

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

**Der Einfluss chronischer Druckentlastung auf die  
Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kanäle und den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom  
ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

aus dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Hanne Irene Broichhausen

aus Aachen

Hamburg, 2009

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 18.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Ehmke

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Reichensperner

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Sydow

*Für Papa und Mama*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ätiologie der chronischen Herzinsuffizienz und VAD-Therapie.....	1
1.2 Elektrophysiologische Grundlagen der Kardiomyozyten .....	5
1.2.1 Erregungsausbreitung über dem Myokard .....	5
1.2.2 Das linksventrikuläre Aktionspotential der Ratte .....	8
1.2.3 Die elektromechanische Kopplung .....	10
1.2.4 Spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle.....	14
1.2.4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals .....	14
1.2.4.2 Elektrophysiologische Eigenschaften des T-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals .....	16
1.2.4.3 Molekularbiologischer Aufbau des L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals.....	19
1.2.4.4 Molekularbiologischer Aufbau des T-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanals.....	20
1.3 Veränderungen chronisch druckbelasteter Kardiomyozyten .....	22
1.3.1 Kompensation durch zelluläre Hypertrophie.....	22
1.3.2 Kompensation durch Veränderung der Elektrophysiologie .....	23
1.3.3 Kompensation durch Veränderung des zellulären Ca <sup>2+</sup> -Haushaltes.....	25
1.3.4 Kompensation durch Veränderung des Metabolismus .....	25
1.3.5 Kompensation durch Veränderung des neurohumoralen Systems .....	26
1.3.6 Der Weg von der Kompensation zur Dekompensation.....	27
1.4 Die Entlastungstherapie insuffizienter Herzen beim Menschen durch VADs.....	30
1.4.1 Rückgang der zellulären Hypertrophie .....	31
1.4.2 Elektrophysiologische Veränderungen .....	32
1.4.3 Veränderungen des zellulären Ca <sup>2+</sup> -Haushaltes .....	32
1.4.4 Veränderung der neurohumoralen Parameter.....	33
1.5 Probleme klinischer Studien und die Notwendigkeit eines Tiermodells.....	34
1.6 Bisherige Erkenntnisse aus der Entlastung mittels hHTX .....	36
1.7 Problemstellung und Ziele der Arbeit.....	39
 <b>2. Material und Methoden .....</b>	 <b>41</b>
2.1 Übersicht .....	41
2.2 Durchführung der heterotopen Herztransplantation nach Ono & Lindsey .....	42

2.2.1 Entnahme des Spenderherzens .....	42
2.2.2 Implantation des Herzens .....	42
2.3 Beurteilung der linksventrikulären Masse und der Herzfrequenz .....	44
2.4 Durchführung der Zellisolation .....	45
2.5 Patch-clamp Technik .....	46
2.5.1 Die <i>patch-clamp</i> Technik .....	46
2.5.2 Die <i>cell-attached</i> Konfiguration .....	47
2.5.2.1 Die <i>whole-cell</i> Konfiguration .....	47
2.5.2.2 Die <i>ruptured-patch</i> Technik .....	47
2.5.3 <i>Voltage-clamp</i> und <i>current-clamp</i> .....	48
2.5.4 Elektrische Eigenschaften der Ganzzelleableitung .....	49
2.5.4.1 Kompensation des Serienwiderstandes $R_s$ .....	50
2.5.4.2 Übergangspotentiale und deren Korrektur .....	50
2.5.5 Vorzeichenkonventionen .....	51
2.6 Der patch-clamp Versuchsstand .....	52
2.6.1 Die mechanischen Komponenten .....	52
2.6.2 Die Versuchskammer .....	53
2.6.3 Die elektronischen Komponenten .....	54
2.6.4 Die Patchpipetten .....	54
2.6.5 Durchführung der <i>patch-clamp</i> Experimente .....	55
2.7 Auswertung der Experimente .....	56
2.7.1 Einlesen der Daten in den Computer und Auswertungsprogramme .....	57
2.8 Versuchslösungen und Chemikalien .....	58
2.8.1 Versuchslösungen .....	58
2.8.2 Herkunft der verwendeten Chemikalien .....	60
2.9 Versuchsprotokolle und Ablauf der Versuche .....	61
2.9.1 Übersicht .....	61
2.9.2 Untersuchung der spannungsabhängigen $Ca^{2+}$ -Ströme .....	63
2.9.2.1 Untersuchung der Zellkapazität .....	63
2.9.2.2 Der Stromverlauf des $I_{CaL}$ .....	63
2.9.2.3 Die funktionelle Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$ .....	65
2.9.2.4 Kinetik des $I_{CaL}$ .....	67

2.9.2.4.1 Die Inaktivierungszeitkonstanten des $I_{CaL}$ .....	67
2.9.2.4.2 Die Aktivierung des $I_{CaL}$ .....	68
2.9.2.4.3 Die steady-state Inaktivierung .....	69
2.9.2.4.4 Die zeitliche Erholung des $I_{CaL}$ von einem Inaktivierungspuls .....	71
2.9.3 Der AP-induzierte $Ca^{2+}$ -Einstrom .....	73
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
3.1 Einfluss der hHTX auf das linksventrikuläre Myokard der Ratte .....	75
3.1.1 Veränderung der linksventrikulären Masse .....	75
3.1.2 Veränderung der Herzfrequenz .....	76
3.1.3 Veränderung der Zellkapazität .....	77
3.2 Einfluss der hHTX auf die Stromdichte des $I_{CaL}$ .....	78
3.3 Funktionelle Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$ nach hHTX .....	80
3.4 Einfluss der hHTX auf die kinetische Eigenschaften des $I_{CaL}$ .....	83
3.4.1 Die Inaktivierung des $I_{CaL}$ .....	83
3.4.2 Die Aktivierung des $I_{CaL}$ .....	86
3.4.3 Die <i>steady-state</i> Inaktivierung des $I_{CaL}$ .....	88
3.4.4 Die zeitliche Erholung des $I_{CaL}$ von einem Inaktivierungspuls .....	90
3.5 Einfluss der hHTX auf den AP-induzierten $Ca^{2+}$ -Einstrom .....	92
3.5.1 Veränderung der Aktionspotentiale .....	92
3.5.2 Veränderung des $Ca^{2+}$ -Einstroms während des Aktionspotentials .....	94
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>96</b>
4.1. Einfluss der hHTX auf das linksventrikuläre Myokard der Ratte .....	96
4.1.1 Reduktion der Zellkapazität getrennt nach Epikard und Endokard .....	96
4.1.2 Veränderung des $I_{CaL}$ .....	97
4.1.2.1 Kanalzusammensetzung der L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanäle .....	98
4.1.2.2 Der Phosphorylierungsgrad der L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanäle .....	99
4.1.2.3 Konzentration der L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanäle in den Kardiomyozyten .....	100
4.1.3 Das Ausbleiben der funktionellen Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$ .....	102
4.1.4 Veränderung der APs .....	103
4.1.4.1 Einfluss des $Ca^{2+}$ -Einstroms .....	104
4.1.4.2 Schichtspezifische Unterschiede der AP-Längen .....	105

4.1.4.3 Der AP-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom .....	106
4.2 Beeinflussung der Ergebnisse durch die Versuchsverhältnisse .....	108
4.2.1 Temperatur .....	108
4.2.2 EGTA .....	109
4.2.3 Identifikation des AP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch $\text{Cd}^{2+}$ .....	110
4.2.4 Stimulationsrate der Aktionspotentiale .....	111
4.2.5 Auswirkungen der verwendeten Narkotika auf den $I_{\text{CaL}}$ .....	112
4.3 Vergleich zwischen chronischer Druckbelastung und Druckentlastung .....	113
4.3.1 Regression auf fetale Proteinmuster .....	113
4.3.2 Vergleich des $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes .....	115
4.4 Vergleich der Entlastung mittels hHTX und VAD .....	118
4.4.1 Reduktion der Zellgröße.....	119
4.4.2 Elektrophysiologische Veränderungen .....	121
4.4.3 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt im Vergleich.....	123
4.5 Auswirkungen der Erkenntnisse auf die VAD-Therapie .....	124
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>126</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>160</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>161</b>
<b>12. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>162</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Ätiologie der chronischen Herzinsuffizienz und VAD-Therapie

Herz-Kreislaufkrankungen sind in den westlichen Ländern für ca. 45% der Gesamt mortalität verantwortlich [Rieder et al. 2004]. Hierzu zählt auch die chronische Herzinsuffizienz, von der ca. 1% der westlichen Bevölkerung betroffen ist [Bauriedel et al. 2005]. Herzmuskelerkrankungen wie die primären und sekundären Kardiomyopathien, die aus zahlreichen pathophysiologischen Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems entstehen, können zur Entwicklung einer solchen chronischen Herzinsuffizienz führen.

Unter den primären Kardiomyopathien werden Herzerkrankungen zusammengefasst, deren Ätiologie weitgehend unbekannt ist. Sie werden nach klinisch-hämodynamischen Parametern beschrieben, wodurch zwischen einer hypertrophen, einer dilatativen und einer restriktiven Kardiomyopathie unterschieden werden kann. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie kommt es durch unbekannte Stimuli zu einem hypertrophen Wachstum des linken Ventrikels und des Kammerseptums, was langfristig zu einer Obstruktion des linken Ventrikels führt. Herzen, die von einer dilatativen Kardiomyopathie betroffen sind, verlieren durch zunehmende Ausdehnung der Ventrikel ihre Fähigkeit zur suffizienten Kontraktion. Die restriktive Kardiomyopathie hingegen zeichnet sich durch eine zunehmende Versteifung der Ventrikel aus, die es dem Herzen erschwert, in der Diastole, der Entspannungsphase des Herzens, genügend Blut in die Ventrikel zu füllen.

Im Unterschied zu den primären Kardiomyopathien sind die sekundären Kardiomyopathien spezifische Herzmuskelerkrankungen, deren Ätiologie bekannt ist, wie zum Beispiel ischämische, valvuläre, hypertensive und entzündliche Herzmuskelerkrankungen.

Sowohl primäre als auch sekundäre Kardiomyopathien haben eine zunehmende Arbeitsunfähigkeit zur Folge. Somit kann der Körper mit immer weniger sauerstoffreichem Blut versorgt werden. Es kommt zur Ausbildung des Symptomkomplexes einer Herzinsuffizienz.

Die medikamentöse Therapie der primären und sekundären Kardiomyopathien richtet sich nach dem präsentierten klinischen Stadium der Herzinsuffizienz, welche nach der *New York Heart Association* (NYHA) in vier Stadien eingeteilt wird (siehe Tabelle 1). Die medikamentöse Therapie zielt allerdings meist nur auf eine Verbesserung der Symptomatik ab.

NYHA-Stadium	Symptome
I	Herzerkrankung ohne Symptomatik
II	Herzerkrankung mit Beschwerden bei stärkerer Alltagsbelastung
III	Herzerkrankung mit Beschwerden bei leichter Alltagsbelastung
IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bereits in Ruhe

Tabelle 1: **Einteilung der Herzinsuffizienz nach der *New York Heart Association* (NYHA) in vier klinische Stadien**

Ist die der Kardiomyopathie zugrunde liegende Erkrankung nicht zu beherrschen, ist die Progression der chronischen Herzinsuffizienz unter konservativer Therapie kaum aufzuhalten.

Mit Progredienz der Erkrankung steigt das Risiko einer Dekompensation des insuffizienten Organs, was zwangsläufig zu einem Herz-Kreislaufversagen führt. Bei derart fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist ein Ersatz der kardialen Pumpfunktion erforderlich. Dies kann zum einen ermöglicht werden durch eine Herztransplantation. Da die Wartezeiten für passende Spenderorgane aufgrund der Knappheit und der sorgfältigen Auswahl der Organe sich über Monate erstrecken können, wurden Unterstützungssysteme, so genannte *Ventricular Assist Devices* (VADs), entwickelt. Hierbei werden Pumpensysteme, die mechanisch extra- oder intrakorporal gesteuert werden, in die Ventrikel eingebracht, über die das insuffizient arbeitende Herz unterstützt und somit entlastet werden kann (siehe Abbildung 1). Zunächst wurden diese Systeme lediglich für die kurzfristige Unterstützung der ventrikulären Pumpfunktion eingesetzt um einer akuten Dekompensation entgegenzuwirken. Mit fortschreitender Entwicklung der Pumpensysteme wurden diese allerdings derart verbessert, dass sie über immer längere

Zeitspannen die ventrikuläre Pumpfunktion unterstützen konnten. So wurde es möglich Patienten auch mit VAD-Unterstützung zu mobilisieren und ambulant zu betreuen.

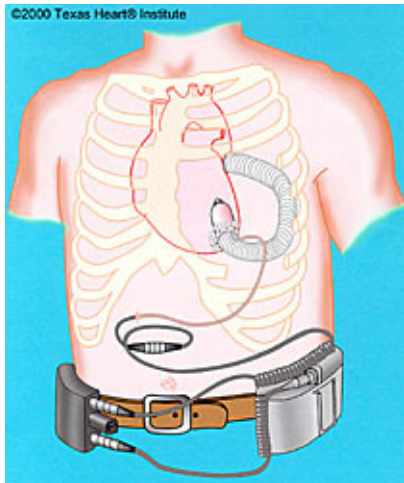


Abbildung 1: **Beispiel für ein Unterstützungssystem (Jarvik2000)**  
[Texas Heart & Institute 2000]

Diese Axialpumpe wird in die Wand des linken Ventrikels implantiert, fördert von dort ein Herzminutenvolumen (HMV) von bis zu 6,5 l/min in die Aorta und kann also bei Bedarf das „normale“ HMV vollständig übernehmen.

Hierdurch können diese Pumpensysteme mittlerweile zum einen als Überbrückung der Zeitspanne bis zur Transplantation dienen, zum anderen aber auch als langfristige Therapie in Frage kommen, wenn eine Transplantation kontraindiziert ist. Bei einigen derart behandelten Patienten zeigte sich interessanterweise, dass die durch die mechanische Unterstützung herbeigeführte Reduktion der Herzarbeit einen kardialen Umbauprozess ermöglichte, der zu einer deutlichen Verbesserung der Ventrikelgeometrie, der Kontraktilität und schließlich auch des Herzzeitvolumens führte [Dandel et al. 2005]. So konnte, wie in Abbildung 2 dargestellt, bei einem streng selektierten Patientenkollektiv nachgewiesen werden, dass nach Explantation der Pumpensysteme lediglich bei einem der zehn untersuchten Patienten eine Herztransplantation (HTX) erforderlich wurde und ein weiterer Patient mit einem biventrikulären Schrittmacher versorgt werden musste.

Alle weiteren Patienten zeigten während der Nachuntersuchungszeit eine konstante und ausreichend große Ejektionsfraktion [Birks et al. 2003].

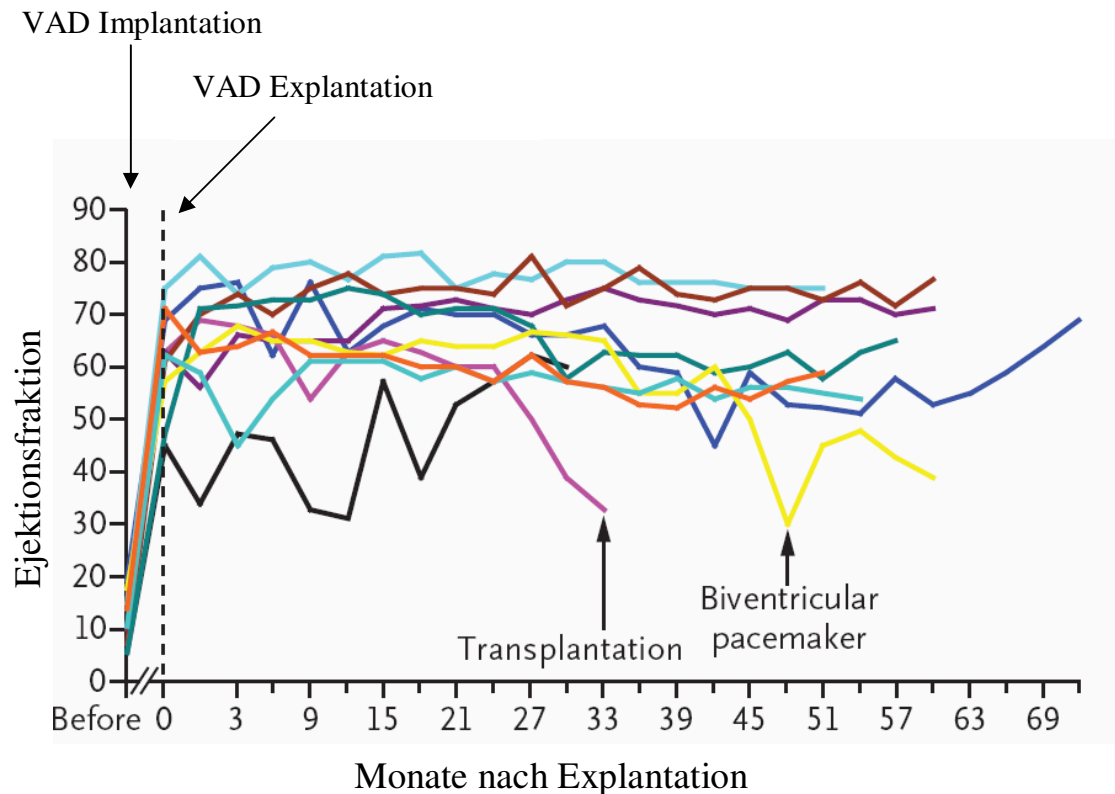


Abbildung 2: **Entwicklung der Ejektionsfraktion nach Explantation der VADs**  
[Birks et al. 2003]

Wie es zu diesen makroskopischen und funktionellen Veränderungen, die zu der Verbesserung der Funktion des erkrankten Organs führen, kommen kann, ist bisher weitgehend unbekannt. Da die Funktion des gesamten Organs allerdings streng an die Funktion der einzelnen Kardiomyozyten gekoppelt ist, werden Vorgänge auf zellulärer Ebene für diese makroskopischen und funktionellen Veränderungen des Herzmuskels verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund ist die Funktionalität der Kardiomyozyten unter chronischer Druckentlastung von besonderem Interesse. Elektrophysiologische Veränderungen der Kardiomyozyten scheinen bei dem unter Druckentlastung stattfindenden Umbauprozess eine zentrale Rolle zu spielen, weshalb auch in der vorliegenden Arbeit die elektrophysiologischen Eigenschaften, insbesondere die eines speziellen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanals, des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, unter chronischer Druckentlastung untersucht werden sollen.

Um die Veränderungen unter chronischer Druckentlastung besser verstehen zu können soll im Folgenden zunächst auf einige physiologische Funktionsweisen der Kardiomyozyten eingegangen werden. Anschließend sollen pathophysiologische Vorgänge an Kardiomyozyten bei Entstehung einer Herzinsuffizienz dargestellt und schließlich die bereits bekannten Veränderungen unter chronischer Druckentlastung skizziert werden.

### 1.2 Elektrophysiologische Grundlagen der Kardiomyozyten

#### 1.2.1 Erregungsausbreitung über dem Myokard

Die elektrische Autonomie des Herzens ermöglicht die Generierung des Herzschlages. Spezialisierte Schrittmacherzellen des rechten Vorhofes, die im so genannten Sinusknoten lokalisiert sind, besitzen die Fähigkeit zur Erzeugung von spontanen, rhythmischen Spannungsänderungen, den Aktionspotentialen (AP). Diese APs breiten sich über ein System aus besonders konfigurierten Zellen, dem so genannten Reizleitungssystem, auf die Vorhöfe und anschließend auf die Ventrikel aus (siehe Abbildung 4). Hier führen diese Spannungsänderung letztendlich zur Ausbildung von APs über dem Arbeitsmyokard, was die Kontraktion der Muskelzellen und somit der Ventrikel zur Folge hat. Um eine kontrollierte Kontraktion der Ventrikel zu ermöglichen unterliegt die Erregungsausbreitung und -rückbildung über dem ventrikulären Myokard einem streng geregelten Ablauf.

Man kann das ventrikuläre Myokard anatomisch von außen nach innen in Schichten unterteilen, wobei die äußeren Schichten als Epikard und die inneren Schichten als Endokard bezeichnet werden. Aufgrund der Lokalisation des Reizleitungssystems im Endokard werden die endokardialen Schichten zuerst von einer eintreffenden Erregung erreicht und breiten sich von dort bis zum Epikard hin aus. Da die Kardiomyozyten der epikardialen Schichten kürzere APs ausbilden als die Kardiomyozyten der endokardialen Schichten, repolarisieren die Kardiomyozyten der epikardialen Schichten trotz späterer Depolarisierung vor den Kardiomyozyten der endokardialen Schichten. Diese Aktionspotential-Längendifferenz (AP-Längendifferenz) zwischen den endokardialen und den epikardialen Schichten bildet die Grundlage dafür, dass die Front der

Erregungsausbreitung und -rückbildung in unterschiedlichen Richtungen verläuft. Die Erregungsausbreitung startet nämlich im Endokard und geht von hier auf das Epikard über, während die Erregungsrückbildung im Epikard beginnt und sich anschließend auf das Endokard ausbreitet. Hierdurch sind die endokardialen Schichten während der Systole zu jedem Zeitpunkt erregt, während die epikardialen Schichten nur in der Mitte des Zyklus einer elektrischen Aktivierung unterliegen. Deshalb zeigt der Vektor von erregtem zu unerregtem Myokard zu jedem Zeitpunkt des Zyklus in dieselbe Richtung, nämlich vom erregten Endokard zum unerregten Epikard. Dies bildet die Grundlage des physiologischen Oberflächen-EKGs mit einer positiven T-Welle (siehe Abbildung 3) [Cohen et al. 1976; Franz et al. 1987].

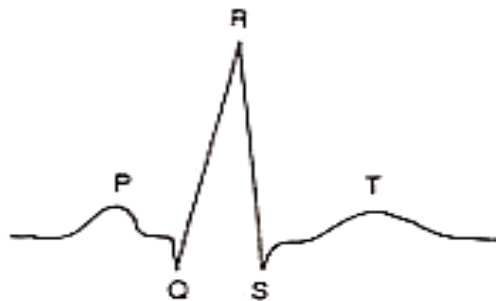


Abbildung 3: **Das physiologische Oberflächen-EKG**

P-Welle: Erregungsausbreitung über die Vorhöfe

QRS-Komplex: Erregungsausbreitung über die Ventrikel

T-Welle: Erregungsrückbildung über dem Arbeitsmyokard

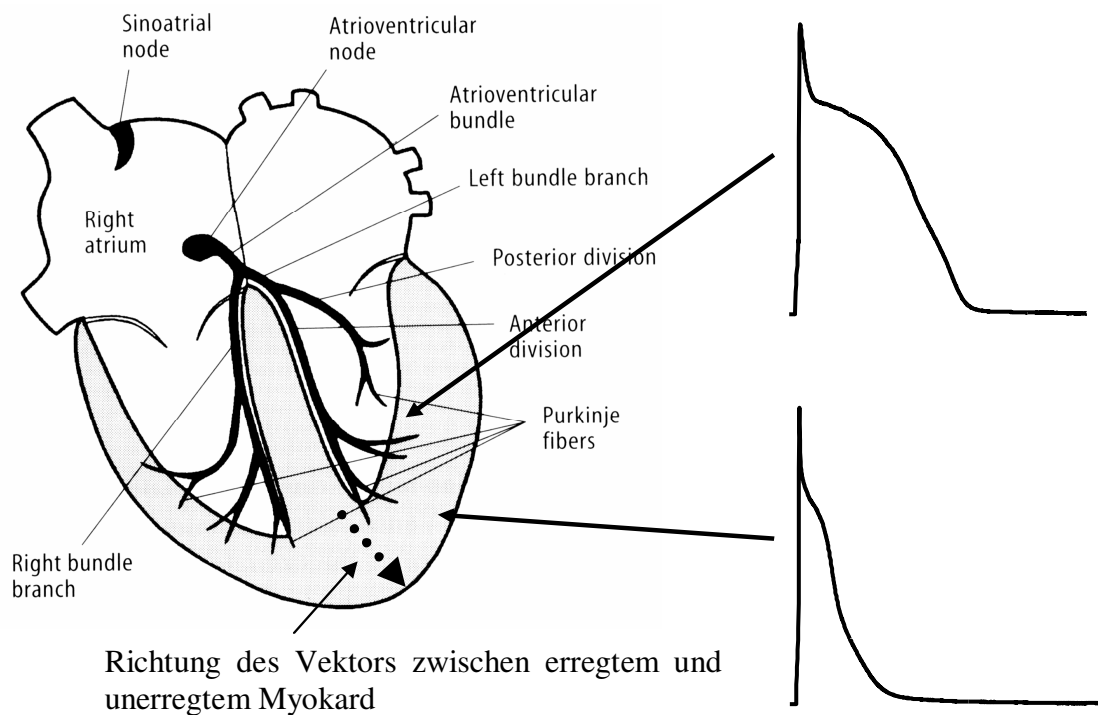


Abbildung 4: **AP-Längendifferenz zwischen Endokard und Epikard**  
[mod. nach Antoni et al. 1996].

Darstellung des kardialen Reizleitungssystems und der physiologischen AP-Längendifferenz zwischen endokardialen und epikardialen Schichten des Arbeitsmyokards

**Bestandteile des Reizleitungssystems:**

<i>Sinoatrial node:</i>	Sinusknoten
<i>Atrioventricular node:</i>	Atrioventrikularknoten
<i>Atrioventricular bundle:</i>	Atrioventrikularbündel
<i>Left bundle branch:</i>	linker Kammerschenkel
→ <i>Posterior division:</i>	posteriorer Teil des linken Kammerschenkels
→ <i>Anterior division:</i>	anteriorer Teil des linken Kammerschenkels
<i>Right bundle branch:</i>	rechter Kammerschenkel
<i>Purkinje fibers:</i>	Purkinjefasern

### 1.2.2 Das linksventrikuläre Aktionspotential der Ratte

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines APs stellt die elektrophysiologische Grundlage für die Kontraktion des Arbeitsmyokards dar. Bei einem AP des ventrikulären Arbeitsmyokards handelt es sich um eine immer gleich konfigurierte, mehrere 100ms andauernde Spannungsänderung über der Zellmembran, die von Ionenströmen durch spannungsgesteuerte Ionenkanäle getragen wird (siehe Abbildung 5). Diese spannungsgesteuerten Ionenkanäle zeigen eine speziesabhängige Variabilität, weshalb sich auch die Form der APs von Spezies zu Spezies unterscheidet [Nerbonne et al. 2005]. Da die Untersuchungen für diese Arbeit an Kardiomyozyten von Ratten durchgeführt wurden, wird hier maßgeblich auf die APs der Kardiomyozyten dieser Spezies eingegangen.

Eine vom kardialen Schrittmacher-System generierte Spannungsänderung erreicht über das Reizleitungssystem, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, die Kardiomyozyten des ventrikulären Arbeitsmyokards und führt hier zu einer Abweichung der Membranspannung vom Ruhemembranpotential (RMP), welches sich bei ca. -80mV befindet. Ist diese lokale Spannungsänderung ausreichend (-80mV auf ca. -60mV), so öffnen sich spannungsgesteuerte  $\text{Na}^+$ -Kanäle und ermöglichen einen Einstrom von  $\text{Na}^+$  in die Zelle. Dies führt die schnelle Phase der Depolarisation herbei (siehe Abbildung 5, Phase 0).

Während der Inaktivierung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle beginnt die Repolarisation der Zelle mit der Öffnung spannungsabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle, was den so genannten *transient  $\text{K}^+$  outward current*  $I_{\text{to}}$  (transienter  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom) ermöglicht. Hierdurch kommt es zu einem  $\text{K}^+$ -Ausstrom aus der Zelle, wodurch die Zelle teilweise wieder repolarisiert wird (siehe Abbildung 5, Phase 1). Die unterschiedliche Expression und Funktionsweise der diesen Strömen zugrunde liegenden Ionenkanäle in den einzelnen Schichten des Arbeitsmyokards trägt mit zu der unter Kapitel 1.2.1 beschriebenen AP-Längendifferenz zwischen den endokardialen und epikardialen Schichten bei.

Ab einer Spannung von ca. -40mV öffnen sich L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, wodurch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der *long lasting  $\text{Ca}^{2+}$  current*  $I_{\text{CaL}}$  (langsamer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom), aktiviert wird. Die Aktivierung dieses Stroms bewirkt einen depolarisierenden Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle, der dem repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ausstrom während Phase 1 entgegen wirkt, wodurch es zur Ausbildung der Plateauphase kommt (siehe Abbildung 5, Phase 2). Die Länge dieser Plateauphase wird durch die Stromdichte des  $I_{\text{to}}$  bestimmt. Je



größer die repolarisierenden Kräfte, desto schneller werden die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle inaktiviert. Somit wird über die Länge der Plateauphase auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär reguliert, worauf in Kapitel 1.2.3 noch genauer eingegangen werden wird [Volk et al. 1999].

Nach Inaktivierung des  $I_{\text{CaL}}$  wird die Repolarisation durch die Aktivierung weiterer  $\text{K}^+$ -Ströme abgeschlossen (siehe Abbildung 5, Phase 3) und das Ruhemembranpotential (RMP) wieder hergestellt (siehe Abbildung 5, Phase 4).

Eine besondere Rolle bei der Bildung des APs übernimmt der  $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX). Dieser sekundär aktive Iontentransporter ist neben den spannungsgesteuerten Ionenkanälen in der Plasmamembran der Kardiomyozyten lokalisiert und macht sich das Gefälle von  $\text{Na}^+$ -Ionen über der Plasmamembran zunutze, um  $\text{Ca}^{2+}$  zu transportieren. Da die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration während des APs allerdings stark variiert, verändert sich auch die Arbeitsrichtung des NCX. Befinden sich in der Zelle niedrige Konzentrationen an  $\text{Na}^+$ -Ionen, wie zum Beispiel während das RMP über der Zelle anliegt (siehe Abbildung 5, Phase 4), transportiert der NCX  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  aus der Zelle heraus. Kommt es allerdings zum Beispiel durch Depolarisation der Zelle zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration, dann kann sich die Richtung des Iontentransportes umdrehen und es werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle hinein und  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle heraustransportiert. Hierdurch kann der NCX neben dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Bildung der Plateauphase mit beitragen.

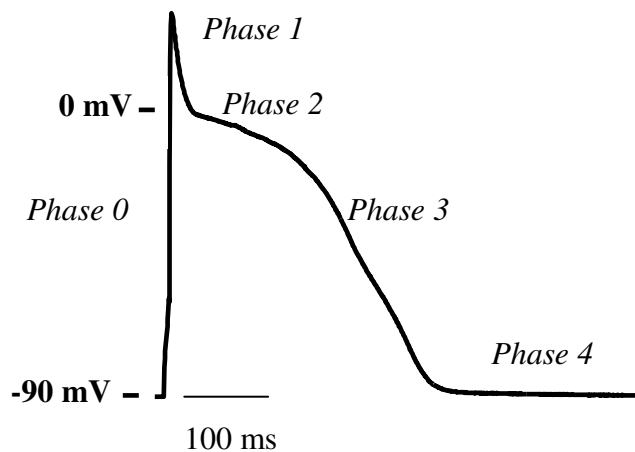


Abbildung 5: **Phasen des APs ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte**  
[mod. nach Nerbonne et al. 2005]

- Phase 0: schnelle Depolarisation durch  $I_{Na}$
- Phase 1: kurzfristige Repolarisation durch  $I_{to}$
- Phase 2: Plateauphase, getragen durch  $I_{CaL}$  und  $I_{NCX}$
- Phase 3: Repolarisation durch  $I_K$
- Phase 4: Wiederherstellung RMP

### 1.2.3 Die elektromechanische Kopplung

Den Trigger für die Kontraktion einer Herzmuskelzelle stellt ein Konzentrationsanstieg von  $Ca^{2+}$  im Zytosol der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) dar. Hierbei ist die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten proportional zum Konzentrationsanstieg des  $Ca^{2+}$  [Bouchard et al. 1995]. Das AP bildet die elektrophysiologische Grundlage für den Konzentrationsanstieg von  $Ca^{2+}$  im Zytosol. Deshalb wird dieser Vorgang auch als elektromechanische Kopplung bezeichnet auf deren genaue Funktionsweise im Folgenden näher eingegangen werden soll [Bers et al. 2002].

Während der Plateauphase der APs (siehe Abbildung 5, Phase 2) kommt es durch Aktivierung der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle zu einem Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen von extrazellulär. Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär ist für die Kontraktion der Kardiomyozyten essentiell [Trafford et al. 2002]. Durch diesen ersten Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration werden weitere intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -permeable Kanäle in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), die so genannten Ryanodinrezeptoren (RyR), aktiviert (siehe Abbildung 6). Erst dieser Schritt führt zu der für die Kontraktion notwendigen drastischen Konzentrationssteigerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration

von ca.  $10^{-7}$  mol/L auf ca.  $10^{-5}$  mol/L. Je größer allerdings der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von extrazellulär ist, desto mehr  $\text{Ca}^{2+}$  wird auch aus dem SR freigesetzt, weshalb die von extrazellulär einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen den tatsächlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration maßgeblich beeinflussen. Die Stärke des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär hingegen wird unter anderem durch die Länge der Plateauphase der APs geregelt. Somit beeinflusst die Länge der APs die Kontraktilität der Kardiomyozyten. Dieser zweigeteilte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist für das adulte ventrikuläre Myokard charakteristisch und wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR bezeichnet [Escobar et al. 2004].

Da sich in der Zelle zum Zeitpunkt der Plateauphase verhältnismäßig hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen befinden, transportiert auch der NCX  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle und trägt so ebenfalls zur Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei (siehe Abbildung 6).

Die so in das Zytoplasma gelangten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen initiieren die Kontraktion durch Bindung an Troponin C, einem Bestandteil des kontraktilen Filaments Aktin. Im relaxierten Zustand des Muskels blockiert Troponin C die Kontaktstelle zwischen den kontraktilen Filamenten Myosin und Aktin, die bei Kontakt Auslöser der Kontraktion einer Zelle sind. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C kommt es zu einer Konformationsänderung des Troponin C, was nun die Kontaktaufnahme zwischen Myosin und Aktin ermöglicht und so zu einer Kontraktion der Zelle führt.

Damit der Muskel wieder entspannen kann, muss die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma sinken. Hierbei stehen an der Herzmuskulatur mehrere Wege zur Verfügung, die schematisch in Abbildung 6 dargestellt sind [Bers et al. 2002]. In der Herzmuskulatur wird ein Teil des während der Kontraktion im Zytosol befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär transportiert. Auch werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, wie das SR, zurücktransportiert. Der Transport in das SR wird durch die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) ermöglicht, die unter Verbrauch von ATP das zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR zurückbefördert. Der Transport nach extrazellulär geschieht zum einen mittels des NCX, der aufgrund der während der Repolarisation sinkenden  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  aus der Zelle herausbefördern kann. Zum anderen existieren  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in der Plasmamembran, die unter ATP-Verbrauch einen Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusion übernehmen. Auch können  $\text{Ca}^{2+}$ -

Ionen mittels bestimmter Uniporter und spezieller  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in die Mitochondrien transportiert werden. Somit dienen die Mitochondrien neben dem SR als intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher [Bers et al. 2002].

Bei der Ausschleusung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma ist von besonderer Bedeutung, dass die gleiche Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ , die aus dem SR in das Zytoplasma geströmt ist, auch wieder dorthin zurück transportiert wird. Nur so kann die adäquate Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR für die nächste Kontraktion zur Verfügung stehen. Kommt es nun zu einem verstärkten Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR, was zum Beispiel bei verstärkter Herzarbeit der Fall ist, muss die Aktivität der SERCA an diesen Umstand anpassbar sein. Diese Regulation wird unter anderem vom sympathischen Ast des vegetativen Nervensystems übernommen. Unter sympathischer Aktivierung kommt es zu einer Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch Proteinkinasen wie der Proteinkinase A (PKA), die unter der Regulation des Sympathikus stehen. Durch diese Phosphorylierung zeigen die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit [De Jongh et al. 1996]. Hierdurch gelangt mehr  $\text{Ca}^{2+}$  von extrazellulär in die Zellen. Dies führt zu einer gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, was unter anderem die unter sympathischer Aktivierung stattfindende Kontraktionssteigerung der Kardiomyozyten und eine Zunahme der Herzarbeit ermöglicht. Um nun aber die gleiche Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  wieder in das SR zurücktransportieren zu können muss die SERCA in ihrer Aktivität gesteigert werden. Diese Regulation wird durch Phosphorylierung des Proteins Phospholamban (PLB) übernommen. PLB hemmt im dephosphorylierten Zustand die SERCA und wird durch Proteinkinasen wie der PKA phosphoryliert. Dadurch kommt es bei Aktivierung des Sympathikus zu einer Enthemmung der SERCA, die nun verstärkt  $\text{Ca}^{2+}$  zurück in das SR transportieren kann [Bers et al. 2002].

Sinkt im Ruhezustand die Sympathikusaktivität wieder ab, kommt es zu einer Reduktion der Aktivität der durch den Sympathikus aktivierten Proteinkinasen, wie zum Beispiel der PKA. In diesem Zustand überwiegen Enzyme, die Proteine dephosphorylieren, so genannte Phosphatasen. So kommt es durch verminderte Phosphorylierung zum Beispiel der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär, der auch einen geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR zur Folge hat. Eine Dephosphorylierung von PLB ermöglicht in diesem Zustand durch Hemmung der SERCA eine Anpassung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransports in das SR.

So wird am gesunden Myokard der Füllungszustand des SR durch ein neural geregeltes Gleichgewicht aus Proteinkinasen und Phosphatasen auch bei variierender Arbeitsanforderung an den Herzmuskel im Gleichgewicht gehalten.

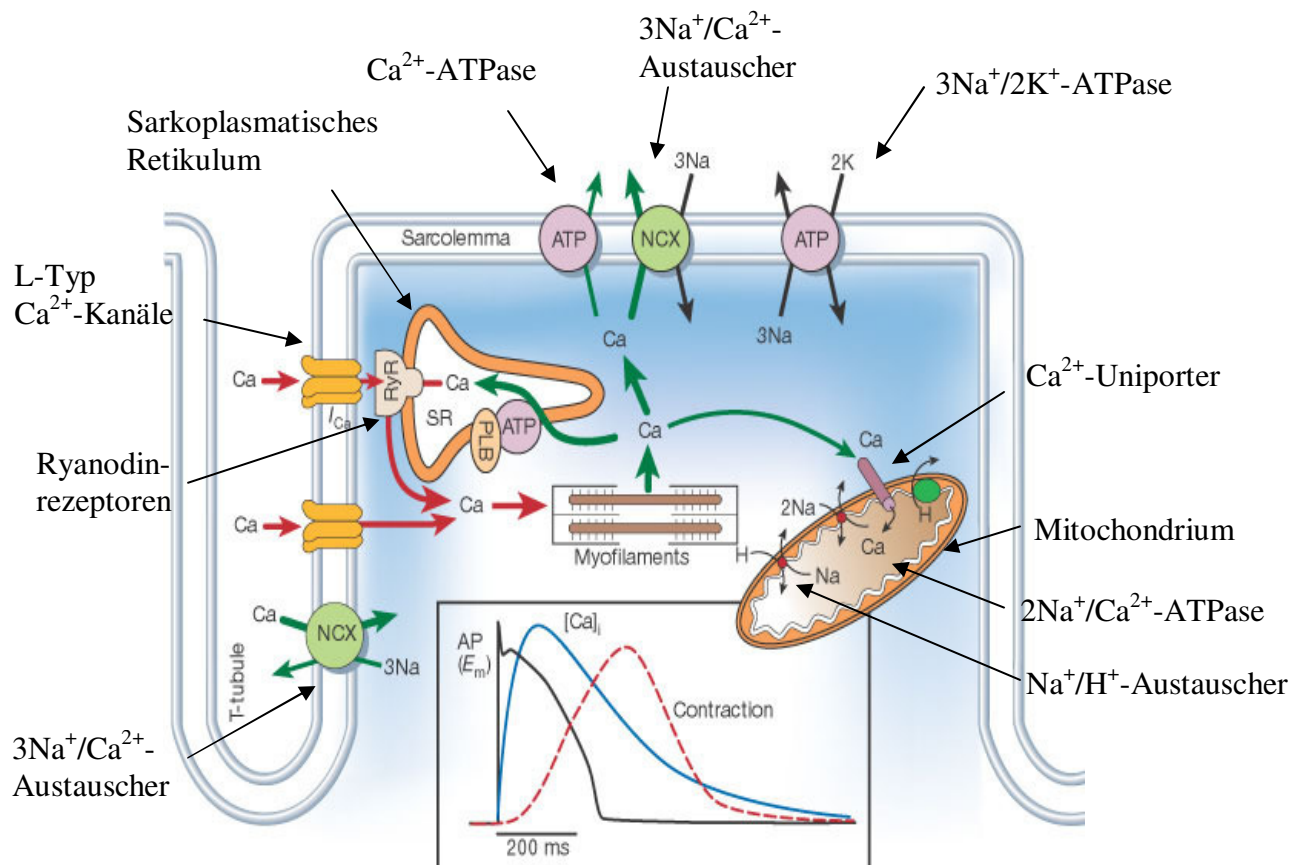


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung**  
[mod. nach Bers et al. 2002]

*Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von extrazellulär:*

L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal

3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX)

*Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem SR:*

Ryanodinrezeptor (RyR)

*Ca<sup>2+</sup>-Extrusion nach extrazellulär:*

Ca<sup>2+</sup>-ATPase, NCX

*Ca<sup>2+</sup>-Extrusion in intrazelluläre Speicher:*

(1) Sarkoplasmatisches Retikulum:

sarkoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA)

(2) Mitochondrium:

mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Uniporter,

mitochondrialer 2Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher

### 1.2.4 Spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle

Der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal, der wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben zusammen mit dem NCX die Plateauphase der ventrikulären APs bildet und dadurch das Signal zur Kontraktion in die Zelle transferiert, stellt den zentralen Teil dieser Arbeit dar. Seine Arbeitsweise unter chronischer Druckentlastung soll in dieser Arbeit untersucht werden. Da dieser Kanal zur Gruppe der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen gehört, wird im folgenden Abschnitt auf die Eigenschaften dieser Kanäle eingegangen.

Im Allgemeinen stellen spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle eine heterogene Gruppe von Proteinen dar, die an inneren und äußeren Oberflächen von Zellen zahlreicher Spezies exprimiert werden und einen gesteuerten Strom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Zelle ermöglichen. Sie lassen sich sowohl nach pharmakologischen, elektrophysiologischen als auch funktionellen Eigenschaften in bisher zehn bekannte Subtypen unterteilen, die in drei Hauptfamilien (Ca<sub>v</sub>1-3) zusammengefasst werden [Jones et al. 1998]. Die Expression der Subtypen unterscheidet sich bei verschiedenen Spezies und Gewebetypen.

Am Herzmuskelgewebe werden hauptsächlich Vertreter der ersten Hauptfamilie, der Ca<sub>v</sub>1.x, und der dritten Hauptgruppe, der Ca<sub>v</sub>3.x, exprimiert, weswegen nachfolgend hauptsächlich auf diese beiden Kanaltypen eingegangen wird.

