

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Universitären Herzzentrum Hamburg
Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Elektrophysiologischer Einfluss nitrierter Fettsäuren auf native ventrikuläre Kardiomyozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Bianca Mattheß
aus Zittau

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 18.10.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Volker Rudolph

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. Alexander Schwoerer

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Myokardiale Ischämie und ischämie-assoziierte Herzrhythmusstörungen	2
2.2	Elektrophysiologie	5
2.2.1	Aktionspotential	5
2.2.2	Elektro-mechanische Kopplung	8
2.2.3	Reentry-Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie	9
2.3	Nitrierte Fettsäuren	12
2.3.1	Endogene Bildung nitrierter Fettsäuren	12
2.3.2	Wirkungen nitrierter Fettsäuren	14
2.3.3	Antiarrhythmischer Effekt nitrierter Fettsäuren im Rahmen myokardialer Ischämie	16
2.3.4	Ausschluss einer Proarrhythmie durch nitrierte Fettsäuren	18
2.4	Ziele dieser Arbeit	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten von adulten FVB-Mäusen	23
3.2	Patch-Clamp-Technik	27
3.2.1	Patch-Clamp-Messplatz und Patchpipette	30
3.2.2	Durchführung der Patch-Clamp-Experimente	35
3.3	Calcium-Fluoreszenzmessungen	37
3.3.1	IonOptix-Messplatz	38
3.3.2	Durchführung der Calcium-Fluoreszenzmessungen	41

3.4	Vorgehensweise bei der Datenanalyse	43
3.4.1	Analyse der Patch-Clamp-Daten.....	43
3.4.2	Analyse der Daten der Calcium-Fluoreszenzmessungen	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente.....	46
4.1.1	Ruhemembranpotential.....	47
4.1.2	Overshoot	48
4.1.3	Aktionspotentialdauer.....	49
4.1.4	Einfluss von OA-NO ₂ auf das Aktionspotential.....	52
4.2	Ergebnisse der Calcium-Fluoreszenzmessungen	53
4.2.1	Ruhecalcium-Konzentration	53
4.2.2	Calcium-Anstieg.....	54
4.2.3	Ausmaß des Calcium-Transienten.....	55
4.2.4	Calcium-Abnahme	57
4.2.5	Calcium-Wiederaufnahme.....	58
5	Diskussion.....	60
5.1	Interpretation der Patch-Clamp-Ergebnisse	60
5.2	Interpretation der Ergebnisse der Calcium-Fluoreszenzmessungen .	61
5.3	Fazit und Forschungsimplicationen	63
5.4	Ausblick auf mögliche Eigenschaften nitrierter Fettsäuren am Beispiel von Omega-3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....	64
6	Zusammenfassung	67
7	Abbildungsverzeichnis.....	68
8	Tabellenverzeichnis	70

9	Abkürzungsverzeichnis.....	71
10	Literaturverzeichnis.....	73
11	Danksagung	81
12	Lebenslauf.....	82
13	Eidesstattliche Erklärung.....	83

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Koronare Herzkrankheit und speziell der akute Myokardinfarkt sind klinisch äußerst relevante Krankheitsbilder. Dies wird verdeutlicht durch die Daten des Statistischen Bundesamtes (2012), nach denen beispielsweise im Jahr 2011 der akute Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache in Deutschland darstellte. Ursächlich für den plötzlichen Herztod bei Infarkt sind zu 80 % ventrikuläre Herzrhythmusstörungen [Herold, 2013]. Diese Komplikation tritt früh auf, wodurch die ersten Minuten und Stunden nach dem Infarktereignis mit dem höchsten Sterberisiko verbunden sind [Loewel, 2006].

Es gibt vielversprechende Forschungsansätze [Rudolph et al., 2010b], die eine neue synthetisch hergestellte Substanz zur Vermeidung von Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie in Aussicht stellt. Es handelt sich dabei um nitrierte Fettsäuren ($\text{NO}_2\text{-FAs}$). Diese entstehen über unterschiedliche Reaktionen von Stickstoffmonoxid (NO)- und Nitrit (NO_2^-)-abgeleiteten Verbindungen mit ungesättigten Fettsäuren. $\text{NO}_2\text{-FAs}$ sind aufgrund ihrer Elektrophilie besonders reaktiv. Bislang ist ihr elektrophysiologischer Einfluss auf native Herzmuskelzellen jedoch nicht erforscht worden. In dieser Arbeit soll der Effekt von Nitro-Ölsäure (OA-NO_2) auf isolierte native ventrikuläre Kardiomyozyten von Mäusen untersucht werden. Mittels Patch-Clamp-Experimenten wird der Einfluss auf das Aktionspotential (AP) untersucht. In Calcium-Fluoreszenzmessungen wird eine Beeinflussung des zytosolischen Calcium-Transienten geprüft.

Die Analyse der Wirkung von $\text{NO}_2\text{-FAs}$ auf die Elektrophysiologie der ventrikulären Einzelzelle ist von großer Bedeutung, da Veränderungen dieser Eigenschaften der Zelle zu der Entstehung von Herzrhythmusstörungen führen können [Dhein und Stark, 2008]. Mit Hilfe dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die $\text{NO}_2\text{-FA OA-NO}_2$ die Elektrophysiologie der Einzelzelle unter nativen Bedingungen beeinflusst und somit die Fähigkeit besitzt Arrhythmien auszulösen. In Hinblick auf eine mögliche Anwendung der $\text{NO}_2\text{-FAs}$ als Prophylaktikum ist die Beurteilbarkeit des proarrhythmogenen Potentials essentiell.

2 Einleitung

Zu Beginn dieses Kapitels wird auf die Häufigkeit myokardialer Ischämie und ischämie-assoziiertes Herzrhythmusstörungen eingegangen, um die klinische Relevanz zu verdeutlichen. Im Anschluss wird die grundlegende Elektrophysiologie ventrikulärer Kardiomyozyten unter physiologischen und ischämischen Bedingungen erklärt. Nachdem auf die Eigenschaften der NO₂-FAs eingegangen wurde, werden abschließend die Ziele dieser Arbeit erläutert.

2.1 Myokardiale Ischämie und ischämie-assoziierte Herzrhythmusstörungen

Laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes starben 2011 in Deutschland 127.101 Menschen an ischämischen Herzkrankheiten, dies entspricht 14,9 % aller Verstorbenen [Statistisches Bundesamt, 2012]. Bei einer myokardialen Ischämie (griechisch, „isch-“ = zurückhalten, „häma“ = Blut) handelt es sich um eine Minderdurchblutung oder Blutleere im Herzmuskel [De Gruyter, 2012]. Verursacht wird die eingeschränkte oder aufgehobene Zufuhr mit arteriellem, sauerstoffreichem Blut meist durch Atherosklerose in den Koronargefäßen (Koronare Herzkrankheit, KHK), wobei es durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque schließlich zum thrombotischen Verschluss kommen kann [Meumann, 2011].

Eine Myokardischämie manifestiert sich unterschiedlich. Dabei wird die belastungsabhängige stabile Angina pectoris von dem akuten Koronarsyndrom unterschieden. Unter das akute Koronarsyndrom fällt auch der Myokardinfarkt, bei dem ein persistierender Verschluss zu einer ischämischen Myokardnekrose führt [Herold, 2013]. Auch hier verdeutlichen die Zahlen der Todesfälle an einem akuten Myokardinfarkt dessen klinische Relevanz: 2011 starben 7,0 % aller verstorbenen Männer und 5,3 % aller verstorbenen Frauen an einem akuten Herzinfarkt. Damit stellte der akute Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache im Jahr 2011 dar [Statistisches Bundesamt, 2012].

Besondere Bedeutung in Bezug auf die Letalität kommt den ersten Minuten und Stunden nach dem Infarkt ereignis zu, da diese mit dem höchsten Sterberisiko verbunden sind. Während der ersten Stunde sterben etwa 25 % aller Betroffenen [Loewel, 2006].

Ein wichtiger Grund für die hohe Sterblichkeit sind Herzrhythmusstörungen, die als häufigste Frühkomplikation bei Myokardinfarkt in 95 % der Fälle auftreten [Herold, 2013]. Dazu zählen besonders ventrikuläre Extrasystolie, Kammertachykardie und Kammerflimmern [Dhein und Stark, 2008], wobei letzteres am häufigsten innerhalb der ersten Stunde nach dem Infarkt auftritt [Stühlinger, 2003]. Todesfälle, die durch plötzlichen Herztod bei Infarkt verursacht wurden, können zu 80 % auf ventrikuläre Herzrhythmusstörungen zurückgeführt werden [Herold, 2013]. Dies verdeutlicht die bedeutende Rolle dieser Frühkomplikation. Dabei ist unbestritten, dass eine akute myokardiale Ischämie mitverantwortlich ist für die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen. Bereits „1841/1842 fand Erichsen durch die Koronarligatur von Hundeherzen einen Zusammenhang zwischen dem Verschluss von Koronararterien und Kammerflimmern“ [Wit und Janse, 1993].

Umso entscheidender für die Überlebenschance ist die möglichst frühe Behandlung, um letale ventrikuläre Arrhythmien zu verhindern. Die intravenöse Gabe von Betablockern stellt eine potente Therapie dar, um das Auftreten von Kammerflimmern in der Akutphase zu reduzieren [Ryden et al., 1983; Rossi et al., 1983; Herold, 2013]. Des Weiteren zählen elektrische Kardioversion, intravenös verabreichtes Amiodaron, Lidocain oder Sotalol und Defibrillation zu den antiarrhythmischen Maßnahmen in der Frühphase [Steg et al., 2012]. Problematisch bei allen genannten Therapieformen ist, dass sie möglichst früh angewendet werden müssen und dafür eine entsprechend ausgebildete Person wie beispielsweise ein Notarzt anwesend sein muss.

Es gibt vielversprechende Forschungsansätze, die eine neue synthetisch hergestellte Substanz als Therapie in Aussicht stellen. Diese soll präventiv regelmäßig eingenommen werden, um im Falle eines Myokardinfarktes Herzrhythmusstörungen zu verhindern. Es handelt sich dabei um NO₂-FAs. Die

endogene Synthese der NO₂-FAs, sowie deren protektive Effekte auf den Herzmuskel wurden in einem in-vivo-Modell myokardialer Ischämie und Reperfusion gezeigt [Rudolph et al., 2010b]. Dabei wurde Wildtyp-Mäusen für 30 Minuten die linke Koronararterie ligiert und nach weiteren 30 Minuten Reperfusion konnten die endogen gebildeten nitrierten Fettsäuren OA-NO₂ und Nitro-Linolsäure (LNO₂) gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden in Mäusen, die ohne Durchführung von Manipulationen operiert wurden oder bei denen der 30-minütigen Ischämie keine Reperfusion folgte, keine NO₂-FAs detektiert. In weiteren Experimenten wurden die Tiere in 3 Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Der ersten Versuchsgruppe wurde 3 Tage vor Ischämie / Reperfusion synthetisches OA-NO₂ intraperitoneal injiziert, der zweiten Gruppe 15 Minuten vor Reperfusion und der dritten Versuchsgruppe direkt vor Beginn der Reperfusion. Nach 24 Stunden Reperfusion zeigten sich in allen 3 Versuchsgruppen eine signifikante Reduktion der myokardialen Infarktgröße und die Erhaltung der linksventrikulären Pumpfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der 3 Gruppen, die zu unterschiedlichen Zeiten mit OA-NO₂ behandelt wurden, gab es keine signifikanten Unterschiede. Als einen zugrunde liegenden Hauptmechanismus wurde die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells) durch posttranslationale Modifikation der p65-Untereinheit durch OA-NO₂ identifiziert [Rudolph et al., 2010b]. Aufgrund dieser Ergebnisse und den Reaktionseigenschaften von NO₂-FAs wird ein protektiver Einfluss dieser Verbindungen auf die Arrhythmieentstehung infolge einer myokardialen Ischämie vermutet.

2.2 Elektrophysiologie

Zum besseren Verständnis der elektrophysiologischen Effekte der NO₂-FAs wird die zugrunde liegende Elektrophysiologie der ventrikulären Herzmuskelzelle erklärt. Um den Angriffsort von NO₂-FAs in den Kontext der Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie einordnen zu können, werden im Folgenden die dafür verantwortlichen Mechanismen erläutert.

2.2.1 Aktionspotential

Grundlage jeder Kontraktion des Herzmuskels ist die elektrische Erregung, die sich in koordinierter Form über das Herz ausbreitet. Sie besteht aus APs der Herzmuskelzellen, die durch das Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle in der Zellmembran entstehen [Bakker und Rijen, 2010]. Die Fortleitung dieser APs erfolgt über Kanalproteine, sogenannte Gap junctions, welche die Zellen elektrisch miteinander verbinden [Kanno und Saffitz, 2001]. Das Herz besteht aus verschiedenen Typen von Kardiomyozyten, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausstattung mit Ionenkanälen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden [Bakker und Rijen, 2010]. Die Kardiomyozyten werden entsprechend ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften eingeteilt in Zellen des Sinusknotens, Vorhofmyokards, Atrioventrikulären-Knotens (AV-Knoten), spezifischen ventrikulären Reizleitungssystems (His-Bündel, Tawara-Schenkel, Purkinje-Faser) oder Kammermyokards [Seidl und Senges, 1999].

Nachfolgend wird das AP der Kardiomyozyten aus dem Ventrikelmyokard des Menschen beschrieben, da von diesen Zellen ventrikuläre Tachyarrhythmien ausgehen können [Pastore et al., 1999; Diaz et al., 2004; Belevych et al., 2009]. Das Ruhemembranpotential des Arbeitsmyokards liegt zwischen -60 mV und -90 mV [Bakker und Rijen, 2010]. Hervorgerufen wird es durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulären Raum, die

zur Diffusion der Ionen über die Membran führt. Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz, die der Diffusion entgegenwirkt und schließlich zum elektrochemischen Gleichgewicht führt. Da im Ruhezustand nur Kaliumkanäle geöffnet sind, wird das Potential hauptsächlich durch die intra- und extrazelluläre Kaliumkonzentration bestimmt [Jaye et al., 2010].

Ein typisches ventrikuläres AP des Menschen wird ausgelöst, wenn das Membranpotential durch einen Depolarisationsstrom, wie er normalerweise von benachbarten erregten Zellen erzeugt wird, auf einen Schwellenwert um -60 mV angehoben wird. Bei dieser Membranspannung öffnen sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle. Dadurch kommt es zum Einstrom von Natrium (I_{Na}) und das Membranpotential wird zu dem Wert des Natriumgleichgewichts um +20 mV verschoben [Bakker und Rijen, 2010]. Diese Depolarisationsphase dauert 1 ms bis 2 ms und wird als *Phase 0* bezeichnet. Der positivste Wert, den das Membranpotential während dieser Phase annimmt, wird als Overshoot bezeichnet. Kurz nach dem Öffnen der Natriumkanäle werden diese inaktiviert und bei Werten von -60 mV bis -70 mV wieder aktivierbar. Somit ist die Zelle erst dann wieder erregbar. Zusätzlich kommt es zu einer ersten Repolarisation durch transiente Auswärtsströme (I_{To}), die mit einem Einschnitt des AP korrelieren [Seidl und Senges, 1999]. Diese beiden Prozesse definieren die initiale Repolarisation (*Phase 1*) [Bakker und Rijen, 2010]. Im Vergleich zu Neuronen besitzt das AP der Kardiomyozyten eine Plateauphase [Jaye et al., 2010]. Während dieser Phase bleibt das Membranpotential für mehrere hundert Millisekunden über 0 mV [Seidl und Senges, 1999]. Die Plateauphase (*Phase 2*) wird durch einen langsamen Einstrom von Calcium über die L-Typ Calciumkanäle ($I_{Ca,L}$) aufrechterhalten, wobei es ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Depolarisations- und Repolarisationsströmen gibt. *Phase 3* beschreibt die terminale schnelle Repolarisation, welche aus der Inaktivierung der Depolarisationsströme und Erhöhung der Leitfähigkeit der „delayed rectifier“ Kaliumkanäle resultiert. Diese schnell und langsam verzögerten Kaliumauswärtsströme (I_{Kr} , I_{Ks}) bringen das Membranpotential auf die anfänglichen Ruhewerte von -60 mV bis -90 mV

zurück [Bakker und Rijen, 2010]. Das Ruhemembranpotential wird durch den Kaliumhintergrundstrom (I_{K1}) aufrechterhalten und als *Phase 4* bezeichnet [Seidl und Senges, 1999]. In Abbildung 1 ist ein AP einer ventrikulären Kardiomyozyte des Menschen mit den einzelnen Phasen und Ionenströmen dargestellt.

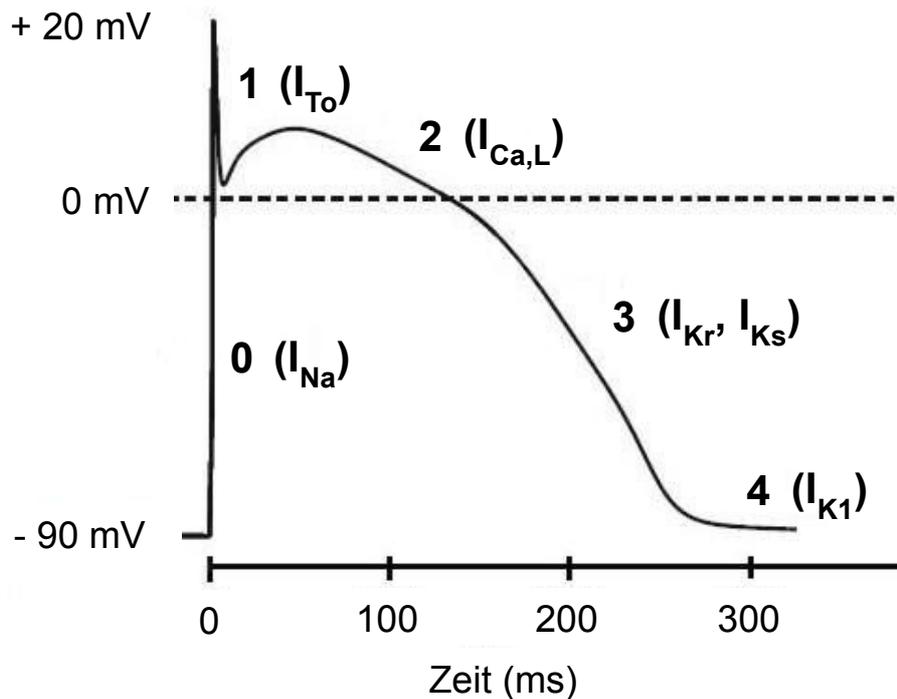


Abbildung 1: Aktionspotential ventrikuläre Kardiomyozyte des Menschen

Es sind die Phasen des AP (Zahlen) und die Ionenströme während der jeweiligen Phase dargestellt.

Quelle: Bakker und Rijen, 2010

Ein weiteres Merkmal eines AP ist die Dauer. Das AP von Zellen aus dem Ventrikelmyokard des Menschen umfasst 200 ms bis 300 ms [Jaye et al., 2010]. Funktionell ist eine lange Aktionspotentialdauer (APD) wichtig, um eine frühzeitige Wiedererregung zu vermeiden, sowie die Amplitude und Dauer der Kontraktion zu steuern [Seidl und Senges, 1999]. Während der absoluten Refraktärzeit kann kein erneutes AP ausgelöst werden. Die absolute

Refraktärzeit umfasst die Plateauphase bis zum Beginn der späten Repolarisationsphase. Davon abzugrenzen ist die relative Refraktärzeit, in der die Zelle erregbar ist, aber größere Schwellenreize erforderlich sind, um APs auszulösen [Jaye et al., 2010]. Durch Frequenzerhöhung verkürzt sich das AP, da die Leitfähigkeit der „delayed rectifier“ Kaliumkanäle erhöht wird. Gleichzeitig verkürzt sich dadurch die absolute Refraktärzeit [Seidl und Senges, 1999].

2.2.2 Elektro-mechanische Kopplung

Während des Natriumeinstroms in der Depolarisationsphase werden ab einem Membranpotential von -40 mV L-Typ Calciumkanäle aktiviert [Bakker und Rijen, 2010]. Diese sorgen für einen lang anhaltenden Calciumeinstrom und induzieren die elektro-mechanische Kopplung [Seidl und Senges, 1999]. Der Einstrom von Calcium in das Zytosol führt zu einer „Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung“, indem die Calciumionen an die nahegelegenen Calciumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) binden und diese durch Konformationsänderung öffnen. Durch die Freisetzung des Calciums aus dem SR steigt die Calcium-Konzentration im Zytosol von 0,1 μM auf 1,0 μM bis 1,3 μM an [Bers, 2002].

Ein einzelner sarkoplasmatischer Calciumkanal ist ein makromolekularer Komplex, der aus 4 identischen Ryanodin-Rezeptor-Proteinen, Stabilisierungsproteinen, Phosphatasen und anderen Proteinen wie Calsequestrin, Triadin und Junctin besteht [Laurita und Rosenbaum, 2008]. Aufgrund der Affinität des sarkoplasmatischen Calciumkanals zu dem Insektizid Ryanodin wird dieser auch Ryanodin-Rezeptor (RyR) genannt [Pessah et al., 1985]. Die im Herzmuskel vorkommende Isoform ist der RyR2 [Balshaw et al., 2001].

Die freigesetzten Calciumionen binden an Troponin C des Aktinfilaments und es kommt zur Interaktion zwischen Aktin und Myosin, woraus die Kontraktion des Kardiomyozyten resultiert [Jaye et al., 2010]. Dabei ist die Stärke der Kontraktion abhängig von der freigesetzten Calcium-Menge und der Calcium-Sensitivität der Myofilamente [Bers, 2002]. Durch Einstülpungen der

Zellmembran entstehen sogenannte Transversal-Tubuli, über welche die Erregung in tiefer liegende Abschnitte der Muskelzelle geleitet und eine synchrone Calcium-Freisetzung sowie Kontraktion gewährleistet wird. Für die Relaxation der Zelle muss die intrazelluläre Calcium-Konzentration wieder auf den diastolischen Wert gesenkt werden [Laurita und Rosenbaum, 2008]. Dazu werden die Calciumionen entweder über den Natrium-Calcium-Austauscher in den Extrazellularraum transportiert oder über die sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase (SERCA) in das SR befördert [Jaye et al., 2010]. Die resultierende Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration während der Systole und Diastole wird als Calcium-Transient bezeichnet.

