

Diplomarbeit

**Funktionelle Effekte der Antiarrhythmika Flecainid
und Amiodaron auf das isolierte humane Myokard**

eingereicht von

Christian Mayer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Dr. med. Egbert Hubertus Bisping

und

Nataša Djalinač, MSc

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.

Graz, am 29. August 2018

Christian Mayer eh

Danksagungen

Für die Erstellung dieser Diplomarbeit war es nötig mich mit neuen Arbeitsweisen auseinanderzusetzen bzw. diese dann auch zu erlernen. Zudem konnte ich dadurch einen sehr interessanten Einblick in die Grundlagenforschung gewinnen. Dabei war ich während der Arbeit auf verschiedene in der Materie tätige Personen angewiesen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mir die nötigen Grundlagen und nicht zuletzt auch Freude und Motivation an der Arbeit vermittelten. Deshalb bedanke ich mich bei meinem Erstbetreuer Ass.Prof. Priv.-Doz. Dr.med. Egbert Bisping für die kameradschaftliche fachliche Führung während des gesamten Arbeitszeitraumes und für das Näherbringen der Interpretation von Ergebnissen. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Zweitbetreuerin Nataša Djalinač, MSc mit der ich viele, oft lustige, gemeinsame Stunden im Labor verbracht habe und die mir gerade zu Beginn sowohl die Arbeitstechniken als auch Problemlösungskompetenzen vermittelte. Ein weiterer Dank geht an Dr.med.univ. Ewald Kolesnik, der mich dafür begeistern konnte mich für ein Thema in der Grundlagenforschung zu entscheiden und der für Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Ich bedanke mich ebenfalls bei der gesamten herzchirurgischen Abteilung für die reibungslose Zusammenarbeit, ohne die das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt geht auch noch ein großer Dank an meine Freunde und Familie, die mir nicht nur während der arbeitsintensiven Zeit des Verfassens dieser Diplomarbeit, sondern auch während des gesamten Studiums verständnisvoll und helfend zur Seite standen. Besonderen Dank auch an Clemens Oppeck, den ich durch dieses Studium kennen lernen durfte, für eine wunderbare Freundschaft.

Zusammenfassung

Flecainid und Amiodaron sind beides wichtige Medikamente in der Therapie von Arrhythmien, insbesondere des häufig auftretenden Vorhofflimmerns. Flecainid ist bei dieser Indikation prinzipiell ein Mittel der ersten Wahl, da es sehr gute Konversions- und niedrige Rückfallraten in der Dauertherapie aufweist. Jedoch ist es kontraindiziert bei Personen mit strukturellen Herzerkrankungen und höhergradig reduzierter linksventrikulärer Funktion, was bei diesem Patientenkollektiv allerdings häufig der Fall ist. Hier hat Amiodaron seinen Stellenwert, da es keinen negativen Einfluss auf die Herztätigkeit hat. Dennoch sind die direkten systolischen und diastolischen Effekte dieser beiden Medikamente noch unzureichend bekannt, weshalb diese in dieser Arbeit am atrialen humanen Myokard untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Flecainid im humanen atrialen Myokard einen negativ inotropen Effekt vermittelt und zudem auch die Kraft-Frequenz-Beziehung (KFB), einen wichtigen physiologischen Anpassungsmechanismus, deutlich verschlechtert. Zudem konnte auch eine verursachte Relaxationsstörung gezeigt werden. Als möglicher Mechanismus hierfür, könnte eine Hemmung der SERCA-Aktivität verantwortlich sein.

Amiodaron hingegen scheint, vor allem durch sein Lösungsmittel einen negativ inotropen Effekt zu entfalten. Nur im mittleren Konzentrationsbereich liegen auch eigene substanzspezifische Effekte vor. Auch in submaximaler Konzentration bewirkt Amiodaron aber keine Verschlechterung der KFB. Ebenso wurde die diastolische Funktion durch Amiodaron nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit gut mit klinischen Beobachtungen vereinbar und sind im Einklang mit der erhöhten Mortalität unter Flecainid-Therapie bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Zudem untermauern sie auch die gute Verträglichkeit von Amiodaron bei Herzinsuffizienz. Außerdem legen sie nahe, die diastolische Funktion unter Flecainid-Therapie regelmäßig zu überwachen und eine gute Herzfrequenzkontrolle anzustreben. Für Amiodaron hingegen würde sich die Verwendung eines Lösungsmittels mit weniger kardiodepressiven Eigenschaften als vorteilhaft erweisen.

Abstract

Flecainide and amiodarone are essential in the therapy of arrhythmias, especially for the very common atrial fibrillation. For this indication flecainide is recommended for first line therapy, due to its good conversion rate and low relapse rate in long term therapy. Though, it is contraindicated in patients with structural heart disease or with reduced left ventricular function. Amiodarone on the other hand does not affect global heart function and is therefore used in this patient collective. However, the direct effects on the systolic and diastolic function of these two therapeutics are not well known and therefore have been studied in this thesis on human atrial myocardium to provide further insight.

Flecainide exerts a negative inotropic effect and furthermore worsens the force-frequency-relationship (FFR), an important physiological compensation mechanism. Additionally, flecainide also induces a diastolic dysfunction, which could probably be due to effects on the calcium-pump SERCA.

Amiodarone on the other hand, does not seem to have strong negative inotropic properties and also did not affect the FFR. The observed negative inotropic effects are attributable mostly to its necessary solvent. Only in the middle concentration range it seems to exert a substance specific own effect. Furthermore, it did not affect the diastolic function.

The results of this thesis are consistent with clinical observations and explain the increased mortality during flecainide-therapy, as well as the better tolerance of amiodarone in heart failure. Moreover, the results implicate that monitoring diastolic function during flecainide-therapy and adequate frequency control are key elements for the safe use of flecainide. For amiodarone using a different solvent with less cardio-depressant properties would be beneficial.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Glossar und Abkürzungen	X
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Einleitung	18
1.1 Physiologie der Herzmuskelkontraktion	18
1.1.1 Das Aktionspotential	18
1.1.2 Elektromechanische Koppelung	19
1.2 Inotropie und Regulationsmechanismen	21
1.2.1 Die Kraft-Frequenz-Beziehung	21
1.2.2 Der Frank-Starling-Mechanismus	22
1.3 Antiarrhythmische Pharmakotherapie	22
1.3.1 Das Klasse-Ic-Antiarrhythmikum Flecainid	23
1.3.2 Das Klasse-III-Antiarrhythmikum Amiodaron	25
1.4 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Puffer- und Nährlösungen	28
2.1.1 Tyrode-Lösung	28
2.1.2 2,3-Butan-Dion-Monoxim Lösung (BDM)	28
2.2 Vorhofgewebe	29

2.2.1 Erhalt und Transport.....	30
2.2.2 Präparation	30
2.2.3 Einverständniserklärung	31
2.3 Streifenanlage(n).....	31
2.3.1 Setup 1	31
2.3.2 Setup 2	33
2.4 Versuchsablauf	34
2.4.1 Versuchsaufbau.....	34
2.4.2 Versuchsbeginn	35
2.4.3 Einfrieren und Lagern der Präparate	36
2.5 Substanzen	36
2.5.1 Flecainid	36
2.5.2 Amiodaron	36
2.5.3 Amiodaron-Lösungsmittel	37
2.6 Versuchsprotokolle.....	37
2.6.1 Flecainid-Konzentrations-Wirkungs-Kurve.....	37
2.6.2 Amiodaron-Konzentrations-Wirkungs-Kurve.....	38
2.6.3 Einfluss von Flecainid auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	38
2.6.4 Einfluss von Amiodaron auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	38
2.7 Patientendaten	39
2.8 Auswertung	40
2.8.1 Untersuchte Parameter.....	41
2.8.2 Statistische Auswertung	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Flecainid Konzentration-Wirkungs-Kurve (KWK).....	42
3.1.1 Diastolische Spannung unter Flecainid.....	43

3.1.2	Zeitparameter der isometrischen Relaxation unter Flecainid.....	43
3.2	Amiodaron Konzentrations-Wirkungs-Kurve	44
3.2.1	Diastolische Spannung unter Amiodaron.....	45
3.2.2	Zeitparameter der isometrischen Relaxation unter Amiodaron	46
3.3	Flecainid Kraft-Frequenz Beziehung	46
3.3.1	Diastolische Spannung während der Flecainid-KFB.....	48
3.3.2	Zeitparameter der isometrischen Relaxation während der Flecainid-KFB.....	48
3.3.3	Frequenzabhängigkeit der Flecainid-Effekte	49
3.4	Amiodaron Kraft-Frequenz Beziehung	50
3.4.1	Diastolische Spannung während der Amiodaron-KFB.....	51
3.4.2	Zeitparameter der isometrischen Relaxation während der Amiodaron-KFB.....	51
3.4.3	Frequenzabhängigkeit der Amiodaron-/Lösungsmittel-Effekte	52
4	Diskussion	54
4.1	Inotrope Effekte und Wirkmechanismus von Flecainid.....	54
4.1.1	Flecainid-Effekte auf direkte Ca ²⁺ -Regulatoren (NCX, LTCC, SERCA).....	55
4.1.2	Flecainid-Effekte auf K ⁺ -Kanäle	55
4.1.3	Flecainid und der Ryanodinrezeptor	56
4.2	Einfluss von Flecainid auf die Kraft-Frequenz-Beziehung	57
4.3	Diastolische Funktion unter Flecainid.....	58
4.4	Inotrope Effekte und Wirkmechanismus von Amiodaron und Lösungsmittel.....	59
4.4.1	Molekulare Angriffspunkte von Amiodaron	60
4.4.2	Effekte des Lösungsmittels.....	61

4.5 Einfluss von Amiodaron und Lösungsmittel auf die Kraft-Frequenz-Beziehung.....	62
4.6 Diastolische Effekte unter Amiodaron	63
4.7 Klinische Relevanz der Ergebnisse	63
5 Tabellen.....	65
5.1 Flecainid KWK – Interventionen	65
5.2 Flecainid KWK – Kontrollen.....	65
5.3 Amiodaron KWK – Interventionen	66
5.4 Amiodaron KWK – Lösungsmittel.....	66
5.5 Flecainid KFB – Interventionen	67
5.6 Flecainid KFB – Kontrollen.....	67
5.7 Amiodaron KFB – Interventionen	68
5.8 Amiodaron KFB – Lösungsmittel.....	68
6 Literaturverzeichnis.....	69

Glossar und Abkürzungen

<i>AAE</i>	<i>Aorta ascendens Ersatz-Operation</i>
<i>AC</i>	<i>Adenylatcyclase</i>
<i>Agw</i>	<i>Ausgangswert</i>
<i>AKE</i>	<i>Aortenklappenersatz-Operation</i>
<i>APD</i>	<i>Aktionspotentialdauer</i>
<i>Aqua dest.</i>	<i>destilliertes Wasser</i>
<i>ARB</i>	<i>Angiotensin-Rezeptor-Blocker</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>AVNRT</i>	<i>AV-Knoten-Reentry-Tachykardie</i>
<i>AVRT</i>	<i>Atrioventrikuläre-Reentry-Tachykardie</i>
<i>bpm</i>	<i>beats per minute</i>
<i>BMI</i>	<i>body mass index</i>
<i>BDM</i>	<i>2,3-Butandionmonoxim</i>
<i>BL</i>	<i>Baseline (= Ausgangswert)</i>
Ca^{2+}	<i>Calcium-Ion</i>
<i>CABG</i>	<i>Aortocoronare-Bypass-Operation</i>
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	<i>Calciumchlorid</i>
<i>CaM</i>	<i>Calmodulin</i>
<i>cAMP</i>	<i>cyclisches Adenosinmonophosphat</i>
Cl^-	<i>Chlorid-Ion</i>
CO_2	<i>Kohlendioxid</i>
<i>CPVT</i>	<i>katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie</i>
<i>EC50</i>	<i>Konzentration mit 50% des maximalen Effekts</i>
<i>HCN-Kanäle</i>	<i>hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated</i>
<i>Hz</i>	<i>Hertz</i>
<i>ICD</i>	<i>implantierbarer Kardioverter-Defibrillator</i>
<i>I.E.</i>	<i>Injektions-Einheiten</i>
I_{Na}	<i>Natrium-Kanal-Strom</i>
I_K	<i>Kalium-Kanal-Strom</i>
I_{K1}	<i>einwärtsgerichteter Kalium-Strom (kanalspezifisch)</i>
I_{Kr}	<i>schneller Kalium-Strom (kanalspezifisch)</i>
I_{Ks}	<i>langsamer Kalium-Strom (kanalspezifisch)</i>

I_{Kur}	<i>ultraschneller Kalium-Strom (kanalspezifisch)</i>
I_{to}	<i>transienter Kalium-Strom (kanalspezifisch)</i>
K^+	<i>Kalium-Ion</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
KWK	<i>Konzentrations-Wirkungs-Kurve</i>
L	<i>Liter</i>
L_{max}	<i>Maximalwert der Kontraktion bei Dehnung</i>
LQTS	<i>Long-QT-Syndrom</i>
LTCC/ $I_{Ca(L)}$	<i>spannungsabhängiger Calciumkanal vom L-Typ</i>
(LV)EF	<i>linksventrikuläre Ejektionsfraktion</i>
m	<i>männliches Geschlecht</i>
Mg^{2+}	<i>Magnesium-Ion</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mm^2	<i>Quadratmillimeter</i>
mol	<i>Mol</i>
μ	<i>mikro</i>
n	<i>nano</i>
N	<i>Newton</i>
Na^+	<i>Natrium-Ion</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
Na^+ -Kanal	<i>Natriumkanal</i>
Na^+/K^+ -ATPase	<i>Natrium-Kalium-ATPase</i>
NCX	<i>Natrium-Calcium-Austauscher</i>
Nep	<i>Neprilysinrezeptor-Blocker</i>
n.s.	<i>nicht signifikant</i>
O_2	<i>Sauerstoff</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PLB	<i>Phospholamban</i>
p.o.	<i>peroral</i>
RCC	<i>rapid cooling contracture</i>
RT50	<i>Hälfte der Relaxationszeit</i>
RT90	<i>90% der Relaxationszeit</i>
RYR2	<i>kardialer Ryanodinrezeptor</i>
s.c.	<i>subkutan</i>

<i>SD</i>	<i>Standardabweichung (standard deviation)</i>
<i>SO₄²⁻</i>	<i>Sulfat-Ion</i>
<i>SEM</i>	<i>Standardfehler (standard error of mean)</i>
<i>SERCA</i>	<i>sarko/endoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase</i>
<i>SR</i>	<i>sarkoplasmatisches Retikulum</i>
<i>SVT</i>	<i>supraventrikuläre Tachykardie</i>
<i>T-ASS</i>	<i>Acetylsalicylsäure</i>
<i>TR</i>	<i>Schilddrüsenrezeptor</i>
<i>vgCaCh</i>	<i>spannungsabhängiger Calciumkanal</i>
<i>VT</i>	<i>ventrikuläre Tachykardie</i>
<i>w</i>	<i>weibliches Geschlecht</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Ionenströme und elektromechanischen Koppelung eines Kardiomyozyten..... 3

Abbildung 2:

Darstellung eines kardialen Aktionspotentials mit seinen einzelnen Phasen, den dabei hauptsächlich wirkenden Ionenkanälen und Angriffspunkten von Antiarrhythmika..... 6

Abbildung 3:

Fotographie eines rechten Herzohres..... 14

Abbildung 4:

Fotographie eines Isolierten Trabekel..... 14

Abbildung 5:

Fotographie der Messanlage für Muskelstreifen (Setup 1)..... 15

Abbildung 6:

Fotographie der Messeinheit mit Organbad und Force Transducer (Setup 1)..... 15

Abbildung 7:

Fotographie der Messanlage für Muskelstreifen (Setup 2)..... 16

Abbildung 8:

Fotographie der Messeinheit mit Organbad und Force Transducer (Setup 2)..... 17

Abbildung 9:

Fotographie des Stimulators und des Thermostats (Setup 2)..... 17

Abbildung 10:

KWK von Flecainid..... 25

<i>Abbildung 11:</i>	
<i>Diastolische Spannung bei Zunahme der Flecainid-Konzentration.....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 12:</i>	
<i>Relaxationszeit RT50 bei Zunahme der Flecainid-Konzentration.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 13:</i>	
<i>Relaxationszeit RT90 bei Zunahme der Flecainid-Konzentration.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 14:</i>	
<i>KWK von Amiodaron.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 15:</i>	
<i>Diastolische Spannung bei Zunahme der Amiodaron-Konzentration.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 16:</i>	
<i>Relaxationszeit RT50 bei Zunahme der Amiodaron-Konzentration.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 17:</i>	
<i>Relaxationszeit RT90 bei Zunahme der Amiodaron-Konzentration.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 18:</i>	
<i>KFB von Flecainid.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 19:</i>	
<i>Diastolische Spannung während der Flecainid-KFB.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 20:</i>	
<i>Relaxationszeit RT50 während der Flecainid-KFB.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 21:</i>	
<i>Relaxationszeit RT90 während der Flecainid-KFB.....</i>	<i>32</i>

<i>Abbildung 22:</i>	
<i>Reversibilität der frequenzvermittelten Effekte unter Flecainid.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 23:</i>	
<i>Reversibilität der frequenzvermittelten Effekte bei den Kontrolltrabekeln.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 24:</i>	
<i>KFB von Amiodaron.....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 25:</i>	
<i>Diastolische Spannung während der Amiodaron-KFB.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 26:</i>	
<i>Relaxationszeit RT50 während der Amiodaron-KFB.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 27:</i>	
<i>Relaxationszeit RT90 während der Amiodaron-KFB.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 28:</i>	
<i>Reversibilität der frequenzvermittelten Effekte unter Amiodaron.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 29:</i>	
<i>Reversibilität der frequenzvermittelten Effekte unter dem Lösungsmittel.....</i>	<i>35</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	
<i>Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 2:</i>	
<i>Patientendemographie der Experimente zur Flecainid-KWK.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 3:</i>	
<i>Patientendemographie der Experimente zur Amiodaron-KWK.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 4:</i>	
<i>Patientendemographie der Experimente zur Flecainid-KFB.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 5:</i>	
<i>Patientendemographie der Experimente zur Amiodaron-KFB.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 6:</i>	
<i>Flecainid KWK – Interventionen.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 7:</i>	
<i>Flecainid KWK – Kontrollen.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 8:</i>	
<i>Amiodaron KWK – Interventionen.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 9:</i>	
<i>Amiodaron KWK – Lösungsmittel.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 10:</i>	
<i>Flecainid KWK – Interventionen.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 11:</i>	
<i>Flecainid KWK – Kontrollen.....</i>	<i>50</i>

Tabelle 12:

Amiodaron KFB – Interventionen.....51

Tabelle 13:

Amiodaron KFB – Lösungsmittel.....51

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Herzmuskelkontraktion

Um die für diese Arbeit durchgeführten Experimente und ihre Ergebnisse richtig verstehen und deuten zu können, ist es wichtig, dass man die ihnen zugrunde liegenden physiologischen Vorgänge einer Herzmuskelkontraktion kennt. Zum einen geht es hier um einen elektrophysiologischen Vorgang, woher und wie das Aktionspotential in den Zellen zustande kommt und zum anderen die elektromechanische Koppelung, wie diese elektrochemische in eine mechanische Aktivität überführt wird.

1.1.1 Das Aktionspotential

Das Herz bildet seine für die Kontraktion nötigen Impulse mittels autonomer Reizgeneration. Imstande dazu ist es über spezielle Kardiomyozyten, die das Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzes bilden. Der primäre Taktgeber in diesem System ist der im Bereich der Einmündung der rechten oberen Hohlvene liegende Sinusknoten. Von diesem wird die Erregung anschließend weitergeleitet zu AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern – und von diesen geht die Erregung schließlich auf das Arbeitsmyokard über. Dies führt zu einer koordinierten Depolarisation der Kardiomyozyten, welche durch gap junctions untereinander verbunden sind⁸.

Ermöglicht wird diese autonome Reizgeneration in den Schrittmacherzellen über spezielle, nur in diesen Zellen exprimierte hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle), durch welche Na⁺- und K⁺-Ionen in die Zellen gelangen. Im Gegensatz dazu werden im Arbeitsmyokard spannungsabhängige Natriumkanäle (Na⁺-Kanäle) exprimiert. Diese sind verantwortlich für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials, der bei Zellen des Arbeitsmyokards im Vergleich zu den Schrittmacherzellen messbar ist^{9,11}.

Die einströmenden Ionen führen zur Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Calciumkanälen (vgCaCh) vom L-Typ (LTCC) und Ca²⁺-Ionen strömen in den Myozyten ein. Das eingeströmte Calcium bewirkt, dass sich der kardiale Ryanodinrezeptor (RyR2) öffnet, welcher sich in der Membran des

sarkoplasmatischen Retikulum (SR) befindet. Das SR dient den Myozyten als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher¹⁰. Die eingeströmten Kationen führen anschließend zur Membrandepolarisation, welche nun positiv geladen ist. Zusätzlich stehen die Ca^{2+} -Ionen für die elektromechanische Koppelung und Kontraktion zur Verfügung, da diese dort eine essentielle Rolle einnehmen^{11,13}.