#### 1.2.4.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals

L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle werden zur Gruppe der Ca<sub>v</sub>1.x gezählt und unter anderem an Plasmamembranen von Muskelzellen exprimiert. So sind diese Kanäle auch an Kardiomyozyten nachweisbar, an denen hauptsächlich der Subtyp Ca<sub>v</sub>1.2 zu finden ist [Brette et al 2006]. Die elektrophysiologischen Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Die Aktivierung der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Plasmamembran der Kardiomyozyten führt zu einem in die Zelle hinein gerichteten Ca<sup>2+</sup>-Strom, dem I<sub>CaL</sub>, der, wie unter Kapitel 1.2.2 beschrieben, neben dem I<sub>NCX</sub> für die Ausbildung der Plateauphase des APs verantwortlich ist. Durch den I<sub>CaL</sub> wird die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR getriggert, wodurch die Kontraktion der Kardiomyozyten ermöglicht wird.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kanäle führen zu einer präzisen Regulierung der Kontraktion der Kardiomyozyten.

Durch die Spannungsabhängigkeit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals gelangt nur zu bestimmten Zeitpunkten während des APs  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle, denn der Kanal zeigt nur bei positiveren Membranpotentialen als  $-30\text{mV}$  eine Aktivität (siehe Abbildung 7) [Carbone et al. 1987; Marban et al. 1995]. Hierdurch kommt es erst zur Aktivierung des Kanals, wenn die Zellmembran im Verlauf des APs auf derartige Membranpotentiale vordepolarisiert wurde. Durch die Aktivierung bei relativ positiven Membranpotentialen wird der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zu den *high voltage activated channels*, den so genannten HVC, gezählt.

Die größte Stromdichte fließt durch den Kanal bei einem Membranpotential von ca.  $0\text{mV}$  (siehe Abbildung 7). Bei diesem Membranpotential wird innerhalb von  $2\text{-}7\text{ms}$  die maximale Stromstärke erreicht, die von Spezies zu Spezies variiert [Brette et al. 2006]. Da diese maximale Stromstärke allerdings meist sehr groß (*large*) ist, hat dies mit dazu beigetragen, diesen Kanaltyp als L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zu bezeichnen.

Die Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle folgt zeitlich gesehen nach maximaler Aktivierung einem biexponentiellen Verlauf, der durch zwei Inaktivierungszeitkonstanten beschrieben werden kann [Bondarenko et al. 2004]. Die erste Zeitkonstante  $\tau_1$  beschreibt den schnellen Teil der Inaktivierung und ist nach maximaler Aktivierung ca.  $50\text{ms}$  lang. Der Betrag dieser Zeitkonstanten  $\tau_1$  ist allerdings abhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Je höher die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, desto kleiner wird  $\tau_1$  und desto schneller erfolgt der erste Teil der Inaktivierung, was die Zelle vor einer Überladung mit  $\text{Ca}^{2+}$  schützt [Zuhlke et al. 1999; Shirokov et al. 1998; Liang et al. 2003]. Der langsame Teil der Inaktivierung wird durch die zweite Zeitkonstante  $\tau_2$  dargestellt. Diese Inaktivierung schließt sich an den ersten Teil an und dauert ca.  $150\text{ms}$ . Insgesamt werden die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle während einer relativ großen Zeitspanne inaktiviert, was neben der Stromgröße (*large*) durch die Bezeichnung als *long lasting calcium channels* zu der Namensgebung als L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geführt hat.

Nach Inaktivierung benötigt der Kanal etwa  $500\text{ms}$  zur Erholung, um erneut maximal aktiviert werden zu können. Neben dieser zeitlichen Begrenzung der Aktivität führen auch Membranspannungen von positiveren Werten als  $-50\text{mV}$  dazu, dass der Kanal nicht maximal erregt werden kann. Somit kann die Aktivität des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch eine zu kurze Zeitspanne nach der vorherigen Aktivierung, durch zu positive

RMPs und aufgrund des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Betrags von  $\tau_1$  auch durch zu hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen eingeschränkt werden [Bondarenko et al. 2004].

### 1.2.4.2 Elektrophysiologische Eigenschaften des T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Auch der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der zur Familie der  $\text{Ca}_v3.x$  gehört, stellt einen am Herzen exprimierten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal dar. Am adulten gesunden Myokard ist die Expression dieses Kanals auf die Kardiomyozyten der Vorhöfe beschränkt, wobei in diesen Zellen hauptsächlich die Untergruppen  $\text{Ca}_v3.1$  und  $\text{Ca}_v3.2$  nachgewiesen wurden [Brette et al. 2006]. Die Aufgabe dieser Kanäle wird sehr kontrovers diskutiert. Anders als die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die unter anderem die Vermittlung der Kontraktion in die Zelle zur Aufgabe haben, scheint dieser Kanal daran nicht beteiligt zu sein. Auch der Beitrag zur Erregungsbildung in den Sinusknotenzellen (siehe Kapitel 1.2.1) ist nicht gesichert, da die spontane Erregungsbildung der Sinusknotenzellen nicht unterbleibt, wenn der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal an diesen Zellen nicht exprimiert wird [Brette et al. 2006; Mangoni et al. 2003]. Diskutiert wird des Weiteren der Zusammenhang zwischen dem T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und myokardialen Wachstumsvorgängen. Da der Kanal am fetalen ventrikulären Myokard nachweisbar ist [Escobar et al. 2003], könnte die Vermittlung von Wachstumsvorgängen eine seiner Aufgaben darstellen [Martinez et al. 1999]. Auch bei bestimmten krankhaften Veränderungen des Myokards scheint der Kanal an ventrikulären Kardiomyozyten wieder nachweisbar zu werden.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals unterscheiden sich von denen des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. So wird dieser Kanal bereits ab Potentialen von etwa  $-60\text{mV}$  aktiviert (siehe Abbildung 7), weswegen er zu den *low voltage activated channels* (LVC) gezählt wird [Hagiwara et al. 1988; Yeoman et al. 1999]. Er ermöglicht einen in die Zelle hineingerichteten Strom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, den  $I_{\text{CaT}}$ . Die maximale Stromdichte durch diesen Kanal ist wesentlich geringer als die des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und kann bei Membranpotentialen von ca.  $-40\text{mV}$  erreicht werden (siehe Abbildung 7). Die kleinere (*tiny*) Stromstärke durch diesen Kanal trug mit zur Namensgebung des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei.

Die Inaktivierung des Kanals ist analog zum L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wiederum zeitabhängig und kann im Falle des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mit einer Exponentialfunktion dargestellt



werden, deren Verlauf durch die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  beschrieben wird. Diese Zeitkonstante  $\tau$  beträgt bei maximaler Aktivität des Kanals ca. 20ms, wodurch der Kanal im Vergleich zum L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal relativ schnell inaktiviert wird [Yeoman et al. 1999]. Aufgrund der kinetischen Eigenschaft dieser schnellen Inaktivierung wird der  $I_{\text{CaT}}$  auch *transient  $\text{Ca}^{2+}$  current* genannt, wonach der Kanal auch als T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bezeichnet wird [Nudler et al.2003; Carbonne et al. 1987]. Auch lässt sich der Kanal ausgehend von positiveren Membranpotentialen als dem RMP von -80mV nicht mehr zu einer maximalen Aktivität stimulieren. Ausgehend von einer Membranspannung von ca. -50mV kann durch eine maximale Aktivierung auf -40mV nur noch die Hälfte des Stroms passieren [Yeoman et al. 1999].

Im Unterscheid zum L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal lässt sich der T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal nicht durch eine steigende intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration inaktivieren, er scheint also eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Inaktivierung zu besitzen [Perez-Reyes et al. 1998].

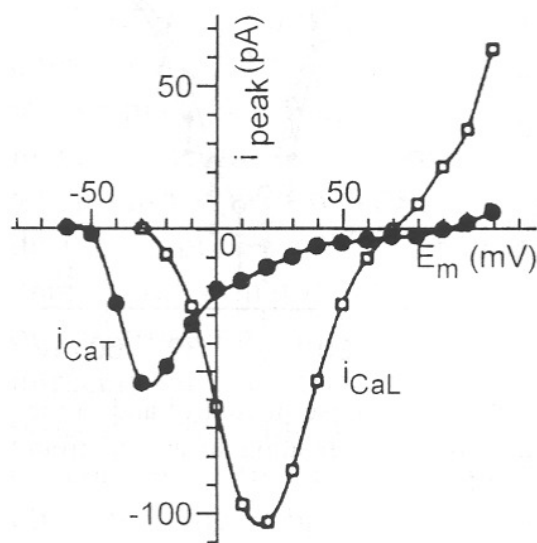


Abbildung 7: **Strom-Spannungskurve des  $I_{\text{CaL}}$  und des  $I_{\text{CaT}}$  zur Unterscheidung der beiden spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Hund)**  
 [Carmeliet & Vereecke: Cardiac Cellular Electrophysiology, 2002: Seite 101, Abbildung IV.4]

Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Typ	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal	T-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal
<b>α<sub>1</sub>-Untereinheit</b> (Proteinebene)	Ca <sub>v</sub> 1.x	Ca <sub>v</sub> 3.x
<b>Strombezeichnung</b>	I <sub>CaL</sub>	I <sub>CaT</sub>
<b>Vorkommen</b>	Arbeitsmyokard	Sinusknoten Vorhofzellen Purkinjefasern
<b>Aktivierung</b>	-30mV <i>high voltage activated</i>	-60mV <i>Low voltage activated</i>
<b>Inaktivierung</b>	Langsam (τ <sub>1</sub> = 50ms; τ <sub>2</sub> = 150ms)	Schnell (τ= 20ms)
<b>Blocker</b>	DHP PAA BTZ Cd <sup>2+</sup>	Flunizarin Octanol Ni <sup>2+</sup>
<b>Max. Stromstärke</b>	Bei 0mV 1nA/pF	Bei -40mV 60pA/pF

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften des L-Typ und des T-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals

DHP: Dihydropyridine  
PAA: Phenyl-Alkyl-Amine  
BTZ: Benzothiazepine  
Cd<sup>2+</sup>: Cadmium  
Ni<sup>2+</sup>: Nickel

### 1.2.4.3 Molekularbiologischer Aufbau des L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist ein Multimer, bestehend aus fünf verschiedenen Untereinheiten [Caterall et al. 2000]. Eine Untereinheit, die  $\alpha_1$ -Untereinheit, formt die Pore und ist bestimmend für die Eigenschaften des Kanals. Die vier akzessorischen Untereinheiten ( $\alpha_2$ - $\sigma$ ) üben weitgehend modulierende Effekte auf die Funktion der  $\alpha_1$ -Untereinheit aus. Eine schematische Darstellung des Kanals ist in Abbildung 8 gezeigt.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von ca. 190kD [Caterall et al. 2000] und wird als myokardiale Isoform  $\text{Ca}_v1.2$  im humanen Genom auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 kodiert [Schulz et al. 1993]. Sie besteht aus vier repetitiven Domänen (DI-IV) mit je sechs Transmembransegmenten ( $S_1$ - $S_6$ ). Die einzelnen Domänen werden durch intrazelluläre Schleifen verbunden, wobei N- und C-Terminus des Proteins jeweils intrazellulär liegen [Tanabe et al. 1987; Caterall et al. 2000].

Den sechs Segmenten der DI-IV kommen durch bestimmte Aminosäurereihenfolgen unterschiedliche Aufgaben zu. So binden repetitive Glutamatreste von  $S_5$  und  $S_6$   $\text{Ca}^{2+}$  und ermöglichen einen relativen Selektivitätsfilter für bivalente Kationen [Tsien et al. 1987]. Auch die Spannungsabhängigkeit hat ein molekularbiologisches Korrelat. In  $S_4$  der DI-IV befinden sich Aminosäuren mit vornehmlich positiv geladenen Resten. Die Plasmamembran ist im Ruhezustand außen positiv und innen negativ geladen. In diesem Zustand werden die vorwiegend positiv geladenen  $S_4$  nach innen gezogen und verschließen die Pore. Kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran, d.h. zur Ladungsumkehr, werden diese Segmente nach außen verlagert und öffnen den Kanal [Stuhmer et al. 1989].

Das molekularbiologische Korrelat der Inaktivierung der Kanäle ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wurden einige Determinanten beschrieben, die für die spannungsabhängige Inaktivierung mit verantwortlich zu sein scheinen. Hierzu gehören die  $S_6$  der DI-IV, die Schleife zwischen DI und DII [Berjukow et al. 2001; Hering et al. 1996; Stotz et al. 2000], sowie das C-terminale Ende des Proteins [Klockner et al. 1999; Soldatov et al. 1998]. Auch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung existieren Erklärungsansätze: am C-terminalen Ende der  $\alpha_1$ -Untereinheit befindet sich eine Region, an die ein intrazelluläres Protein, Calmodulin, binden kann [deLeon et al. 1995]. Calmodulin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, wobei der Komplex aus  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin intrazellulär

zahlreiche Informationen übermitteln kann. In diesem Fall führt er durch Bindung an den C-terminalen Bereich der  $\alpha_1$ -Untereinheit zu einer Konformationsänderung des Proteins, die den Kanal verschließt [Zuhlke & Reuter et al. 1998].

Die restlichen vier Untereinheiten des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals,  $\alpha_2$ - $\sigma$ , treten an bestimmten Bereichen der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit ihr in Kontakt, wodurch sie die  $\alpha_1$ -Untereinheit vervollständigen und ihre Eigenschaften modulieren.

Die Interaktionsstelle mit den bisher vier bekannten  $\beta$ -Untereinheiten ist an der Schleife zwischen  $S_1$  und  $S_2$  lokalisiert [Pragnell et al. 1994; De Waard et al. 1995]. Es wird angenommen, dass durch die Interaktion dieser beiden Untereinheiten unter anderem der Transport und der Einbau der  $\alpha_1$ -Untereinheit in die Plasmamembran gesteigert wird [Dolphin et al. 2003; Bichet et al. 2000]. Neben diesem Effekt scheint eine Interaktion die biophysikalischen Eigenschaften der  $\alpha_1$ -Untereinheit zu beeinflussen [Olcese et al. 1996].

Die Interaktionen und Aufgaben der restlichen Untereinheiten sind noch weitgehend ungeklärt.

#### 1.2.4.4 Molekularbiologischer Aufbau des T-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Im humanen Genom kodiert ein Abschnitt auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 für die am adulten ventrikulären Myokard hauptsächlich exprimierte Isoform des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal  $\text{Ca}_v3.2$  [Cribbs et al. 1998]. Der Kanal wird wie der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch ein Multimer aus fünf Untereinheiten ( $\alpha_1, \alpha_2$ - $\sigma$ ) gebildet (siehe Abbildung 8).

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit besteht analog zu der des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aus vier Domänen (DI-IV) mit je sechs Transmembransegmenten ( $S_1$ - $S_6$ ). Die Verbindungsstücke zwischen den einzelnen Domänen bilden durch je zwei Glutamat- und Aspartatreste den Selektivitätsfilter für bivalente Kationen [Talavera et al. 2001].

Die Spannungsabhängigkeit lässt sich auch in Analogie zum L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal durch die positive Ladung der  $S_4$  der DI-IV erklären [Perez-Reyes et al. 2003]. Die molekulare Grundlage für eine spannungsabhängige Inaktivierung scheint unter anderem bei den  $S_6$  der DI-IV und bei der Schleife zwischen der DI und DII zu liegen [Marksteiner et al. 2001; Park et al. 2004].

Die akzessorischen Untereinheiten  $\alpha_2$ - $\sigma$  scheinen für die Kanalfunktion des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. In welcher Weise sie Einfluss auf seine Eigenschaften ausüben, wird in der Literatur diskutiert.

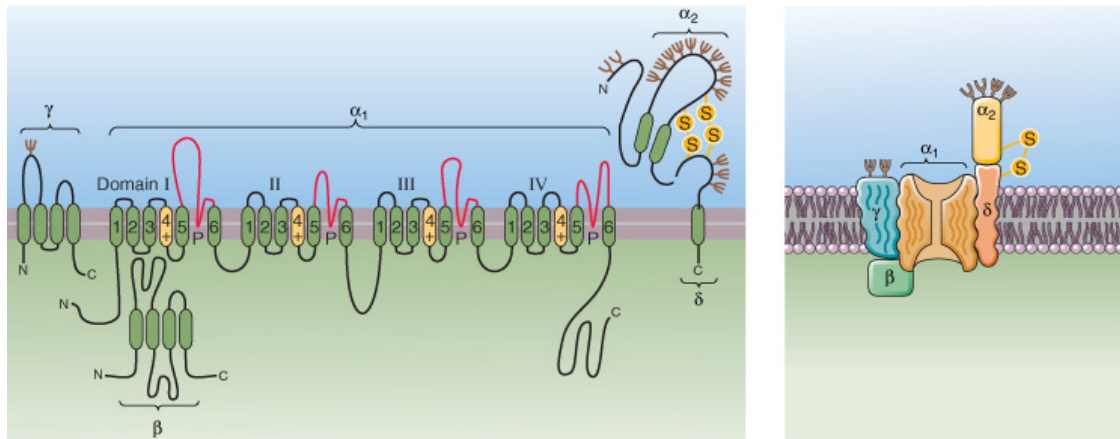


Abbildung 8: **Schematische Darstellung der Proteinzusammensetzung des  $\text{Ca}_v1.x$  und des  $\text{Ca}_v3.x$**

[Boron & Boulpaep: Medical Physiology, 2005: Seite 185; Abbildung 9]

*Rechtes Bild:* schematische Darstellung des  $\text{Ca}_v1.x$  und des  $\text{Ca}_v3.x$  als Pentamer, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\mu$ ,  $\sigma$

*Linkes Bild:* schematische Darstellung der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit den Domänen I-IV, bestehend aus den Segmenten  $S_1$ - $S_6$  und den akzessorischen Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\mu$ ,  $\sigma$

### 1.3 Veränderungen chronisch druckbelasteter Kardiomyozyten

Eine chronische Herzinsuffizienz zeichnet sich durch einen progredienten Verlust der Auswurfleistung des Herzens aus. Die unter Kapitel 1.1 beschriebenen primären und sekundären Kardiomyopathien stellen häufige Ursachen für myokardiale Erkrankungen dar, die zu einer verminderten Ejektionsfraktion, d.h. Auswurfleistung des Herzens führen. Um diese Verminderung der Ejektionsfraktion so gering wie möglich zu halten, werden zur Kompensation der Erkrankung im Herzmuskel Umbauprozesse (*remodeling*) initiiert, die die Pumpfunktion des Herzens unterstützen sollen. Diese zunächst kompensatorischen Umbauprozesse führen dazu, dass die Ejektionsfraktion auf für den Körper tolerierbaren Werten gehalten werden kann. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Umbauprozesse bei chronisch insuffizienten Herzen auf molekularbiologischer und elektrophysiologischer Ebene zur erneuten Ausprägung des fetalen Phänotyps von Kardiomyozyten führen, deren Bedeutung bisher weitgehend unbekannt ist. Ob allerdings gerade diese Regression auf einen fetalen Phänotyp den Weg zu einer Dekompensation der Herzfunktion bahnen kann oder diesem Vorgang eher entgegen wirken soll, steht derzeit zur Diskussion.

Da eine der häufigsten Ursachen, die zur Entstehung einer sekundären Kardiomyopathie führt, ein chronischer Hypertonus darstellt, sollen im Folgenden am Beispiel der chronischen Druckbelastung die bisher bekannten Veränderungen des Herzmuskels dargestellt werden und auf ihre möglichen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System eingegangen werden.

#### 1.3.1 Kompensation durch zelluläre Hypertrophie

Chronisch druckbelastete Herzen unterscheiden sich insbesondere in Bezug auf die hämodynamischen Parameter von gesunden Herzen. Die gesteigerte Nachlast, gegen die der Herzmuskel arbeiten muss, verursacht eine Verringerung der Ejektionsfraktion. Dies hat zur Folge, dass nach der Systole ein vergrößertes Volumen in den Ventrikeln verbleibt, was zu einer chronischen Volumenbelastung der Ventrikel führt. Zunächst versucht der Herzmuskel nach dem Frank-Starling-Mechanismus durch Steigerung der Kontraktionskraft das überschüssige Volumen aus den Ventrikeln auszuwerfen. Reicht

allerdings die Steigerung der Kontraktionskraft nicht aus, um das endsystolische Volumen zu reduzieren, kommt es zu einer Überfüllung der Ventrikel, was eine Steigerung der Wandspannung zur Folge hat. Dieser Steigerung der Wandspannung versucht der Herzmuskel nach dem Laplace'schen Gesetz  $K=P_{tm} \cdot r/2d$  ( $K$ =Wandspannung;  $P_{tm}$ =transmuraler Druckgradient;  $r$ =Radius;  $d$ =Wanddicke) durch Zunahme der Wanddicke entgegenzuwirken. Da adulte Kardiomyozyten die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben, wird diese Zunahme der Wanddicke durch Hypertrophie, d.h. durch Volumenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten erreicht [Campbell et al. 1991; Schreiber et al. 1981]. Dies führt zu einer Steigerung der Masse des gesamten Organs, zu einer kardialen Hypertrophie [Campbell et al. 1991; Klein et al. 1991], wodurch der Herzmuskel versucht, seine Kontraktionskraft zu steigern und so der Erkrankung entgegenzuwirken.

### 1.3.2 Kompensation durch Veränderung der Elektrophysiologie

Ventrikuläre Kardiomyozyten chronisch druckbelasteter Herzen zeigen im Vergleich zu normal belasteten Kardiomyozyten ein verändertes Muster der an der Bildung der APs beteiligten Ströme.

Bei chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten kommt zu einer verminderten Aktivität verschiedener repolarisierender  $K^+$ -Ströme [Kaprielian et al. 1998]. Welche  $K^+$ -Ströme von dieser Veränderung betroffen sind, unterscheidet sich von Spezies zu Spezies, wobei eine Reduktion des transienten  $K^+$ -Auswärtsstroms  $I_{to}$  in den untersuchten Spezies Hund und Ratte nachgewiesen werden konnten [Wickenden et al. 1998].

Auch auf die  $Na^+$ -Ströme scheint chronisch gesteigerte Herzarbeit einen Einfluss zu haben, da chronische Druckbelastung der Kardiomyozyten von Hasen zu einer Steigerung des  $Na^+$ -Einstroms während des APs führt [Despa et al. 2002].

Bei der Untersuchung der  $Ca^{2+}$ -Ströme chronisch druckbelasteter Kardiomyozyten wurden in verschiedenen Studien unveränderte, gesteigerte oder reduzierte Ströme nachgewiesen [Qin et al. 1996; Bryant et al. 1999; Keung et al. 1989]. Diese uneinheitlichen Ergebnisse scheinen hauptsächlich mit den unterschiedlichen Krankheitsstadien der untersuchten Herzen zusammenzuhängen und scheinen auch bei den untersuchten Spezies verschieden reguliert zu werden. Die genaue Regulation des  $Ca^{2+}$ -Stroms ist also nicht ausreichend geklärt.

So lässt sich zusammenfassen, dass es unter chronischer Druckbelastung zu einer Steigerung der depolarisierenden  $\text{Na}^+$ -Ströme und einer Reduktion der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ströme kommt, was zu einer Verlängerung der APs führen könnte. Derart verlängerte APs an chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten ließen sich auch tatsächlich nachweisen [Wickenden et al. 1998].

Neben diesen Veränderungen kann es an chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten von Ratten zur Expression eines weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanals, des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, kommen [Martinez et al. 1999]. Dieser Kanal ist typischerweise nur im fetalen Entwicklungsstadium des Herzens am ventrikulären Myokard nachweisbar. Im Laufe der Entwicklung verschwindet der Kanal nahezu vollkommen aus dem ventrikulären Arbeitsmyokard und ist dann bei gesunden adulten Herzen nur noch im Schrittmachersystem und in atrialen Kardiomyozyten nachweisbar [Yasui et al. 2005]. Wie es zu dieser Reexpression des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals unter chronischer Druckbelastung des Myokards der Ratte kommen kann, ist weitgehend unklar. Auch die Auswirkungen der Reexpression dieses Kanals auf den Herzmuskel sind nicht verstanden. So könnte dieser Kanal zum einen neben dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und dem NCX zur Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole beitragen und so die Kontraktilität der Kardiomyozyten verbessern. Zum anderen könnte dieser Kanal an der Entstehung der Hypertrophie der Kardiomyozyten beteiligt sein, da die Vermittlung von Wachstumsvorgängen durch den T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal diskutiert wird [Martinez et al. 1999]. Auf mögliche negative Auswirkungen der Reexpression dieses Kanals soll in Kapitel 1.3.6 eingegangen werden.

Elektrophysiologisch zeichnen sich also die Kardiomyozyten an chronisch druckbelasteten Herzen unter anderem durch längere APs und eventuell eine Reexpression des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aus. Beide Parameter sind Merkmale des fetalen Phänotyps ventrikulärer Kardiomyozyten. Somit sind chronisch druckbelastete Kardiomyozyten in Bezug auf die Elektrophysiologie durch eine Regression auf fetale Funktionsmuster gekennzeichnet [Kilborn et al. 1990].



### 1.3.3 Kompensation durch Veränderung des zellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes

Die elektrophysiologischen Veränderungen druckbelasteter Kardiomyozyten haben Auswirkungen auf den zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt. Durch die in Kapitel 1.3.2 beschriebene Steigerung der AP-Länge kann es während des APs zu einer verlängerten Öffnung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle kommen [Kapriliian et al. 1998; Volk et al. 1999, 2004]. Dies hat einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Folge [Wickenden et al. 1998; Bers et al 2006]. So kommt es zu einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR, was in einem größeren Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole resultiert [Bouchard et al. 1995; Kapriilien et al. 1998]. Da derart gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben die Kontraktilität der Kardiomyozyten erhöhen, könnte diese Steigerung der AP-Länge einen Kompensationsversuch des erkrankten Organs darstellen, die Pumpfunktion zu maximieren und dem Fortschreiten der Erkrankung entgegenzuwirken [Wickenden et al 1998; Kapriilien et al 1998]. Neben den positiv inotropen Effekten der gesteigerten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterstützt diese auch die Entstehung der zellulären Hypertrophie, da  $\text{Ca}^{2+}$  in Bindung mit dem Protein Calmodulin eine Proteinkinase, die so genannte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKIV) aktiviert, die unter anderem an der Regulation des Zellwachstums beteiligt ist [Passier et al. 2000].

### 1.3.4 Kompensation durch Veränderung des Metabolismus

Gesunde adulte Kardiomyozyten erhalten den Hauptteil ihrer Energie aus der Oxidation von Fettsäuren [Bartelds et al. 1998], weshalb hier hauptsächlich Enzyme für diesen Weg der Energiegewinnung exprimiert werden. Unter chronischer Belastungssteigerung der Kardiomyozyten scheinen allerdings andere Wege der Energiegewinnung bereitgestellt zu werden. Es kommt zu einer Umstellung des Energiehaushaltes auf die Oxidation von Glukose und Laktat, die nun die Substrate für den Hauptweg der Energiegewinnung darstellen [Razeghi et al. 2001; Korvald et al. 2000; Goodwin et al. 1998]. Eine derartige Energiegewinnung lässt sich auch an fetalen Kardiomyozyten nachweisen.

Die Verbrennung von Zuckern stellt einen wesentlich effizienteren Weg zur Herstellung von ATP dar als die Verbrennung von Fettsäuren. Somit könnte diese Regression auf fetale Formen der Energiegewinnung es dem Herzmuskel unter den gesteigerten Arbeitsanforderungen ermöglichen im kompensierten Stadium der Erkrankung ausreichend Energie zu produzieren.

### 1.3.5 Kompensation durch Veränderung des neurohumoralen Systems

Durch chronische Druckbelastung des Herzens kommt es zu zahlreichen Veränderungen im neurohumoralen Haushalt des Körpers. Durch zum Beispiel eine gesteigerte Nachlast des Herzens kommt es durch Reduktion der Ejektionsfraktion zu einer Reduktion der peripheren Blutversorgung des Körpers. Zur Vermeidung einer peripheren Sauerstoffunterversorgung durch eine reduzierte Ejektionsfraktion wird zum einen aus den sympathischen Nervenendigungen Noradrenalin sezerniert und zum anderen aus der Nebennierenmark Adrenalin in die Zirkulation entlassen, wodurch es zu einem chronischen Anstieg der Katecholaminkonzentration im Blut kommt [Bristow et al. 1990]. Diese beiden Hormone haben auf das Herz positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Effekte, sie unterstützen also die Herzfunktion, wodurch die periphere Durchblutung und Sauerstoffversorgung aufrechterhalten bleiben [Spinarova et al. 2007].

Des Weiteren kommt es durch eine Verminderung der Ejektionsfraktion zu einer verminderten Durchblutung der Niere. Hierdurch wird eine Reaktionskette, das sogenannte Renin-Angiotensin-System (RAAS), induziert, die die Durchblutung der Niere durch Steigerung des Blutdrucks wieder normalisieren soll. Durch verminderte Nierendurchblutung und dadurch verminderter  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Tubulussystem der Niere kommt es zur Sekretion von Renin aus spezialisierten Zellen der Niere. Dieses Enzym bewirkt die Freisetzung von Angiotensin I aus der Leber, welches in der Lunge in Angiotensin II überführt wird. Angiotensin II stellt einen wesentlichen Faktor bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar. Dieses Hormon wirkt zum einen an der Niere, zum anderen allerdings auch direkt am Herzen. Durch seine Wirkung an der Niere kommt es zu einer Vasokonstriktion der zuführenden Gefäße der Niere, wodurch es zur Steigerung des realen Blutflusses kommt. Auch die periphere Durchblutung wird hierdurch verbessert. Neben diesen den Blutdruck steigernden Effekten hat Angiotensin II

auch direkte Effekte auf die Kardiomyozyten. Durch Stimulation mit Angiotensin II wird das Wachstum der Kardiomyozyten angeregt, was zur Entstehung der kardialen Hypertrophie unter chronischer Druckbelastung beiträgt [Spinarova et al. 2007].

Neben diesen beiden beschriebenen hormonalen Veränderungen unter chronischer Druckbelastung kommt es zu zahlreichen weiteren Veränderungen im neurohumoralen System des Körpers, auf die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden kann.

### 1.3.6 Der Weg von der Kompensation zur Dekompensation

In den frühen Stadien einer Herzinsuffizienz versucht das Herz durch die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Umbauprozesse die Erkrankung zu kompensieren, was durch eine Regression auf einige fetale Funktionsmuster der Kardiomyozyten gekennzeichnet ist. Allerdings wird trotz dieser Mechanismen früher oder später ein bestimmter Punkt überschritten, an dem die Pumpfunktion des erkrankten Organs nicht mehr kompensiert werden kann. Es kommt durch Verlust der Pumpfunktion zu einer kardialen Dekompensation. Da unbekannt ist, wann es zu diesem Übergang zur Dekompensation kommt, kann bisher lediglich durch medikamentöse Therapie versucht werden diesen Übergang so weit wie möglich hinauszuzögern.

Interessanterweise hat sich allerdings gezeigt, dass gerade die Faktoren, die zu Beginn der Erkrankung dazu beitragen sollten die kardiale Funktion zu unterstützen, den Übergang zur Dekompensation bahnen können. Wie letztendlich die Kompensationsmechanismen zur Dekompensation führen können, soll im Folgenden an einigen Beispielen gezeigt werden.

Durch die Hypertrophie der Kardiomyozyten versucht der Herzmuskel zunächst, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, den steigenden Arbeitsanforderungen gerecht zu werden. Allerdings können die Kardiomyozyten nicht beliebig groß werden, da ein gewisses Verhältnis zwischen DNA und Zytoplasma eingehalten werden muss, um das Überleben der Zelle zu sichern [Campbell et al. 1991]. Durch das derart begrenzte Wachstum der Kardiomyozyten wird der Kompensationsmechanismus der Hypertrophie limitiert [Campbell et al. 1991]. Auch kommt es durch die muskuläre Hypertrophie zu einer Zunahme von Muskelgewebe. Die Zahl der Blutgefäße steigt allerdings nicht mit an,

weshalb die Dichte der Blutgefäße abnimmt. Hierdurch kommt es zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff, was zu einer Sauerstoffminderversorgung des kardialen Gewebes führt [Rakusan et al. 1996]. Dieser chronisch hypoxische Zustand wird weiter verstärkt durch den vermehrten Sauerstoffverbrauch des gegen die erhöhte Vor- und Nachlast ankämpfenden Herzens, wodurch es zu einem Untergang von Kardiomyozyten und kardialem Stützgewebe kommt [Olivetti et al. 1997]. Diese Gewebe werden durch Narbengewebe ersetzt, was zur Folge hat, dass es zum einen durch Verlust der Struktur gebenden Anteile zu einer Dilatation und zum anderen zu einer Versteifung der Ventrikel kommt. Dies führt zu einer Verschlechterung der diastolischen und systolischen Funktion des Herzens.

Neben den positiven Auswirkungen der elektrophysiologischen Anpassungsmechanismen, wie zum Beispiel der positiven Inotropie, hat die Verlängerung der APs auch zur Folge, dass sich die Erregungsrückbildung der Kardiomyozyten verlangsamt. Dies führt zu einer abnormal verlängerten Repolarisation des Herzmuskels. Derartige Repolarisationsstörungen konnten bei chronisch druckbelasteten Herzen durch eine Verlängerung der QT-Zeit in transthorakalen EKG-Ableitungen bestätigt werden [Volk et al. 2000, Harding et al. 2001]. Diese Repolarisationsstörungen können den Herzmuskel zum einen für maligne ventrikuläre Rhythmusstörungen prädisponieren [Volk et al. 2000; Qin et al. 1996] und tragen zum anderen durch Verlangsamung der Entspannung des Herzmuskels zu der häufig zu beobachtenden diastolischen Dysfunktion insuffizienter Herzen bei. Auch die eventuelle Reexpression des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals kann zu einer Destabilisierung des Membranpotentials von ventrikulären Kardiomyozyten führen und dadurch mit zu dem arrhythmogenen Potential chronisch druckbelasteter Herzen beitragen [Martinez et al. 1999].

Eine zentrale Rolle bei der Progression der Erkrankung scheinen die Proteine des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes zu übernehmen, deren Expression sich unter chronischer Druckbelastung drastisch zu verändern scheint [Wickenden et al. 1997]. Auch wenn bisher nicht genau bekannt ist, was zu den Veränderungen auf Genexpressionsebene führen könnte, gibt es Hinweise darauf, dass die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Kardiomyozyten während des kompensierten Stadiums einen Einfluss auf die Genexpression der Kardiomyozyten haben könnte [Berridge et al. 2003]. Ein Protein, dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Expression diskutiert wird, scheint die SERCA darzustellen. Mit

steigenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten wird eine zunehmend sinkende Aktivität und Expression dieses Proteins nachgewiesen [Bers et al. 2006]. Es kommt zu einer Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, wodurch in der Systole nicht mehr ausreichend  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt werden kann. Dies führt zu einer Verminderung der zu Beginn der Erkrankung gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol (siehe Kapitel 1.3.3), was eine Verschlechterung der systolischen Funktion der Kardiomyozyten zur Folge hat [Wickenden et al. 1998].

Die reduzierte Expression der SERCA verlangsamt daneben auch den Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Initiation der Diastole, weshalb die Fehlfunktion dieses am  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt beteiligten Proteins zu einer Verschlechterung der systolischen und diastolischen Funktion der Kardiomyozyten führen könnte [Terraciano et al. 2003; Heerdt et al. 2000; Wickenden et al. 1998].

Auch die unter Kapitel 1.3.5 beschriebenen Veränderungen der neurohumoralen Parameter haben negative Auswirkungen auf die Herzfunktion. Durch die hohe Aktivität des RAAS kommt es zwar zu einer Verbesserung der peripheren Durchblutung, allerdings kommt es auch zu einer weiteren Zunahme der systolischen Blutdruckwerte. So wird hierdurch erneut die Nachlast gesteigert, was die periphere Durchblutung wiederum verschlechtert. Auch die chronisch gesteigerte Konzentration von Katecholamine hat neben der Unterstützung der Herzfunktion negative Auswirkungen auf kardiale Situation. Neben den wie das RAAS blutdrucksteigernden Effekten der Katecholamine kommt es zum einen durch die positiv inotropen Effekte am Myokard zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch, was den bereits erwähnten hypoxischen Zustand weiter verstärkt. Außerdem führen die chronisch gesteigerten Katecholaminkonzentrationen zu einer Desensitivierung der adrenergen Rezeptoren. Neben diesem Effekt der chronisch gesteigerten Katecholaminkonzentration scheint diese auch dazu zu führen, dass die Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Katecholaminrezeptoren abnimmt. Hierdurch kann der Herzmuskel immer weniger sensitiv auf Katecholamine reagieren [Bristow et al. 1989; Bristow et al. 1986].

So kommt es letztendlich trotz der kompensierenden Umbauprozesse zur Ausbildung eines *circulus vitiosus*, wodurch der Herzmuskel letztendlich seine Arbeitsleistung nicht mehr aufrechterhalten kann. Es kommt zur Progression der Erkrankung, was bei Versa-

gen der medikamentösen Therapie letztendlich zu einer Dekompensation der Herzleistung führt und mit dem Leben nicht vereinbar ist.

### 1.4 Die Entlastungstherapie insuffizienter Herzen beim Menschen durch VADs

Kommt es zur Entwicklung von derart fortgeschrittenen Stadien der Herzinsuffizienz mit weitgehendem Versagen konservativer Therapeutika, kann nur noch ein Ersatz der Pumpfunktion den Patienten retten [Jessup et al. 2003]. Da Herztransplantationen in den seltensten Fällen als akute Therapie zum Einsatz kommen, wurden die bereits erwähnten VADs entwickelt, die mit Hilfe von in die Ventrikel eingebrachten univentrikulären oder biventrikulären Pumpensystemen die kardiale Funktion nahezu vollkommen übernehmen können. Mit dieser mechanischen Unterstützung kann die Zeit bis zu einer Transplantation überbrückt werden, da die hämodynamischen Parameter sich rapide verbessern [Zafeiridis et al 1998; Heerdt et al. 2000]. Die Pumpensysteme eigneten sich früher lediglich zur kurzfristigen Unterstützung der Herzleistung und die Patienten waren durch die Aufwändigkeit der Therapie weitgehend an die Krankenhäuser gebunden. Durch Weiterentwicklung der Systeme ist es allerdings mittlerweile möglich, diese Pumpen als langfristige Therapie zu implantieren, insbesondere bei Patienten, die nicht für eine Transplantation in Frage kommen. Bei einigen derart behandelten Patienten zeigte sich, dass ihre Herzen bei Reduktion der mechanischen Unterstützung zunehmend selbst zu einer adäquaten Ejektionsfraktion beitragen konnten. So konnte, wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, bei einem streng selektierten Patientenkollektiv durch Wiederherstellung der endogenen Ejektionsfraktion auf die anschließend geplante Herztransplantation verzichtet werden [Dandel et al. 2005; Birks et al. 2005].

Offensichtlich kann durch die mechanische Entlastung der durch die Herzinsuffizienz eingetretene Umbauprozess revidiert werden, was zu einer Verbesserung der kardialen Situation der Patienten führt. Allerdings kommt es nicht bei allen derart behandelten Patienten zu dieser Reversion des Umbauprozesses. Somit scheint dieser nicht allein an die Entlastung gekoppelt zu sein, vielmehr scheinen auch die Grunderkrankung, das Alter und viele weitere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle zu spielen. Daher kann lediglich spekuliert werden bei welchen Patienten diese Reversion des Umbauprozesses

eintritt. Die Kenntnis dieser Einflussfaktoren ist allerdings essentiell um in Zukunft elektive Implantation von VADs bei Patienten durchführen zu können, bei denen es mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Verbesserung der endogenen Herzfunktion kommen wird. Hierfür müssen allerdings zunächst die Vorgänge bei chronischer Druckentlastung und somit Atrophie des Herzmuskels besser verstanden werden, da hierdurch eine Optimierung der Entlastungstherapie mittels VADs ermöglicht werden könnte. Die bisher bekannten Veränderungen bei mechanischer Unterstützung und so erzeugter chronischer Druckentlastung sollen im Folgenden dargestellt werden.

### 1.4.1 Rückgang der zellulären Hypertrophie

Ansteigende Drücke in den Ventrikeln führen zu einer gesteigerten Arbeitsanforderung an den Herzmuskel und bewirken über eine chronisch gesteigerte Wandspannung eine Hypertrophie der Kardiomyozyten [Campbell et al. 1991]. Wird ein derart erkranktes Herz nun durch ein Pumpensystem mechanisch unterstützt, wird ein Großteil der Herzarbeit von den Pumpen übernommen, was die Arbeitsanforderungen an den Herzmuskel reduziert [Radovanvevic et al. 1992]. Es kommt zu einer Reduktion des in den Ventrikeln verbleibenden Volumens, was zu einer Normalisierung der ventrikulären Drücke und Durchmesser führt, wodurch es zu einer Reduktion der auf dem Myokard lastenden Wandspannung kommt. Da die Herzarbeit und die Wandspannung über den Ventrikelwänden die Größe der Kardiomyozyten maßgeblich beeinflusst [Campbell et al. 1991], kommt es durch die mechanische Unterstützung zu einer Reduktion der Zellgröße [Zafeiridis et al. 1998]. Dies hat zur Folge, dass die bei Hypertrophie reduzierte Dichte an Blutgefäßen durch Reduktion der Muskelmasse wieder ansteigt, wodurch die Diffusionsstrecke für Sauerstoff abnimmt. Das derart gesteigerte Sauerstoffangebot in Kombination mit dem durch die mechanische Unterstützung verringerten Sauerstoffverbrauch scheint den hypoxischen Zustand des insuffizienten Myokards zu verringern, wodurch weiterer nekrotischer und apoptotischer Untergang von kardialem Gewebe verhindert wird [Bartling et al. 1999].

Somit wird durch Reduktion der Zellgröße der einzelnen Kardiomyozyten Muskelgewebe erhalten und dadurch die Kontraktilität des Herzens verbessert. Die Reduktion der Zellgröße trägt unter anderem dazu bei, dass sich der Füllungszustand der Ventrikel

vermindert, was letztendlich eine Verbesserung der Geometrie des gesamten Herzens zur Folge hat [Bartling et al. 1999].

### 1.4.2 Elektrophysiologische Veränderungen

Die mechanische Entlastung des Herzens hat auch Auswirkungen auf die Elektrophysiologie der Kardiomyozyten. So führt eine Entlastungstherapie nach einigen Wochen zu einer Rückbildung der bei insuffizienten Herzen häufig verlängerten APs [Harding et al. 2001]. Hierdurch kommt es durch Normalisierung der Erregungsrückbildung zu einer Verbesserung insbesondere der diastolischen Funktion [Terracciano et al. 2003; Harding et al. 2001].

Allerdings hat sich gezeigt, dass es in den ersten Tagen nach der Implantation der Pumpensysteme zunächst zu einer weiteren Verlängerung des QT-Intervalls im Oberflächen-EKG kommt. Dies weist abermals auf eine Repolarisationsstörung hin und könnte das nach dem Eingriff initial erhöhte Risiko für ventrikuläre Tachykardien erklären [Harding et al. 2001; Harding et al. 2005]. Allerdings ist bisher unbekannt welche Faktoren zu dieser Verlängerung der APs mit beitragen [Harding et al. 2001].

Sind die ersten Wochen nach Implantation der Pumpensysteme überstanden, kommt es allerdings zu einer Normalisierung der Erregungsausbreitung und -rückbildung. Dies senkt das unter Kapitel 1.3.6 beschriebene hohe Risiko insuffizienter Herzen maligne ventrikuläre Tachykardien zu entwickeln [Harding et al. 2001; Harding et al. 2005].