2.2.3 Reentry-Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie

Durch akute myokardiale Ischämie können sich ventrikuläre Tachyarrhythmien entwickeln, die auf einer kreisenden Erregung (Reentry-Arrhythmien) beruhen. Klinisch manifestieren sich die Reentry-Arrhythmien als Kammertachykardie und Kammerflimmern [Dhein und Stark, 2008]. Die Kammertachykardie ist charakterisiert durch eine Herzfrequenz zwischen 100 und 200 Schläge pro Minute und es besteht die Gefahr der Degeneration in Kammerflimmern. Kammerflimmern ist gekennzeichnet durch eine Herzfrequenz größer als 320 Schläge pro Minute, sowie oberflächenelektrokardiographisch durch wechselnde Zykluslänge und Morphologie. Dadurch kann keine koordinierte Kontraktion der Kammern erfolgen, die Blutförderung sinkt drastisch und es kommt zum Kreislaufstillstand [Herold, 2013].

Eine kreisende Erregung entsteht, wenn die Depolarisationsfront die Repolarisation der vorangegangenen Erregung erreicht [Dhein und Stark, 2008]. Dies bedeutet, dass Gewebe von demselben Impuls wiedererregt wird. Grundlage ist ein anatomisches oder funktionelles Hindernis an dem die Erregungsfront abgelenkt wird (unidirektionaler Block). Stattdessen folgt die Erregung einer anderen Leitungsbahn und aktiviert schließlich den in der Zwischenzeit erregbar gewordenen Blockbereich retrograd [Seidl und

Senges, 1999]. Voraussetzung für das Fortbestehen der kreisenden Erregung ist, dass die Wellenlänge (Produkt aus Fortleitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit) des Impulses nur geringfügig kleiner ist als die Bahnlänge. Bei einer kurzen Wellenlänge ist die Entstehung eines Reentrys wahrscheinlicher. Folglich begünstigen verringerte Fortleitungsgeschwindigkeiten und eine verkürzte APD oder Refraktärzeit die Entstehung von Reentry-Kreisen [Dhein und Stark, 2008]. In Abbildung 2 ist zur Veranschaulichung des Pathomechanismus der Verlauf einer Erregung bei normaler Reizleitung und bei einem unidirektionalen Block, mit daraus resultierendem Reentry, dargestellt.

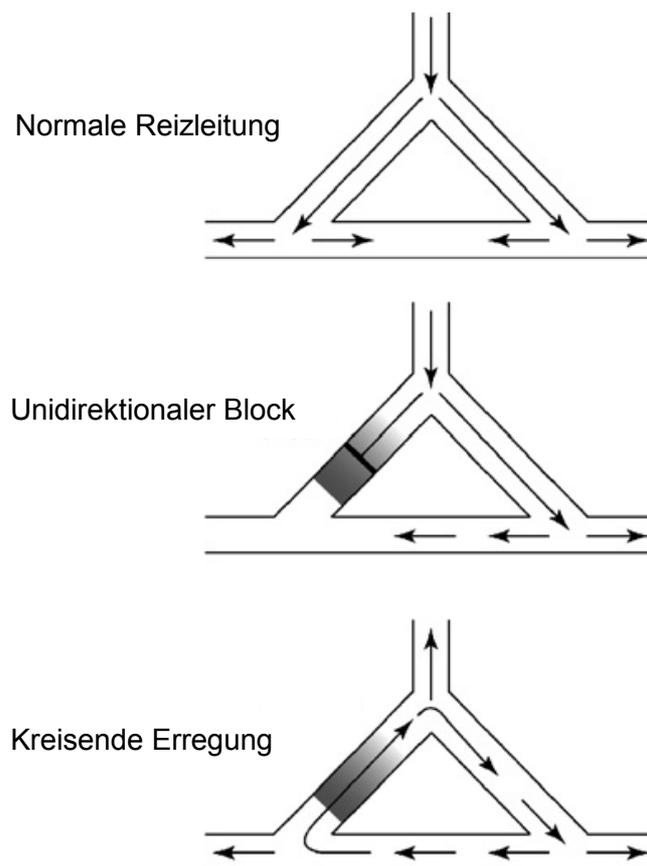


Abbildung 2: Kreisende Erregung

Dargestellt ist schematisch eine normale Reizleitung und eine kreisende Erregung, die durch einen unidirektionalen Block verursacht ist.

Quelle: Den Ruijter et al., 2007

Der Entstehung von Herzrhythmusstörungen liegen zunächst arrhythmische Veränderungen an der Einzelzelle zugrunde, die auf den gesamten Zellverband übertragen werden [Dhein und Stark, 2008]. Pastore et al. (1999) zeigten, dass die Ursache von Kammerflimmern Unterschiede in der APD zwischen benachbarten Zellen sind. Sie stellten fest, dass bei schnelleren Frequenzen die Membranrepolarisation in benachbarten Zellen nicht mehr phasengleich stattfindet. Dies wird als räumlich diskordanter Alternans bezeichnet. Eine geringe Steigerung der Stimulationsfrequenz führt unter diesen Bedingungen zu der Ausbildung eines unidirektionalen Blocks, kreisender Erregung und somit zum Kammerflimmern [Pastore et al., 1999]. Des Weiteren wurde das Auftreten eines räumlich diskordanten APD-Alternans nach 2 bis 4 Minuten Ischämie gezeigt [Qian et al., 2003].

Bereits 1988 beobachteten Lee et al. in Herzen von Hasen einen Alternans des zytosolischen Calcium-Transienten (Calcium-Alternans), der nach 2 bis 3 Minuten Ischämie sichtbar wurde. Schließlich konnte gezeigt werden, dass der Calcium-Alternans dem APD-Alternans zugrunde liegt [Pruvot et al., 2004; Goldhaber et al., 2005]. Der Calcium-Alternans beruht auf Fluktuationen der Calcium-Menge, die vom SR freigesetzt wird [Diaz et al., 2004]. Wobei die Ursache für diese Fluktuationen kontrovers diskutiert wird [Shiferaw et al., 2003; Diaz et al., 2004; Picht et al., 2006]. Richtungsweisend für den zugrunde liegenden Mechanismus sind Ergebnisse aus in-vivo-Versuchen, die unter pathophysiologischen Bedingungen von Belevych et al. (2009) durchgeführt wurden. In Hunden wurden Myokardinfarkte induziert und unter Belastungsbedingungen die Anfälligkeit für die Entwicklung von Kammerflimmern beobachtet. Nach sieben Tagen wurden kardiales Gewebe und Kardiomyozyten von den behandelten Hunden, die Kammerflimmern entwickelt haben, isoliert und mit denen gesunder Hunde verglichen. Die isolierten Zellen der kranken Tiere zeigten das Auftreten eines Calcium-Alternans bereits bei niedrigeren Stimulationsfrequenzen als die Zellen der Kontrolltiere. Als Ursache für die Entstehung des Calcium-Alternans wurde eine erhöhte RyR2-Aktivität festgestellt, die zu einer erhöhten Abhängigkeit der

Calcium-Freisetzungsrates von der Calcium-Menge im SR führt. Ursächlich für die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 ist die vermehrte Oxidation der freien Thiole des Rezeptorproteins durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Konzentration von ROS war in den postischämischen Zellen im Vergleich zu den gesunden Zellen doppelt so hoch [Belevych et al., 2009].

2.3 Nitrierte Fettsäuren

Durch die Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit $\cdot\text{NO}$ - und NO_2^- -abgeleiteten Verbindungen kommt es zur Formierung von NO_2 -FAs [Freeman et al., 2008]. Diese Verbindungen könnten aufgrund ihrer spezifischen Reaktionsfähigkeit an den RyR2 binden und damit eine Aktivierung durch ROS, die vermehrt bei Ischämie entstehen und zu Arrhythmien führen können, verhindern. Damit stellen sie ein potentiell Mittel zur Vermeidung von Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie dar. Im Folgenden werden die Eigenschaften der NO_2 -FAs in Bezug auf ihre Bildung, Wirkungen und ihren antiarrhythmischen Einfluss erläutert. Anschließend wird anhand anderer Antiarrhythmika die Beurteilbarkeit des proarrhythmogenen Potentials von NO_2 -FAs als Voraussetzung für die therapeutische Anwendung verdeutlicht.

2.3.1 Endogene Bildung nitrierter Fettsäuren

Nachdem die Nitrierung von Lipiden nur in Modellstudien zur Untersuchung von Luftverschmutzung beobachtet wurde [Gallon und Pryor, 1994], zeigten weitere Versuche, dass die Nitrierung von ungesättigten Fettsäuren auch endogen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen möglich ist. Beispielsweise führt $\cdot\text{NO}$ bei peroxyradikal-induzierten Radikalkettenreaktionen zum Kettenabbruch, wobei NO_2 -FAs als Endprodukte entstehen [Rubbo et al., 1994; Rubbo et al., 1995]. Freeman et al. (2008) fanden schließlich weitere Reaktionen, auf denen die endogene Bildung der NO_2 -FAs beruht. An der Nitrierung von ungesättigten Fettsäuren sind $\cdot\text{NO}$, reaktive Stickstoffspezies

(RNS, wie z.B. Peroxynitrit (ONOO^-) und Stickstoffdioxid ($\cdot\text{NO}_2$)) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, wie z.B. Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Lipidperoxyradikale (LOO^\cdot)) beteiligt, die über verschiedene Mechanismen reagieren. Dabei weisen sie als Gemeinsamkeit die homolytische Addition von $\cdot\text{NO}_2$ an eine Doppelbindung des Alkens auf. In diesem ersten schnellen und reversiblen Schritt der Fettsäurenitrierung entsteht ein β -Nitroalkylradikal. In einem hydrophoben Milieu ist die Löslichkeit von $\cdot\text{NO}$ und verwandten Stickoxiden relativ hoch, so dass aus den Radikalen NO_2 -FAs hervorgehen [Freeman et al., 2008]. Dabei entsteht eine Vielzahl an Konstitutions- und Stereoisomeren [Baker et al., 2005]. Im Gegensatz dazu ist die Löslichkeit von $\cdot\text{NO}$ und verwandten Verbindungen in einem hydrophilen Milieu gering und die Nitrierung der β -Nitroalkylradikale weniger effizient [Freeman et al., 2008]. Die langsame und irreversible Abstraktion eines allylischen Wasserstoffradikals durch $\cdot\text{NO}_2$ überwiegt, wodurch eine Kettenreaktion initiiert wird und es zur Bildung von Peroxidationsprodukten kommt [Pryor und Lightsey, 1981]. Unter sauerstoffarmen Bedingungen, wie beispielsweise bei Ischämie, ist das Gleichgewicht zwischen Lipidperoxyradikalbildung und Fettsäurenitrierung zu Gunsten der Nitrierungsreaktionen verschoben [Freeman et al., 2008]. Bisher konnten die nitrierten Fettsäuren OA- NO_2 , L NO_2 , Nitro-Linolensäure, Nitro-Palmitoleinsäure, Nitro-Arachidonsäure und Nitro-Eicosapentaensäure in gesunden Menschen nachgewiesen werden [Baker et al., 2004; Baker et al., 2005]. OA- NO_2 stellt die häufigste nitrierte Fettsäure im lebenden Organismus dar und wurde im menschlichen Plasma mit Konzentrationen im picomolaren Bereich gemessen [Baker et al., 2005; Tsikas et al., 2009]. In Abbildung 3 ist die Strukturformel von OA- NO_2 gezeigt.

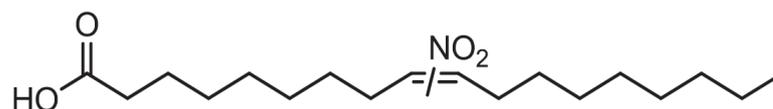


Abbildung 3: Strukturformel von OA- NO_2

Quelle: Geisler und Rudolph, 2012

2.3.2 Wirkungen nitrierter Fettsäuren

NO₂-FAs besitzen eine einzigartige chemische Reaktionsfähigkeit, die vielfältige Zellsignalabläufe unterstützt. Sie vermitteln sowohl rezeptorabhängige als auch rezeptorunabhängige Reaktionen. Zentral für ihre rezeptorunabhängige Reaktionsfähigkeit ist ihre Elektrophilie, die aus der chemischen Struktur resultiert: NO₂-FAs besitzen eine Nitrogruppe, die an ein Kohlenstoffatom der ungesättigten Fettsäure gebunden ist. Dieses Kohlenstoffatom befindet sich in einer Doppelbindung. Die Nitrogruppe ist stark elektronenziehend und entzieht dem anderen sich in der Doppelbindung befindenden Kohlenstoffatom ein Elektron. Dadurch wird das elektronenarme Kohlenstoffatom stark elektrophil. Diese Konfiguration begünstigt die Michael-Additionsreaktion bei der das angreifende Reagenz nukleophil sein muss [Freeman et al., 2008]. Gut geeignete Reaktionspartner sind beispielsweise nukleophile Aminosäuren, wobei den Cysteinresten aufgrund des Thiolatanions große Bedeutung zukommt [Baker et al., 2007]. Diese Reaktion, bei der eine kovalente Bindung zwischen dem elektrophilen Kohlenstoffatom der NO₂-FA und dem nukleophilen Thiolatanion entsteht, wird als Nitroalkylierung bezeichnet [Freeman et al., 2008].

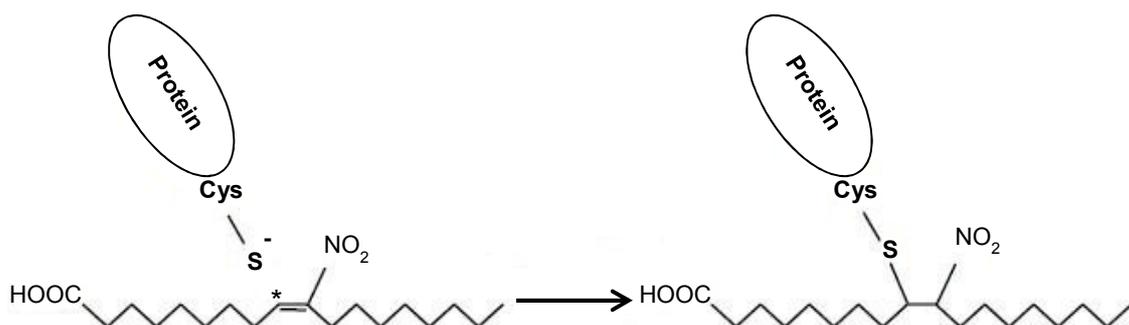


Abbildung 4: Nitroalkylierung

Dargestellt ist die Reaktion zwischen dem Thiolatanion des Cysteinrests eines Proteins und OA-NO₂.

Quelle: Geisler und Rudolph, 2012

Die Nitroalkylierung von Proteinen durch NO₂-FAs spielt im Rahmen der Zellsignaltransduktion eine Rolle. Vorwiegend über die posttranslationale Modifikation greifen NO₂-FAs in die Zellsignalabläufe ein. Es gibt viele funktionelle Proteine, die über Thiole und andere nukleophile Reste verfügen und somit über deren Modifikation signifikant beeinflusst werden können. Aufgrund der Reversibilität der Nitroalkylierung erfüllen NO₂-FAs ein notwendiges Merkmal von Signalmediatoren [Freeman et al., 2008].

NO₂-FAs verfügen durch die Beeinflussung verschiedener Zellsignalwege über anti-entzündliche Eigenschaften [Coles et al., 2002; Ferreira et al., 2009; Wright et al., 2009; Kansanen et al., 2011; Villacorta et al., 2013]. Es wurden bereits mehrere Transkriptionsfaktoren und Signalmediatoren identifiziert, die am Entzündungsprozess beteiligt sind und durch Nitroalkylierung modifiziert werden können. Dazu zählt die Aktivierung des nukleären PPAR_γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor) durch LNO₂. Der aktivierte Rezeptor steuert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Regulation des Glucosestoffwechsels, Lipidmetabolismus und der Inflammation beteiligt sind [Baker et al., 2005; Schopfer et al., 2005]. Des Weiteren inhibieren OA-NO₂ und LNO₂ den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF-κB. Durch Nitroalkylierung verhindern sie die Bindung von NF-κB an die DNA (deoxyribonucleic acid) und somit die Expression von entzündungsfördernden Genen [Cui et al., 2006]. Ferner führt OA-NO₂ über die Aktivierung der Hitze-Schock-Faktoren 1 und 2 zu der Hitze-Schock-Antwort, die anti-inflammatorische und zytoprotektive Reaktionen vermittelt. Der genaue Aktivierungsweg ist nicht bekannt, da der Hitze-Schock-Faktor 1 jedoch über mehrere Cysteinreste verfügt, ist die posttranslationale Modifikation durch Nitroalkylierung denkbar [Kansanen et al., 2009]. Ein weiterer Aspekt, wie NO₂-FAs einschränkend in den Entzündungsprozess eingreifen, ist die Regulation von Matrix-Metalloproteasen [Bonacci et al., 2011]. Des Weiteren stellen inflammatorische Prozesse einen bedeutenden Faktor bei der Entstehung und Progression von Atherosklerose dar. In einem Mausmodell der Atherosklerose wurde gezeigt, dass NO₂-FAs in diesen chronischen

Entzündungsprozess eingreifen und über unterschiedliche Mechanismen anti-atherosklerotisch wirken [Rudolph et al., 2010a].

Darüber hinaus weisen NO₂-FAs weitere vaskuloprotektive Eigenschaften auf. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor2) hemmt LNO₂ die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Dieser Mechanismus weist darauf hin, dass NO₂-FAs einen regulatorischen Einfluss auf die Pathogenese vaskulärer Erkrankungen haben [Villacorta et al., 2007]. Des Weiteren verhindert OA-NO₂ einen durch Angiotensin II vermittelten Bluthochdruck. In Mäusen wurde gezeigt, dass OA-NO₂ als nichtkompetitiver Antagonist an den AT₁-Rezeptor (Angiotensin II Typ 1 Rezeptor) bindet und eine Vasokonstriktion durch Angiotensin II unterdrückt [Zhang et al., 2010].

2.3.3 Antiarrhythmischer Effekt nitrierter Fettsäuren im Rahmen myokardialer Ischämie

Es gibt Hinweise darauf, dass NO₂-FAs Arrhythmien infolge einer Myokardischämie verhindern können. Grundlage sind Beobachtungen, dass alkylierende Substanzen sowohl zur Inhibition des RyR führen als auch die Aktivierung des RyR durch Oxidantien verhindern können [Aghdasi et al., 1997; Porter et al., 1999]. Somit könnte die Entstehung des unter Kapitel 2.2.3 beschriebenen Calcium-Alternans verhindert werden, sowie der darauf beruhende APD-Alternans und schließlich die Reentry-Arrhythmie.

Der aus vier Proteinuntereinheiten bestehende RyR verfügt über 84 freie Thiole [Xu et al., 1998] und stellt dadurch ein hochsensitives Target für oxidative Modifikationen dar. Diese oxidativen Veränderungen können zu Konformationsänderungen der Kanalproteine führen und somit deren Funktion beeinflussen, indem sie beispielsweise das Ausmaß der Kanalöffnung oder die Sensitivität gegenüber Effektoren wie Calcium, Magnesium oder ATP modifizieren [Zissimopoulos und Lai, 2006]. Wie bereits geschildert, wiesen Belevych et al. (2009) eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RyR2 aufgrund einer vermehrten Oxidation der freien Thiole durch ROS nach. ROS wie H₂O₂

werden unter ischämischen Bedingungen, aber verstärkt auch durch die Reperfusion des ischämischen Herzgewebes, gebildet [Zweier et al., 1987]. Favero et al. (1995) beobachteten denselben Effekt von H_2O_2 auf den RyR der Skelettmuskulatur (RyR1) und die Reversibilität dieser Stimulation durch thiolreduzierende Reagenzien. Als Ursache für die erhöhte RyR-Aktivität zeigten sie, dass die RyR-Untereinheiten große Proteinkomplexe bilden, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Durch Oxidation der freien Thiole kommt es zur Bildung dieser Disulfidbrücken und somit zur Konformationsänderung des Rezeptorproteins [Favero et al., 1995; Anzai et al., 2000].

Für den RyR1 wurde dessen Inhibition durch das alkylierende Reagenz N-Ethylmaleinimid gezeigt. N-Ethylmaleinimid reagiert mit freien Thiolen, bildet aber keine Disulfidbrücken aus. Es wurde ein triphasischer Effekt auf den RyR1 beobachtet, bei dem es in der ersten Phase zu einer Inhibition der Kanalaktivität kommt, in der zweiten Phase (3 bis 10 Minuten) zu einer Aktivierung und in der dritten Phase wieder zu einer Inhibition [Aghdasi et al., 1997]. Entscheidend dabei ist, dass während der ersten Phase N-Ethylmaleinimid die durch Oxidantien hervorgerufene Disulfidbrückenbildung zwischen den Rezeptoruntereinheiten und die damit einhergehende Konformationsänderung verhindern kann [Aghdasi et al., 1997; Porter et al., 1999]. Somit wird der RyR1 vor einer Stimulation durch Oxidantien geschützt. Da der skelettale und myokardiale RyR hoch homologe Isoformen sind [Shoshan-Barmatz und Ashley, 1998], kann ein ähnlicher Einfluss alkylierender Substanzen auf die Kanalaktivität des RyR2 angenommen werden. Aufgrund der Eigenschaft der NO_2 -FAs freie Thiole zu nitroalkylieren ist eine Bindung der NO_2 -FAs an den RyR2 möglich. Dadurch könnten sie zu einer direkten Inhibition des RyR2 führen, als auch vor der stimulierenden Wirkung von Oxidantien schützen. Unterstützt wird diese Annahme durch bisher unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe geführt von PD Dr. Rudolph des Cardiovascular Research Centers am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg (nun aktuell am Herzzentrum der Uniklinik Köln). Als Hinweis auf die Bindung der NO_2 -FAs an den RyR2 wiesen sie eine Abnahme der freien Thiole am RyR2 nach.

2.3.4 Ausschluss einer Proarrhythmie durch nitrierte Fettsäuren

Die in Kapitel 2.3.2 erläuterten Interaktionen mit verschiedenen funktionellen Proteinen sind ein Zeichen dafür, dass NO₂-FAs sehr reaktiv sind und viele Angriffsziele haben können. Folglich müssen weitere Angriffsorte neben dem RyR2 ausgeschlossen werden, da Interaktionen mit Ionenkanälen die Elektrophysiologie der Herzmuskelzelle verändern und Arrhythmien verursachen können [Dhein und Stark, 2008]. Besonders unter dem Gesichtspunkt der späteren Anwendung der NO₂-FAs als Prophylaktikum muss der Einfluss auf die Elektrophysiologie der nativen Kardiomyozyte bekannt sein, um das proarrhythmogene Potential der synthetisierten Substanz beurteilen zu können.