Die einströmenden Ionen führen in Folge zur Aktivierung von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen (K^+ -Kanäle), die nun K^+ aus der Zelle hinaus transportieren, was das Aktionspotential schließlich beendet. Das in der Zelle befindliche Natrium wird über die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) wieder in den Extrazellulärraum befördert. Zusätzlich sorgt sie dafür, dass das aus der Zelle gelangte K^+ wieder in diese hineingelangt. Das Ca^{2+} wird auf zwei verschiedenen Wegen wieder aus dem Cytoplasma entfernt, zum einen über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), der Ca^{2+} im Austausch für Natrium aus der Zelle pumpt⁹ und zum anderen über die sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die das Ca^{2+} wieder zurück in das SR befördert^{12,13}. Dies konnte auch als der beim Herzgesunden dominante Mechanismus identifiziert werden. Das Verhältnis scheint sich außerdem bei höheren Frequenzen noch weiter zugunsten der SERCA zu verschieben und eine Störung dieses Mechanismus scheint einer der bei Herzinsuffizienz ausschlaggebenden Ursachen für die kompromittierte Kraft-Frequenz-Beziehung zu sein^{14,15}. Die SERCA-Aktivität wird durch das Regulatorprotein Phospholamban (PLB) beeinflusst. Unphosphoryliert fungiert es als Hemmer der SERCA. Wenn es aber über einen cAMP-abhängigen (durch β -Rezeptoren aktivierten) oder über einen Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Signalweg phosphoryliert wird, dann verliert es seine inhibitorische Funktion⁷².

1.1.2 Elektromechanische Koppelung

Die elektromechanische Koppelung bezeichnet die Vermittlung des elektrischen Vorganges der Depolarisation in den mechanischen Vorgang der Kontraktion. Wie bereits erwähnt spielt für diesen Vorgang Ca^{2+} eine große Rolle.

Die kontraktile Einheit eines (Herz-)Muskels besteht aus den Proteinen Aktin, Myosin, Tropomyosin und Troponin. Die Muskelkontraktion findet durch eine Konformationsänderung des Myosin-Moleküls statt, welches dazu mit dem Aktinfilament interagiert, wodurch die Zelle verkürzt wird. Im Ruhezustand ist jedoch

die Bindungsstelle des Aktins vom Troponin-Tropomyosin-Komplex blockiert. Hier kommt nun das zuvor ins Zytosol freigegebene Ca^{2+} ins Spiel. Indem es an Troponin C andockt löst sich dieses und die Bindungsstelle wird frei.

Das Ca^{2+} wird anschließend wieder durch die im vorherigen Kapitel 1.1.1 beschriebenen Mechanismen aus dem Zytosol eliminiert und der Herzmuskel kann sich wieder (vorübergehend) entspannen^{16,17}. Diese in Kapitel 1.1.1 und 1.1.2 beschriebenen Vorgänge sind in Abbildung 1 dargestellt.

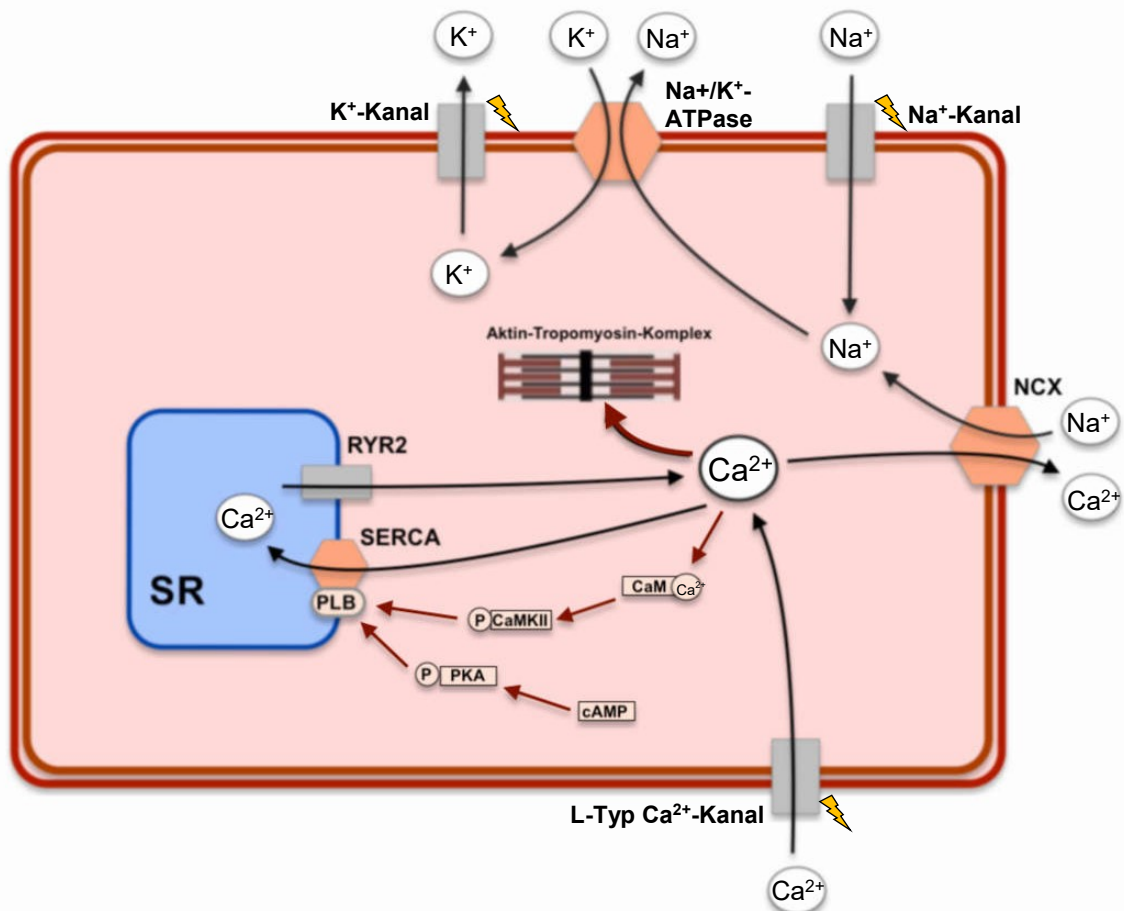


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ionenströme und elektromechanischen Koppelung eines Kardiomyozyten. Spannungsabhängige Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle werden im Rahmen des Aktionspotentials geöffnet und führen zu Ionen-Ein- bzw. Ausstrom. Außerdem wird Ca^{2+} vom SR ins Zytosol ausgeschüttet. Dieses kann nun an den Aktin-Tropomyosin-Komplex andocken, wodurch Myosin an Aktin binden kann und die gesamte Muskelzelle dadurch kontrahiert. Die Na^+/K^+ -ATPase führt anschließend durch den Austausch von intrazellulärem Na^+ mit extrazellulärem K^+ die ursprünglichen Ionenverhältnisse wieder herbei. Die SERCA und der NCX befördern Ca^{2+} wieder aus dem Zytosol. Reguliert werden kann die SERCA zum Beispiel über Calmodulin (CaM) und Proteinkinase A (PKA), welche über cAMP aktiviert wird. Diese phosphorylieren das PLB, welches daraufhin seine inhibitorische Funktion auf die SERCA verliert.

1.2 Inotropie und Regulationsmechanismen

Den Vorgang des Herzens seine Schlagkraft zu erhöhen bzw. anzupassen bezeichnet man als Inotropie. Die Inotropie des Herzens kann durch verschiedene Stimuli erhöht oder erniedrigt werden. Diese können nervlicher, hormoneller oder pharmakologischer Natur sein. Daneben existieren noch spezifische Mechanismen des Herzmuskelgewebes wie der Frank-Starling-Mechanismus und die Kraft-Frequenz-Beziehung, auf die an dieser Stelle etwas genauer eingegangen wird⁶⁶.

1.2.1 Die Kraft-Frequenz-Beziehung

Eine Möglichkeit des Herzens seine Inotropie zu steigern, ist über die Veränderung seiner Herzfrequenz. Diesen Zusammenhang bezeichnet man als die Kraft-Frequenz-Beziehung des Herzens. Im gesunden Myokard nimmt so mit zunehmender Herzfrequenz auch die myokardiale Kontraktionskraft zu, was ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Myokard- und Kreislauffunktion ist. Dieser Effekt wirkt außerdem einem anderen negativ inotropen Effekt entgegen. Bei höheren Herzfrequenzen sinkt das enddiastolische Füllungsvolumen, da die Zeit, welche das Herz hat um sich wieder mit Blut zu füllen, reduziert ist. Durch die positive Kraft-Frequenz-Beziehung wird dies ausgeglichen bzw. sogar überkompensiert²⁶.

Auf subzellulärer Ebene spielt für diesen Mechanismus die vermehrte Beladung des SR mit Ca^{2+} eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass mit höheren Stimulationsfrequenzen auch die SERCA-Aktivität, die ja Calcium wieder zurück ins SR pumpt, zunimmt. Die negative KFB bei insuffizienten Herzen und das in ihm nachgewiesene Verhältnis der Ca^{2+} -Elimination von SERCA und NCX zugunsten des NCX, legen die Relevanz der Erhöhung der SERCA-Aktivität für eine positive KFB nahe^{14,27}.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Steigerung der Stimulationsfrequenz auch die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle erhöht. Dadurch kann zusätzliches Ca^{2+} in die Zelle gelangen, welches dann wieder für die kontraktile Funktion zur Verfügung steht. Dieser Effekt wird zudem durch Katecholamine modifiziert bzw. durch β - und Calcium-Kanalblocker gehemmt. Weiters scheint dieser Mechanismus am insuffizienten Herzen gestört zu sein²⁸.

1.2.2 Der Frank-Starling-Mechanismus

Eine weitere Möglichkeit zur Inotropie-Steigerung ist der Frank-Starling-Mechanismus, der durch eine erhöhte Vor- oder Nachlast ausgelöst wird (erhöhte Vordehnung der Herzmuskelzellen). Durch diesen Mechanismus ist das Herz in der Lage die Ejektionsfraktion dem venösen Rückstrom anzupassen, damit immer ungefähr gleich viel Blut wieder aus dem Herz hinausgepumpt wird, wie auch hineingelangt²⁹.

Vermittelt wird dieser Mechanismus über eine durch Dehnung der Muskelzellen ausgelösten Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente. Eine wesentliche Rolle scheint dabei das Riesenprotein Titin zu spielen, welches dem Muskel eigentlich Elastizität und Stabilität verleiht. Jedoch scheint es auch die Konformation und Nähe von Aktin und Myosin, sowie die Ausbildung von Querbrückenverbindungen des Myosinfilaments und die Ca^{2+} -sensitiven Areale des Aktinfilaments regulieren zu können²⁹.

1.3 Antiarrhythmische Pharmakotherapie

Bei den beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen handelt es sich jeweils um Antiarrhythmika mit verschiedenen Wirkmechanismen, weshalb an dieser Stelle kurz auf diese Substanzklasse und ihre elektrophysiologischen Effekte eingegangen wird. Antiarrhythmika werden nach ihren verschiedenen Angriffspunkten gemäß Vaughan und Williams in die Klassen I, II, III und IV eingeteilt. Sie modifizieren verschiedene Phasen des kardialen Aktionspotentials und können dadurch Arrhythmien unterdrücken⁴⁰. Klasse-I-Antiarrhythmika, die nach ihrer Kinetik und ihren genauen elektrophysiologischen Effekten noch weiter in die Subklassen Ia, Ib und Ic eingeteilt werden, hemmen den schnellen spannungsabhängigen Na^+ -Kanal (I_{Na}) und modifizieren deshalb die Depolarisationsphase (Phase 0). Bei der Klasse II handelt es sich um β -Blocker, die durch ihre antiadrenerge Wirkung negativ chronotrop und dromotrop wirken, außerdem die effektive Refraktärzeit verlängern und so in die Ruhephase (Phase 4) eingreifen. Klasse-III-Antiarrhythmika blockieren verschiedene nach außen gerichtete K^+ -Kanäle (I_{K}) und verlängern dadurch die Repolarisationsphase (Phase

3) und die effektive Refraktärzeit. Und zu guter Letzt, Klasse-IV-Antiarrhythmika blockieren die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ ($\text{I}_{\text{Ca(L)}}$), verlangsamen dadurch die AV-Überleitung und modifizieren die Plateauphase (Phase 2) des Aktionspotentials^{8,40}. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Angriffspunkte eines Antiarrhythmikums anhand eines Aktionspotentials bildlich dargestellt.

Zu beachten ist allerdings, dass die verschiedenen Substanzen auch innerhalb einer Klasse relativ inhomogen sind, da Antiarrhythmika meistens auf mehr als nur eine Art bzw. Ionenkanal-Klasse wirken. Ein Versuch dies transparenter darzustellen wurde mit dem „Sicilian Gambit“ unternommen, bei der die einzelnen Substanzen in einer Tabelle aufgelistet sind und von jeder einzelnen die jeweiligen Wirkungen und Angriffspunkte ersichtlich sind⁶⁷.

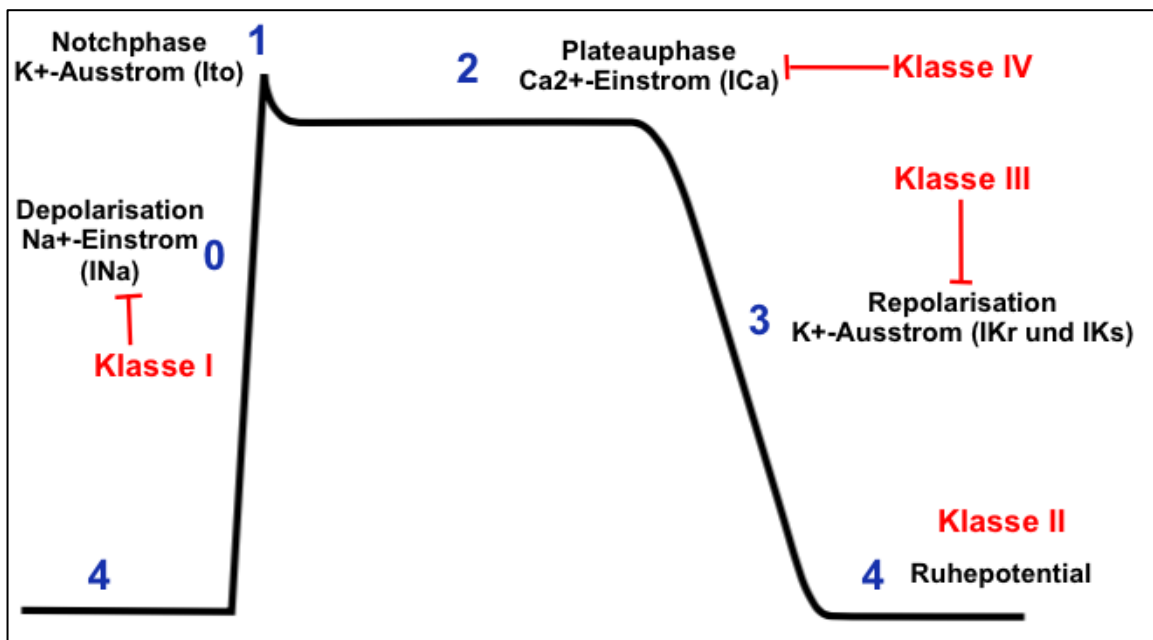


Abbildung 2: Kardiales Aktionspotential mit seinen einzelnen Phasen, den dabei hauptsächlich wirkenden Ionenkanälen und Angriffspunkten von Antiarrhythmika.

1.3.1 Das Klasse-Ic-Antiarrhythmikum Flecainid

Flecainid, als ein Klasse-Ic-Antiarrhythmikum, vermittelt seine antiarrhythmische Wirkung über eine potente selektive Blockade der einwärtsgerichteten schnellen spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle. Dies äußert sich in einer flacheren und längeren Phase 0 des Aktionspotentials. Diese Wirkung trifft quasi nur das Arbeitsmyokard, da die Schrittmacherzellen statt den Na^+ -Kanälen über HCN-Kanäle verfügen. Ein weiterer Wirkmechanismus ist die Blockade der nach außen

gerichteten K⁺-Kanäle, besonders des schnellen I_{Kr}-Kanals, die für die Beendigung des Aktionspotentials verantwortlich sind und verlängern dieses deshalb. Diese elektrophysiologischen Vorgänge äußern sich im Oberflächen-EKG über PQ-, QRS- und QT-Zeit-Verlängerungen¹⁸. Es wurde auch eine Wirkung auf den Ryanodinrezeptor RyR2 diskutiert¹⁹, wegen der Wirksamkeit von Flecainid bei der katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT), dies konnte jedoch nicht bestätigt werden²⁰.

Flecainid und andere Klasse Ic Antiarrhythmika kamen unter anderem durch die CAST-Studie (Clinical Arrhythmia Suppression Trial) in Verruf, da in ihr signifikant mehr Personen in der Behandlungsgruppe, meist durch plötzlichen Herztod, verstarben als in der Placebo-Gruppe²². Seither gelten trotz guter Effektivität Einschränkungen für Personen mit strukturellen oder ischämischen Herzerkrankungen¹⁸.

Dennoch ist Flecainid neben Propafenon prinzipiell ein Mittel der ersten Wahl zur medikamentösen Wiederherstellung des Sinusrhythmus bei Vorhofflimmern, wenn keine strukturelle Herzerkrankung vorliegt^{18,21}. Hier konnte es mit Konversionsraten von 90% innerhalb eines 12-Stunden Beobachtungszeitraumes besser abschneiden als Propafenon (72%) und Amiodaron (64%)²⁴. Wenn keine strukturelle oder ischämische Herzerkrankung vorliegt, ist es auch zur Langzeittherapie von persistierendem Vorhofflimmern geeignet²¹ und konnte mit einer Rückfallrate von 38% ebenfalls besser abschneiden, als beispielsweise Propafenon (61%) und Amiodaron (47%)²³. Sehr gut eignet es sich auch zur Therapie als „pill in the pocket“, wo die/der PatientIn, wenn sie/er die Herzrhythmusstörung bemerkt, selbst eine größere orale Dosis zu sich nimmt. Diese Methode hat sich bisher als nur minimal schlechter als die im Krankenhaus durchgeführte Kardioversion erwiesen und es konnten Erfolge in 94% der Arrhythmien bzw. 84% der PatientInnen erzielt werden. So konnten effektiv Hospitalisierungen gesenkt und Ressourcen gespart werden^{18,21}.

Weitere Indikationen für die Flecainid eingesetzt wird sind supraventrikuläre Tachykardien (SVTs) wie die AV-Knoten-Reentry-Tachykardie (AVNRT) und die Atrioventrikuläre-Reentry-Tachykardie (AVRT), bei denen jedoch auch andere oft günstigere Behandlungsmethoden existieren. Für ventrikuläre Tachykardien (VT) sind die Indikationen sehr eingeschränkt, nicht zuletzt wegen der häufig zu Grunde liegenden strukturellen Herzerkrankungen. Ein Beispiel wäre jedoch die

rechtsventrikuläre Ausflusstrakt-Tachykardie¹⁸. Seltene Indikationen bei denen Flecainid als first line therapy angewandt wird sind die bereits genannte CPVT¹⁹ und die fetale supraventrikuläre Tachykardie²⁵.

Wichtig bei der Verwendung von Flecainid ist, dass man seine Nebenwirkungen kennt. Seine proarrhythmogene Wirkung kann in seltenen Fällen auch bei Herzgesunden ventrikuläre Tachykardien (VTs) auslösen (< 3% bei Kardioversionen). Schon häufiger kann es aber passieren, dass es die Entstehung eines Vorhofflatterns mit schneller 1:1 Überleitung begünstigt (3,5-5%). Dem kann man entgegenwirken indem man Substanzen, welche die AV-Überleitung hemmen, verwendet, beispielsweise Beta-Blocker, Verapamil oder Diltiazem. Wie viele andere Antiarrhythmika, vermittelt auch Flecainid einen negativ inotropen Effekt, was es zusätzlich unattraktiv und gefährlich bei herzinsuffizienten Personen oder Personen mit reduzierter Ejektionsfraktion (EF) macht¹⁸.

Kennt man die gute Effektivität und weiß man über die möglichen Nebenwirkungen Bescheid, sollte man auf gewisse Dinge bei der Verwendung dieses Pharmakons achten. Diese beinhalten, dass man PatientInnen besonders zu Therapiebeginn genau überwacht und die ersten Tage, bis man die entsprechende therapeutische Dosis erreicht, regelmäßige EKG-Kontrollen durchführt um Auffälligkeiten zu entdecken und eine Steigerung der QRS-Dauer um mehr als 25% auszuschließen. Weiters sollte man ischämische und strukturelle Herzerkrankungen, eingeschränkte linksventrikuläre EF, höhergradige AV-Blockierungen, andere Leitungsstörungen und sonstige Kontraindikationen ausschließen^{18,23}.

