, "Effects of bile acids on ventricular muscle contraction and electrophysiological properties: studies in rat papillary muscle and isolated ventricular myocytes", *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, vol. 335, no. 2, pp. 160-165.
- Blanchard, E.M., Smith, G.L., Allen, D.G. & Alpert, N.R. 1990, "The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles", *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, vol. 416, no. 1-2, pp. 219-221.
- Blatter, L.A., Kockskamper, J., Sheehan, K.A., Zima, A.V., Huser, J. & Lipsius, S.L. 2003, "Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes", *The Journal of physiology*, vol. 546, no. Pt 1, pp. 19-31.
- Bosch, R.F. & Nattel, S. 2002, "Cellular electrophysiology of atrial fibrillation", *Cardiovascular research*, vol. 54, no. 2, pp. 259-269.
- Cardenas, M.E., Sanfridson, A., Cutler, N.S. & Heitman, J. 1998, "Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products", *Trends in biotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 427-433.
- De Jong, A.M., Maass, A.H., Oberdorf-Maass, S.U., Van Veldhuisen, D.J., Van Gilst, W.H. & Van Gelder, I.C. 2010, "Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation", *Cardiovascular research*, .
- Desai, M.S., Shabier, Z., Taylor, M., Lam, F., Thevananther, S., Kosters, A. & Karpen, S.J. 2010, "Hypertrophic cardiomyopathy and dysregulation of cardiac energetics in a mouse model of biliary fibrosis", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 51, no. 6, pp. 2097-2107.
- Doleschal, B. 2010, *Mechanismen des langsamen Kraftzuwachses nach Dehnung in humanem Vorhofmyokard*, Medizinische Universität Graz.
- European Heart Rhythm Association, European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Camm, A.J., Kirchhof, P., Lip, G.Y., Schotten, U., Savelieva, I., Ernst, S., Van Gelder, I.C., Al-Attar, N., Hindricks, G., Prendergast, B., Heidbuchel, H., Alfieri, O., Angelini, A., Atar, D., Colonna, P., De Caterina, R., De Sutter, J., Goette, A., Gorenek, B., Heldal, M., Hohloser, S.H., Kolh, P., Le Heuzey, J.Y., Ponikowski, P. & Rutten, F.H. 2010, "Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)", *European heart journal*, vol. 31, no. 19, pp. 2369-2429.
- Fabiato, A. 1983, "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum", *The American Journal of Physiology*, vol. 245, no. 1, pp. C1-14.

- Fagbemi, O.S., Brack, K., Golar, S., Crisp, D. & Economides, A. 2001, "Electrophysiological and biochemical changes in rabbit hearts stored at 4 degrees C for 6 or 24 h", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 101, no. 4, pp. 367-376.
- Fawcett, D.W. & McNutt, N.S. 1969, "The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle", *The Journal of cell biology*, vol. 42, no. 1, pp. 1-45.
- Fryer, M.W., Gage, P.W., Neering, I.R., Dulhunty, A.F. & Lamb, G.D. 1988, "Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase", *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, vol. 411, no. 1, pp. 76-79.
- Gassanov, N., Brandt, M.C., Michels, G., Lindner, M., Er, F. & Hoppe, U.C. 2006, "Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation", *Cell calcium*, vol. 39, no. 2, pp. 175-186.
- Gerok, Huber, Meinertz & Zeidler 2007, *Die Innere Medizin - Referenzwerk für den Facharzt*, 11th edn, Schattauer GmbH, Deutschland.
- Glantz, A., Marschall, H.U. & Mattsson, L.A. 2004, "Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 40, no. 2, pp. 467-474.
- Go, A.S., Hylek, E.M., Phillips, K.A., Chang, Y., Henault, L.E., Selby, J.V. & Singer, D.E. 2001, "Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 18, pp. 2370-2375.
- Gorelik, J., Harding, S.E., Shevchuk, A.I., Koralage, D., Lab, M., de Swiet, M., Korchev, Y. & Williamson, C. 2002, "Taurocholate induces changes in rat cardiomyocyte contraction and calcium dynamics", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 103, no. 2, pp. 191-200.
- Gorelik, J., Shevchuk, A., de Swiet, M., Lab, M., Korchev, Y. & Williamson, C. 2004, "Comparison of the arrhythmogenic effects of tauro- and glycoconjugates of cholic acid in an in vitro study of rat cardiomyocytes", *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 111, no. 8, pp. 867-870.
- Gorelik, J., Shevchuk, A.I., Diakonov, I., de Swiet, M., Lab, M., Korchev, Y. & Williamson, C. 2003, "Dexamethasone and ursodeoxycholic acid protect against the arrhythmogenic effect of taurocholate in an in vitro study of rat cardiomyocytes", *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 110, no. 5, pp. 467-474.