### 1.4.3 Veränderungen des zellulären $Ca^{2+}$ -Haushaltes

Unter mechanischer Entlastungstherapie konnte gezeigt werden, dass es durch Wiederherstellung des schnellen  $Ca^{2+}$ -Anstiegs im Intrazellulärraum während der Systole und raschem Konzentrationsabfall von  $Ca^{2+}$  zu Beginn der Diastole es zu einer Normalisierung des  $Ca^{2+}$ -Haushaltes kommt [Dipla et al. 1998]. Hierzu trägt die Wiederherstellung eines physiologisch großen  $I_{CaL}$  bei. In Untersuchungen, bei denen insuffiziente Herzen eine Verminderung des  $I_{CaL}$  zeigten, ließen sich unter mechanischer Entlastung eine Zunahme dieser Ströme nachweisen [Terracciano et al. 2003]. Hierdurch



könnte es zu einer Verbesserung der elektromechanischen Kopplung kommen, was zur Zunahme der Kontraktilität des entlasteten Herzmuskels mit beitragen könnte.

Zum anderen zeigt die SERCA im Vergleich zu chronisch druckbelasteten Herzen eine wieder gesteigerte Aktivität. Somit wird dieses Enzym unter chronischer Druckentlastung erneut vermehrt exprimiert und weniger durch Phospholamban gehemmt [Bartling et al. 1999; Heerdt et al. 2000]. Durch diese Enthemmung und die gesteigerte Anwesenheit des Proteins kann die SERCA wieder mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR transportieren und den Füllungszustand dieses Zellorganells steigern [Gupta et al. 2005; Marguliez et al. 2003]. Somit scheint sich das Gleichgewicht zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR dem physiologischen Zustand wieder anzunähern, was zu der beobachteten Verbesserung der systolischen und diastolischen Parameter beitragen könnte [Terracciano et al 2003; Heerdt et al. 2000].

### 1.4.4 Veränderung der neurohumoralen Parameter

Einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung des Gesundheitszustandes der Patienten leistet insbesondere die Normalisierung der neurohumoralen Faktoren. Durch Verbesserung der peripheren Durchblutung kommt es zu einer Normalisierung des RAAS, wodurch es zum einen zum Absinken des Blutdruckes kommt, was die Nachlast senkt und so den Energieverbrauch des Herzens reduziert, wodurch die Sauerstoffversorgung des Herzens verbessert wird. Zum anderen wird durch Absinken der Angiotensin II-Konzentration neben der ventrikulären Wandspannung ein weiterer Stimulus des Zellwachstums entfernt.

Neben der Anpassung des RAAS sinken auch die Katecholaminkonzentrationen im Blut, da sie für die Aufrechterhaltung der Herzleistung nicht mehr benötigt werden. Hierdurch könnte es zu einer erneuten Sensibilisierung und Zunahme der unter chronischer Druckbelastung desensitivierten und reduzierten Katecholaminrezeptoren kommen. Auch wenn dies bisher noch nicht gezeigt werden konnte, kommt es dennoch zu einer verbesserten Ansprache der Kardiomyozyten auf positiv inotrope Substanzen unter chronischer Druckentlastung mittels VAD, weshalb eine Normalisierung der Funktion der Katecholaminrezeptoren nahe liegend ist [Dipla et al. 1998].

Somit scheinen die erkrankten Kardiomyozyten nach Unterstützung durch ventrikuläre Pumpensysteme in den bisher durchgeführten klinischen Studien wieder eine weitgehend physiologische Arbeitsweise aufzunehmen.

### 1.5 Probleme klinischer Studien und die Notwendigkeit eines Tiermodells

Auch wenn bereits viele Vorgänge unter mechanischer Entlastungstherapie bekannt sind, sind die meisten Mechanismen weitgehend unverstanden.

Ein Problem in diesem Zusammenhang stellen die bei der Entwicklung von klinischen Studien auftretenden Komplikationen dar. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen benötigt man ausreichend große Patientenkollektive als Vergleichsgruppen, die auch in spezialisierten Zentren kaum erreicht werden können. Daneben wird die Anzahl an Patienten durch zahlreiche weitere Faktoren, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, reduziert. Bei der Entlastungstherapie mittels VAD kommt es neben der durch die Entlastung stattfindenden Atrophie zu einer Überlagerung verschiedener Prozesse: Zum einen sind die Herzen durch die kardialen Umbauprozesse bei der Entstehung der Herzinsuffizienz bereits verändert. Hierdurch ist es schwer festzulegen, ob die Veränderungen nach VAD-Therapie der Entlastung oder der zugrunde liegenden Erkrankung zuzuschreiben sind. Außerdem werden die Patienten neben der Entlastungstherapie mit zahlreichen Medikamenten behandelt, deren Einfluss auf die Kardiomyozyten schwer zu trennen ist vom Einfluss der Entlastung. Auch das Alter der Patienten wird Einfluss auf die Veränderung unter Entlastungstherapie nehmen. So müsste die ideale Versuchsgruppe aus Patienten gleichen Alters, gleicher Medikation, gleicher Grunderkrankung und gleichem Krankheitsstadium bestehen. Durch diese Überlagerung von Einflussfaktoren ist es schwierig die einzelnen Prozesse in klinischen Studien voneinander zu trennen.

Um nun die einzelnen Vorgänge unter Entlastungstherapie besser verstehen zu können wurde ein Modell benötigt in dem man den Vorgang der Atrophie durch chronische Druckentlastung isoliert von anderen Einflussfaktoren betrachten kann. Dieses wird durch das international anerkannte Tiermodell der heterotopen Herztransplantation (hHTX) nach Ono & Lindsey aus dem Jahr 1969 ermöglicht. Dieses Tiermodell beschreibt die Durchführung einer hHTX an die abdominellen Gefäße eines Empfänger-

tiers bei isogenen Ratten der gleichen Altersgruppe. Das transplantierte Herz wird hierdurch nahezu vollständig hämodynamisch entlastet, schlägt aber dennoch im Sinusrhythmus. Die nativen Herzen der transplantierten Ratten dienen in den Versuchen als Vergleichsgruppe. Hierdurch sind die Herzen während der Entlastungszeit derselben hormonellen Umgebung ausgesetzt.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieses Modells auf die Entlastungstherapie der chronischen Herzinsuffizienz mittels VAD könnte allerdings aufgrund der unterschiedlichen Ausgangssituationen angezweifelt werden. Interessanterweise konnte allerdings gezeigt werden, dass trotz aller Unterschiede zwischen der Entlastung von gesunden Herzen der Ratte und erkrankten menschlichen Herzen dennoch eine Übertragbarkeit zwischen beiden Situationen gewährleistet ist. Denn es gibt Vorgänge, die durch chronische hämodynamische Entlastung unabhängig von der Spezies und der Ausgangssituation stattzufinden scheinen [Doenst et al. 2006]. Diese primär durch hämodynamische Entlastung verursachten Vorgänge können mit dem Modell der hHTX identifiziert werden. Basierend auf den Kenntnissen der zellulären Vorgänge bei kardialer Atrophie könnte der Aufbau von klinischen Studien anschließend stark erleichtert werden, da ganz gezielt bestimmte Faktoren an den durch VADs entlasteten Herzen untersucht werden könnten.

### 1.6 Bisherige Erkenntnisse aus der Entlastung mittels hHTX

Bei chronischer Druckentlastung von Kardiomyozyten durch hHTX kommt es ebenfalls zu einem Umbauprozess auf histologischer, elektrophysiologischer und molekularbiologischer Ebene.

Zunächst wird die Herzarbeit und die über den Ventrikelwänden liegende Wandspannung durch die hHTX auf ein Minimum reduziert, da die Operation eine maximale hämodynamische Entlastung des Herzens durch Entfallen der Vor- und Nachlast bewirkt. Hierdurch kommt es zu einer Atrophie der Kardiomyozyten, wodurch die Gesamtmasse des Herzens reduziert wird [Campbell et al. 1991; Korecky et al. 1991].

Es wurde befürchtet, dass ab einem gewissen Stadium die Atrophie des Herzmuskels derart fortschreiten würde, dass es zu einer Verschlechterung der kontraktilen Parameter kommen könnte. Diese Befürchtung wurde an über mehreren Wochen entlasteten Kardiomyozyten von Ratten teilweise bestätigt. Hier zeigte sich nämlich eine eindeutige Zeitabhängigkeit der kontraktilen Parameter, besonders in Bezug auf die diastolische Funktion. Während nach zweiwöchiger Entlastung keine Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt und den kontraktilen Eigenschaften nachzuweisen waren [Ritter et al. 2000; Ito et al. 2003], zeigte sich nach fünfwöchiger Entlastung eine Verschlechterung einiger diastolischer Parameter. Dies ist wahrscheinlich auf eine verlangsamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusion zurückzuführen, die mit einer verminderten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR zusammenhängen könnte [Ito et al. 2003].

Auch scheint die chronische Druckentlastung der transplantierten Herzen zum einen durch eine reduzierte Aktivität des transienten Auswärtsstroms  $I_{t0}$  zu einer Verlängerung der APs [Schwoerer et al. 2008] und zum anderen zu einer Umstellung der Energiegewinnung auf die Verbrennung von Zuckern zu führen [Depre et al. 1998].

Gerade durch diese Erkenntnisse wurde festgestellt, dass es durch chronische Druckentlastung, wie bei der chronischen Druckbelastung zu einer dem fetalen Muster ähnlichen Genexpression zu kommen scheint, wodurch zwischen chronischer Druckbelastung und Druckentlastung Parallelen gezogen werden konnten [Depre et al. 1998]. Diese Parallelen zwischen fetalem, insuffizientem und atrophiertem Myokard sollen in Tabelle 3 dargestellt werden.

	<b>HI+ VAD</b>	<b>HI</b>	<b>Heterotope HTX</b>	<b>Fetaler Phänotyp</b>
<b>APD</b>	APD ?	APD ↑ <sup>1)</sup>	APD ↑ <sup>2)</sup>	APD ↑ <sup>3)</sup>
<b>Ionenströme</b>	I <sub>to</sub> ? AP ind. I <sub>CaL</sub> ? I <sub>CaL</sub> → <sup>4)</sup>	I <sub>to</sub> ↓ <sup>5)</sup> AP ind. I <sub>CaL</sub> ↑ <sup>6)</sup> I <sub>CaL</sub> →↓ <sup>7)</sup>	I <sub>to</sub> ↓ <sup>8)</sup> <b>AP ind. I<sub>CaL</sub> ?</b> I <sub>CaL</sub> ?	I <sub>to</sub> ↓ <sup>9)</sup> AP ind. I <sub>CaL</sub> ↑ <sup>10)</sup> I <sub>CaL</sub> ↑ <sup>11)</sup>
<b>Ca<sup>2+</sup>-Haushalt</b>	SERCA (Protein) ↑ <sup>12)</sup> PLB (Protein) → <sup>13)</sup> Phosphoryliertes PLB ↑ <sup>14)</sup> SERCA/PLB ↑	SERCA (Protein) ↓ <sup>16)</sup> PLB ? Phosphoryliertes PLB <sup>17)</sup> ↓ SERCA/PLB ↓ <sup>18)</sup>	SERCA (Protein) → <sup>19)</sup> PLB ↑ (Protein) <sup>20)</sup> Phosph. PLB ↓ <sup>21)</sup> SERCA/PLB ↓	SERCA (Funktion) ↓ <sup>22)</sup>
<b>Energiegewinnung</b>	Oxidation von Zuckern ?	Oxidation von Zuckern <sup>23)</sup>	Oxidation von Zuckern <sup>24)</sup>	Oxidation von Zuckern <sup>25)</sup>

Tabelle 3: **Elektrophysiologische, metabolische Veränderungen sowie Veränderungen des Ca<sup>2+</sup>-Haushaltes;**

↑↓ positive bzw. negative Regulation des gezeigten Parameters

DCM: dilatative Kardiomyopathie

ICM: ischämische Kardiomyopathie

HCM: hypertrophe Kardiomyopathie

AS: Aortenstenose

HI: Herzinsuffizienz

- 1), 5), 6), 7) [Wickenden et al. 1998] → Mensch (DCM, HCM)  
 2) [Schwoerer et al. 2008] → Ratte (hHTX)  
 3), 9) [Kilborn et al. 1990] → Ratte (fetal versus juvenil)  
 4) [Terraciano et al 2003] → Mensch (VAD)  
 8) [Schwoerer et al. 2008] → Ratte (hHTX)  
 10), 11), 22) [Escobar et al. 2003] → Ratte (fetal versus juvenil)  
 12) [Heerdt et al. 2000] → Mensch (DCM;ICM)  
 13), 14) [Gupta et al. 2005] → Hund (VAD, HCM)  
 16), 17), 18) [Bers et al: 2006] → Mensch (HF)  
 19), 20) [Schwoerer et al. 2008] → Ratte (hHTX)  
 21) [Schwoerer et al. 2008] → Ratte (hHTX)  
 23), 24) 25) [Depre et al. 1998] → Ratte (AS; hHTX)

Aufgrund dieser Parallelen stellt sich die Frage in wie weit auch die chronische Druckentlastung durch Entstehung einer Atrophie dem Herzen schaden kann. Um diese Frage zu klären müssen die Veränderungen unter durch chronischer Druckentlastung herbeigeführter Atrophie des Herzens an dem Modell der hHTX genauer untersucht werden. Die Kenntnis der Parameter, die durch Entlastung zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion führen könnten, scheint hierbei essentiell zu sein, da zum Beispiel durch pharmakologische Intervention die Option zur Umgehung dieser Parameter bestünde. Hierdurch könnte die Entlastungstherapie mittels VADs optimiert werden und einem breiteren Patientenkollektiv zur Verfügung stehen.

### 1.7 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Chronische Druckbelastung führt zu einer Veränderung der Genexpression, die dem fetalen Expressionsmuster ähnelt. Dieser Umbauprozess könnte einen Kompensationsversuch des Herzmuskels darstellen um den gesteigerten Arbeitsanforderungen entsprechen zu können. Allerdings scheint der als Kompensationsversuch angesehene Umbauprozess in Kombination mit einer unverminderten Druckbelastung den Fortschritt der Erkrankung nicht aufhalten zu können. Hierbei wird sogar davon ausgegangen, dass insbesondere die Regression auf eine fetale Elektrophysiologie als Bestandteil der unter chronischer Druckbelastung stattfindenden Veränderungen langfristig zu der Verschlechterung der kardialen Situation mit beitragen könnte.

Die Implantation von mechanischen Unterstützungssystemen, den so genannten VADs, führt zur Druckentlastung der erkrankten Herzen, was zu einer erneuten Verbesserung der kardialen Pumpfunktion führt. Allerdings wurde an Entlastungsmodellen im Tierversuch gezeigt, dass in Bezug auf zahlreiche Proteine die fetale Genexpression unter chronischer Druckentlastung erhalten bleibt, also derjenigen druckbelasteter Kardiomyozyten im kompensierten Stadium ähnelt. In solchen Modellen konnte auch gezeigt werden, dass es nach längerer Entlastung zu einer Verschlechterung der kontraktile Parameter, insbesondere der diastolischen Funktion kommt. Dies deutet darauf hin, dass die physikalisch gegensätzlichen Situationen der Druckbelastung und Druckentlastung zu ähnlichen Veränderungen in den Kardiomyozyten führen. Ist dies tatsächlich der Fall, könnte auch die Entlastung mittels VAD-Therapie nach initialer Verbesserung der hämodynamischen Parameter zu einer erneuten Verschlechterung der Herzleistung führen. Die genaue Kenntnis darüber, welche Faktoren sich durch hämodynamische Entlastung verändern, ist essentiell, da hierdurch die Entlastungstherapie mittels VADs verbessert werden könnte.

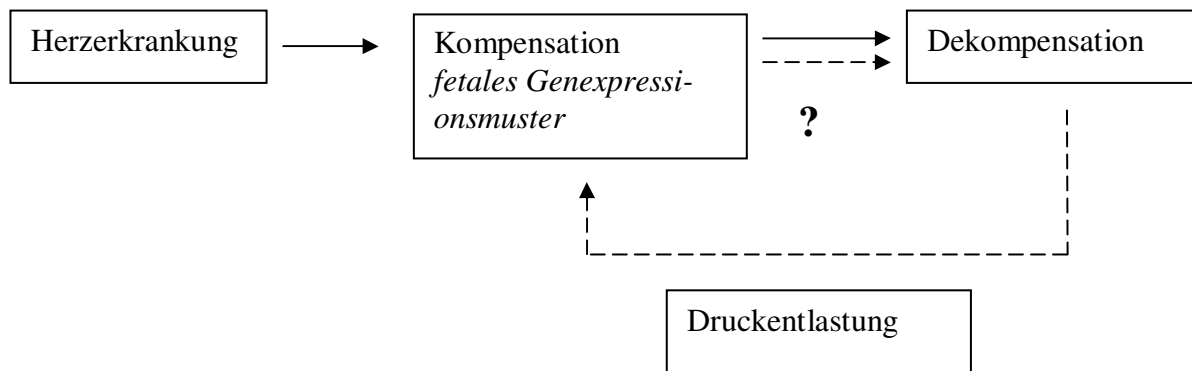


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Vorgänge bei Druckentlastung und Druckbelastung

Da den Parametern des zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Umbauprozesses unter chronischer Druckbelastung zugeschrieben werden, sind diese Parameter auch bei chronischer Druckentlastung von zentralem Interesse. Aufgrund der Ähnlichkeit der Veränderungen unter chronischer Druckbelastung und Druckentlastung kann hypothetisch angenommen werden, dass sich auch die Bestandteile des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes unter chronischer Druckentlastung ähnlich verhalten werden wie unter chronischer Druckbelastung.

So sollen in dieser Arbeit durch den Vergleich von durch hHTX atrophierten und nativen, normal belasteten Kardiomyozyten folgende Fragen über einige funktionelle Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes beantwortet werden.

- 1) Wie verhält sich der  $I_{\text{CaL}}$  linksventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte unter chronischer Druckentlastung durch hHTX im Bezug auf seine Stromgröße und Kinetik?
- 2) Kommt es an linksventrikulären Kardiomyozyten der Ratte bei chronischer Druckentlastung durch hHTX zu einer Reexpression des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals?
- 3) Wie verhält sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des APs an linksventrikulären Kardiomyozyten der Ratte unter chronischer Druckentlastung durch hHTX?

Nach Beantwortung dieser Fragen sollen die Ergebnisse dieser Arbeit in den Vergleich zwischen chronischer Druckbelastung und Druckentlastung eingebracht werden und insbesondere mit den fetalen Parametern dieser Bestandteile des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes verglichen werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Übersicht

Zur Induktion der hämodynamischen Entlastung des linken Ventrikels wurden die Herzen männlicher Lewis-Ratten (n=19) im Alter von 6 Wochen mit einem Gewicht von 200g bis 260g einer heterotopen Herztransplantation (hHTX) nach K.Ono und E.S.Lindsey (1969) unterzogen. Für sämtliche Versuche lagen von den jeweils zuständigen Behörden entsprechende Genehmigungen vor. Das Spenderherz wurde durch Erzeugung von Anastomosen zwischen Aortenbogen des Spenderherzens und Bauch-aorta des Empfängertiers und zwischen *Truncus Pulmonalis* des Spenderherzens und *Vena Cava Inferior* des Empfängertiers in den Bauchraum implantiert. Da für die Versuche isogene Ratten verwendet wurden, konnte auf eine Immunsuppression verzichtet werden. Die transplantierten Herzen wurden hierdurch für vierzehn Tage hämodynamisch entlastet.

Am Ende dieser zweiwöchigen Periode wurden sowohl die entlasteten als auch die nativen Herzen entnommen, die Kardiomyozyten isoliert und mit geeigneten Methoden elektrophysiologisch untersucht.

### 2.2 Durchführung der heterotopen Herztransplantation nach Ono & Lindsey

#### 2.2.1 Entnahme des Spenderherzens

Der Spender wurde mit 4,5%–5% Isofluran bei einer Flussstärke von 700ml/min narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Abdomen eröffnet und die abdominale Aorta sowie die *Vena Cava Inferior* frei präpariert. Um das Thromboserisiko zu minimieren, wurden 100.000 internationale Einheiten (IE) Heparin in die *Vena Cava Inferior* injiziert. Durch einen Schnitt in die abdominale Aorta wurde das Herz entlastet. Anschließend wurde eine Thorakotomie durchgeführt und das Herz freigelegt.

Durch die *Vena Cava Inferior* wurde 10ml kardioplege Lösung (L-01; siehe Kapitel 2.8.1) injiziert, wodurch das Herz durch den K<sup>+</sup>-Überschuss in der Diastole arretierte. Die zu- und abführenden Gefäße des Herzens wurden in folgender Reihenfolge legiert: *Vena Cava Superior*, *Vena Cava Inferior* und an beiden Lungenhila die zu den Lungen führenden Gefäße. Anschließend wurde das Herz von den beiden Lungenflügeln, der Aorta und den *Venae Cavae* abgetrennt und in 4°C kalte kardioplege Lösung gelegt, wo es bis zur Implantation in den Empfänger aufbewahrt wurde. Von diesem Zeitpunkt an wurde die kalte Ischämiezeit bestimmt.

#### 2.2.2 Implantation des Herzens

Zur Implantation des zuvor entnommenen Herzens wurde das Empfängertier mit einer volatilen Narkose narkotisiert (Isofluran 1,5%-2%), intubiert und mechanisch beatmet. Nach Eröffnung des Abdomen wurde die *Aorta Abdominalis* und die *Vena Cava Inferior* kurz unter dem Abgang der renalen Gefäße freigelegt. Segmentale Gefäße wurden verödet, abdominale Aorta und *Vena Cava Inferior* abgeklemmt und anschließend in longitudinaler Richtung 2–3mm eröffnet.

Das Herz wurde zunächst so an die Gefäße gelegt, dass die anteriore Seite des Herzens dem Operateur zugewandt zu liegen kam. In dieser Position wurden der obere, der untere und der vordere Rand der Aorta des Spenders an die Aorta des Empfängers vernäht. Um an den ehemaligen *Truncus Pulmonalis* zu gelangen wurde das Herz

gewendet, wonach die hintere Seite des Herzens zum Operateur zeigte. Die Aorten Anastomose wurde auf der Rückseite vervollständigt und die venöse Anastomose zwischen *Vena Cava Inferior* des Empfängers und *Truncus Pulmonalis* des Spenderherzens analog zur arteriellen Anastomose durchgeführt (siehe Abbildung 10). Nach Vervollständigung der Anastomosen wurden die Klemmen gelöst, wodurch die Herzkranzgefäße wieder anterograd durchblutet wurden. Innerhalb von 1-2min nach hergestellter Reperfusion schlugen die transplantierten Herzen wieder im Sinusrhythmus. Durch die so wieder hergestellte Sauerstoffversorgung des kardialen Gewebes wurde die kalte Ischämiezeit des Myokards beendet. Diese betrug in den hier durchgeführten Versuchen zwischen 35min und 50min. Nach dem Eingriff wurde der Situs schichtweise verschlossen und das Tier mit einer Schmerztherapie subkutan behandelt.

Durch diese hHTX kommt es bei intakter Aortenklappe zu folgendem Blutfluss: Aorta, Herzkranzgefäße, Koronarvene, rechter Vorhof, rechter Ventrikel, *Truncus Pulmonalis*, *Vena Cava Inferior*. Abgesehen von geringem Pendelblut über der Aortenklappe kommt es so zu einer nahezu vollständigen Druckentlastung des linken Ventrikels.

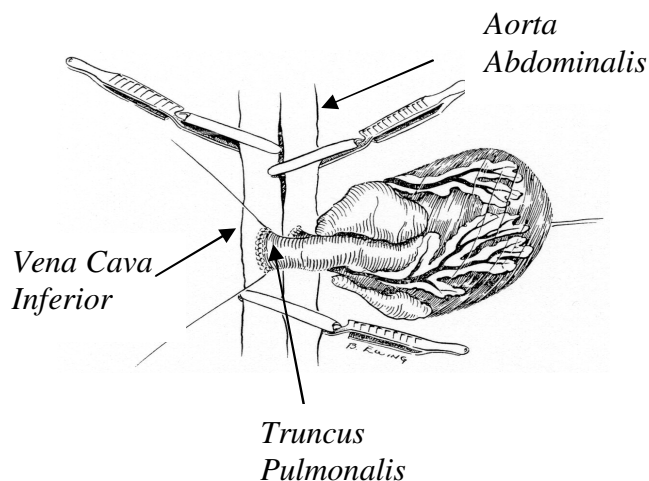


Abbildung 10: **Heterotope Herztransplantation nach Ono & Lindsey**  
[mod. nach Ono & Lindsey et al. 1969]

Sicht auf das transplantierte Herz bei Herstellung der  
Gefäßanastomosen an den abdominalen Gefäßen des Empfängers

### 2.3 Beurteilung der linksventrikulären Masse und der Herzfrequenz

Um das Ausmaß der Reduktion der linksventrikulären Masse (LVM) und die Herzfrequenz (HF) bestimmen zu können, wurden die Ratten vierzehn Tage nach der Operation am Tag vor der Entnahme der Herzen echokardiographisch untersucht.

Hierzu wurden die Ratten mit 1% Isofluran sediert und eine hoch auflösende 2D-Echokardiographie (Vevo 600, VisualSonics) durchgeführt. Die Herzfrequenz wurde direkt aus den Messdaten der Echokardiographie bestimmt.

Des Weiteren konnte der ventrikuläre Durchmesser längs ( $A_2$ ) und quer ( $L$ ) sowie die Wanddicke ( $T$ ) und der Durchmesser des linken Ventrikels inklusive muskulärer Wand ( $A_1$ ) bestimmt werden (siehe Abbildung 11). Alle Werte wurden sowohl während der Systole als auch während der Diastole bestimmt und anschließend gemittelt. Die linksventrikuläre Masse wurde aus den derart gewonnenen Daten nach folgender Gleichung berechnet:  $LVM(mg) = 1.05[5/6A_1 \times (L+T) - (5/6A_2 \times L)]$  [Collins et al. 2001].

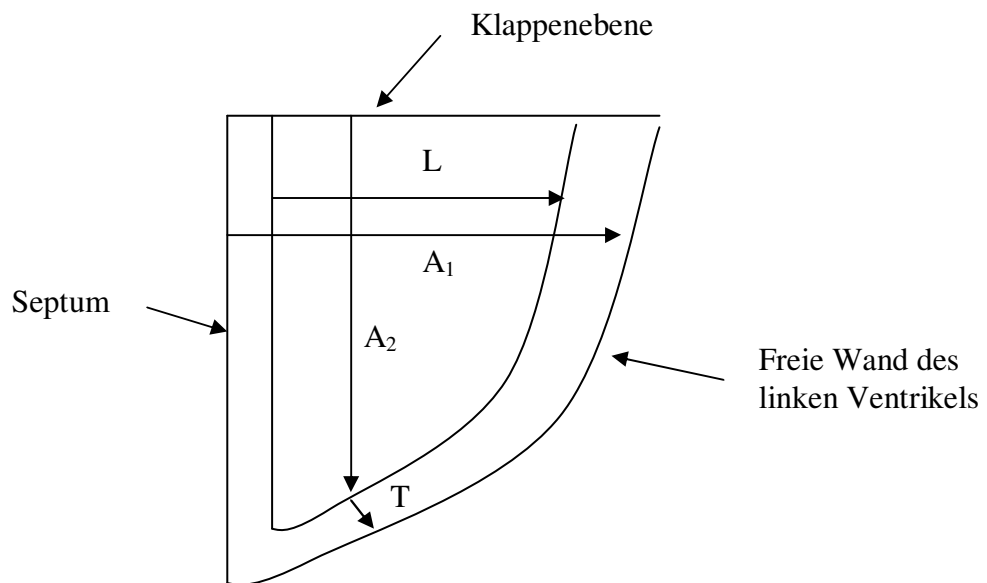


Abbildung 11: **Parameter zur Berechnung der linksventrikulären Masse**

- L: Innendurchmesser quer zum Ventrikel
  - A<sub>1</sub>: Innendurchmesser quer zum Ventrikel + muskulärer Wand
  - A<sub>2</sub>: Innendurchmesser längs zum Ventrikel
  - T: Wanddicke
- Die Bestimmung dieser Parameter fand mittels Echokardiographie (Vevo 600, VisualSonics) statt.

### 2.4 Durchführung der Zellisolation

Einen Tag nach der echokardiographischen Untersuchung wurden sowohl die transplantierten als auch die nativen Herzen entnommen und die Kardiomyozyten des linken Ventrikels beider Herzen isoliert. Dabei wurden die Ratten mit 1,5-2% Isofluran narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Abdomen eröffnet und das transplantierte Herz im Bauchraum frei präpariert. *Aorta Abdominalis* und *Vena Cava Inferior* wurden abgeklemmt und das transplantierte Herz an der Aorta gefasst und abgetrennt. Das noch schlagende Herz wurde in 4°C kalte kardioplege Lösung (L-01; siehe Kapitel 2.8.1) gelegt, wo die mechanische Aktivität nach drei bis vier weiteren Schlägen sistierte.

Die Zellisolation wurde als Modifikation einer von Isenberg und Klockner 1982 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei wurde die Aorta mittels eines Glasröhrchens kanüliert und freihängend unter Verwendung einer Langendorff-Apparatur druckkontrolliert (ca. 75mmHg) mit verschiedenen Lösungen anterograd perfundiert. Alle für die Perfusion verwendeten Lösungen wurden bei einer Temperatur von 37°C mit 100% O<sub>2</sub> gesättigt.

Für 5min wurde mit nominell Ca<sup>2+</sup>-freier Tyrode-Lösung (L-02; siehe Kapitel 2.8.1) gespült um die Herzkranzgefäße von Blutresten zu befreien. Nach dieser Spülung wurde das Herz für 15min mit Hilfe einer Enzymlösung, die das kardiale Bindegewebe zersetzt, rezirkulierend perfundiert. Dabei wurde Kollagenase (Typ CLS 2, 200U/mL; Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Protease (Typ 14, 0,7U/mL; Sigma, München, Deutschland) zu der Ca<sup>2+</sup>-freien Tyrode-Lösung (L-02) gegeben. Um Enzymreste auszuwaschen wurde anschließend noch einmal für 5min mit einer 1mmol Ca<sup>2+</sup>-enthaltenden Tyrode-Lösung gespült.

Das Herz wurde von der Kanüle gelöst und die freie Wand des linken Ventrikels entlang des *Septum Interventriculare* abgetrennt. Von diesem Gewebestück wurden jeweils eine endokardiale und eine epikardiale Probe entnommen. Diese Proben wurden in 1mmol Ca<sup>2+</sup>-haltiger Tyrode-Lösung in einem 41°C warmen Wasserbad für einige Minuten vorsichtig geschwenkt und anschließend gezupft. Es entstand eine trübe Zellsuspension. In der Zwischenzeit wurde das native Herz der Ratte ebenfalls entnommen und die Zellen nach der oben beschriebenen Methode isoliert.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden in einer 1mmol  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Tyrode-Lösung aufbewahrt. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurden die elektrophysiologischen Versuche mit Hilfe der *patch-clamp* Technik durchgeführt

### 2.5 Patch-clamp Technik

#### 2.5.1 Die patch-clamp Technik

1976 publizierten Erwin Neher und Bert Sakmann aus Göttingen die *patch-clamp* Technik (*patch*=Membranfleck, *clamp*=Klemme) [Neher et al. 1976]. Dieses Verfahren erlaubte erstmals, den Stromfluß von Ionen im Bereich von pA durch einzelne Kanäle in der Zellmembran zu messen. Bei der *patch-clamp* Technik wird eine saubere und polierte Mikropipette aus Glas (Patchpipette) mit einer Elektrolytlösung (Pipettenlösung) gefüllt und vorsichtig auf die Zellmembran gesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks saugt sich die Pipettenspitze an der Zellmembran fest und isoliert den darunter liegenden Membranfleck (das so genannte *patch*) elektrisch von seiner Umgebung. Die Mechanismen, die im Einzelnen zu einer solchen Abdichtung (auch *seal* genannt) führen, sind dabei noch weitgehend ungeklärt [Corey et al. 1983; Milton et al. 1990; Rae et al. 1992]. *Seal*-Widerstände im Bereich von mehreren Gigaohm ( $\text{G}\Omega$ ) werden als *Gigaseal* bezeichnet und ermöglichen die Registrierung von Stromsprüngen, welche durch einzelne Schaltvorgänge von Ionenkanälen verursacht werden [Hamill et al. 1981]. Bemerkenswerterweise ist die mechanische Belastbarkeit einer solchen Verbindung zwischen Pipette und Zelle sehr hoch, so dass Messungen an Herzmuskelzellen durchaus über einen Zeitraum von einer halben Stunde stabil vorgenommen oder Badlösungen während eines Experimentes ausgetauscht werden können. Die direkt nach der Sealbildung vorliegende *cell-attached* Konfiguration stellt die Ausgangssituation für weitere Messkonfigurationen (*whole-cell*, *outside-out*, *inside-out*) dar. Da in der vorliegenden Arbeit alle Versuche in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt wurden, wird im Folgenden nur auf die Herstellung und die Eigenschaften der *cell-attached* und der *whole-cell* Konfiguration eingegangen.

### 2.5.2 Die *cell-attached* Konfiguration

Nach Erreichen einer elektrischen Abdichtung durch Herstellung eines *GΩ-Seals* befindet sich die Zelle in der so genannten *cell-attached* Konfiguration. Es können Ströme gemessen werden, die durch den direkt unter der Pipette gelegenen Membranfleck fließen. Da die Zelle bei dieser Konfiguration intakt bleibt, können so zum Beispiel durch Modifikationen in der extrazellulären Badlösung Ionenströme unter Wahrung der physiologischen Zellmechanismen untersucht werden. Dabei muss jedoch in Kauf genommen werden, dass weder das Zellmembranpotential noch die zytosolischen Ionenkonzentrationen genau bekannt sind und dementsprechend auch nicht definiert werden können. Die *cell-attached* Konfiguration ist darüber hinaus die Ausgangsposition für die Ganzzellkonfiguration (*whole-cell* Konfiguration) [Hamill et al. 1981].

#### 2.5.2.1 Die *whole-cell* Konfiguration

Die *whole-cell* Konfiguration zeichnet sich dadurch aus, dass ein direkter elektrischer Kontakt zwischen dem Pipetteninnenraum und dem Zellinneren besteht. Somit können Ströme gemessen werden, die über die gesamte Zellmembran fließen und das Zellmembranpotential kann bestimmt und verändert werden.

Die in der *whole-cell* Konfiguration über der Zellmembran gemessenen Ströme bilden einen Summenstrom aus den Strömen aller in der Zellmembran befindlichen und aktiven Ionenkanäle, weshalb diese Konfiguration auch als Ganzzelleitung (*whole-cell*) bezeichnet wird. Da der Summenstrom in der Regel die Ströme einzelner Ionenkanäle bei weitem übersteigt und der Beitrag einzelner Kanäle verschiedener Gruppen variiert, wird so nur ein „makroskopisches“ Strommuster dieser Zelle gewonnen.

#### 2.5.2.2 Die *ruptured-patch* Technik

Um von der *cell-attached* Konfiguration zu der Ganzzelleitung zu gelangen, muss die Pipette Zugang zur Zelle durch die Zellmembran bekommen. Die übliche Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde um eine Ganzzelleitung zu erlangen ist die

*ruptured-patch* Technik. In der *cell-attached* Konfiguration wird zuerst die Zellmembran durch einen kurzen Strompuls (zum Beispiel 900 mV für 0,1 s) destabilisiert und dann der Membranfleck unter der Patchpipette durch vorsichtige Applikation von Über- oder Unterdruckpulsen mechanisch zerstört.

Dies führt zu einer direkten Verbindung zwischen dem Pipetteninnenraum und dem Zellinneren. Es kommt nun zu einem Lösungsaustausch, wobei die Elektrolytzusammensetzung in der Zelle nach kurzer Zeit praktisch der verwendeten Pipettenlösung entspricht, da das Volumen der Patchpipette sehr viel größer ist als das der Zelle [Marty et al., 1995]. Bei dieser Technik kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Druckpulse nicht-membranständige Zellorganellen in die Nähe der Zellmembran gebracht werden oder sogar mit dieser verschmelzen, was einen nicht zu definierenden Einfluss auf die Ergebnisse nehmen kann.

Ein anderes Phänomen ist die zu beobachtende Aktivitätsabnahme einiger Kanäle, da durch das Auswaschen des Zytoplasmas mit Pipettenlösung Substanzen aus der Zelle entfernt werden können, die für die Aktivität von Kanälen, unter anderem auch für die der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, von Bedeutung sein können. Diese Aktivitätsabnahme der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme war in den hier durchgeführten Versuchen 15-20min nach Versuchsbeginn nachweisbar. Aus diesem Grund wurden in den vorliegenden Experimenten nur Versuche innerhalb dieses Zeitfensters verwendet.

### 2.5.3 Voltage-clamp und current-clamp

Ist ein elektrischer Zugang zur Zelle gebildet, wird generell zwischen zwei elektrischen Registrierkonfigurationen unterschieden: Bei der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) wird das Membranpotential festgelegt („geklemmt“) und die Ströme, die für die Aufrechterhaltung dieses Potentials notwendig sind, aufgezeichnet. Bei der Stromklemme (*current-clamp*) hingegen wird der Gesamtstromfluss über der Zellmembran vorgegeben und das resultierende Membranpotential registriert. Als Sonderfall gilt die so genannte Nullstromklemme. Hierbei wird der Gesamtstromfluss über die Zellmembran auf 0 pA geklemmt. Das dabei registrierte Membranpotential entspricht weitgehend dem Ruhemembranpotential [Hamill et al. 1981].



### 2.5.4 Elektrische Eigenschaften der Ganzzelleableitung

Bei der Ganzzelleableitung in der Spannungsklemme wird das elektrische Potential zwischen der Messelektrode und der in der Badlösung befindlichen Referenzelektrode durch die Kommandospannung  $V_{pip}$  definiert. Dabei entspricht  $V_{pip}$  nicht dem tatsächlich an der Zellmembran anliegenden Potential  $V_m$ . Die zwischen der Messelektrode und der Referenzelektrode angelegte Spannung fällt an zwei in Serie geschalteten Widerständen ab: dem Serienwiderstand ( $R_s$ ) und dem Membranwiderstand ( $R_m$ ).

Der Serienwiderstand ( $R_s$ ) entspricht dem zwischen dem Silberdraht der Messelektrode und dem Zytosol zu findenden elektrischen Widerstand. Idealerweise ist dieser genauso groß wie der elektrische Widerstand der Pipette ( $R_{pip}$ ). Beim Rupturieren der Zelle können jedoch Membranbestandteile und auch Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette gelangen, so dass sich der Zugangswiderstand meist auf das zwei- bis dreifache des Pipettenwiderstandes erhöht. Darüber hinaus kann sich der  $R_s$  im Verlauf des Versuchs ändern und muss daher ständig kontrolliert werden. Durch gezielte vorsichtige Überdruckpulse ist es möglich die Pipettenspitze von Membranpartikeln und Organellen „freizuräumen“ und so einen erhöhten  $R_s$  wieder zu senken. Der  $R_s$  lag bei den mittels der *ruptured-patch* Technik eingeleiteten Versuchen üblicherweise unter  $10M\Omega$ .

In Reihe zum Serienwiderstand liegt der Membranwiderstand ( $R_m$ ), so dass für den Gesamtwiderstand  $R_{ges}$  insgesamt gilt:  $R_{ges}=R_s+R_m$ . Für die an der Membran effektiv anliegende Spannung  $V_m$  gilt dementsprechend (mit  $V_s$  als der am Serienwiderstand abfallenden Spannung):  $V_m=V_{pip}-V_s$ . Nur für den Fall, dass  $R_s$  deutlich kleiner ist als  $R_m$ , kann davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der Kommandospannung an der Membran abfällt und das Zellmembranpotential tatsächlich  $V_{pip}$  entspricht. Steigt  $R_s$  hingegen stark an, so fällt die Kommandospannung in zunehmendem Maße daran ab und  $V_m$  weicht immer mehr von  $V_{pip}$  ab, wodurch es zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse kommen kann. Somit wurden nur Zellen mit einem niedrigen  $R_s$  für die Versuche verwendet.

### 2.5.4.1 Kompensation des Serienwiderstandes $R_s$

Wie in 2.5.4 beschrieben fällt ein Teil der Kommandospannung immer am Serienwiderstand  $R_s$  ab, so dass an der Zellmembran eigentlich eine niedrigere Spannung anliegt als im Versuchsprotokoll geplant. Dieser Verlust lässt sich kompensieren indem systematisch zu dem injizierten Strom eine zusätzliche Stromkomponente durch die verwendete Software addiert wird, die einen großen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht. Dazu wird  $R_s$  regelmäßig im Versuchsverlauf durch einen geeigneten Testpuls ermittelt und der erwartete Verlust berechnet. Um positive Rückkopplungseffekte zu vermeiden wurde in den vorliegenden Experimenten die Kompensation auf 85% begrenzt.

### 2.5.4.2 Übergangspotentiale und deren Korrektur

An den Grenzflächen zwischen zwei verschiedenen Lösungen oder einer Lösung und einem Leiter kommt es aufgrund von Konzentrationsunterschieden zu Ionenverschiebungen. Dadurch entstehen elektrische Potentiale, die Übergangs- oder auch Grenzflächenpotentiale.

Bei dem hier beschriebenen Versuchsaufbau muss vor allem an folgenden Übergängen mit solchen Potentialen gerechnet werden (betrachtet in der Reihenfolge von der Referenz- zur Messelektrode):

- 1) zwischen der Silber/Silberchlorid-Messelektrode im Referenzbad und der Pipettenlösung
- 2) zwischen der Pipettenlösung in der Agar-Brücke und der Badlösung (*liquid junction* Potential)
- 3) zwischen der Badlösung und der Pipettenlösung in der Pipettenspitze (ebenfalls ein *liquid junction* Potential)
- 4) zwischen der Pipettenlösung und der Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode des Verstärkers.

Die Potentiale 1) und 4) entstehen beide durch Grenzflächen zwischen einer Silber/Silberchlorid-Elektrode und der Pipettenlösung. Sie sind vom Betrag her

idealerweise gleich groß und heben sich gegenseitig auf. Eventuelle Abweichungen wurden vor Versuchsbeginn bestimmt und kompensiert.

Die Übergangspotentiale 2) und 3) sind gleich groß und heben sich solange auf, wie die Pipettenöffnung frei in der Badlösung steht. Kommt es zu einer Abdichtung zwischen der Pipette und der Zelle, fällt die Grenzfläche zwischen der Bad- und der Pipettenlösung an der Pipettenspitze weg und somit auch das Übergangspotential 3). Das *liquid junction* Potential an der Grenzfläche zwischen der Agar-Brücke und der Badlösung (2) hingegen bleibt weiterhin erhalten. Dieses Grenzflächenpotential wurde für alle Versuchslösungen bestimmt und dann automatisch von der Steuersoftware des EPC-9 berücksichtigt. Typische Werte für das *liquid junction* Potential lagen bei Verwendung der Standard-Badlösung für die Standard-Pipettenlösung bei 3,2mV und für die K-Glutamat Pipettenlösung bei 12,0mV.

### 2.5.5 Vorzeichenkonventionen

Definitionsgemäß wird sowohl die Richtung des Stromflusses als auch das angelegte Haltepotential aus der Sicht der Zelle betrachtet. Dabei gilt, dass ein Einwärtsstrom durch den Fluss von positiven Ladungsträgern in die Zelle hinein bzw. von negativen Ladungsträgern aus der Zelle heraus hervorgerufen wird. Auswärtsströme werden dementsprechend durch den Fluss von negativen Ladungsträgern in die Zelle hinein bzw. von positiven Ladungsträgern aus der Zelle heraus getragen. Weiterhin werden Einwärtsströme mit einem negativen Vorzeichen, Auswärtsströme mit einem positiven Vorzeichen versehen. In Grafiken werden Einwärtsströme daher unterhalb der Nulllinie und Auswärtsströme oberhalb der Nulllinie aufgetragen.