1.3.2 Das Klasse-III-Antiarrhythmikum Amiodaron

Amiodaron wird nach Klassifikation nach Vaughan Williams als Klasse-III-Antiarrhythmikum eingestuft und wirkt in erster Linie über eine Hemmung der K⁺-Kanäle. Dadurch bewirkt es eine Verlängerung von Phase 3 des Aktionspotentials und eine Verlängerung der effektiven Refraktärzeit. Im EKG äußert sich dies mitunter in einer Verlängerung der QT-Zeit. Allerdings ist der Wirkmechanismus von Amiodaron komplex und ist auch heute noch nicht bis ins letzte Detail verstanden. Als „dirty drug“ hat es zusätzlich zur K⁺-Kanal-Blockade noch Eigenschaften der Antiarrhythmika-Klassen I, II und IV. Deshalb kann es außerdem bradykardisierend

(Klasse II), P-R Zeit verlängernd (Klasse IV) oder QRS-Komplex verbreiternd (Klasse I) wirken^{48,50}.

Eingesetzt wird es wegen seiner guten Wirksamkeit sowohl bei ventrikulären als auch bei supraventrikulären (Tachy-)Arrhythmien. Außerdem zeigt es, vor allem im Vergleich mit anderen Antiarrhythmika, eine sehr niedrige proarrhythmogene Potenz und einen wenig ausgeprägten bzw. kaum vorhandenen negativ inotropen Effekt⁴⁸. Es gibt sogar Publikationen, in denen ein positiver Effekt auf die linksventrikuläre Pumpfunktion (LVEF) gezeigt wurde⁵², weshalb Amiodaron, gerade bei Personen mit Herzinsuffizienz oder kompromittierter Ventrikelfunktion, häufig die einzig mögliche Option darstellt.

Was den Einsatz von Amiodaron allerdings komplizierter macht, ist seine sehr eigene Pharmakokinetik. Es ist hoch lipophil und reichert sich sehr stark im Gewebe an. Bei längerer Therapie beträgt die Halbwertszeit nach dem Absetzen zwischen 60 und 142 Tagen. Dazu kommt eine unvollständige und individuell unterschiedliche Aufnahme (Bioverfügbarkeit: 30-70%). Außerdem muss es zu Therapiebeginn, bis es seine optimale Wirksamkeit erreicht, erst aufdosiert werden (Loading)⁴⁸. Die starke Lipophilie ist außerdem der Grund, wieso in Injektionslösungen zusätzlich ein Lösungsvermittler, bestehend aus dem Polysorbat „Tween 80“ und Benzylalkohol, enthalten sein muss.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Amiodaron sind seine zahlreichen extrakardialen Nebenwirkungen und Interaktionen mit anderen Medikamenten, was Amiodaron deshalb häufig bei nicht Herzinsuffizienten zu einem Therapeutikum zweiter Wahl macht. Die Nebenwirkungen umfassen sehr häufig Mikroablagerungen auf der Kornea (90%) und Störungen des Schilddrüsenstoffwechsels, aufgrund des hohen Iod-Gehalts von Amiodaron. Hervorzuheben sind auch die seltenen, aber meist sehr schwerwiegenden Nebenwirkungen auf die Lunge (Lungenfibrose 2%). Daneben können noch Nebenwirkungen in Haut, Leber und ZNS auftreten. Prinzipiell erhöhen sich die Wahrscheinlichkeiten und die Schwere der Nebenwirkungen mit der Dosis und Therapiedauer. Aus diesem Grund sollte eine Amiodaron-Therapie immer gut überwacht werden und die möglicherweise betroffenen Organe regelmäßig kontrolliert werden⁴⁹.

Nichtsdestotrotz ist Amiodaron ein unverzichtbares Arzneimittel in der Behandlung vieler Arrhythmien, besonders bei Personen mit kompromittierter LVEF. Derzeit

findet es Verwendung zur Rhythmuskontrolle und off-label auch zur Frequenzkontrolle bei Vorhofflimmern, wenn andere Antiarrhythmika kontraindiziert sind²¹. Bei der Kardioversion ist es prinzipiell nicht Mittel der ersten Wahl, es kann jedoch vor und nach Kardioversionen und Katheterablationen zusätzlich gegeben werden, um den Therapieerfolg zu maximieren. Bei der Prävention ventrikulärer Arrhythmien ist es implantierbaren Kardioverter-Defibrillatoren (ICDs) unterlegen, ist aber oft eine wichtige Alternative, falls dies nicht möglich oder erwünscht ist. In der Notfallmedizin ist es wichtig bei kardiovaskulär stark beeinträchtigten PatientInnen und hat eine eigene Position im Reanimations-Algorithmus^{48,51}.

1.4 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

- Welche inotropen und lusitropen Effekte haben die Antiarrhythmika Flecainid und Amiodaron im isolierten atrialen humanen Myokard?
- Welche Auswirkungen bestehen auf die diastolische Funktion?
- Wie wird die Kraft-Frequenz-Beziehung durch diese Antiarrhythmika beeinflusst?
- Wie stehen spezifische Substanzeffekte und unspezifische Lösungsmittelleffekte dabei zueinander?
- Durch welche Mechanismen sind die untersuchten funktionellen Effekte der beiden Antiarrhythmika zu erklären?

2 Material und Methoden

Sämtliche für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit isolierten Herzmuskel-Trabekel aus dem humanen rechten Herzohr durchgeführt. Insgesamt wurde für diese Arbeit Gewebe aus 29 Herzen gewonnen, dabei konnten an 61 Trabekeln Messungen durchgeführt werden.

2.1 Puffer- und Nährlösungen

2.1.1 Tyrode-Lösung

Um im Organbad der Versuchsanlage möglichst ideale Bedingungen für die Trabekel zu schaffen, wurde dieses mit einer sogenannten Tyrode-Lösung (modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer) befüllt. Um physiologischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen wird die Lösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, damit der pH-Wert (7,4) entsprechend eingestellt ist.

2.1.2 2,3-Butan-Dion-Monoxim Lösung (BDM)

Um nach Absetzen des Herzohres dem Gewebsuntergang und autolytischen Prozessen entgegenzuwirken, wurde das Gewebe in einer mit BDM (3g/L) versetzten Tyrode-Lösung aufbewahrt. Auch hier wird zum Puffern wieder Carbogen zugeführt um einen stabilen pH-Wert von 7,4 herzustellen.

BDM dient als kardioplegischer Schutz, da es mögliche Kontraktionen verhindert, die von durch Extraktion und Präparation freigesetztem Calcium ausgelöst werden könnten. BDM ist eine Phosphatase und vermittelt seine Wirkung über eine reversible Hemmung der Querbrückenbildung^{1,2}. Die Calciumsensitivität von Troponin C und die Aufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum bleiben hierbei unbeeinflusst^{3,4}.

Da sämtliche Effekte von BDM durch Auswaschen vollständig reversibel sind, ist es eine optimale kardioprotektive Substanz für diese Art von Experimenten. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer- und Nährlösungen ist in Tabelle 1 angeführt.

<i>Krebs-Henseleit-Puffer</i>			
<i>Kationen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Anionen</i>	<i>Konzentration</i>
<i>Na⁺</i>	152 mmol/L	<i>Cl⁻</i>	129,5 mmol/L
<i>K⁺</i>	3,6 mmol/L	<i>HCO₃⁻</i>	25 mmol/L
<i>Mg²⁺</i>	0,6 mmol/L	<i>H₂PO₄⁻</i>	1,3 mmol/L
<i>Ca²⁺</i>	0,2 mmol/L	<i>SO₄²⁻</i>	0,6 mmol/L

<i>Tyrode-Lösung</i>		<i>BDM-Tyrode-Lösung</i>	
<i>Feststoff</i>	<i>Einwaage (1 L)</i>	<i>Feststoff</i>	<i>Einwaage (1 L)</i>
<i>NaCl</i>	7,422 g	<i>NaCl</i>	7,422 g
<i>NaHCO₃</i>	2,100 g	<i>2,3-BDM</i>	3,000 g
<i>Glucose</i>	2,018 g	<i>NaHCO₃</i>	2,100 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g	<i>Glucose</i>	2,018 g
<i>KCl</i>	0,172 g	<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g	<i>KCl</i>	0,172 g
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g	<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g
<i>Altinsulin</i>	5 I.E.	<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

2.2 Vorhofgewebe

Das für die Arbeit verwendete Gewebe wurde bei herzchirurgischen Operationen gewonnen. Zumeist handelte es sich dabei um aorto-coronare Bypass-Operationen, Aortenklappenersatz-Operationen (AKE) oder Operationen an der Aorta ascendens (AAE). Bei diesen Operationen wird ein Herzstillstand mittels einer kardioplegischen Lösung, die einen Depolarisationsblock zur Folge hat, eingeleitet. Zuvor werden die PatientInnen an die Herzlungenmaschine angeschlossen, um eine extrakorporale Zirkulation durchführen zu können. Die venöse Kanülierung erfolgt hierbei

standardmäßig über den rechten Vorhof. Dabei muss häufig das rechte Herzohr (Abbildung 3) abgesetzt werden und steht so für experimentelle Versuche zur Verfügung.

Im Durchschnitt ist ein erhaltenes Herzohr 2x1x1 cm groß und je nach Beschaffenheit konnten pro Herzohr zwischen 2 und 12 Trabekel gewonnen werden.

2.2.1 Erhalt und Transport

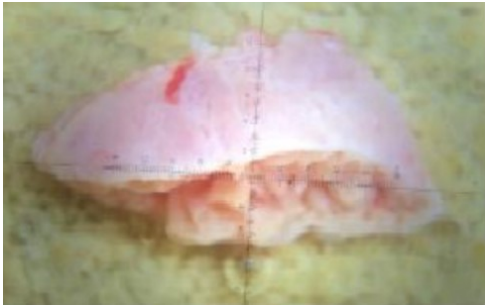
Nachdem die/der ChirurgIn das Herzohr abgesetzt hat, wird es mit einer sterilen Pinzette in einen Plastikbecher gegeben, der ungefähr 100 ml mit Carbogen begaster und gekühlter (4°C) BDM-Tyrode-Lösung enthält. Danach wird es umgehend (10 Minuten) ins Labor gebracht und es kann mit der Präparation begonnen werden. Falls die Durchführung des Experiments nicht sofort möglich ist, sollte das Herzohr vorübergehend gekühlt werden.

2.2.2 Präparation

Die Präparation der Trabeculae carneae (Abbildung 4) erfolgte in einer mit gekühlter und Carbogen aufgesättigter BDM-Tyrode befüllten Präparierschale unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Olympus, VMT) mit 10-facher Vergrößerung. Die Präparation wurde mit mikrochirurgischen Instrumenten (Pinzette, Mikroscheren unterschiedlicher Größe) durchgeführt. Hierbei ist es wichtig möglichst atraumatisch zu arbeiten, um irreversible Schäden an den Trabekeln zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden die herauspräparierten Trabekel auch mit einer Kunststoffpipette in ein eigenes Gefäß (wieder mit BDM-Tyrode) überführt, um mögliche Schäden durch Dehnung zu vermeiden und anschließend wieder sofort gekühlt. Die so gewonnen Trabekel kann man im Anschluss für Experimente mit der Streifenanlage verwenden.

Grundsätzlich sollten die Trabekel keinen größeren Querschnitt als 0,64 mm² (Durchmesser 0,9 mm) haben, da die Versorgung des Gewebes dadurch, dass kein Blutfluss mehr vorhanden ist ausschließlich über Diffusion passiert und deshalb bei dickeren Trabekeln die Gefahr der Hypoxie drohen würde. Außerdem eignen sich möglichst unverzweigte, nicht randständige Trabekel am besten, da man diese am

besten atraumatischen herauspräparieren kann und sie nur an den jeweiligen Enden schneiden muss.



*Abbildung 3: Rehtes Herzohr,
Blick durch das Mikroskop*



*Abbildung 4: Isolierter Trabekel auf
Nadeln fixiert, Blick durch das Mikroskop*

2.2.3 Einverständniserklärung

Für alle erhaltenen Gewebeproben wurde von den PatientInnen zuvor eine Einverständniserklärung unterzeichnet, welche im Rahmen der Aufklärung von der Abteilung für Herzchirurgie Graz akquiriert wurde.

Für die durchgeführten Experimente liegt ein entsprechendes Votum der Ethikkommission vor (Ethikvotum 19-109ex07/08).

2.3 Streifenanlage(n)

Die Experimente wurden mit zwei verschiedenen Messanlagen durchgeführt, die im Folgenden kurz beschrieben bzw. abgebildet werden.

2.3.1 Setup 1

Dieses in den Abb. 5 und 6 dargestellte Setup wurde für die Experimente, in denen Konzentrationswirkungskurven ermittelt wurden, verwendet, da durch das Kreislaufsystem eine möglichst konstante Flüssigkeitsmenge im System gewährleistet wird. Es setzt sich aus folgenden Elementen zusammen:

- Messeinheit mit Force Transducer (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stimulator STM1 (Scientific Instruments, Deutschland)
- Rollpumpe MC MS (Ismatec, Schweiz)
- Stereomikroskop VMT (Olympus, Japan)
- 4-Kanal-Thermoschreiber Graphtec Linearcorder WR 3320 (Graphtec, Japan)

- Computer mit Softwareprogramm Labview

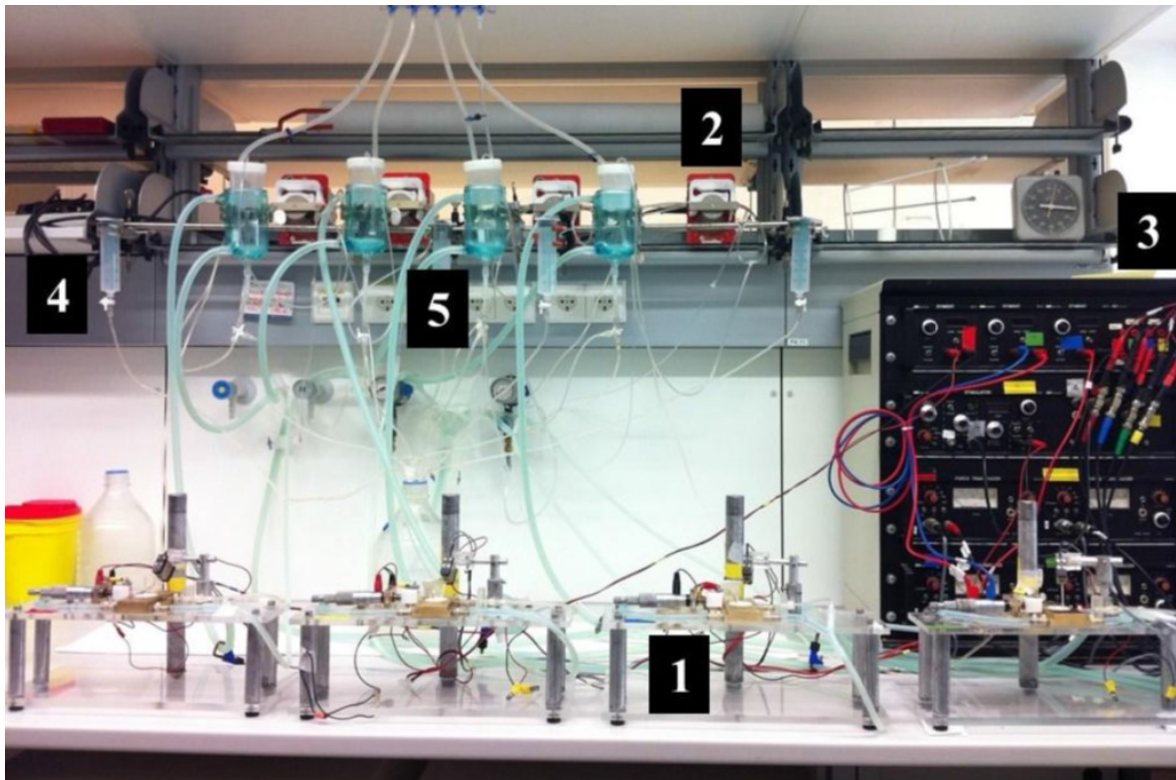


Abbildung 5: Setup 1, 1: Messeinheit mit Organbad, Force Transducer und Mikrometerschraube, 2: Rollpumpe, 3: Stimulator, 4: 50 ml Perfusorspritzen zum Ablassen von Flüssigkeit, 5: Tyrodebecken mit Schlauchsystem und Begasungseinheit.

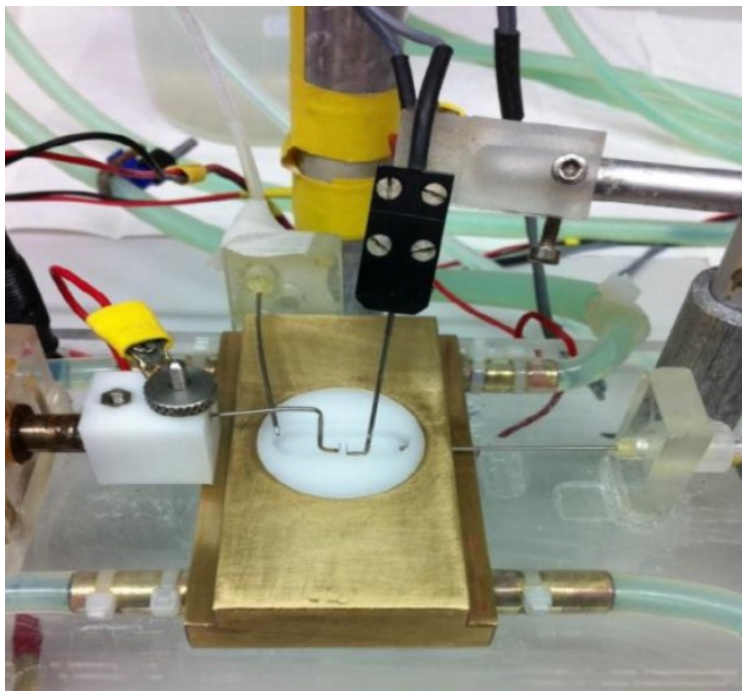


Abbildung 6:
Messeinheit mit
Organbad und
Force Transducer
(schwarzes
Element).

Bei diesem Setup wird die Flüssigkeit im Organbad über eine Kanüle hineingepumpt und über eine andere wieder abgesaugt. So gelangt die Flüssigkeit wieder zurück

zum Tyrode-Becken. Auf weiten Teilen wird das Schlauchsystem hierbei nach dem Gegenstromprinzip thermoreguliert: Das Tyrode-Kreislaufsystem ist integriert in das Schlauchsystem in das die Wärmepumpe eingelassen ist, was für eine konstante Temperatur im Kreislauf sorgt.