Unter Proarrhythmie wird die Verstärkung bestehender Arrhythmien oder das Neuauftreten von Arrhythmien unter antiarrhythmischer Therapie verstanden [Dhein und Stark, 2008]. Es werden zwei Pathomechanismen, die tachykarden Herzrhythmusstörungen zugrunde liegen, unterschieden: Abnorme Erregungsleitung (kreisende Erregung) und abnorme Erregungsbildung (gesteigerte Automatie, abnorme Automatie, getriggerte Aktivität). Klinisch relevante Arrhythmien werden überwiegend durch kreisende Erregung und getriggerte Aktivität ausgelöst [Seidl und Senges, 1999]. Die Pathogenese einer kreisenden Erregung wurde in Kapitel 2.2.3 erläutert. An den folgenden antiarrhythmischen Medikamenten werden beispielhaft die ursächlichen Mechanismen einer getriggerten Aktivität verdeutlicht.

Antiarrhythmika der Klasse Ia, wie Chinidin, hemmen den Natriumeinstrom durch den schnellen Natriumkanal, wodurch die Aufstrich- und Fortleitungsgeschwindigkeit abnehmen. Durch die Verlängerung der relativen Refraktärzeit und der Überführung eines unidirektionalen in einen bidirektionalen Block werden Reentry-Kreise unterbrochen [Dhein und Stark, 2008]. Des Weiteren prolongieren sie die Dauer des AP durch die begleitende Hemmung repolarisierender Kaliumströme [Gillis, 2004; Dhein und Stark, 2008]. Während langsamer Herzfrequenzen wird die APD jedoch deutlich verlängert und die Entwicklung früher Nachdepolarisationen ist stark begünstigt. Frühe

Nachdepolarisationen entstehen während der verzögerten Repolarisation und setzen sich in Form einer oder mehrerer Entladungen auf das AP auf [Seidl und Senges, 1999]. Es handelt sich dabei um Depolarisationen, die vorrangig auf dem Wiederöffnen von L-Typ Calciumkanälen beruhen [Clusin, 2003]. Diese Oszillationen des Membranpotentials können einige Formen von ventrikulären Tachykardien verursachen. [Seidl und Senges, 1999]. Des Weiteren wird durch die Verminderung der Fortleitungsgeschwindigkeit und die damit verkürzte Wellenlänge des Impulses die Entstehung von kleinen Reentry-Kreisen ermöglicht. Das erhöhte proarrhythmogene Potential von Chinidin ist bekannt und führte zu Anwendungsbeschränkungen [Dhein und Stark, 2008].

Ein weiteres Beispiel sind Antiarrhythmika der Klasse III, zu denen Sotalol zählt. Über die Hemmung der „delayed rectifier“ Kaliumkanäle wird das AP und die absolute Refraktärzeit verlängert, wodurch Reentry-Kreise unterbrochen werden [Smith und Cain, 2004]. Aber auch bei dieser Medikamentenklasse können frühe Nachdepolarisationen aus der APD-Verlängerung resultieren und für den proarrhythmogenen Effekt verantwortlich sein [Seidl und Senges, 1999]. Sotalol kann durch die medikamentös induzierte Repolarisationsverlängerung zu einem Long-QT-Syndrom führen, das mit Torsade-de-Pointes-Tachykardien assoziiert ist [Yap und Camm, 2003]. Die SWORD-Studie (Survival With ORal D-sotalol), die den Effekt von D-Sotalol auf die Mortalität von Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Placebo untersuchte, musste wegen Übersterblichkeit unter D-Sotalol abgebrochen werden. Als Ursache für die erhöhte Sterblichkeit wurden Arrhythmien vermutet [Waldo et al., 1996]. Ein Long-QT-Syndrom kann durch eine Vielzahl von Medikamenten induziert sein oder auf seltenen angeborenen Ionenkanalfunktionsstörungen beruhen [Dhein und Stark, 2008]. Es handelt sich bei der QT-Intervall-Verlängerung durch Medikamente um ein bedeutendes Problem. Daher gibt es Vorgaben bezüglich der Überprüfung der Sicherheit der neuen Substanzen während der präklinischen und klinischen Arzneimittelentwicklung [Yap und Camm, 2003].

Des Weiteren können überdosierte Digitalisglykoside Arrhythmien auslösen. Ursächlich ist eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration, die während schneller Herzfrequenzen späte Nachdepolarisationen begünstigt. Das erhöhte diastolische Calciumlevel induziert spontane Calcium-Freisetzen aus dem SR und das Auftreten transientser einwärtsgerichteter Natriumströme, auf denen diese getriggerte Aktivität beruht [Seidl und Senges, 1999; Baartscheer et al., 2003]. Späte Nachdepolarisationen können zu ventrikulären Extrasystolen und Arrhythmien führen [Seidl und Senges, 1999; Dhein und Stark, 2008].

In Abbildung 5 sind zur Veranschaulichung eine frühe und späte Nachdepolarisation dargestellt. Nachdepolarisationen führen zu getriggelter Aktivität, welche ein wichtiges pathogenetisches Prinzip von Herzrhythmusstörungen ist.

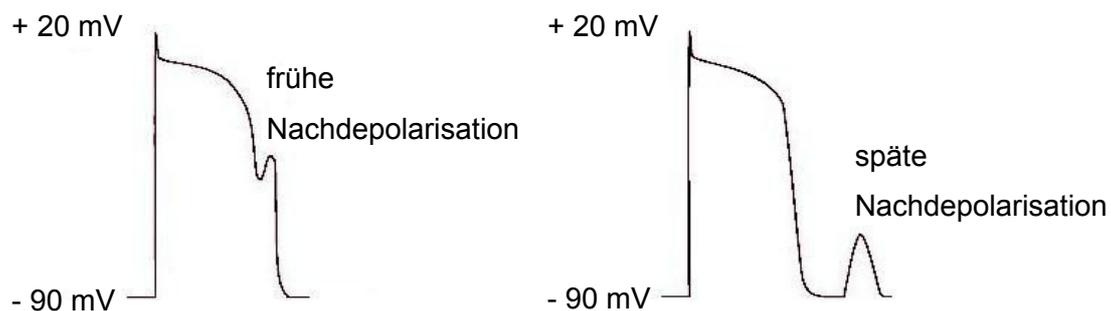


Abbildung 5: Frühe und späte Nachdepolarisation

Quelle: *Gaztanaga et al., 2012*

2.4 Ziele dieser Arbeit

Es gibt Hinweise darauf, dass NO₂-FAs als Antiarrhythmikum im Rahmen myokardialer Ischämie eingesetzt werden können. Ihr elektrophysiologischer Einfluss auf native Herzmuskelzellen ist jedoch bislang nicht untersucht worden. Ziel dieser Arbeit ist es daher, diese Eigenschaften der NO₂-FAs zu charakterisieren. Dazu werden in Patch-Clamp-Experimenten APs isolierter nativer ventrikulärer Kardiomyozyten unter dem Einfluss einer NO₂-FA abgeleitet. Die APs werden anhand der Parameter Ruhemembranpotential, Overshoot und APD mit APs verglichen, die von nativen ventrikulären Kardiomyozyten stammen, die nicht mit der NO₂-FA in Kontakt gekommen sind. Des Weiteren wird in Calcium-Fluoreszenzmessungen die Bedeutung von NO₂-FAs für den zytosolischen Calcium-Haushalt nativer ventrikulärer Herzmuskelzellen untersucht. Hierfür werden die nativen Zellen unter dem Einfluss der NO₂-FA bezüglich ihres Calcium-Transienten mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Aufgrund der hohen Reaktivität von NO₂-FAs ist die Beeinflussung weiterer Angriffsziele neben dem RyR2 möglich und soll über die resultierende Änderung des AP und des zytosolischen Calcium-Transienten aufgedeckt werden. Wie in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, ist die Form des AP und des Calcium-Transienten abhängig von verschiedenen Ionenkanälen und Ionenpumpen. Eine Beeinflussung dieser Proteine durch NO₂-FAs äußert sich somit in der Änderung des AP oder Calcium-Transienten. OA-NO₂ ist das häufigste Derivat der NO₂-FAs in vivo [Baker et al., 2004; Baker et al., 2005] und kommt daher in dieser Arbeit in allen Experimenten zur Anwendung.

Ein denkbarer Einsatz der NO₂-FAs ist die vorbeugende Einnahme dieser Substanz, um im Fall eines ischämischen Ereignisses eine Arrhythmie zu verhindern. Angesichts dieser Anwendung ist neben der Erforschung der antiarrhythmischen Fähigkeiten der NO₂-FAs die Erkundung des proarrhythmogenen Potentials ebenso wichtig. Der erste Schritt, um eine

Proarrhythmie durch NO₂-FAs beurteilen zu können, ist die Untersuchung des elektrophysiologischen Effekts auf isolierte native Herzmuskelzellen, da der Entstehung von Herzrhythmusstörungen zunächst arrhythmische Veränderungen an der Einzelzelle zugrunde liegen [Dhein und Stark, 2008]. Durch die Messung der APD unter dem Einfluss von OA-NO₂ soll eine Verlängerung oder Verkürzung des AP durch die Substanz in nativen Zellen beurteilt werden. Eine AP-Verlängerung würde die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen begünstigen, die zu lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien führen können [Seidl und Senges, 1999]. Eine Verkürzung der APD kann die Entstehung einer kreisenden Erregung hervorrufen, die sich klinisch als Kammertachykardie bis hin zum Kammerflimmern manifestiert [Dhein und Stark, 2008]. Des Weiteren wird der Effekt von OA-NO₂ auf das Ruhemembranpotential unter nativen Bedingungen untersucht. Eine Abnahme des Ruhemembranpotentials in ventrikulären Myokardfasern kann zu einer abnormen Automatie in diesen Zellen führen [Seidl und Senges, 1999]. Die Untersuchung der Auswirkung von OA-NO₂ auf den Calcium-Transienten soll den Einfluss der NO₂-FA auf die zytosolische Calcium-Homöostase unter nativen Bedingungen zeigen. Durch die Messung des Basiswertes des Fluoreszenzverhältnisses kann eine Änderung der diastolischen Calcium-Konzentration durch OA-NO₂ beurteilt werden. Eine Erhöhung der diastolischen Calcium-Konzentration auf pathologische Werte würde die Entstehung von späten Nachdepolarisationen begünstigen, die zu ventrikulären Extrasystolen und Arrhythmien führen können [Seidl und Senges, 1999; Dhein und Stark, 2008].

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien, sowie die Vorgehensweise bei der Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten erläutert. Im Anschluss werden die genutzten Methoden, die Patch-Clamp-Technik und Calcium-Fluoreszenzmessung, vorgestellt und die Durchführung der jeweiligen Experimente geschildert.

3.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten von adulten FVB-Mäusen

Bei allen Experimenten wurden ventrikuläre Kardiomyozyten von FVB-Mäusen verwendet. Die Abkürzung FVB bezeichnet einen reinerbigen Mäusestamm, der nach seiner Schwäche gegenüber dem Leukämie verursachenden Friend Virus B benannt wurde. Die Tiere waren zwischen 8 und 12 Wochen alt. Es wurden nur männliche Mäuse verwendet. Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der zuständigen Behörde der Freien und Hansestadt Hamburg vor (A6/510).

Die Isolation der Zellen erfolgte enzymatisch an einem temperaturkontrollierten Perfusionssystem. Den Tieren wurden 10 IU Heparin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) intraperitoneal appliziert, um eine Thrombenbildung in den Koronarien und im Herz zu verhindern. Nach 10 Minuten wurden die Mäuse mit Isofluran¹ (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Um möglichst viele intakte Kardiomyozyten zu isolieren, wurde das Herz schnell entnommen und perfundiert. Dazu wurde das Herz nach Eröffnung des Thorax freipräpariert und die Aorta dargestellt. Diese wurde 1 mm bis 2 mm über ihrem Austritt aus dem Ventrikel durchtrennt und auf die Spitze einer Kanüle gezogen. Durch den darauffolgenden luftblasenfreien Anschluss der Kanüle an das Perfusionssystem konnte das Herz freihängend perfundiert werden. Die Temperatur der Lösungen lag konstant zwischen 36 °C und 37 °C beim Eintritt in das Herz und die

¹ Isofluran entspricht 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether

Flussgeschwindigkeit betrug 3 ml/min. Die Temperierung der Lösungen erfolgte in doppelwandigen Vorratsgefäßen, durch die erwärmtes Wasser aus einem Wasserbad floss. Der gleichmäßige Fluss der Lösungen wurde durch eine Peristaltikpumpe (Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) gewährleistet. Zunächst wurde das Herz mit calciumfreier Perfusionslösung 4 Minuten und 25 Sekunden retrograd perfundiert. Anschließend wurde eine Enzymlösung für 3 Minuten und 45 Sekunden verwendet. Die Zusammensetzung dieser Lösungen ist in Tabelle 1 aufgeführt. Das in der Enzymlösung enthaltene Trypsin ist eine Endopeptidase. Bei Liberase TM handelt es sich um ein Gemisch aus Kollagenase I und II sowie Thermolysin in mittlerer Konzentration. Die Kollagenasen sind Matrix-Metalloproteasen und Thermolysin ist eine thermostabile Metalloendoprotease.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Perfusions- und Enzymlösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen

Substanz	Perfusionslösung	Enzymlösung	Hersteller
BDM	10 mmol/l	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose	5,55 mmol/l	5,55 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	10 mmol/l	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCl	4,7 mmol/l	4,7 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
KHCO ₃	10 mmol/l	10 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	113 mmol/l	113 mmol/l	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
NaHCO ₃	12 mmol/l	12 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taurine	30 mmol/l	30 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ 2H ₂ O	-	12,5 µmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Liberase TM	-	1,5 mmol/l	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Trypsin	-	0,24 µmol/l	Invitrogen/Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
pH	7,42 (NaOH)	7,42 (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Quelle: Eigene Darstellung

Nach Ablauf der Verdauzeit wurden die Ventrikel abgetrennt und nur diese für die weitere Isolation verwendet. Dazu wurde das ventrikuläre Gewebe in eine Petrischale mit Stopplösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) überführt, in der das darin enthaltene fötale Rinderserum (FBS) die Enzyme inhibierte. Durch vorsichtiges Zupfen mit feinen Pinzetten wurde eine Suspension aus Gewebetrümmern und einzelnen Zellen erzeugt, die durch eine Nylongaze mit 250 µm Porendurchmesser in ein 15 ml Falcontube filtriert wurde. Nach 15-minütiger Sedimentation dieser Zellsuspension bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet einer schrittweisen Erhöhung der

Calcium-Konzentration unterzogen. Es wurden nacheinander Calciumlösungen (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) mit den Konzentrationen 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,8 mmol/l und 1,6 mmol/l über das Sediment gegeben. Dadurch wurde eine Gewöhnung der Zellen an Calcium gewährleistet.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Stopp- und Calciumlösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen

Substanz	Stopplösung	Calciumlösung	Hersteller
BDM	10 mmol/l	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose	5,55 mmol/l	5,55 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	10 mmol/l	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCl	4,7 mmol/l	4,7 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
KHCO ₃	10 mmol/l	10 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mmol/l	1,2 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	113 mmol/l	113 mmol/l	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
NaHCO ₃	12 mmol/l	12 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taurine	30 mmol/l	30 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	variabel*	Merck, Darmstadt, Deutschland
FBS	10 mmol/l	5 mmol/l	Invitrogen/Gibco®, Karlsruhe, Deutschland
pH	7,42 (NaOH)	7,42 (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

* Es wurden die Konzentrationen 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,8 mmol/l und 1,6 mmol/l verwendet.

Quelle: Eigene Darstellung

3.2 Patch-Clamp-Technik

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von OA-NO₂ auf das AP nativer ventrikulärer Kardiomyozyten von Mäusen zu untersuchen. Dazu wurde die Patch-Clamp-Technik als elektrophysiologische Messmethode verwendet.

Als Grundlage für die folgenden Ausführungen über die Patch-Clamp-Technik diente das Handbuch „Patch-Clamp-Technik“ [Numberger und Draguhn, 1996]. Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakman publiziert. Damit ist es Ihnen erstmals gelungen einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran direkt am biologischen Präparat nachzuweisen und den Stromfluss von Ionen durch diese Kanäle zu messen. Da Einzelkanalströme nur wenige Picoampere groß sind, müssen sie aus dem Hintergrundrauschen, das durch die unzähligen Kanäle und Ionentransporter auf der gesamten Zelloberfläche hervorgerufen wird, herausgelöst werden. Erreicht wird dies, indem ein sehr kleiner Abschnitt der Zellmembran („patch“ = Membranfleck) elektrisch von seiner Umgebung isoliert wird. Dazu wird ein sehr dünnes Glasröhrchen (Patchpipette) mit einer Elektrolytlösung gefüllt und auf die Zelloberfläche aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks auf die Pipette wird ein stabiler Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche hergestellt. Die Widerstände dieser Abdichtung haben Werte von mehreren Gigaohm, weshalb sie als „Gigaseals“ („seal“ = Dichtung) bezeichnet werden. Aufgrund der hohen mechanischen Belastbarkeit dieser Verbindung sind unterschiedliche Manipulationen an dem Membranfleck möglich. Daraus resultieren die vier wichtigsten Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik:

- Cell-Attached-Konfiguration,
- Whole-Cell-Konfiguration,
- Inside-Out-Konfiguration und
- Outside-Out-Konfiguration.

Da bei der Inside-Out-Konfiguration und Outside-Out-Konfiguration nur der Membranbereich unter der Pipettenmündung erfasst wird, finden diese Messkonfigurationen bevorzugt Anwendung bei Einzelkanalableitungen. In der

vorliegenden Arbeit stand jedoch das makroskopische Strommuster der Zelle im Mittelpunkt der Untersuchungen, weshalb die Cell-Attached-Konfiguration und die darauf aufbauende Whole-Cell-Konfiguration verwendet wurden. Im Folgenden wird daher lediglich auf die Herstellung und die Eigenschaften dieser beiden Messkonfigurationen eingegangen.

Die untersuchte Zelle befindet sich in der Cell-Attached-Konfiguration, wenn ein stabiler Kontakt zwischen der Patchpipette und der Zellmembran geschaffen ist und sich ein Gigaseal ausgebildet hat. Mit dieser Messanordnung können die Ionenströme bestimmt werden, die durch den Membranabschnitt unter der Pipette fließen. Da der Membranabschnitt intakt bleibt, wird die natürliche intrazelluläre Zusammensetzung aufrechterhalten. Auf diese Weise können Ionenströme unter Beibehaltung der Zellphysiologie untersucht werden. Allerdings ist die Bestimmung des Membranpotentials sowie der zytosolischen Ionenkonzentrationen nicht möglich.

Die Whole-Cell-Konfiguration wird erreicht, indem ein Cell-Attached-Patch hergestellt und anschließend ein Zugang zum Zellinneren geschaffen wird. Es gibt zwei Möglichkeiten diesen Zugang herzustellen: Der Membranbereich unter der Pipette wird durchbrochen (ruptured Patch) oder durch den künstlichen Einbau von Poren durchlöchert (perforated Patch). Für einen ruptured Patch wird zunächst kurz eine hochfrequente und hochamplitudige Wechselspannung angelegt, um die Membran zu destabilisieren. Anschließend wird durch Applikation von Über- oder Unterdruckpulsen der Membranbereich unter der Pipette mechanisch zerstört. Somit ist die Lösung im Pipetteninneren direkt mit dem Inneren der Zelle verbunden. Nach Sekunden bis Minuten hat sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung ausgetauscht. Aufgrund des wesentlich größeren Volumens der Pipettenlösung im Vergleich zum Zellvolumen ändert sich dabei die Zusammensetzung der Pipettenlösung praktisch nicht. Das Zytoplasma hingegen wird vollkommen gegen die Pipettenlösung ausgetauscht, wodurch das intrazelluläre Milieu bekannt ist. Jedoch kann die Veränderung des Zytoplasmas auch eine Veränderung der Messergebnisse bedeuten, da

Substanzen, die für die Aktivität von Kanälen von Bedeutung sind, dabei verloren gehen können.

Mit einem perforated Patch wird diese Veränderung reduziert, da das Zytoplasma nur über kleine Poren (Durchmesser etwa 0,8 nm) mit der Pipettenlösung in Verbindung steht und größere Moleküle somit nicht hindurch diffundieren können. Bei dieser Technik wird der Pipettenlösung eine porenbildende Substanz, meist das Antibiotikum Nystatin oder Amphotericin B, hinzugegeben. Diese Substanzen lagern sich nach der Sealbildung in die Membran ein, bilden Poren und stellen somit einen elektrischen Zugang zu der Zelle her. Aufgrund des höheren Serienwiderstandes und der durch die komplizierte Handhabung der porenbildenden Substanzen vergleichsweise geringen Erfolgsquote, kam in dieser Arbeit nur der ruptured Patch zur Anwendung.

In der Whole-Cell-Konfiguration wird die gesamte Zellmembran erfasst. Durch den direkten elektrischen Kontakt zwischen Pipetten- und Zellinneren können alle Ströme, die durch die Membran der Zelle fließen, gemessen werden. Des Weiteren kann das Membranpotential bestimmt und verändert werden.

Es können zwei Formen der Patch-Clamp-Messung unterschieden werden, wenn eine elektrische Verbindung zu der Zelle besteht:

- die Spannungsklemme (Voltage-Clamp) und
- die Stromklemme (Current-Clamp).

Bei der Spannungsklemme wird das Membranpotential auf einem vorgegebenen Wert gehalten („clamp“ = festklemmen), indem ein Kompensationsstrom in die Zelle injiziert wird, sobald das tatsächliche Membranpotential von dem vorgegebenen Wert abweicht. Dieser Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp-Experimenten gemessen. Die Analyse einzelner Ströme ist somit möglich.

Mit Hilfe der Stromklemme kann demgegenüber das physiologische Erregungsmuster der Zelle bestimmt werden. Bei dieser Messanordnung wird der Strom durch die Membran vorgegeben und das daraus resultierende Potential gemessen. Durch zunehmende Strominjektionen am

Kommandoeingang können Depolarisationen der Zellmembran ausgelöst und bei Erreichen der Schwelle schließlich Aktionspotentiale abgeleitet werden. Wird der Gesamtstromfluss durch die Zellmembran auf 0 pA festgelegt, entspricht das resultierende Membranpotential dem Ruhemembranpotential. Diese Sonderform der Current-Clamp-Messung wird als Nullstromklemme bezeichnet [Numberger und Draguhn, 1996].