Negativere Haltepotentiale als das Ruhemembranpotential (-80mV) entsprechen einer Membranhyperpolarisation (das Zellinnere ist im Vergleich zum Extrazellulärraum negativ), positivere Haltepotentiale einer Membrandepolarisation (das Zellinnere ist im Vergleich zum Extrazellulärraum positiv).

### 2.6 Der *patch-clamp* Versuchsstand

#### 2.6.1 Die mechanischen Komponenten

Selbst geringste Relativbewegungen zwischen der Patchpipette und der Zelle stören *patch-clamp* Versuche. Daher wurde der Versuchsstand zum Schutz gegen mechanische Erschütterungen zum einen auf einem Luftkissen gelagert und zum anderen auf einem schwingungsgedämpften Steintisch aufgebaut. Um die Messapparatur gegen elektromagnetische Felder der Umgebung zu schützen wurde der Versuchsstand von einem Faradaykäfig aus Eisen umgeben, der getrennt vom schwingungsgedämpften Tisch auf einem festen Übertisch stand.

Der Vorverstärker des *patch-clamp* Verstärkers, an dem auch die Pipettenhalterung befestigt war, wurde auf einem motorgetriebenen Mikromanipulator (HS6/3 Märzhäuser) montiert. Die eigentliche Versuchskammer war in den Kreuztisch des Mikroskops eingelassen. Bei dem Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) handelte es sich um ein inverses Mikroskop, bei dem die Versuchskammer von oben beleuchtet wird und die Objektive von unten an die Versuchskammer herangeführt werden. Dadurch blieb oberhalb der Versuchskammer genügend Platz, um mit den Versuchsapparaturen zu arbeiten. Zur besseren Darstellung der Zelloberflächen wurden Varelkontrast-Objektive von Zeiss verwendet, die zusammen mit 10-fach vergrößernden Okularen eine 100- bzw. 400-fache Vergrößerung erlaubten. Eine an das Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera (Sony) ermöglichte es über einen Monitor die Zelle zu beobachten.

Der Pipettenhalter war mit einem Schlauch verbunden über den sowohl mittels einer Glasspritze als auch eines Mundstückes Über- bzw. Unterdruck in der Patchpipette hergestellt werden konnte. Die Druckmessung erfolgte dabei über ein flüssigkeitsgefülltes, U-förmig geformtes Glasrohr.

### 2.6.2 Die Versuchskammer

Bei der Versuchskammer (Eigenbau der Werkstatt) handelte es sich um eine 6x7cm große und 7mm dicke Plexiglasscheibe in die ein Versuchskanal, ein damit verbundener Absaugkanal und eine getrennte Kammer für die Referenzelektrode gefräst waren. Der Boden der Kammer bestand aus einem aufgeklebten Deckglas. Hierdurch war es möglich den geringen Arbeitsabstand zu den stark vergrößernden Objektiven einzuhalten. Der Versuchskanal war etwa 25mm lang und 4mm breit. Auf der rechten Seite war ein Einlaufstutzen befestigt, über den die Badlösungen appliziert werden konnten. Ein Tunnel auf der linken Seite verband den Versuchskanal mit dem parallel dazu verlaufenden Absaugkanal. Dieser war mit 35mm Länge und 10mm Breite etwas größer als der Versuchskanal.

Der Flüssigkeitspegel in der Versuchskammer wurde über eine Absaugpipette am rechten Rand des Absaugkanals eingestellt. Dazu wurde die Absaugung so positioniert, dass sie sich leicht oberhalb des gewünschten Flüssigkeitspegels befand.

Wurde nun über den Zulauf eine Badlösung appliziert so stieg der Flüssigkeitspegel, und überflüssige Badlösung wurde abgesaugt. Gleichzeitig kam es zu einem (unerwünschten) elektrischen Kontakt zwischen der Badlösung und der Absaugung. Stoppte der Flüssigkeitszulauf, sank der Flüssigkeitspegel und der Flüssigkeitsstrom zur Absaugung riss kurz darauf ab. Nunmehr bestand keine elektrisch leitende Verbindung mehr zwischen der Badlösung und der Absaugung. Unter Versuchsbedingungen befanden sich etwa 0,5ml Badlösung in der Versuchskammer.

Die Kammer für die Referenzelektrode hatte eine Größe von ungefähr 7x14x7mm und befand sich etwa 1cm links neben dem Absaugkanal. Sie war während der Versuche mit der jeweiligen Pipettenlösung gefüllt und stand nur über eine mit Agar und Pipettenlösung gefüllte Glasbrücke mit der Versuchskammer in Verbindung.

Die Badlösungen wurden in 50ml fassende Vorratsbehälter gefüllt, die in einer Halterung ca. 40cm oberhalb der Meßkammer angebracht waren. Über Perfusor<sup>®</sup>-Leitungen (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) waren diese mit dem Einlaufstutzen in der Versuchskammer verbunden. Über einen Absperrhahn konnte der Zufluss reguliert werden. Bei einer vollständigen Öffnung des Zuflusses betrug die

Stromstärke etwa 10ml/min, d.h. ein kompletter Lösungsaustausch in der Versuchskammer fand in etwa drei Sekunden statt.

### 2.6.3 Die elektronischen Komponenten

Der *patch-clamp* Verstärker besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: dem Vorverstärker und dem Hauptverstärker. Der Vorverstärker misst das Stromsignal und wandelt es in eine Messspannung um. Der nachgeschaltete Hauptverstärker kann diese Spannung weiter verstärken und filtern und dient außerdem als Steuereinheit. Zur Anwendung kam bei diesen Versuchen ein EPC-9 Verstärker (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland). Er wurde digital von einem Apple Power Macintosh 9500/200 angesteuert. Die Steuer- und Auswertesoftware („PULSE“, HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) erlaubte die Sicherung der gewonnenen Versuchsdaten in Echtzeit auf die Festplatte. Strom- und Spannungssignale wurden zusätzlich auf einem digitalen Speicheroszilloskop (HM 407, HAMEG, Deutschland) dargestellt.

Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid-Pellet und wurde in das Referenzbad getaucht. Die Messelektrode des Vorverstärkers bestand aus einem Silberdraht, der zuvor in einer 100mmol/l KCl-Lösung chloriert wurde. Sie wurde von hinten in die Patchpipette eingeführt. Die elektrische Verbindung zwischen der Messelektrode und der Referenzelektrode in der Badlösung stellte eine Glasbrücke dar. Dazu wurde ein U-förmiges Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 2mm mit der jeweiligen Pipettenlösung, geliert mit zweiprozentigem Agar-Agar, gefüllt.

### 2.6.4 Die Patchpipetten

Die verwendeten Patchpipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät, Modell Flaming/Brown P-97 (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA), aus 7,5cm langen Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von 1,5mm und einem Innendurchmesser von 0,86mm gezogen (GC150-15, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd., England). Das Ziehgerät war über die Parameter Heiztemperatur, Zuggeschwindigkeit, Zugkraft und Anzahl der Ziehstufen programmierbar. Die Kapillare wurde horizontal in das Ziehgerät eingespannt, durch einen

mittig angebrachten Heizdraht aus Platinlegierung erhitzt, dadurch erweicht und gleichzeitig gezogen. Erreichte die Ausziehgeschwindigkeit den eingestellten Maximalwert, wurde der Zug unterbrochen und die Kapillare abgekühlt. Daraufhin begann der nächste Zyklus mit erneutem Erhitzen. Nach sieben Durchgängen riss die Kapillare auseinander und es entstanden zwei ca. 4cm lange, an der Spitze dünn ausgezogene Kapillaren, die Patchpipetten. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die Pipettenspitze mittels eines Heizdrahtes angeschmolzen um Unebenheiten durch den Ziehvorgang zu beseitigen und so den Abdichtungsvorgang an der Zelle zu erleichtern. Der durchschnittliche Pipettenwiderstand ( $R_{\text{Pip}}$ ) lag bei Verwendung der Standard-Badlösung für die Standard-Pipettenlösung bei  $3.0 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$  ( $n=77$ ) und für die  $\text{K}^+$ -Glutamat Pipettenlösung bei  $4.0 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$  ( $n=73$ ).

### 2.6.5 Durchführung der *patch-clamp* Experimente

Mit einer Pipette wurden etwa 0,1ml der Zellsuspension aufgenommen und in die mit einer Badlösung gefüllte Versuchskammer transferiert. Nach etwa fünf Minuten hatten sich die Zellen auf dem Kammerboden abgesetzt. Bei 100-facher Vergrößerung wurde dann eine einzelne Zelle ausgewählt, die über die typische „Querstreifung“ verfügte und nicht spontan kontrahierte. Jetzt erst wurde die Patchpipette mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt um eine vorzeitige Verschmutzung der Pipettenspitze zu verhindern. Dazu wurde sie auf eine Einwegspritze aufgesetzt und mit angelegtem Unterdruck für einige Sekunden in ein mit Pipettenlösung gefülltes Becherglas eingetaucht. Dadurch füllte sich die Pipettenspitze in den vorderen 0,5mm. Die restliche Pipette wurde von hinten mit einer Spinalkanalpunktionsnadel gefüllt. Dabei eventuell entstandene Luftblasen wurden durch leichtes Klopfen vorsichtig entfernt. Vor Versuchsbeginn wurde die Pipette bis auf die vordersten 7mm leer gesaugt. Auf diese Weise konnte sowohl ein Eindringen der Pipettenlösung in den Pipettenhalter verhindert als auch störendes elektrisches Rauschen minimiert werden. Wurde die Pipette so in den Pipettenhalter eingesetzt, ragte die Silber/Silberchlorid-Messelektrode ca. 3-4mm in die Pipettenflüssigkeit hinein.

Die Pipette konnte nun mit dem Mikromanipulator in die Badlösung gefahren werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein leichter Überdruck in der Pipette anlag um durch

einen geringen Ausstrom von Pipettenlösung die Pipettenspitze frei von Verunreinigungen zu halten. Nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde durch eine implementierte Routine des EPC-9 das gemessene Potential als Nullpunkt festgelegt. Dadurch wurden eventuell bestehende konstante Grenzschichtpotentiale kompensiert. Die Pipette wurde sanft auf die Zelloberfläche aufgesetzt, der Überdruck aus der Pipette entfernt und ein leichter Unterdruck ausgeübt. Dies führte in über 50% der Zellen zu einer Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit einem Widerstand von  $>1\text{G}\Omega$ . Von der so erreichten *cell-attached* Konfiguration konnte nun in die Ganzzelleableitung (siehe Kapitel 2.6.2.1) gewechselt werden. Nach Herstellen der Ganzzelleableitung wurde mit automatischen Routinen des EPC-9 die Zellkapazität ( $C_m$ ) und der Zugangswiderstand ( $R_s$ ) bestimmt.  $R_s$  lag bei den hier durchgeführten Versuchen im Mittel bei Verwendung der Standardpipettenlösung bei  $5.2\pm 0.2\text{M}\Omega$  ( $n=77$ ), bei Verwendung der  $\text{K}^+$ -Glutamatlösung  $6.1\pm 0.3\text{M}\Omega$  ( $n=57$ ) und wurde automatisch zu 85% (siehe Kapitel 2.6.4.1) kompensiert.

Nach Herbeiführen der Ganzzelleableitung wurden die Kardiomyozyten in der Regel auf ihr zu erwartendes Ruhemembranpotential von  $-80\text{mV}$  geklemmt um eine Kontraktion zu verhindern.

### 2.7 Auswertung der Experimente

Alle angegebenen Werte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten, Abweichungen wurden als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) angegeben.

Signifikanzen wurden unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten *Student t-tests* oder einer ANOVA gefolgt von einem *Newman-Keuls posthoc test* mit Hilfe der Software PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Als signifikant wurden dabei Unterschiede mit  $p<0,05$  gewertet. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  gilt dabei:  $*$ = $p<0,05$ ;  $**$ = $p<0,01$ ;  $***$ = $p<0,001$ .



### 2.7.1 Einlesen der Daten in den Computer und Auswertungsprogramme

Alle Messdaten wurden während der Versuche von der Steuersoftware des EPC-9 „PULSE“ (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) auf der computerinternen Festplatte gespeichert und konnten später zur Auswertung mit Hilfe der Software PULSE (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) und IGOR (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) wieder dargestellt werden. Bei einer Abtastrate von 5 kHz wurden die Versuchsdaten bereits im EPC-9 mittels der eingebauten Bessel-Filter bei 1kHz gefiltert. Die statistischen Analysen wurden mit PRISM (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

## 2.8 Versuchslösungen und Chemikalien

### 2.8.1 Versuchslösungen

Die für die Herztransplantation und die Zellisolation verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestandteile (mmol/l)</b>	<b>Titriert mit</b>
L-01	<i>Kardioplege Lösung</i>	NaCl 15; KCl 9; MgCl <sub>2</sub> 4; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,33; CaCl <sub>2</sub> 0,015; Glukose 10; Mannitol 238	NaOH
L-02	<i>Tyrode-Lösung (Ca<sup>2+</sup>-frei)</i>	NaCl 138; KCl 4; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,33; MgCl <sub>2</sub> 1; HEPES 10; Glukose 10	NaOH

**Tabelle 4: Lösungen zur Herztransplantation und Zellisolation**

Die Lösungen wurden mit der in der letzten Spalte aufgeführten Substanz auf einen pH-Wert von 7,40 eingestellt.

*HEPES* 4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pipetten- und Badlösungen sind in den beiden folgenden Tabellen zusammengestellt. Wenn im laufenden Text auf sie Bezug genommen wird, dann entweder über die Nummerierung oder die Bezeichnung.

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestandteile (mmol/l)</b>	<b>Titriert mit</b>
P-01	<i>Standard-Pipettenlösung</i>	CsCl 108; MgCl <sub>2</sub> 25; EGTA 10; HEPES 10; NaCl 16; TEA-Cl 20	CsOH
P-02	<i>K<sup>+</sup>-Glutamat Lösung</i>	<i>K<sup>+</sup>-Glutamat</i> 120; KCl 10; MgCl <sub>2</sub> 2; EGTA 10; HEPES 10; Na <sub>2</sub> -ATP 2	KOH

**Tabelle 5: Pipettenlösungen**

Zusammenfassung der verwendeten Pipettenlösungen. Der pH-Wert wurde mit der in der letzten Spalte aufgeführten Substanz auf 7,20 eingestellt.

*EGTA* entspricht Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat, *HEPES* 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure und *TEA-Cl* Tetraethyl-Ammoniumchlorid.

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestandteile (mmol/l)</b>	<b>Titriert mit</b>
B-01	<i>Standard-Badlösung (Tyrode-Lösung)</i>	NaCl 138; KCl 4; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,33; MgCl <sub>2</sub> 1; CaCl <sub>2</sub> 2; HEPES 10, Glukose 10	NaOH
B-02	<i>NMDG-Lösung</i>	NMDG 140; MgCl <sub>2</sub> 1; CaCl <sub>2</sub> 2; Glukose 10; HEPES 10	TRIS

**Tabelle 6: Badlösungen**

Zusammenfassung der verwendeten Badlösungen. Die Badlösungen wurden mit der in der letzten Spalte aufgeführten Substanz auf einen pH von 7,30 eingestellt.

*NMDG* entspricht N-Methyl-D-Glucamin, *TRIS* Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.

### 2.8.2 Herkunft der verwendeten Chemikalien

Die Salze wurden von Sigma (CsCl), Merck (HCl, KCl, KOH, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) und J.T. Baker (NaCl) bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind die übrigen verwendeten Substanzen aufgeführt.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Kollagenase	Biochrom AG
NMDG	Fluka
ATP (Natrium-Salz)	SIGMA (A-2383)
D-Mannitol	SIGMA (M-9546)
EGTA	Roth, Karlsruhe
Glukose	Fluka
Glutamat	SIGMA (H-3375)
HEPES	SIGMA (P-5147)
Protease	SIGMA
TEA-Cl	Roth
TRIS	SIGMA

Tabelle 7: **Herkunft der verwendeten Substanzen**

### 2.9 Versuchsprotokolle und Ablauf der Versuche

#### 2.9.1 Übersicht

Mit Hilfe der unter Kapitel 2.5-2.8 beschriebenen Methode der *patch-clamp* Technik wurden in diesen Versuchen die elektrophysiologischen Eigenschaften spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, die Charakteristika der APs und der AP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an chronisch druckentlasteten Kardiomyozyten des linken Ventrikels untersucht. Aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen zur Bestimmung dieser beiden Parameter wurden zwei voneinander unabhängige Versuchsteile durchgeführt, der eine zur Untersuchung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme und der andere zur Bestimmung der Eigenschaften der APs. Dabei dienten die entlasteten Kardiomyozyten der transplantierten Herzen als Versuchsgruppe und wurden mit den linksventrikulären Kardiomyozyten der nativen Herzen als Kontrollgruppe verglichen.

#### *Versuchteil (1):*

Zur Bestimmung der Eigenschaften der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme an druckentlasteten Kardiomyozyten wurden die Messungen wie folgt durchgeführt.

- (1.1) Bestimmung der Zellkapazität als Maß für die Zellgröße
- (1.2) Bestimmung der Stromgröße des  $I_{\text{CaL}}$
- (1.3) Funktionelle Nachweisbarkeit des  $I_{\text{CaT}}$
- (1.4) Bestimmung der Kinetik der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme

Nach Herstellung eines  $\text{G}\Omega$ -Seals wurde durch die *ruptured-patch* Methode (siehe Kapitel 2.5.2.2) ein Zugang zur Kardiomyozyte hergestellt. Die Versuchsschritte (1.1)-(1.4) dieses ersten Versuchsteils wurden als Ganzzelleableitung in der Spannungsklemme durchgeführt. Die Lösungskonstellationen bestanden für Versuchsschritt (1.1) aus P(01) und B(01) (siehe Kapitel 2.8.1). Ab Versuchsschritt (1.2) wurde die Badlösung ausgetauscht und durch B(02) ersetzt (siehe Kapitel 2.8.1). Nach Durchführung des für den ersten Versuchsteil zugrunde liegenden Protokolls konnten die benutzten Zellen verworfen werden.

### *Versuchteil (2):*

Der zweite Versuchsteil zur Bestimmung der Eigenschaften der APs und des AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms druckentlasteter Kardiomyozyten wurde aufgrund voneinander abweichender Versuchsbedingungen getrennt vom ersten Versuchsteil an anderen Kardiomyozyten durchgeführt, wobei der Ablauf wie folgt aussah:

- (2.1) Bestimmung der Zellkapazität
- (2.2) Messung der APs
- (2.3) Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms während des APs

Nach Herstellung eines  $\text{G}\Omega$ -Seals wurde durch die *ruptured-patch* Methode (siehe Kapitel 2.5.2.2) ein Zugang zur Kardiomyozyte hergestellt. Hierbei wurde für Versuchsschritt (2.1) und (2.3) die Spannungsklemme, in Versuchsschritt (2.2) die Stromklemme in der Ganzzelleableitung verwendet. Für diesen zweiten Versuchsteil kam eine Lösungskonstellation bestehend aus P(02) und B(01) zum Einsatz (siehe Kapitel 2.8.1).

Alle Messungen wurden getrennt für endokardiale und epikardiale Kardiomyozyten durchgeführt um auf eventuelle schichtspezifische Veränderungen eingehen zu können (siehe Kapitel 1.2.1). Im Folgenden sollen die einzelnen Versuchsbestandteile näher erläutert werden.

### 2.9.2 Untersuchung der spannungsabhängigen $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme

#### 2.9.2.1 Untersuchung der Zellkapazität

Zu Beginn eines jeden Experimentes (siehe Kapitel 2.9.1) wurde die Zellkapazität der zu untersuchenden Zellen bestimmt. Da sich eine Zellmembran beim Anlegen einer Spannung wie ein Kondensator verhält, der elektrisch aufgeladen werden kann, kann über die zu messende Kapazität auf die Zellgröße geschlossen werden. Dadurch konnte das Ausmaß der durch chronische Druckentlastung herbeigeführten Atrophie ermittelt werden. Des Weiteren konnten durch Bestimmung der Zellgröße die später im Versuchsprotokoll gemessenen Ströme auf die Zellgröße der untersuchten Kardiomyozyten normiert werden.

#### 2.9.2.2 Der Stromverlauf des $I_{\text{CaL}}$

Nach Untersuchung der Zellkapazität sollte zunächst der Stromverlauf des  $I_{\text{CaL}}$  über der Zellmembran bei bestimmten Membranpotentialen aufgezeichnet.

Durch Anlegen einer Spannung kommt es zu einer Abweichung des Membranpotential vom Ruhemembranpotential. Hierdurch kommt es zur Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle in der Zellmembran (siehe Kapitel 1.2.2). Neben dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal werden durch Potentialänderungen über der Zellmembran auch spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle aktiviert. Um den Stromverlauf des  $I_{\text{CaL}}$  aus dem Gesamtstrom bestehend aus  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen isolieren zu können mussten die Ströme durch die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle so effektiv wie möglich von den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen getrennt werden. Da die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Ströme bei positiveren Potentialen als -50mV keine Aktivität mehr zeigen, wurden diese durch einen im Pulsprotokoll festgelegten Vorpuls auf -50mV inaktiviert (siehe Abbildung 12). Der  $I_{\text{CaL}}$  wird durch diesen Vorpuls nicht beeinflusst, da dieser Strom erst eine Aktivität bei Potentialen positiver als -50mV zeigt. Die Unterdrückung der spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Ströme sollte durch die Zusammensetzung der Standardpipettenlösung (P-01) erreicht werden. Zum einen blockierte das in der Lösung P-01 befindliche TEA-Cl die spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle, zum anderen wurde diese Lösung als nominell

$K^+$ -freie Lösung mit  $Cs^+$ -Ionen als positive Ladungsträger hergestellt, für welche die  $K^+$ -Kanäle nicht permeabel sind. Durch diese beiden Modifikationen in der für diesen Versuchteil verwendeten Pipettenlösung waren weitgehend keine  $K^+$ -Ströme mehr messbar.

Die Messungen wurden ausgehend von einem dem Ruhemembranpotential entsprechenden Potential von  $-80mV$  durchgeführt. Zunächst wurde die Zelle zur Inaktivierung der spannungsabhängigen  $Na^+$ -Kanäle einem Vorpuls auf  $-50mV$  unterzogen. Nach diesem Vorpuls wurde die Zelle in  $10mV$  Schritten von  $-50mV$  bis  $+70mV$  für jeweils  $600ms$  depolarisiert (siehe Abbildung 11(A)). Aufgezeichnet wurden die auftretenden Stromverläufe des  $I_{CaL}$  bei dem jeweils angelegten Membranpotential. Eine dem Pulsprotokoll entsprechende repräsentative Stromkurve wird in Abbildung 12(B) gezeigt. Zur Bestimmung der Stromgröße wurden die bei einem Membranpotential maximal auftretenden Ströme verwendet. Diese wurden als Differenz zwischen dem Spitzenstrom und der Basislinie des Stromverlaufs der durchgeführten Messung bei dem jeweils angelegten Membranpotential definiert und durch die PULSE-Software (Heka Elektronik) auf einem Power Macintosh Computer (Apple Computers Inc.) berechnet.

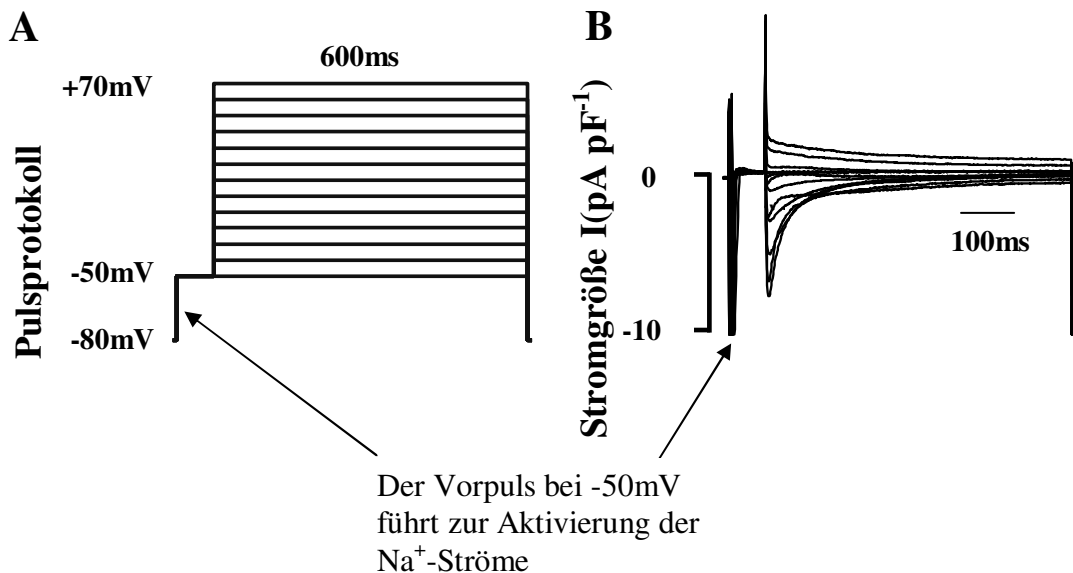


Abbildung 12: Versuchsprotokoll zur Messung des  $I_{CaL}$

- (A) Pulsprotokoll zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$
- (B) Typischer, aus dem Pulsprotokoll resultierender Stromverlauf



### 2.9.2.3 Die funktionelle Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$

Nach Aufzeichnung der Stromverläufe des  $I_{CaL}$  wurden die Kardiomyozyten auf die funktionelle Nachweisbarkeit eines weiteren  $Ca^{2+}$ -Stroms, des  $I_{CaT}$  durch den T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal, untersucht.

Dieser unter bestimmten Bedingungen an ventrikulären Kardiomyozyten exprimierte Kanal hat andere elektrophysiologische Eigenschaften als der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal, wodurch die beiden Kanäle im vorliegenden Experiment unterschieden werden konnten. Der T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal wird bereits bei negativeren Membranpotentialen von ca.  $-70mV$  aktiviert (siehe Kapitel 1.2.4.2). Somit ist die Anwesenheit des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals wahrscheinlich, wenn ein  $Ca^{2+}$ -Strom bei Potentialen unterhalb von  $-50mV$  auftritt. Deshalb mussten zur Untersuchung dieses Kanals die Messungen bei niedrigeren Membranpotentialen gestartet werden als die Messungen zur Bestimmung des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals. Aus diesem Grund konnte der Vorpuls auf  $-50mV$  nicht für die Inaktivierung der spannungsabhängigen  $Na^+$ -Kanäle verwendet werden. Um einen Stromfluss durch diese Kanäle dennoch inhibieren zu können wurde ein Austausch der Standardbadlösungen (B-01) gegen die NMDG-Lösung (B-02) durchgeführt. Diese Lösung war weitgehend  $Na^+$ -frei, wobei das Kation NMDG die positiven Ladungsträger extrazellulär ersetzte. Dieses organische Kation ist zu groß um durch die  $Na^+$ -Kanäle strömen zu können, wodurch ein  $Na^+$ -Strom nicht mehr registrierbar war. Die Standardpipettenlösung (P-01) verhinderte weiterhin eine Verfälschung der Ergebnisse durch spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme.

In dieser Lösungskonstellation wurde ein Pulsprotokoll verwendet, das die Zelle ausgehend von  $-80mV$  in  $10mV$  Schritten, die  $600ms$  andauerten, bis  $+70mV$  depolarisierte (siehe Abbildung 13(A)). Bei jedem angelegten Membranpotential wurde der Verlauf der auftretenden Ströme aufgezeichnet, die unter Abbildung 13(B) als repräsentatives Beispiel einer aus diesem Pulsprotokoll resultierenden Stromkurve zu sehen sind. Zur Auswertung wurde wiederum die Differenz zwischen dem Spitzenstrom und der Basislinie bei den jeweils angelegten Membranpotentialen verwendet.

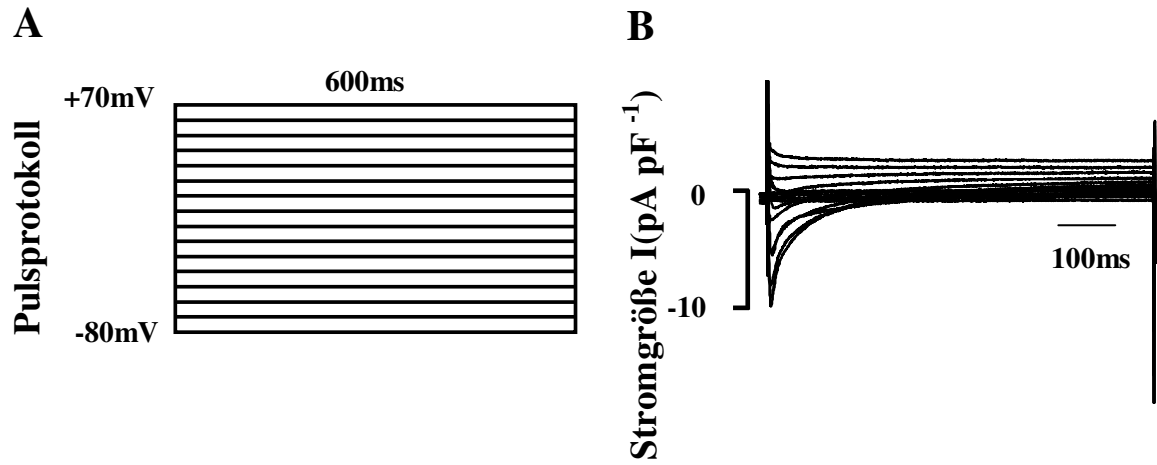


Abbildung 13: **Versuchsprotokoll zur funktionellen Nachweisbarkeit des  $I_{CaT}$**

- (A) Pulsprotokoll zur Identifizierung aller  $Ca^{2+}$ -permeablen Kanäle
- (B) Typischer, aus dem Pulsprotokoll resultierender Stromverlauf

### 2.9.2.4 Kinetik des $I_{CaL}$

Die kinetischen Eigenschaften des durch einen Kanal fließenden Stroms sind spezifisch für eine ganz bestimmte Proteinkonstellation des betreffenden Kanals. Veränderungen der Kinetik können somit auf eine Veränderung auf Proteinebene der Kanäle hinweisen. Des Weiteren beeinflussen Veränderungen der kinetischen Eigenschaften des  $I_{CaL}$  die Funktion des Kanals, was beispielsweise Auswirkungen auf die Form der APs haben könnte. Um dies zu beurteilen wurden die kinetischen Eigenschaften des  $I_{CaL}$  untersucht. Alle Versuche zur Bestimmung der kinetischen Eigenschaften des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals wurden in der Spannungsklemme mit einer Lösungskonstellation aus P-01 und B-02 durchgeführt.

#### 2.9.2.4.1 Die Inaktivierungszeitkonstanten des $I_{CaL}$

Die Stromverläufe des  $I_{CaL}$  bei bestimmten Membranpotentialen werden während einer definierten Zeitspanne inaktiviert. Der Verlauf dieser Inaktivierung lässt sich mittels einer biexponentiellen Funktion, deren Zeitkonstanten als  $\tau_1$  und  $\tau_2$  bezeichnet werden, beschreiben (siehe Abbildung 14). Für die Bestimmung dieser Zeitkonstanten wurden die Stromkurven des zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$  verwendeten Pulsprotokolls herangezogen (siehe Kapitel 2.9.2.2). Die einzelnen Inaktivierungskonstanten wurden für jede angelegte Membranspannung durch die PULSE-Software (Heka Elektronik) auf einem Power Macintosh Computer (Apple Computers Inc.) aus den Stromverläufen der Messungen zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$  (siehe Kapitel 2.9.2.2) berechnet.

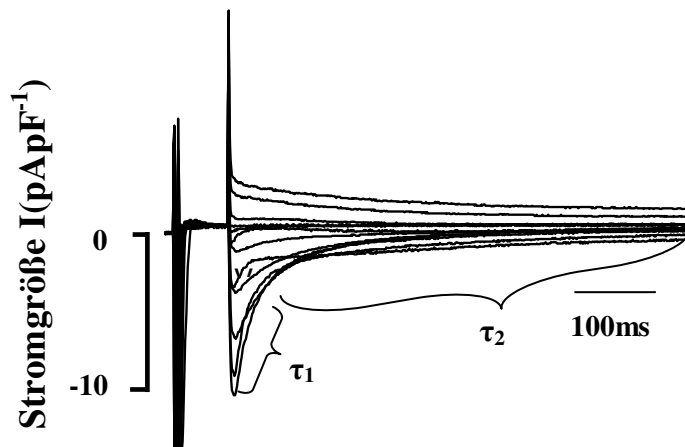


Abbildung 14: Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  der Inaktivierung

Biexponentielle Beschreibung der Inaktivierung der Stromverläufe des  $I_{CaL}$  bei den unter Kapitel 2.9.2.2 beschriebenen Pulsprotokoll gemessenen Stromkurven.

#### 2.9.2.4.2 Die Aktivierung des $I_{CaL}$

Mit zunehmender Depolarisation der Zellmembran kommt es zu einer steigenden Öffnungswahrscheinlichkeit, also Aktivierung der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Hierdurch nimmt die Leitfähigkeit der Plasmamembran für  $Ca^{2+}$ -Ionen zu. Zur Bestimmung der Aktivierung der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle wurden wiederum die Stromkurven zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$  aus dem unter Kapitel 2.9.2.2 beschriebenen Pulsprotokoll verwendet. Hierbei wurden die maximal fließenden Ströme bei einem bestimmten Membranpotential wie bereits beschrieben durch Subtraktion der Basislinie von dem Spitzenstrom bestimmt. Nach dem *Ohm'schen* Gesetz  $R=U/I$  wurden die Widerstände der einzelnen Stromkurven bestimmt und aus dem Kehrwert  $1/R$  die Leitfähigkeit errechnet. So erhielt man einen Wert für die Leitfähigkeit für die einzelnen Stromkurven bei den jeweils angelegten Membranspannungen. Dies gab Auskunft über die Leitfähigkeit der Plasmamembran der Kardiomyozyten für  $Ca^{2+}$ -Ionen bei bestimmten Membranpotentialen.

### 2.9.2.4.3 Die *steady-state* Inaktivierung

Die *steady-state* Inaktivierung beschreibt die Stromgröße des  $I_{CaL}$  bei maximaler Aktivierung (0mV) nach einem im Pulsprotokoll festgelegt großen Vorpuls. Durch das Pulsprotokoll wurde die Zelle für 600ms auf einen Vorpuls in 10 mV Schritten aufwärts zwischen -80mV und +70mV geklemmt und anschließend wurde das Potential angelegt, bei dem der  $I_{CaL}$  unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen maximal aktiv ist, nämlich bei einer Membranspannung von 0mV. Auf dieses Potential wurde die Zelle ebenfalls für 600ms geklemmt (siehe Abbildung 15(A)). Von Interesse war die Stromgröße, die nach den definierten Vorpulsen durch maximale Aktivierung des  $I_{CaL}$  wieder induziert werden konnte. Die bei den jeweiligen Membranpotentialen induzierbaren Stromgrößen wurden wiederum durch die Differenz zwischen Spitzenstrom und Basislinie bestimmt. Eine repräsentative, aus diesem Pulsprotokoll entstandene Stromkurve ist in Abbildung 15(B) dargestellt.

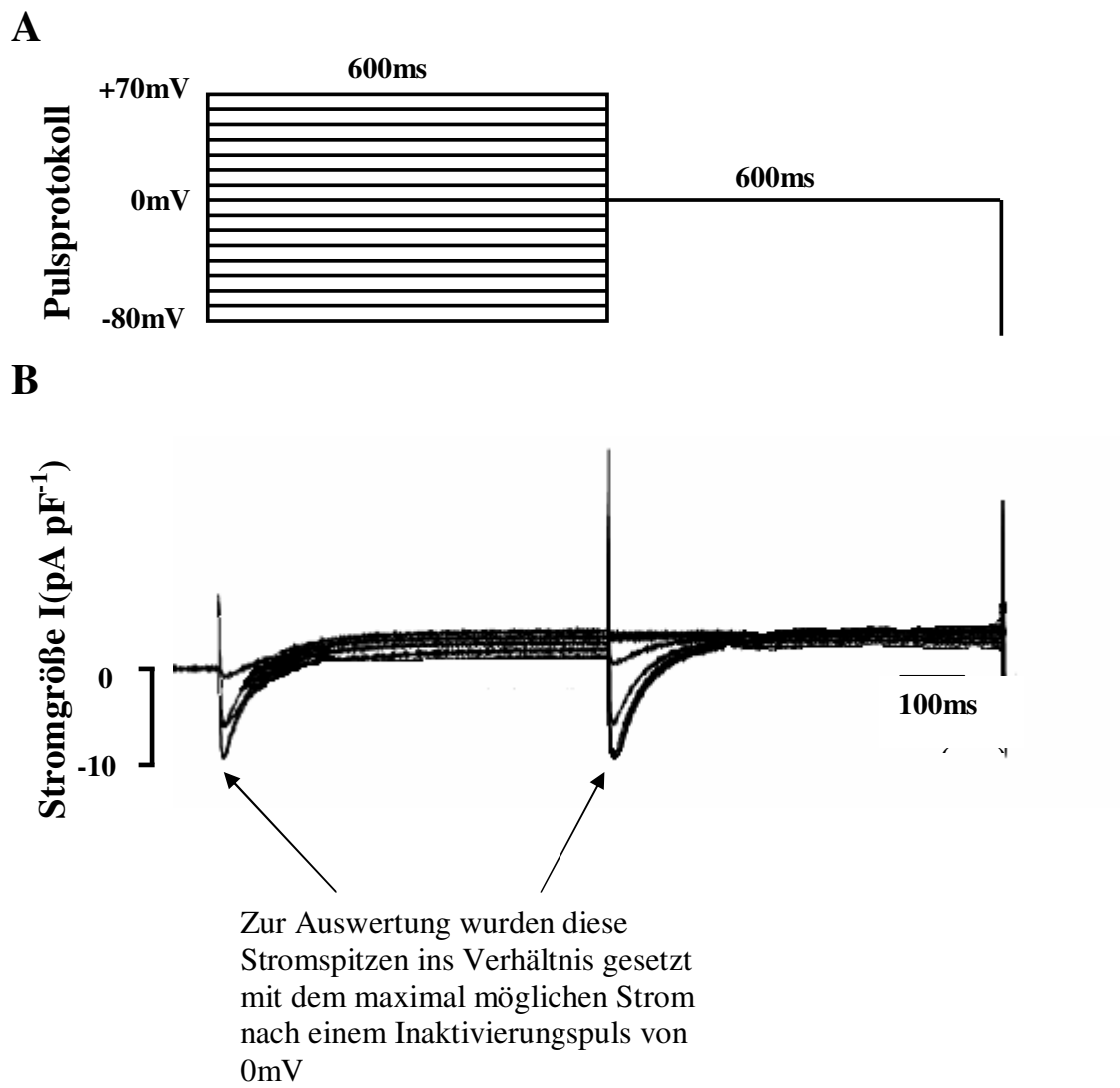


Abbildung 15: **Versuchsprotokoll zur Bestimmung der *steady-state* Inaktivierung**

(A): *Pulsprotokoll* zur Bestimmung der *steady-state* Inaktivierung

(B): Typischer, aus dem Pulsprotokoll resultierender Stromverlauf

### 2.9.2.4.4 Die zeitliche Erholung des $I_{CaL}$ von einem Inaktivierungspuls

Eine weitere wichtige kinetische Eigenschaft betraf den Zeitverlauf der Erholung des  $I_{CaL}$  nach maximaler Aktivität. Hier wurde der Zeitpunkt bestimmt an welchem der Strom nach einer maximalen Aktivierung erneut zu einer maximalen Aktivität fähig war.

Die Zelle wurde zur maximalen Aktivierung des  $I_{CaL}$  auf 0mV geklemmt. In exponentiell steigenden Zeitintervallen zwischen 5 und 1500ms nach dem ersten Puls wurde erneut diese Spannung an der Zelle angelegt (siehe Abbildung 16(A)) und der Strom, der nach diesem Zeitintervall wieder fließen konnte, gemessen. Zur Bestimmung der Stromgröße wurde wiederum die Differenz zwischen Spitzenstrom und Basislinie jeder einzelnen Stromkurve bestimmt. Eine Stromkurve, die aus diesem Pulsprotokoll entstanden ist, wird in Abbildung 16(B) dargestellt.

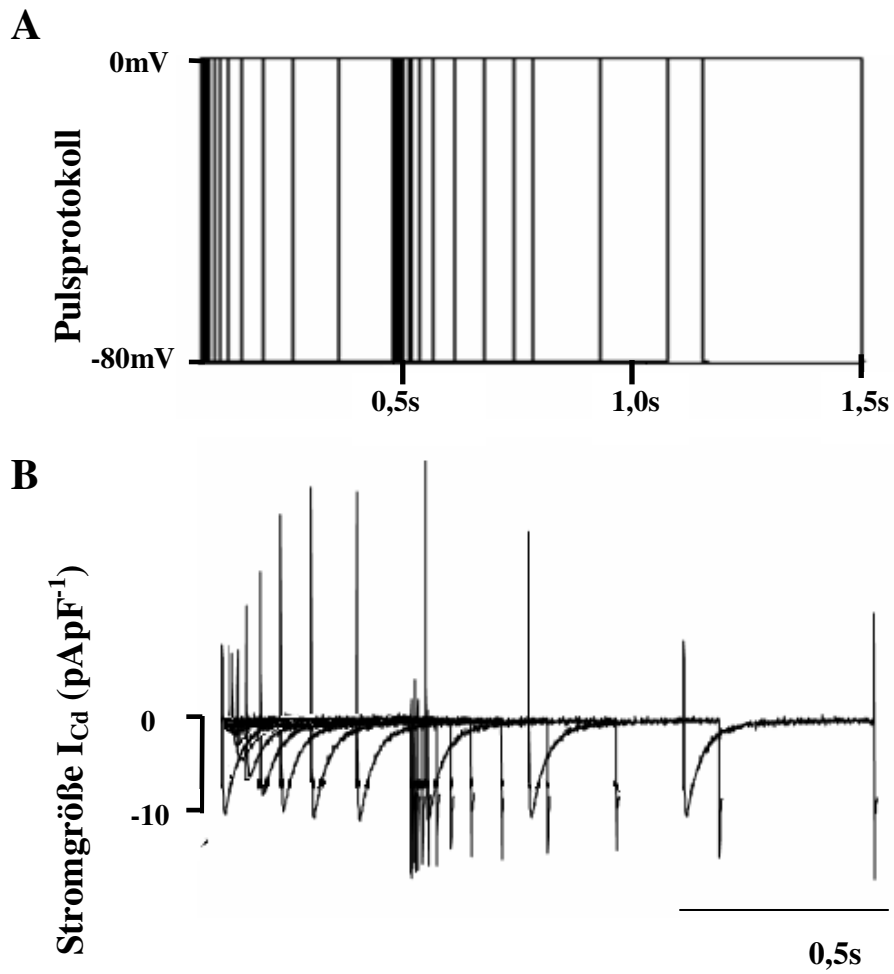


Abbildung 16: **Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Erholung von einem Vorpuls**

- (A): Pulsprotokoll zur Bestimmung der Erholung von einem Vorpuls
- (B): aus dem Pulsprotokoll resultierende, repräsentative Stromkurve



### 2.9.3 Der AP-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom

Im zweiten Versuchsteil sollte die Größe des während eines APs in die Zelle gelangenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms bestimmt werden.