2.3.2 Setup 2

Dieses in Abb. 7 dargestellte Setup wurde für die Experimente, in denen frequenzabhängige Effekte ermittelt wurden, verwendet. Es setzt sich zusammen aus:

- Messeinheit mit Force Transducer (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stimulator STIM8 (Scientific Instruments, Deutschland)
- Thermostat (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stereomikroskop (Optech, Deutschland)
- A/D-Wandler
- Computer mit Softwareprogramm LabChart

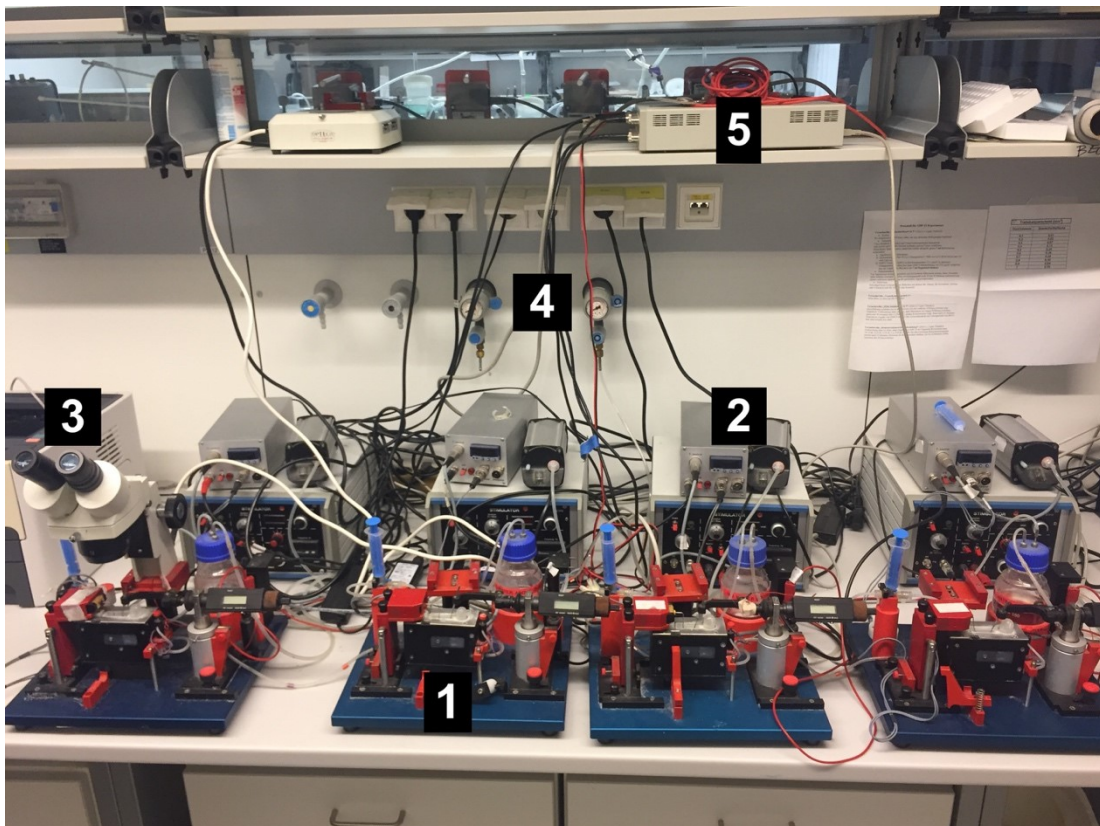


Abbildung 7: Setup 2, 1: Messeinheit mit Organbad, Force Transducer und Mikrometerschraube, 2: Stimulator und Thermostat, 3: Stereomikroskop, 4: Sauerstoffventil, 5: A/D-Wandler mit Anschluss zum Computer

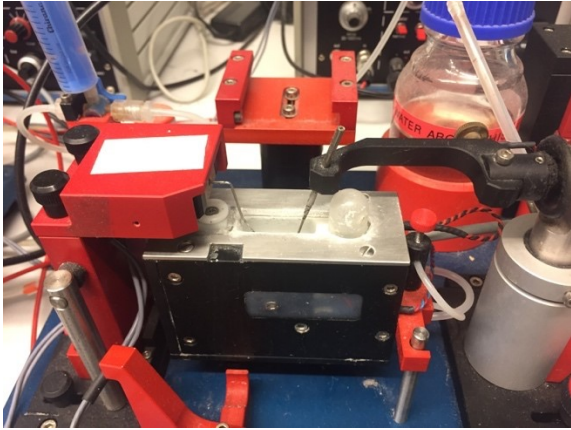


Abbildung 8: Messeinheit mit Organbad und Force Transducer

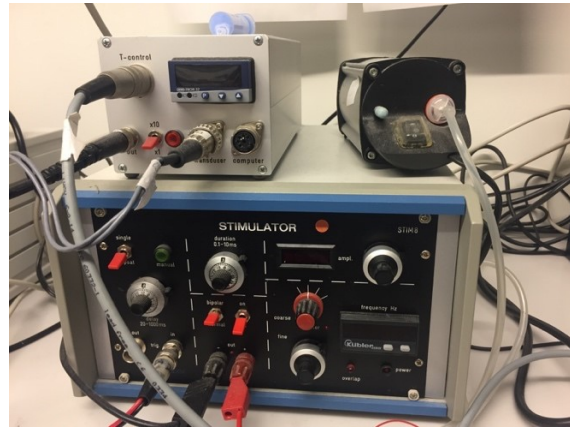


Abbildung 9: Stimulator und Thermostat (oben)

Im Unterschied zum ersten Setup verfügt dieses nicht über ein Kreislaufsystem, weshalb bei längeren Versuchen verdunstende Flüssigkeit ein Problem darstellen könnte. Außerdem ist die Anordnung der Stimulatoren hier anders und man kann die Stimulationsfrequenzen für jeden Kanal separat einstellen, was für Experimente mit verschiedenen Stimulationsfrequenzen von Vorteil sein kann. Das Computerprogramm LabChart liefert zusätzlich eine kontinuierliche Aufzeichnung des gesamten Experiments.

2.4 Versuchsablauf

2.4.1 Versuchsaufbau

Beide beschriebenen Anlagen verfügen über jeweils vier Kanäle, das heißt man kann Messungen jeweils simultan mit vier Trabekeln durchführen. Ein Kanal verfügt jeweils über ein eigenes Organbad und eine eigene Temperaturregulation, welche die Temperatur konstant auf 37°C hält. Außerdem verfügt jeder Kanal über eine eigene Begasungseinheit (wiederum mit Carbogen), die dafür sorgt, dass die zirkulierende Substanz ausreichend Sauerstoff enthält und der pH-Wert konstant auf 7,4 bleibt.

Das Organbad, welches das zentrale Element der Anlage bildet, besteht aus Teflon und ist in einen Thermoblock eingefasst. Als Nährlüssigkeit dient die vorbereitete Tyrode-Lösung, die mit 2,018 g/l Glucose als Energiesubstrat und 5 I.E. Insulin versetzt wurde. Eine der beiden Nadeln, auf die der Trabekel gehängt wird, ist mit

einem Force Transducer verbunden, der die Kontraktionskraft und kinetischen Daten misst. Diese Daten werden anschließend an einen Computer mit dem jeweiligen laufenden Programm übermittelt bzw. bei Setup 1 zusätzlich an einen Drucker. Die andere Nadel ist mit einer Mikrometerschraube verbunden, durch welche man den Trabekel kontrolliert dehnen kann. Dadurch kann man eine steigende Vorlast (preload) simulieren und die isometrische Kontraktionskraft steigt nach dem Frank-Starling-Mechanismus an, bis man einen Maximalwert (=L_{max}) erreicht hat⁵. Die elektrische Stimulation erfolgt über einen mit beiden Nadeln verbundenen Stimulator.

2.4.2 Versuchsbeginn

Nach erfolgter Präparation werden die Trabekel unter Mikroskop-Sicht mit zwei Pinzetten möglichst atraumatisch und ungedehnt in die Streifenanlage eingehängt. Zuvor muss noch die BDM-Tyrode aus den Trabekeln ausgewaschen werden. Dies geschieht beim ersten Setup, indem man von den anfangs enthaltenen 90 ml Tyrode die ersten 40 ml ablässt und sie aus dem Kreislauf entfernt. Anschließend hat man 50 ml Volumen im System. Da diese Möglichkeit beim zweiten Setup nicht besteht, werden die Trabekel in drei verschiedenen, mit Tyrode gefüllten Plastikbechern ausgewaschen. Überführt werden die Trabekel dabei stets mit einer Plastikpipette.

Nach dem Einhängen werden die jeweiligen Computerprogramme gestartet und kalibriert, danach kann mit der Aufzeichnung begonnen werden. Bevor mit der Stimulation begonnen wird, muss eine physiologische Ca²⁺-Konzentration aufgebaut werden. Dazu wird im ersten Schritt durch Zugabe von 1 Mol Ca²⁺ zuerst die Calciumkonzentration von 0,2 auf 1,2 mmol/l gesteigert. Danach wartet man ungefähr fünf Minuten bis sich die Trabekel an die erhöhte Calciumkonzentration gewöhnt haben und es kann vorsichtig mit der Stimulation begonnen werden. Nun kann die Konzentration in einem weiteren Schritt auf 2,5 mmol/l erhöht werden. Um bei Setup 2 eine überschießende Reaktion auf den ersten Calcium-Schritt zu vermeiden, teilt man diesen hier in drei separate Schritte, da das Calcium hier durch das nicht vorhandene Kreislaufsystem schneller anflutet.

Die zu Beginn verwendete Stimulationsfrequenz war bei allen Experimenten 1 Hz, dies wurde außer bei Experimenten für die Kraft-Frequenz Beziehung auch so

belassen. Die Stimulationsspannung wurde bei einer Impulsdauer von 5 ms zumeist zwischen 3 und 6 mV eingestellt. Die benötigte Spannung kann von Trabekel zu Trabekel variieren. Man erhöht sie in der Regel so weit, bis man eine schöne, unausgebeulte Kontraktion (Twitch) sieht und sich die Kontraktionskraft durch weiteres Erhöhen der Spannung nicht mehr wesentlich verändert.

Ist alles richtig eingestellt, kann mit der vorsichtigen Dehnung der Trabekel bis zum Erreichen von L_{max} begonnen werden. Hierbei orientiert man sich daran, wie stark die diastolische Spannung durch die Dehnung ansteigt. Dies sollte nicht mehr als ein Drittel betragen, um Dehnungstraumen der Trabekel zu vermeiden. Nach Erreichen von L_{max} kann mit dem eigentlichen Versuchsprotokoll begonnen werden.

2.4.3 Einfrieren und Lagern der Präparate

Nach dem Experiment werden die Trabekel entnommen und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte, beschriftete Eppendorf Cryotubes überführt. Das verschlossene Röhrchen wird anschließend direkt in einen mit Flüssig-Stickstoff bereitstehenden Behälter gegeben und zur Langzeitlagerung in einem Kühlschrank (-80°C) des ZMF Graz untergebracht.

2.5 Substanzen

2.5.1 Flecainid

Für die Flecainid-Experimente wurden „Aristocor“-Ampullen von der kardiologischen Intensivstation des Uniklinikum Graz verwendet. Diese enthalten 10 mg/ml Flecainidacetat, eine Ampulle enthält jeweils 15 ml. Mittels dieser Ampullen wurde mit Aqua dest. zuerst eine Stammlösung angesetzt, die 10^{-2} mol/l Flecainid enthielt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit den jeweils benötigten Konzentrationen 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} mol/l Flecainid hergestellt.

2.5.2 Amiodaron

Für die Amiodaron-Experimente wurde auf „Sedacoron“-Ampullen von der kardiologischen Station des Uniklinikum Graz zurückgegriffen. Diese Ampullen

enthalten Amiodaronhydrochlorid in der Konzentration 50 mg/ml in jeweils 3 ml blassgelber Flüssigkeit. Auch hier wurde durch Zugabe von Tyrode eine Stammlösung hergestellt, die 10^{-2} Amiodaron enthielt und anschließend eine Verdünnungsreihe analog zu Flecainid hergestellt.

2.5.3 Amiodaron-Lösungsmittel

Da Amiodaron stark lipophile Stoffeigenschaften besitzt, ist das alleinige Lösen in Aqua dest. oder Tyrode nicht möglich. Deshalb liegt es in den zuvor genannten „Sedacoron“-Ampullen auch gelöst in 20mg/ml Benzylalkohol und 10% „Tween 80“ (Polysorbat 80) vor.

Um mögliche kardiotoxische Effekte, die durch das Lösungsmittel verursacht werden, zu erkennen bzw. untersuchen zu können, wurde für die Amiodaron-Versuchsreihe auch ein Gemisch aus 2% Benzylalkohol, 10% „Tween 80“ und 88% Aqua dest. hergestellt. Anschließend wurde analog zu Flecainid und Amiodaron wiederum eine Verdünnungsreihe mit den benötigten Konzentrationen hergestellt.

2.6 Versuchsprotokolle

2.6.1 Flecainid-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Mit dieser Versuchsreihe sollte die Konzentrations-Wirkungskurve im Hinblick auf Kontraktionskraft von Flecainid auf das humane atriale Myokard untersucht werden. Nach den in Kapitel 2.4.2 erwähnten Vorbereitungen und Erreichen eines steady state, kann mit der kumulativen Steigerung der Flecainid-Konzentration begonnen werden. Die gewählten Schritte waren 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , $3 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} und 10^{-4} mol/l. Nach jeder Steigerung der Konzentration wurde gewartet, bis sich wiederum ein steady state einstellt. Diese Zeit betrug zwischen 10 und 15 Minuten. Zu den Kontrolltrabekeln wurde jeweils Aqua dest. in der selben Menge hinzugegeben. Pro Versuch wurden immer 1-2 Interventions- bzw. 1-2 Kontrolltrabekel aus demselben Herzohr untersucht.

Insgesamt wurden für die Ermittlung der Konzentrations-Wirkungskurve 13 Trabekel und 9 Kontrolltrabekel aus 9 Herzen untersucht.

2.6.2 Amiodaron-Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Analog zu Flecainid wurde auch die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Amiodaron ermittelt.

Die hier gewählten Konzentrationen waren 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} und 10^{-3} mol/l. Die Zeit zwischen den einzelnen Schritten betrug ebenfalls 10 bis 15 Minuten. Da Amiodaron aufgrund seiner Lipophilie gelöst in einem Gemisch mit Benzylalkohol und „Tween 80“ vorliegt, wurden die Kontrolltrabekel hier mit dem hergestellten Lösungsmittel behandelt, um dadurch vermittelte Effekte identifizieren zu können. Insgesamt wurden für diese Versuchsreihe 8 Trabekel mit Amiodaron und 6 Kontrolltrabekel mit dem Lösungsmittel aus 4 Herzen untersucht.

2.6.3 Einfluss von Flecainid auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Um den Einfluss von Flecainid auf die Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz zu ermitteln, wurden Trabekel nach Erreichen des steady state einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid im Organbad ausgesetzt. Die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l wurde gewählt, weil in einer anderen Arbeit, in der ventrikuläres Myokard untersucht wurde, diese Konzentration als Konzentration mit halbmaximaler Wirkung ermittelt wurde⁶. Dadurch ist auch eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben.

Nach Zugabe von Flecainid wurde 15 Minuten gewartet, bis sich der Effekt stabilisiert hatte und es wurde die Stimulationsfrequenz von 1,0 auf 1,5 – 2,0 – 2,5 und 3 Hz gesteigert. Auch hier wurde zwischen den Frequenzerhöhungen ein steady state abgewartet. Die dafür nötige Zeit war jeweils 5 Minuten. Nach Erreichen der 3 Hz wurde die Stimulationsfrequenz wieder auf 1 Hz gesenkt um die Reversibilität der Effekte beobachten zu können bzw. ob und wie sehr die Trabekel durch die hochfrequente Stimulation in Mitleidenschaft gezogen wurden.

Insgesamt wurde für dieses Protokoll 8 Flecainid-Trabekel und 6 Kontrolltrabekel aus 3 Herzen untersucht.

2.6.4 Einfluss von Amiodaron auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Um den Einfluss von Amiodaron und des Lösungsmittels auf die Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz zu ermitteln, wurden die Trabekel

einer Konzentration von 10^{-4} mol/l Amiodaron bzw. der Äquivalenzdosis an Lösungsmittel ausgesetzt. Die Konzentration von 10^{-4} mol/l Amiodaron wurde gewählt, da sie dem therapeutisch wirksamen Plasmaspiegel entspricht, wie er als Gewebespiegel im Myokard nachgewiesen werden kann⁷.

Danach wurde 15 Minuten gewartet und die Steigerung der Stimulationsfrequenz analog zum in 2.5.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Insgesamt wurden hierfür 6 mit Amiodaron behandelte und 5 mit dem Lösungsmittel behandelte Trabekel aus 4 Herzen untersucht.

2.7 Patientendaten

Die folgenden Tabellen liefern eine Übersicht über die Patientendemographie der einzelnen Versuchsreihen. Die erfassten Parameter dabei waren Geschlecht (m/w), Alter (Jahre \pm SD), Rhythmus (Sinusrhythmus oder VHFA), Operation (CABG, AKE, CABG + AKE oder AAE) und die Ejektionsfraktion (EF in % \pm SD). Außerdem wurden folgende Medikamentengruppen erfasst: Acetylsalicylsäure (T-ASS), β -Blocker, ACE-Hemmer, Angiotensinrezeptor-Blocker (ARB), Angiotensin- + Neprilysinrezeptorblocker (ARB/Nep), Diuretika, Aldosteron-Antagonisten (Aldosteron-Anta.), Calcium-Blocker (Calcium-Anta.), Alpha-Blocker und Antiarrhythmika.

Flecainid KWK, N=9			
Geschlecht [w/m]	0,22/0,78	Medikation:	
Alter [Jahre]	63,22 \pm 12,4	T-ASS	56 %
Sinusrhythmus [%]	89 %	β -Blocker	44 %
VHFA [%]	11 %	ACE-Hemmer	44 %
CABG [%]	44 %	Diuretika	22 %
AKE [%]	22 %	Aldosteron-Anta.	11 %
AAE [%]	33 %	Calcium-Anta.	22 %
EF [%]	55,0 \pm 6,22 %	Alpha-Blocker	44 %

Tabelle 2: Patientendemographie der Experimente zur Flecainid-KWK

Amiodaron KWK, N=4			
Geschlecht [w/m]	0,25/0,75	Medikation:	
Alter [Jahre]	67,25 ± 8,02	T-ASS	100 %
Sinusrhythmus [%]	100 %	β-Blocker	100%
CABG [%]	75 %	ACE-Hemmer	50%
AKE [%]	25 %		
EF [%]	52,63 ± 4,75 %		

Tabelle 3: Patientendemographie der Experimente zur Amiodaron-KWK

Flecainid KFB, N=3			
Geschlecht [w/m]	0,00/1,00	Medikation:	
Alter [Jahre]	69 ± 5,29	T-ASS	66 %
Sinusrhythmus [%]	100	β-Blocker	33 %
CABG [%]	33	ACE-Hemmer	66 %
CABG + AKE [%]	66	ARB	33 %
EF [%]	50,8 ± 2,89 %	Diuretika	66 %

Tabelle 4: Patientendemographie der Experimente zur Flecainid-KFB

Amiodaron KFB, N=4			
Geschlecht [w/m]	0,50/0,50	Medikation:	
Alter [Jahre]	66 ± 9,42	T-ASS	50 %
Sinusrhythmus [%]	100 %	β-Blocker	50 %
CABG [%]	50 %	ACE	25 %
AKE [%]	50 %	ARB/Nep	25 %
EF [%]	49,4 ± 17,37 %	Diuretika	25 %
		Aldosteron-Anta.	25 %

Tabelle 5: Patientendemographie der Experimente zur Amiodaron-KFB

2.8 Auswertung

Die erhobenen Daten wurden beim ersten Setup mit LabView anhand eines Mittelwertes von fünf aufeinanderfolgenden Kontraktionen zu den jeweiligen Messzeiten erfasst. Bei den mit LabChart erhobenen Daten wurde zu den Messzeitpunkten ein Zeitraum von 30 bis 120 Kontraktionen mit stabilen Verhältnissen gewählt und daraus ein Mittelwert berechnet.

2.8.1 Untersuchte Parameter

Bei den durchgeführten Experimenten wurden folgende Parameter untersucht:

- | | | |
|-------------------------|------|--|
| - Entwickelte Kraft | (mN) | Amplitude der isometrischen Kontraktion |
| - Diastolische Spannung | (mN) | Ruhekraft/-spannung des Trabekels |
| - RT50 | (ms) | Zeit vom Zeitpunkt der maximal entwickelten Kraft bis zur 50%igen Relaxation |
| - RT90 | (ms) | Zeit vom Zeitpunkt der maximal entwickelten Kraft bis zur 90%igen Relaxation |

Die gemessenen Kraftdaten wurden auf die Querschnittsfläche der Trabekel normiert (mN/mm^2). Die systolische Kraft und die diastolische Spannung wurden anschließend zur besseren Vergleichbarkeit unterschiedlich starker Trabekel in % des Ausgangswertes (Agw) angegeben. Der hier definierte Ausgangswert war hier der Messzeitpunkt nachdem L_{max} erreicht wurde, kurz bevor die jeweilige Substanz erstmalig hinzugefügt wurde.

2.8.2 Statistische Auswertung

Zur statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse wurden two-way repeated measures ANOVA-Tests durchgeführt. Verwendet wurden Sidak's multiple comparisons test zum Vergleich zwischen den Versuchsgruppen (gekennzeichnet mit #) und Dunnett's multiple comparisons test zum Vergleich zwischen der Interventionsgruppe und der Baseline (BL) (gekennzeichnet mit *).

Signifikante Ergebnisse wurden bei Werten $p < 0,05$ angenommen und sind in den Diagrammen mit einem * bzw. einer # gekennzeichnet. Zusätzlich wurde $p < 0,01$ mit **/##, $p < 0,001$ mit ***/### und $p < 0,0001$ mit ****/#### gekennzeichnet um hochsignifikante Ergebnisse deutlicher hervorzuheben.

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) bzw. grafisch mit Fehlerbalken angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Flecainid Konzentration-Wirkungs-Kurve (KWK)

Die KWK für Flecainid wurde nach dem im Methodenteil erläuterten Protokoll durchgeführt. Der untersuchte Konzentrationsbereich lag zwischen 10^{-8} und 10^{-4} mol/l Flecainid bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz. Die Werte sind in Prozent des Ausgangswertes (Agw) angegeben.

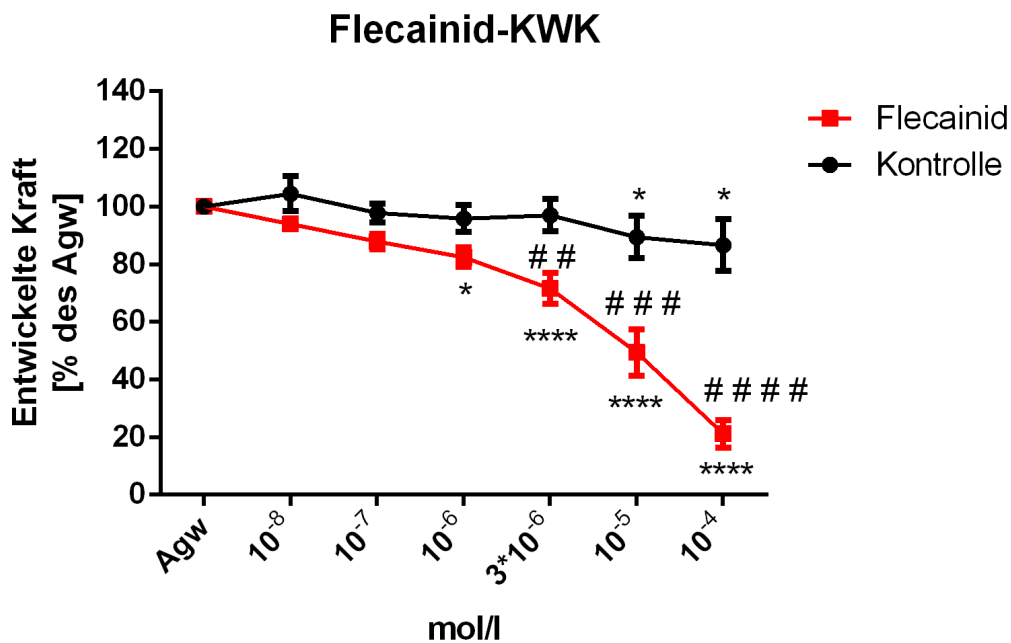


Abbildung 10: KWK von Flecainid, konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktionskraft der Flecainid-Trabekel (rot, n=13) im Vergleich zu einer leichten linearen Abnahme bei den Kontroll-Trabekeln (schwarz, n=9) in Prozent des Ausgangswertes (% Agw \pm SEM). ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$; ####: $P < 0,0001$ zur Kontrollgruppe. *: $p < 0,05$; ****: $P < 0,0001$ zum Ausgangswert (Agw).