- Guarino, M.P., Cong, P., Cicala, M., Alloni, R., Carotti, S. & Behar, J. 2007, "Ursodeoxycholic acid improves muscle contractility and inflammation in symptomatic gallbladders with cholesterol gallstones", *Gut*, vol. 56, no. 6, pp. 815-820.
- Gwathmey, J.K., Hajjar, R.J. & Solaro, R.J. 1991, "Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium", *Circulation research*, vol. 69, no. 5, pp. 1280-1292.
- Iguchi, Y., Nishimaki-Mogami, T., Yamaguchi, M., Teraoka, F., Kaneko, T. & Une, M. 2011, "Effects of chemical modification of ursodeoxycholic acid on TGR5 activation", *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 34, no. 1, pp. 1-7.
- Jalife, J. 2003, "Experimental and clinical AF mechanisms: bridging the divide", *Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing*, vol. 9, no. 2, pp. 85-92.
- Katz, A.M. 1996, "Calcium channel diversity in the cardiovascular system", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 28, no. 2, pp. 522-529.
- KOCH-WESER, J. & BLINKS, J.R. 1963, "The Influence of the Interval between Beats on Myocardial Contractility", *Pharmacological reviews*, vol. 15, pp. 601-652.
- Kockskamper, J., Seidlmayer, L., Walther, S., Hellenkamp, K., Maier, L.S. & Pieske, B. 2008, "Endothelin-1 enhances nuclear Ca²⁺ transients in atrial myocytes through Ins(1,4,5)P₃-dependent Ca²⁺ release from perinuclear Ca²⁺ stores", *Journal of cell science*, vol. 121, no. Pt 2, pp. 186-195.
- Kockskamper, J., Sheehan, K.A., Bare, D.J., Lipsius, S.L., Mignery, G.A. & Blatter, L.A. 2001, "Activation and propagation of Ca(2+) release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes", *Biophysical journal*, vol. 81, no. 5, pp. 2590-2605.
- Kockskamper, J., Zima, A.V., Roderick, H.L., Pieske, B., Blatter, L.A. & Bootman, M.D. 2008, "Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 45, no. 2, pp. 128-147.
- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z. & Kurylowicz, W. (eds) 1978, *Antibiotics: Origin, nature, and properties*, 2002/02/27 edn, American Society for Microbiology, US/Mountain.
- Kotake, H., Itoh, T., Watanabe, M., Hisatome, I., Hasegawa, J. & Mashiba, H. 1989, "Effect of bile acid on electrophysiological properties of rabbit sino-atrial node in vitro", *British journal of pharmacology*, vol. 98, no. 2, pp. 357-360.
- Lammert, F., Marschall, H.U., Glantz, A. & Matern, S. 2000, "Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management", *Journal of hepatology*, vol. 33, no. 6, pp. 1012-1021.

- Levy, S., Camm, A.J., Saksena, S., Aliot, E., Breithardt, G., Crijns, H., Davies, W., Kay, N., Prystowsky, E., Sutton, R., Waldo, A., Wyse, D.G. & Working Group on Arrhythmias, Working Group on Cardiac Pacing of the European Society of Cardiology, North American Society of Pacing and Electrophysiology 2003, "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 : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, vol. 5, no. 2, pp. 119-122.
- Löffler G., P.P.E. (ed) 2003, *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. edn, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Deutschland.
- Marban, E., Robinson, S.W. & Wier, W.G. 1986, "Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle", *The Journal of clinical investigation*, vol. 78, no. 5, pp. 1185-1192.
- McNutt, N.S. & Fawcett, D.W. 1969, "The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle", *The Journal of cell biology*, vol. 42, no. 1, pp. 46-67.
- Moura, D., Pinheiro, H., Paiva, M.Q. & Guimaraes, S. 1999, "Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels", *Journal of Autonomic Pharmacology*, vol. 19, no. 6, pp. 321-325.
- Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Littleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. 1989, "Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime", *Circulation research*, vol. 65, no. 5, pp. 1441-1449.
- Nabauer, M., Gerth, A., Limbourg, T., Schneider, S., Oeff, M., Kirchhof, P., Goette, A., Lewalter, T., Ravens, U., Meinertz, T., Breithardt, G. & Steinbeck, G. 2009, "The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management", *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, vol. 11, no. 4, pp. 423-434.
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H. & Matsuda, Y. 1992, "Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 4, pp. 2157-2163.
- Nakashima, H., Kumagai, K., Urata, H., Gondo, N., Ideishi, M. & Arakawa, K. 2000, "Angiotensin II antagonist prevents electrical remodeling in atrial fibrillation", *Circulation*, vol. 101, no. 22, pp. 2612-2617.
- Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., Domeier, T.L., Mikoshiba, K., Lorenz, J.N., Blatter, L.A., Bers, D.M. & Molkentin, J.D. 2010, "The IP3

- receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli", *Circulation research*, vol. 107, no. 5, pp. 659-666.
- Paavola, J., Viitasalo, M., Laitinen-Forsblom, P.J., Pasternack, M., Swan, H., Tikkanen, I., Toivonen, L., Kontula, K. & Laine, M. 2007, "Mutant ryanodine receptors in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia generate delayed afterdepolarizations due to increased propensity to Ca²⁺ waves", *European heart journal*, vol. 28, no. 9, pp. 1135-1142.
- Paumgartner, G. & Beuers, U. 2002, "Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 36, no. 3, pp. 525-531.
- Perez, M.J. & Briz, O. 2009, "Bile-acid-induced cell injury and protection", *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 15, no. 14, pp. 1677-1689.
- Perreault, C.L., Mulieri, L.A., Alpert, N.R., Ransil, B.J., Allen, P.D. & Morgan, J.P. 1992, "Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium", *The American Journal of Physiology*, vol. 263, no. 2 Pt 2, pp. H503-10.
- Phillips, R.M. & Altschuld, R.A. 1996, "2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 229, no. 1, pp. 154-157.
- Pretorius, L., Du, X.J., Woodcock, E.A., Kiriazis, H., Lin, R.C., Marasco, S., Medcalf, R.L., Ming, Z., Head, G.A., Tan, J.W., Cemerlang, N., Sadoshima, J., Shioi, T., Izumo, S., Lukoshkova, E.V., Dart, A.M., Jennings, G.L. & McMullen, J.R. 2009, "Reduced phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) activation increases the susceptibility to atrial fibrillation", *The American journal of pathology*, vol. 175, no. 3, pp. 998-1009.
- Primessnig, U. 2011, *Title to be announced*, Dr. med. univ. edn; Medizinische Universität Graz, Graz
- Sag, C.M., Wadsack, D.P., Khabbazzadeh, S., Abesser, M., Grefe, C., Neumann, K., Opiela, M.K., Backs, J., Olson, E.N., Brown, J.H., Neef, S., Maier, S.K. & Maier, L.S. 2009, "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure", *Circulation.Heart failure*, vol. 2, no. 6, pp. 664-675.
- Schotten, U., Duytschaever, M., Ausma, J., Eijlbouts, S., Neuberger, H.R. & Allessie, M. 2003, "Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand", *Circulation*, vol. 107, no. 10, pp. 1433-1439.
- Schulman, H. & Greengard, P. 1978, "Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator"", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no. 11, pp. 5432-5436.

- Sheikh Abdul Kadir, S.H., Miragoli, M., Abu-Hayyeh, S., Moshkov, A.V., Xie, Q., Keitel, V., Nikolaev, V.O., Williamson, C. & Gorelik, J. 2010, "Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes", *PloS one*, vol. 5, no. 3, pp. e9689.
- Singh, M.V., Kapoun, A., Higgins, L., Kutschke, W., Thurman, J.M., Zhang, R., Singh, M., Yang, J., Guan, X., Lowe, J.S., Weiss, R.M., Zimmermann, K., Yull, F.E., Blackwell, T.S., Mohler, P.J. & Anderson, M.E. 2009, "Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II triggers cell membrane injury by inducing complement factor B gene expression in the mouse heart", *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 4, pp. 986-996.
- Speckmann, E.J., Hescheler, J. & Köhling, R. (eds) 2008, *Physiologie*, 5. edn, Urban & Fischer Verlag München, Jena, Deutschland.
- Stein, R.C. 2001, "Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment", *Endocrine-related cancer*, vol. 8, no. 3, pp. 237-248.
- Stewart, S., Hart, C.L., Hole, D.J. & McMurray, J.J. 2001, "Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study", *Heart (British Cardiac Society)*, vol. 86, no. 5, pp. 516-521.
- Sun, H., Chartier, D., Leblanc, N. & Nattel, S. 2001, "Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes", *Cardiovascular research*, vol. 49, no. 4, pp. 751-761.
- van de Heijning, B.J., van de Meeberg, P.C., Portincasa, P., Doornewaard, H., Hoebers, F.J., van Erpecum, K.J. & Vanberge-Henegouwen, G.P. 1999, "Effects of ursodeoxycholic acid therapy on in vitro gallbladder contractility in patients with cholesterol gallstones", *Digestive diseases and sciences*, vol. 44, no. 1, pp. 190-196.
- von Lewinski, D., Bruns, S., Walther, S., Kogler, H. & Pieske, B. 2005, "Insulin causes [Ca²⁺]_i-dependent and [Ca²⁺]_i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium", *Circulation*, vol. 111, no. 20, pp. 2588-2595.
- von Lewinski, D., Kockskamper, J., Rubertus, S.U., Zhu, D., Schmitto, J.D., Schondube, F.A., Hasenfuss, G. & Pieske, B. 2008, "Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium", *European journal of heart failure : journal of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology*, vol. 10, no. 12, pp. 1172-1176.
- Wijffels, M.C., Kirchhof, C.J., Dorland, R. & Allessie, M.A. 1995, "Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats", *Circulation*, vol. 92, no. 7, pp. 1954-1968.
- Williamson, C., Geenes, V. 2009, "Intrahepatic cholestasis of pregnancy", *World J Gastroenterol.*, vol. 15, no. 17, pp. 2049-2066