Nach Herstellung eines *GΩ-Seals*, Erreichen der Ganzzelleableitung und Bestimmung der Zellkapazität (siehe Kapitel 2.9.1) in der Spannungsklemme wurde zunächst in die Konfiguration der Stromklemme umgeschaltet. In dieser Konfiguration konnte der Spannungsverlauf eines APs aufgezeichnet und dessen Ruhemembranpotential und Länge bestimmt werden. Des Weiteren konnte der Depolarisationsüberschuss der APs ermittelt werden, der sich aus dem Spannungswert oberhalb von 0mV ergab (siehe Abbildung 15(A)).

Nach Speicherung eines durch diese Messung gewonnenen APs wurde in die Konfiguration der Spannungsklemme umgeschaltet und die Zellen auf den vorher bestimmten und gespeicherten Spannungsverlauf ihres eigenen APs geklemmt und der hier auftretende Gesamtstrom bestehend aus  $\text{K}^+$ -,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -Strömen bestimmt.

Die Lösungen zur Bestimmung des Spannungsverlaufs der APs sollten möglichst physiologischen Bedingungen entsprechen. Aus diesem Grund wurden als Badlösung die Standardbadlösung (B-01) verwendet und die Pipetten im Unterschied zum ersten Versuchsteil mit  $\text{K}^+$ -Glutamatlösung (P-02) gefüllt. Die für die Bestimmung des hier gesuchten Parameters benötigte Pipettenlösung P(02) stellte den Grund dafür dar, weshalb sich Versuchsteil (1) und (2) nicht verbinden ließen, da sich die Pipettenlösungen nach Herstellung eines *GΩ-Seals* nicht austauschen lassen und da die Bestimmung der gesuchten Parameter im ersten Versuchsteil Pipettenlösung P(01) forderte.

Um nun den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des APs aus dem Gesamtstrom isolieren zu können wurde die Badlösung gegen eine  $300\mu\text{m}$   $\text{Cd}^{2+}$  enthaltende Standardlösung (B-01+ $300\mu\text{m}$   $\text{Cd}^{2+}$ ) ausgetauscht.  $\text{Cd}^{2+}$  diente hierbei als Blocker der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass es zu einem weitgehenden Sistieren des Stroms durch diese Kanäle kam. Nach erneutem Auslösen eines APs flossen also alle nicht blockierten Ströme über die Zellmembran, außer dem blockierten  $I_{\text{CaL}}$ .

Zur Bestimmung des  $I_{\text{CaL}}$  wurde zunächst die Größe des Gesamtstroms bestehend aus  $\text{K}^+$ -,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -Strömen von der Software IGOR als Integral des Stromverlaufs

während des APs berechnet. Nach Blockade der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mit  $\text{Cd}^{2+}$  wurde die Größe der Restströme von der Software IGOR ebenfalls als Integral des Stromverlaufs bestimmt. Durch Subtraktion der Integralflächen des während des APs fließenden Gesamtstroms und der nach Exposition mit  $\text{Cd}^{2+}$  fließenden Restströme durch die Software IGOR erhielt man die Gesamtmenge der  $\text{Cd}^{2+}$ -sensitiven Ströme, die weitgehend dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des APs entsprachen. Die Subtraktion der Integralflächen ergab die unter Abbildung 17(B) dargestellte Kurve, deren Integral wiederum die Größe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms während des APs beschrieb.

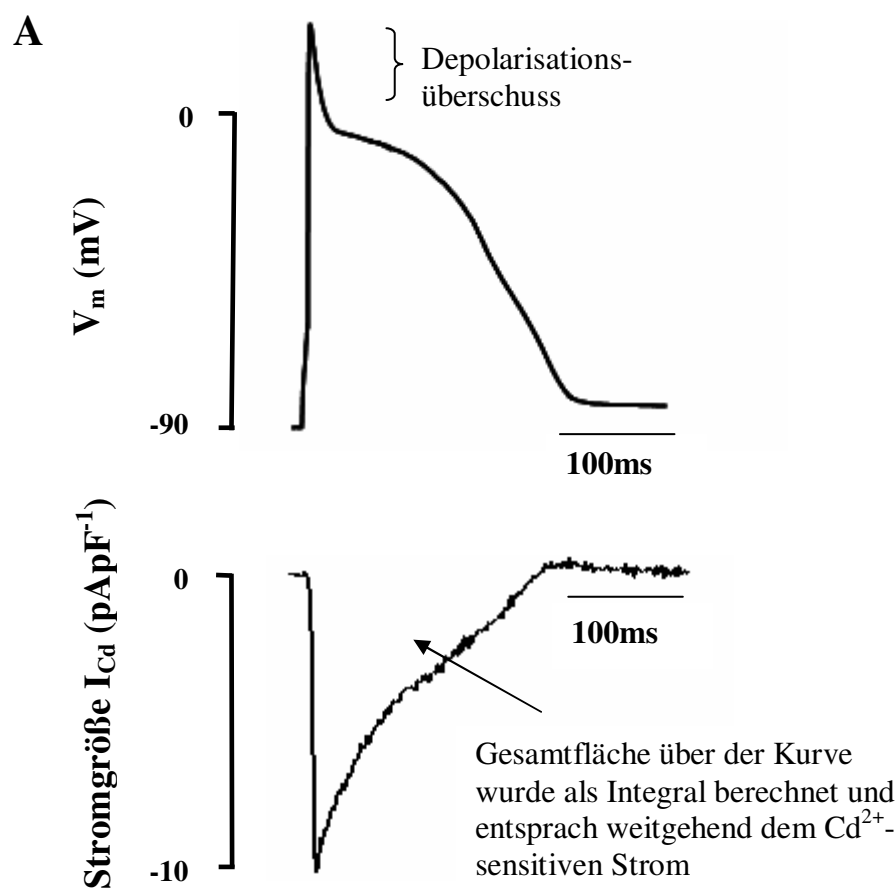


Abbildung 17: **Protokoll zur Bestimmung des AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms**

- (A): typisches AP in der Stromklemme
- (B): Verlauf des  $\text{Cd}^{2+}$ -sensitiven Stroms; das Integral dieser Stromverlaufskurve ergibt die Größe des während des APs in die Zelle gelangenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Einfluss der hHTX auf das linksventrikuläre Myokard der Ratte**

##### **3.1.1 Veränderung der linksventrikulären Masse**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur experimentellen Nachstellung einer Druckentlastung des linken Ventrikels die unter 2.1 beschriebene hHTX nach Ono & Lindsey durchgeführt. Um die Auswirkungen der durch die Operation herbeigeführten Druckentlastung auf die kardiale Masse bestimmen zu können wurde 13 Tage nach dem Eingriff eine 2D-Echokardiographie durchgeführt und mit Hilfe der so gewonnenen Daten die linksventrikuläre Masse bestimmt (siehe Kapitel 2.3).

Es wurde die linksventrikuläre Masse von 7 transplantierten Herzen mit der Masse von 11 nativen Herzen als Kontrollgruppe verglichen. Hierbei lag das linksventrikuläre Gewicht der Kontrollgruppe bei  $580 \pm 50$ mg, wohingegen die Masse der entlasteten linken Ventrikel beinahe eine Halbierung des Gewichts auf  $260 \pm 50$ mg zeigte (siehe Abbildung 18). Daraus lässt sich schließen, dass es durch hämodynamische Entlastung des linken Ventrikels für 14 Tage durch eine hHTX zu einer Reduktion der Gesamtmasse des linksventrikulären Herzmuskelgewebes kommt ( $p < 0.001$ ; \*\*\*).

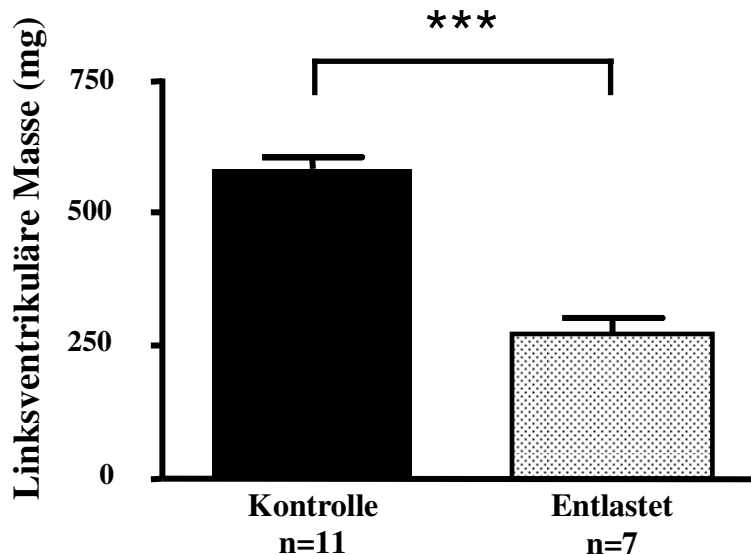


Abbildung 18: Linksventrikuläre Masse

*Reduktion der linksventrikulären Masse durch 14-tägige Druckentlastung des linken Ventrikels; geometrische Parameter des linken Ventrikels bestimmt durch Echokardiographie und anschließender mathematischer Berechnung nach Collins et al. 2001 (siehe Kapitel 2.5)*

### 3.1.2 Veränderung der Herzfrequenz

Neben der Bestimmung der linksventrikulären Masse konnte direkt durch die echokardiographische Untersuchung die Herzfrequenz ermittelt werden. Vergleich man die Frequenz von 7 entlasteten Herzen mit der Frequenz von 11 nativen Herzen der Kontrollgruppe, zeigte sich eine Reduktion der Herzfrequenz von  $377 \pm 8$  bpm der nativen Herzen der Kontrollgruppe auf  $191 \pm 10$  bpm der transplantierten Herzen der Versuchsgruppe. So zeigten die transplantierten Herzen eine signifikante Reduktion der Herzfrequenz ( $p < 0.001$ ; \*\*\*).

### 3.1.3 Veränderung der Zellkapazität

Ein Grund für die Reduktion der kardialen Masse durch chronische hämodynamische Druckentlastung stellt die Reduktion der Zellgröße der einzelnen Kardiomyozyten dar [Korecky & Rakusan 1983]. Da eine Verringerung der Zellkapazität einen Einfluss auf die anschließend gemessenen Ströme hat, wurde die Zellkapazität der untersuchten Zellen bestimmt. Dabei zeigten die entlasteten Kardiomyozyten eine signifikant kleinere Kapazität ( $117 \pm 3 \text{ pF}$ ;  $n=59$ ) als die Kardiomyozyten der nativen Herzen aus der Kontrollgruppe ( $174 \pm 17 \text{ pF}$ ;  $n=76$ ) ( $p < 0.001$ ; \*\*\*). Dies deutet darauf hin, dass es in den hier durchgeführten Versuchen durch chronische Druckentlastung zu einer zellulären Atrophie gekommen ist. Allerdings zeigte sich bei Auftrennung der Versuchsgruppe in endokardiale und epikardiale Schichten nur in den endokardialen Schichten eine signifikante Reduktion der Zellkapazität, wohingegen in den epikardialen Schichten diese weitgehend unverändert blieb.

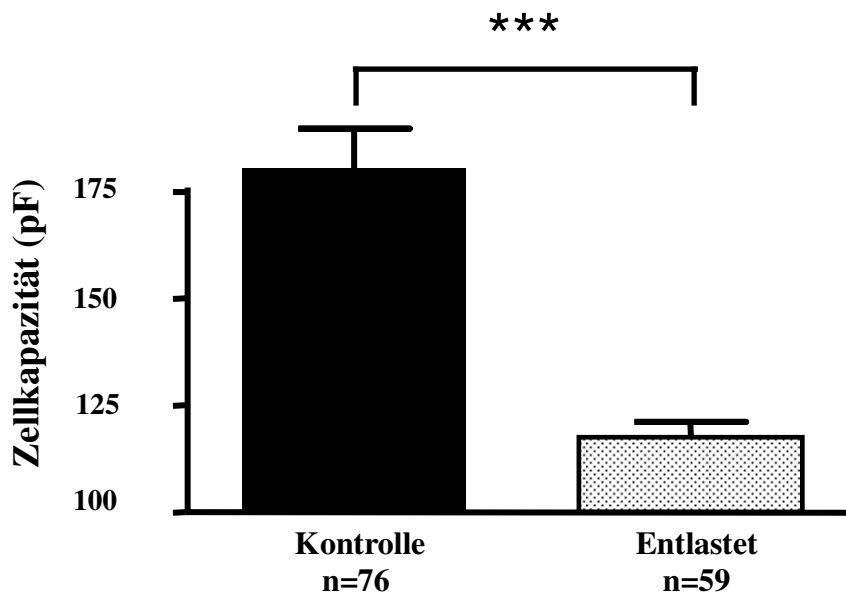


Abbildung 19: **Bestimmung der Zellkapazität**

*Reduktion der Zellkapazität linksventrikulärer Kardiomyozyten durch chronische Druckentlastung*

### 3.2 Einfluss der hHTX auf die Stromdichte des $I_{CaL}$

Zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$  wurden die aus dem unter Kapitel 2.9.2.2 beschriebenen Pulsprotokoll resultierenden Stromverläufe verwendet. Die bei den einzelnen Membranpotentialen maximal fließenden Ströme wurden bestimmt durch Bildung der Differenz zwischen dem Spitzenstrom und der Basislinie der einzelnen Stromkurven bei den entsprechenden Membranpotentialen. Die so berechneten Stromwerte wurden gegen die jeweils angelegte Membranspannung graphisch aufgetragen. So erhielt man eine Strom-Spannungskurve.

Die aus den hier durchgeführten Messungen resultierende Strom-Spannungskurve des  $I_{CaL}$  zeigten die für diesen Strom unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen charakteristische Glockenform mit einem Aktivierungspotential bei ca.  $-40\text{mV}$ , einer maximalen Stromdichte bei  $0\text{mV}$  und einem Umkehrpotential bei ca.  $+50\text{mV}$ . Die Ströme wurden als relative Ströme in Bezug auf die Zellkapazität aufgezeichnet, d.h. in  $\text{pA/pF}$ , wobei sich kein Unterschied der Strom-Spannungskurven in den endokardialen und epikardialen Schichten innerhalb einer Versuchsgruppe zeigte. Beim Vergleich der Strom-Spannungskurven der nativen Kardiomyozyten aus der Kontrollgruppe mit denen der entlasteten Kardiomyozyten ließ sich allerdings bei den chronisch entlasteten Kardiomyozyten in beiden Schichten ein signifikanter Anstieg des relativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms  $I_{CaL}$  feststellen. Die Stromverläufe und Strom-Spannungskurven der einzelnen Messungen der jeweiligen Versuchsgruppen sind für die untersuchten endokardialen und epikardialen Schichten in Abbildung 20 dargestellt.

Bei einem Membranpotential von  $0\text{mV}$  stieg der  $I_{CaL}$  in den endokardialen Schichten von  $-9.0 \pm 0.7 \text{pA/pF}$  ( $n=13$ ) auf  $-13.8 \pm 1.3 \text{pA/pF}$  ( $n=17$ ;  $p < 0.01$ ; \*\*). Epikardial ließ sich bei einem Membranpotential von  $0\text{mV}$  ein Anstieg von  $-9.5 \pm 0.7 \text{pA/pF}$  ( $n=26$ ) auf  $-15.3 \pm 0.8 \text{pA/pF}$  ( $n=21$ ;  $p < 0.001$ ; \*\*\*) verzeichnen.

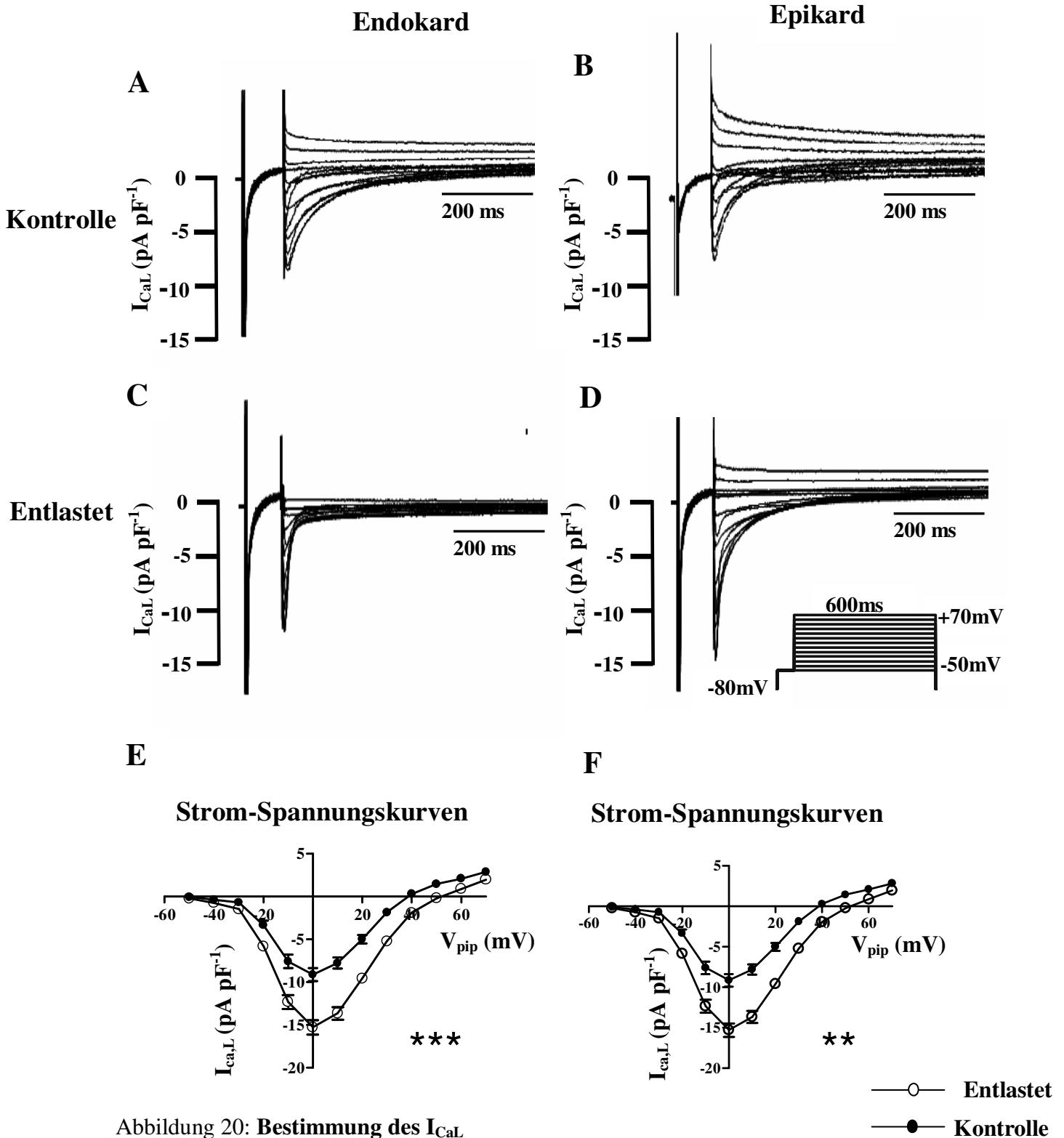


Abbildung 20: Bestimmung des  $I_{CaL}$

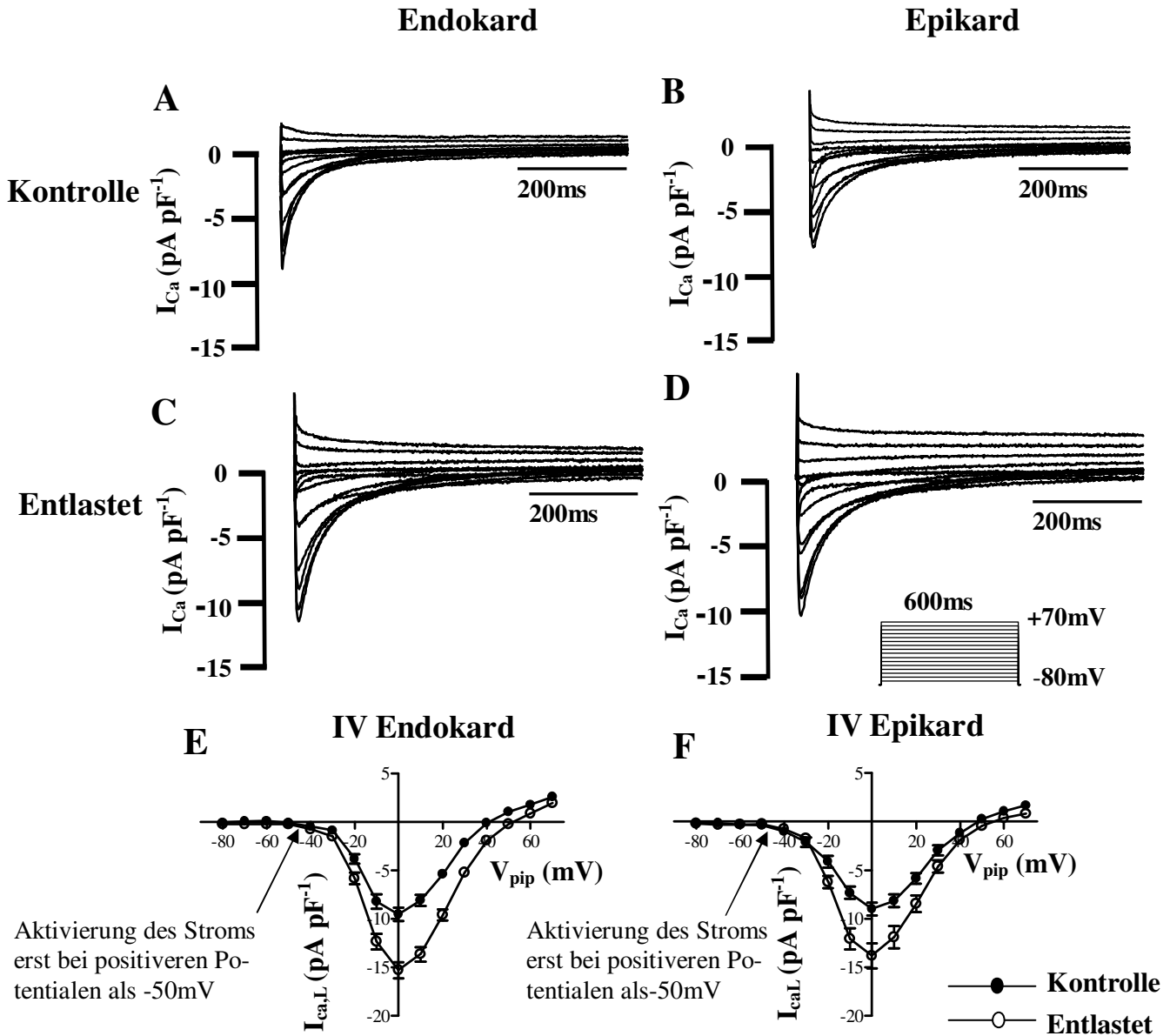
Durch chronische Druckentlastung des linken Ventrikels kam es zu einer *Steigerung der Dichte des  $I_{CaL}$*  der linksventrikulären Kardiomyozyten. Die Messungen wurden in der Lösungskombination aus B-01 und P-01 (siehe Tabelle 5,6) und mit Hilfe des unter 2.9.2.2 beschriebenen Pulsprotokolls durchgeführt.

(A-D) repräsentativer Stromverlauf während der Messungen  
(E-F) Strom-Spannungskurven aus allen Experimenten

### 3.3 Funktionelle Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$ nach hHTX

Dem Versuchsprotokoll folgend wurden die hämodynamisch entlasteten Kardiomyozyten als nächstes auf die funktionelle Nachweisbarkeit des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals überprüft. Hierzu wurden die Stromverläufe der unter 2.9.2.3 beschriebenen Pulsprotokolle verwendet. Durch Bildung der Differenz zwischen Spitzenstrom und Basislinie der Stromverläufe bei den einzelnen Membranpotentialen erhielt man die Stromgrößen, die graphisch gegen die angelegte Membranspannung aufgetragen wurden. Die so erhaltenen Strom-Spannungskurven ermöglichten die eventuelle Identifikation des  $I_{CaT}$  neben dem  $I_{CaL}$  aufgrund der unterschiedlichen Aktivierungspotentiale dieser beiden  $Ca^{2+}$ -permeablen Kanäle. Da der T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal bereits bei Membranpotentialen unterhalb von  $-50mV$  aktiv ist, kommt es bei Anwesenheit des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals, im Unterscheid zur bloßen Anwesenheit des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals, zu einer Aktivierung der Ströme bei Membranspannungen unter  $-50mV$ . Die aus den hier aufgezeichneten Stromverläufen resultierenden Strom-Spannungskurven zeigten jedoch sowohl bei der Kontrollgruppe der nativen Kardiomyozyten, bestehend aus 15 epikardialen und 10 endokardialen Zellen, als auch bei der Gruppe der durch hHTX hämodynamisch entlasteten Kardiomyozyten mit 19 epikardialen und 13 endokardialen Zellen keine Aktivierung der Ströme bei Membranpotentialen unterhalb von  $-50mV$  (siehe Abbildung 21). Hierdurch ist eine Anwesenheit des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals in beiden Versuchsgruppen auszuschließen.



Abbildung 21: Funktionelle Nachweisbarkeit des  $I_{CaT}$ 

Durch hämodynamische Druckentlastung des linken Ventrikels ließ sich *keine Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Ströme unterhalb von -50mV* erkennen. Dies schließt die Anwesenheit des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals an hämodynamisch druckentlasteten Kardiomyozyten aus.

Die Messungen wurden in der Lösungskombination aus B-02 und P-01 (siehe Tabelle 2, 3) und mit Hilfe des unter 2.9.2.3 beschriebenen Pulsprotokolls durchgeführt.

(A-D) Stromverlauf während der Messungen

(E-F) Strom-Spannungskurven aus allen Experimenten

Auch beim Vergleich der Strom-Spannungskurven der entlasteten Kardiomyozyten aus dem Pulsprotokoll zur Bestimmung der Stromgröße des  $I_{CaL}$  (siehe Kapitel 3.2) mit den hier aufgezeichneten Strom-Spannungskurven der entlasteten Kardiomyozyten zeigte sich nahezu kein Unterschied (siehe Abbildung 22). Beim Übereinanderlegen der beiden Kurven stellten sich beide Kurven als größtenteils deckungsgleich dar, der durch die PULSE-Software berechnete Subtraktionsstrom zeigte keinerlei statistische Signifikanz. Hieraus lässt sich schließen, dass die Strom-Spannungskurven der entlasteten Kardiomyozyten aus den beiden unter 2.9.2.2 und 2.9.2.3 beschriebenen Pulsprotokollen denselben Strom, nämlich den  $I_{CaL}$ , beschreiben und ein  $I_{CaT}$  unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen nicht nachzuweisen ist.

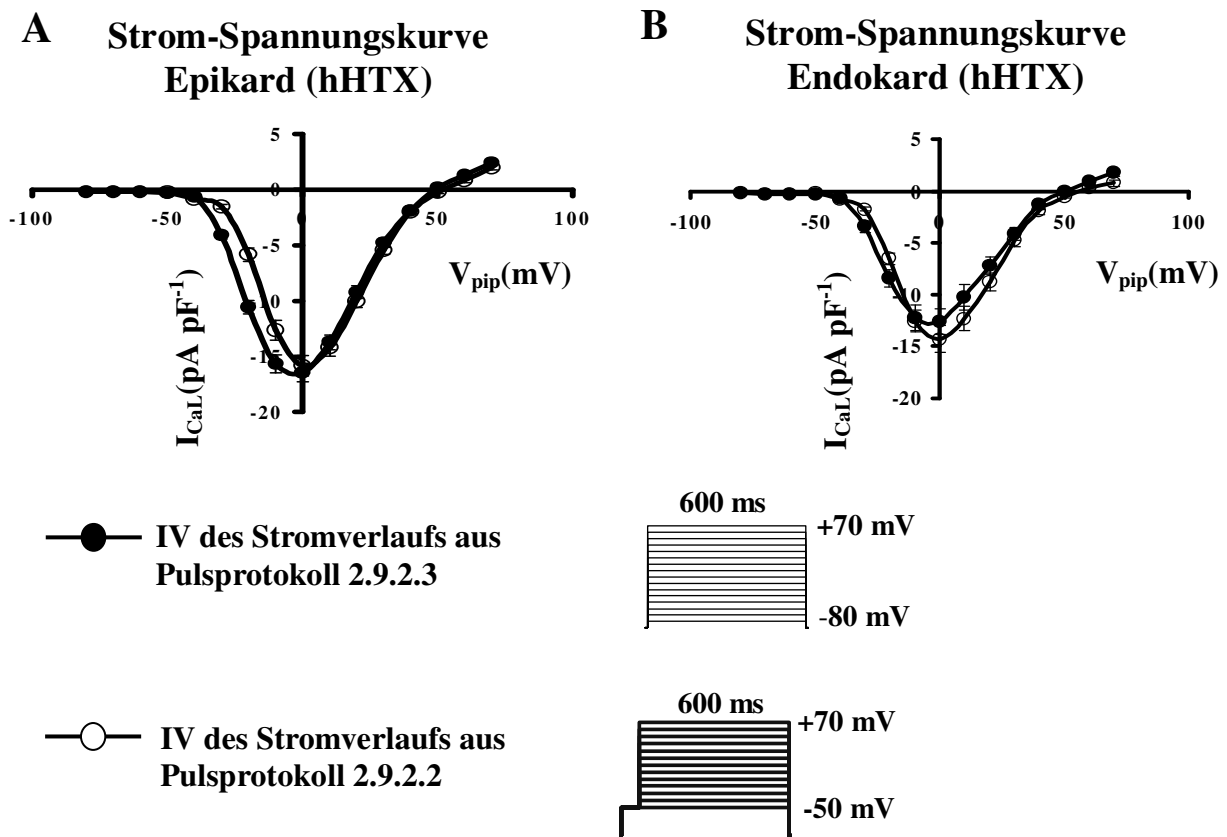


Abbildung 22: Vergleich der aus den Pulsprotokollen 2.9.2.2 und 2.9.2.3 resultierenden Strom-Spannungskurven der entlasteten Kardiomyozyten

Die beiden Kurven zeigen sich als nahezu deckungsgleich.

(A) *Epikard*

(B) *Endokard*

### 3.4 Einfluss der hHTX auf die kinetische Eigenschaften des $I_{CaL}$

Zur näheren Charakterisierung des  $I_{CaL}$  an hämodynamisch druckentlasteten Kardiomyozyten wurden die kinetischen Eigenschaften des  $I_{CaL}$  untersucht. Hierdurch sollte eingeschätzt werden können, inwieweit eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften die Zunahme des  $I_{CaL}$  durch chronische Druckentlastung erklären kann.

#### 3.4.1 Die Inaktivierung des $I_{CaL}$

Nach der wie in Kapitel 2.9.2.4.1 beschriebenen Berechnung der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  aus den Stromverläufen zur Bestimmung der Stromdichte des  $I_{CaL}$ , wurden diese beiden Konstanten gegen die jeweiligen Membranspannungen graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 23).

Es wurden die Daten von 13 endokardialen und 26 epikardialen Zellen aus der Kontrollgruppe mit 17 endokardialen und 21 epikardialen Zellen der entlasteten Kardiomyozyten für die statistische Auswertung und graphische Darstellung verwendet. Die statistische Auswertung der einzelnen Inaktivierungskonstanten zeigte keinerlei Signifikanz.

Um die biexponentielle Funktion der Inaktivierung des  $I_{CaL}$  genau definieren zu können, wurden die Anteile der beiden durch die Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  beschriebenen Funktionen am Vorgang der Gesamtinaktivierung berechnet.

Der in Abbildung 24 dargestellte Anteil der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  zeigte bei den getesteten Membranpotentialen keine signifikanten Veränderungen beim Vergleich von 13 endokardialen und 26 epikardialen Zellen der Kontrollgruppe mit den 17 endokardialen und 21 epikardialen Zellen der entlasteten Herzen. Somit bleibt der Anteil der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  an der Gesamtinaktivierung konstant.

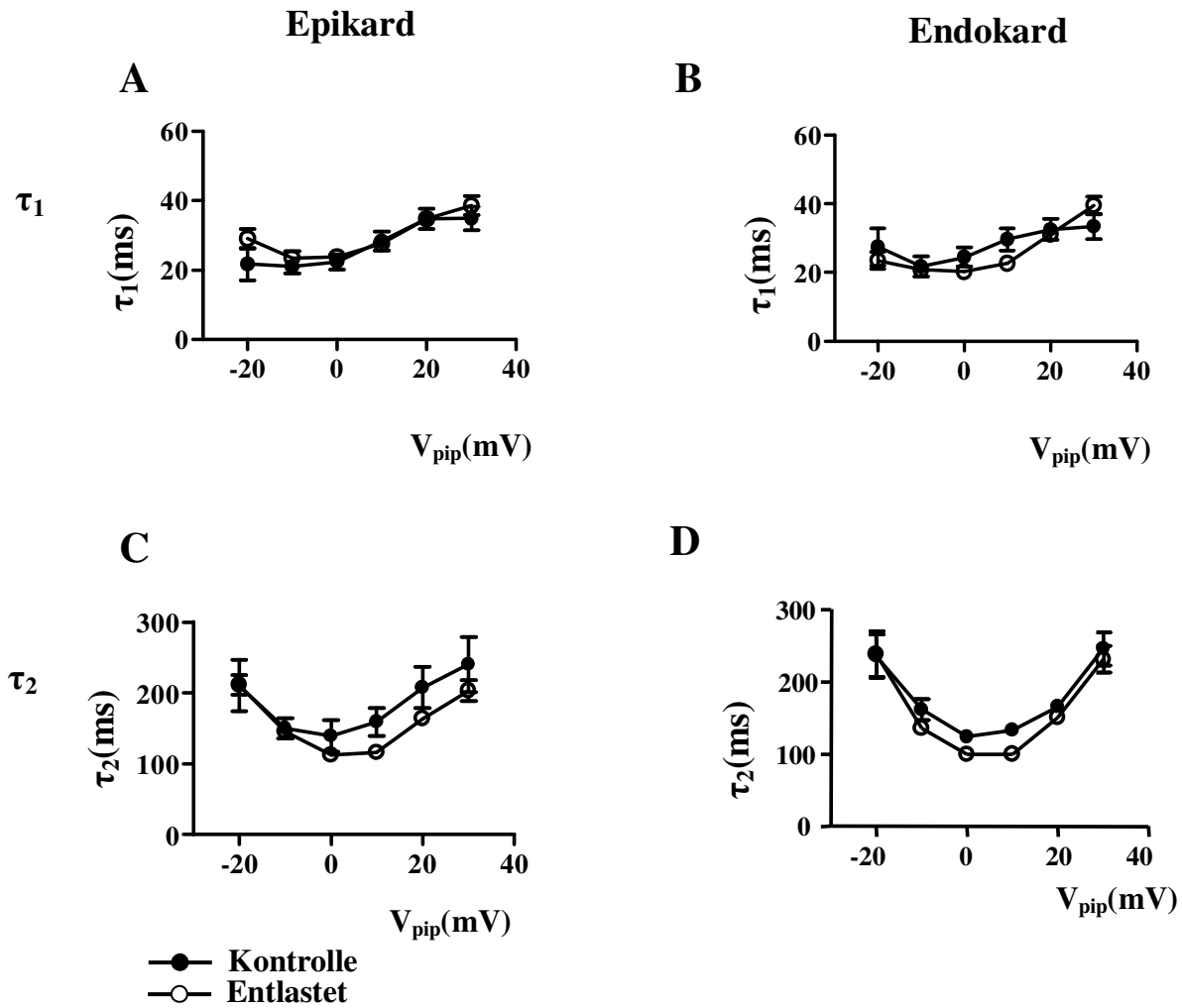


Abbildung 23: Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  des  $I_{CaL}$  unter chronischer Druckentlastung

Der Verlauf der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  zeigte durch chronische Druckentlastung des linken Ventrikels *keine statistisch signifikanten Unterschiede*.

(A)  $\tau_1$  Epikard

(B)  $\tau_1$  Endokard

(C)  $\tau_2$  Epikard

(D)  $\tau_2$  Endokard

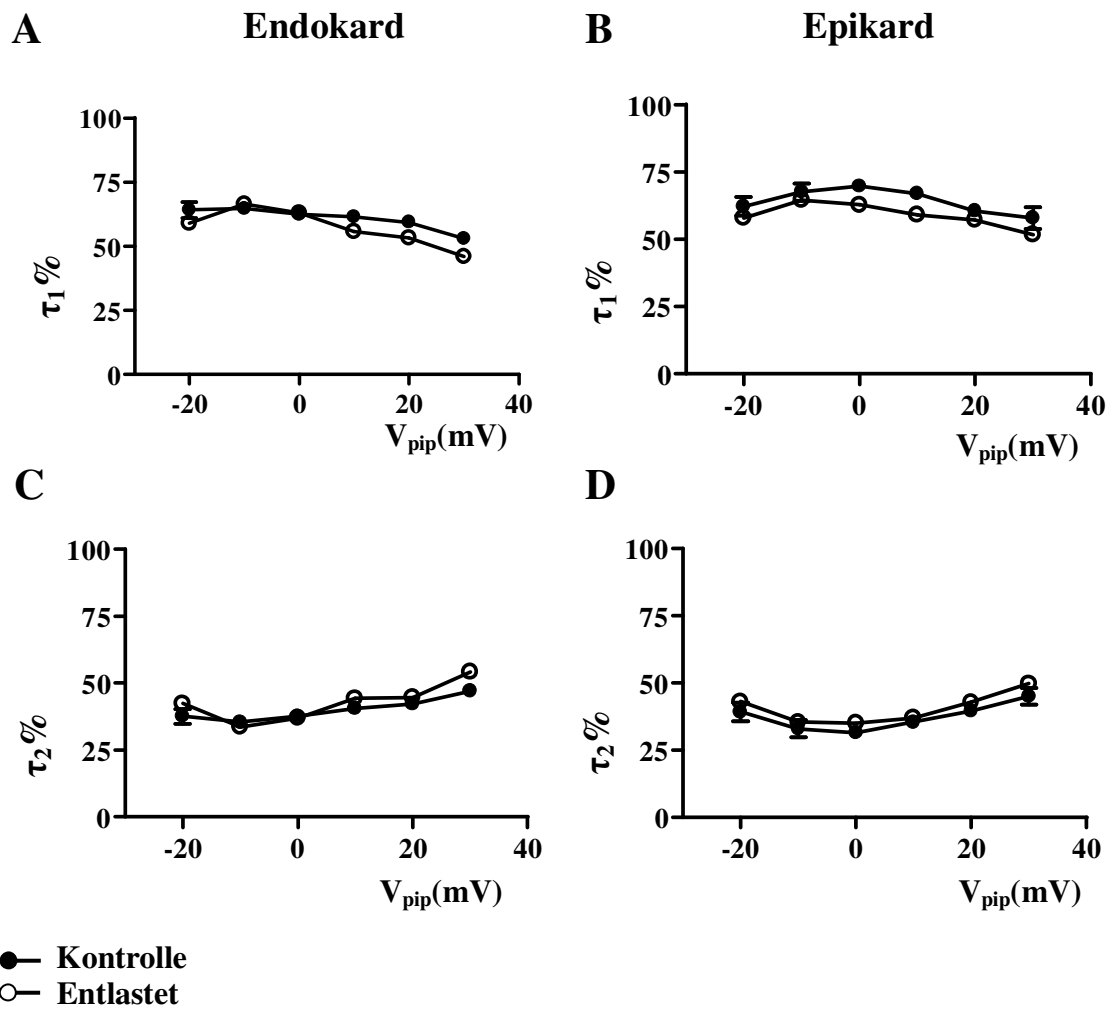


Abbildung 24: Anteil der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  an der Inaktivierungszeit

Es zeigten sich in beiden Schichten *keine statistisch signifikanten Veränderungen am Anteil* der Inaktivierungskonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  an der Gesamtinaktivierungszeit.

(A) und (C) Endokard  $\tau_1$ % und  $\tau_2$ %

(B) und (D) Epikard  $\tau_1$ % und  $\tau_2$ %

### 3.4.2 Die Aktivierung des $I_{CaL}$

Wie in Kapitel 2.9.2.4.2 beschrieben wurden die Leitfähigkeiten der Plasmamembran der Kardiomyozyten für  $Ca^{2+}$ -Ionen bei den einzelnen Membranpotentialen errechnet. Diese Werte wurden ins Verhältnis zum Wert der maximalen Leitfähigkeit ( $g/g_{max}$ ) gesetzt, der sich aus der Stromkurve bei 0mV bestimmen ließ. Aus diesen Werten konnte mittels Boltzmannanpassung mit Hilfe der Software PRISM eine Kurve erstellt werden, durch die Rückschluss auf die Aktivierung der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle gezogen werden konnte. Diese Aktivierungskurven sind in Abbildung 25 gezeigt.

Hierbei war von besonderem Interesse der Wert der halbmaximalen Aktivierung  $A_{0,5}$ , d.h. die Spannung bei der eine halbmaximale Leitfähigkeit der Plasmamembran für  $Ca^{2+}$ -Ionen bestand. Zwischen den Kardiomyozyten der Kontrollgruppe und den Kardiomyozyten der entlasteten Herzen ließen sich keinerlei signifikante Unterschiede im Bezug auf die  $A_{0,5}$  feststellen. Die  $A_{0,5}$  der epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe zeigte Werte von  $-11.8 \pm 1.1$  mV ( $n=26$ ), die der entlasteten Kardiomyozyten Werte von  $-12.9 \pm 0.8$  mV ( $n=21$ ). In den endokardialen Schichten der Kontrollgruppe konnten Werte der  $A_{0,5}$  bei  $-12.9 \pm 1.5$  mV ( $n=13$ ) errechnet werden, wovon der Wert der endokardialen, entlasteten Kardiomyozyten mit  $-14.9 \pm 1.2$  mV ( $n=17$ ) keine statistisch relevanten Unterschiede zeigte.

Neben der halbmaximalen Aktivierung wurde auch die Steigung der Aktivierungskurve berechnet. Dies wurde mit Hilfe des Programms PRISM durchgeführt. Hierbei wurde folgende Formel verwendet:  $Y = \text{Minimum} + (\text{Maximum} - \text{Minimum}) / (1 + \exp((V_{50} - X) / \text{Steigung}))$ . Die Steigung der epikardialen Zellen der Kontrollgruppe betrug  $5,4 \pm 0,2$  mV ( $n=26$ ), die der entlasteten, epikardialen Zellen  $5.5 \pm 0.1$  mV ( $n=21$ ). Bei den endokardialen Zellen der Kontrollgruppe ließen sich Werte von  $5.9 \pm 0.3$  mV ( $n=13$ ) und bei den endokardialen entlasteten Zellen Werte von  $5.3 \pm 0.3$  mV ( $n=17$ ) errechnen. Somit zeigte auch die Steigung der Aktivierungskurven der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe keine statistisch relevanten Unterschiede.