Abbildung 10 zeigt einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Effekt von Flecainid. Der Effekt ist ab einer Konzentration von 3×10^{-6} signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe und steigert sich weiter mit Zunahme der Konzentration. Insgesamt nahm die Kraft auf $21,16 \pm 4,85$ % des Ausgangswertes ab.

Die leichte kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft der Kontroll-Trabekel lassen sich auf den Versuchsaufbau-bedingten Leistungsverlust („Rounddown“) von Herzmuskeltrabekel nach Erreichen von L_{max} zurückführen. Hier betrug die Kontraktionskraft beim letzten Messpunkt aber immer noch $86,68 \pm 9,02$ % des Ausgangswertes.

3.1.1 Diastolische Spannung unter Flecainid

Der hier in Abbildung 11 gezeigte Verlauf der diastolischen Spannung wird auch durch Zunahme der Flecainid-Konzentration nicht wesentlich beeinflusst. Lediglich bei 10^{-4} mol/l zeichnet sich ein leichter Wiederanstieg der Spannung im Vergleich zu den etwas niedrigeren Werten davor ab. Alle Veränderungen erreichen aber nicht das Signifikanzniveau.

Bei den Kontroll-Trabekeln nimmt die Spannung tendenziell etwas ab (ebenso n.s.).

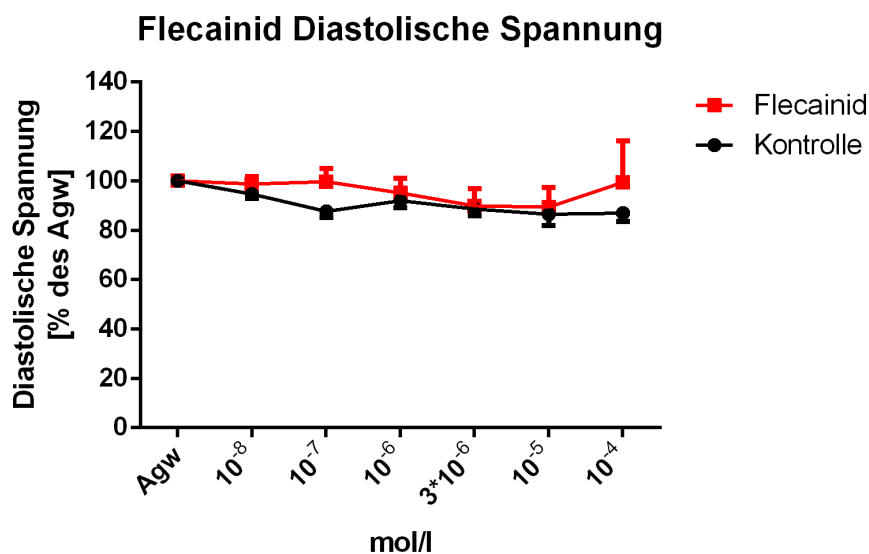


Abbildung 11: Diastolische Spannung (% Agw \pm SEM) bei Zunahme der Flecainid-Konzentration der Interventionstrabekel (rot) und der Kontroll-Trabekel (schwarz), insgesamt keine signifikanten Veränderungen.

3.1.2 Zeitparameter der isometrischen Relaxation unter Flecainid

Der in Abbildung 12 und 13 gezeigte konzentrationsabhängige Einfluss von Flecainid auf die Zeitparameter der isometrischen Kontraktion ist hier in Millisekunden (ms) angegeben. Unter Flecainid treten keine signifikanten Veränderungen auf. Allenfalls etwas ähnliche Anstiegstendenzen, wie bei der diastolischen Kraft oben beschrieben, sind sichtbar.

Bei den Kontroll-Trabekeln bleiben die RT50 und RT90 weitgehend konstant.

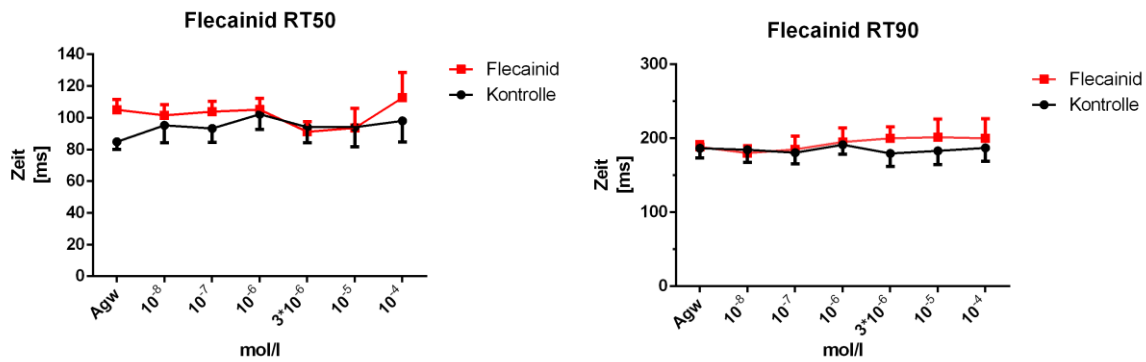


Abbildung 12: Zeitparameter der Relaxation RT50 (ms \pm SEM) bei Zunahme der Flecainid-Konzentration (links), kein wesentlicher Effekt.

Abbildung 13: Zeitparameter der Relaxation RT90 (ms \pm SEM) bei Zunahme der Flecainid-Konzentration (rechts), kein wesentlicher Effekt.

3.2 Amiodaron Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Die KWK für Amiodaron (Abbildung 14) wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll durchgeführt. Der untersuchte Konzentrationsbereich war von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/l Amiodaron bzw. der Äquivalenzdosis an Lösungsmittel, die kumulativ appliziert wurde. Dadurch konnten die inotropen Effekte von Amiodaron und jene, die auf das Lösungsmittel zurückzuführen sind diskriminativ identifiziert werden.

Wie Abbildung 14 zeigt, kam es zu einem deutlichen negativ inotropen Effekt, sowohl unter Einfluss von Amiodaron als auch unter Applikation des Lösungsmittels. Bei der maximalen Konzentration von 10^{-3} mol/l reduziert sich die entwickelte Kraft von Amiodaron auf $26,14 \pm 5,14$ % und vom Lösungsmittel auf $18,50 \pm 8,55$ %. Die Werte sind wieder in Abhängigkeit vom Ausgangswert angegeben. Der Effekt ist konzentrationsabhängig und unterscheidet sich bei Amiodaron ab 10^{-5} mol/l und bei dem Lösungsmittel ab 10^{-4} mol/l signifikant vom Ausgangswert. Die Kurven verlaufen im mittleren Bereich divergent voneinander mit eindeutig stärkerer Kraftabnahme in der Amiodaron-Gruppe, was bei der Konzentration 10^{-5} mol/l das Signifikanzniveau erreicht. In diesem Konzentrationsbereich lässt sich also ein substanzspezifischer negativ inotroper Effekt von Amiodaron (über den des Lösungsmittels hinaus) nachweisen.

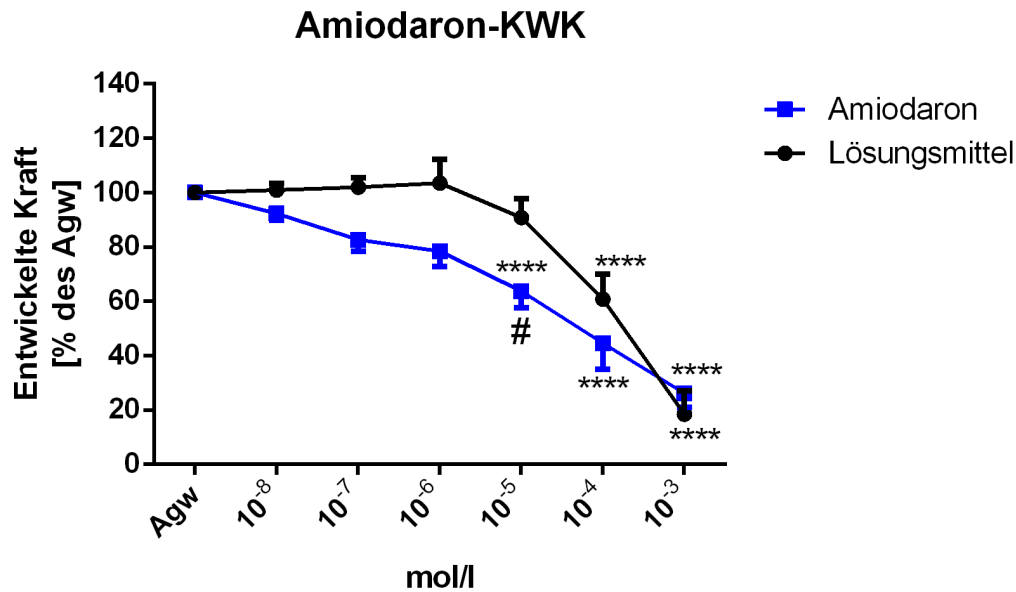


Abbildung 14: KWK von Amiodaron (blau, n=8) und des Lösungsmittels (schwarz, n=6), konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent des Ausgangswertes (% Agw ± SEM) in beiden Gruppen. #: p<0,05 zwischen den Gruppen. ****: p<0,0001 zum Ausgangswert.

3.2.1 Diastolische Spannung unter Amiodaron

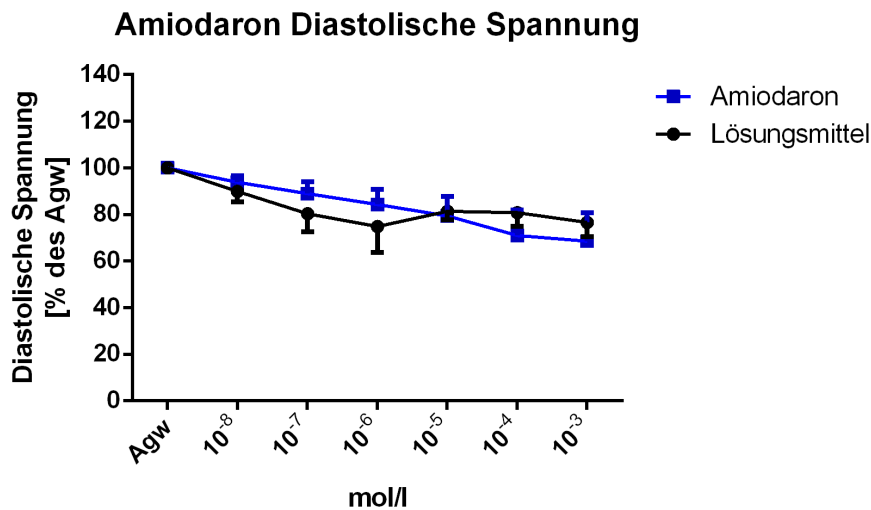


Abbildung 15: Diastolische Spannung (% Agw ± SEM) bei Zunahme der Amiodaron- (blau) und Lösungsmittel-Konzentration (schwarz), leichte Abnahme der Spannung in beiden Gruppen (n.s.).

Die diastolische Spannung (Abbildung 15) zeigt unter Amiodaron und dem Lösungsmittel einen sehr ähnlichen Verlauf. Die Spannung nimmt im Verlauf des Experiments in beiden Kurven etwas ab, die Abnahme ist jedoch nicht signifikant. Für Amiodaron beträgt die Spannung bei 10^{-3} mol/l $68,50 \pm 12,28$ % und für das Lösungsmittel $76,60 \pm 6,02$ % des Ausgangswertes.

3.2.2 Zeitparameter der isometrischen Relaxation unter Amiodaron

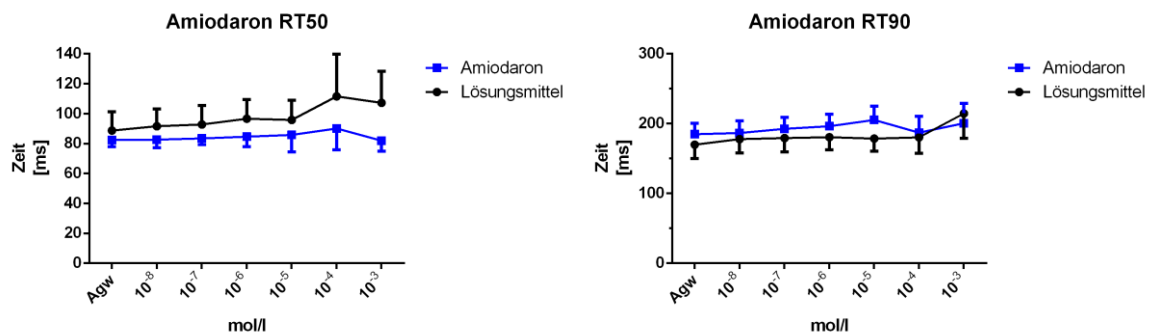


Abbildung 16: Zeitparameter der Relaxation RT50 (ms \pm SEM) bei Zunahme der Amiodaron- bzw. Lösungsmittel-Konzentration (links), kein signifikanter Effekt.

Abbildung 17: Zeitparameter der Relaxation RT90 (ms \pm SEM) bei Zunahme der Amiodaron- bzw. Lösungsmittel-Konzentration (rechts), leichter Anstieg der RT90 bei 10^{-3} mol/l (n.s.).

Die in Abbildung 16 und 17 dargestellten Relaxationszeiten RT50 und RT90 ändern sich auch bei steigender Amiodaron-Konzentration nicht wesentlich bzw. es ist keine eindeutige Tendenz in eine Richtung erkennbar.

Dasselbe trifft zu für die Trabekel, die mit Lösungsmittel behandelt wurden. Zwar sieht man hier einen leichten Anstieg der RT90 bei 10^{-3} mol/l, dieser ist jedoch nicht signifikant. Die RT50 bleibt auch bei dieser Konzentration weitgehend unverändert.

3.3 Flecainid Kraft-Frequenz Beziehung

Die Kraft-Frequenz-Beziehung für Flecainid wurde mit der Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid ermittelt. Als Kontrollen dienten wiederum Trabekel, die der gleichen Äquivalenzmenge an Aqua dest. ausgesetzt waren, wie bei der entsprechenden Flecainid-Konzentration erforderlich wäre.

Der untersuchte Frequenzbereich war 1 Hz bis 3 Hz bzw. 60 bis 180 bpm. Wie im Methodenteil erläutert wurde erst die Substanz hinzugegeben und nach 15 Minuten Wartezeit die Stimulationsfrequenz in 5-Minuten-Schritten immer um jeweils ein halbes Hz erhöht.

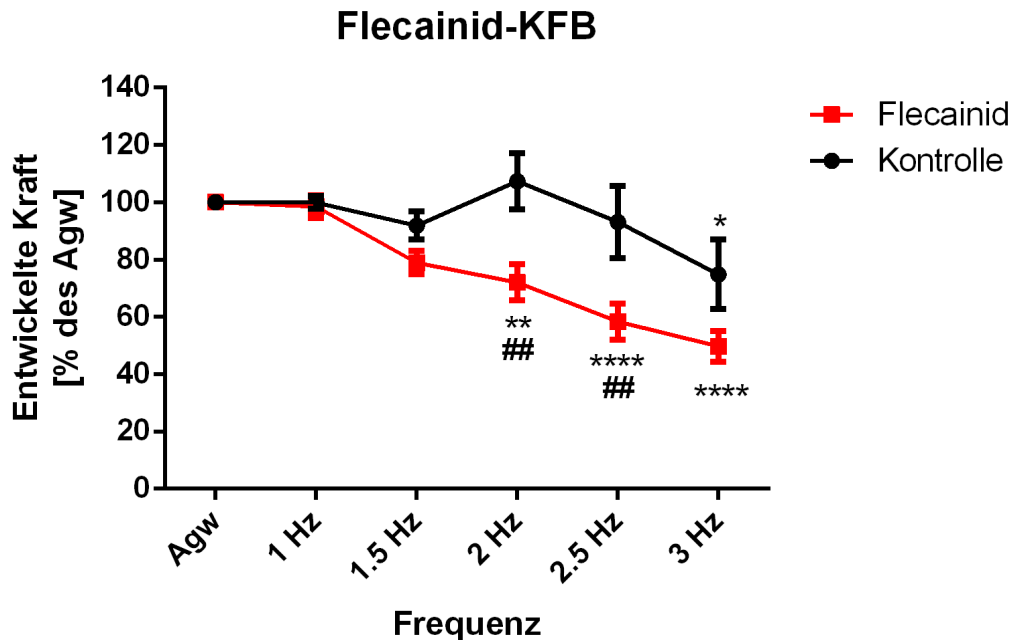


Abbildung 18: Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung von Flecainid (rot, n=8) für die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l in Prozent des Ausgangswertes (% Agw \pm SEM); die Kontroll-Trabekel (schwarz, n=6) zeigen eine dezent positive KFB, während sie unter Flecainid durchgehend negativ wird. ##: $p < 0,01$ zur Kontrollgruppe. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ zum Agw.

Wie in Abbildung 18 ersichtlich haben die Kontroll-Trabekel ihre Optimumfrequenz bei 2 Hz, mit einem dezenten durchschnittlichen Kraftanstieg auf $107,41 \pm 9,81$ % im Vergleich zum Ausgangswert bei 1 Hz. Danach nimmt die Kraft graduell ab und erreicht bei 3 Hz ihr Minimum mit $74,90 \pm 12,11$ %.

Unter Flecainid ändert sich die KFB signifikant. Die entwickelte Kraft nimmt kontinuierlich mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz ab und erreicht ihr Minimum bei 3 Hz mit $49,77 \pm 5,33$ % im Vergleich zum Ausgangswert. Die Unterschiede sind ab 2 Hz sowohl im Vergleich zu den Kontroll-Trabekeln als auch zum Ausgangswert signifikant.

3.3.1 Diastolische Spannung während der Flecainid-KFB

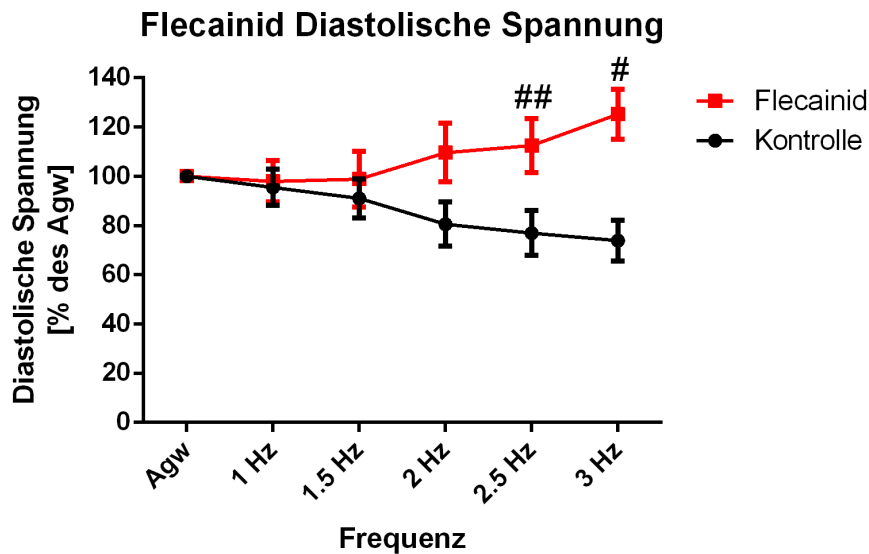


Abbildung 19: Verlauf der diastolischen Spannung (% Agw \pm SEM) während der KFB für die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid, die mit Flecainid behandelten Trabekel (rot) zeigen eine signifikante Zunahme der diastolischen Spannung im Vergleich zu den Kontroll-Trabekeln (schwarz) wo sie leicht abnimmt. #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$ zur Kontrollgruppe.

Auch die diastolische Spannung zeigt einen signifikant unterschiedlichen Verlauf zwischen Kontroll- und Flecainid-Trabekeln, wie hier in Abbildung 19 ersichtlich. Während die diastolische Spannung bei den Kontroll-Trabekeln abfällt und ein Minimum bei 3 Hz erreicht mit $74,93 \pm 9,49$ %, steigt sie bei den Flecainid-Trabekeln an und erreicht ihr Maximum bei 3 Hz ($125,23 \pm 10,08$ % des Agw).