-
- Williamson, C., Gorelik, J., Eaton, B.M., Lab, M., de Swiet, M. & Korchev, Y. 2001, "The bile acid taurocholate impairs rat cardiomyocyte function: a proposed mechanism for intra-uterine fetal death in obstetric cholestasis", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 100, no. 4, pp. 363-369.
- Xie, L.H., Takano, M., Kakei, M., Okamura, M. & Noma, A. 1999, "Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels", *The Journal of physiology*, vol. 514 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 655-665.
- Xu, J., Zaim, S. & Pelleg, A. 1996, "Effects of pinacidil, verapamil, and heart rate on afterdepolarizations in the guinea-pig heart in vivo", *Heart and vessels*, vol. 11, no. 6, pp. 289-302.
- Zhao, Z., Fefelova, N., Shanmugam, M., Bishara, P., Babu, G.J. & Xie, L.H. 2011, "Angiotensin II induces afterdepolarizations via reactive oxygen species and calmodulin kinase II signaling", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 50, no. 1, pp. 128-136.
- Zimmermann, R. 2003, "Normwerte in der Schwangerschaft", *Praxis*, vol. 92, pp. 331-336.

B Anleitung der verwendeten Programme „Settingdatei_TFall50/90“ in Labchart

B.1 Beschreibung der Programme

Die Programme „Settingdatei_TFall50/90“ wurden in 13-monatiger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kierstein von der Firma ADInstruments GmbH erstellt.

Die Makrodateien sind in der Lage, Originaldaten des Programms Labchart zu analysieren und nach speziellen Kriterien auszuwerten. Die Dateien erkennen vorher manuell gesetzte Marker mit dem Namen „Hz“, nach welchen jeweils 10 Kurven („peaks“) analysiert werden.

Folgende Parameter werden ausgewertet:

Baseline (DT), Height (F_{dev}), Time toPeak (TPT), MaxSlope (dF/dt_{max}), MinSlope (dF/dt_{min}), TFall50 (RT50) und TFall90 (TT90).

B.2 Schrittweise Anleitung zur Anwendung

Die Datei „Settingdatei_TFall 50“ wird geöffnet. Auf dem Bildschirm erscheint das Programm Labchart mit einem leeren Dokument. Anschließend muss unter *file* in der Hauptmenüleiste der Befehl *append* aufgerufen werden. Nun kann die zu analysierende Labchart-Originaldatei ausgewählt und geöffnet werden. Im Dokument auf der rechten Bildschirmhälfte ist nun diese Originaldatei zu sehen (siehe Abbildung unten). Um korrekte Werte zu erhalten, muss in diesem Fenster unter *Kraft mN/mm2 C...* unter dem Befehl *Arithmetics* die Querschnittsfläche des Muskeltrabekels in mm^2 eingegeben werden. Im Normalfall erscheint eine Information im oberen Fenster in folgendem Format: Ch1/0,6*1000. Ch1 bezeichnet die Nummer des Kanals und 0,6*1000 ist die vorinstallierte Querschnittsfläche des zu analysierenden Trabekels. In diesem Fall handelt es sich um Kanal 1 und die Querschnittsfläche beträgt 0,6 mm^2 . Diese Querschnittsfläche muss nun der aktuellen Messung angepasst und dementsprechend korrigiert werden. Beträgt somit die Querschnittsfläche nicht 0,6 mm^2 , sondern 0,8 mm^2 , lautet nun die korrekte Eingabe: Ch1/0,8*1000. Anschließend kann diese Änderung mit *OK* bestätigt werden.