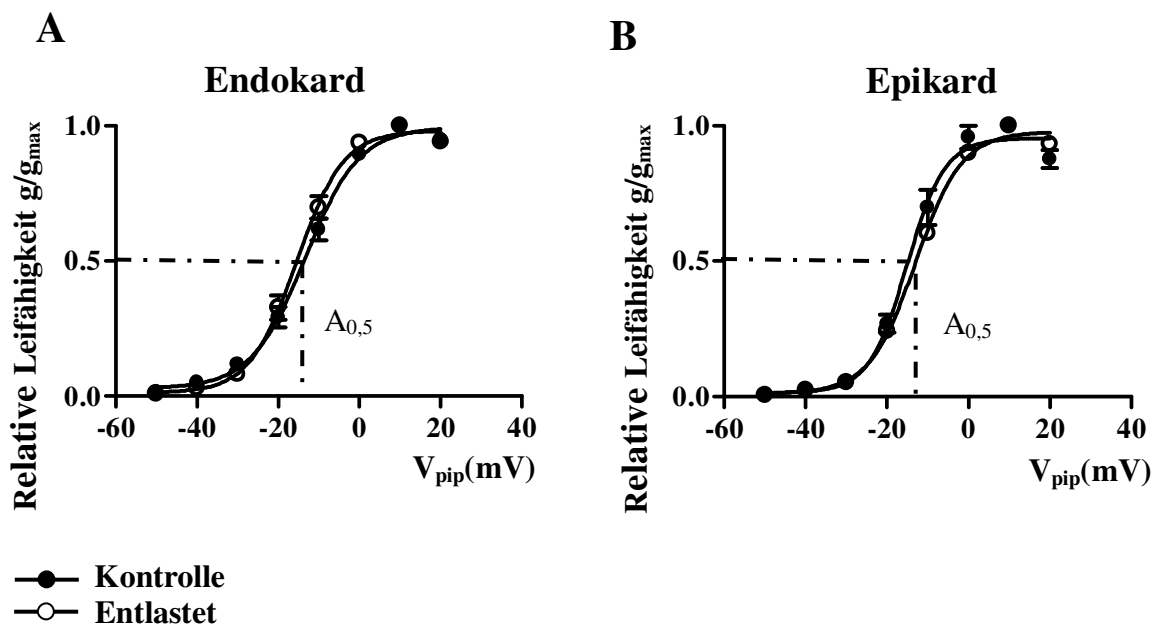


Abbildung 25: Die Aktivierungskurven der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Die Boltzmannanpassung des Verhältnisses aus der Leitfähigkeit bei bestimmten Membranpotentialen und maximaler Leitfähigkeit bei 0mV beschreibt die Aktivierungskurve. Hierbei zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen entlasteten Kardiomyozyten und den Kardiomyozyten der Kontrollgruppe.

(A) *Endokard*

(B) *Epikard*

### 3.4.3 Die *steady-state* Inaktivierung des $I_{CaL}$

Die nächste kinetische Eigenschaft des  $I_{CaL}$ , die nach dem Versuchsprotokoll untersucht wurde, stellte die *steady-state* Inaktivierung dar. Zur Auswertung der aus dem in Kapitel 2.9.2.4.3 beschriebenen Pulsprotokoll gewonnenen Daten, wurden die maximalen Stromwerte der nach dem Vorpuls durch erneute Reizung induzierten Stromverläufe bestimmt. Diese Stromwerte wurden wiederum durch die Differenz des Spitzenstroms und der Basislinie der aus der angelegten Membranspannung resultierenden Stromkurve bestimmt. Dieser Stromwert wurde in ein prozentuales Verhältnis zu dem Maximalstrom ohne Vorpuls, der somit keiner Inaktivierung unterlag, gesetzt ( $I/I_{max}$ ). Dieser prozentuale Anteil der Ströme wurde gegen die angelegten Spannungen des Vorpulses graphisch mittels einer Boltzmannanpassung mit Hilfe der Software PRISM aufgetragen. In den so erhaltenen Grafiken wurde der Wert der halbmaximalen Inaktivierung ( $I_{0,5}$ ) bestimmt. Dieser Wert beschreibt die Spannung des Vorpulses, bei der nach anschließendem Anlegen einer Spannung von 0mV noch die Hälfte des maximal möglichen Stroms fließen kann. Dieser Wert diente in diesen Untersuchungen als Vergleichskriterium zwischen den Kurven der entlasteten Kardiomyozyten und den nativen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe.

Ausgewertet wurden die Werte von 13 endokardialen und 15 epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe. Sie wurden mit den Werten von 12 endokardialen und 16 epikardialen Kardiomyozyten der entlasteten Herzen verglichen.

Die Kurven der *steady-state* Inaktivierung stellten sich sowohl für die endokardialen als auch für die epikardialen Kardiomyozyten beider Versuchsgruppen als nahezu deckungsgleich dar (siehe Abbildung 26). Die halbmaximale Inaktivierung lag bei den endokardialen Kardiomyozyten der entlasteten Zellen und der Kontrollgruppe bei -35mV. Bei der epikardialen Kontrollgruppe lagen die Werte der halbmaximalen Inaktivierung bei -32mV und bei der entlasteten Gruppe bei -36mV. Diese Differenz zeigte allerdings keine statistische Signifikanz.

Neben dem Wert der halbmaximalen Inaktivierung konnte mit Hilfe der Software PRISM die Steigung der Inaktivierungskurve nach der unter Kapitel 3.2.2 beschriebenen Formel berechnet werden. Die epikardialen Kardiomyozyten zeigten in der Kontrollgruppe eine Steigung von  $-5.5 \pm 0.2$  mV und die der entlasteten Herzen  $-5.8 \pm 0.1$  mV. Bei den Kardiomyozyten des Endokardiums konnten in der Kontrollgruppe Werte von  $-5.8 \pm 0.2$  mV und



in der Gruppe der entlasteten Herzen Werte von  $-6.1 \pm 0.2 \text{ mV}$  gefunden werden. Somit zeigten sich auch hier keinerlei statistisch signifikante Unterschiede.

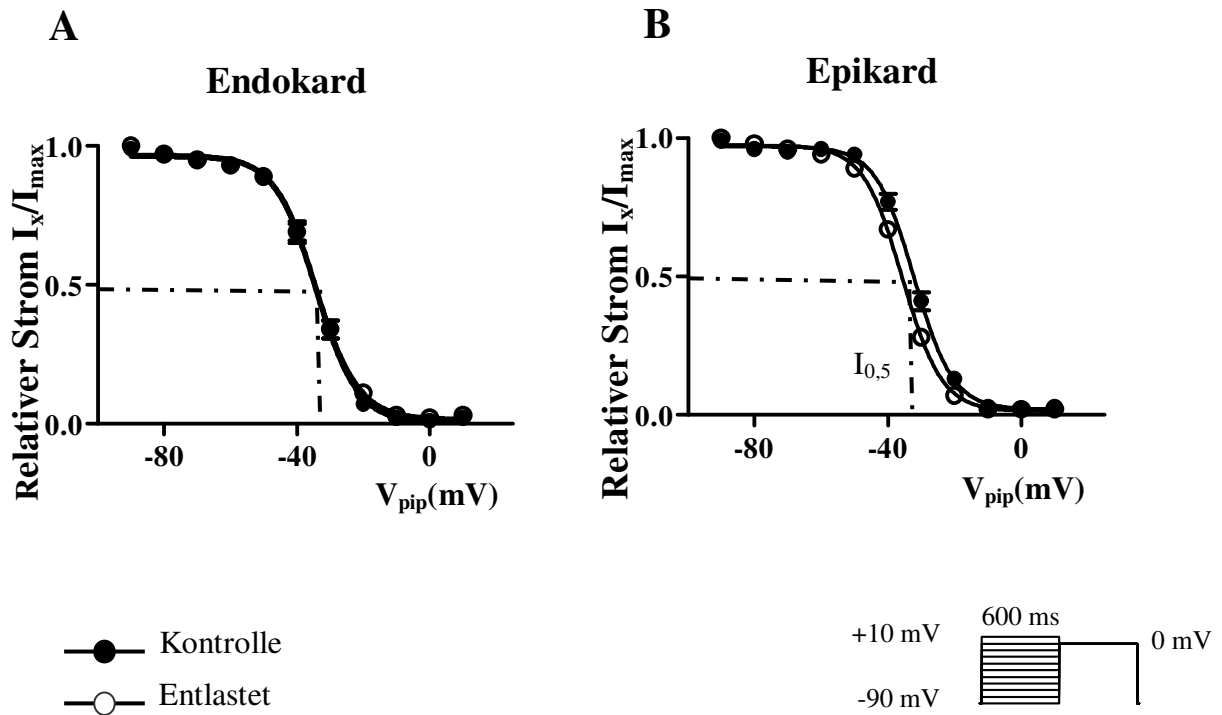


Abbildung 26: Die *steady-state* Inaktivierung des  $I_{\text{CaL}}$

Es zeigte sich bei chronisch druckentlasteten Kardiomyozyten kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die *steady-state* Inaktivierung.

Die Messungen wurden in der Lösungskonstellation aus B-02 und P-01 und nach dem unter 2.9.2.4.3 beschriebenen Pulsprotokoll durchgeführt.

(A) *Endokard*

(B) *Epikard*

#### 3.4.4 Die zeitliche Erholung des $I_{CaL}$ von einem Inaktivierungspuls

Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Erholung von einer maximalen Aktivierung wurden die relativen Ströme, die nach einer bestimmten Zeit nach maximaler Aktivierung wieder auslösbar waren, gegen diesen Zeitpunkt mittels einer monoexponentiellen Anpassung mit Hilfe der Software PRISM graphisch aufgetragen. Hierfür wurden die Daten des unter 2.9.2.4.4 beschriebenen Pulsprotokolls verwendet, wobei die Differenz zwischen Stromspitzen und Basislinie der einzelnen Stromverläufe für die Auswertung herangezogen wurden. Diese Stromwerte wurden in ein Verhältnis zu dem maximal an dieser Zelle auslösbaren  $I_{CaL}$ , der durch die erste Messung beschrieben wurde, gesetzt ( $I/I_{max}$ ). Es wurden die Werte von 11 endokardialen und 15 epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe mit den Werten von 12 endokardialen und 18 epikardialen Kardiomyozyten der entlasteten Herzen verglichen.

Einen Anhaltspunkt zum Vergleich der Erholung stellte der Zeitpunkt dar, bei dem die Hälfte des Maximalstroms wieder gemessen werden konnte. Dieser Wert wird auch als Zeitpunkt der halbmaximalen Erholung,  $t_{0,5}$ , bezeichnet.

Auch hier ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Kurven aus den Messwerten der entlasteten und der nativen Kardiomyozyten feststellen (siehe Abbildung 27). Die Zeitspanne bis zur halbmaximalen Erholung betrug in der epikardialen Kontrollgruppe und der Gruppe der entlasteten epikardialen Zellen 48ms und war damit identisch. Auch in den endokardialen Schichten der Vergleichsgruppen unterschied sich dieser Wert nicht von der Kontrollgruppe. In beiden Versuchsgruppen betrug der Wert 45ms.

Auch hier konnte wiederum durch die PRISM-Software nach der unter 3.4.2 beschriebenen Formel die Steigung der Kurven bestimmt werden, die auch mit einer Zeitkonstanten  $\tau_{rec}$  beschrieben wurde. Die  $\tau_{rec}$  der epikardialen Myozyten der Kontrollgruppe betrug  $85.1 \pm 1.0$ ms und die der entlasteten Kardiomyozyten  $82.7 \pm 0.4$ ms. In den endokardialen Schichten zeigten sich Werte der  $\tau_{rec}$  von  $86.0 \pm 0.7$ ms in der Kontrollgruppe und Werte von  $81.5 \pm 0.3$ ms in der Gruppe der entlasteten Kardiomyozyten. Diese Werte zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

So hat chronische Druckentlastung des linken Ventrikels der Ratte keine Auswirkung auf diesen Parameter der Kinetik des  $I_{CaL}$ .

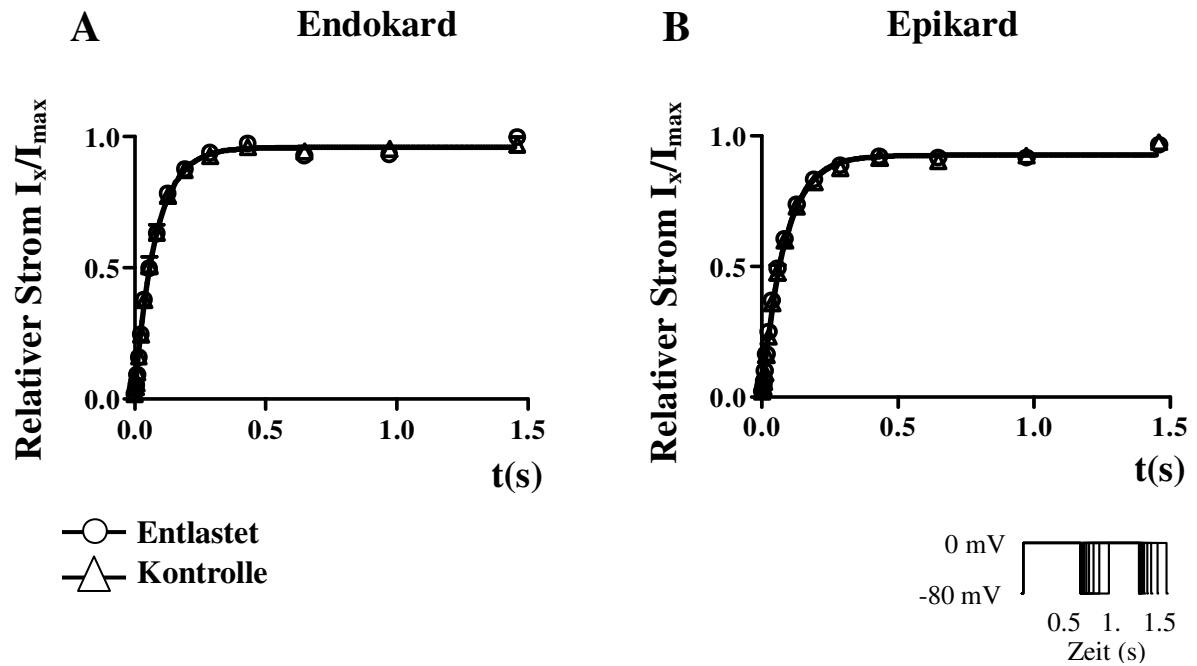


Abbildung 27: Erholung des  $I_{CaL}$  von einem Vorpuls

Chronische Druckentlastung führte in Bezug auf diese kinetische Eigenschaft des  $I_{CaL}$  nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung an linksventrikulären Kardiomyozyten.

(A) Endokard

(B) Epikard

### 3.5 Einfluss der hHTX auf den AP-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom

#### 3.5.1 Veränderung der Aktionspotentiale

Der zweite Versuchteil diente wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben zur Bestimmung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms während eines APs. Für diese Messung wurden zunächst APs im Stromklemmmodus aufgezeichnet und deren Länge bestimmt (siehe Kapitel 2.9.3). Als Vergleichsparameter wurde die Dauer des APs bis zu 90% der Repolarisation gemessen, die so genannte APD<sub>90</sub>. Des Weiteren konnte das Ruhemembranpotential und der Depolarisationsüberschuss der Kardiomyozyten der einzelnen Versuchsgruppen verglichen werden.

Verglichen wurden die Werte von 21 endokardialen und 14 epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe mit den Werten von 7 endokardialen und 15 epikardialen Kardiomyozyten der entlasteten Herzen.

In der Kontrollgruppe wurde, wie in der Literatur beschrieben, in diesen Versuchen ein AP-Gefälle zwischen Endokard und Epikard gemessen [Solberg et al. 1974; Volk et al. 1999]. Die mittlere APD<sub>90</sub> betrug in den 21 untersuchten endokardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe 205±15.28ms, wohingegen die epikardialen Schichten bei den 14 getesteten Zellen eine mittlere APD<sub>90</sub> von 51.56±5.08ms aufwiesen (siehe Abbildung 28). Die mittlere APD<sub>90</sub> der 7 entlasteten endokardialen Kardiomyozyten ergab Werte von 306.8±44.30ms, was einer Verlängerung der APs der endokardialen Zellen der entlasteten Herzen entsprach (p<0.01;\*\*). Auch die mittlere APD<sub>90</sub> der 15 untersuchten entlasteten epikardialen Kardiomyozyten verlängerte sich im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe auf 135.9±32.50ms (p< 0.05;\*).

Das Ruhemembranpotential zeigte in den Kardiomyozyten der epikardialen Schichten in der Kontrollgruppe Werte von -86.19±0.82mV und die der entlasteten Kardiomyozyten -85.38±0.85mV. In den endokardialen Schichten wiesen die Kardiomyozyten der Kontrollgruppe -86.45±0.59mV und die der entlasteten Kardiomyozyten -85.96±0.855mV als Ruhemembranpotential auf. Hier zeigte sich demzufolge kein statistisch signifikanter Unterschied.

Auch der Depolarisationsüberschuss veränderte sich durch chronische Druckentlastung nicht. Hier zeigte sich in den epikardialen Schichten der Kontrollgruppe ein Depolarisationsüberschuss von 30.86±3.22mV und in der Gruppe der entlasteten Kardiomyozyten von

21.60±3.00mV. Die endokardialen Zellen zeigten in der Kontrollgruppe einen Depolarisationsüberschuss von 30.91±2.10mV und in der Gruppe der entlasteten Kardiomyozyten einen Depolarisationsüberschuss von 32.00±2.96mV. Diese Unterschiede zeigten keine statistische Signifikanz.

Hämodynamische Druckentlastung des linken Ventrikels der Ratte führt folglich zu einer Verlängerung der APs in den epi- und endokardialen Schichten des Myokards.

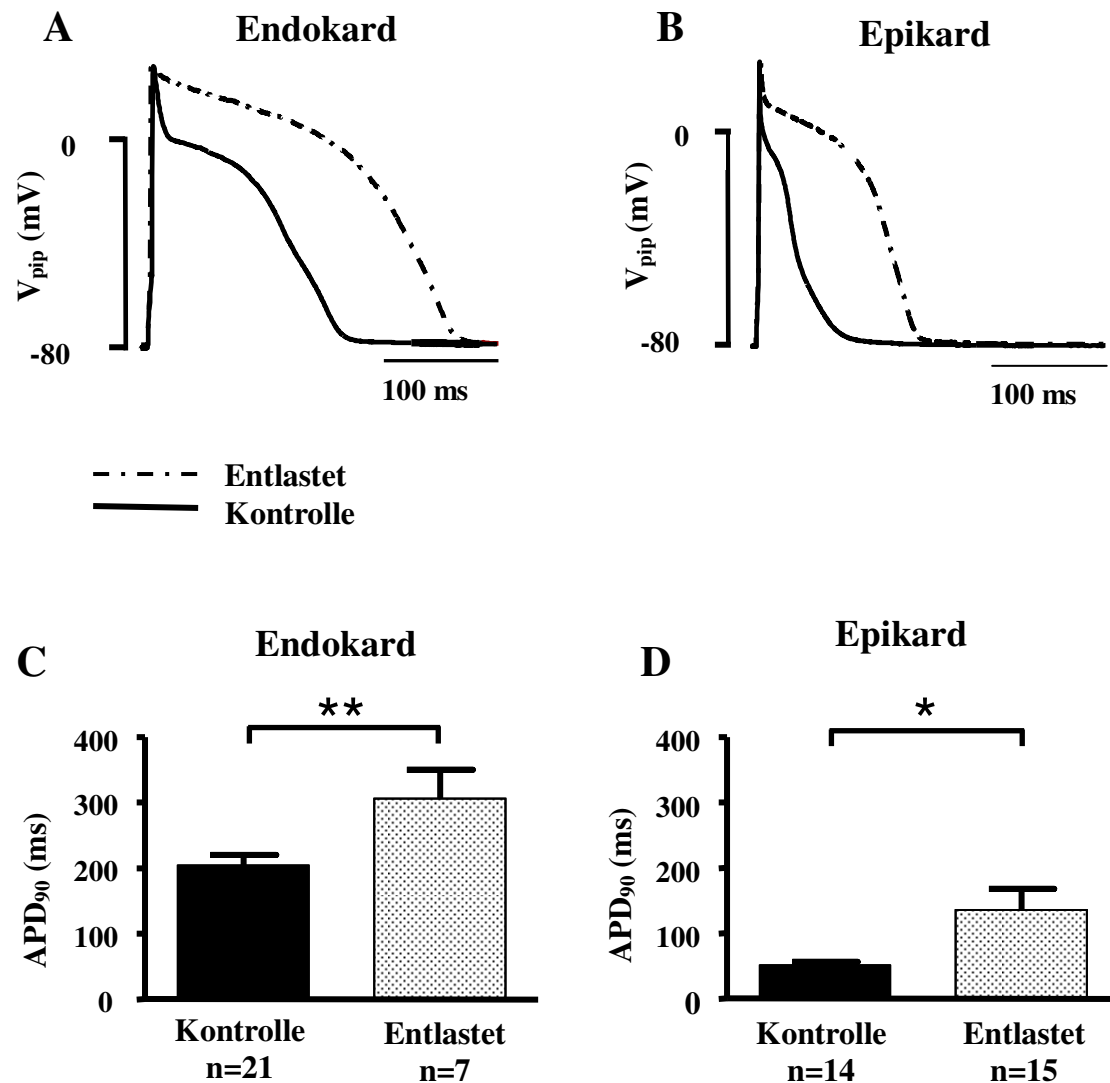


Abbildung 28: Bestimmung der Länge der APs

Durch chronische Druckentlastung des linken Ventrikels der Ratte kam es zu einer Zunahme der AP-Länge in beiden Schichten des linksventrikulären Myokards.

(A) Repräsentatives endokardiales AP

(B) Repräsentatives epikardiales AP

(C) mittlere APD<sub>90</sub> Endokard

(D) mittlere APD<sub>90</sub> Epikard

### 3.5.2 Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms während des Aktionspotentials

Um nun den Einfluss hämodynamischer Druckentlastung des linken Ventrikels auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom während der APs zu untersuchen wurden die oben bestimmten APs als Pulsprotokolle verwendet. Die Zellen wurden in der Spannungsklemme diesem Spannungsverlauf des vorher bestimmten APs ausgesetzt (siehe Kapitel 2.9.3) und der AP-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben errechnet.

Die Messungen wurden an 19 endokardialen und 11 epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe durchgeführt und mit den Werten von 7 endokardialen und 15 epikardialen Kardiomyozyten der entlasteten Herzen verglichen.

Als Maß für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom während des APs wurden die Flächen unter den Kurven des Stromverlaufs des Cd<sup>2+</sup>-sensitiven Stroms integriert, wodurch die Ladungsverschiebung durch den AP-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom errechnet werden konnte. Endokardial stieg die Ladungsmenge von 397±41fC/pF (n=19) gemessen an den Kardiomyozyten der Kontrollgruppe auf 720±124fC/pF (n=7) bei den entlasteten Kardiomyozyten (p<0.01;\*\*). Bei den epikardialen Kardiomyozyten der Kontrollgruppe betrug die Ladungsmenge 84±20fC/pF (n=11) und stieg durch Druckentlastung auf 324±55fC/pF an (n=15; p< 0.05;\*). Unter hämodynamischer Druckentlastung des linken Ventrikels der Ratte kommt es also zu einem vermehrten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom während des APs in den endokardialen und epikardialen Schichten des linksventrikulären Myokards.

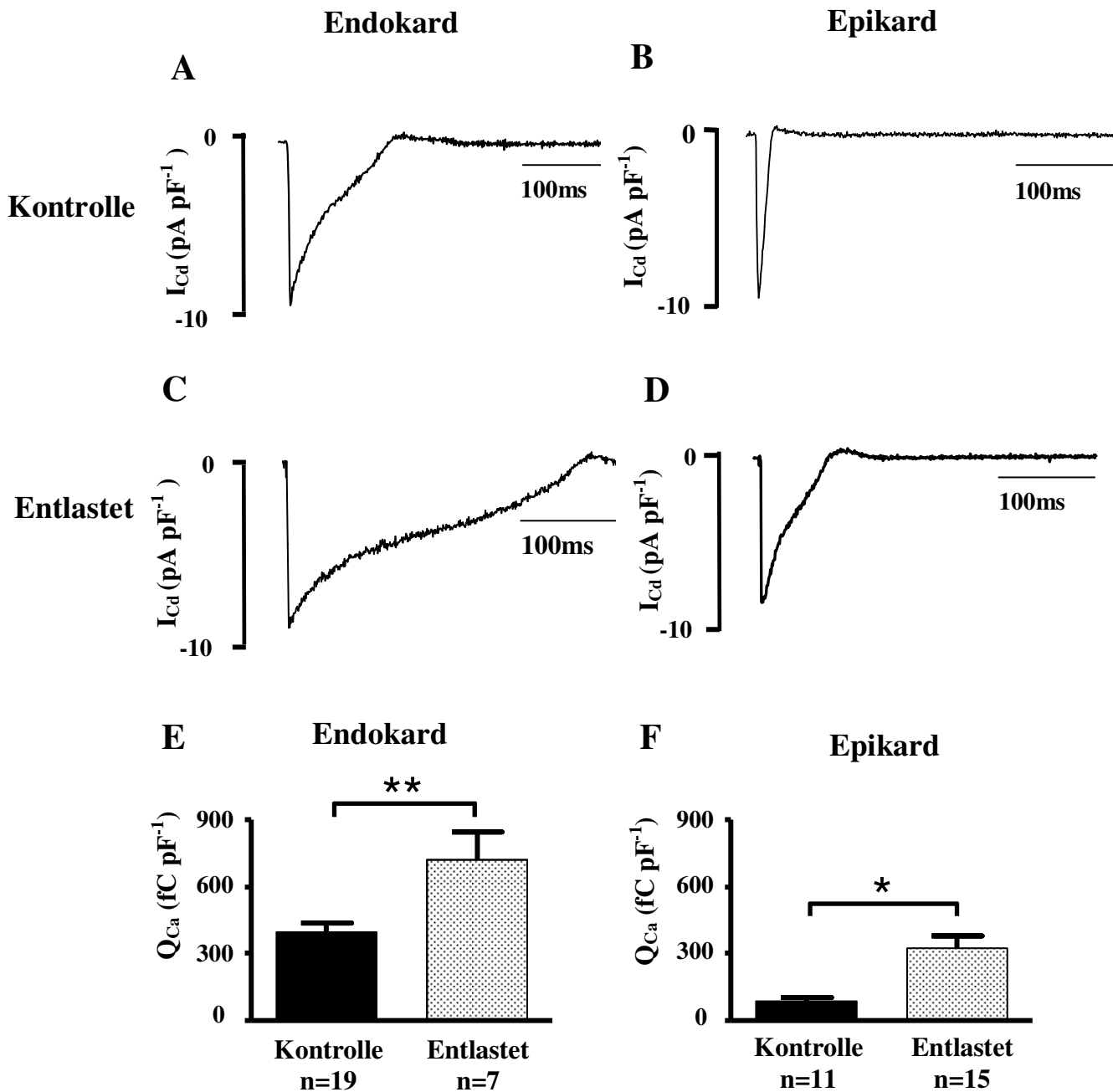


Abbildung 29: Der AP-induzierte  $Ca^{2+}$ -Einstrom

Durch hämodynamische Druckentlastung des linken Ventrikels kam es bei linksventrikulären Kardiomyozyten von Ratten zu einem gesteigerten  $Ca^{2+}$ -Einstrom während des APs.

(A-D) Stromverlauf des AP-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms repräsentiert durch den  $Ca^{2+}$ -sensitiven Subtraktionsstrom

(E)  $Q_{Ca}$  Endokard:

(F)  $Q_{Ca}$  Epikard:

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss der hHTX auf das linksventrikuläre Myokard der Ratte

#### 4.1.1 Reduktion der Zellkapazität getrennt nach Epikard und Endokard

Durch die hHTX nach Ono & Lindsey wird das Herz hämodynamisch entlastet, wodurch es, wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, zu einer Reduktion der Zellgröße der Kardiomyozyten kommt [Campbell et al. 1991; Korecky et al. 1983]. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

Die Reduktion der Zellgröße fand allerdings unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen nicht in allen Schichten im gleichen Ausmaß statt. Bei getrennter Erhebung der Daten der epikardialen und der endokardialen Kardiomyozyten der entlasteten Herzen lässt sich keine signifikante Reduktion der Zellgröße in den epikardialen Schichten nachweisen. Dieses Phänomen ist bereits bekannt. Es wurde festgestellt, dass es bei einer durch hämodynamische Druckentlastung herbeigeführten Atrophie zu einer asymmetrischen Reduktion der Zellgröße kommt. Die Atrophie der Kardiomyozyten in den Zellen der endokardialen Schichten scheint prominenter ausgeprägt zu sein als in den Zellen der epikardialen Schichten [Campbell et al. 1991].

Als eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte folgendes dienen: Bei normal belasteten Herzen findet man die größten Kardiomyozyten des linken Ventrikels in den endokardialen Schichten [Campbell et al. 1991]. Hier lastet die größte Vor- und Nachlast auf dem Myokard, weshalb die Kardiomyozyten dieser Schichten vermehrt zur Kontraktion beitragen müssen. Somit scheint die Arbeit, die die einzelnen Kardiomyozyten leisten müssen neben genetischen Faktoren die Größe der Kardiomyozyten maßgeblich zu beeinflussen [Korecky & Rakusan 1983]. Wird nun durch eine hHTX die Belastung des Herzens durch Reduktion der Vor- und Nachlast minimiert, müssen die einzelnen Kardiomyozyten nicht mehr so viel Arbeit leisten. Von dieser Entlastung sind die unter physiologischen Bedingungen am stärksten belasteten Kardiomyozyten, die Zellen der endokardialen Schichten, in erster Linie betroffen. Folglich könnte die am intensivsten ausgeprägte Druckentlastung in den endokardialen Schichten stattfinden,



wohingegen die epikardialen Schichten in geringerem Maße von der Druckentlastung betroffen sein könnten. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die unter chronischer Druckentlastung in unterschiedlichem Maße stattfindende Reduktion der Zellgröße in den endokardialen und epikardialen Abschnitten des Myokards bieten [Campbell et al. 1991].

### 4.1.2 Veränderung des $I_{CaL}$

Der  $I_{CaL}$  bildet, wie in Kapitel 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben, durch den Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle die Grundlage für die Plateauphase der APs und ermöglicht die elektromechanische Kopplung, die letztendlich zur Kontraktion der Kardiomyozyten führt [Bers et al. 2002].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch zweiwöchige hämodynamische Druckentlastung im Vergleich zu normal belasteten Herzen in der freien Wand des linksventrikulären Myokards der Spezies Ratte zu einem deutlichen Anstieg der Stromdichte des  $I_{CaL}$  kommt. Die Kinetik des  $I_{CaL}$  stellte sich allerdings als weitgehend unverändert dar.

Mehrere Faktoren können zu der Zunahme der Stromdichte führen. Zum einen kann eine Zunahme der Kanaldichte in der Plasmamembran dazu beitragen, dass die Stromdichte durch den L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal steigt. Zum anderen gibt es allerdings auch Variationen auf Kanalebene die zu einer Steigerung der Stromdichte beitragen können, wie zum Beispiel Veränderungen auf Proteinebene durch Phosphorylierung oder proteolytischer Vorgänge am Protein. Auch posttranskriptionelle Veränderungen auf RNA-Ebene, das so genannte Spleißen, könnte zu Veränderungen der Stromdichte des  $I_{CaL}$  führen. Welche Faktoren nun zu der in dieser Arbeit gezeigten Zunahme der Stromdichte beitragen könnten, soll im Folgenden diskutiert werden.

### 4.1.2.1 Kanalzusammensetzung der L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Die kinetischen Eigenschaften eines spannungsabhängigen Ionenkanals und seine Öffnungswahrscheinlichkeit werden unter anderem durch seine Proteinzusammensetzung geregelt (siehe Kapitel 1.2.4). Durch Veränderungen der Zusammensetzung kann es zu Modifikation dieser Eigenschaften kommen. Es stehen den Zellen unterschiedliche Wege zur Verfügung, auf welchen diese Modifikationen erreicht werden können. Zum einen kann die Zelle durch posttranskriptionelles Verarbeiten der RNA, dem alternativen Spleißen, aus einer RNA mehrere Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften produzieren. Dadurch können in unterschiedlichen Geweben die Proteine genau den Aufgaben des entsprechenden Gewebes angepasst werden. Neben dem alternativen Spleißen kann des Weiteren das bereits fertige Protein prozessiert werden, indem es zum Beispiel proteolytisch verändert wird, d.h. ein bestimmter Teil des Proteins durch so genannte Proteasen herausgeschnitten wird. Auch der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal unterliegt solchen Modifikationen. So ist zum Beispiel bekannt, dass bestimmte Spleißvarianten des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals seine Inaktivierungseigenschaften verändern [Soldatov et al. 1998]. Auch proteolytische Prozessierungen sind bekannt, die durch Spaltung des Proteins am Carboxylende zum Beispiel zu Veränderungen der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  führen können [Klößner et al. 1995]. Da in dieser Arbeit keine genaue Sequenzierung des Proteins durchgeführt wurde, lässt sich zunächst nicht sagen, inwiefern Veränderungen auf RNA- oder Proteinebene zu der beobachteten Steigerung der Stromdichte beitragen können. Allerdings zeigen die bisher bekannten Spleißvarianten der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle unterschiedliche kinetische Eigenschaften oder eine Veränderung der Strom-Spannungskurven [Singh et al. 2008; Liao et al 2004; Soldatov et al. 1996]. Die kinetischen Eigenschaften und die Strom-Spannungskurve des  $I_{\text{CaL}}$  zeigten sich allerdings in dieser Arbeit unter chronischer Druckentlastung unverändert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei druckentlasteten Kardiomyozyten und bei physiologisch belasteten Kardiomyozyten mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleiche Spleißvariante des Proteins handeln wird.

### 4.1.2.2 Der Phosphorylierungsgrad der L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Neben der Proteinzusammensetzung stellt auch die Phosphorylierung von Proteinen einen wichtigen Parameter zur schnellen Modifikation von Proteineigenschaften dar. So sind auch die Proteine des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes der Kardiomyozyten Ziel verschiedener phosphorilierender und dephosphorilierender Enzyme. Zu den phosphorilierenden Enzymen zählt zum Beispiel die in Kapitel 1.2.3 beschriebene Proteinkinase A (PKA). Dieses Enzym unterliegt der Regulation des sympathischen Astes des vegetativen Nervensystems. Durch Aktivierung der PKA werden die Eigenschaften mehrerer am  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt beteiligter Proteine in den Kardiomyozyten verändert. So unterliegt unter anderem der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der RyR, der NCX und auch PLB einer Phosphorylierung durch die PKA [Liew et al. 2004]. Durch Phosphorylierung dieser Proteine können die Kardiomyozyten den unter sympathischer Aktivierung gesteigerten Arbeitsanforderungen gerecht werden. Es kommt zu einer Sensibilisierung und Synchronisierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auf eine Depolarisation und zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit des  $I_{\text{CaL}}$ . Auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR nimmt durch Phosphorylierung der RyR zu und die Aktivität der SERCA wird durch Phosphorylierung von Phospholamban den gesteigerten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen während der Systole angepasst (siehe Kapitel 1.2.3).

Somit bewirkt die Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einen drastischen Anstieg auf das 2-7 fache der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  durch eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle [Yue et al. 1990]. Allerdings kommt es durch diese Modifikation des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals nicht nur zu einer Zunahme der Stromdichte, sondern die Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle wird um ca. 10mV auf negativere Membranpotentiale verschoben [Hartzell et al. 1991; Tsien et al. 1986]. Dies verändert die Stromspannungsabhängigkeit der Kanäle. Da allerdings in dieser Arbeit keine Unterschiede in den Stromspannungskurven, der Aktivierung und der Inaktivierung des  $I_{\text{CaL}}$  der Kardiomyozyten der physiologisch belasteten und der entlasteten Kardiomyozyten gezeigt werden konnte, scheint es eher unwahrscheinlich, dass eine gesteigerte Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle isoliert zu der gezeigten Zunahme der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  führt.

Zu diskutieren bleibt allerdings trotz unveränderter kinetischer Eigenschaften der Einfluss des Phosphorylierungsgrades der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auf die Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$ . Denn insbesondere unter chronischer Druckentlastung kommt zu einer erheblichen Verschiebung der Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen [Schwoerer et al. 2008; Marguliez et al. 2003]. So kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Phosphorylierungsgrad der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle unter chronischer Druckentlastung konstant bleibt. Allerdings kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass der Phosphorylierungsgrad alleine zur gezeigten Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  führt.

Ein direkter Nachweis über die Proteinbiochemie bleibt dennoch offen, da derzeit kein aussagekräftiger *Essay* für diese Untersuchung zur Verfügung steht.

### 4.1.2.3 Konzentration der L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in den Kardiomyozyten

Da Veränderungen der Proteinzusammensetzung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades, wie im vorherigen Abschnitt erörtert, offensichtlich nicht allein die nachgewiesene Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  erklären können, müssen andere Faktoren mit daran beteiligt sein. Eine gesteigerte Kanaldichte der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran könnte ebenfalls zu der gezeigten Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  mit beitragen.

Um diese Hypothese zu verfolgen wurde in Kooperation mit dem *Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg–Eppendorf* durch proteinbiochemische Untersuchungen die Konzentration der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, der  $\text{Ca}_v1.2$ , an linksventrikulären Kardiomyozyten von Ratten untersucht. Hierbei wurde mit Hilfe von *western blotting* die Proteinkonzentration der  $\text{Ca}_v1.2$  an linksventrikulärem Gewebe von entlasteten und normal belasteten Rattenherzen betrachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten unter chronischer Druckentlastung eine deutliche Zunahme der  $\alpha_1$ -Untereinheiten  $\text{Ca}_v1.2$  der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Dies bekräftigt die Hypothese, dass eine gesteigerte Kanalkonzentration in der Plasmamembran druckentlasteter linksventrikulärer Kardiomyozyten zu der gezeigten Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  beitragen könnte. Da allerdings für diese Untersuchung das gesamte linksventrikuläre

Gewebe verwendet wurde, ist das Ausmaß der Steigerung der Kanaldichte in der Plasmamembran der Kardiomyozyten schwer abschätzbar. Hier wurden L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von zum Beispiel neuronalem Gewebe und Bindegewebe mitbestimmt, weshalb eine Beeinflussung nicht auszuschließen ist. Da über die Veränderung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle dieser Gewebe wenig bekannt ist, müssten weitergehende Untersuchungen die Veränderungen des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in den Plasmamembranen entlasteter linksventrikulärer Kardiomyozyten weiter differenzieren.

Neben der Untersuchung der  $\alpha_1$ -Untereinheiten wurde des Weiteren die Konzentration der regulierenden  $\beta$ -Untereinheiten der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle untersucht. Diese Untereinheiten scheinen an der Regulation der  $\alpha_1$ -Untereinheiten der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt zu sein [Brette et al. 2005]. Es wird davon ausgegangen, dass durch den Einfluss der  $\beta$ -Untereinheit die Konzentration der porenbildenden Anteile der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran gesteigert werden kann [Brette et al. 2005]. In den proteinbiochemischen Untersuchungen stellte sich auch die Konzentration der  $\beta$ -Untereinheiten als gesteigert dar. So könnte tatsächlich durch chronische Druckentlastung des linksventrikulären Myokards eine positive Regulation der Kanal-konzentration der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle hervorgerufen werden.

Allerdings ist die Steigerung der Kanaldichte in der Plasmamembran nicht die einzige Auswirkung der  $\beta$ -Untereinheiten auf die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Neben dieser Funktion verändern die  $\beta$ -Untereinheiten auch die kinetischen Eigenschaften der  $\alpha_1$ -Untereinheiten. Durch den Einfluss der  $\beta$ -Untereinheiten kommt es zum einen zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, was zu einer Steigerung der Stromdichte führt [Dzhura et al. 2000; Costantin et al. 1998]. Allerdings kommt es auch zu einer Verschiebung der Stromspannungskurven und der *steady-state* Inaktivierung in Richtung negativere Membranpotentiale [Dolphin 2003a; Walker et al. 1998]. Auch wenn in dieser Arbeit eine gesteigerte Stromdichte gezeigt werden konnte, was unter anderem durch den Einfluss der  $\beta$ -Untereinheiten bewirkt werden kann, konnten dennoch keine Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gezeigt werden. Somit scheint die Veränderung der Proteinkonzentration der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wahrscheinlich kein isolierter Prozess zu sein, der zu der gezeigten Zunahme der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  führt. Eine detaillierte Erklärung der beobachteten

Zunahme der Stromdichte kann mit den hier durchgeführten Experimenten daher nicht geliefert werden.

### 4.1.3 Das Ausbleiben der funktionellen Nachweisbarkeit des $I_{CaT}$

Aufgrund der zahlreichen bisher bekannten Parallelen der kardialen Umbauprozesse bei chronischer Druckbelastung und Druckentlastung des linken Ventrikels sollte in dieser Arbeit das Myokard durch elektrophysiologische Untersuchungen auf eine Reexpression des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals überprüft werden. An linksventrikulären Kardiomyozyten chronisch druckbelasteter Herzen kann dieser Kanal bei der Ratte nachgewiesen werden [Martinez et al 1999].

In den vorliegenden Versuchen konnten allerdings nach chronischer Druckentlastung des linksventrikulären Myokards elektrophysiologisch keine Ströme mit den Eigenschaften eines  $I_{CaT}$  gezeigt werden. Die unter Kapitel 3.3 dargestellten Stromspannungskurven zur Bestimmung aller  $Ca^{2+}$ -permeablen Kanäle an den entlasteten Kardiomyozyten zeigten genau wie die physiologisch belasteten Kardiomyozyten ausschließlich einen Strom mit den Eigenschaften des  $I_{CaL}$ .

Die Rolle des T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals ist weitgehend unbekannt. Sein Expressionsschema, das sich am adulten, normal belasteten Myokard auf das Reizleitungssystem beschränkt, deutet darauf hin, dass dieser Kanal eine Rolle bei der Generierung des Schrittmacherpulses spielt [Brette et al. 2005]. Wie wichtig die Anwesenheit dieses Kanals zur Generation eines solchen Pulses ist, bleibt dennoch zu diskutieren, insbesondere da Tiere, die keinen kardialen T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal exprimieren, überlebensfähig sind [Brette et al. 2005].

An fetalen Herzen wird der Kanal außer von Zellen des Reizleitungssystems auch von ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert [Escobar et al. 2003]. Welche Aufgabe der Kanal hier übernimmt, ist ebenfalls unbekannt. Eine Beteiligung des  $I_{CaT}$  an der Bildung der APs der ventrikulären Kardiomyozyten und somit eine Beteiligung an der elektro-mechanischen Kopplung ist ungeklärt. Insbesondere ein Beitrag zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom während der Plateauphase scheint eher unwahrscheinlich zu sein, da sich die maximale Öffnungswahrscheinlichkeit der T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle bei Membranpotentialen von ca.

-40mV bewegt, also außerhalb des Spannungsbereiches, in dem die Plateauphase liegt (siehe Kapitel 1.2.4.2).

Allerdings wird diskutiert, ob der Kanal an der Vermittlung von Wachstumsvorgängen des Herzens beteiligt sein könnte [Martinez et al. 1999]. Eine solche Aufgabe würde erklären, dass der Kanal neben dem fetalen Myokard auch an chronisch druckbelasteten und dadurch hypertrophierten Herzen nachgewiesen werden kann [Martinez et al. 1999]. Wäre der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal tatsächlich unter anderem an der Vermittlung von Wachstumsvorgängen beteiligt, ist es nachvollziehbar, dass in den vorliegenden Versuchen, bei denen es zu einer Reduktion der Herzmasse kommt, ein  $\text{I}_{\text{CaT}}$  nicht zu identifizieren ist.

#### 4.1.4 Veränderung der APs

Es konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass es durch chronische hämodynamische Druckentlastung zu einer Verlängerung der APs in beiden Schichten der freien Wand des linksventrikulären Myokards kommt. Hierbei bleibt eine transmurale Längendifferenz der APs zwischen Epikard und Endokard erhalten.