3.3.2 Zeitparameter der isometrischen Relaxation während der Flecainid-KFB

Die Zeitparameter der isometrischen Relaxation RT50 und RT90 verkürzen sich in beiden Gruppen bei steigender Stimulationsfrequenz sowohl für die Kontroll- als auch für die Flecainid-Trabekel gleichermaßen (Abbildung 20 und 21). Die Werte der behandelten Gruppe liegen für beide Zeitparameter tendenziell höher als die der Kontrollgruppe (n.s.).

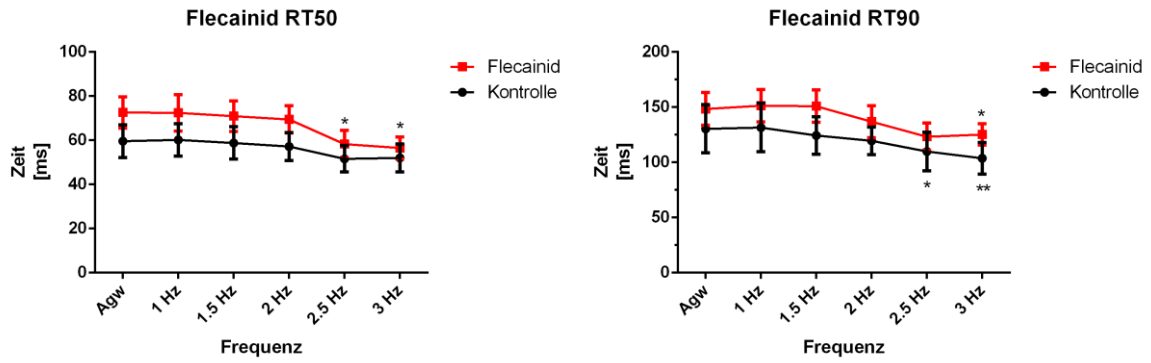


Abbildung 20: Verlauf der RT50 (ms ± SEM) während der KFB für die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid (links), es zeigt sich eine Verkürzung der Relaxationszeiten ab 2,5 Hz. *: $p < 0,05$ zum Agw.

Abbildung 21: Verlauf der RT90 (ms ± SEM) während der KFB für die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid (rechts), es zeigt sich eine Verkürzung der Relaxationszeiten ab 2,5 Hz. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ zum Agw.

3.3.3 Frequenzabhängigkeit der Flecainid-Effekte

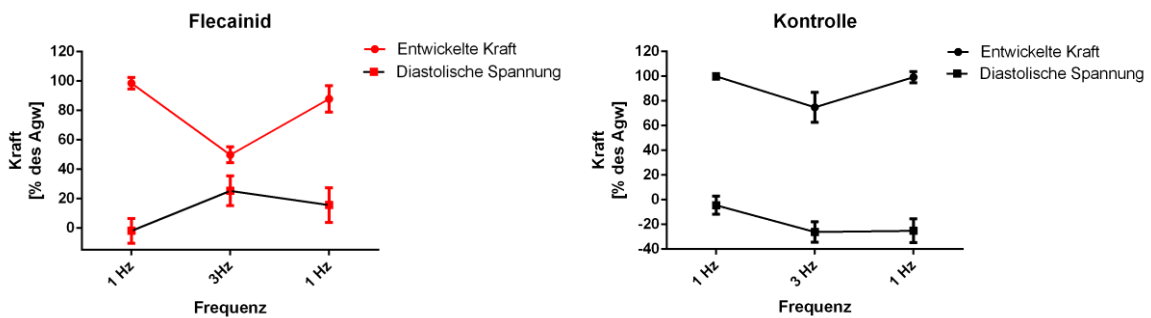


Abbildung 22: Effekte von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid vor, während und nach der KFB (rot), die reduzierte Kraft bei 3 Hz baut sich nach Umstellen auf 1 Hz fast wieder auf ihren Ausgangswert bei 1 Hz auf und die erhöhte diastolische Spannung nimmt auch wieder ab.

Abbildung 23: Effekte der KFB auf die Kontroll-Trabekel (schwarz) vor, während und nach der Durchführung, die reduzierte Kraft bei 3 Hz baut sich wieder auf ihr Niveau bei 1 Hz auf, die reduzierte diastolische Spannung bleibt aber auch nach der Intervention bestehen.

Nach Erreichen von 3 Hz wurde die Stimulationsfrequenz wieder auf 1 Hz reduziert, um zu prüfen, inwieweit die Effekte von Flecainid nur zeitabhängig oder tatsächlich frequenzabhängig waren. Es zeigt sich durch das Umstellen auf die Ausgangsfrequenz eine Reversibilität der Effekte und somit der Nachweis einer eindeutigen frequenzabhängigen Wirkung (Abbildung 22).

In der Kontrollgruppe erreichen die Trabekel mit einer Kraft von $99,30 \pm 4,53$ % wieder ihr ursprüngliches Niveau bei 1 Hz. Die diastolische Spannung blieb reduziert bei $74,93 \pm 9,49$ %.

In der Flecainid-Gruppe sind die Effekte ebenfalls größtenteils reversibel und die Trabekel erreichen wieder eine Kraft von $87,91 \pm 8,98$ % im Vergleich zu den $49,77 \pm 5,33$ % bei 3 Hz. Die aufgebaute diastolische Spannung nimmt auch wieder etwas ab auf $115,52 \pm 11,77$ %.

3.4 Amiodaron Kraft-Frequenz Beziehung

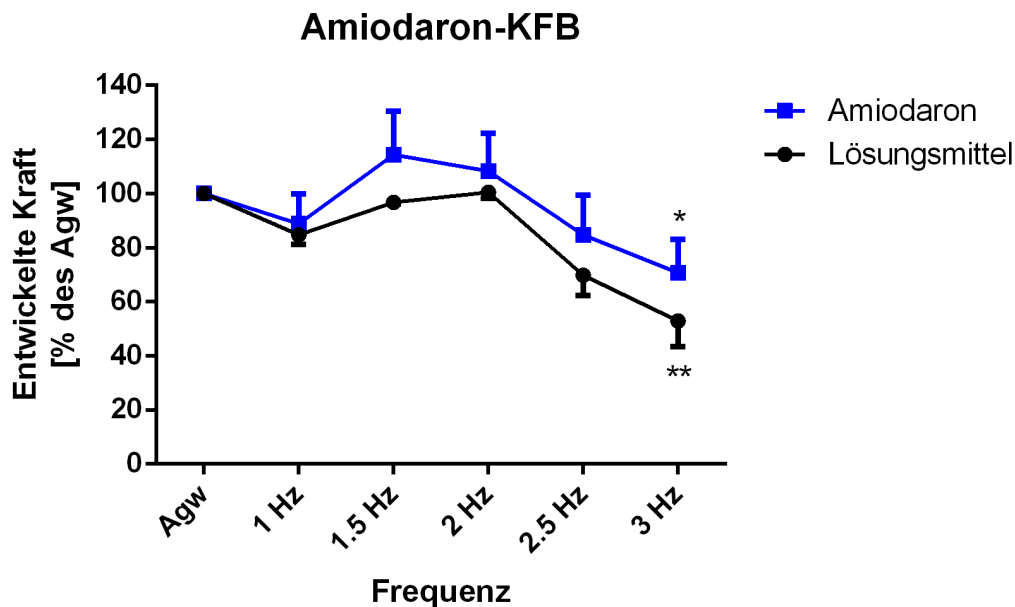


Abbildung 24: Verlauf der KFB für Amiodaron (blau, n=6) und das Lösungsmittel (schwarz, n=5) für die Konzentration 10^{-4} mol/l, beide Gruppen zeigen eine positive KFB, eine Kraftabnahme tritt erst ab 2,5 Hz auf. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ zum Agw.

Die mit einer Konzentration von 10^{-4} mol/l ermittelte KFB ändert sich zwischen Amiodaron und dem Lösungsmittel nicht signifikant (Abbildung 24). Beide Kurven zeigen einen erst positiven Kraftverlauf, der dann erst mit höheren Frequenzen von 2,5 und 3 Hz abnimmt.

Unter Amiodaron hatten die Trabekel ihre Optimumfrequenz bei 1,5 Hz mit einem Maximum von $114,41 \pm 16,06$ % im Vergleich zum Ausgangswert und nahmen anschließend auf ein Minimum von $70,78 \pm 12,27$ bei 3 Hz ab.

Für die nur mit Lösungsmittel behandelten Kontroll-Trabekel zeigte sich nach einem initialen Abfall auf $84,77 \pm 3,50$ % bei 1 Hz, ihr Maximum bei 2 Hz mit $100,55 \pm 2,55$ % im Vergleich zum Ausgangswert. Ihr Minimum hatten sie ebenfalls bei 3 Hz mit $52,96 \pm 9,58$ %.

3.4.1 Diastolische Spannung während der Amiodaron-KFB

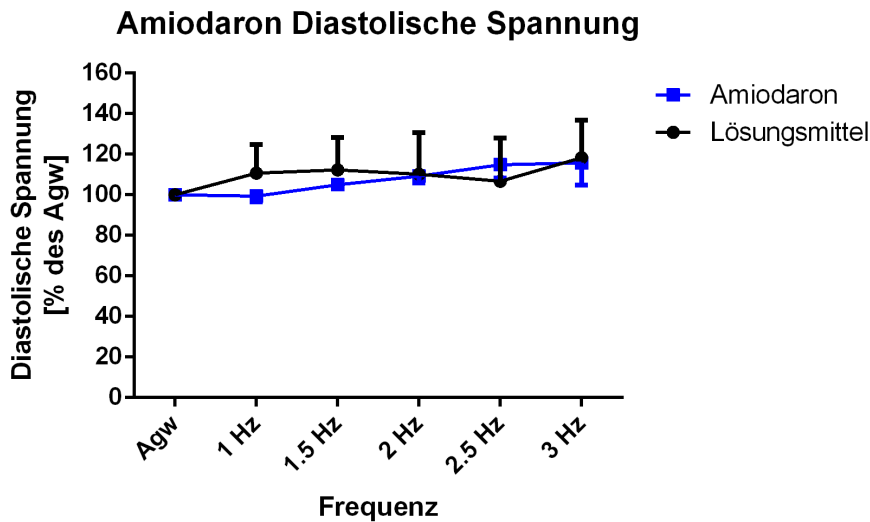


Abbildung 25: Verlauf der diastolischen Spannung (% Agw \pm SEM) während der KFB für die Konzentration 10^{-4} mol/l Amiodaron bzw. dem Lösungsmittel-Äquivalent, die Spannung nimmt in beiden Gruppen kontinuierlich etwas zu (n.s.).

Für die diastolische Spannung zeigen die Amiodaron- und Lösungsmitteltrabekel einen ähnlichen Verlauf und verzeichnen als Tendenz eine leichte kontinuierliche Zunahme auf maximal $115,77 \pm 10,88$ % für Amiodaron und $118,35 \pm 18,51$ % für das Lösungsmittel bei 3 Hz (Abbildung 25).

3.4.2 Zeitparameter der isometrischen Relaxation während der Amiodaron-KFB

Die hier für Amiodaron und das Lösungsmittel dargestellten Zeitparameter der isometrischen Kontraktion (Abbildung 26 und 27) RT50 und RT90, bleiben auch bei steigender Stimulationsfrequenz weitgehend konstant. Lediglich bei 3 Hz zeigt sich eine Verkürzung der RT90 in beiden Gruppen. Insgesamt ähneln die Effekte jenen aus der Flecainid- bzw. Kontrollgruppe (Kapitel 3.3.2).

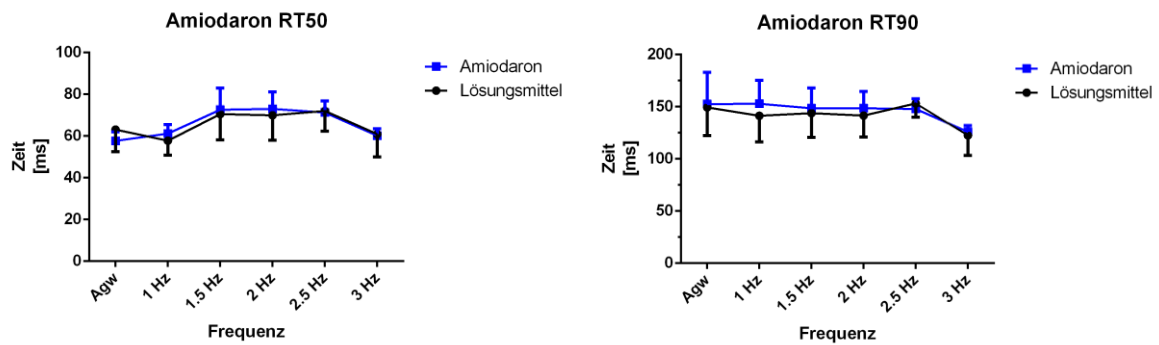


Abbildung 26: Verlauf der RT50 (ms ± SEM) während der KFB für die Konzentration 10^{-4} mol/l Amiodaron bzw. Lösungsmittel (links), kein wesentlicher Effekt.

Abbildung 27: Verlauf der RT90 (ms ± SEM) während der KFB für die Konzentration 10^{-4} mol/l Amiodaron bzw. Lösungsmittel (rechts), es zeigt sich eine Verkürzung der RT90 bei 3 Hz (n.s.).

3.4.3 Frequenzabhängigkeit der Amiodaron-/Lösungsmittel-Effekte

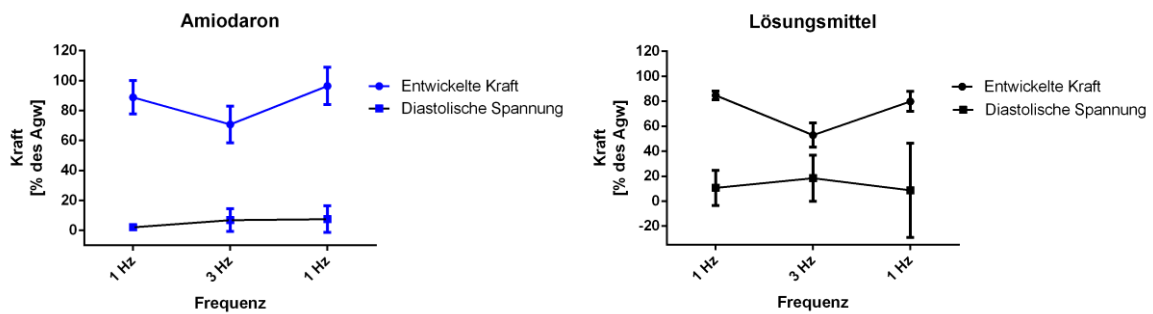


Abbildung 28: Effekte von 10^{-4} mol/l Amiodaron vor, während und nach der KFB (blau), die reduzierte Kraft bei 3 Hz baut sich nach der Intervention hier sogar stärker wieder auf als ihr ursprüngliches Niveau bei 1 Hz war, die erhöhte diastolische Spannung bleibt jedoch auch bei 1 Hz ungefähr auf diesem Niveau.

Abbildung 29: Effekte des Lösungsmitteläquivalents von 10^{-4} mol/l Amiodaron vor, während und nach der KFB (schwarz), die reduzierte Kraft bei 3 Hz baut sich wieder fast auf ihr ursprüngliches Niveau bei 1 Hz auf, die leicht erhöhte diastolische Spannung geht nach der Intervention wieder zurück.

Auch hier wurde die Stimulationsfrequenz nach Erreichen der 3 Hz wieder auf 1 Hz gesenkt, um die dabei auftretenden Effekte messen zu können.

In der Amiodaron-Gruppe erreichen die Trabekel mit einer Kraft von $96,46 \pm 12,41$ % sogar mehr, als ihr ursprüngliches Niveau bei 1 Hz von $88,82 \pm 11,15$ %. Dies kennzeichnet die Kraftabnahme als rein frequenzbedingt. Die diastolische Spannung hingegen reagiert nicht rein frequenzabhängig, sondern steigt weiter etwas an, was für einen zeitabhängigen Effekt von Amiodaron auf die diastolische Spannung spricht.

In der Lösungsmittel-Gruppe sind die Effekte sowohl für die Kontraktionskraft als auch für die diastolische Spannung größtenteils reversibel. Die Trabekel erreichen nach Frequenzumstellung wieder eine Kraft auf ähnlichem Niveau, wie bei der Ausgangsfrequenz bei 1 Hz. Auch die aufgebaute diastolische Spannung nimmt nach ihrem Anstieg bei 3 Hz wieder ab.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten erstmalig die Effekte von Flecainid und Amiodaron an humanen atrialen multizellulären Herzmuskelstreifen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Flecainid einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Effekt vermittelt und die Kraft-Frequenz-Beziehung (KFB) des Herzens ebenfalls ins Negative verändert. Amiodaron und sein Lösungsmittel zeigten ebenfalls einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Effekt, wobei in hohen Konzentrationen das Lösungsmittel selbst die stärksten Effekte hat. Die KFB wurde sowohl in der Amiodaron- als auch in der Lösungsmittel-Gruppe nicht wesentlich verändert.

4.1 Inotrope Effekte und Wirkmechanismus von Flecainid

In den durchgeführten Experimenten konnte für Flecainid ein konzentrationsabhängiger negativ inotroper Effekt auf das atriale Myokard nachgewiesen werden, der seine halbmaximale Wirkung (EC_{50}) bei einer Konzentration von circa $7 \cdot 10^{-6}$ mol/l Flecainid zeigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren. Schulze und Knops konnten diesen dosisabhängigen negativ inotropen Effekt bei ventrikulären Trabekeln von Kälbern³⁰, Ito et al. bei isolierten Trabekeln aus Kaninchen- und Rattenherzen³¹ und C. Pagel bei Trabekeln aus Kaninchenherzen und insuffizienten ventrikulären humanen Trabekeln nachweisen⁶.

Flecainid als Klasse-Ic-Antiarrhythmikum entfaltet seine Wirkung in erster Linie über Hemmung schneller spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, die für die Einleitung des Aktionspotentials verantwortlich sind. Somit verlängert sich die Phase 0 des Aktionspotentials und die relative Refraktärzeit, was einfallende Extrasystolen unterdrücken kann. Ito et al. konnten durch die Durchführung von „rapid cooling contractures“ (RCC), mit denen man auf den Ca^{2+} -Gehalt des SR schließen kann, zeigen, dass durch die Blockade des Na^+ -Kanals und des damit verbundenen verminderten Na^+ -Einstroms in die Zelle, auch das gespeicherte Ca^{2+} im SR reduziert wird. Passend dazu wurde in der Arbeit von C. Pagel mithilfe von Aequorin ein sichtbares messbares Signal des intrazellulären Calcium-Transienten erzeugt und so konnte auch hier die Calciumabhängigkeit des negativ inotropen Effekts demonstriert werden⁶.

4.1.1 Flecainid-Effekte auf direkte Ca²⁺-Regulatoren (NCX, LTCC, SERCA)

Als ein möglicher Mechanismus des inotropen Effekts kommt dieser durch einen erhöhten Ca²⁺-Export durch den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) aus der Zelle zustande, da dieser durch den erhöhten Natriumgradienten dazu angeregt wird³¹. Deshalb ist davon auszugehen, dass Flecainid die Aktivität des NCX erhöht.

Für Flecainid konnte außerdem von Scamps et al. in Frosch³⁷, sowie Kihara et al. in Hunde³⁸ und Yamashita et al. in Kaninchenmyokard⁴³ eine Blockade des sarkolemmalen Calciumkanals vom L-Typ (LTCC) nachgewiesen werden. Dies könnte den negativ inotropen Effekt ebenfalls erklären bzw. dazu beitragen. Unklar ist jedoch die genaue Plasmakonzentration ab der dieser Effekt in vivo relevant wird. In den Experimenten zeigte sich der Effekt auf die LTCC bei Konzentrationen > 10⁻⁵ mol/l. Der therapeutische Bereich für Arrhythmien liegt zwischen 4*10⁻⁷ mol/l und 2*10⁻⁶ mol/l (200-1000 ng/ml)³⁹, wobei man sich hier zur Vermeidung von gefährlichen Nebenwirkungen, beispielsweise ventrikuläre Arrhythmien, eher an der unteren Grenze orientieren sollte. Deshalb spielen mögliche Effekte durch die Hemmung der LTCC in der Praxis wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten könnte aber eine Hemmung der LTCC bei den höheren Flecainid-Konzentrationen, bei denen der negativ inotrope Effekt sehr ausgeprägt war, eine Rolle spielen.

Darüber hinaus konnten Bisping et al. zudem auch eine direkte Hemmung der SERCA, vermutlich über das Regulatorprotein Phospholamban (PLB), durch Flecainid nachweisen, was ebenso einen calciumabhängigen negativ inotropen Effekt erklärt⁶⁹. Dies könnte auch den bisher unbekanntem Wirkmechanismus von Flecainid bei der CPVT erklären, da Bai et al. bei PLB-defizienten Knockout-Mäusen, die zusätzlich das CPVT-Gen trugen, herausfanden, dass die Ausschaltung von PLB die Arrhythmien wirkungsvoll unterdrückte⁷³.