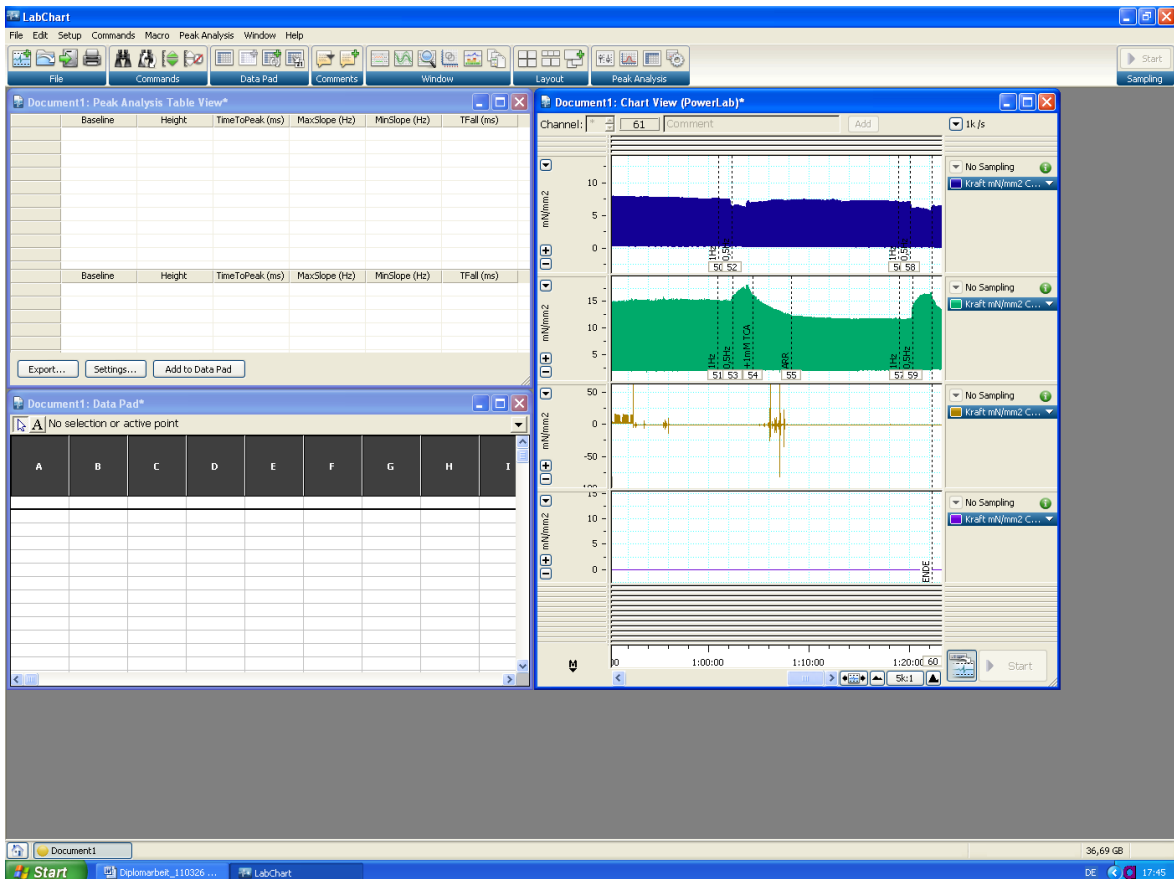
Ein weiterer Schritt, welcher vor dem Starten der Makrodatei beachtet werden muss, ist die richtige Wahl des Kanals. Dieser Schritt funktioniert automatisch bei Kanal 5. Sollen allerdings die Kanäle 6 oder 7 analysiert werden, muss unter *settings* (zu finden in der Hauptmenüleiste über *Peak Analysis*) bei *Setup* unter *Source* „CH6: Kraft mN/mm2 CH-2“ für Kanal 6 oder analog für Kanal 7 „CH7: Kraft mN/mm2 CH-3“.

Unter dem Menü *Peak Analysis Settings* sind bereits alle gewünschten Parameter voreingestellt, was eine wiederholte Eingabe überflüssig macht und viel Zeit erspart.

Mit der Taste F5 wird das Makro aktiviert. Hier ist zu beachten, dass in dem nun erscheinenden Fenster (Choose Channel) der richtige Kanal (5,6 oder 7) steht. Dieser kann wiederum mit *OK* bestätigt werden.

Wenn das Makro seine Analyse abgeschlossen hat, können die Rohdaten unter *file* und *Export* als Exceldatei gespeichert werden. Diese Exceldatei enthält nun die Analysewerte im gleichen Format, wie im Labchart - Peak Analysis Table View - Fenster.

Da die Parameter TFall50 und TFall90 nicht parallel analysiert werden können, muss derselbe Vorgang mit der Datei „Settingdatei_TFall 90“ wiederholt werden.



B.3 Probleme bei der Auswertung mit der Makrodatei

Durch die Voreinstellungen und die automatische Analyse bedeutet das Programm eine enorme Zeitersparnis.

Allerdings funktioniert die Makrodatei bei manchen Originaldateien nicht oder nur teilweise und ergibt entweder keine Werte oder zeichnet in einer Endlosschleife immer wieder dieselben Werte auf. Hier für könnte die Streuung der Messwerte in den Aufzeichnungen verantwortlich sein.

Diese Fehlfunktionen wurden mehrmals besprochen, teilweise behoben und das Programm immer wieder angepasst.