Die unterschiedliche Länge der APs in den epikardialen und endokardialen Schichten stellt für die physiologische Herzfunktion einen wichtigen Parameter dar (siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Hierdurch wird zum einen die Menge des während der Plateauphase in die Zelle gelangenden  $\text{Ca}^{2+}$  geregelt, was zum Beispiel die Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinflusst [Bers et al. 2002]. Zum anderen wird durch die AP-Längendifferenz die geregelte Erregungsausbreitung und Rückbildung ermöglicht. Veränderungen der APs können somit die physiologische Herzfunktion sehr empfindlich stören, weswegen im Folgenden darauf eingegangen werden soll, welche Faktoren unter chronischer Druckentlastung zur Verlängerung der APs mit beitragen könnten und welche Auswirkungen diese auf Kardiomyozyten haben würde.

### 4.1.4.1 Einfluss des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms

Die Form der ventrikulären APs wird durch das Zusammenspiel der depolarisierenden  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme und der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ausströme gebildet. So ist es naheliegend, dass es durch Veränderung der Stromdichte der an der Bildung der APs beteiligten Ströme zu einer Veränderung der Aktionspotentialform kommt. Die Stromdichte der betreffenden spannungsabhängigen Ionenströme ist zum einen abhängig von der Expression der zugehörigen Kanäle zum anderen abhängig von der Funktionalität der Kanäle.

Durch eine verminderte Stromdichte der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ströme kommt es zu einer Zunahme der AP-Länge [Nerbonne et al. 2006]. Diese Verminderung der Stromdichte der  $\text{K}^+$ -Ströme ist zum einen Grundlage einiger angeborener Herzrhythmusstörungen. Hierbei kommt es durch veränderte Expression der den repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Strömen zugrunde liegenden Kanäle zu einer Verlängerung der APs, was sich in den transthorakalen EKG-Ableitungen in einer Verlängerung des QT-Intervalls äußert [Nerbonne et al. 2006]. Zum anderen gibt es Pharmaka, wie zum Beispiel Amiodaron, die durch Blockade der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Kanäle die APs verlängern und so funktionelle Verlängerungen der QT-Zeiten herbeiführen können.

Auch die Funktion der  $\text{Na}^+$ -Kanäle beeinflusst die Form der APs maßgeblich. Bei zunehmender Stromdichte dieser Ionenkanäle wurde experimentell gezeigt, dass es durch Steigerung der depolarisierenden Kräfte zu einer Verlängerung der APs kommt [Nerbonne et al. 2006]. So sind wiederum angeborene Herzrhythmusstörungen bekannt, bei denen es durch Mutationen der für die  $\text{Na}^+$ -Kanäle kodierenden Gene zu einer Zunahme der Stromdichte des  $I_{\text{Na}}$  kommt, was zu einer Verlängerung der APs führt [Antzelevitch et al. 2008].

Inwieweit eine Zunahme des depolarisierenden  $I_{\text{CaL}}$  während der Plateauphase die Form der APs beeinflussen kann, ist experimentell bisher nicht gezeigt. Allerdings gibt es auch hier angeborene Störungen, wie zum Beispiel das so genannte Timothy-Syndrom, bei dem es durch verminderte Inaktivierung des  $I_{\text{CaL}}$  zu einer Verlängerung der APs kommt [Antzelevitch et al. 2008]. Des Weiteren ist bekannt, dass es durch Blockade der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mit nachfolgender Reduktion des  $I_{\text{CaL}}$  zu einer Verminderung der AP-Länge kommt [Cazorla et al. 2003]. Somit ist nahe liegend, dass es durch eine



Zunahme der Stromdichte des  $I_{CaL}$  auch zu einer Verlängerung der APs kommen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass es unter chronischer Druckentlastung des linksventrikulären Myokards der Ratte zu einer Reduktion der verschiedenen repolarisierenden  $K^+$ -Ströme kommt, was, wie oben beschrieben mit einer Verlängerung der APs einhergeht [Schwoerer et al 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine gesteigerte Stromdichte des  $I_{CaL}$  an entlasteten linksventrikulären Kardiomyozyten von Ratten nachgewiesen werden. Somit könnte es durch den gesteigerten  $I_{CaL}$  zu einer Zunahme der depolarisierenden Kräfte kommen, was zu der beobachteten Verlängerung der APs mit beitragen könnte. In diesem Fall würde an chronisch druckentlasteten Kardiomyozyten nicht ausschließlich die Reduktion der repolarisierenden Kräfte zur Verlängerung der APs führen, sondern auch eine Zunahme der depolarisierenden Kräfte. Es bleibt allerdings experimentell nachzuweisen, ob eine gesteigerte Stromdichte des  $I_{CaL}$  und eine gesteigerte Expression der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle tatsächlich zu einer Verlängerung der APs führen kann.

#### 4.1.4.2 Schichtspezifische Unterschiede der AP-Längen

Unter physiologischen Bedingungen zeigen sich über dem Myokard sowohl in transmuraler Richtung als auch zwischen Herzbasis und Herzspitze AP-Längendifferenzen [London et al. 2007]. Dieses genau definierte Muster der AP-Längen scheint eine wichtige Rolle für die geregelte Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung über dem Myokard während eines Kontraktionszyklus zu spielen [Franz et al. 1987; Cohen et al. 1976]. Kommt es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer Veränderung dieses AP-Längendifferenzmusters, kommt es zur Ausbildung pathologischer EKG-Linien. Dies geht offenbar mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien einher [Volk et al. 2000; Qin et al 1996].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter chronischer Druckentlastung eine Differenz der AP-Längen zwischen Endokard und Epikard zwar bestehen bleibt, es allerdings in beiden Schichten zu einer Zunahme der AP-Längen kommt. Auch wenn eine AP-Längendifferenz zwischen den epikardialen und endokardialen Schichten erhalten bleibt, könnte dies dennoch zu einer Verlängerung der

Repolarisierung über den betroffenen Myokardabschnitten führen und so das physiologische AP-Längenmuster stören. An diese Hypothese anlehnend konnte bei denen unter Kapitel 4.1.4.1 beschriebenen Herzrhythmusstörungen bereits nachgewiesen werden, dass das Risiko der Entstehung von ventrikulären Arrhythmien durch derartige Erregungsrückbildungsstörungen zunimmt [London et al 2007; Antzelevitch et al. 2008].

Den elektrophysiologischen Kenntnissen über die APs, die Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung zur Folge ist somit wegen des veränderten AP-Längenmusters unter chronischer Druckentlastung mit einer zunehmenden Vulnerabilität des Herzens für ventrikuläre Arrhythmien zu rechnen.

### 4.1.4.3 Der AP-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom

Während der Plateauphase des APs kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, der unter anderem durch die elektromechanische Kopplung die Kontraktion der Kardiomyozyten initiiert. Durch Verlängerung der APs steigt auch die Länge der Plateauphase an. Dies bedingt eine Zunahme der Zeit, während der eine Triebkraft für  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle besteht, wodurch theoretisch mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle gelangen könnte. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Durch die Verlängerung der APs kam es unter chronischer Druckentlastung durch hHTX zu einer Zunahme des AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms.

Da dieser Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Plasmamembran die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR triggert, könnte es hierdurch zu einer Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole kommen, was derart gesteuert die Kontraktilität der Zellen beeinflussen könnte [Bers et al. 2002].

Interessanterweise bleiben die maximale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole so wie auch die kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten nach zweiwöchiger Druckentlastung unverändert [Ito et al. 2003]. Eine unveränderte maximale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole trotz gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär könnte zum Beispiel dann zustande kommen, wenn die an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR beteiligten Ryanodinrezeptoren weniger sensibel auf den

$\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär reagieren. Dies wurde bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -armen SR bereits beobachtet [Bers et al. 2002]. Eine solche Entleerung des SR scheint unter chronischer Druckentlastung auch tatsächlich stattzufinden [unveröffentlichte Daten des Instituts für vegetative Physiologie, Hamburg]. Welche Faktoren allerdings zu dieser Entleerung des SR führen, ist weitgehend unbekannt. Der Füllzustand des SR unterliegt allerdings unter physiologischen Bedingungen einem genau geregelten Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten der SERCA,  $I_{\text{CaL}}$  und NCX. Um eine chronische Entleerung des SR herbeizuführen muss dieses Gleichgewicht erheblich gestört werden. So könnte zum Beispiel eine verminderte Aktivität der SERCA, eine gesteigerte Aktivität des NCX oder auch eine Steigerung der diastolisch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR das System aus dem Gleichgewicht bringen und so zu einer Entleerung des SR führen. Eine verminderte Aktivität der SERCA kann zum einen durch eine verminderte Expression oder auch durch einen verminderten Phosphorylierungsgrad von PLB zustande kommen. So führt chronische Druckentlastung mittels hHTX tatsächlich zu einer Verminderung des Phosphorylierungsgrades von PLB und reduziert dadurch die Aktivität der SERCA [Schwoerer et al. 2008]. Dies könnte zur Entleerung des SR beitragen. Da das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR allerdings für die Kontraktion der Kardiomyozyten essentiell ist, könnte eine Dysfunktion des SR mit einer Verschlechterung der diastolischen Funktion der Kardiomyozyten einhergehen. So betrachtet könnte die Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär durch stärkere Triggerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung dazu führen, dass bei vermindertem Füllungszustand des SR die maximale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole auf für eine suffiziente Kontraktion ausreichenden Werten gehalten wird. Dieser Sachverhalt wurde bei pharmakologisch erzeugter Entleerung des SR bereits gezeigt, wo es zum Anstieg des  $I_{\text{CaL}}$  kam um die mangelnde  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR zu kompensieren [Dibb et al. 2004]. Dies könnte die bereits mehrfach gezeigte Beobachtung erklären, dass es durch chronische Druckentlastung mittels hHTX zu einem Erhalt der systolischen aber einem Verlust der diastolischen Funktion mit Verschlechterung der Relaxation der Kardiomyozyten kommt [Ito et al. 2003; unveröffentlichte Daten des Instituts für Vegetative Physiologie, Hamburg].

## 4.2 Beeinflussung der Ergebnisse durch die Versuchsverhältnisse

Obwohl versucht wurde die Untersuchungen möglichst nahe an physiologischen Umgebungsbedingungen durchzuführen, mussten einige Kompromisse eingegangen werden um die gewünschten Messungen durchführen zu können.

### 4.2.1 Temperatur

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden bei Raumtemperatur (22°-25°) durchgeführt. Bei Körpertemperatur sind aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Nernstschen Gleichung,  $E_m = R \cdot T / Z \cdot F \cdot [\text{Ion}]_{\text{extr.}} / [\text{Ion}]_{\text{in}}$  (R= allgemeine Gas-konstante; T= absolute Temperatur; Z= Wertigkeit der betrachteten Ionen; F= Faraday-konstante), die die Triebkraft für Ionen über einer Plasmamembran beschreibt, größere Ströme zu messen als bei Raumtemperatur [Numberger: *patch-clamp*-Technik; Spektrum]. Deshalb werden die gemessenen Ströme durch die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle *in situ* einer anderen Größenordnung unterliegen. Von besonderem Interesse sind allerdings in diesen Versuchen die Unterschiede in der Stromdichte oder auch den APs, die zwischen entlasteten und normal belasteten Kardiomyozyten zu finden sind. Unter der Voraussetzung, dass alle Kanäle von Temperaturschwankungen in ähnlichem Ausmaß beeinflusst werden, spielen zur Identifizierung eines solchen Verhältnisses die absoluten Werte eine untergeordnete Rolle. Auch Vergleichswerte aus anderen Arbeiten liegen durch Messungen unter Raumtemperatur vor.

Ein großes Problem bei Messungen unter Körpertemperatur stellt das Phänomen des so genannten *Rundown* der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle dar. Dieses Phänomen beschreibt eine schnell eintretende zeitabhängige Verringerung der messbaren Ströme [Numberger: *patch-clamp*-Technik]. Die genaue Ätiologie dieses *Rundowns* der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist bisher nicht im Detail geklärt, scheint aber unter anderem von der Temperatur abhängig zu sein. Durch Verringerung der Temperatur kann diese Verminderung des messbaren Stroms reduziert werden [Numberger: *patch-clamp*-Technik]. Allerdings ist dieses Phänomen auch unter Raumtemperatur noch messbar, was auch bei den hier durchgeführten Versuchen zu bemerken war. Unter diesen Bedingungen existiert aller-

dings ein größerer zeitlicher Spielraum bis zur Verringerung des messbaren Stroms, da der *Rundown* der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle meist erst nach mehreren Minuten beginnt. So zeigte sich in den hier durchgeführten Versuchen eine Halbierung des Stroms nach einer Versuchsdauer von 20min und mehr. Daher konnte ein Einfluss dieses Effekts auf die Ergebnisse durch eine ausschließliche Verwendung der in den ersten Minuten nach Sealbildung durchgeführten Versuche, deren Ergebnisse sich gut reproduzieren ließen, minimiert werden.

### 4.2.2 EGTA

Um eine Kontraktion der Kardiomyozyten zu verhindern wurde der Pipettenlösung 10mM EGTA (*Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat*) zugefügt. Dieses Makromolekül stellt als Chelatbildner einen sehr effektiven Puffer für  $\text{Ca}^{2+}$  dar, wodurch es nach Einbringen der Substanz in den Intrazellulärraum zu einem Sistieren der Kontraktionen der Kardiomyozyten kommt. Hierdurch kann zum einen eine Stabilisierung des Seals zwischen Zelle und Pipette erreicht werden. Zum anderen kann durch die Pufferung von  $\text{Ca}^{2+}$  auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung bestimmter Kanäle wie zum Beispiel der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, weitgehend verhindert werden, was sonst die Ergebnisse beeinflussen könnte [Zygmunt et al 1992].

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bleibt bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung durch EGTA allerdings erhalten [Sham et al. 1997]. Dies liegt daran, dass die Bindungsstelle dieser Kanäle für  $\text{Ca}^{2+}$  sehr nah an der intrazellulären Kanalöffnung direkt unter der Zellmembran liegt. Dieser Bereich unter der Zellmembran wird als *Fuzzy Space* bezeichnet und ist sehr proteinreich. Deshalb steht hier nicht genügend Platz für das relativ große Puffermolekül EGTA zur Verfügung [Peterson et al. 1999; de Leon et al. 1995]. Dadurch kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in diesem Bereich nicht stark genug gesenkt werden um eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu unterbinden. Somit ist es unter diesen Versuchsbedingungen weiterhin möglich die Inaktivierungskonstante  $\tau_1$  des  $I_{\text{CaL}}$ , die weitgehend durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung beschrieben wird, zu bestimmen. Somit stellte EGTA, auch wenn hierdurch ein unphysiologisches Molekül in den Intrazellulärraum eingebracht wird, im Vergleich zu

anderen Puffermolekülen, wie zum Beispiel BAPTA (*1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid*), einen guten Kompromiss dar. Denn BAPTA zum Beispiel verhindert zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und beeinflusst zum anderen die kinetischen Eigenschaften anderer spannungsabhängiger Ionenkanäle in einem stärkeren Ausmaß als EGTA, wodurch es zu einer stärkeren Verfälschung der AP-Längen und des AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms kommen würde [Fauconnier et al. 2003].

### 4.2.3 Identifikation des AP-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch $\text{Cd}^{2+}$

Die während des APs in die Zelle einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurden bestimmt, indem der Gesamtstrom während des APs gemessen wurde. Anschließend wurden die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch  $\text{Cd}^{2+}$  blockiert und die Restströme während des APs gemessen. Der aus diesen beiden Ergebnissen resultierende Subtraktionsstrom stellte den  $\text{Cd}^{2+}$ -sensitiven Strom dar, der weitgehend dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des APs entspricht.

$\text{Cd}^{2+}$  zählt zu den pharmakologischen Blockern des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals [Fox et al. 1987]. Mit der hier verwendeten Konzentration von  $300\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  kann eine effektive Blockade der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erreicht werden.

Allerdings zeigt  $\text{Cd}^{2+}$  sowie andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern, zum Beispiel Blocker aus der Gruppe der Dihydropyridine, keine ausgeprägte Spezifität für eine bestimmte Kanalgruppe [Gotoh et al. 1991]. Das Ion beeinflusst ab einer Konzentration von  $300\mu\text{M}$  neben dem  $I_{\text{CaL}}$  auch die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des transienten  $\text{K}^+$ -Auswärtsstroms  $I_{\text{to}}$  und des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers [Agus et al. 1991]. Somit könnte eine verlangsamte Inaktivierung des  $I_{\text{to}}$  durch  $\text{Cd}^{2+}$  einen kleineren Subtraktionsstrom verursachen, was dazu führen würde, dass die AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme aller Wahrscheinlichkeit nach in den hier durchgeführten Versuchen unterschätzt wurden. Hinzu kommt, dass der  $I_{\text{to}}$  in beiden Versuchsgruppen nicht in gleichem Maße exprimiert wird. Durch chronische Druckentlastung kommt es wie bereits beschrieben zu einer verminderten Expression dieses Kanals. Somit kommt es zu einer geringeren Beeinflussung der Ergebnisse in der Gruppe der entlasteten Kardiomyozyten als in der

Gruppe der physiologisch belasteten Kardiomyozyten was den Betrag des Anstiegs des AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms unter chronischer Druckentlastung weiter beeinflusst. Da allerdings bei allen anderen verfügbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern, wie zum Beispiel Nifedipin, ebenfalls mit derartig einschränkenden Nebeneffekten zu rechnen ist, stellt die in der vorliegenden Arbeit verwendete Hemmkonzentration von  $300\mu\text{m Cd}^{2+}$  einen allgemein akzeptierten Kompromiss dar um den gefragten Strom aus den anderen am Aktionspotential beteiligten Strömen zu isolieren.

#### 4.2.4 Stimulationsrate der Aktionspotentiale

Zur Bestimmung des während des APs in die Zelle gelangenden  $\text{Ca}^{2+}$  wurden die APs mit einer Frequenz von 0,33 Hz ausgelöst, was im Vergleich zur Herzfrequenz der Ratte von über 300/min einem sehr geringen Wert entspricht. Diese niedrige Stimulationsrate könnte Auswirkungen auf die kinetischen Eigenschaften der an der Bildung des APs beteiligten Kanäle haben.

So zeigt zum Beispiel der transiente  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom  $I_{\text{to}}$  frequenzabhängige Zeitkonstanten während seiner Inaktivierung [Shimoni et al. 1995]. Je höher die Frequenz, desto kleiner werden die Zeitkonstanten der Inaktivierung, was in einem kleineren repolarisierende Strom resultiert. Diese Eigenschaften des  $I_{\text{to}}$  sind in den endokardialen Schichten stärker ausgeprägt als in den epikardialen Schichten. So konnte gezeigt werden, dass bei steigenden Stimulationsraten die Länge der APs in den endokardialen Schichten stärker zunehmen als in den epikardialen [Shimoni et al. 1995], da es zu einer schnelleren Inaktivierung des  $I_{\text{to}}$  in den endokardialen Schichten kommt.

Im Bezug auf die vorliegende Arbeit käme es bei höheren Stimulationsraten somit wahrscheinlich zu einer größeren Differenz zwischen der mittleren  $\text{APD}_{90}$  der endokardialen und der epikardialen Schichten. Dies könnte dazu führen, dass die Unterschiede in den Aktionspotentiallängen zwischen epikardialen und endokardialen Schichten sowohl bei den entlasteten als auch bei den normal belasteten Kardiomyozyten unterschätzt wurden.

### 4.2.5 Auswirkungen der verwendeten Narkotika auf den $I_{CaL}$

Die Entnahme der Herzen am Versuchstag wurde nach Absprache mit den zuständigen Behörden mit Hilfe einer volatilen Narkose durch Isofluran durchgeführt.

Volatile Anästhetika zeigen einen starken Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Es wurde beobachtet, dass die Kontraktilität der Kardiomyozyten unter der Wirkung volatilen Anästhetika abnimmt und es zu einer Reduktion der Herzfrequenz kommt. Hieraus resultieren teilweise starke Blutdruckabfälle [Hanley et al. 1998].

Da der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal auch an der zur Kontraktion führenden elektromechanischen Kopplung beteiligt ist, könnte eine derart durchgeführte Narkose die Eigenschaften der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle akut beeinflussen.

Bisher wurde gezeigt, dass die akut negativ inotrope Wirkung volatiler Anästhetika zum einen auf eine verringerte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem SR zurückzuführen ist. Zum anderen scheinen die kontraktilen Filamente, die letztendlich die Kontraktion bewirken, unter volatiler Narkose weniger sensitiv auf  $Ca^{2+}$  reagieren zu können [Hanley et al. 1998]. Eine Beteiligung des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals am negativ inotropen Effekt volatiler Anästhetika ist bisher nicht bekannt, aber auch nicht direkt auszuschließen.

Inwieweit solch ein Effekt dennoch Auswirkungen auf die hier durchgeführten Ergebnisse haben könnte, bleibt zu diskutieren. Es ist bekannt, dass die negativ inotropen Effekte durch volatile Anästhetika sich akut manifestieren und nach Abatmung der Substanzen rasch sistieren. Ein bleibender Effekt volatiler Anästhetika auf die oben erwähnten Parameter der elektromechanischen Kopplung ist nicht bekannt.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Herzen nach der Exposition der Tiere mit dem Anästhetikum vor den Versuchen gewaschen und präpariert, so dass die Kardiomyozyten während der Versuche nicht mehr in Kontakt mit im Blut zirkulierenden Substanzen stehen konnten. Hierdurch kann ein eventueller Effekt der volatilen Anästhetika auf die gesuchten Parameter des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals weitgehend ausgeschlossen werden.



## 4.3 Vergleich zwischen chronischer Druckbelastung und Druckentlastung

### 4.3.1 Regression auf fetale Proteilmuster

Durch die Kopplung an den mütterlichen Kreislauf sind fetale Herzen anderen Bedingungen ausgesetzt als die adulten Organe. So kommt es zum Beispiel nach der Geburt zu einer Umstellung der hämodynamischen Belastung des Herzens, da in der Fetalzeit durch die Umgehungskreisläufe von Lunge und Leber das Herz anderen Drücken ausgesetzt ist als im adulten Kreislauf. Es wird vermutet, dass dies unter anderem eine Erklärung für das vom adulten Herzen abweichende Proteilmuster fetaler Kardiomyozyten darstellen könnte. Kommt es postnatal durch Beginn der Lungenfunktion zu einer Exposition des Herzens an die physiologischen Drücke des adulten Kreislaufs, unterliegen die Kardiomyozyten einer Veränderung der Genexpression, wodurch sich in Bezug auf das Proteilmuster der Zellen der Phänotyp adulter Kardiomyozyten auszubilden beginnt [Rajabi et al. 2007]. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die ventrikulären Druckverhältnisse einen essentiellen Einfluss auf die Genexpression und somit die Proteinausstattung der Kardiomyozyten ausüben [Depre et al. 1998].

Dies lässt sich dadurch bestätigen, dass sich unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, die mit Veränderungen der ventrikulären Drücke einhergehen, die Proteinausstattung fetaler Kardiomyozyten zurückbildet. Einige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Tatsache, ob es zu einer chronischen Drucksteigerung oder Druckminderung in den Ventrikeln kommt, eine eher untergeordnete Rolle spielt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass es in beiden physikalisch entgegengesetzten Situationen zu einer Umstellung der kardialen Energiegewinnung kommt, die der fetaler Kardiomyozyten entspricht [Depre et al. 1998].

Auch der für die Kardiomyozyten zur Kontraktion besonders wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt scheint durch veränderte Druckverhältnisse beeinflusst zu werden. Adulte, normal belastete Kardiomyozyten besitzen ein stark ausgebildetes SR [Escobar et al. 2003]. Die starke Ausprägung dieses intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers deutet darauf hin, dass der zur Kontraktion notwendige Konzentrationsanstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  vorwiegend

durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus diesem Speicher stammt. Der transplasmalemmale  $I_{\text{CaL}}$  übernimmt dahingegen eine eher modulierende Aufgabe, da er den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR über die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den Ryanodinrezeptoren triggert [Escobar et al. 2003]. Allerdings ist der  $I_{\text{CaL}}$  für die Initiation der elektromechanischen Kopplung dennoch essentiell, da es ohne den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär zu keiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR kommen kann [Trafford et al. 2002]. Daher werden zur Initiation der Diastole die im Zytoplasma befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vornehmlich durch eine stark aktive SERCA wieder in den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zurücktransportiert, wohingegen lediglich ein kleinerer Anteil des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär transportiert wird [Escobar et al. 2003; Dibb et al. 2004]. Somit scheint bei adulten Kardiomyozyten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ein- und Ausstrom von extrazellulär, abgesehen von einer modulierenden Funktion, für die Kontraktilität der Kardiomyozyten eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [Escobar et al. 2003].

An Kardiomyozyten fetaler Herzen finden sich allerdings umgekehrte Verhältnisse. Es zeigt sich ein schwach ausgebildetes SR mit geringfügig aktiver SERCA. Aus diesem Grund muss am fetalen Myokard der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär einen stärkeren Beitrag zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg leisten als an adulten Kardiomyozyten [Yasiu et al. 2005; Escobar et al. 2003]. Dies könnte unter anderem durch verhältnismäßig lange APs, eine stärkere Expression der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und der NCX in der Plasmamembran fetaler Kardiomyozyten ermöglicht werden [Cernohorsky et al. 1998]. Durch die starke Expression des NCX könnte ebenfalls erklärt werden, dass zur Initiation der Diastole der Hauptanteil des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär verlagert wird [Vetter et al. 1995]. Somit wird an fetalen Herzen ein größerer Teil des für die Kontraktion der Kardiomyozyten benötigten  $\text{Ca}^{2+}$  von extrazellulär zur Verfügung gestellt und zur Einleitung der Diastole auch wieder in den Extrazellulärraum zurücktransportiert.

Unter chronischer Druckbelastung konnte gezeigt werden, dass die Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes der fetalen Situation ähnelt. Analog zu fetalen Kardiomyozyten scheint der Beitrag des SR durch eine verminderte Aktivität der SERCA reduziert zu werden, während es durch Zunahme der AP-Längen zu einer Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von

extrazellulär zu kommen scheint [Piacentino et al. 2003; Wickenden et al. 1997; Volk et al. 2004].

Dass sich unter chronischer Druckentlastung ähnliche Verhältnisse finden lassen, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Auch hier ließ sich eine Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär zum einen durch eine Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  und zum anderen durch eine Zunahme der AP-Länge nachweisen.

Dies deutet darauf hin, dass es nicht nur in Bezug auf die Energiegewinnung durch chronische Druckbelastung und Druckentlastung in den Ventrikeln zu einer Regression auf fetale Funktionsmuster der Kardiomyozyten zu kommen scheint. Durch Nachweis von analogen Veränderungen in Bezug auf die AP-Länge und den AP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär konnte bestätigt werden, dass die Regression auf fetale Funktionsmuster auch bei diesen Parametern unabhängig davon stattzufinden scheint, ob es zu einer Druckbelastung oder einer Druckentlastung kommt.

### 4.3.2 Vergleich des $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass es unter chronischer Druckbelastung und chronischer Druckentlastung zu einer Regression auf fetale Funktionsweisen der Kardiomyozyten kommt [Depre et al. 1998]. Dies bedeutet, dass durch die beiden physikalisch entgegengesetzten Situationen interessanterweise gleichsinnige Veränderungen ausgelöst werden können, die auch die Regulierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts betreffen.

Derzeit wird diskutiert, inwieweit die Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes durch Regression auf fetale Muster an chronisch druckbelasteten Kardiomyozyten zu einem Verlust der kardialen Pumpfunktion beitragen können [Wickenden et al. 1997]. Da hier vermutlich ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Verschlechterung der Kontraktilität besteht [Wickenden et al. 1997], könnten theoretisch auch an druckentlasteten Kardiomyozyten die Veränderungen des physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes negative Auswirkungen auf die kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten haben.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des APs von extrazellulär chronisch druckentlasteter und chronisch druckbelasteter Kardiomyozyten stellt sich im Vergleich zu normal belasteten Kardiomyozyten als gesteigert dar. Allerdings scheinen die Wege, auf denen dieser gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erreicht wird in den physikalisch gegensätzlichen Situationen nicht komplett überein zu stimmen. Zwar kommt es sowohl bei chronischer Druckbelastung als auch bei chronischer Druckentlastung aufgrund einer Reduktion der repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ströme zu einer Verlängerung der APs [Volk et al. 2004]. Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wird aber in beiden Situationen unterschiedlich reguliert. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es unter chronischer Druckentlastung zu einer Steigerung der Stromdichte des  $\text{I}_{\text{CaL}}$  kommt, wohingegen dieser Strom unter chronischer Druckbelastung keiner Veränderung unterliegt oder sogar reduziert wird [Volk et al. 2004; Hasenfuss et al. 1997]. Als mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte Folgendes dienen: Durch hHTX wird eine maximale Entlastung des linken Ventrikels erzielt. In Tiermodellen, die zur Druckbelastung führen, kann hingegen keine so ausgeprägte Steigerung des linksventrikulären Drucks erzielt werden, die dem Betrag der Entlastung entsprechen würde. Dies würde zu einer akuten Herzinsuffizienz führen und wäre nicht mit dem Leben des Tieres vereinbar. Der Stimulus unter chronischer Druckbelastung ist also geringer als unter chronischer Druckentlastung, was zu den Unterschieden im transplasmalem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit beitragen könnte.

Trotz dieses Unterschiedes führt die Verlängerung der APs in beiden Situationen zu einer Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär. Dies könnte eine gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR nach sich ziehen und so zu einer Verbesserung der kontraktilen Parameter der Zelle führen. Diese Vorgänge konnten durch Aortenstenose chronisch druckbelasteten linksventrikulären Kardiomyozyten auch gezeigt werden [Bouchard et al. 1995; Wickenden et al. 1998; Volk et al. 2004].

Gesteigerte maximale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen während der Systole konnten an durch hHTX druckentlasteten Kardiomyozyten nach zweiwöchiger Entlastung nicht nachgewiesen werden [Ito et al. 2003]. Eine mögliche Erklärung für die Kombination aus konstanter maximaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole und gesteigertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär könnte, wie in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben, ein entleertes SR mit verminderter Sensitivität der RyR sein [Ito et al. 2003]. Bei chronisch

druckbelasteten Herzen scheint die Entleerung des SR allerdings einen zentralen Pathomechanismus bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz darzustellen. Denn das Fortschreiten der Erkrankung ist an eine progrediente Entleerung des SR gebunden, wodurch es bei chronischer Druckbelastung langfristig zu einer Reduktion der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Systole kommt. Ein entscheidender Faktor, der zur Entleerung des SR unter chronischer Druckbelastung beiträgt, ist der Funktionsverlust der SERCA. Durch diesen Funktionsverlust verliert das SR zum einen  $\text{Ca}^{2+}$ , was die systolischen Parameter verschlechtern kann, zum anderen kann  $\text{Ca}^{2+}$  zur Initiation der Diastole nicht mehr so schnell aus der Zelle entfernt werden, wodurch es zu einer Verlängerung der Diastole kommt [Wickenden et al. 1998]. Dies führt so zu einer Verschlechterung sowohl der systolischen als auch der diastolischen kontraktilen Parameter unter chronischer Druckbelastung [Bailey et al. 1992].

Interessanterweise scheinen sich hier allerdings chronische Druckbelastung und Druckentlastung in einem ganz entscheidenden Parameter zu unterscheiden. Während bei der chronischen Druckbelastung durch Funktionsverlust des SR sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion der Kardiomyozyten verschlechtert wird, kommt es bei chronischer Druckentlastung trotz der Entleerung des SR auf bisher ungeklärten Weise lediglich zu einer Verschlechterung einiger diastolischer Parameter [Ito et al. 2003]. So scheint der gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär durch Steigerung der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  und der AP-Länge die systolischen Eigenschaften unter chronischer Druckentlastung kompensieren zu können, während dies bei chronischer Druckbelastung nicht der Fall zu sein scheint. Hier kann lediglich spekuliert werden, ob zum Beispiel die in manchen Veröffentlichungen gezeigte Reduktion der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  unter chronischer Druckbelastung dazu beiträgt, dass der verminderte Füllzustand des SR nicht mehr kompensiert werden kann [Hasenfuss et al. 1997].

Zusammenfassend lässt sich also aussagen, dass sich Kardiomyozyten unter chronischer Druckbelastung und Druckentlastung an die Funktionsweisen fetaler Kardiomyozyten, wie in Kapitel 4.3.1 bereits beschrieben, annähern. In beiden Situationen verschiebt sich die Beteiligung der an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg während der Systole beteiligten Systeme auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär. Allerdings scheinen die Folgen dieser Umstellung in den physikalisch gegensätzlichen Situationen nicht vollkommen überein zu stimmen.

#### 4.4 Vergleich der Entlastung mittels hHTX und VAD

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche sollen dazu dienen, die Vorgänge der Entlastungstherapie insuffizienter Herzen mittels mechanischer Unterstützungssysteme und die daraus resultierende kardiale Atrophie besser verstehen zu können. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Entlastung normal belasteter Kardiomyozyten durch hHTX als Modell für die Entlastung insuffizienter Kardiomyozyten dienen kann.

Inwieweit die Ergebnisse von durch hHTX entlasteten Kardiomyozyten von Ratten auf die Entlastungstherapie am Menschen übertragen werden können, ist umstritten. Kritiker des Entlastungsmodells der hHTX gesunder Organe gehen zum einen davon aus, dass aufgrund der unterschiedlichen Ausgangssituationen bei der Entlastung durch hHTX andere Mechanismen als bei Entlastungstherapie aktiviert werden. Zum anderen könnten die Herzen unterschiedlicher Spezies anders auf eine Entlastung reagieren. Dennoch scheint es Vorgänge am Herzen zu geben, die unabhängig von der Spezies und der Ausgangssituation des Herzens durch hämodynamische Druckentlastung initiiert zu werden scheinen [Doenst et al. 2006].

Gerade diese primär durch hämodynamische Entlastung verursachten Vorgänge sind von besonderem Interesse, können aber nur isoliert durch die Untersuchung gesunder, entlasteter Herzen identifiziert werden. Denn im Falle einer vorausgegangenen Hypertrophie auf dem Boden einer Kardiomyopathie können Veränderungen nicht eindeutig der Entlastung zugeordnet werden, da unter anderem auch die Erkrankung oder die Medikation zu Veränderungen auf zellulärer Ebenen führen können.

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu den primären Veränderungen zählen, die durch chronische hämodynamisch Druckentlastung hervorgerufen werden, sollen diese mit Studien an durch VAD-Therapie entlasteten Herzen verglichen werden.

### 4.4.1 Reduktion der Zellgröße

Bei der Entlastungstherapie insuffizienter und hypertrophierter Herzen kommt es durch die mechanischen Unterstützungssysteme zu einer Reduktion der Herzmasse und auch der zellulären Hypertrophie, wodurch die Herz- und Kardiomyozytengröße wieder physiologische Ausmaße annimmt [Terracciano et al. 2003; Zafeiridis et al. 1998]. Auch bei dem Tiermodell der heterotopen Herztransplantation kommt es zu einer Reduktion der kardialen Masse und der Zellgröße der einzelnen Kardiomyozyten [Nourani et al. 2001]. Hier sinken die Werte allerdings unter die physiologischen Maße, da bereits von normal großen Kardiomyozyten und Herzen ausgegangen wird. Es kommt also zu einer Atrophie der Kardiomyozyten und somit des Herzens. Dennoch kann die Hypothese gestellt werden, dass es durch Reduktion der Vor- und Nachlast zu einer Reduktion der kardialen Masse kommt.

Die Größe des Herzens und der einzelnen Kardiomyozyten ist abhängig von der Arbeit, die der Herzmuskel leisten muss [Korecky & Rakusan 1983; Rakusan et al. 1979; Campbell 1991]. Die Herzarbeit wiederum variiert zum einen mit den Druckverhältnissen in den Kreisläufen und in den Ventrikeln, also der Vor- und der Nachlast, zum anderen kann aber auch eine Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft die Herzarbeit ansteigen lassen. Herzfrequenz und Kontraktionskraft ihrerseits sind wiederum abhängig von der hormonellen Umgebung und der vegetativen Innervation des Herzens. So steigern zum Beispiel Katecholamine als endokrine und parakrine Effektoren des sympathischen Astes des vegetativen Nervensystems die Frequenz und Kontraktionskraft des Herzens. Deshalb führt eine chronisch gesteigerte Konzentration an Katecholaminen zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten [Simpson et al 1985; Simpson et al. 1881]. Neben den Katecholaminkonzentrationen hat auch das RAAS Einfluss auf die kardiale Funktion (siehe Kapitel 1.3.5). Die durch Herzinsuffizienz gesteigerte Konzentration an Angiotensin II, einem Bestandteil des RAAS, bewirkt ihrerseits eine Hypertrophie der Kardiomyozyten. Auch die Schilddrüsenhormone haben Einfluss auf die Herzfunktion. So konnte gezeigt werden, dass chronischer Hyperthyreoidismus unter anderem über eine gesteigerte Expression der  $\beta_1$ -Rezeptoren mit einer

Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten einhergeht und so zu einer Hypertrophie des Herzmuskels führen kann [Sanford et al. 1978].

Um nun die hHTX als Modell für eine Entlastungstherapie verwenden zu können sollten in beiden Situationen dieselben Faktoren zu der Reduktion der Zellgröße beitragen.

Hierbei stößt man zunächst auf das Problem der bei der Herztransplantation herbeigeführten Denervierung des Herzens, die zu einer Reduktion der parakrinen Effekte des vegetativen Nervensystems führt. Wird das Herz von der vegetativen Innervierung getrennt, kommt es zu einer Reduktion der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft. Gerade Ratten besitzen eine extrem hohe Herzfrequenz von ca. 300 Schlägen/min, die nach der Transplantation um beinahe 50% sinkt (siehe Kapitel 3.1.1). Zwar trägt auch die hämodynamische Entlastung dazu bei, dass es zu einer Reduktion der Herzfrequenz kommt, der Beitrag der Denervierung zur Reduktion der Herzfrequenz ist dennoch nicht zu unterschätzen. Man könnte also argumentieren, dass die durch Denervierung herbeigeführte Reduktion der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft einen Beitrag zu der Reduktion der Zellgröße leisten könnte. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei hHTX eine gesteigerte Konzentration an Katecholaminen die Reduktion der Zellgröße des transplantierten Herzens nicht inhibieren konnte, das native Herz der Empfänger allerdings hypertrophierte [Petrie et al. 1994]. Außerdem lässt sich durch eine spezielle Form der heterotopen Herztransplantation, durch die eine gewisse Vor- bzw. Nachlast auf dem transplantierten Herzen ruht, trotz Denervierung des Herzens eine Atrophie der Kardiomyozyten weitgehend verhindern [Galinares et al. 1994]. Somit scheint die Denervierung ohne hämodynamische Entlastung des Herzens nur einen geringen Einfluss auf die Größe der Kardiomyozyten zu haben [Petrie et al. 1994; Klein et al. 1991]. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Denervierung nicht den Hauptteil zur Reduktion der Herzmasse beiträgt.

Des Weiteren sind bei dem Modell der heterotopen Herztransplantation die Herzen beider Versuchsgruppen den gleichen im Kreislauf zirkulierenden endokrinen Hormonkonzentrationen ausgesetzt, da sich beide Organe im selben Individuum befinden. Hierdurch sind die endokrinen Effekte der im Blut zirkulierenden Hormone auf beide Organe gleich.



Unter mechanischer Unterstützungstherapie bleibt die Innervation des Herzens intakt. Allerdings kommt es durch eine Verbesserung der peripheren Durchblutung zu einer Reduktion der Sympathikusaktivität [Dipla et al.1998]. Dies führt zum einen zu einer Senkung der im Kreislauf zirkulierenden Katecholamine, zum anderen auch zu einer verminderten parakrinen Stimulation durch die sympathischen Nervenfasern direkt am Herzen. Dies hat eine Reduktion der Frequenz und der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten zur Folge. Inwieweit dies zur Reduktion der Zellgröße beitragen könnte, ist unbekannt. Außerdem besteht bei Patienten die an einer Herzinsuffizienz leiden, durch die in den meisten Fällen durchgeführte medikamentöse Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren zu einer sympathischen Abschirmung, weshalb der Einfluss der Katecholamine umstritten ist. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass diese verminderte Konzentration an Katecholaminen in der Zirkulation dennoch einen Stimulus für die Reduktion der Zellgröße darstellen könnte.

Somit kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Denervierung bei der hHTX und die sinkenden Katecholaminspiegel bei der VAD-Therapie einen Beitrag zu der Reduktion der kardialen Massen leisten können. Allerdings kann dennoch davon ausgegangen werden, dass sinkende Katecholaminkonzentrationen keinen isolierten Beitrag zur Reduktion der Kardiomyozytengröße leisten [Petrie et al. 1994; Klein et al. 1991] und ohne die hämodynamische Entlastung wohl weniger ausgeprägt stattfinden würde.

### 4.4.2 Elektrophysiologische Veränderungen

Kardiomyopathien sind durch zahlreiche Veränderungen insbesondere auch der Elektrophysiologie der Kardiomyozyten gekennzeichnet (siehe Kapitel 1.3.2). Diese Veränderungen prädisponieren den Herzmuskel für ventrikuläre Arrhythmien, die deshalb eine häufige Komplikation von Kardiomyopathien darstellen. Es wird davon ausgegangen, dass die Ursache dieser Neigung zur Ausbildung ventrikulärer Arrhythmien ätiologisch in einer Verlängerung der APs zu suchen ist [Harding et al. 2001; Volk et al. 2000]. Eine solche Verlängerung der APs zeigt sich im Oberflächen-EKG in einer Verlängerung der QT-Zeiten, die in den Ableitungen chronisch erkrankter

Herzen oft zu finden ist. Durch verlängerte APs kommt es über dem gesamten Ventrikel zu einer Verzögerung der Repolarisation, wodurch Extrasystolen, die in jedem gesunden Myokard auftreten können, in derart erkranktem Myokard auf nur teilweise refraktäres Gewebe treffen. Hierdurch kommt es zu einer Ausbildung pathophysiologischer Erregungsausbreitungen, die sich in Form von ventrikulären Tachykardien äußern können.

Um das Risiko dieser Rhythmusstörungen minimieren zu können sollte sich unter mechanischer Unterstützungstherapie die Länge der APs und der QT-Zeiten im Oberflächen-EKG normalisieren. Interessanterweise wird allerdings nach der Implantation des Pumpensystems initial eine weitere Zunahme der QT-Zeiten beschrieben, die auf eine erneute Verlängerung der APs zurückzuführen ist [Harding et al. 2005]. Auch bei Reduktion der Vorlast in den Ventrikeln durch perkutane Koronarintervention nach einem Myokardinfarkt kann es zu Verlängerungen der QT-Zeiten kommen [Kawabata et al. 2008]. Hierdurch erklärt man sich auch das in der Anfangsphase der Behandlung erhöhte Risiko für Arrhythmien [Harding et al. 2001; 2005; Kawabata et al. 2008]. Welche zellulären Vorgänge allerdings zu dieser Verlängerung der APs führen und wie es dazu kommt, dass sich die QT-Zeiten nach einigen Wochen bis hin zu Monaten nach Therapiebeginn wieder normalisieren, ist derzeit nicht bekannt. Dennoch scheint eine reduzierte Länge der APs mit einem sinkenden Risiko für ventrikuläre Tachykardien einherzugehen, was darauf hindeutet, dass Normalisierung der Länge der APs einen entscheidenden Faktor in der VAD-Therapie darstellen könnte [Harding et al 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es bei hämodynamischer Entlastung durch eine hHTX an Ratten ebenfalls zu einer Verlängerung der APs kommt. Ob es bei längerer Entlastung auch zu einer Normalisierung der AP-Länge kommen würde, ist unbekannt.