4.1.2 Flecainid-Effekte auf K⁺-Kanäle

In mehreren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass Flecainid auch eine blockierende Wirkung auf K⁺-Kanäle hat. Yue et al. konnte eine blockierende

Wirkung auf den I_{Kur} bei Hundemyozyten⁴², Yamashita et al. eine blockierende Wirkung auf den auswärtsgerichteten I_{to} bei Kaninchenmyozyten⁴³ und Wang et al. konnte an humanen atrialen Myozyten eine blockierende Wirkung auf den I_{to} , nicht aber auf den I_{Kur} nachweisen⁴⁴. In einer neueren Arbeit konnten Melgari et al. zudem die Wirkung von Flecainid auf den humanen I_{Kr} bei therapeutischen Plasmaspiegeln ($EC_{50} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) belegen und die molekularen Grundlagen davon weiter beleuchten⁴¹. Dies steht im Einklang mit einer beobachteten verlängerten APD⁴⁵, als auch mit möglichen QT-Zeit-Verlängerungen, weshalb hier bei Gefahr eines Long-QT-Syndrom (LQTS) zusätzliche Vorsicht geboten ist⁴¹. Insgesamt scheint für die antiarrhythmische Wirkung von Flecainid daher, neben der Blockade des I_{Na} , auch die Blockade des I_{Kr} eine praxisrelevante Rolle zu spielen. Inwiefern dies aber auch Einfluss auf inotrope Effekte und die Kraft-Frequenz-Beziehung hat, ist unklar.

4.1.3 Flecainid und der Ryanodinrezeptor

Kontrovers diskutiert wurde in den letzten Jahren die Wirkung von Flecainid auf den am sarkoplasmatischen Retikulum ansässigen Ryanodinrezeptor RyR2³⁶, woraus ebenfalls inotrope Effekte resultieren könnten. Angestoßen wurde dies durch eine Publikation von Watanabe et al., in der die Wirksamkeit von Flecainid bei der katecholaminergen polymorphen Kammertachykardie (CPVT) anhand eines Maus-Modells und an PatientInnen festgestellt wurde³². Bei der CPVT liegt ursächlich eine Mutation des RyR2 vor, was zu teilweise unkontrollierten Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR führen kann, die in weiterer Folge potentiell tödliche ventrikuläre Tachykardien triggern können. Dadurch suggerierten die ersten Daten eine direkte Wirkung von Flecainid auf den RyR2³². Hilliard et al. konnten dies durch weitere Versuche mit isolierten Myozyten von Mäusen und Ratten untermauern³³. In darauffolgenden Arbeiten, unter anderem von Bannister et al., die mit voltage clamp Techniken arbeiteten, konnte dieser Wirkmechanismus jedoch nicht bestätigt werden. Sie erklärten die Wirkung eher durch sekundäre Effekte, die durch die bekannte Na^+ -Kanal-Blockade von Flecainid entsteht. Etwa durch die weiter oben beschriebene reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung des NCX, als Folge der reduzierten zytosolischen Na^+ -Konzentration, und der daraus resultierenden möglicherweise reduzierten Reizschwelle ein Aktionspotential zu

triggern^{34,35}. Deshalb scheint der RyR2 bei den hier beschriebenen negativ inotropen Effekten keine Rolle zu spielen.

4.2 Einfluss von Flecainid auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

In dieser Arbeit konnte außerdem eine durch Flecainid veränderte aufgespaltene KFB in humanem atrialen Myokard gezeigt werden. Als Ausgangsfrequenz wurde hier 1 Hz gewählt, da dies im Gegensatz zu den in vielen anderen Arbeiten verwendeten 0,5 Hz einen physiologischeren Wert darstellt. Für die Versuche wurde die Konzentration $3 \cdot 10^{-6}$ gewählt, da dies in einer anderen Arbeit mit ventrikulärem Myokard als EC_{50} errechnet wurde⁶. Außerdem liegt der Wert am oberen Ende der therapeutischen Plasmakonzentration³⁹, um einen möglichst guten Praxisbezug zu haben und gleichzeitig Effekte möglichst gut sichtbar machen zu können. Die so durchgeführte KFB verlief für die Kontrollen schwach positiv, mit einem maximalen Kraftanstieg auf etwa 110 % des Ausgangswertes bei 2 Hz, anschließend nahm die Kraft aber mit steigender Stimulationsfrequenz wieder ab. Im Gegensatz dazu wurde die KFB bei den Flecainid-Trabekeln gänzlich negativ und nahm bis auf 50% des Ausgangswertes bei 3 Hz ab.

C. Pagel kam zu ähnlichen Ergebnissen, als er insuffizientes humanes Myokard und gesundes Kaninchenmyokard untersuchte. Das insuffiziente humane Myokard zeigte ebenfalls eine negative KFB und die KFB des Kaninchenmyokards wurde deutlich verschlechtert. Abgesehen davon konnten sie nicht nur eine gestörte systolische, sondern in beiden Geweben auch eine gestörte diastolische Funktion beobachten⁶. Ito et al. konnte ebenfalls eine fast aufgehobene KFB bei Kaninchenmyokard und eine negative KFB bei Rattenmyokard zeigen³¹. Bei Vergleichen mit anderen Arbeiten ist zu beachten, dass für die KFB sowohl die Herkunft (atrial oder ventrikulär) als auch der Zustand (Gewebe aus insuffizienten oder gesunden Herzen) des untersuchten Myokards eine wesentliche Rolle spielt. Dies wurde in einer Arbeit von Schwinger et al. gezeigt. So scheint für atriales Gewebe im Gegensatz zu ventrikulärem die Kraftzunahme von 0,5 Hz auf 1 Hz (also in einem physiologisch niedrigen Bereich) bei weitem am ausgeprägtesten zu sein. Auch die anschließende Kraftabnahme bei höheren Stimulations-Frequenzen scheint bei atrialem Gewebe stärker ausgeprägt zu sein als bei ventrikulärem⁴⁶.

Die gezeigte Verschlechterung der KFB durch Flecainid könnte durch seine Bindungskinetik erklärt werden. Flecainid als Klasse-I-Antiarrhythmikum blockt in erster Linie die schnellen spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle (I_{Na}) und reduziert damit den Na⁺-Einstrom in die Zelle. Wie bereits gezeigt wurde, scheint eine reduzierte zytosolische Na⁺-Konzentration auch zu einer reduzierten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu führen, was sich in weiterer Folge auf die Kontraktionskraft auswirkt³¹. Die Bindung von Flecainid an den Na⁺-Kanal hängt von dessen Aktivitätszustand ab. Diese ist hochaffin für geöffnete und inaktivierte Na⁺-Kanäle, jedoch nicht, wenn der Kanal sich im Ruhezustand befindet. Zusätzlich wirkt Flecainid auch von zytosolischer Seite, dazu muss es aber erst in die Zelle gelangen. Dies gelingt ebenfalls nur durch geöffnete Na⁺-Kanäle. Die Wirkung des Antiarrhythmikums ist also umso stärker, je öfter der Kanal pro Zeiteinheit aktiv ist^{34,47}. Diesen Wirkmechanismus nennt man auch „use-dependent-block“ und könnte eine Erklärung sein, wieso sich die negativ inotropen Effekte bei höheren Stimulationsfrequenzen potenzieren.

4.3 Diastolische Funktion unter Flecainid

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Effekte auf die diastolische Funktion von Flecainid zu untersuchen. Bei konstanter Stimulation mit 1 Hz, konnte auch in hohen Konzentrationen von 10⁻⁴ mol/l kein eindeutiger Hinweis auf eine Beeinflussung der diastolischen Funktion gefunden werden. Allerdings konnte in den Versuchen für die KFB bei zunehmender Stimulationsfrequenz eine signifikante Zunahme der diastolischen Spannung verzeichnet werden. Die Relaxationszeiten der isometrischen Kontraktion blieben dabei dennoch weitgehend unverändert.

Dies deckt sich mit der vorliegenden Arbeit von C. Pagel, da hier ebenfalls eine frequenzabhängige Zunahme der diastolischen Spannung sowohl in insuffizientem humanen ventrikulären Myokard als auch in gesundem Kaninchenmyokard gezeigt wurde. In ventrikulärem insuffizientem Myokard konnte zudem die konzentrationsabhängige Induktion von erhöhter diastolischer Spannung und einer Erhöhung der RT90, was allerdings erst in hohen Dosen (10⁻⁴ mol/l) auftrat, gezeigt werden⁶. Die Unterschiede beim konzentrationsabhängig induzierten Effekt könnten darin liegen, dass in dem von C. Pagel verwendeten insuffizientem Myokard wahrscheinlich schon eine gewisse diastolische Dysfunktion vorbestehend war.

Dennoch konnten beide Arbeiten zeigen, dass auch ohne Vorbestehen einer diastolischen Dysfunktion, Flecainid diese Effekte zumindest unter Versuchsbedingungen induzieren kann.

Die beiden Mechanismen die für die Ca^{2+} -Elimination aus dem Zytosol und damit auch für die diastolische Funktion verantwortlich sind, sind die Aktivitäten des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) und die der Calcium-Pumpe SERCA. Da Flecainid durch den verminderten Na^+ -Einstrom die Aktivität des NCX indirekt erhöht, könnte die bei diesen Experimenten verursachte diastolische Dysfunktion auf eine Hemmung der SERCA-Aktivität zurückgehen. Eine Hemmung der SERCA-Aktivität würde auch zusätzlich die Verschlechterung der KFB erklären, da die Erhöhung der SERCA-Aktivität bei höheren Frequenzen zusätzlich an Relevanz gewinnt im Vergleich zur NCX-Aktivität¹⁴. Bisping et al. konnten mittels radioaktivem Ca^{2+} Uptake Assay eine verminderte SERCA-Aktivität nachweisen und mittels Westernblot das Regulatorprotein Phospholamban als wahrscheinlichen Angriffspunkt ausmachen⁶⁹.

4.4 Inotrope Effekte und Wirkmechanismus von Amiodaron und Lösungsmittel

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Amiodaron auf das nicht insuffiziente atriale Myokard untersucht. Um die Wirkung von Amiodaron von denen seines Lösungsmittels abgrenzen zu können, wurden parallel dazu Kontrollen mit dessen Lösungsmittel in der gleichen Dosis, wie es bei Amiodaron der Fall war, durchgeführt. Das Ergebnis davon war, dass bei konstanter Stimulationsfrequenz von 1 Hz, sich in beiden Gruppen ein sehr ähnlicher, wenn auch nicht exakt gleicher konzentrationsabhängiger negativ inotroper Effekt zeigte. Im mittleren Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-4} mol/l verliefen die beiden Kurven divergent zueinander, was bei 10^{-5} mol/l auch signifikant war. Unter Amiodaron zeigte sich so in diesem Konzentrationsbereich ein substanzspezifischer negativ inotroper Effekt, der über den Effekt des Lösungsmittels hinausging. In hohen Konzentrationen hingegen dominierte der Effekt des Lösungsmittels selbst. So war der Effekt bei der höchsten Konzentration von 10^{-3} mol/l in der Lösungsmittel-Gruppe sogar ausgeprägter als unter Amiodaron in Lösungsmittel. Bei C. Pagel zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger negativ inotroper Effekt, als er die Effekte

von Amiodaron mit denen des Lösungsmittels in insuffizientem ventrikulären Myokard miteinander verglich⁶. Bei C. Pagel verliefen die Amiodaron- und Lösungsmittel-Gruppe allerdings quasi identisch. Diese Unterschiede könnten erklärt werden durch eine Selektivität atrialer Na⁺-Kanäle von Amiodaron^{55,68}, was in Folge über sekundäre Ca²⁺-Verluste einen negativ inotropen Effekt vermitteln könnte³¹. In höheren Konzentrationen könnte dann der stärker ausgeprägte Effekt des Lösungsmittels überwiegen.

Die gezeigten Effekte decken sich mit klinischen Beobachtungen, die nach Bolusgabe von Amiodaron in vivo initial zu beobachten sind. Hier zeigt sich meist eine Reduktion der LVEF und des arteriellen Blutdrucks, begleitet von einer reaktiven Zunahme der Herzfrequenz⁵⁴. Dies ist ein Grund warum im klinischen Setting die Bolusgabe von Amiodaron vermieden wird und man es als Kurzinfusion bzw. Infusion verabreicht. Diese initial beobachteten Effekte könnten auch hier auf das Lösungsmittel zurückzuführen sein, da dessen Halbwertszeit im Blut nur wenige Minuten beträgt⁵³ und sich diese Effekte in vivo meist innerhalb von 10 Minuten wieder zurückbilden. Unter den experimentellen Bedingungen der hier durchgeführten Versuche waren keine für den Abbau verantwortlichen Enzyme im Organbad enthalten. Für eine Lösungsmittel-vermittelte Wirkung spricht ebenfalls, dass bei oraler Einnahme keine hämodynamisch relevanten Effekte auftreten, außer einer moderaten Reduktion der Herzfrequenz dank seiner anti-adrenergen Wirkkomponente⁵⁴.

4.4.1 Molekulare Angriffspunkte von Amiodaron

Amiodaron, obwohl eingestuft als Klasse-III-Antiarrhythmikum, ist eigentlich ein Multi-Kanal Blocker. Seine Hauptwirkung entfaltet es dennoch über Blockade der K⁺-Kanäle und blockiert dabei den „verzögerten Gleichrichtstrom“ (delayed rectifier current I_K) mit den Kanälen I_{Kr}, I_{Ks} und I_{K1}, sowie den ebenfalls K⁺-spezifischen Kanal I_{to}. Dadurch verlängert es die Repolarisation (Phase 3) des Aktionspotentials, die Aktionspotentialdauer (APD) und die absolute Refraktärzeit. Im EKG kann sich dies in einer Verlängerung der QT-Zeit äußern^{48,50}. Amiodaron verursacht außerdem eine „use-dependent“ Hemmung des schnellen spannungsabhängigen Na⁺-Kanals (I_{Na})⁵⁶. Es konnte zudem in Kaninchen-Kardiomyozyten⁵⁵ sowie Hunde-Myokard⁶⁸ eine atriale Selektivität von Amiodaron bei der Hemmung des I_{Na} nachgewiesen

werden, was, falls dies auch für den Menschen zutrifft, seine gute Wirksamkeit bei atrialen Arrhythmien ohne die Ventrikelfunktion zu beeinträchtigen erklären könnte. Nachgewiesen ist auch seine hemmende Wirkung auf Ca^{2+} -Kanäle, welche ebenfalls „use-dependent“ zu sein scheint^{57,58}. Und schließlich hat Amiodaron auch noch eine antiadrenerge Wirkkomponente. Dies scheint es aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den Schilddrüsenhormonen über den Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) zu vermitteln, indem es β -Rezeptoren herunter reguliert^{59,60}. All diese Effekte können den im mittleren Konzentrationsbereich beobachteten negativ inotropen Effekt von Amiodaron erklären. Eine weitere Erklärung wäre eine mögliche Einflussnahme auf den NCX. Dafür finden sich in der Literatur allerdings widersprüchliche Informationen^{70,71}.

4.4.2 Effekte des Lösungsmittels

Für den dominanten Lösungsmittelleffekt in hohen Konzentrationen scheinen folgende Dinge relevant: Intravenöses Amiodaron ist in seiner Standard-Galenik, die in der Praxis verwendet wird, mit Polysorbat 80 und Benzylalkohol als Lösungsvermittler gemischt. Polysorbat 80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat) ist ein Emulgator und einer der wenigen oberflächenaktiven Substanzen, die auch parenteral verträglich sind. Es kommt in vielen Lebensmitteln und Medizinprodukten vor und gilt als gesundheitlich unbedenklich. Jedoch gibt es Hinweise, dass Polysorbat 80 für die nach Amiodaron Bolus-Injektion auftretende arterielle Hypotension verantwortlich ist. Munoz et al. verglichen bei PatientInnen während einer Coronarangiographie die normale Galenik von Amiodaron mit einer experimentellen, ohne Polysorbat 80, hinsichtlich der hämodynamischen Parameter. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur normalen Galenik nur ein sehr geringer Effekt auf den arteriellen Blutdruck. Die beiden Gruppen waren aber nach 30 Minuten wieder identisch hinsichtlich ihrer hämodynamischen und kardialen Parameter⁶¹. Platou et al. konnte bei Hunden zeigen, dass Lösungsmittel alleine die gleichen hypotensiven Effekte vermittelt wie Amiodaron, nicht jedoch die elektrophysiologischen⁶². Somberg et al. testeten eine neue Zusammensetzung mit dem Namen Amio-Aqueus an Ratten und stellten fest, dass diese deutlich weniger hypotensive und kardiodepressive Eigenschaften zeigte⁶³. In einer neueren Studie testeten Lindquist et al. eine Zusammensetzung mit dem Sulfoalkyl-Ether

Cyclodextrin als Lösungsvermittler an PatientInnen während eines 18-stündigem loading-Regimes und stellten dort einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Behandlungshäufigkeit einer Hypotension fest⁶⁴.

Auch durch Benzylalkohol vermittelte Effekte sind denkbar, da Benzylalkohol als Lokalanästhetikum auch Na⁺-Kanäle blockiert. Zudem ist eine negativ inotrope Wirkung auf Kaninchenmyokard beschrieben⁶⁵ und in Kapitel 4.1 wurde erklärt, wie ein verminderter Na⁺-Einstrom eine negativ inotrope Wirkung über sekundären Ca²⁺-Verlust durch den NCX nach sich ziehen kann³¹.

4.5 Einfluss von Amiodaron und Lösungsmittel auf die Kraft-Frequenz-Beziehung

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde auch der Einfluss von Amiodaron und seines Lösungsmittels auf die Kraft-Frequenz-Beziehung untersucht. Die dafür verwendete Konzentration war 10⁻⁴ mol/l und der untersuchte Frequenzbereich war auch hier von 1 Hz bis 3 Hz. Die Konzentration 10⁻⁴ mol/l wurde deshalb gewählt, da diese Konzentration auch der im Myokard gemessenen Konzentration entspricht⁷. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten in-vivo Studien zur Hämodynamik kann man hier durch die Versuchsanordnung bedingt davon ausgehen, dass nur die akuten Effekte von Amiodaron bestimmt wurden. Ebenso verhält es sich für die Lösungsmittel-Gruppe, da die für den enzymatischen Abbau verantwortlichen Enzyme in der hier verwendeten Tyrode nicht enthalten sind.

Die entwickelte Kraft und der Verlauf der KFB änderte sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Insgesamt ähnelten sich die Silhouetten der Kurven in Form und Verlauf. Prinzipiell sind sie auch vergleichbar mit der Kurve der Kontroll-Gruppe aus den Flecainid-Experimenten. Tendenziell fiel der frequenzabhängige Kraftanstieg in der Amiodaron-behandelten Gruppe sogar am höchsten aus, was eine Verschlechterung der KFB somit gänzlich ausschließt. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Amiodaron trotz seiner negativ inotropen Wirkung, die aber auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist, keine negativen Auswirkungen auf die Kraft-Frequenz-Beziehung des atrialen Myokards hat. Damit unterscheidet es sich hier grundlegend von den Auswirkungen von Flecainid auf diesen wichtigen physiologischen Kompensationsmechanismus.

4.6 Diastolische Effekte unter Amiodaron

Im Gegensatz zu Flecainid, scheinen sowohl Amiodaron als auch das Lösungsmittel keinerlei Effekte auf die diastolische Funktion im hier untersuchten atrialen Myokard zu vermitteln.

4.7 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Sowohl Flecainid als auch Amiodaron sind wichtige Medikamente in der Behandlung kardialer Arrhythmien, besonders auch bei der am häufigsten auftretenden kardialen Arrhythmie, dem Vorhofflimmern. Dabei unterscheiden sich die beiden Medikamente jedoch im dafür geeigneten Patientenkollektiv. Flecainid ist Personen ohne strukturellen Herzerkrankungen und mit guter Pumpfunktion vorbehalten, also im Durchschnitt eher Jüngeren. Außerdem eignet es sich auch für eine „pill in the pocket“-Herangehensweise²¹. Wegen den Ergebnissen der CAST-Studie ist Flecainid bei Personen, auf die das zuvor beschrieben nicht zutrifft, kontraindiziert²². Hier hat sich Amiodaron bewährt, da es kaum kardiodepressive Eigenschaften besitzt, wohl aber eine Reihe extrakardialer Nebenwirkungen. Aus diesem Grund wird Amiodaron eher bei Personen mit vorbestehenden Herzschäden eingesetzt^{21,48}.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Vorgehensweise. Sie sind außerdem im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen erhöhten Mortalität unter Flecainid-Therapie. Erstmals konnte auch eine Verschlechterung der diastolischen Funktion in humanem atrialen Myokard nachgewiesen werden. Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, vor dem Einleiten einer Flecainid-Therapie, als auch währenddessen die diastolische Funktion regelmäßig zu überwachen. Die ebenfalls verschlechterte KFB und die negativ inotrope Wirkung legen nahe, dass dies auch bei nur geringgradig Herzinsuffizienten zu einer symptomatischen Verschlechterung und einer weiteren Einschränkung der Belastbarkeit führen könnte.