3.2.1 Patch-Clamp-Messplatz und Patchpipette

Minimale örtliche Verschiebungen zwischen Patchpipette und Zelle stören Patch-Clamp-Versuche. Daher wurde das Mikroskop einschließlich der Messkammer auf einem schwingungsgedämpften Steintisch aufgebaut, um mechanische Erschütterungen auszuschließen. Des Weiteren befand sich als Schutz vor elektromagnetischen Feldern ein Faraday-Käfig um den Messplatz. Auf einem motorgetriebenen Mikromanipulator war der Vorverstärker zusammen mit dem Pipettenhalter befestigt. Der Mikromanipulator konnte mit Hilfe eines Joysticks in zwei unterschiedlichen Geschwindigkeiten in drei Dimensionen bewegt werden. Mit Hilfe eines Schlauches, der über den Pipettenhalter mit der Pipette verbunden war, konnte mittels einer Glasspritze oder eines Mundstückes Über- bzw. Unterdruck auf das Pipetteninnere angelegt werden. Über ein flüssigkeitsgefülltes U-Rohr-Manometer wurden die Drücke bestimmt. In Abbildung 6 ist der Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes gezeigt.

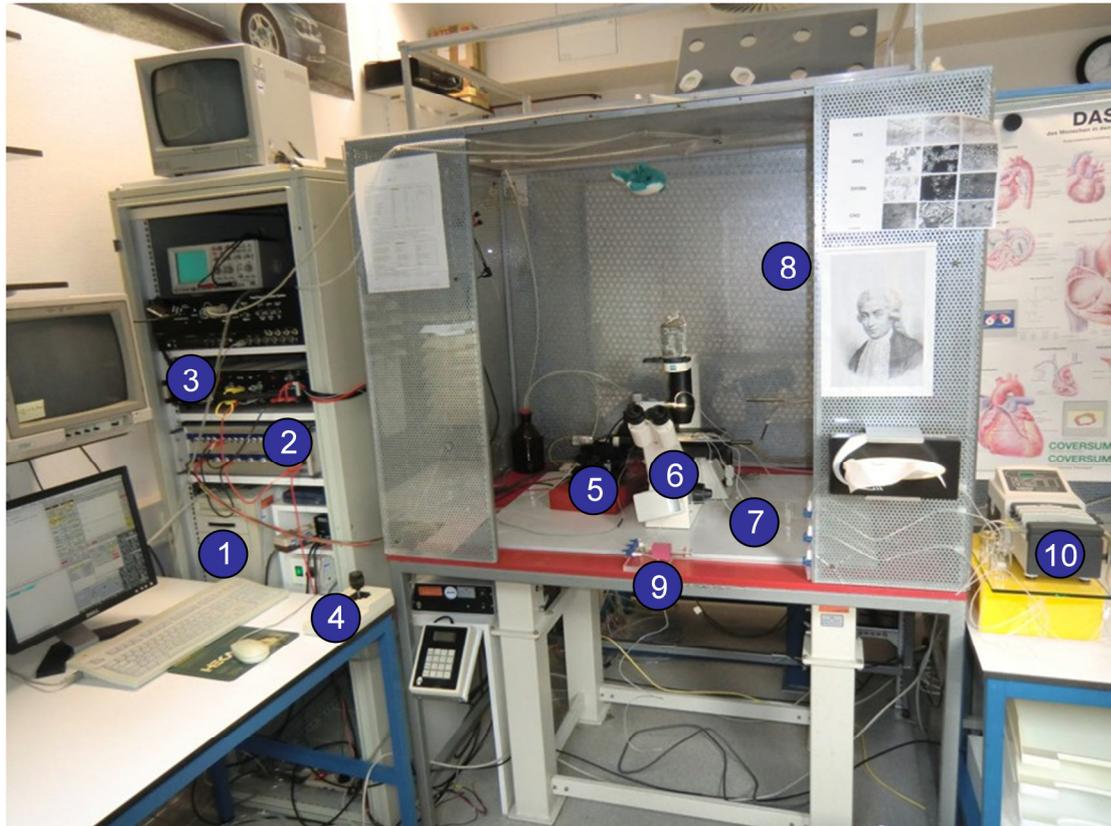


Abbildung 6: Messplatz Patch-Clamp-Technik

1 Computer mit „Pulse“-Software, 2 Hauptverstärker, 3 Temperaturerfassung, 4 Joystick, 5 Mikromanipulator, 6 inverses Mikroskop, 7 schwingungsgedämpfter Tisch, 8 Faraday-Käfig, 9 Mundstück und Spritze zum Anlegen unterschiedlicher Drücke an das Pipetteninnere, 10 Mehrkanalpumpe

Quelle: Eigene Darstellung

In den Kreuztisch des Mikroskops (Zeiss Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurde die Messkammer eingespannt. Das Mikroskop war invers, so dass die Objektive von unten an die Messkammer herangeführt wurden und genügend Platz oberhalb der Versuchskammer zum Arbeiten blieb. Es war eine 100- und 400-fache Gesamtvergrößerung möglich und der Einsatz von Varelkontrast-Objektiven von Zeiss führten zu einer Kontrastverstärkung. Abbildung 7 zeigt die Messkammer im Kreuztisch des inversen Mikroskops, sowie die Pipettenhalterung.

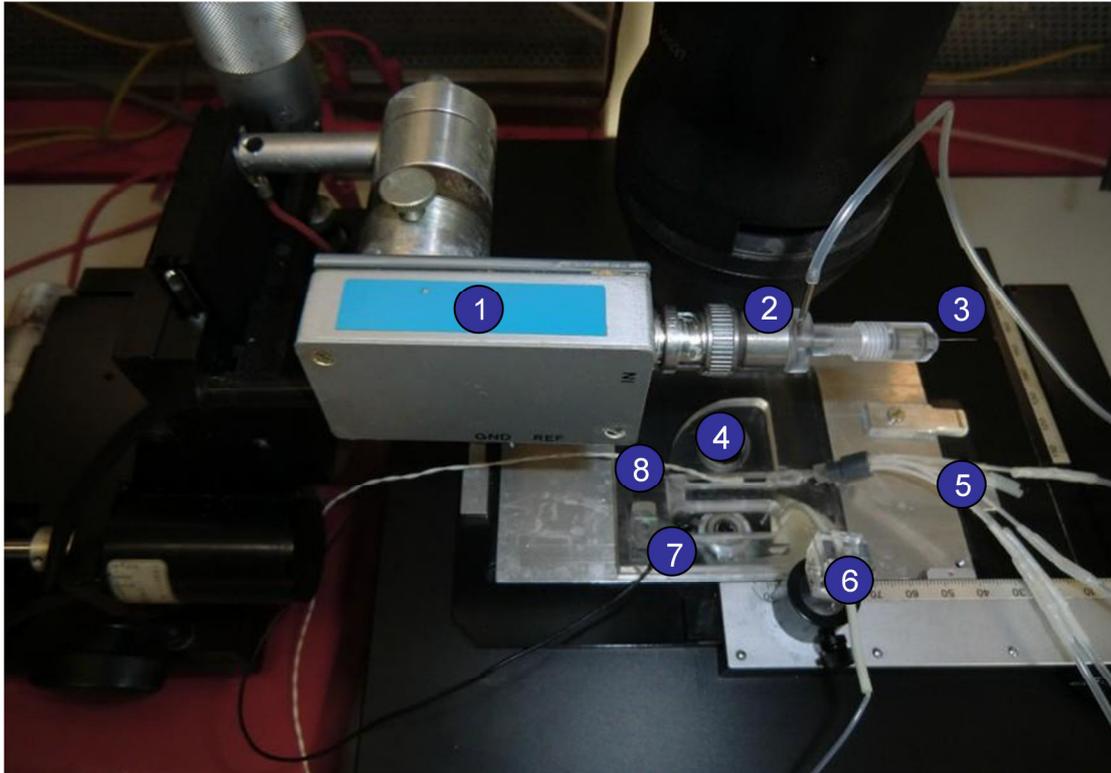


Abbildung 7: Messkammer und Pipettenhalterung Patch-Clamp-Technik

1 Vorverstärker, 2 Pipettenhalter, 3 Messelektrode, 4 Messkammer, 5 Zulauf, 6 Absaugung, 7 Referenzelektrode, 8 Temperaturmesser

Quelle: Eigene Darstellung

Die Messkammer bestand aus einer 7 cm x 7 cm großen Plexiglasscheibe. In diese waren zwei parallel zueinander verlaufende Gänge eingefräst. Ein Deckgläschen bildete den Boden der Gänge. Durch einen Zulauf und eine Absaugung war die Zirkulation der Badlösung gewährleistet und ein kompletter Lösungsaustausch möglich.

Die Perfusionslösungen wurden in separaten Bechergläsern bei Raumtemperatur aufbewahrt. Von jedem Becherglas führte eine Perfusor[®]-Leitung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), die sich durch ein Dreiwegeventil absperren ließ, in die Messkammer. Die Leitungen verliefen voneinander getrennt zur Vermeidung eines Misch- oder Totraumes. Für die Perfusion wurde eine mehrkanalige Pumpe (Modell 205S/CA, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland) verwendet. Die

Versuche wurden bei einer Flussrate von 0,9 ml/min durchgeführt. Bei einem Volumen von etwa 2 ml in der Versuchskammer bedeutete dies ein kompletter Lösungsaustausch nach ungefähr 2 Minuten und 20 Sekunden.

Zu den elektronischen Komponenten des Messplatzes zählen der Vorverstärker und der Hauptverstärker. Der Vorverstärker misst das Stromsignal und gibt es als Spannung aus (Strom-Spannungs-Wandler). Der nachgeschaltete Hauptverstärker dient der Signalverstärkung und Filterung. Des Weiteren bietet er die Bedienungsfläche für den Benutzer. Im Fall des verwendeten EPC-9 (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) wurde dies über einen Computer (Apple PowerMacintosh 9500/200) bewerkstelligt. Bevor die Messdaten in Echtzeit betrachtet und langfristig gespeichert wurden, mussten die ursprünglich analogen Signale des Verstärkers mit Hilfe eines Analog/Digital-Wandlers in digitale Signale umkodiert werden. Zur Erfassung und Auswertung der Patch-Clamp-Daten diente die Software „Pulse“ (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland).

Die Patchpipetten wurden direkt vor dem Versuch hergestellt und nur einmal verwendet. Sie bestanden aus mittelhartem Borosilikatglas (Schmelzpunkt 750 °C - 800 °C). Für die Herstellung wurde eine 7,5 cm lange Glaskapillare (GC 150-15, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd., England) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm verwendet. Mit Hilfe eines programmierbaren Pipettenziehgerätes (Modell Flaming/Brown P-97, Sutter Instruments Company, San Rafael, USA) wurde diese in zwei etwa 3,7 cm lange, an der Spitze dünn ausgezogene Kapillaren geteilt. Unebenheiten, die bei der Herstellung an der Spitze der Patchpipette entstanden sind, wurden danach mittels eines Heizdrahtes entfernt. Anschließend wurde die Pipette mit der Kalium-Glutamat-Lösung gefüllt. Der Pipettenwiderstand lag bei Verwendung der Kalium-Glutamat-Lösung und Eintauchen in die Tyrode-Lösung bei 2,5 M Ω bis 5,5 M Ω .

Um die Kalium-Glutamat-Lösung in der Pipette mit dem Vorverstärker und die Tyrode-Lösung in der Messkammer mit der Referenz zu verbinden, wurden

Elektroden als metallische Leiter verwendet. Zur Reduzierung der Elektrodenpotentiale wurde auf chlorierte Silberdrähte zurückgegriffen. Als Referenzelektrode wurde ein Silber/Silberchlorid-Pellet an der Spitze eines chlorierten Silberdrahtes verwendet, das in die Tyrode-Lösung in der Kammer eintauchte. Die Messelektrode stellte die elektrische Verbindung zwischen Vorverstärker und Kalium-Glutamat-Lösung her und bestand aus einem Silberdraht, der zuvor in 100 mmol/l KCl-Lösung chloriert wurde.

Die Zusammensetzung der verwendeten Tyrode- und Kalium-Glutamat-Lösung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Gelagert wurden die Lösungen bei 8 °C.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode- und Kalium-Glutamat-Lösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen

Substanz	Tyrode-Lösung	Kalium-Glutamat-Lösung	Hersteller
ATP	-	1,1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂	2 mmol/l	-	ZNF Chemikalienlager, Heidelberg, Deutschland
EGTA	-	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose	10 mmol/l	-	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamic ac.	-	120 mmol/l	Fluka, Buchs, Schweiz
HEPES	10 mmol/l	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCl	4 mmol/l	10 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	1 mmol/l	2 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	138 mmol/l	-	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
NaH ₂ PO ₄	0,33 mmol/l	-	Merck, Darmstadt, Deutschland
pH	7,3 (NaOH)	7,2 (KOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.2 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Für die Messungen wurden native ventrikuläre Kardiomyozyten verwendet, welche wie in Kapitel 3.1 erläutert, isoliert wurden. Nach der Sedimentation der Zellen wurde der Überstand verworfen und das Sediment in Tyrode-Lösung suspendiert. Es wurden 0,2 ml der Zellsuspension in die Messkammer transferiert. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden abgesetzt hatten, wurde die Tyrode-Lösung in die Kammer geleitet. Bei 100-facher Vergrößerung konnte eine geeignete Kardiomyozyte ausgewählt werden. Diese musste stabförmig sein, über eine gut sichtbare Querstreifung verfügen und durfte keine sichtbaren Membranschäden oder Spontankontraktionen aufweisen.

Die vorbereitete Pipette wurde in den Pipettenhalter eingespannt, so dass die Messelektrode wenige Millimeter in die Kalium-Glutamat-Lösung hineinragte. Anschließend konnte mittels Mikromanipulator die Pipettenspitze in die Tyrode-Lösung eingetaucht werden. Es lag ein Überdruck am Pipetteninneren an, so dass die Kalium-Glutamat-Lösung kontinuierlich in die Tyrode-Lösung strömte. Damit wurde das Verschmutzen der Pipettenspitze verhindert. Des Weiteren wurde durch eine implementierte Routine des EPC-9 das gemessene Potential als Nullpunkt festgelegt, um eventuell bestehende Elektrodenpotentiale zu kompensieren.

Die Pipettenspitze wurde vorsichtig an die Zelloberfläche herangefahren. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks im Pipetteninneren entstand eine Abdichtung zwischen Glas- und Membranoberfläche mit Widerstandswerten größer als 1 G Ω . Somit war die Cell-Attached-Konfiguration erreicht. Diese Messkonfiguration wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben mittels ruptured Patch in die Whole-Cell-Konfiguration umgewandelt. Im Current-Clamp Modus erfolgte durch kontinuierliche Steigerung der Stromstärke und Dauer der Strominjektionen die Bestimmung der Schwelle ab der APs ausgelöst werden. Anschließend erfolgte die Messung der APs. Die Zellen wurden mit 5 ms bzw. 10 ms kurzen Depolarisationsströmen, mit 150 % bestimmter AP-Schwelle und einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Durch die gleichmäßige Perfusion der Messkammer blieben die mechanischen Einflüsse auf die Zelle während des

gesamten Versuchs konstant. Zeitgleich zu der Stimulation wurden die unterschiedlichen Perfusionslösungen nacheinander in die Kammer geleitet und die resultierenden AP-Änderungen erfasst.

Bei der anfänglichen Badlösung handelte es sich um Tyrode-Lösung, in der die Zellen 1 Minute stimuliert wurden. Anschließend wurde Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), das mit Tyrode-Lösung auf 0,1 % verdünnt wurde, in die Kammer geleitet und die Stimulation für 5 Minuten fortgesetzt. Darauffolgend wurde die Kammer mit 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ (bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Professor Freeman, Abteilung für Pharmakologie und Chemische Biologie, Universität Pittsburgh, USA), das in der 0,1 prozentigen Ethanol-Tyrode-Lösung gelöst war, perfundiert. In dieser Lösung erfolgte die Stimulation der Zellen ebenfalls 5 Minuten. In Abbildung 8 ist der beschriebene zeitliche Ablauf der Experimente veranschaulicht. Dabei stellen die grau hinterlegten Anteile jene APs dar, die zur Auswertung herangezogen wurden. Bei diesen APs war durch vorausgehende längere Stimulationsphasen sichergestellt, dass sich die untersuchten Zellen in einem möglichst konstanten Zustand befanden.

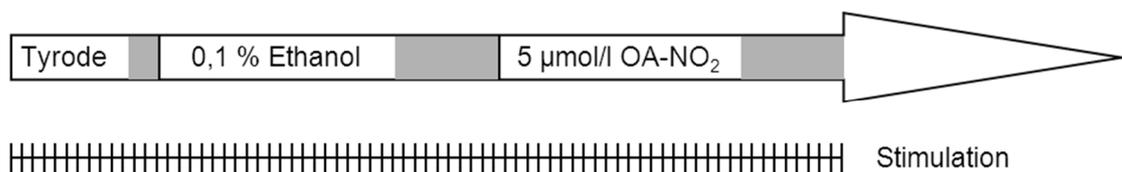


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Patch-Clamp-Experimente

Quelle: Eigene Darstellung

Über einen Fühler in der Kammer erfolgte während des gesamten Versuchs die Messung der Temperatur der Lösungen. Eventuelle Temperaturunterschiede, die sich während des Lösungswechsels ergaben, konnten somit erfasst und als Ursache für Veränderungen der APs identifiziert werden.

3.3 Calcium-Fluoreszenzmessungen

Um den Einfluss von OA-NO₂ auf den Calcium-Transienten nativer ventrikulärer Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden Calcium-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode werden die zytosolischen Calcium-Konzentrationsänderungen während der Systole und Diastole visualisiert.

Bei allen durchgeführten Messungen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 als Acetoxymethylester (Invitrogen/Gibco[®], Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM) ist das membranpermeable Derivat von Fura-2. Nachdem das Molekül in die Zelle diffundiert ist, wird es durch zelleigene unspezifische Esterasen gespalten. Dadurch verliert es seine lipophile Eigenschaft und wird gleichzeitig calciumsensitiver. Die hydrophilen Fura-2 Moleküle reichern sich intrazellulär an, wodurch eine ausreichende Beladung der Zellen möglich ist. Fura-2 bindet freie Calcium-Ionen und fluoresziert bei Anregung durch ultraviolettes Licht [Paredes et al., 2008].

Grundlage für die Ermittlung der zytosolischen Calcium-Konzentration ist die Veränderlichkeit des Anregungsspektrums von Fura-2 durch die Bindung des Farbstoffs an Calcium. Liegt Fura-2 frei vor, ergibt sich ein Anregungsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 380 nm. Mit Bindung an Calcium verschiebt sich dieses auf 340 nm. Das Maximum des Emissionsspektrums von Fura-2 ist bei einer Wellenlänge von 500 nm. Wobei dies sowohl für das gebundene Fura-2, als auch für das freie Fura-2 zutrifft [Paredes et al., 2008].

Während der Messung wurde die Zelle abwechselnd mit den Wellenlängen von 340 nm und 380 nm angeregt und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Bei einem Anregungslicht mit der Wellenlänge von 340 nm fluoresziert der Farbstoff bei 500 nm mit der Intensität F_{340} . Analog gilt für das Anregungslicht der Wellenlänge von 380 nm und dem Emissionslicht bei der Wellenlänge von 500 nm die Intensität des Fluoreszenzlichtes F_{380} . Folglich resultieren aus einer Erhöhung der Calcium-Konzentration ein Anstieg von F_{340} und ein Abfall von F_{380} . Der Quotient aus den beiden Intensitäten ($F_{340/380}$) kann somit als relatives Maß für die zytosolische Calcium-Konzentration angesehen werden.

3.3.1 IonOptix-Messplatz

Als Messapparatur diente das Fluoreszenz-Setup der Firma IonOptix (IonOptix LLC, Milton, MA, USA), mit dem gleichzeitig das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten als relatives Maß für die zytosolische Calcium-Konzentration als auch die Sarkomerlängenverkürzung stimulierter Kardiomyozyten aufgezeichnet werden können. Da sich diese Arbeit mit dem Einfluss der NO₂-FAs auf den zytosolischen Calcium-Transienten beschäftigt, wird im Folgenden nur auf die Bestimmung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten eingegangen.

Zu dem Messplatz gehörte ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA), ein Feldstimulator (MyoPacer, IonOptix LLC, Milton, MA, USA), die IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) als UV-Lichtquelle und eine Photomultiplier-Röhre zur Verstärkung und Umwandlung des emittierten Lichts in einen Strom. Schließlich wurde der erzeugte Strom über das Fluoreszenz System Interface (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) durch den Computer (Aberdeen LLC, Santa Fe Springs, CA, USA) erfasst und mit Hilfe der Software „IonWizard 5.0“ (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) graphisch dargestellt. In Abbildung 9 ist der Aufbau des Messplatzes für die Calcium-Fluoreszenzmessungen veranschaulicht.

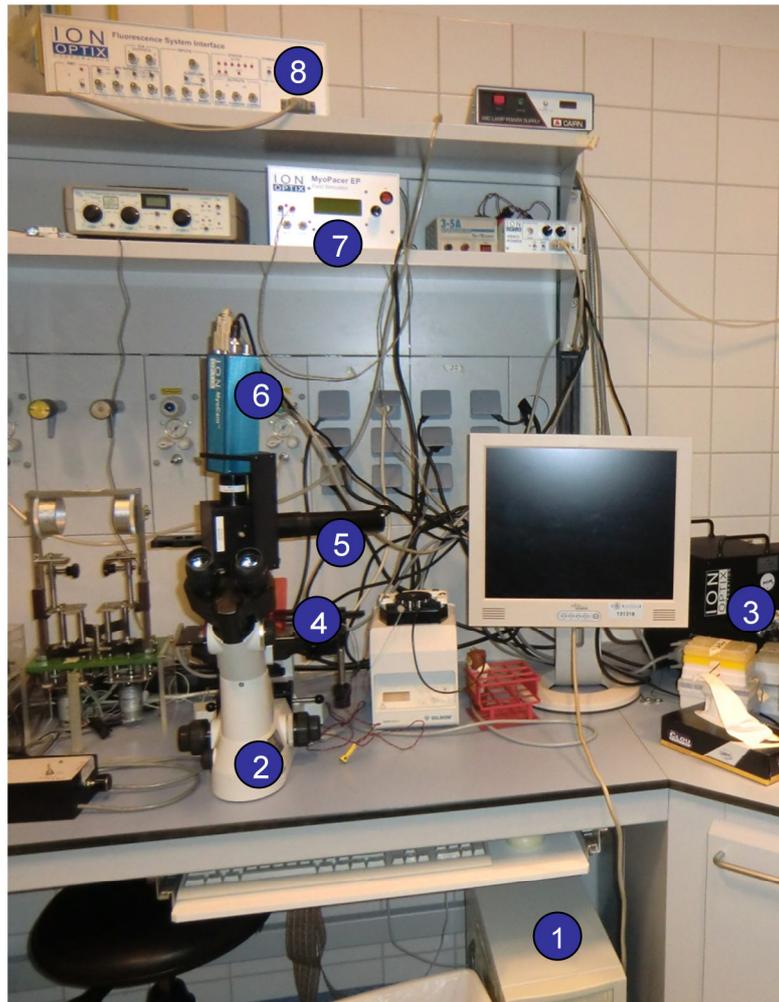


Abbildung 9: Messplatz Calcium-Fluoreszenzmessungen

1 Computer mit Software „IonWizard“, 2 inverses Mikroskop, 3 IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source, 4 Messkammer, 5 Photomultiplier-Röhre, 6 Kamera, 7 Feldstimulator, 8 Fluoreszenz System Interface

Quelle: Eigene Darstellung

Die Messkammer (IonOptix LLC, Milton, MA, USA) wurde während des Versuchs perfundiert. Als Motor für den Zulauf diente eine Perfusor®-Spritzenpumpe (Typ Perfusor®compact, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und für die Absaugung wurde eine Peristaltikpumpe (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) verwendet. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Bei einem Volumen in der Messkammer von 0,4 ml wurde ein vollständiger Lösungswechsel nach 2 Minuten erreicht. Des Weiteren waren zwei

Iridiumelektroden in die Messkammer getaucht, die mit dem Feldstimulator verbunden waren. Darüber wurden die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Spannung von 10 mV stimuliert.

Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration spielen sich innerhalb von Millisekunden ab. Daher muss eine entsprechend hochfrequente Anregung des Fura-2 Farbstoffs mit den zwei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm erfolgen. Bewerkstelligt wurde dies durch die IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source, die in der Lage ist 250 Wellenlängenpaare in einer Sekunde zu erzeugen. Lichtquelle ist eine 75 W Xenon Bogenlampe, deren Lichtstrahlen durch ein sich schnell drehenden Spiegel auf zwei Pfade aufgeteilt werden. Auf beiden Pfaden befindet sich jeweils ein Anregungsfilter, welcher unterschiedliche Wellenlängen (340 nm beziehungsweise 380 nm) für die Fluoreszenzanregung herausfiltert. Mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels werden beide Pfade wieder vereint und über einen Flüssiglichtleiter zur Mikroskopkupplung geleitet. Im Mikroskop wird das relativ kurzwellige Licht von einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch das Objektiv auf die zu untersuchende gefärbte Zelle in der Messkammer gerichtet. Das langwellige Emissionslicht der Zellen kann den dichroitischen Spiegel durchdringen und wird mit Hilfe eines Filters auf ein enges Wellenlängenband von 500 nm bis 530 nm reduziert. Die Photomultiplier-Röhre detektiert und quantifiziert schließlich dieses Emissionslicht [IonOptix LLC, 2012].

Die Messungen fanden in einem abgedunkelten Raum statt, um das Störlicht für die Photomultiplier-Röhre zu reduzieren. Auf diese Weise wurde außerdem verhindert, dass die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs ausbleichen (Photobleaching) und die Bestimmung des Fluoreszenzverhältnisses verfälscht wird [Becker und Fay, 1987]. Aus diesem Grund wurde der Farbstoff Fura-2 AM vor den Experimenten ebenfalls lichtgeschützt aufbewahrt.

3.3.2 Durchführung der Calcium-Fluoreszenzmessungen

Für die Messungen wurden native ventrikuläre Kardiomyozyten verwendet, welche wie in Kapitel 3.1 beschrieben isoliert wurden. Nach der Sedimentation der Zellen wurde der Überstand verworfen und das Sediment in IonOptix-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) verdünnt. Die ausreichende Verdünnung gewährleistete, dass sich die Kardiomyozyten in der Messkammer nicht überlagerten.

Tabelle 4: Zusammensetzung der IonOptix-Lösung und die Hersteller der verwendeten Substanzen

Substanz	IonOptix-Lösung	Hersteller
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	20 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCl	4,7 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	135 mmol/l	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,6 mmol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
pH	7,42 (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Quelle: Eigene Darstellung

Anschließend erfolgte die Beladung der Zellen mit 0,6 µmol/l Fura-2 AM. Dafür wurden die Kardiomyozyten 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gewaschen, weitere 15 Minuten inkubiert und schließlich nochmals gewaschen.

Nach Transferierung von 0,4 ml Zellsuspension in die Messkammer konnte mit der Stimulation begonnen werden. In der 100-fachen Vergrößerung wurden die Zellen betrachtet und eine geeignete Kardiomyozyte ausgewählt. Diese musste stabförmig sein, über eine gut sichtbare Querstreifung und eine gleichförmige

Kontraktionsamplitude verfügen, durfte jedoch keine sichtbaren Membranschäden oder hyperkontraktile Zonen besitzen. Waren diese Kriterien erfüllt, erfolgte der Wechsel auf die 400-fache Vergrößerung und das Bild einer am Mikroskop befindlichen Kamera (IonOptix MyoCam™, IonOptix LLC, Milton, MA, USA). Somit konnte die untersuchte Zelle während des Versuchs am Computerbildschirm beobachtet werden.

Nach der Erfassung der Fluoreszenzintensitäten wie in Kapitel 3.3.1 erläutert, wurde durch die Software der Quotient aus den beiden Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm berechnet. Dieses Verhältnis wurde gegen die Zeit aufgetragen und die resultierende Funktion dargestellt. Somit konnte während der Messung der Calcium-Transient beobachtet werden. Um die Hintergrundfluoreszenz aus den Ergebnissen zu subtrahieren und damit die Genauigkeit der Messungen zu erhöhen, wurde nach jedem Experiment die Zelle aus dem Kamerabild geschoben und einige Sekunden die Fluoreszenzintensität des zellfreien Gebietes gemessen.

Im ersten Teil der Versuche erfolgte die Stimulation der Zellen für jeweils 5 Minuten in der IonOptix-Lösung. Anschließend wurde in einer Versuchsreihe Ethanol, das mit IonOptix-Lösung auf 0,1 % verdünnt wurde, in die Kammer geleitet und die Stimulation weitere 5 Minuten fortgesetzt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde 5 µmol/l OA-NO₂, das in der 0,1 prozentigen Ethanol-IonOptix-Lösung gelöst war, in die Kammer geleitet und die Zellen wurden ebenfalls weitere 5 Minuten durchgängig stimuliert. In Abbildung 10 ist der beschriebene zeitliche Ablauf beider Versuchsreihen veranschaulicht. Die grau hinterlegten Anteile stellen die für die Auswertung herangezogenen Calcium-Transienten dar. Bei diesen Calcium-Transienten war durch vorausgehende längere Stimulationsphasen sichergestellt, dass sich die untersuchten Zellen in einem möglichst konstanten Zustand befanden.

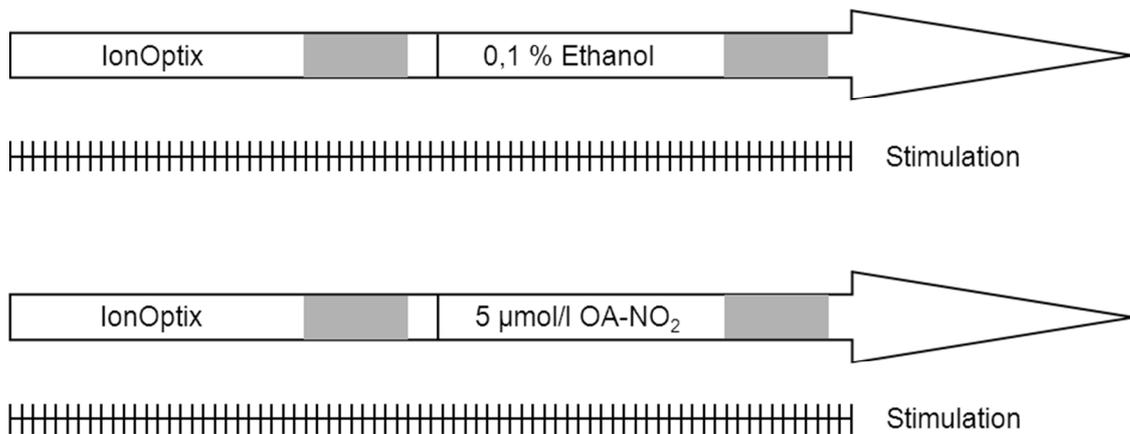


Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf der Calcium-Fluoreszenzmessungen

Quelle: Eigene Darstellung

3.4 Vorgehensweise bei der Datenanalyse

Im Folgenden wird erläutert, welche Daten der Patch-Clamp-Experimente und Calcium-Fluoreszenzmessungen für die Auswertung herangezogen wurden. Des Weiteren werden die genutzten Programme und statistischen Tests genannt.

3.4.1 Analyse der Patch-Clamp-Daten

Die Durchführung der statistischen Analysen und die Anfertigung der graphischen Darstellungen erfolgten mit Hilfe der Software „Prism 4“ (Graphpad Software, San Diego, USA) und Microsoft® Excel® 2010 (Microsoft® Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Für die Auswertung wurden von einer Zelle 10 APs nach 50 Sekunden Stimulation in der Tyrode-Lösung, 50 APs nach 4-minütiger Stimulation in der 0,1 % Ethanol-Lösung und 50 APs nach weiteren 4 Minuten Stimulation in 5 µmol/l OA-NO₂-Lösung verwendet. Es wurden APs nach längeren Stimulationsphasen gewählt um sicherzustellen, dass sich die untersuchten Zellen in einem möglichst konstanten Zustand befanden und sich anfängliche Schwankungen ausgeglichen haben.

Verglichen wurden die APs der Zellen unter dem Einfluss der unterschiedlichen Perfusionslösungen. Grundlage für den Vergleich der APs waren die Parameter Ruhemembranpotential, Overshoot und APD. Es wurde jeweils das arithmetische Mittel der Messdaten von 10 bzw. 50 APs gebildet. Die Mittelwerte der Ergebnisse aus den Versuchen mit der 0,1 % Ethanol-Lösung und der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung wurden mit Hilfe des Student's T-Tests verglichen. Dabei wurde bei einem p-Wert < 0,05 eine statistische Signifikanz angenommen.

3.4.2 Analyse der Daten der Calcium-Fluoreszenzmessungen

Die Durchführung der statistischen Analysen und die Anfertigung der graphischen Darstellungen erfolgten mit Microsoft[®] Excel[®] 2010 (Microsoft[®] Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Für die Auswertung wurden von einer Zelle aus der ersten Versuchsreihe 20 Calcium-Transienten nach 3 Minuten und 30 Sekunden Stimulation in der IonOptix-Lösung und 20 Calcium-Transienten nach 3 Minuten und 30 Sekunden Stimulation in der 0,1 % Ethanol-Lösung herangezogen. Analog wurden von einer Zelle aus der zweiten Versuchsreihe 20 Calcium-Transienten nach 3 Minuten und 30 Sekunden Stimulation in der IonOptix-Lösung und 20 Calcium-Transienten nach 3 Minuten und 30 Sekunden Stimulation in der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung verwendet. Berücksichtigung fanden lediglich die Messergebnisse nach längeren Stimulationsphasen, damit sichergestellt werden konnte, dass sich die Zellen in einem möglichst konstanten Zustand befanden. Bei der Auswahl der Calcium-Transienten wurde des Weiteren auf Artefaktfreiheit geachtet. Es wurde jeweils das arithmetische Mittel der Messdaten der 20 Calcium-Transienten gebildet.

Verglichen wurden die Calcium-Transienten der Zellen unter dem Einfluss der 0,1 % Ethanol-Lösung und der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung. Um zu analysieren, ob die Unterschiede zwischen den Mittelwerten statistisch signifikant waren,

wurden diese mittels Student's T-Test miteinander verglichen. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

Folgende Parameter des Calcium-Transienten wurden durch die Software „IonWizard 5.0“ bestimmt: t_0 , Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses, Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs ($dep v$), Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs ($dep v t$), maximaler Wert des Fluoreszenzverhältnisses, Differenz des maximalen Wertes und des Basiswertes des Fluoreszenzverhältnisses (*maximale Calcium-Amplitude*), prozentuale maximale Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses, Zeit bis zum Erreichen des maximalen Wertes des Fluoreszenzverhältnisses, Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme ($ret v$), Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme ($ret v t$) und die Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 50 % (*CTD 50*) bzw. 80 % (*CTD 80*) des maximalen Wertes des Fluoreszenzverhältnisses. In Abbildung 11 sind die relevanten Parameter des Calcium-Transienten veranschaulicht.

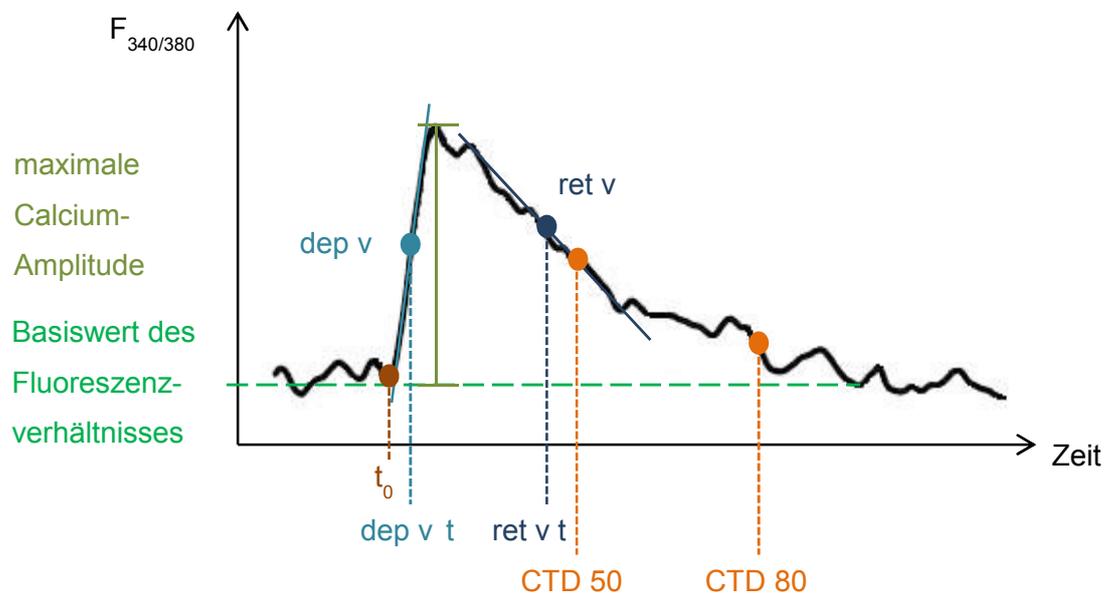


Abbildung 11: Parameter des Calcium-Transienten

Quelle: In Anlehnung an Böttcher, 2009; Shah et al., 2010

4 Ergebnisse

Es werden die Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente anhand der Daten der Parameter Ruhemembranpotential, Overshoot und APD gezeigt. Darauf folgen die Resultate der Calcium-Fluoreszenzmessungen, welche die Ruhecalcium-Konzentration, den Calcium-Anstieg, das Ausmaß des Calcium-Transienten, die Calcium-Abnahme und Calcium-Wiederaufnahme charakterisieren.

4.1 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

Es gingen die Daten von 5 ventrikulären Kardiomyozyten in die Auswertung ein. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) \pm standard error of the mean (SEM) angegeben. Eine Zelle wurde jeweils durchgängig 11 Minuten stimuliert. In dieser Zeit befand sich die Kardiomyozyte nacheinander unter dem Einfluss der unterschiedlichen Perfusionslösungen. In vorangegangenen Kontrollversuchen wurde eine Änderung der APs über die Zeit von 10 Minuten bei kontinuierlicher Stimulation und gleichbleibender Perfusion mit Tyrode-Lösung ausgeschlossen. Während der gesamten Messung erfolgte die Aufzeichnung der Temperatur in der Messkammer. Die Auswertung dieser Daten zeigte, dass bei den Versuchen die Temperatur der Lösungen im Mittel 20,5 °C betrug. Während der einzelnen Experimente war der Temperaturverlauf konstant. Bei den Lösungswechseln entstanden Temperaturschwankungen von maximal 0,2 °C. Diese glichen sich innerhalb von 10 bis 30 Sekunden wieder an. Anhand dieser Daten kann ein Einfluss der Temperatur auf die APs ausgeschlossen werden. Die Auswertung ergab, dass die Zellen nach etwa 3 Minuten Stimulation in einen stabilen Zustand gelangten. Aus diesem Grund wurden die Daten, der nach 50 Sekunden Stimulation in der Tyrode-Lösung abgeleiteten APs, nicht in die statistische Analyse eingeschlossen. Es erfolgte ein statistischer Vergleich der Mittelwerte der Messdaten von den Zellen in der 0,1 % Ethanol-Lösung und der 5 μ mol/l OA-NO₂-Lösung. Bei diesen Ergebnissen war mit 5 bzw. 10 Minuten Stimulation eine ausreichend lange Zeit für die Stabilisation der Zellen gewährleistet.

4.1.1 Ruhemembranpotential

Das Ruhemembranpotential der nativen ventrikulären Kardiomyozyten betrug in der anfänglichen Tyrode-Lösung nach 50 Sekunden Stimulation $-73,82 \pm 1,94$ mV. Nach zusätzlichen 4 Minuten Stimulation in der 0,1 % Ethanol-Lösung war das Ruhemembranpotential auf $-75,33 \pm 2,15$ mV gesunken. Nach weiteren 4 Minuten Stimulation in der $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung lag das Ruhemembranpotential bei $-76,15 \pm 2,25$ mV. In Abbildung 12 sind die angegebenen Ergebnisse veranschaulicht.

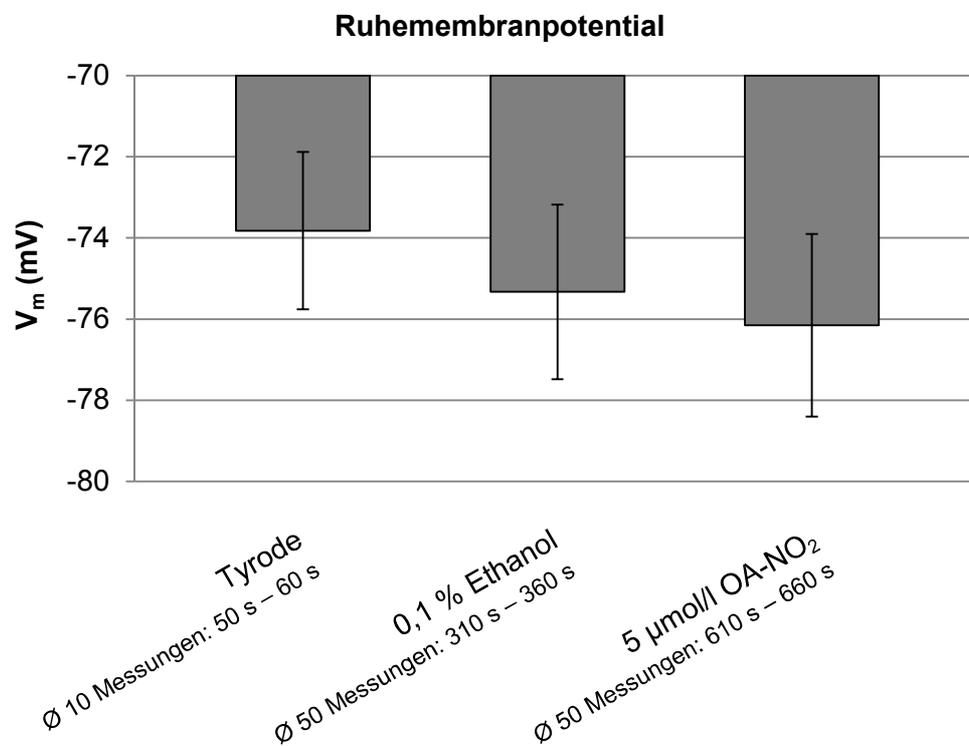


Abbildung 12: Einfluss von 0,1 % Ethanol und $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf das Ruhemembranpotential

Angegeben sind $MW \pm SEM$ ($n = 5$)

Quelle: Eigene Darstellung

Das Ruhemembranpotential der Zellen in 0,1 % Ethanol-Lösung unterschied sich nicht signifikant von dem Ruhemembranpotential der Zellen in $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung ($-75,33 \pm 2,15$ mV vs. $-76,15 \pm 2,25$ mV, $p = 0,80$).

4.1.2 Overshoot

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse bezüglich des Parameters Overshoot. Dieser betrug in den nativen ventrikulären Kardiomyozyten in der Tyrode-Lösung $43,13 \pm 4,86$ mV. In der 0,1 % Ethanol-Lösung war der Overshoot $31,62 \pm 3,43$ mV und in der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung betrug der Overshoot $32,18 \pm 3,66$ mV.

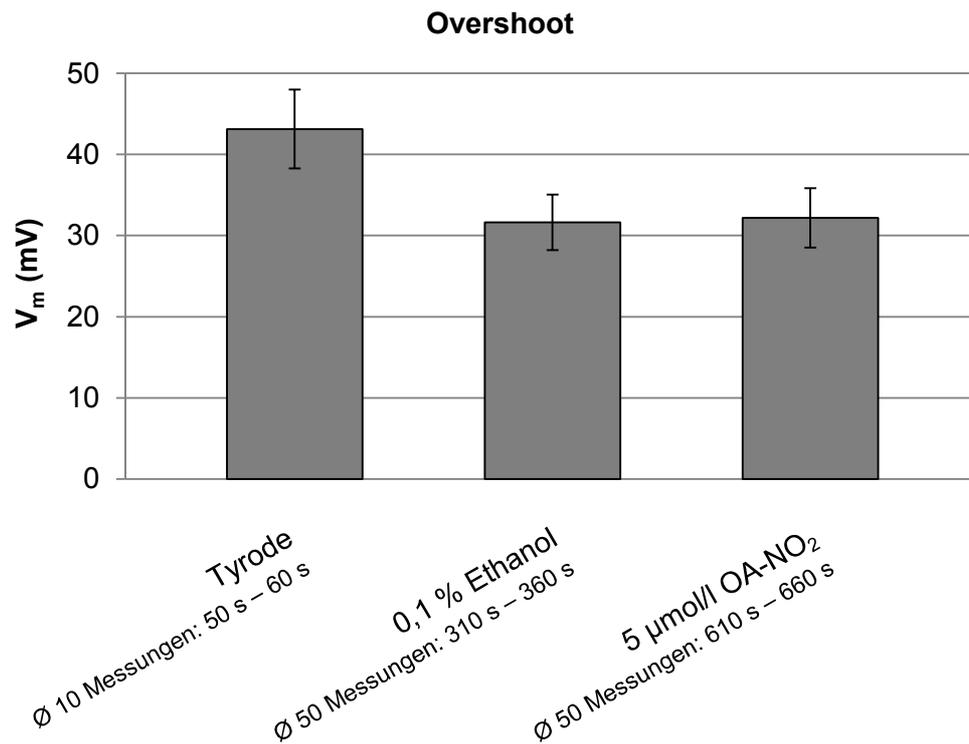


Abbildung 13: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf den Overshoot

Angegeben sind MW \pm SEM ($n = 5$)

Quelle: Eigene Darstellung

Der Overshoot der Zellen in der 0,1 % Ethanol-Lösung veränderte sich nicht signifikant unter dem Einfluss von 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ ($31,62 \pm 3,43$ mV vs. $32,18 \pm 3,66$ mV, $p = 0,91$).