C Tabellenanhang

Nr.	Substanz	Experiment	Alter bei OP	Geschlecht	Größe	Gewicht	BMI	Eingriff	EF in %	KHK	AST	AINS	MINS	TRINS	MST
1	AT, UDCA	sh.100311-vh	64	M	170	72	24,9	AKE		x	x		x		
2	UDCA	sh.100312-vh	59	W	164	80	29,7	CABG	60	x					
3	UDCA	sh.100315-vh	72	M	171	90	30,8	CABG	60	x					
4	AT	sh.100318-vh	95	M	164	84	31	CABG	64	x					
5	UDCA	sh.100318andPat-vh	78	M	178	92	29	CABG	75	x	x				
6	AT, UDCA	sh.100329-vh	42	M	178	107	34	AKE	60		x				
7	AT	sh.100330-vh	54	M	163	80	30	CABG	55	x					
8	AT, KN-93	sh.100331AT-vh, sh.100331KN-vh	66	M	170	71	25	CABG	60	x					
9	AT, Wo, KN-93	sh.100420AT-vh, sh.100420-vh	70	M	182	79	23,8	CABG, AKE	65	x	x				
10	Wo, KN-93	sh.100422-vh	61	W	170	70	24	CABG	83	x		x			
11	UDCA	sh.100505-vh	73	M	167	76	27,3	CABG	55	x		x	x		
12	AT	sh.100507AT-vh	71	M	172	104	35,2	CABG	47	x					
13	AT, UDCA, Wo, KN-93	sh.100510AT-vh, sh.100510-vh	70	M	182	85	25,7	CABG	50	x					
14	KN-93	sh.100511-vh	79	M	182	88	26,6	AKE	65	x	x				
15	Wo, KN-93	sh.100521-vh	55	M	179	90	28,1	AKE	60		x				
16	AT	sh.100521AT-vh	87	M	174	79	26,1	CABG	60	x	x		x	x	
17	AT, UDCA	sh.100525AT-vh	69	M	176	85	27,4	CABG	50	x					
18	AT, UDCA	sh.100525-vh	71	W	167	88	31,5	CABG		x					
19	AT	sh.100526AT-vh	80	M	165	74	27,2	CABG	45	x		x	x		
20	AT, Wo, KN-93	sh.101122AT-vh, sh.101122-vh	67	M	166	59	21	CABG	82	x					
21	Wo, KN-93	sh.101123-vh	79	M	164	68	25	CABG, AKE	65	x	x	x	x	x	
22	AT, Wo, KN-93	sh.101124AT-vh, sh.101124-vh	63	M	173	94	31,4	CABG	60	x					
23	Wo	sh.101125-vh	83	W	161	60	23,1	CABG, AKE	60	x	x	x			
24	Wo, KN-93	sh.101126-vh	77	W	158	82	32,8	CABG		x					
25	Wo, KN-93	sh.101130-vh	51	M	175	91	29,7	CABG	60	x			x	x	
26	Wo	sh.101201-vh	66	W	168	80	28,3	CABG	60	x					

Nr.	Risikofaktoren	Weitere Diagnosen
1	KHK, art. HTN, NDDM	
2	KHK III, DM II, HLP, art.HTN	CCS III-IV, NYHA III
3	KHK III + Hauptstammeteiligung, St.p. NSTEMI, art. HTN, HCH	CCS II-III, St.p. PTCA (25% ACI bds.)
4	KHK II, art. HTN, HLP	GERD
5	KHK II, art. HTN, HCH	CCS II, St.p. SM-Implantation, PAVK, COPD
6	HLP	AAA, NYHA II, CCS II-III, St.p. Gastritis, Migräne mit Aura, Tinnitus bds.
7	art. HTN	CCS III, NYHA II-III, GERD I-II, HWS-Syndrom, Prostatahypertrophie, Asthma bronchiale
8	art. HTN, HLP, St.p. Nikotinabusus, St.p. MCI mit Stent-Implantation	KHK III, CCS II, NYHA III
9	KHK I, HLP, AP	CCS III, Belastungs-dyspnoe, Präsynkope, St.p. Hüft-TEP II, St.p. Schulter-OP II, TURP
10	KHK II, HTN, HLP	CCS II, Hypothyreose, LWS-Syndrom
11	KHK II	NYHA III, CCS III, rezidivierende Synkopen
12	KHK III, St.p. MCI (2xRCA-Stent), art. HTN, HCH	CCS III, NYHA II-III, chron. Polyarthritis, kompensierte NINS, St.p. Borellien
13	KHK II, art.HTN, HLP	St.p. CHE
14	KHK	dilatierter Aorta asc., Anämie, degenerative WS, Lumbago, Osteomyelitis, TE, Polypektomie
15	HLP	St.p.TVT Unterschenkel links, Cholezystolith
16	KHK II, art. HTN, DM II, HLP	kompenierte NINS
17	KHK II, HCH, St.p. Nikotinabusus	St.p. TVT, St.p. CHE, St.p. Nikotinabusus
18	KHK III, IDDM, art. HTN, HCH	Stent Arteria femoralis, PAVK
19	KHK II, art. HTN, HLP	St.p. CPR, NYHA III-IV, CCS III-IV
20	KHK II, HLP	angeborene Muskeldystrophie OS links, erythematöse Pangastritis, St.p. Fraktur US II.
21	KHK II, art. HTN, HLP	CCS III, NYHA III, NINS, Varikosis, St.p. Hepatitis A
22	KHK II, art. HTN, HLP, NSTEMI	NYHA III, CCS II, erosive Gastritis
23	KHK III, St.p. NSTEMI, art. HTN, HCH	NYHA III, CCS II, Synkope, Varicosis rechts, St.p. Basaliomentfernung
24	KHK, AP, art. HTN, Herzinsuffizienz, DM Typ II	intermittierende VHA, PAVK II bds., AVK II, NYHA III, Hypothyreose
25	KHK II, art. HTN, HLP	Aorta ascendens 4cm, COPD II, St.p. TBC, abgekapselter Pleuraerguss, kompensierte NINS
26	KHK II, HLP, art. HTN	NYHA II-III, CCS II-III, St.p. TEA II, St.p. Schulter-OP II.