Amiodaron hingegen hatte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine verschlechternde Wirkung auf die diastolische Funktion und die KFB. Die beobachteten negativ inotropen Effekte waren in erster Linie auf das Lösungsmittel zurückzuführen. Die klinische Anwendbarkeit von Amiodaron, vor

allem im Akutsetting, könnte man durch die Verwendung eines anderen, weniger kardiodepressiven, Lösungsmittels verbessern. Vielversprechend dazu könnten Lösungen auf Basis von Cyclodextrin sein⁶⁴.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Verwendung von Amiodaron als Antiarrhythmikum der ersten Wahl bei Herzinsuffizienz bestätigen. Flecainid hat dennoch seinen Stellenwert bei Personen die eine gute Herzfunktion aufweisen, da es ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil als Amiodaron aufweist.

5 Tabellen

5.1 Flecainid KWK – Interventionen

n = 13

Tabelle 6:

Mittelwerte	BL	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	3*10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
Force [%]	100,00	94,03	87,60	82,48	71,55	49,37	21,16
SEM ±	0,00	1,98	2,74	3,31	5,39	8,09	4,85
Diast. [%]	100,00	98,79	99,65	95,14	89,84	89,37	99,47
SEM ±	0,00	2,94	5,39	5,85	6,96	8,02	16,72
RT50 [ms]	105,00	101,58	103,92	105,17	91,18	93,64	112,58
SEM ±	6,54	6,75	6,55	6,96	6,24	12,41	15,89
RT90 [ms]	188,33	180,00	185,00	195,00	200,00	201,67	200,00
SEM ±	7,26	10,00	18,03	18,93	15,28	24,55	26,46

5.2 Flecainid KWK – Kontrollen

n = 9

Tabelle 7:

Mittelwerte	BL	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	3*10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
Force [%]	100,00	104,49	97,79	95,88	97,06	89,46	86,68
SEM ±	0,00	6,11	3,22	4,73	5,63	7,37	9,02
Diast. [%]	100,00	94,64	87,68	92,00	88,56	88,53	86,97
SEM ±	0,00	1,89	2,46	2,90	2,80	4,58	3,50
RT50 [ms]	84,86	95,29	93,25	102,25	94,14	94,14	98,00
SEM ±	4,87	11,12	8,89	9,62	9,83	12,43	13,24
RT90 [ms]	186,67	184,67	180,67	191,33	179,67	183,00	187,00
SEM ±	13,33	17,03	15,01	12,72	17,70	18,50	17,95

5.3 Amiodaron KWK – Interventionen

n = 8

Tabelle 8:

Mittelwerte	BL	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
Force [%]	100,00	92,38	82,63	78,50	63,75	44,57	26,14
SEM ±	0,00	2,43	4,33	5,67	6,16	9,46	5,14
Diast. [%]	100,00	93,86	89,00	84,29	79,43	71,00	68,50
SEM ±	0,00	2,68	5,00	6,51	8,34	10,84	12,28
RT50 [ms]	82,44	82,67	83,46	84,59	85,85	90,11	81,91
SEM ±	4,42	5,50	4,25	6,59	11,47	14,29	6,89
RT90 [ms]	184,80	186,72	192,58	196,26	205,38	187,18	200,50
SEM ±	15,80	17,13	16,64	17,34	19,48	23,44	28,44

5.4 Amiodaron KWK – Lösungsmittel

n = 6

Tabelle 9:

Mittelwerte	BL	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
Force [%]	100,00	101,00	102,00	103,50	90,83	60,83	18,50
SEM ±	0,00	2,48	3,42	8,67	6,85	9,26	8,55
Diast. [%]	100,00	89,83	80,33	74,83	81,40	80,80	76,60
SEM ±	0,00	4,50	7,86	11,18	3,67	5,81	6,02
RT50 [ms]	88,78	91,59	92,84	96,61	95,79	111,55	107,25
SEM ±	12,47	11,50	12,74	12,86	13,24	28,23	21,12
RT90 [ms]	169,85	177,80	179,25	180,68	178,57	180,26	214,50
SEM ±	19,92	19,83	19,98	18,22	18,30	22,83	35,50

5.5 Flecainid KFB – Interventionen

n = 7

Tabelle 10:

Mittelwerte	BL	1 Hz	1.5 Hz	2 Hz	2.5 Hz	3 Hz	1 Hz (ende)
Force [%]	100,00	98,52	78,98	72,09	58,37	49,77	87,91
SEM ±	0,00	3,95	4,13	6,37	6,33	5,33	8,98
Diast. [%]	100,00	97,98	98,87	109,65	112,51	125,23	115,52
SEM ±	0,00	8,49	11,27	11,84	10,92	10,08	11,77
RT50 [ms]	72,64	72,42	70,92	69,50	58,33	56,57	74,21
SEM ±	7,09	8,30	6,94	6,23	6,18	5,00	7,25
RT90 [ms]	148,50	151,40	150,99	136,94	123,21	125,25	9,68
SEM ±	14,82	14,57	14,59	14,53	12,33	9,68	14,19

5.6 Flecainid KFB – Kontrollen

n = 6

Tabelle 11:

Mittelwerte	BL	1 Hz	1.5 Hz	2 Hz	2.5 Hz	3 Hz	1 Hz (ende)
Force [%]	100,00	99,94	91,91	107,41	93,18	74,90	99,30
SEM ±	0,00	2,23	4,92	9,82	12,57	12,11	4,53
Diast. [%]	100,00	95,53	91,02	80,56	76,98	73,89	74,93
SEM ±	0,00	7,27	7,88	9,01	9,11	8,22	9,49
RT50 [ms]	59,60	60,17	58,82	57,17	51,61	52,04	66,24
SEM ±	7,37	7,29	7,37	6,32	5,98	6,29	8,59
RT90 [ms]	130,49	131,62	124,42	119,52	109,86	103,79	127,01
SEM ±	21,80	21,88	16,93	12,55	17,45	14,36	17,55

5.7 Amiodaron KFB – Interventionen

n = 6

Tabelle 12:

Mittelwerte	BL	1 Hz	1.5 Hz	2 Hz	2.5 Hz	3 Hz	1 Hz (ende)
Force [%]	100,00	88,82	114,41	108,29	84,76	70,78	96,46
SEM ±	0,00	11,15	16,06	13,93	14,74	12,27	12,41
Diast. [%]	100,00	99,42	104,95	109,23	114,89	115,77	127,18
SEM ±	0,00	2,85	1,65	3,42	6,58	10,88	20,93
RT50 [ms]	57,71	61,22	72,61	73,03	71,28	60,22	73,88
SEM ±	4,28	4,24	10,33	8,16	5,63	3,24	11,54
RT90 [ms]	152,62	152,85	148,62	148,66	147,85	125,92	158,26
SEM ±	30,51	22,58	19,46	15,94	9,67	5,97	24,17

5.8 Amiodaron KFB – Lösungsmittel

n = 5

Tabelle 13:

Mittelwerte	BL	1 Hz	1.5 Hz	2 Hz	2.5 Hz	3 Hz	1 Hz (ende)
Force [%]	100,00	84,77	96,80	100,55	69,86	52,96	79,96
SEM ±	0,00	3,50	0,78	2,25	7,60	9,58	8,02
Diast. [%]	100,00	110,69	112,38	110,15	106,72	118,35	108,74
SEM ±	0,00	14,06	15,91	20,57	21,35	18,51	37,72
RT50 [ms]	63,15	57,77	70,52	69,92	72,01	60,95	76,71
SEM ±	10,69	6,86	12,27	11,91	9,60	10,92	8,52
RT90 [ms]	149,40	141,42	143,91	141,58	153,24	122,58	166,87
SEM ±	27,03	25,02	23,25	20,42	13,18	19,27	20,24

6 Literaturverzeichnis

1. Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR. The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *European Journal of Physiology* 416(1-2), 219-221 (1990).
2. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circulation Research* 65(5), 1441-1449 (1989).
3. Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circulation Research* 69(5), 1280-1292 (1991).
4. Phillips RM, Altschuld RA. 2,3-Butanedione 2-monoxime (BDM) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229(1), 154-157 (1996).
5. Solaro RJ. Mechanisms of the Frank-Starling law of the heart: the beat goes on. *Biophysical Journal* 93, 4095-4096 (2007).
6. Pagel C, Pieske B, Kirbel TH, Einfluss der Antiarrhythmika Flecainid und Amiodaron auf die kontraktile Funktion und die Kraft-Frequenz-Beziehung des Herzens. Göttingen (2009).
7. Latini R, Connolly SJ, Kates RE. Myocardial disposition of amiodarone in the dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 224, 603-608 (1983).
8. Hoth M., Wischmeyer E. *Duale Reihe Physiologie: Elektrophysiologie des Herzens*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 74-83 (2012).
9. Nerbonne, JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* 85, 1205-1253 (2005).
10. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology* 245, C1-14 (1983).
11. Luis F. Santana, Edward P. Cheng, W. Jonathan Lederer, How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49(6), 901–903 (2010).
12. Periasamy, M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve* 35, 430-442 (2007).

13. Kane C, Couch L, Terracciano CMN. Excitation–contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3, 59 (2015).
14. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca handling and sarcoplasmic reticulum Ca content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circulation Research* 85, 38-45 (1999).
15. Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM: CaMK-II is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* 268, H 703-712 (1995).
16. Rettig J. *Duale Reihe Physiologie: Grundlagen der Muskelphysiologie*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 57-64 (2012).
17. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80, 853-924 (2000).
18. Andrikopoulos GK, Pastromas S, Tzeis S. Flecainide: Current status and perspectives in arrhythmia management. *World Journal of Cardiology* 7(2), 76-85 (2015).
19. Hwang HS, Hasdemir C, Laver D, Mehra D, Turhan K, Faggioni M, Yin H, Knollmann BC. Inhibition of cardiac Ca²⁺ release channels (RyR2) determines efficacy of class I antiarrhythmic drugs in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4(2), 128-35 (2011).
20. Bannister ML, Thomas NL, Sikkell MB, Mukherjee S, Maxwell C, MacLeod KT, George CH, Williams AJ. The mechanism of flecainide action in CPVT does not involve a direct effect on RyR2. *Circulation Research* 116(8), 1324-35 (2015).
21. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson D, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener HC et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS, *European Heart Journal* 37(38), 2893–2962 (2016).
22. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *New England Journal of Medicine* 324(12), 781-788 (1991).
23. Aliot E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace* 13(2), 161–173 (2011).
24. Martínez-Marcos FJ, García-Garmendia JL, Ortega-Carpio A, Fernández-Gómez JM, Santos JM, Camacho C. Comparison of intravenous flecainide, propafenone,

and amiodarone for conversion of acute atrial fibrillation to sinus rhythm. *The American Journal of Cardiology* 86(9), 950-953 (2000).

25. Ekiz A, Kaya B, Bornaun H, Acar DK, Avci ME, Bestel A, Yildirim G. Flecainide as first-line treatment for fetal supraventricular tachycardia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* 31(4), 407-412 (2018).
26. Koch-Weser J, Blinks JR. The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacological Reviews* 15(3), 601-652 (1963).
27. Münch G, Böck B, Brixius K, Reuter H, Mehlhorn U, Bloch W, Schwinger RHG. SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278(6), H1924-1932 (2000).
28. Piot C, LeMaire SA, Albat B, Seguin J, Nargeot J, Richard S. High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* 93(1), 120-8 (1996).
29. Sequeira V, van der Velden J. The Frank–Starling Law: a jigsaw of titin proportions. *Biophysical Reviews* 9(3), 259–267 (2017).
30. Schulze JJ, Knops J. Effects of flecainide on contractile force and electrophysiological parameters in cardiac muscle. *Drug Research* 32, 1025-1029 (1982).
31. Ito K, Nagafuchi K, Taga A, Yorikane R, Koike H. Possible involvement of altered Na⁺-Ca²⁺ Exchange in negative inotropic effects of class I antiarrhythmic drugs on rabbit and rat ventricles. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27, 355-361 (1996).
32. Watanabe H, Chopra N, Laver D, Hwang HS, Davies SS, Roach DE, Duff HJ, Roden DM, Wilde AAM, Knollmann BC. Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nature Medicine* 15(4), 380–383 (2009).
33. Hilliard FA, Steele DS, Laver D, Yang Z, Le Marchand SJ, Chopra N, Piston DW, Huke S, Knollmann BC. Flecainide inhibits arrhythmogenic Ca²⁺ waves by open state block of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels and reduction of Ca²⁺ spark mass. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* 48(2), 293 (2010).
34. Bannister ML, Alvarez-Laviada A, Thomas NL, Mason SA, Coleman S, du Plessis CL, Moran AT, Neill-Hall D, Osman H, Bagley MC, MacLeod KT, George CH, Williams AJ. Effect of flecainide derivatives on sarcoplasmic reticulum calcium release suggests a lack of direct action on the cardiac ryanodine receptor. *British Journal of Pharmacology* 173(15), 2446–2459 (2016).

35. Bannister ML, Thomas NL, Sikkell MB, Mukherjee S, Maxwell C, MacLeod KT, George CH, Williams AJ. The mechanism of flecainide action in CPVT does not involve a direct effect on RyR2. *Circulation Research* 10;116(8), 1324-35 (2015).
36. Curran J, Louch WE. Linking ryanodine receptor Ca²⁺ leak and Na⁺ current in heart: a day in the life of flecainide. *Acta Physiologica (Oxf)*. 214(3), 300-302 (2015).
37. Kihara Y, Inoko M, Hatakeyama N, Momose Y, Sasayama S. Mechanisms of Negative Inotropic Effects of Class Ic Antiarrhythmic Agents: Comparative Study of the Effects of Flecainide and Pilsicainide on Intracellular Calcium Handling in Dog Ventricular Myocardium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27(1), 42-51 (1996).
38. Scamps F, Undrovinas A, Vassort G. Inhibition of I_{Ca} in single frog cardiac cells by quinidine, flecainide, ethmozin, and ethacizin. *American Journal of Physiology* 256(3), C549-559 (1993).
39. Homma M, Kuga K, Doki K, Katori K, Yamaguchi I, Sugibayashi K, Kohda Y. Assessment of serum flecainide trough levels in patients with tachyarrhythmia. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57(1), 47-51 (2005).
40. Kowey PR. Pharmacological Effects of Antiarrhythmic Drugs: Review and Update. *JAMA Internal Medicine* 158(4), 325-332 (1998).
41. Melgari D, Zhang Y, El Harchi A, Dempsey CE, Hancox JC. Molecular basis of hERG potassium channel blockade by the class Ic antiarrhythmic flecainide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 86, 42–53 (2015).
42. Yue L, Feng JL, Wang Z, Nattel S. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovascular Research* 46(1), 151-161 (2000).
43. Yamashita T, Nakajima T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. Flecainide inhibits the transient outward current in atrial myocytes isolated from the rabbit heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274(1), 315-321 (1995).
44. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 272(1), 184-196 (1995).
45. Olsson SB, Edvardsson N. Clinical electrophysiologic study of antiarrhythmic properties of flecainide: acute intraventricular delayed conduction and prolonged repolarization in regular paced and premature beats using intracardiac monophasic action potentials with programmed stimulation. *American Heart Journal* 102: 864-871 (1981).

46. Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Uhlmann R, Überfuhr P, Kreuzer E, Reichart B, Erdmann E. Force-frequency-relation in human atrial and ventricular myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry* 17;119(1-2), 73-78 (1993).
47. Wang GK, Russell C, Wang S. State-dependent Block of Wild-type and Inactivation-deficient Na⁺ Channels by Flecainide. *The Journal of General Physiology* 122(3), 365-374 (2003).
48. Elsa-Grace Giardina, Passman R. Amiodarone: Clinical uses. Uptodate (2018). Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Aufgerufen am 20.8.2018).
49. Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, Olshansky B, Singh B, Collard HR, Murphy E. A Practical Guide for Clinicians Who Treat Patients with Amiodarone: 2007. *Heart Rhythm* 4(12), 1590 (2007).
50. Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, Gillis AM, Bryant WJ, Hlatky MA, Callans DJ, Granger CB, Curtis AB, Hammill SC, Deal BJ, Joglar JA, Dickfeld T, Kay GN, Field ME, Matlock DD, Fonarow GC, Myerburg RJ, Page RL. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2017, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000550> (Aufgerufen am 15.7. 2018).
51. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal* 36(41), 2793-2867 (2015).
52. Massie BM, Fisher SG, Radford M, Deedwania PC, Singh BN, Fletcher RD, Singh SN. Effect of amiodarone on clinical status and left ventricular function in patients with congestive heart failure. CHF-STAT Investigators. *Circulation* 15;94(10), 2668 (1996).
53. van Tellingen O, Beijnen JH, Verweij J, Scherrenburg EJ, Nooijen WJ, Sparreboom A. Rapid Esterase-sensitive Breakdown of Polysorbate 80 and Its Impact on the Plasma Pharmacokinetics of Docetaxel and Metabolites in Mice. *Clinical Cancer Research* 5(10), 2918-2924 (1999).
54. Pfisterer M, Burkart F, Müller-Brand J, Kiowski W. Important differences between short- and long-term hemodynamic effects of amiodarone in patients with chronic

- ischemic heart disease at rest and during ischemia-induced left ventricular dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 5(5), 1205-1211 (1985).
55. Suzuki T, Morishima M, Kato S, Ueda N, Honjo H, Kamiya K. Atrial selectivity in Na⁺channel blockade by acute amiodarone. *Cardiovascular Research* 98(1), 136-144 (2013).
 56. Mason JW, Hondeghem LM, Katzung BG. Block of inactivated sodium channels and of depolarization-induced automaticity in guinea pig papillary muscle by amiodarone. *Circulation Research* 55, 277-285 (1984).
 57. Nattel S, Talajic M, Quantz M, De Roode M. Frequency-dependent effects of amiodarone on atrio-ventricular nodal function and slow-channel action potentials: Evidence for calcium channel blocking activity. *Circulation* 76, 442-449 (1987).
 58. Lubic SP, Nguyen KPV, Dave B, Giacomini JC. Antiarrhythmic agent amiodarone possesses calcium channel blocker properties. *Journal of Cardiovasc Pharmacology* 24, 707-714 (1994).
 59. Drvota V, Häggblad J, Blange I, Magnusson Y, Sylvén S. The effect of amiodarone on the beta-adrenergic receptor is due to a downregulation of receptor protein and not to a receptor-ligand interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255(2), 515-520 (1999).
 60. Vassy R, Starzec A, Yin Y, Nicolas P, Perret GY. Amiodarone has exclusively non-genomic action on cardiac beta-adrenoceptor regulation. *European Journal of Pharmacology* 408(3), 227-232 (2000).
 61. Munoz A, Karila P, Gallay P, Zettelmeier F, Messner P, Mery M, Grolleau R. A randomized hemodynamic comparison of intravenous amiodarone with and without Tween 80. *European Heart Journal* 9(2), 142-148 (1988).
 62. Platou ES, Refsum H. Acute electrophysiologic and blood pressure effects of amiodarone and its solvent in the dog. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 58(3), 163-168 (1986).
 63. Somberg JC, Cao W, Cvetanovic I, Ranade V, Molnar J. Pharmacology and toxicology of a new aqueous formulation of intravenous amiodarone (Amio-Aqueous) compared with Cordarone IV. *American Journal of Therapeutics* 12(1), 9-16 (2005).
 64. Lindquist DE, Rowe AS, Heidel E, Fleming T, Yates JR. Evaluation of the Hemodynamic Effects of Intravenous Amiodarone Formulations During the Maintenance Phase Infusion. *Annals of Pharmacotherapy* 49(12), 1317-1321 (2015).

65. Yasaka WJ, Eichbaum FW, Oga S. Antiarrhythmic effects of solvents: III Effects of propylene glycol and benzyl alcohol on contractile force of isolated rabbit heart. *Cardiovascular Research* 13(12), 717-722 (1979).
66. Hoth M., Wischmeyer E. *Duale Reihe Physiologie: Steuerung der Herztätigkeit*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 100-104 (2012).
67. Rosen MR, Bigger JT, Breithardt G, Brown AM, Camm AJ, Carmeliet E, Fozzard HA, Hoffman BF, Janse MJ, Lazzara R, et al. The Sicilian gambit. A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. Task Force of the Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Circulation*. 84(4), 1831-1851 (1991).
68. Burashnikov A, Di Diego JM, Sicouri S, Ferreiro M, Carlsson L, Antzelevitch C. Atrial-Selective Effects of Chronic Amiodarone in the Management of Atrial Fibrillation. *Heart Rhythm*. 5(12), 1735–1742 (2008).
69. Bisping E, Pagel C, Wilken A, Toischer K, Pieske B. The antiarrhythmic agent Flecainid induced diastolic dysfunction, but not Amiodaron. *Wiener klinische Wochenschrift* 120(15-16), A52-A52. (2008).
70. Watanabe Y, Kimura J. Inhibitory effect of amiodarone on Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology* 131(1), 80–84 (2000).
71. Watanabe Y, Matsuoka I, Kimura J. Chronic Administration of Amiodarone Does Not Affect Na⁺/Ca²⁺ Exchange Current in Guinea Pig Cardiac Ventricular Myocytes. *The Japanese Journal of Pharmacology* 90, 21-27 (2002).
72. Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Research* 79, 1059-1063 (1996).
73. Bai Y, Jones PP, Guo J, Zhong X, Clark RB, Zhou Q, Wang R, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Semeniuk L, Guo A, Song LS, Duff HJ, Chen SRW. Phospholamban Knockout Breaks Arrhythmogenic Ca²⁺ Waves and Suppresses Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Mice. *Circulation Research* 113(5), 10 (2013).