4.1.3 Aktionspotentialdauer

Für die exakte Bestimmung der APD erfolgte die Erhebung der Messwerte APD 20, 50 und 90. Dabei entspricht die APD 20 der Dauer des AP bei 20 prozentiger Repolarisation. Die APD 50 ist die Dauer des AP bis das Membranpotential auf 50 % der maximalen Spannungsamplitude zurückgegangen ist und die APD 90 entspricht der Zeit des AP bis zu einer 90 prozentigen Repolarisation. Die Ergebnisse der APD 20, 50 und 90 sind in den Abbildungen 14, 15 und 16 dargestellt.

Die APD 20 der Zellen in der Tyrode-Lösung betrug $4,25 \pm 0,36$ ms. In der 0,1 % Ethanol-Lösung stieg diese auf $6,31 \pm 0,50$ ms. Unter dem Einfluss von $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ hatte sich die APD 20 wieder verkürzt auf $5,96 \pm 0,47$ ms.

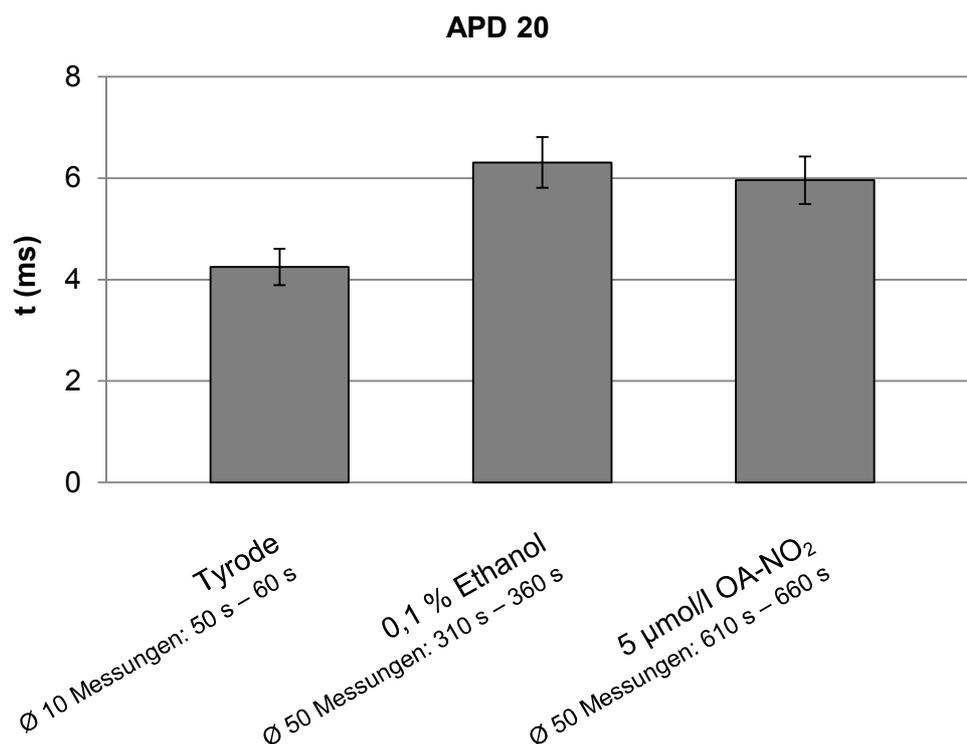


Abbildung 14: Einfluss von 0,1 % Ethanol und $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 20 prozentiger Repolarisation

Angegeben sind $MW \pm SEM$ ($n = 5$)

Quelle: Eigene Darstellung

Die APD 20 der Zellen in der 0,1 % Ethanol-Lösung unterschied sich nicht signifikant von der APD 20 der Zellen in der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung ($6,31 \pm 0,50$ ms vs. $5,96 \pm 0,47$ ms, $p = 0,63$).

Die APD 50 betrug in den nativen ventrikulären Kardiomyozyten in der Tyrode-Lösung $10,93 \pm 2,78$ ms. In den Zellen in der 0,1 % Ethanol-Lösung verlängerte sich die APD 50 auf $12,44 \pm 1,73$ ms und verkürzte sich unter dem Einfluss von 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ wieder auf $11,65 \pm 1,40$ ms.

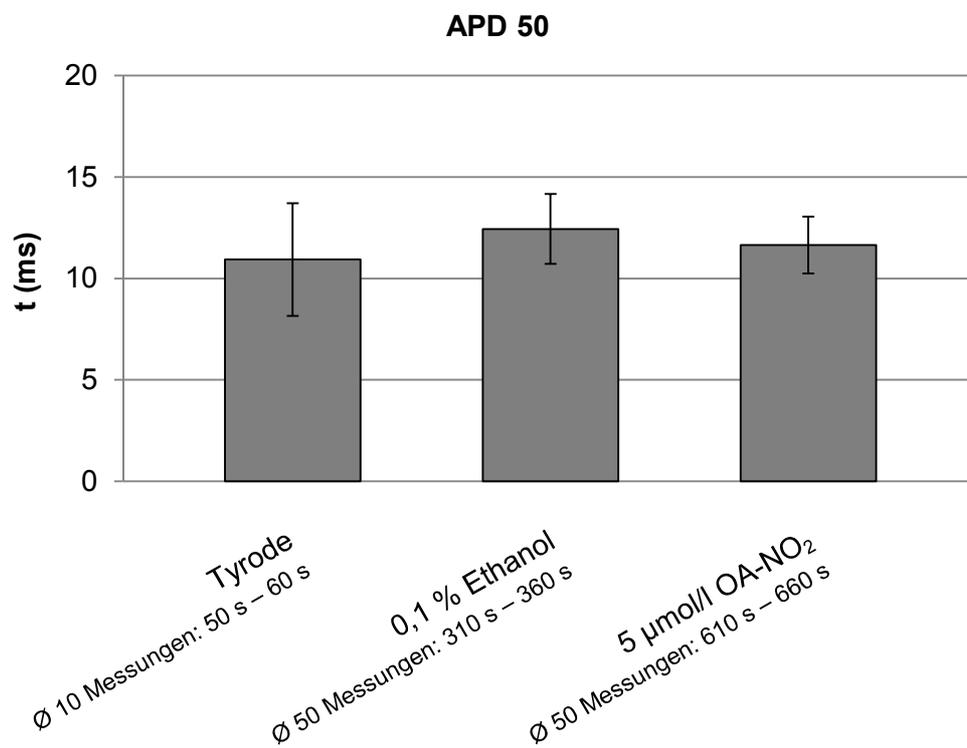


Abbildung 15: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 50 prozentiger Repolarisation

Angegeben sind $MW \pm SEM$ ($n = 5$)

Quelle: Eigene Darstellung

Die APD 50 unterschied sich nicht signifikant in den nativen ventrikulären Kardiomyozyten unter dem Einfluss der beiden Perfusionslösungen 0,1 % Ethanol-Lösung und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung ($12,44 \pm 1,73$ ms vs. $11,65 \pm 1,40$ ms, $p = 0,73$).

Die APD 90 betrug in den Zellen in der Tyrode-Lösung $64,05 \pm 16,43$ ms. In den Zellen unter dem Einfluss der 0,1 % Ethanol-Lösung verlängerte sich die APD 90 auf $78,76 \pm 10,12$ ms. In den nativen Kardiomyozyten in der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung hatte sich die APD 90 auf $73,70 \pm 7,19$ ms verkürzt.

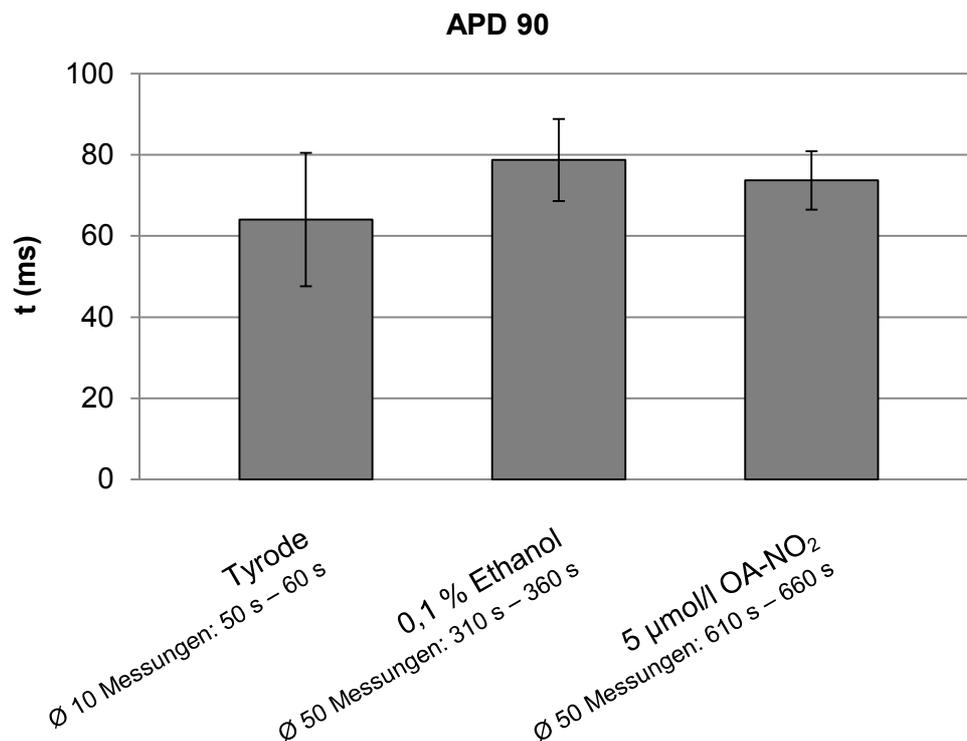


Abbildung 16: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 90 prozentiger Repolarisation

Angegeben sind $MW \pm SEM$ ($n = 5$)

Quelle: Eigene Darstellung

Die APD 90 der Zellen in der 0,1 % Ethanol-Lösung veränderte sich nicht signifikant unter dem Einfluss von 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ ($78,76 \pm 10,12$ ms vs. $73,70 \pm 7,19$ ms, $p = 0,69$).

4.1.4 Einfluss von OA-NO₂ auf das Aktionspotential

Wie aus den zuvor gezeigten Ergebnissen der Patch-Clamp-Experimente hervorgeht, hat die NO₂-FA OA-NO₂ keine signifikante Veränderung der Parameter Ruhemembranpotential, Overshoot und APD im Vergleich zu der 0,1 % Ethanol-Lösung bewirkt. Abbildung 17 zeigt die daraus resultierende, fast vollständige Deckungsgleichheit der abgeleiteten APs einer Zelle unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂.

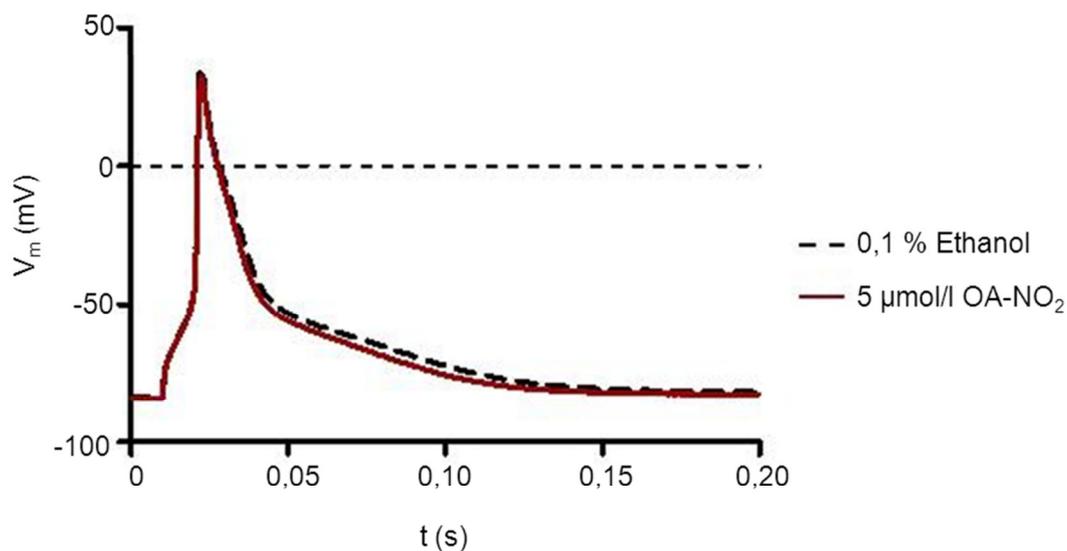


Abbildung 17: Aktionspotentiale unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂

Quelle: Eigene Darstellung

4.2 Ergebnisse der Calcium-Fluoreszenzmessungen

Aus der ersten Versuchsreihe mit 0,1 % Ethanol gingen die Daten von 19 nativen ventrikulären Kardiomyozyten in die Auswertung ein. Aus der zweiten Versuchsreihe mit 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ wurden die Ergebnisse von 11 Zellen in die Auswertung eingeschlossen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) \pm standard error of the mean (SEM) angegeben.

4.2.1 Ruhecalcium-Konzentration

Die zytosolische Calcium-Konzentration vor Beginn der Stimulation wurde als Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm Anregungslicht ($F_{340/380}$) dargestellt. Der Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses war nach 3 Minuten Stimulation in der anfänglichen IonOptix-Lösung signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Versuchsreihen ($0,41 \pm 0,01$ vs. $0,35 \pm 0,01$, $p < 0,01$). Nach weiteren 5 Minuten Stimulation unter dem Einfluss der beiden unterschiedlichen Lösungen war der Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses signifikant unterschiedlich zwischen der 0,1 % Ethanol-Lösung und der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung ($0,44 \pm 0,01$ vs. $0,38 \pm 0,01$, $p < 0,01$).

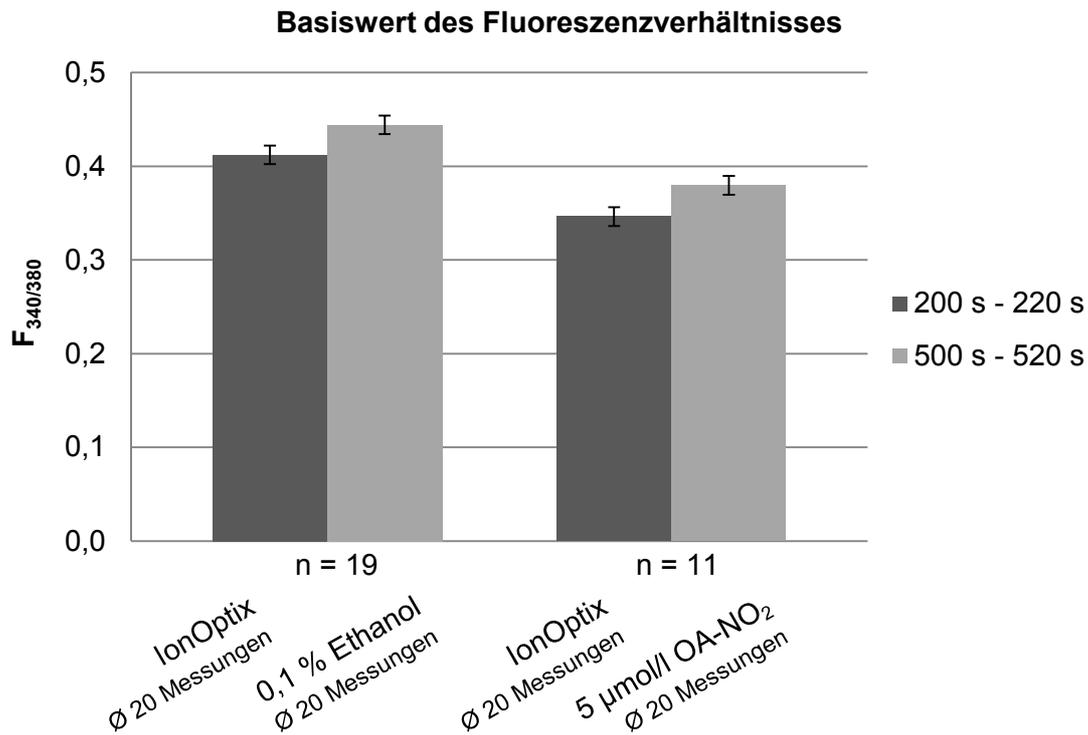


Abbildung 18: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂ auf den Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.2 Calcium-Anstieg

Für die Charakterisierung des Ausmaßes der Calcium-Zunahme im Zytosol während der Kontraktionsphase wurde die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs gemessen. Diese war in der IonOptix-Lösung nicht signifikant unterschiedlich in den Zellen der beiden Versuchsreihen ($59,91 \pm 3,16$ ms vs. $61,08 \pm 4,21$ ms, $p = 0,83$). Des Weiteren veränderte sich die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des Calcium-Anstiegs unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂ geringfügig und unterschied sich nicht signifikant in den Zellen in den beiden Lösungen ($58,90 \pm 3,50$ ms vs. $60,37 \pm 3,81$ ms, $p = 0,79$).

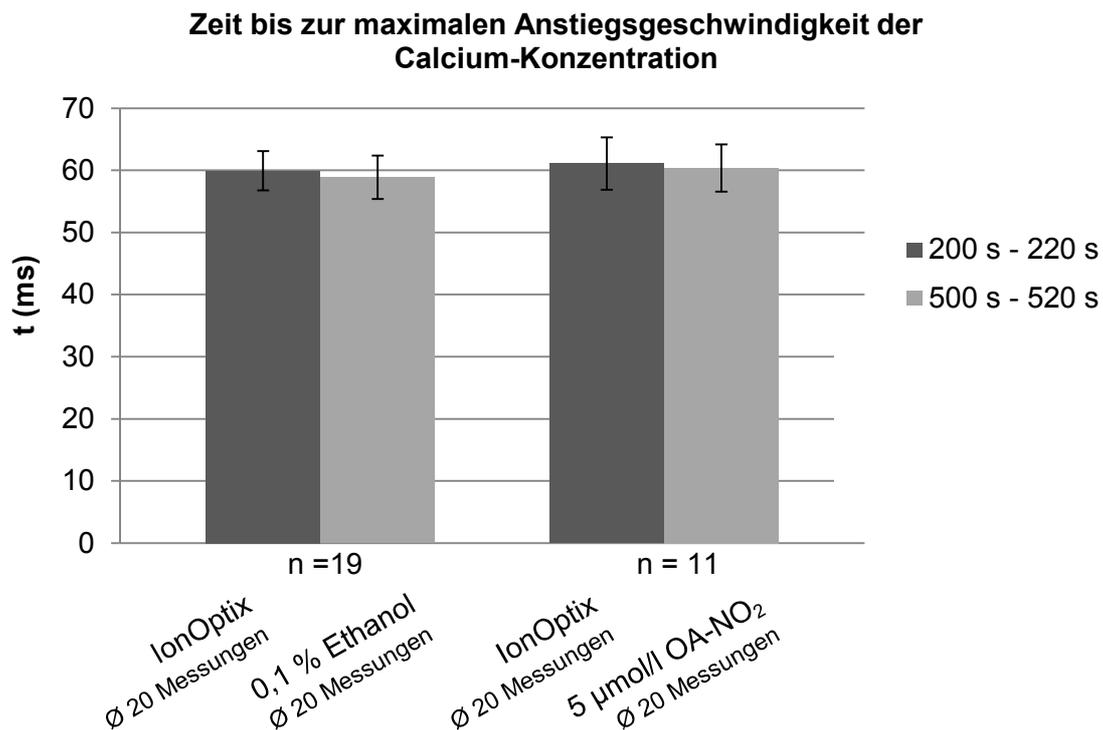


Abbildung 19: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂ auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.3 Ausmaß des Calcium-Transienten

Um das Ausmaß des Calcium-Transienten besser zu quantifizieren, wurde die prozentuale Änderung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten während der Kontraktion berechnet. Es erfolgte die Bestimmung der prozentualen maximalen Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses.

In der IonOptix-Lösung waren die Mittelwerte der maximalen Calcium-Amplitude in Prozent, ausgehend von dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses, nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Versuchsreihen ($18,68 \pm 1,45 \%$ vs. $19,83 \pm 1,73 \%$, $p = 0,62$). Sowohl in der 0,1 % Ethanol-Lösung, als auch in der 5 µmol/l OA-NO₂-Lösung hat die prozentuale maximale

Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses, in den nativen ventrikulären Kardiomyozyten zugenommen. Jedoch unterschieden sich die Mittelwerte aus beiden Lösungen nicht signifikant ($22,23 \pm 1,99$ % vs. $25,96 \pm 2,87$ %, $p = 0,28$).