Nr.	BB	DIU	ACEI	CaB	ARB	Aldo	DIG	Statine	TAH	Gesamte Medikation
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	Diabelex, Halcion, Nervenruh, Norvasc, Pantoloc, Seloken, Temesta
2	1	1	0	0	0	0	0	2	1	Aquaphoni, Concor, Ergovascan, Euthyrox, Ezatrol, Glucophage, Halcion, Novonorm, Pantoloc, Seropram, Sortis, T-ASS, Tritico, Ulcusan, Ursotalk, Xefo
3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	Cadivan, Carchol, Halsel, Myosin, Nasivir, Nervenruh, Pantoloc, Seloken, Sortis, Temesta
4	1	0	1	0	0	0	0	1	0	Concor, Pantoloc, Nervenruh, Simvastatin, Lisinopril, Temesta
5	0	0	1	1	0	0	0	1	0	Lisinopril, Amlodipin, Simvastatin, Nervenruh, Allopurinol, Aina, Ginko, Lansobene, Adamoni, Mirabene, Sereide
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	Pantoloc, Simvastatin, Cymbalta, Urosin, Nervenruh, Temesta
7	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Thrombo-ASS, Tritace, Pariet, Alna ret, Foster DA, Combivent, Nervenruh, Temesta, Nitro-Spray bei Bedarf
8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	Thrombo-ASS, Lansobene, Nomexor, Dancor, Lisinopril, Simvastatin, Nervenruh, Temesta
9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	Nervenruh forte, Pantoloc, Simvastatin, Temesta
10	1	0	1	0	0	0	0	1	0	Crestor, Concor, Euthyrox, Hypren, Pantoloc, Xancor
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Actilemin, Caidenia, Concor, Kreon, Lansobene, Movicol, Norvasc, Saroten, Somnubene, Voltaren Gel
12	1	0	0	0	1	0	0	1	0	Aclonel, Dilatrend, Losartan(AT1-antag), Nervenruh, Nitro b. B., Simvastatin, Temesta, Zerkol
13	0	0	1	0	0	0	0	1	1	Acatan, Dancor, Inegy, Nervenruh, T-ASS, Temesta
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Magadon, Nervenruh forte, Pantoloc
15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	Simvastatin, Temesta
16	0	1	2	0	0	0	0	1	0	Avandamet, Co-Renitec, Dancor, Enalapril, Nervenruh, Pantoloc, Panchol, Temesta
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Senis, Pantoloc, Dilatrend, Nervenruh, Temesta, Nicotnelle
18	1	0	0	0	0	0	0	1	0	Nomexor, Olmetec, Dancor, Simvastatin, Pantoloc, Nervenruh, Temesta, Nitro b. Bed., Novocrapid, Insulatard
19	1	2	2	0	0	1	0	1	0	Pantoloc, Seloken, Fositen, Simvastatin, Fosicomb, Dancor, Spirono, Isomonit, Nervenruh, Temesta
20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	T-Ass, Pantoloc, Simvastatin, Temesta, Heparin-Perfusor
21	0	1	1	1	0	0	0	0	0	Lisinopril, Nervenruh, Zamidip, Torasemid, Pantoloc, Temesta
22	1	0	1	0	0	0	0	1	0	Concor, Pantoloc, Sortis, Inhibace, Sirdalud, Lovenor, Praxiten
23	1	1	2	0	0	0	0	1	0	Enalapril+HCT, Concor, Simvastatin, Pantoloc 40, Temesta, Nervenruh, Enalapril, Norvasc, Passedan 200gt
24	1	1	1	1	0	0	0	1	1	Euthyrox, Nomexor, Dancor, Seroxat, Simvastatin, Hydrogin, Inhibace plus, Norvasc, T-ASS, Glucophage, Insulin, Heparin
25	1	1	3	1	0	0	0	1	0	Nitrolingulspray b.Bed., Amlodipin, Seloken, Renitec, Co-Renitec, Simvastatin, Acemin, Praxiten, Berodual, Nicotnelle
26	1	2	1	0	0	0	0	1	0	Seloken, Acecomb, Simvastatin, Pantoloc, Temesta, Nervenruh

LEGENDE

Allgemeines und operative Eingriffe:

Nr.	Nummerierung der Patienten
Substanz	verwendete pharmakologische Substanz
Experiment	Bezeichnung der durchgeführten Experimente
Alter bei OP	Alter der Patienten in Jahren bei Durchführung des operativen Eingriffs
Geschlecht	Geschlecht der Patienten: M (männlich), W (weiblich)
Größe	Größe der Patienten in cm
Gewicht	Gewicht der Patienten in kg.
BMI	Body Mass Index der Patienten
CABG	Coronary artery bypass graft
AKE	Aortenklappenersatz

Diagnosen und Risikofaktoren:

AAA	abdominelles Aortenaneurysma
ACI	Arteria carotis interna
AINS	Aorteninsuffizienz
AP	Angina pectoris
art. HTN	arterielle Hypertonie
asc.	ascendierend
AST	Aortenstenose
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
bds.	Beidseits
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CHE	Cholezystektomie
chron.	chronisch
COPD	chronisch – obstruktive Lungenerkrankung
CPR	cardiopulmonale Reanimation
DM	Diabetes mellitus
GERD	gastro – ösophagealer Reflux
HCH	Hypercholesterinämie
HLP	Hyperlipidämie

HWS	Halswirbelsäule
IDDM	independent Diabetes mellitus
KHK	Koronare Herzerkrankung
li.	links
LWS	Lendenwirbelsäule
MCI	Myocardinfarkt
MINS	Mitralinsuffizienz
MST	Mitralstenose
NIDDM	Non – independent Diabetes mellitus
NINS	Niereninsuffizienz
NSTEMI	Myocardinfarkt ohne ST – Strecken – Hebung
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
OS	Oberschenkel
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankung
PTCA	perkutane transluminale Angioplastie
RCA	Arteria coronaria dextra
SM	Schrittmacher
St.p.	Status post
TBC	Tuberkulose
TE	Tonsillektomie
TEA	Thrombendarteriektomie
TEP	totale Endoprothese
TRINS	Trikuspidalinsuffizienz
TURP	transurethrale Resektion der Prostata
TVT	tiefe Venenthrombose
US	Unterschenkel
VHFA	Vorhofflimmerarrhythmie
WS	Wirbelsäule

Medikation:

BB	Beta-Blocker
DIU	Diuretika
ACE	ACE-Hemmer

CaB	Calcium-Kanal-Blocker
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
Aldo	Aldosteronantagonisten
DIG	Digitalis
AAR	Antiarrhythmika
TAH	Thrombozytenaggregationshemmer

D Curriculum Vitae

Name: Sandra Harenkamp
 Geburtsdatum: 03.03.1984
 Geburtsort: München
 Staatsbürgerschaft: deutsch

Studium und Schulausbildung

1989/90 – 1993/94 Grundschule München/ Unterhaching
 1994/95 – 2002/03 Gymnasium München/ Unterhaching

Absolvierte medizinische Praktika

08.2003 – 09.2003 Krankenpflegepraktikum in der Frauenklinik Dr. Geisenhofer GmbH
 München
 12.2003 – 01.2004 Krankenpflegepraktikum in der Frauenklinik Dr. Geisenhofer GmbH
 München
 02.2004 OP-Praktikum in der Frauenklinik Dr. Geisenhofer GmbH München
 10.2004 – 08.2005 Ausbildung zur Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin im
 Krankenhaus Dritter Orden, München
 Seit Oktober 2005 Studium der Humanmedizin in Graz, Österreich
 08.2006 – 09.2006 Vierwöchige Famulatur im Krankenhaus Dritter Orden in München
 (Allgemeinchirurgie)
 08.2007 – 09.2007 Vierwöchige Famulatur im Krankenhaus Neuwittelsbach in
 München (Innere Medizin)
 03.2009 Vierwöchige Famulatur im Greenslopes Private Hospital in
 Brisbane/ Australien (Anästhesie)
 07.2007 – 08.2009 Vierwöchige Famulatur im Kantonsspital St. Gallen/ Schweiz
 (Chirurgie)
 05.20010 – 07.2010 Fünfwöchige Famulatur bei Dr. Robert Mader in Trofaiach/
 Österreich (Allgemeinmedizin, Teil des 6. Jahres)
 08.2010 – 09.2010 Sechswöchige Famulatur im Krankenhaus Neuperlach in München
 (Kardiologie, Teil des 6. Jahres)
 09.2010 – 10.2010 Dreiwöchige Famulatur im Krankenhaus Neuperlach in München
 (Gynäkologie, Teil des 6. Jahres)
 10.2009 – 12.2010 Mitarbeit in der kardiologischen Grundlagenforschung der
 Medizinischen Universität Graz
 04.2011 Abschluss der Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen
 Grades Dr. med. univ.
 04.2011 – 06.2011 Sechswöchige Famulatur im Greenslopes Private Hospital in
 Brisbane/ Australien (plastische Chirurgie, Teil des 6. Jahres) und
 Abschluss des Studiums