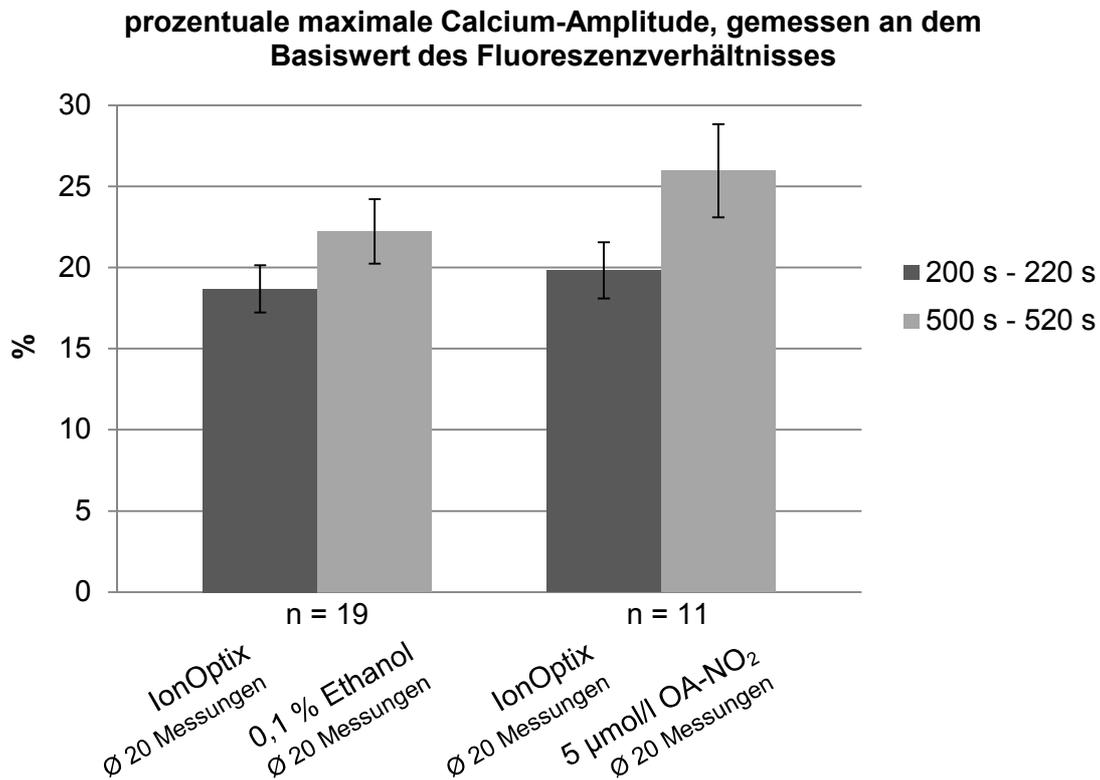


Abbildung 20: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂ auf die prozentuale maximale Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.4 Calcium-Abnahme

Für die Charakterisierung der Geschwindigkeit der Calcium-Abnahme im Zytosol während der Relaxationsphase wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme bestimmt. Diese war in der IonOptix-Lösung signifikant unterschiedlich in den Zellen der beiden Versuchsreihen ($176,64 \pm 5,65$ ms vs. $148,15 \pm 4,19$ ms, $p < 0,01$). Unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol bzw. $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ nahm die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Calcium-Abnahme in den Kardiomyozyten zu und unterschied sich signifikant voneinander in beiden Lösungen ($182,81 \pm 7,77$ ms vs. $155,80 \pm 9,47$ ms, $p < 0,05$).

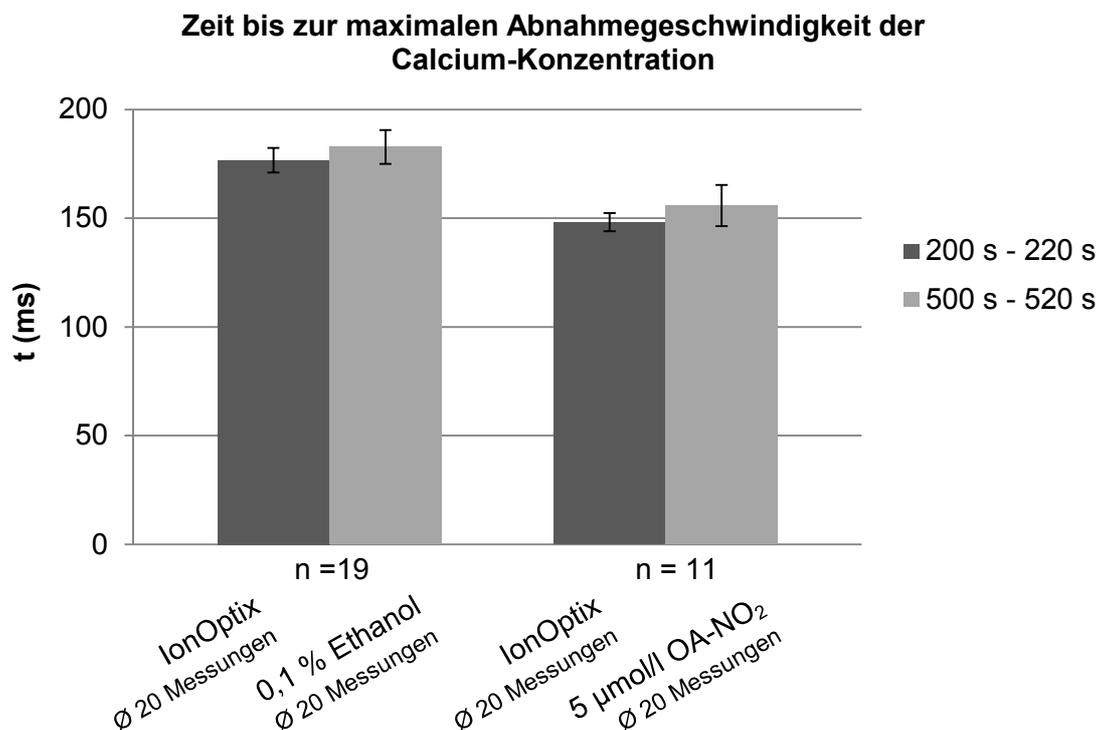


Abbildung 21: Einfluss von 0,1 % Ethanol und $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.5 Calcium-Wiederaufnahme

Die Charakterisierung der Calcium-Wiederaufnahme in das SR erfolgte über die gemessene Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 50 % bzw. 80 % des maximalen Wertes des Fluoreszenzverhältnisses. Die Dauer des Calcium-Transienten bis der Quotient der Fluoreszenzintensitäten auf 50 % des maximalen Wertes abgesunken ist (CTD 50), war in den Zellen in der anfänglichen IonOptix-Lösung in beiden Versuchsreihen nicht signifikant unterschiedlich ($241,78 \pm 6,01$ ms vs. $224,97 \pm 5,59$ ms, $p = 0,07$). In den Kardiomyozyten in der 0,1 % Ethanol-Lösung und der 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂-Lösung unterschied sich die CTD 50 ebenfalls nicht signifikant voneinander ($239,24 \pm 6,69$ ms vs. $224,55 \pm 7,47$ ms, $p = 0,17$).

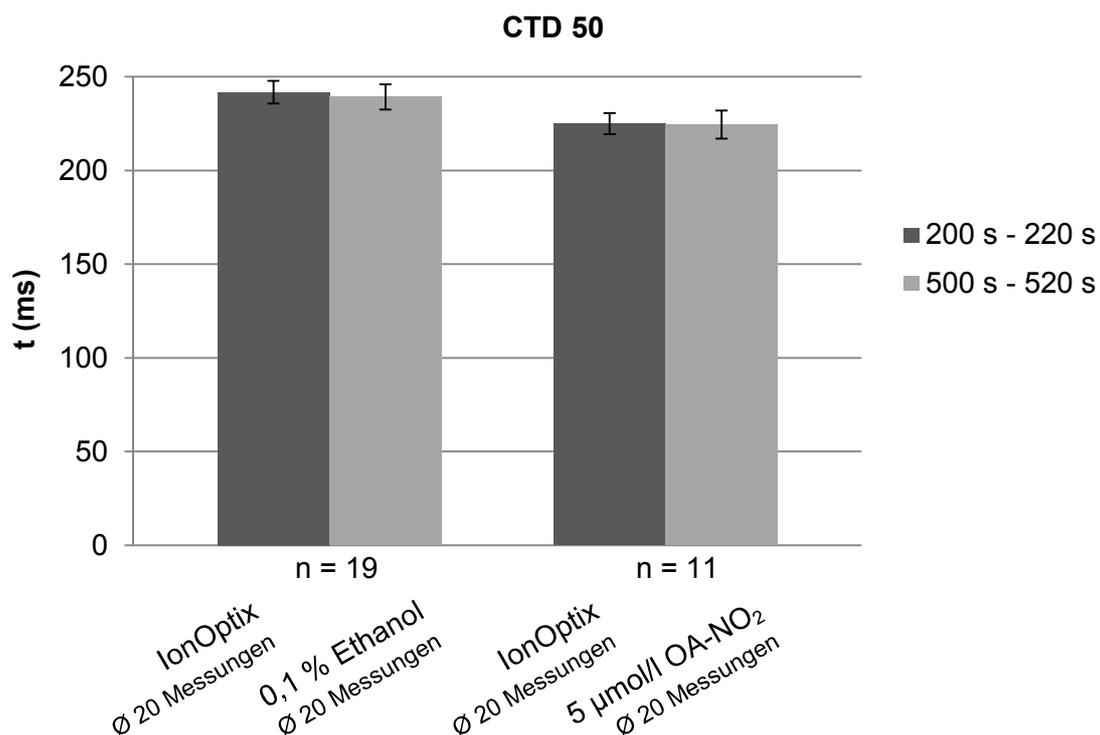


Abbildung 22: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 50 % des maximalen Wertes

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

Bei der Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 80 % des maximalen Wertes (CTD 80) ergaben sich vergleichbare Resultate. In der IonOptix-Lösung waren die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen nicht signifikant unterschiedlich voneinander ($347,95 \pm 9,87$ ms vs. $336,60 \pm 11,46$ ms, $p = 0,47$). Das 0,1 prozentige Ethanol bzw. $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ änderten die CTD 80 in den Zellen gering und die Mittelwerte aus beiden Lösungen waren nicht signifikant unterschiedlich voneinander ($339,95 \pm 9,29$ ms vs. $337,45 \pm 9,81$ ms, $p = 0,86$).

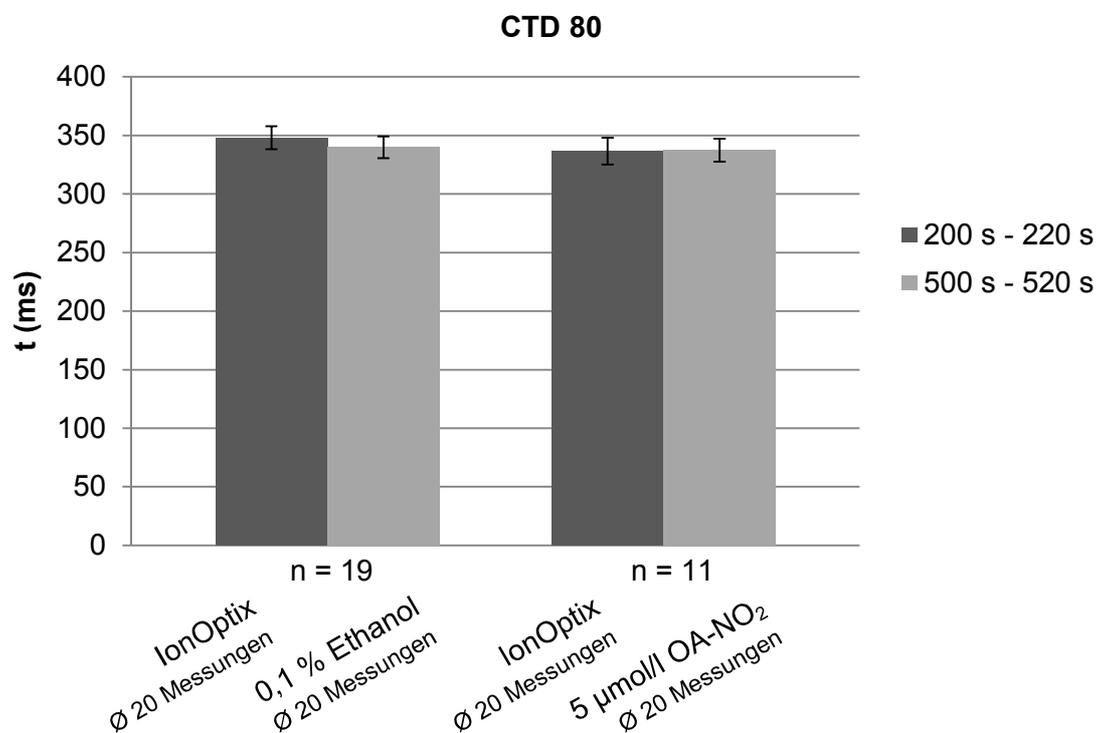


Abbildung 23: Einfluss von 0,1 % Ethanol und $5 \mu\text{mol/l}$ OA-NO₂ auf die Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 80 % des maximalen Wertes

Angegeben sind $MW \pm SEM$

Quelle: Eigene Darstellung

5 Diskussion

Die Beeinflussung vielfältiger Zellsignalabläufe durch NO₂-FAs wurde in einer Vielzahl von Studien belegt [Schopfer et al., 2005; Cui et al., 2006; Villacorta et al., 2007; Kansanen et al., 2009; Bonacci et al., 2011]. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass NO₂-FAs des Weiteren antiarrhythmische Eigenschaften unter ischämischen Bedingungen besitzen. Für die therapeutische Anwendung der NO₂-FAs als Antiarrhythmikum ist zugleich die Beurteilbarkeit des proarrhythmogenen Potentials eine wichtige Voraussetzung. Dazu ist die Analyse der Wirkung von NO₂-FAs auf die Elektrophysiologie der ventrikulären Einzelzelle notwendig, denn Veränderungen dieser Eigenschaften der Zelle können zu der Entstehung von Herzrhythmusstörungen führen [Dhein und Stark, 2008]. Diesbezüglich wurde bislang der elektrophysiologische Einfluss der NO₂-FAs nicht erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten und Calcium-Fluoreszenzmessungen untersucht, ob die NO₂-FA OA-NO₂ die Elektrophysiologie der nativen ventrikulären Kardiomyozyte von FVB-Mäusen beeinflusst und somit die Fähigkeit besitzt Arrhythmien auszulösen.

5.1 Interpretation der Patch-Clamp-Ergebnisse

Mittels der Patch-Clamp-Technik konnte der Effekt von NO₂-FAs auf das AP isolierter nativer ventrikulärer Herzmuskelzellen bewertet werden. Dabei führte OA-NO₂ zu keiner signifikanten Veränderung der Parameter des AP Ruhemembranpotential, Overshoot und APD. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die NO₂-FA OA-NO₂, trotz der hohen Konzentration von 5 µmol/l, keinen signifikanten Einfluss auf das AP nativer ventrikulärer Kardiomyozyten von FVB-Mäusen hat.

Damit kann eine signifikante Verlängerung der APD durch OA-NO₂ in nativen Zellen ausgeschlossen werden. Die mit einer APD-Verlängerung einhergehende Begünstigung von frühen Nachdepolarisationen und darauf

beruhenden ventrikulären Tachykardien [Seidl und Senges, 1999] erscheint somit unter einer OA-NO₂-Behandlung unwahrscheinlich.

Es kommt ebenfalls zu keiner signifikanten Verkürzung der APD durch OA-NO₂ unter nativen Bedingungen. Damit wird die Begünstigung eines Reentrys, durch die mit einer APD-Verkürzung einhergehenden Verkürzung der Refraktärzeit [Dhein und Stark, 2008], unter dem Einfluss von OA-NO₂ weitgehend ausgeschlossen.

Ferner beeinflusst OA-NO₂ das Ruhemembranpotential unter nativen Bedingungen nicht signifikant. Eine Abnahme des Ruhemembranpotentials in ventrikulären Myokardfasern kann zu einer unphysiologischen Bildung von APs in diesen Zellen führen [Seidl und Senges, 1999]. Da OA-NO₂ das Ruhemembranpotential nicht signifikant ändert, ist die Entstehung einer abnormen Automatie unter OA-NO₂ unwahrscheinlich.

5.2 Interpretation der Ergebnisse der Calcium-Fluoreszenzmessungen

Die Calcium-Fluoreszenzmessungen dienten der Beurteilung des Effekts von NO₂-FAs auf den zytosolischen Calcium-Transienten unter nativen Bedingungen. Dabei hatte OA-NO₂ keinen signifikanten Einfluss auf die Parameter Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des Calcium-Anstiegs, prozentuale maximale Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses sowie CTD 50 und 80. Bei den Parametern Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses und Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Calcium-Abnahme ergab sich ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollversuchen. Bei der statistischen Analyse zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse beider Parameter bereits in der IonOptix-Lösung signifikant unterschiedlich waren. Des Weiteren war der Anstieg des Basiswertes des Fluoreszenzverhältnisses unter dem Einfluss der 0,1 % Ethanol-Lösung und 5 µmol/l OA-NO₂-Lösung nicht signifikant unterschiedlich ($0,03 \pm 0,01$ vs. $0,03 \pm 0,01$, $p = 0,92$), wodurch die anfängliche Signifikanz bestehen blieb. Die signifikante Änderung des Basiswertes des Fluoreszenzverhältnisses ist somit

nicht auf den Einfluss von OA-NO₂ zurückzuführen. Entsprechendes trifft für die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Calcium-Abnahme zu. Diese war ebenfalls bereits unter gleichen Bedingungen in der IonOptix-Lösung signifikant unterschiedlich zwischen beiden Versuchsreihen. Die gemessenen Zeiten nahmen in beiden Versuchsreihen unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO₂ im Mittel zu. Die Differenzen zwischen den Endwerten und den Ausgangswerten unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (6,16 ± 7,33 ms vs. 7,65 ± 10,97 ms, p = 0,91). Folglich führte das in beiden Lösungen enthaltene 0,1 prozentige Ethanol zu der Änderung, wohingegen OA-NO₂ keinen Einfluss hatte.

Zusammenfassend zeigen die Calcium-Fluoreszenzmessungen, dass OA-NO₂, selbst in der hohen Konzentration von 5 µmol/l, keinen signifikanten Einfluss auf den zytosolischen Calcium-Transienten von nativen ventrikulären Kardiomyozyten von FVB-Mäusen besitzt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass OA-NO₂ keinen Effekt auf die zytosolische Calcium-Homöostase unter nativen Bedingungen hat. Eine signifikante Erhöhung des Basiswertes des Fluoreszenzverhältnisses konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die durch eine pathologisch erhöhte diastolische Calcium-Konzentration ausgelösten späten Nachdepolarisationen [Seidl und Senges, 1999] werden somit unter OA-NO₂-Behandlung unwahrscheinlich. Letztendlich können die darauf beruhenden ventrikulären Extrasystolen und Arrhythmien [Seidl und Senges, 1999; Dhein und Stark, 2008] ebenso ausgeschlossen werden.

Bisher gibt es keine Veröffentlichungen von weiteren Untersuchungen des elektrophysiologischen Einflusses NO₂-FAs auf native Herzmuskelzellen. Somit kann kein Vergleich mit anderen Resultaten erfolgen.

5.3 Fazit und Forschungsimplicationen

Es wurde der Einfluss von OA-NO₂ auf das AP und den zytosolischen Calcium-Haushalt in isolierten nativen ventrikulären Kardiomyozyten untersucht, um die elektrophysiologische Wirkung der NO₂-FA auf diese Zellen zu charakterisieren. Damit sollte festgestellt werden, ob OA-NO₂ die Elektrophysiologie dieser Zellen ändert und zu der Entstehung von Herzrhythmusstörungen führen kann. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse eine Proarrhythmie durch OA-NO₂ unwahrscheinlich erscheinen. Hinsichtlich der positiven antiarrhythmischen Eigenschaften unter ischämischen Bedingungen sind NO₂-FAs somit weiterhin eine interessante Substanz bezüglich einer Arzneimittelentwicklung.

Um weiterführende Erkenntnisse zu dem elektrophysiologischen Einfluss von NO₂-FAs zu gewinnen, sollte in folgenden Arbeiten die Auswirkung auf die wichtigsten Ionenkanäle der verschiedenen Zellen des Herzens erforscht werden. Mittels Patch-Clamp-Messungen in der Voltage-Clamp-Anordnung sind Untersuchungen einzelner Ströme durch Ionenkanäle möglich [Numberger und Draguhn, 1996]. Somit kann der Einfluss von NO₂-FAs auf die Ionenströme identifiziert und detailliertere Aussagen getroffen werden.

Des Weiteren ist der Einfluss von NO₂-FAs auf die Elektrophysiologie der Zellen des Sinusknotens und AV-Knotens unklar, welche wichtige Schaltstellen der Erregungsbildung und Erregungsleitung des Herzens sind. Diese Zellen exprimieren andere Ionenkanäle als ventrikuläre Herzmuskelzellen und besitzen dadurch ein für sie charakteristisches AP [Bakker und Rijen, 2010]. Aufgrund der unterschiedlichen Ausstattung mit Ionenkanälen ist eine abweichende Wirkung an diesen Zellen möglich, woraus Erregungsbildungs- oder Erregungsleitungsstörungen resultieren können.

Für eine umfassende Bewertung des elektrophysiologischen Einflusses NO₂-FAs ist zusätzlich die weitergehende Untersuchung im Zellverband und am intakten Herz notwendig. Das Herz ist ein Synzytium, daher müssen die

Mechanismen im Gewebeverband beachtet werden. Denkbar ist beispielsweise die Beeinflussung der Geometrie der Erregungsausbreitung und die daraus resultierende Entstehung von Rhythmusstörungen [Dhein und Stark, 2008]. Experimente mit Hilfe von Proarrhythmie-Modellen *in vitro* und *in vivo* sind für die Untersuchung komplexer elektrophysiologischer Prozesse im Gewebeverband geeignet. Denkbar ist die Verwendung des *in-vitro*-Proarrhythmie-Modells der arteriell perfundierten linksventrikulären wedge-Präparation, bei der gleichzeitig ein Pseudo-Elektrokardiogramm und APs der Zellen des Epi-, Endo- und mittleren Myokards aufgezeichnet werden [Yan und Antzelevitch, 1998]. Mit diesem Modell wird der unterschiedliche Einfluss der untersuchten Substanz auf die APD der Zellen der 3 Herzmuskelschichten untersucht. Eine ausgeprägte Veränderung der APD von Zellen einer Myokardschicht führt zu einer verstärkten Heterogenität zwischen den Zellschichten und kann proarrhythmogen wirken [Antzelevitch, 2004; Extramiana und Antzelevitch, 2004]. Weitere *in-vitro*-Proarrhythmie-Modelle beruhen auf dem Langendorff-perfundierten isolierten Herz [Lawrence et al., 2005]. Dazu zählt unter anderem das automatisierte SCREENIT-Modell [Valentin et al., 2004]. Mit Hilfe von *in-vivo*-Modellen (zum Beispiel das Methoxamin-sensibilisierte Herz-Modell oder chronisch AV-Knotenblockierte Herz-Modell) können des Weiteren neurogene und adrenalinbedingte Effekte mit einbezogen und dessen Wechselwirkungen mit NO₂-FAs erforscht werden [Lawrence et al., 2005].

5.4 Ausblick auf mögliche Eigenschaften nitrierter Fettsäuren am Beispiel von Omega-3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren

Anhand der bereits elektrophysiologisch umfassender erforschten Omega-3-mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (Ω 3-PUFAs) wird ersichtlich, dass Fettsäuren vielfältige Effekte auf Herzmuskelzellen haben können. Wie Den Ruijter et al. (2007) ausführt, können die in Fisch vorhandenen Ω 3-PUFAs, wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, die APD verlängern oder

verkürzen, je nachdem welche Spezies untersucht wird und ob sie durch mehrere Wochen Diät in die Zellmembran eingebaut wurden oder durch kurzfristige Injektion im Blut zirkulieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ω 3-PUFAs direkte Effekte auf Natrium-, Calcium- und Kalium-Ionenströme besitzen, wobei der Einfluss ebenfalls zwischen zirkulierenden und in die Zellmembran eingebundene Ω 3-PUFAs variiert. Im Gegensatz dazu inhibieren Ω 3-PUFAs unabhängig von der Zeit der Darreichung den Natrium/Calcium-Austauscher. Die Beeinflussung des intrazellulären Calcium-Transienten wiederum wurde nur bei einer kurzfristigen Gabe von Ω 3-PUFAs beobachtet. Dabei führt Eicosapentaensäure zu einer Reduktion der Calcium-Amplitude, der diastolischen Calcium-Konzentration und der spontanen Calcium-Freisetzung aus dem SR. Diese Daten berücksichtigend, könnte die antiarrhythmische Wirkung von Ω 3-PUFAs auf der Reduktion von späten Nachdepolarisationen beruhen, indem sie den Natrium/Calcium-Austauscher inhibieren, spontane Calcium-Freisetzungen aus dem SR senken und das AP verkürzen. Die Verminderung früher Nachdepolarisationen durch das Verhindern des Wiederöffnens von L-Typ Calciumkanälen ist zusätzlich denkbar. Andererseits können unter dem Einfluss von Ω 3-PUFAs vermehrt Reentry-Arrhythmien auftreten, aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf den Natriumkanal und einer Verkürzung des AP [Den Ruijter et al., 2007].

Die vorangehenden Fakten bezüglich der Ω 3-PUFAs zeigen, dass ihre Wirkungsweise davon abhängig ist, ob die Fettsäuren frei im Blut zirkulieren oder in gebundener Form in den Zellmembranen vorliegen. NO_2 -FAs können durch Veresterung zu komplexen Lipiden ebenfalls in Zellmembranen und Lipoproteinen eingebunden, sowie durch Esterasen und die Phospholipase A_2 mobilisiert werden [Freeman et al., 2008]. In Anbetracht dessen ist bei weiterführenden Untersuchungen zur Wirkungsweise der NO_2 -FAs die Berücksichtigung der Darreichungszeit sinnvoll.

In randomisierten kontrollierten klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Ω 3-PUFAs die Inzidenz des plötzlichen Herztodes bei Postinfarkt-Patienten senken, indem sie ventrikuläre Arrhythmien verhindern [Burr et al., 1989;

GISSI Prevention Trial, 1999; Den Ruijter et al., 2007]. Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere klinische Studie, dass eine Nahrungsergänzung mit Fischöl die Inzidenz des plötzlichen Herztodes bei Patienten mit Angina pectoris erhöht [Burr et al., 2003]. Daran wird deutlich, dass Ω 3-PUFAs sowohl anti- als auch proarrhythmogene Effekte haben können. Ursächlich dafür könnten die unterschiedlichen Mechanismen sein, die der Arrhythmieentstehung zugrunde liegen und mit bestimmten Pathologien assoziiert sind. Während Arrhythmien bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch getriggerte Aktivität ausgelöst werden [Janse, 2004], kommt es bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt durch kreisende Erregung zu Herzrhythmusstörungen [Dhein und Stark, 2008]. Vermindern Ω 3-PUFAs frühe und späte Nachdepolarisationen und begünstigen kreisende Erregungen, könnte die Reduktion der kardiovaskulären Mortalität auf eine Untergruppe der Bevölkerung begrenzt sein [Den Ruijter et al., 2007].

In Hinblick darauf könnten NO_2 -FAs ebenfalls gegensätzliche Wirkungen in Abhängigkeit von kardialen Grunderkrankungen haben. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass NO_2 -FAs Arrhythmien infolge einer akuten Myokardischämie verhindern können, indem sie die Aktivierung des RyR2 durch Oxidantien hemmen. Welchen Einfluss die NO_2 -FAs bei Patienten mit anderen kardialen Vorerkrankungen haben, sollte ein Schwerpunkt weiterführender Studien sein.

6 Zusammenfassung

NO₂-FAs sind hoch reaktive Verbindungen, die vielfältige Zellsignalabläufe beeinflussen. Es gibt Hinweise darauf, dass NO₂-FAs ventrikuläre Arrhythmien im Rahmen myokardialer Ischämie verhindern können. Für ihre therapeutische Anwendung ist der Ausschluss eines proarrhythmogenen Potentials essentiell. Dafür ist die Kenntnis des elektrophysiologischen Einflusses auf native Herzmuskelzellen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die elektrophysiologische Wirkung der NO₂-FA OA-NO₂ auf native ventrikuläre Kardiomyozyten von FVB-Mäusen untersucht. Dazu wurden in Patch-Clamp-Experimenten APs unter dem Einfluss von 5 µmol/l OA-NO₂ abgeleitet und in Calcium-Fluoreszenzmessungen die Auswirkung von 5 µmol/l OA-NO₂ auf den zytosolischen Calcium-Transienten überprüft.

Es wurde gezeigt, dass OA-NO₂ keinen signifikanten Effekt auf das AP und den zytosolischen Calcium-Transienten ventrikulärer Kardiomyozyten unter nativen Bedingungen hat. Da OA-NO₂ die Elektrophysiologie der nativen ventrikulären Herzmuskelzelle nicht beeinflusst, ist die auf Veränderungen dieser Eigenschaften beruhende Begünstigung ventrikulärer Arrhythmien unwahrscheinlich. Die Ergebnisse sprechen somit gegen eine Proarrhythmie durch die NO₂-FA OA-NO₂.

Um weiterführende Erkenntnisse zu dem elektrophysiologischen Einfluss von NO₂-FAs zu gewinnen, sollte ihre Auswirkung auf die Zellen des Sinusknotens und AV-Knotens betrachtet werden. Des Weiteren sind zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse Versuche mit in-vitro- und in-vivo-Proarrhythmie-Modellen notwendig. Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften der NO₂-FAs sind diese weiterhin eine vielversprechende Substanz hinsichtlich einer Arzneimittelentwicklung.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktionspotential ventrikuläre Kardiomyozyte des Menschen.....	7
Abbildung 2: Kreisende Erregung.....	10
Abbildung 3: Strukturformel von OA-NO ₂	13
Abbildung 4: Nitroalkylierung.....	14
Abbildung 5: Frühe und späte Nachdepolarisation.....	20
Abbildung 6: Messplatz Patch-Clamp-Technik	31
Abbildung 7: Messkammer und Pipettenhalterung Patch-Clamp-Technik.....	32
Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Patch-Clamp-Experimente.....	36
Abbildung 9: Messplatz Calcium-Fluoreszenzmessungen	39
Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf der Calcium-Fluoreszenzmessungen.....	43
Abbildung 11: Parameter des Calcium-Transienten	45
Abbildung 12: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO ₂ auf das Ruhemembranpotential.....	47
Abbildung 13: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO ₂ auf den Overshoot.....	48
Abbildung 14: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO ₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 20 prozentiger Repolarisation	49
Abbildung 15: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO ₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 50 prozentiger Repolarisation	50
Abbildung 16: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 µmol/l OA-NO ₂ auf die Dauer des Aktionspotentials bei 90 prozentiger Repolarisation	51

Abbildung 17: Aktionspotentiale unter dem Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂	52
Abbildung 18: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf den Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses	54
Abbildung 19: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs	55
Abbildung 20: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf die prozentuale maximale Calcium-Amplitude, gemessen an dem Basiswert des Fluoreszenzverhältnisses.....	56
Abbildung 21: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme.....	57
Abbildung 22: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf die Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 50 % des maximalen Wertes	58
Abbildung 23: Einfluss von 0,1 % Ethanol und 5 $\mu\text{mol/l}$ OA-NO ₂ auf die Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 80 % des maximalen Wertes	59

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Perfusions- und Enzymlösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen.....	25
Tabelle 2: Zusammensetzung der Stopp- und Calciumlösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen.....	26
Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode- und Kalium-Glutamat-Lösung sowie die Hersteller der verwendeten Substanzen.....	34
Tabelle 4: Zusammensetzung der IonOptix-Lösung und die Hersteller der verwendeten Substanzen	41

9 Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential (von englisch action potential)
APD	Aktionspotentialdauer
APD 20	Aktionspotentialdauer bei 20 prozentiger Repolarisation
APD 50	Aktionspotentialdauer bei 50 prozentiger Repolarisation
APD 90	Aktionspotentialdauer bei 90 prozentiger Repolarisation
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
ATP	Adenosin-5-(tetrahydrogen-triphosphat), Dinatriumsalz
AV-Knoten	Atrioventrikulärer-Knoten
BDM	2,3-Butandionmonoxim
CTD 50	Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 50 % des maximalen Wertes des Fluoreszenzverhältnisses
CTD 80	Dauer des Calcium-Transienten bis zum Absinken des Fluoreszenzverhältnisses um 80 % des maximalen Wertes des Fluoreszenzverhältnisses
dep v	Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs
dep v t	Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit des zytosolischen Calcium-Anstiegs
DNA	deoxyribonucleic acid
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
F _{340/380}	Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm Anregungslicht
FBS	fötales Rinderserum
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
I _{Ca,L}	langsamer Calciumeinstrom
I _{Na}	schneller Natriumeinstrom
I _{K1}	zeitunabhängiger Kaliumauswärtsstrom
I _{Kr,Ks}	schnell und langsam verzögerter Kaliumauswärtsstrom

I_{To}	transiente Auswärtsströme
IU	international unit
KHK	Koronare Herzkrankheit
LNO ₂	Nitro-Linolsäure
LOO [·]	Lipidperoxyradikal
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NF- κ B	nuclear factor-,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nrf2	nuclear factor erythroid 2 related factor2
[·] NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
[·] NO ₂	Stickstoffdioxid
NO ₂ -FA	nitrierte Fettsäure (von englisch nitrated fatty acid)
O ₂ ^{-·}	Superoxid
OA-NO ₂	Nitro-Ölsäure
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
ret v	Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme
ret v t	Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der zytosolischen Calcium-Abnahme
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SWORD-Studie	Survival With ORal D-sotalol-Studie
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Ω 3-PUFA	Omega-3-mehrfach-ungesättigte Fettsäure (von englisch omega-3-polyunsaturated fatty acid)

10 Literaturverzeichnis

Aghdasi B, Zhang JZ, Wu Y, Reid MB, Hamilton SL (1997) Multiple classes of sulfhydryls modulate the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem.* 272: 3739-3748.

Antzelevitch C (2004) Arrhythmogenic mechanisms of QT prolonging drugs: is QT prolongation really the problem? *J Electrocardiol.* 37 Suppl: 15-24.

Anzai K, Ogawa K, Ozawa T, Yamamoto H (2000) Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid Redox Signal.* 2: 35-40.

Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW (2003) SR calcium handling and calcium after-transients in a rabbit model of heart failure. *Cardiovasc Res.* 58: 99-108.

Baker LM, Baker PR, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R, Freeman BA (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem.* 282: 31085-31093.

Baker PR, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 11577-11582.

Baker PR, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LM, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem.* 280: 42464-42475.

Bakker JMT, Rijen HVM (2010) Cardiac Action Potentials, Ion Channels and Gap Junctions. In: *Cardiac Electrophysiology Methods and Models.* Sigg DC, Iuzzo PA, Xiao YF, He B (Hrsg.) Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 53-72.

Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G (2001) Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 276: 20144-20153.

Becker PL, Fay FS (1987) Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *Am J Physiol.* 253: C613-C618.

Belevych AE, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, Wilson LD, Cardounel AJ, Laurita KR, Carnes CA, Billman GE, Gyorke S (2009) Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 84: 387-395.

Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415: 198-205.

Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, Rudolph TK, Rudolph V, Khoo NK, Kelley EE, Freeman BA (2011) Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem.* 286: 16074-16081.

Böttcher F (2009) Wirkungsweise des Nitroxyl-donator NCA an isolierten Kardiomyozyten und am Langendorff-perfundierten Herz der Maus. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.

Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet.* 2: 757-761.

Burr ML, Shfield-Watt PA, Dunstan FD, Fehily AM, Breay P, Ashton T, Zotos PC, Haboubi NA, Elwood PC (2003) Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 57: 193-200.

Clusin WT (2003) Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40: 337-375.

Coles B, Bloodsworth A, Clark SR, Lewis MJ, Cross AR, Freeman BA, O'Donnell VB (2002) Nitrooleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel anti-inflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ Res.* 91: 375-381.

Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PR, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP, Agarwal A, Freeman BA, Chen YE (2006) Nitroated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem.* 281: 35686-35698.

De Gruyter W (2012) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* 264. Aufl., Walter De Gruyter GmbH, Berlin, Boston. 1029.

Den Ruijter HM, Berecki G, Opthof T, Verkerk AO, Zock PL, Coronel R (2007) Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. *Cardiovasc.Res.* 73: 316-325.

Dhein S, Stark G (2008) Antiarrhythmika und antiarrhythmische Therapie - Pathophysiologie, Klinik und Pharmakologie der Herzrhythmusstörungen. Ammon HPT, Werning C (Hrsg.) *Medizinisch-pharmakologisches Kompendium Band 20*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 45, 47, 51-59, 71, 73.

Diaz ME, O'Neill SC, Eisner DA (2004) Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. *Circ Res.* 94: 650-656.

Extramiana F, Antzelevitch C (2004) Amplified transmural dispersion of repolarization as the basis for arrhythmogenesis in a canine ventricular-wedge model of short-QT syndrome. *Circulation.* 110: 3661-3666.

Favero TG, Zable AC, Abramson JJ (1995) Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270: 25557-25563.

Ferreira AM, Ferrari MI, Trostchansky A, Batthyany C, Souza JM, Alvarez MN, Lopez GV, Baker PR, Schopfer FJ, O'Donnell V, Freeman BA, Rubbo H (2009) Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J.* 417: 223-234.

Freeman BA, Baker PR, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A, d'Ischia M (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem.* 283: 15515-15519.

Gallon AA, Pryor WA (1994) The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids.* 29: 171-176.

Gaztanaga L, Marchlinski FE, Betensky BP (2012) Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Rev.Esp.Cardiol.* 65: 174-185.

Geisler AC, Rudolph TK (2012) Nitroalkylation - A redox sensitive signaling pathway. *Biochim.Biophys.Acta.* 1820: 777-784.

Gillis AM (2004) Class I Antiarrhythmic Drugs: Quinidine, Procainamide, Disopyramide, Lidocaine, Mexiletine, Flecainide and Propafenone. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. Zipes DP, Jalife J (Hrsg.) 4. Aufl., Saunders An Imprint of Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania. 911-912.

GISSI-Prevenzione Trial (1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 354: 447-455.

Goldhaber JJ, Xie LH, Duong T, Motter C, Khuu K, Weiss JN (2005) Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes: the key role of intracellular calcium cycling. *Circ Res*. 96: 459-466.

Herold G (2013) *Innere Medizin*. Gerd Herold, Köln. 239, 252-258, 293-295.

IonOptix LLC (2012) IonOptix Overview: Myocyte System Hyper Switch. Milton, MA USA [Online im Internet] URL: <http://www.ionoptix.com/userfiles/File/Database/HMSYS.pdf> [Stand: 18.09.2012, 13:30].

Janse MJ (2004) Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res*. 61: 208-217.

Jaye DA, Xiao YF, Sigg DC (2010) Basic Cardiac Electrophysiology: Excitable Membranes. In: *Cardiac Electrophysiology Methods and Models*. Sigg DC, Iuzzo PA, Xiao YF, He B (Hrsg.) Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 41-51.

Kanno S, Saffitz JE (2001) The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol*. 10: 169-177.

Kansanen E, Jyrkkanen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivela AM, Hakkinen SK, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL (2009) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem*. 284: 33233-33241.

Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, Woodcock SR, Yamamoto M, Carlberg C, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem*. 286: 14019-14027.

Laurita KR, Rosenbaum DS (2008) Cellular mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Prog Biophys Mol Biol*. 97: 332-347.

Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP (2005) Nonclinical proarrhythmia models: predicting Torsades de Pointes. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 52: 46-59.

Loewel H (2006) Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. Robert Koch-Institut Gesundheitsberichterstattung. 33: 9-15.

Meumann B (2011) Notfall: Myokardinfarkt Vollstau am Herzkranz. *Via medici*. 1: 30-32.

Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods*. 46: 143-151.

Pastore JM, Girouard SD, Laurita KR, Akar FG, Rosenbaum DS (1999) Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation*. 99: 1385-1394.

Pessah IN, Waterhouse AL, Casida JE (1985) The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 128: 449-456.

Picht E, DeSantiago J, Blatter LA, Bers DM (2006) Cardiac alternans do not rely on diastolic sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuations. *Circ Res*. 99: 740-748.

Porter MC, Zhang JZ, Hamilton SL (1999) A role for cysteine 3635 of RYR1 in redox modulation and calmodulin binding. *J Biol Chem*. 274: 36831-36834.

Pruvot EJ, Katta RP, Rosenbaum DS, Laurita KR (2004) Role of calcium cycling versus restitution in the mechanism of repolarization alternans. *Circ Res*. 94: 1083-1090.

Pryor WA, Lightsey JW (1981) Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous Acid. *Science*. 214: 435-437.

Qian YW, Sung RJ, Lin SF, Province R, Clusin WT (2003) Spatial heterogeneity of action potential alternans during global ischemia in the rabbit heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285: H2722-H2733.

Rossi PR, Yusuf S, Ramsdale D, Furze L, Sleight P (1983) Reduction of ventricular arrhythmias by early intravenous atenolol in suspected acute myocardial infarction. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 286: 506-510.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 269: 26066-26075.

Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA (1995) Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* 324: 15-25.

Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, Franek A, Pekarova M, Khoo NK, Hasty AH, Baldus S, Freeman BA (2010a) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 938-945.

Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, Bonacci G, Woodcock SR, Cole MP, Baker PR, Ramani R, Freeman BA (2010b) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 85: 155-166.

Ryden L, Ariniego R, Arnman K, Herlitz J, Hjalmarson A, Holmberg S, Reyes C, Smedgard P, Svedberg K, Vedin A, Waagstein F, Waldenstrom A, Wilhelmsson C, Wedel H, Yamamoto M (1983) A double-blind trial of metoprolol in acute myocardial infarction. Effects on ventricular tachyarrhythmias. *N Engl J Med.* 308: 614-618.

Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA (2005) Nitrooleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 2340-2345.

Seidl K, Senges J (1999) Anatomie und normale Elektrophysiologie des Herzens. In: *Interventionelle Therapie von Herzrhythmusstörungen Lehratlas zur klinischen Elektrophysiologie, Katheterablation und Elektrotherapie.* Gonska BD (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 11-20.

Shah U, Bien H, Entcheva E (2010) Microtopographical effects of natural scaffolding on cardiomyocyte function and arrhythmogenesis. *Acta Biomater.* 6: 3029-3034.

Shiferaw Y, Watanabe MA, Garfinkel A, Weiss JN, Karma A (2003) Model of intracellular calcium cycling in ventricular myocytes. *Biophys J.* 85: 3666-3686.

Shoshan-Barmatz V, Ashley RH (1998) The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels. *Int Rev Cytol.* 183: 185-270.

Smith TW, Cain ME (2004) Class III Antiarrhythmic Drugs: Amiodarone, Ibutilide and Sotalol. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside.* Zipes DP, Jalife J (Hrsg.) 4. Aufl., Saunders An Imprint of Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania. 932-933.

Statistisches Bundesamt (2012) Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4. Wiesbaden [Online im Internet] URL: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?__blob=publicationFile [Stand: 24.03.2013, 18:30].

Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di MC, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't HA, Widimsky P, Zahger D (2012) ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 33: 2569-2619.

Stühlinger H (2003) Myokardinfarkt und Beta-Blocker. *J Kardiol.* 10: 7-9.

Tsikakos D, Zoerner AA, Mitschke A, Gutzki FM (2009) Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids.* 44: 855-865.

Valentin JP, Hoffmann P, De CF, Hammond TG, Hondeghem L (2004) Review of the predictive value of the Langendorff heart model (Screenit system) in assessing the proarrhythmic potential of drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 49: 171-181.

Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen XL, Freeman BA, Chen YE, Cui T (2007) Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H770-H776.

Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, Ichikawa T, Zhang J, Petrovic-Djergovic D, Jia L, Carlsen H, Schopfer FJ, Freeman BA, Chen YE (2013) Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res.* 98: 116-124.

Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP (1996) Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*. 348: 7-12.

Wit AL, Janse MJ (1993) *The Ventricular Arrhythmias of Ischemia and Infarction Electrophysiological Mechanisms*. Futura Publishing Company Inc., Mount Kisco, New York. 8.

Wright MM, Kim J, Hock TD, Leitinger N, Freeman BA, Agarwal A (2009) Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem J*. 422: 353-361.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 279: 234-237.

Yan GX, Antzelevitch C (1998) Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation*. 98: 1928-1936.

Yap YG, Camm AJ (2003) Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart*. 89: 1363-1372.

Zhang J, Villacorta L, Chang L, Fan Z, Hamblin M, Zhu T, Chen CS, Cole MP, Schopfer FJ, Deng CX, Garcia-Barrio MT, Feng YH, Freeman BA, Chen YE (2010) Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res*. 107: 540-548.

Zissimopoulos S, Lai FA (2006) Redox regulation of the ryanodine receptor/calcium release channel. *Biochem Soc Trans*. 34: 919-921.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84: 1404-1407.

11 Danksagung

Zu aller erst danke ich herzlich PD Dr. med. Volker Rudolph für die Überlassung des Themas, sowie seine freundliche, fachlich kompetente und motivierende Betreuung.

Ein weiterer großer Dank gilt Dr. med. Alexander Schwoerer, der mich in die Patch-Clamp-Technik eingewiesen hat. Außerdem stand er mir bei der Auswertung meiner Untersuchungen immer beratend zur Seite.

Dr. med. Anne Geisler möchte ich ebenfalls sehr danken für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Zellisolation und den Fluoreszenzmessungen.

Bei allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Kardiologie, des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie und des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich für die unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meiner Familie und meinen wunderbaren Freunden. Insbesondere meine Eltern unterstützten mich sehr durch ihren liebevollen Zuspruch. Des Weiteren gilt mein großer Dank meinem Bruder für seine konstruktiven Korrekturen.

Schließlich bin ich meinem lieben Aaron sehr dankbar für seinen unersetzlichen Rückhalt und seine Anmerkungen, die mir immer eine große Hilfe waren bei der Erstellung dieser Arbeit.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Bianca Mattheß