Auch wenn nicht bekannt ist ob der zur Verlängerung der APs führende Mechanismus in beiden Situationen identisch ist, scheint es dennoch durch hämodynamische Entlastung sowohl unter mechanischer Unterstützungstherapie als auch nach hHTX zu dieser gleichsinnigen Veränderung in der elektrophysiologischen Funktionsweise der Kardiomyozyten zu kommen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine Reduktion der über den Ventrikelwänden lastenden Drücke unabhängig von der Spezies und der

kardialen Vorgeschichte zu einer Verlängerung der APs führen kann und somit zu den primär durch hämodynamische Entlastung herbeigeführten Faktoren zählt.

Neben diesen Verlängerungen der APs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es im Vergleich zu normal belasteten Kardiomyozyten zu einer Steigerung der Stromdichte des  $I_{CaL}$  an durch hHTX entlasteten Kardiomyozyten kommt. Die Untersuchung dieses Parameters an durch VAD-Therapie entlasteten Kardiomyozyten menschlicher Herzen konnte ebenfalls zeigen, dass es bei erkrankten Kardiomyozyten, die eine reduzierte Stromdichte des  $I_{CaL}$  aufwiesen, unter Therapie zu einem erneuten Anstieg dieses Parameters kam [Terracciano et al. 2003]. Somit scheint hämodynamische Entlastung ein Trigger zur Steigerung der Stromdichte des  $I_{CaL}$  zu sein, wodurch auch dieser Parameter zu den primär durch die Hämodynamik beeinflussbaren Faktoren zählen könnte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es tatsächlich Faktoren zu geben scheint, die unabhängig von der Ausgangssituation und der Spezies durch hämodynamische Entlastung des Herzens reguliert werden. Hierzu gehören neben der Reduktion der Kardiomyozytengröße die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der Stromdichte des  $I_{CaL}$  und die Verlängerung der APs.

### 4.4.3 Der $Ca^{2+}$ -Haushalt im Vergleich

Die hier durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass es unter chronischer Druckentlastung durch hHTX zu einer Steigerung der Stromdichte des  $I_{CaL}$  kommt. Interessanterweise zeigt sich aber unter diesen Versuchsbedingungen keine Steigerung der maximalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration während der Systole [Ito et al.2003]. Zu erklären ist dies durch die unter chronischer Druckentlastung durch hHTX stattfindende Entleerung der des SR. Im Gegensatz zu dieser Reduktion des Füllzustandes des SR kommt es unter VAD-Therapie zu einem Wiederauffüllen des SR [Terraciano et al. 2003]. Welche Ursachen dem zugrunde liegen ist nicht bekannt. Allerdings könnte eine mögliche Erklärung die Steigerung der Antwortfähigkeit der Kardiomyozyten auf Katecholamine unter Entlastungstherapie sein. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Phosphorylierung zum Beispiel von PLB, was durch Enthemmung der SERCA zu einem Wiederansteigen des  $Ca^{2+}$ -Gehalts des SR führen könnte [Margulies et al.2003;

Gupta et al.2005]. Somit unterscheiden sich beide Formen der Entlastung in diesem Parameter. Allerdings zeigt dieser Unterschied zwischen den beiden Entlastungsformen, dass es neben den primär durch hämodynamische Entlastung hervorgerufenen Veränderungen auch Veränderungen zu geben scheint, die sich in Abhängigkeit von der Ausgangssituation, der Entlastungszeit und Entlastungsintensität und vielleicht sogar der Spezies vollziehen.

### 4.5 Auswirkungen der Erkenntnisse auf die VAD-Therapie

In einigen klinischen Studien wurde gezeigt, dass die mechanische Entlastungstherapie mittels Pumpenimplantation nicht nur zur zeitlichen Überbrückung bis zu einer Herztransplantation dienen kann, sondern auch als langfristige Therapie zur Wiederherstellung der endogenen Pumpfunktion des Herzens [Birks et al. 2006; Dandel et al. 2005]. Bei derart behandelten Herzen zeigte sich, dass das Organ nach Explantation des Pumpensystems aufgrund erneuter Umbauprozesse im Myokard wieder erfolgreich selbstständig arbeiten konnte. Somit könnte eine elektive Implantation dieser Unterstützungssysteme als zukünftige Therapie der Herzinsuffizienz indiziert sein, wenn man Patientengruppen ausreichend evaluieren und die Therapie derart optimieren könnte, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Eintreten der Reversion des zur Insuffizienz führenden Umbauprozesses zu rechnen ist.

Insbesondere aufgrund der Ähnlichkeit der pathophysiologischen Vorgänge bei chronischer Druckbelastung und chronischer Druckentlastung wurde befürchtet, dass es durch langzeitige hämodynamische Druckentlastung erneut zu einer Degeneration der kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten kommen könnte (siehe Kapitel 4.3.2). Dies konnte im Tiermodell der heterotopen Transplantation bereits insuffizienter Herzen bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass sich die positiven Auswirkungen der Druckentlastung auf das erkrankte Myokard in einem bestimmten Zeitraum abzuspielen scheinen. Bei Fortbestehen der hämodynamischen Entlastung über diesen Zeitpunkt hinaus kam es zu einer erneuten Verschlechterung der Kardiomyozytenfunktion, insbesondere der diastolischen Parameter [Oriyanhan et al. 2006].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung der Stromdichte des  $I_{CaL}$  und neben der Zunahme der AP-Länge auch zu einer Steigerung des AP-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms bei durch hHTX entlasteten linksventrikulären Kardiomyozyten von Ratten kommt. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit bereits bekannten Ergebnissen von mittels VAD entlasteten Herzen zeigte sich, dass diese Veränderungen primär durch chronische hämodynamische Entlastung unabhängig von der Ausgangssituation zustande zu kommen scheinen. Aufgrund der Parallelen zur chronischen Druckbelastung kann befürchtet werden, dass diese primär durch chronische Druckentlastung zustande kommenden Veränderungen, die in dieser Arbeit aufgezeigt werden konnten nicht nur positive Effekte auf die Funktion des Herzmuskels haben könnten. Aber gerade die Faktoren, die zu einer solchen Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion führen könnten, sind von besonderem Interesse, da diese Faktoren zum Beispiel durch pharmakologische Intervention oder zeitliche Begrenzung der Entlastungszeit eventuell umgangen werden könnten. Hierin bestünde eine Möglichkeit zur Optimierung der VAD-Therapie.

### 5. Zusammenfassung

Viele Kardiomyopathien führen im Rahmen einer Herzinsuffizienz zu einer Veränderung der Genexpression, die dem fetalen Expressionsmuster von Kardiomyozyten ähnelt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass diese Regression auf fetale Funktionsweisen langfristig zu einer Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion führt. Die Implantation von mechanischen Unterstützungssystemen führt zur Druckentlastung der erkrankten Herzen, was zu einer erneuten Verbesserung der Herzleistung führt. Allerdings wurde an Entlastungsmodellen im Tierversuch gezeigt, dass in Bezug auf zahlreiche Proteine die fetale Genexpression unter chronischer Druckentlastung erhalten bleibt, also derjenigen druckbelasteter Kardiomyozyten ähnelt. So scheinen die physikalisch gegensätzlichen Situationen der Druckbelastung und Druckentlastung zu ähnlichen Veränderungen in den Kardiomyozyten zu führen.

Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich wesentliche Bestandteile des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes wie der  $I_{\text{CaL}}$ , die AP-Längen und der AP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom unter chronischer Druckentlastung ähnlich verhalten würden, wie unter chronischer Druckbelastung. Um dies zu untersuchen wurden die Herzen männlicher Lewis-Ratten durch hHTX für zwei Wochen entlastet, anschließend auf die gesuchten Parameter hin untersucht und mit den nativen Herzen verglichen. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der Stromdichte des  $I_{\text{CaL}}$  bei unveränderter Strom-Spannungsabhängigkeit und unveränderten kinetischen Eigenschaften. Stromkurven mit den Eigenschaften eines  $I_{\text{CaT}}$  konnten nicht identifiziert werden, weshalb eine Reexpression des T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden kann. Der AP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zeigte analog zu den AP-Längen in den endokardialen als auch den epikardialen Schichten einen Anstieg. Unter chronischer Druckbelastung kommt es insbesondere aufgrund einer Verlängerung der APs genauso wie bei Druckentlastung zu einer Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär.

Dies bestätigt die Hypothese, dass es in den physikalisch entgegengesetzten Situationen der Druckbelastung und Druckentlastung im Hinblick auf wesentliche Bestandteile des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes zu ähnlichen Veränderungen zu kommen scheint.

## **6. Literaturverzeichnis**

Agus Z.S., Dukes I.D., Morad M. (1991): Divalent kations modulate the transient outward current in rat ventricular myocytes ;

*Am. J. Phsy.*; **261**: C310-C318

Antzelevitch C. (2008): Drug-induced spatial dispersion of repolarization;

*Cardiology Journal*; **15, 2**: 100–121

Anversa P., Olivetti G., Hiler B., Ricci R., Guideri G. (1986): Myocyte cell loss and myocyte hypertrophie in aging rat heart;

*J. Am. Cell. Coll. Cardiol.*; **8**: 1441-1448

Bailey B.A., Houser S.R. (1992): Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy induced by slow progressive pressure overload.

*J. Mol. Cell. Cardiol.*; **24(4)**:365-73.

Bartelds B., Knoester H., Beaufort –Krol G.C., Smid G.B., Takens J., Zijlstra W.G., Heymanns H.S., Kuipers J.R. (1999): Myocardial lactate metabolism in fetal and newborn lambs;

*Circ.*; **99**: 1892-1897

Bartelds B., Gratama J.W., Knoester H., Takens J., Smid G.B., Aarnoudse J.G., Heymanns H.S., Kuipers J.R. (1998): Perinatal changes in myocardial supply and flux of fatty acids, carbohydrates and ketone bodies in lambs;

*Am. J. Phys*; **274**: H1962-H1969

Bartling B., Milting H., Schumann H., Darner D., Arusoglu L., Koerner M.M., El-Bayanosy A., Koerfer R., Holtz J., Zerkowsk H.R. (1999): Myocardial gene expressions of regulators of myocyte echanic and myocyte Ca<sup>2+</sup> homeostases during hemodynamic unloading by devices in patients with end-stage heart failure;  
*Circ.*; **100**: H216-H223

Bauriedel G., Skowatsch D., Lüderitz B. (2005): Die chronische Herzinsuffizienz;  
*Deutsches Ärzteblatt*; **Heft 9**: 592-601

Bean B.P. (1985): Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology;  
*J. Gen. Physiol.*; **86**: 1–30

Bedi M., Kormos R., Winowitch S., McNamara D.M., Mathier M.A., Murali S. (2007): Ventricular arrhythmias during left ventricular assist device;  
*Am. J. Cardiol.*; **99(8)**: 1151-1153

Berjukow S., Marksteiner R., Sokolov S., Weiss R.G., Margreiter E., Hering S. (2001): Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during Ca(v)2.1 inactivation;  
*J. Biol. Chem.*; **276**: 17076–17082

Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003): *Review*: Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling;  
*Nature*; **4**: 517-529

Bers D.M. (2000): Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction;  
*Circ. Res.*; **87**: 275-281



- Bers D.M. (2002): *Review: Cardiac excitation-contraction coupling;*  
*Nature*; **415**: 198-205
- Bers D.M., Despa S. (2006): *Review: Cardiac myocytes Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> regulation in normal and failing hearts;*  
*Pharmacol. Sci*; **100**: 315-322
- Bers D.M. (2006): *Review: Altered cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> regulation in heart failure;*  
*Physiology*; **21**: 380-387
- Bichet D., Cornet V., Geib S., Carlier E., Volsen S., Hoshi T., Mori Y., De Waard M. (2000): The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit;  
*Neuron*; **25**: 177-190
- Birks E.J., Tansley P.D., Hardy J., George R.S., Bowles C.T., Burke M., Banner N.R., Khagani A., Yacoub M.H. (2006): Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure;  
*NEJM*; **355(18)**:1873-84
- Bondarenko V.E, Bett G.C, Rasmusson R.L. (2004): A model of graded calcium release and L-type Ca<sup>2+</sup> channel inactivation in cardiac muscle.  
*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **286(3)**:H1154-69
- Boucek M.M., Kanakriyeh M.S., Mathis C.M., Truim R.F., Bailey L.L. (1990): Cardiac transplantation in infancy: donors and recipients;  
*J. Pediatr.*; **116**: 171-176

Bouchard R.A., Clark R.B., Giles W.R. (1995): Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements;

*Circ. Res.*; **76**: 790-801

Brette F., Leroy J., Le Guennecc J.Y., Salle´ d L. (2006): Ca<sup>2+</sup> currents in cardiac myocytes: Old story, new insights\$

*Prog. Bioph. Mol. Biol.*; **91**: 1–82

Bristow M.R., Ginsburg R., Minobe W., Cubicciotti R.S., Sagemann S.W., Lurie K., Billingham M.E., Harrison D.C., Stinson E.B. (1982): Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human heart;

*J. of Med.*; **307**: 205-211

Bristow M.R., Anderson F.L., Port J.D., Skerl L. Hershberger R.E., Larrabee P., O'Connell J.B., Renlund D.G., Volkman K., Murray J. (1991): Differences in beta adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy;

*Circ.*; **84**: 1024-1039

Brodde E.O. 1991:  $\beta_1$  and  $\beta_2$ adrenoreceptors in the human heart: properties, functions and alterations in chronic heart failure;

*Pharm. Rev.*; **43**: 204-242

Bryant S.M., Shipsey S.J., Hart G. (1999): Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy;

*Cardiovasc. Res.*; **42**: 391-401

Campbell S.E., Korecky B., Rakusan K. (1991): Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic Rat Hearts;

*Circ. Res.*; **68**: 984-996

Campbell D.L., Rasmusson R.L., Qu Y., Strauss H.C. (1993): The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. Basic characterization and kinetic analysis;

*J. Gen. Physiol.*; **101**: 571–601

Carbone E., Lux H.D. (1987): Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current in chick and rat sensory neurones.

*J. Phys.*; **386**: 547–570, 1987.

Carbone E., Lux H.D. (1987): Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones;

*J. Phys.*; **386**: 571–601, 1987.

Catterall W.A. (2000): Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

*Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*; **16**: 521–555

Cazorla O, Lacampagne A, Fauconnier J, Vassort G. (2003): SR33805, a  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist with length-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitizing properties in cardiac myocytes.

*Br. J. Pharmacol.*; **139(1)**:99-108.

Cernohorsky J., Ek Koltař F., Pelouch V.C., Korecky B., Vetter R. (1998): Thyroid control of sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in developing rat heart;

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **275**:264-273

Cohen I., Giles W., Noble D. (1976): Cellular basis for the T-wave of the electrocardiogram;

*Nature*; **262**: 657-661

Collins K.A., Korcarz C.E., Shroff S.G., Bednarz J.E., Fentzke R.C., Lin H., Leiden J.M., Lang R.M. (2001): Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice;

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **280**: H1954-H1962

Costantin J.L., Qin N., Zhou J., Platano D., Birnbaumer L., Stefani E. (1998): Long lasting facilitation of the rabbit cardiac Ca<sup>2+</sup> channel: correlation with the coupling efficiency between charge movement and pore opening;

*FEBS Lett*; **423**: 213–217.

Corey D.P., Stevens C.F. (1983): Science and technology of patch-recording electrodes. In Sakmann B. and Neher E. (Eds.);

*Single-channel Recordings*; Plenum Press, New York and London, pp. 53-68

Cribbs L.L., Lee J.H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Perez-Reyes E. (1998): Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family;

*Circ. Res.*; **83**: 103–109

Dandel M., Wenig Y., Siniawski H., Potapov E., Lehmkuhl H.B., Hetzer R. (2005): Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices;

*Circ.*; **112**: I-37-I-45

De Jongh K.S., Murphy B.J., Colvin A.A., Hell J.W., Takahashi M., Catterall W.A. (1996): Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase;

*Biochemistry*; **35**: 10392–10402.

de Leon M., Wang Y., Jones L., Perez-Reyes E., Wei X., Soong T.W., Snutch T.P., Yue D.T. (1995): Essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif for  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels;

*Science*; **270**: 1502–1506

Depre C., Shipley G.L., Chen W., Han Q., Doenst T., Moore M.L., Stepkowski S., Davies P.J.A., Taegtmeyer H. (1998): Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy;

*Nat. Med.*; **4**: 1269-1275

Despa S., Islam A.M., Weber C.R., Pogwizd S.M., Bers D.M. (2002):

Intracellular  $\text{Na}^+$  concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged;

*Circ.*; **105**: 2543-2548

De Waard M., Campbell K.P. (1995): Subunit regulation of the neuronal  $\alpha 1\text{A}$   $\text{Ca}^{2+}$  channel expressed in *Xenopus* oocytes;

*J. Phys.*; **485 (Part 3)**: 619–634

Dibb K.M., Rueckschloss U., Eisner D.A., Isenberg G., Trafford A.W. (2004): Mechanisms underlying enhanced cardiac excitation contraction coupling observed in senescent sheep myocardium;

*J. Mol. Cell. Cardio.*; **37**: 1171-1181

Dipla K., Mattiello J.A., Jeevanandam V., Houser S.R., Margulies K.B. (1998): Myocyte Recovery after Mechanical Circulatory Support in Humans with end-stage Heart failure;

*Circ.*; **97**: 2316-2322

Doenst T., Bugger H., Leippert S., Barleon B., Marme D., Beyersdorf F. (2006): Differential gene expression in response to ventricular unloading in rat and human myocardium;

*Thorac. Card. Surg.*; **54**: 381-387

Dolphin A.C. (2003): G protein modulation of voltage-gated calcium channels; *Pharmacol. Rev.*; **55**: 607–627

Dolphin A.C. (2003a): Beta subunits of voltage-gated calcium channels; *J. Bioenerg. Biomembr.*; **35**: 599–620

Dzhura I., Wu Y., Colbran R.J., Balser J.R., Anderson M.E. (2000): Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels; *Nat. Cell. Biol.*; **2**: 173–177

Ertel E., Tsien R.W. (2000): Nomenclature of voltage-gated Calcium channels; *Neuron*; **25**: 533-535

Escobar A.L., Ribeiro-Costa R., Villalba-Galea C., Zoghbi M.E., Perez C.G., Mejia-Alvarez R. (2003): Developmental changes of intracellular Ca<sup>2+</sup> transients in beating rat hearts; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **286**: H971-H978

Fauconnier J., Bedut S., Le Guennec J.Y., Babuty D., Richard S. (2003): Ca<sup>2+</sup> current mediated regulation of action potential by pacing rate in rat ventricular myocytes; *Cardiovasc. Res.*; **57**: 670-680

Fox A.P., Nowycky M.C., Tsien R.W. (1987): Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons; *J. Phys.*; **394**: 149-172

Franz M.R., Bargheer K., Raffenbeul W., Haverich A., Lichtlen P.R. (1987): Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence fro the genesis of the T-wave;

*Circ.*; **75**: 379-386

Fedida D., Giles W.R. (1991): Regional variations in action potential and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle;

*J. Phys.*; **442**: 191-209

Gabrellus F., Schmid C., Levkau B., Stypmann J., Scheld H.H., Baba H.A. (2003): Myocardiale Veränderungen unter mechanischer linksventrikulärer Unterstützungstherapie;

*Patho.*; **24**: 83-90

Galinares M., Zhai X., Hearse D.J. (1995): The Effect of Load on Atrophy, Myosin Isoform Shifts and Contractile Function: Studies in a Novel Rat Heart Transplant Preparation;

*Cardio.Vasc.Res.*; **27**: 407-417

Ginsburg R., Bristow M., Billingham M.E., Stinson E.B., Schroeder J., Harrison D.C. (1983): Study of the normal and the failing human heart: decreased response of failing heart to isoproterenol;

*Am. Heart J.*; **106**: 53-.540

Goldmann S. (1991): Stoltefuß, J.: 1,4-Dihydropyridine: Einfluss von Chiralität und Konformation auf die Calcium-antagonistische und -agonistische Wirkung;

*Angew. Chemie*; **103**: 1587-1605

Goodwin G.W., Taylor C.S., Taetgmeyer H. (1998): Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work;

*J. Biol. Chem.*; **273**: 29530-29539

Gotoh Y., Imaizumi Y., Watanabe M., Shibata E.F., Clark R.B., Giles W.R. (1991): Inhibition of transient outward  $K^+$  current by DHP  $Ca^{2+}$  antagonists and agonists in rabbit cardiac myocytes;

*Am. J. Phys.*; **260**: H1737-H1742

Gupta R.C., Mishra S., Rastogi S., Sharov V.G., Sabbah H.N. (2005): Improvement of cardiac sarkoplasmic reticulum calcium cycling in dogs with heart failure following long-term therapy with the Acorn Cardiac Support Device;

*Heart fail. Rev.*; **10**: 149-155

Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M. (1988): Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells;

*J. Phys.*; **395**: 233-253

Hanley J.P., Loiselle D.S. (1998): Mechanism of force inhibition by halothane and isoflurane in intact rat cardiac muscle;

*J. Phys.*; **506.1**: 231-244

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981): Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches;

*Pfluegers Arch.*; **391**: 85-100

Harding J.D., Piacentino V., Rothman S., Chambers S., Jessup M., Marqulies K.B. (2005): Prolonged repolarization after ventricular assist device support is associated with arrhythmias in humans with congestive heart failure;

*J. Card. Fail.*; **11(3)**: 227-232



Harding J.D., Piacentino V., Gaughan J.P., Houser S.R., Margulies K.B. (2001): Electrophysiological alterations after mechanical circulatory support in patients with advanced cardiac failure;

*Circ.*; **104**: 1241-1247

Hartzell, H.C., Mery, P.F., Fischmeister, R., Szabo, G. (1991): Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation;

*Nature*; **351**: 573–576.

Hasenfuss G. (1997): Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure;

*Cardiov. Res.*; **37**: 279-289

Heerd P.M., Holmes J.W., Cai B., Barbone A., Madigan J.D., Reiken S., Lee D.L., Oz M.C., Marks A.R., Burkhoff D. (2000): Chronic unloading by left ventricular assist device reverses contractile dysfunction and alters gene expression in end-stage heart failure;

*Circ.*; **102**: 2713-2719

Hering S., Aczel S., Grabner M., Doring F., Berjukow S., Mitterdorfer J., Sinnegger M.J., Striessnig J., Degtiar V.E., Wang Z., Glossmann H. (1996): Transfer of high sensitivity for Benzothiazepines from L-type to Class A (BI) calcium channels;

*J. Biol. Chem.*; **271**: 24471–24475

Isenberg G., Kloeckner U. (1982): Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium”;

*Pfluegers Arch.*; **359**: 6-18

Ito K., Nakayama M., Hasan F., Yan X., Schneider M.D., Lorell B.H. (2003): Contractile Reserve and Calcium Regulation are depressed in Myocytes from Chronically Unloaded Hearts;

*Circ.*; **107**: 1176-1182

Jessup M., Brozena S. (2003): Heart Failure;  
*NEJM*; **348**: 2007-2018

Jones S.W. (1998): Overview of voltage-gated Calcium channels;  
*Biomembr.*; **30**:299-312

Kaprielian R., Wickenden A.D., Kassiri Z., Parker T.G., Liu P.P., Backx P.H. (1999):  
Relationship between K<sup>+</sup>-channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular  
myocytes following myocardial infarction;  
*J. Phys.*; **517.1**: 229-245

Kawabata M., Hirao K., Takeshi S., Sakurai K., Inagaki H., Hachiya H., Isobe M.  
(2008): Torsades de pointes related to transient marked QT prolongation following  
successful emergent percutaneous coronary intervention for acute coronary syndrome;  
*J. Electrocardiol.*; **41(2)**:117-22.

Keung E.C. (1989): Calcium current is increased in isolated adult from hypertrophied  
rat myocardium;  
*Circ. Res.* **64**: 753-763

Kilborn M.J., Fedida D (1990): A study of the developmental changes in outward  
currents in rat ventricular myocytes;  
*J. Phys.*; **430**: 37-60

Kinoshita M., Takano H., Taenaka Y., Takaichi S., Nakatani T. (1996): Influence of  
prolonged ventricular assistance on myocardial histopathology in intact heart;  
*Ann. Thorac. Surg.*; **61**: 640-645

Klein I., Hong C., Schreiber S.S. (1991): Isovolumic Loading prevents Atrophy of the  
Heterotopically Transplanted Rat Heart;  
*Circ. Res.*; **69**: 1421-1425

Klockner U., Mikala G., Varadi M., Varadi G., Schwartz A. (1995): Involvement of the carboxyl-terminal region of the alpha 1 subunit in voltage-dependent inactivation of cardiac calcium channels;

*J. Biol. Chem.*; **270**: 17306–17310.

Klockner U., Lee J.H., Cribbs L.L., Daud A., Hescheler J., Pereverzev A., Perez-Reyes E., Schneider T. (1999): Comparison of the Ca<sup>2+</sup> currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels;

*Eur. J. Neurosci.*; **11**: 4171–4178

Korecky B., Rakusan K. (1983): Morphological and physiological aspects of cardiac atrophy; in Alpert NR (ed): Perspectives in cardiovascular research: Myocardial Hypertrophy and failure;

*New York, Raven Press, Publishers*; vol **7**: pp293-309

Korecky B., Masika M. (1991): Direct Effect of Increased Hemodynamic Load on Cardiac Mass;

*Circ. Res.*; **68**: 1174-1178

Korvald C., Elvenes O.P., Myrnes T. (2000): Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo;

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; **278**: H1345-H1351

LeMoine C.M., McClelland G.B., Lyons C.N., Mathieu-Costello O., Moyes C.D. (2006): Control of mitochondrial gene expression in the aging rat myocardium;

*Biochem. Cell. Biol.*; **84(2)**: 191-198

Levin H.R., Oz M.C., Pecker M., Rose E.A., Burkhoff D. (1995): Reversal of chronic ventricular dilatation in Patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading;

*Circ.*; **91**: 2717-2720

Liao P., Yu D., Lu S., Tang Z., Liang M.C., Zeng S., Lin W., Soong T.W. (2004): Smooth muscle-selective alternatively spliced exon generates functional variation in Cav1.2 Calcium Channels;

*J. biol. Chem.*; **279**, **48**: 50329–50335

Liang H., DeMaria C.D., Erickson M.G., Mori M.X., Alseikhan B.A., Yue D.T. (2003): Unified mechanisms of Ca<sup>2+</sup> regulation across the Ca<sup>2+</sup> channel family;

*Neuron*; **39**: 951–960.

Liew C. C., Dzau V. J. (2004): Molecular genetics and genomics of heart failure;

*Nature Rev.*; **5**: 911-825

Linz K.W., Meyer R. (1998): Control of L-Type Ca<sup>2+</sup>-current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes;

*J. Phys.*; **513**: 425-442

London B., Baker L.C., Petkova-Kirova P., Nerbonne J.M., Choi B.K., Salama G. (2007): Dispersion of repolarization and refractoriness are determinants of arrhythmia phenotype in transgenic mice with long QT;

*J. Phys.*; **578**: 115-129

Mangoni M.E., Couette B., Bourinet E., Platzer J., Reimer D., Striessnig J., and Nargeot J. (2003): Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity;

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; **100**: 5543–5548

Marban E., O'Rourke B. (1995); Calcium channels: structure function and regulation; *Car. Electrophys.*; edited by D. P. Zipes and J. Jalife. Philadelphia, PA: Saunders, 11–21

Marksteiner R., Schurr P., Berjukow S., Margreiter E., Perez-Reyes E., Hering S. (2001): Inactivation determinants in segment IIS6 of Ca(v)3.1.; *J. Phys.*; **537**: 27–34.

Marguliez K.B. (2003): Blocking stretched induced myocardial remodelling; *Circ. Res.*; **93**: 1020-1022

Martinez M.L., Heredia M.P., Delgado C. (1999): Expression of T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Ventricular Cells from Hypertrophied Rat Hearts; *J. Mol. Cell. Card.*; **31**:1617-1625

Marty A., Neher E. (1995): Tight-seal whole-cell recording. In Sakmann B. and Neher E. (Eds.); *Single-Channel Recordings*; Plenum Press, New York and London, pp. 31-51.  
McConcey D.J., Orrenius S. (1996): The role of Calcium in the regulation of apoptosis; *J. Leucocyte Biol.*; **272**: 21227-21232

Milton R.L., Caldwell J.H. (1990): How do patch clamp seals form? A lipid bleb model; *Pflügers Arc.*; **416**: 758-762

Mueller J., Wallukat G., Weng Y., Dandel M., Spiegelsberger S., Semrau S., Brandes K., Theodorides V., Loebe M., Meyer M., Hetzer R. (1997): Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy; *Circ.*; **96**: 542-549

Mulieri L.A., Hasenfuss G., Leavitt B., Allen P., Alpert N.R. (1992): Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure; *Circ.*; **85**: 1743-1750

Muller A., Zuidwijk M.J, Simonides W.S., Van Hardeveld C. (1997): Modulation of SERCA2 expression by thyroid hormone and norepinephrine in cardiocytes: role contractility;

*Am. J. Phys;* **26**: 55-60

Navartnam V. (1987): Heart Muscle: ultrastructural studies;

*Cambridge Uni. Press; New York*

Neher E., Sakmann B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres;

*Nature*; **260**: 799-802

Nerbonne J.M., Nichols C.G., Escande D. (2001): Genetic Manipulation of Cardiac K<sup>+</sup> Channel Function in Mice. What Have We Learned, and Where Do We Go From Here?;

*Circ. Res.*; **89**: 944-956

Nerbonne J. M.; Kass R.S (2005): Molecular Physiology of Cardiac Repolarization

*Physiol. Rev*; **85**: 1205–1253

Nourani F., Laufer G., Hollensteiner H., Windberger U., Macfelda K., Schuster M.D., McCue J.D., Solomon D., Schlehta B., Losert U., Wolner E., Kocher A.A. (2001): Morphologic changes in heterotopically transplanted rat heart isograft; *Elsevier Science Inc. Transplantation Proceedings*; **33**: 2755-2756

Nudler S., Piriz J., Urbano F.J., Rosato-Siri M.D., Renteria E.S., Uchitel O.D. (2003): Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction;

*Ann. NY. Acad. Sci.*; **998**: 11–17

Nuss H.B., Houser S.R. (1993): T-type Calcium current is expressed in hypertrophied feline left ventricular myocytes;

*Circ. Res.*; **73**: 777-782

Oriyanhan T., Komeda M., Nishina T., Mutsuoku S., Ikeda T., Komeda M. (2007): Determination of optimal duration of mechanical unloading for failing hearts to achieve bridge to recovery in a rat heterotopic heart transplant model;

*J. heart lung transplant.*; **26(1)**: 16-23

Olcese R., Neely A., Qin N., Wei X., Birnbaumer L., Stefani E. (1996): Coupling between charge movement and pore opening in vertebrate neuronal alpha 1E calcium channels;

*J. Phys.*; **497 (Part 3)**: 675–686

Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Nitahara J.A., Quaini E., Loreto C.D., Beltrami C.A., Krajewski S., Reed J.C., Anversa P. (1997): Apoptoses in the failing human heart;

*NEJM*; **336**: 1131-1141

Ono K., Lindsey E.S. (1969): Improved technique of heart transplantations in rats;

*J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*; **57**: 225-229

Park J.Y., Kang H.W., Jeong S.W., Lee J.H. (2004): Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the Cav3.3 T-type channel;

*J. Biol. Chem.*; **279**: 21707–21713

Passier R. (2000): CaM kinase signalling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo;

*J. Clin. Invest.*; **105**: 1395-1406

Perez-Reyes E. (1998): Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels;

*J. Bioenerg. Biomembr.*; **30**: 313–318

Perez-Reyes E. (2003): Molecular physiology of low-voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels;

*Physiol. Rev.*; **83**: 117–161

Peterson B.Z., DeMaria C.D., Adelman P.J., Yue D.T. (1999): Calmodulin is the Calcium sensor for Calcium dependent inactivation of L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channel;

*Neuron*; **22(3)**:549-58

Petrie J., Ojamaa K., Hong C., Smilari T., Klein I. (1994): Effects of adrenergic agonists on the growth and gene expression of the transplanted heart;

*JLCM*; **124**: 789-795

Piacentino V., Weber C.R., Chen X., Weisser-Thomas J., Margulies K.B., Bers D.M., Houser S.R. (2003): Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes;

*Circ. Res.*; **92**: 651-658

Piper H.M. (2000): Update Review: The calcium paradox revisited: An artefact of great heuristic value;

*Cardiovasc. Res.*; **45**: 123-127

Pragnell M., De Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P. (1994): Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit;

*Nature*; **368**: 67–70



Qin D., Zhang Z.H., Caref E.B., Boutjdir M., Jain P., el-Sherif N. (1996): Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium;  
*Circ. Res.*; **79**: 461-473

Radivancevis B., Frazier O.H., Duncan J.M. (1992): Implantation Technique for the heart mate left ventricular assist device;  
*J. Card. Surg*; **7**(3): 203-207

Rae J.L., Levis R.A. (1992): Glass technology for patch-clamp electrodes; In Rudy B. and Iverson L.E. (Eds.); *Ion channels*; Academic Press, Inc., Sand Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 66-92

Rajabi M., Kassiotis C., Razeghi P., Taegmeyer H. (2007): Return to fetal gene programme protects the stressed heart: a strong hypothesis;  
*Heart Fail. Rev.*; **12**: 331-343

Razeghi P., Young M.E., Alcorn J.L., Moravec C.S., Frazier O.H., Taegmeyer H. (2001): Metabolic gene expression in fetal and failing human heart;  
*Circ.*; **104**: 2923-2931

Rakusan K., Heron M.I. (1979): Transplantation-induced atrophy of normal and hypertrophic rat hearts: Effect on cardiac myocytes and capillaries;  
*J. Mol. Cell. Card.*; **29**:1045-1054

Rieder A. (2004): Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen;  
*Journal für Kardiologie*; **11** (Supplementum D), 3-4

Ritter M., Su Z., Xu S., Shelby J., Barry W.H. (2000): Cardiac unloading alters contractility and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in ventricular myocytes;  
*J. Mol. Cell. Card.*; **32**: 577-584

Sanford C.F., Griffin E.E., Wildenthal K. (1978): Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroid-induced cardiac hypertrophy in rats;

*Circ. Res.*; **43**: 688-694

Schleifer K.J. (1997): Spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanal; Aufbau, Funktion und Modulation;

*Pharm. Uns. Zeit.*; **26**: 179-186

Schreiber S.S., Evans C.D., Oratz M., Rothschild M.A. (1981): Protein synthesis and degradation in cardiac stress;

*Circ. Res.*; **48**: 601-611

Schultz D., Mikala G., Yatani A., Engle D.B., Iles D.E., Segers B., Sinke R.J., Weghuis D.O., Klockner U., Wakamori M. (1993): Cloning, chromosomal localization and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart;

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; **90**: 6228–6232

Schwoerer A.P., Neuber C., Schmechel A., Melnychenko I., Mearini G., Boknik P., Kirchhefer U., Schmitz W., Ehmke H., Eschenhagen T., El-armouche A. (2008): Mechanical unloading involves marked changes in the kinase-Phosphatase balance;

*J. Mol. Cell. Card.*; **45(6)**: 846-52

Schwoerer, A.P., Melnychenko I., Goltz D., Hedinger N., Broichhausen I., El-Armouche A., Eschenhagen T., Volk T., Ehmke H. (2008): Unloaded rat hearts in vivo express a hypertrophic phenotype of cardiac repolarization;

*J. Mol. Cell. Cardiol.*; **45(5)**: 633-641

Sham J.S. (1997): Calcium release-induced inactivation of Calcium current in rat ventricular myocytes: evidence for local Calcium signalling;

*J. Phys.*; **500**: 285-295

Shimoni Y., Banno H., Clark R.B. (1992): Hyperthyreodism selectively modified a transient potassium current in rabbit ventricular and atrial myocytes;

*J. Phys.*; **457**: 369-389

Shirokov R., Ferreira G., Yi J., Rios E. (1998): Inactivation of gating currents of L-type calcium channels. Specific role of the alpha 2 delta subunit;

*J. Gen. Physiol.*; **111**, 807–823

Shimoni Y., Severson D., Giles W. (1995): Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium current in rat ventricle;

*J. Phys.*; **488**: 673-688

Simpson P. (1985) Stimulation of hypertrophy of neonatal rat heart cells through alpha 1 adrenergic receptors and induction of beating through alpha 1 and beta1 adrenergic receptor interaction;

*Circ. Res.*; **56**: 884-894

Simpson P., McGrath A., Savion S. (1981): Myocyte Hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines;

*Circ. Res.*; **51**: 787-801

Singh A., Gebhart M., Fritsch R., Sinnegger-Brauns M.J., Poggiani C., Hoda J.C., Engel J., Romanin C., Striessnig J., Koschak A. (2008): Modulation of Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Gating of CaV1.3 L-type Calcium Channels by Alternative Splicing of a C-terminal Regulatory Domain;

*J. Biol. Chem.*; **283**, **30**: 20733–20744,

Sipido K.R., Carmeliet E., Van de Werf F. (1998): T-Type  $\text{Ca}^{2+}$  current as a trigger for  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes; *J. Phys.*; **508**: 439-451

Solberg L.E., Singer D.H., Ten-Eick R.E., Duffin-Eg J. (1974): Glas microelectrode studies in intramural papillary muscle cells. Description and preparation and studies on normal dog papillary muscle; *Circ. Res.*; **34**: 783-797

Soldatov N.M. (1994): Genomic structure of human L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel; *Genomics*; **22**: 77–87

Soldatov N.M., Oz M., O'Brien K.A., Abernethy D.R., Morad M. (1998): Molecular determinants of L-type  $\text{Ca}^{2+}$ - channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal cytoplasmic motif encoded by exons 40–42 of the human alpha 1C subunit gene; *J. Biol. Chem.*; **273**: 957–963

Soloff L.A. (1999): Atrophy of myocardium and its myocytes by left ventricular assist device; *Circ.*; **100**: 1012

Spinarova L., Vitovec J (2007): Neurohumorale changes in chronic heart failure; *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*; **151(2)**:201–207.

Stotz S.C., Hamid J., Spaetgens R.L., Jarvis S.E., Zamponi G.W. (2000): Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism?; *J. Biol. Chem.*; **275**: 24575–24582

Stuhmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X.D., Noda M., Yahagi N., Kubo H., Numa S. (1989): Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel; *Nature*; **339**: 597–603

Talavera K., Staes M., Janssens A., Klugbauer N., Droogmans G., Hofmann F., Nilius B. (2001): Aspartate residues of the Glu–Glu–Asp–Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$ - channel  $\alpha(1G)$ ;

*J. Biol. Chem.*; **276**: 45628–45635

Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. (1987): Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle;

*Nature*; **328**: 313–318.

Terracciano C.M.N., Harding S.E., Adamson D., Koban M., Tansley P., Birks E.J., Barton P.J.R., Yacoub M.H. (2003): Changes in sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  entry and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  content in ventricular myocytes from patients with end-stage Heart failure following myocardial recovery after combined pharmacological and ventricular assist device therapy;

*Eur. Heart J.*; **24**: 1329-1339

T Trafford A.W., Eisner D.A. (2002): No role for voltage sensitive release mechanism in cardiac muscle;

*J. Mol. Cell. Card.*; **35**: 145-151

Trump B.F., Berezesky I.K. (1996): The role of altered  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis and necrosis;

*Biochim. Biophys. Acta.*; **131**: 173-178

Tsien, R.W., Bean, B.P., Hess, P., Lansman, J.B., Nilius, B., Nowycky, M.C. (1986): Mechanisms of calcium channel modulation by beta–adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists;

*J. Mol. Cell. Cardiol.*; **18**: 691–710.

Tsien R.W., Hess P., McCleskey E.W., Rosenberg R.L. (1987): Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block;  
*Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*; **16**: 265–290

Vetter R., Lammerich A., Günther J., Pfitzer G., Storch E. (1995): Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats;  
*J. Hypertens.*; **13(11)**:1313-1324

Volk T., Nguyen T.H-D., Schultz J.H., Ehmke H. (1999): Relationship between transient outward  $K^+$  current and  $Ca^{2+}$  influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin;  
*J. Phys.*; **519.3**: 841-850

Volk T., Nguyen T.H-D., Schultz J.H., Faulhaber J., Ehmke H. (2000): Regional alterations of repolarizing  $K^+$  currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis;  
*J. Phys.*; **530.3**: 443-455

Volk T., Noble P.J., Wagner M., Noble D., Ehmke H. (2004): Ascending aortic stenosis selectively increases action potential-induced  $Ca^{2+}$  influx in epicardial myocytes of rat left ventricle;  
*Exp. Physiol.*; **90.1**: 111-121

Volk T., Ehmke H. (2002): Conservation of L-type  $Ca^{2+}$  current characteristics in endo-and epicardial myocytes from rat left ventricle with pressure-induced hypertrophy;  
*Eur. J. Phys.*; **443**:399-404

Walker D., De Waard M. (1998): Subunit interaction sites in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels: role in channel function;  
*Trends. Neurosci.*; **21**: 148–154

Welsh D.C., Dipla K., McNulty P.H., Mu A., Ojamaa K.M., Klein I., Houser S.R., Margulies K.B. (2001): Preserved contractile function despite atrophic remodelling in unloaded rat hearts;

*AJP-Heart Circ. Physiol.*; **281**: H1131-H1136

Wickenden A.D., Kaprilian R., Parker T.G., Jones O.T., Backx P.H. (1997): Effects of development and thyroid hormone on K<sup>+</sup> currents and K<sup>+</sup> channel gene expression in rat ventricular;

*J. Phys.*; **504.2**: 271-286

Wickenden A.D., Kaprielian R., Kassiri Z., Tsoporis J.N., Tsushima R., Fishman G.I., Backx P.H. (1998): *Review*: The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure;

*Cardiovasc. Res.*; **37**: 312-323

Yasui K., Niwa N., Opthof T., Muto T., Horiba M., Shimizu A., Lee J.K., Honjo H., Kamiya K., Kodama I. (2005): Pathophysiological significance of t-type Ca<sup>2+</sup>-channel: Expression of t-type Ca<sup>2+</sup>-channels in fetal and diseased heart;

*J. Pharmacol. Sci.*; **99**: 205-210

Yeomann M.S., Brezden B.L., Benjamin P.R. (1999): LVA and HVA Ca<sup>2+</sup> currents in ventricular muscle cells of the *Lymnaea* heart;

*J. Neurophysiol.*; **82**: 2428-2440

Yue, D.T., Marban, E. (1990): Permeation in the dihydropyridine-sensitive calcium channel. Multi-ion occupancy but no anomalous mole-fraction effect between Ba<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>; *J. Gen. Physiol.*; **95**, 911-939

Zafeiridis A., Jeevanandam V., Houser S.R., Margulies K.B. (1998): Regression after cellular Hypertrophy after Left Ventricular Assist Device Support;  
*Circ.*; **98**: 656-662

Zipes D.P., Wellens H.J. (1998): *Sudden cardiac death*;  
*Circ.*; **98**: 2334-2351

Zuhlke R.D., Reuter H. (1998):  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit;  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **95**: 3287–3294

Zygmunt A.C., Gibbons W.R. (1992): Properties of the Calcium activated chloride current in heart;  
*J. General Phys.*; **99**: 391-414



## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <b>Unterstützungssystem Jarvic 2000</b> .....	3
Abbildung 2: <b>Entwicklung der Ejektionsfraktion nach VAD-Explantation</b> .....	4
Abbildung 3: <b>Das physiologische Oberflächen-EKG</b> .....	6
Abbildung 4: <b>AP-Längendifferenzen</b> .....	7
Abbildung 5: <b>Phasen des APs ventrikulärer Kardiomyozyten</b> .....	10
Abbildung 6: <b>Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung</b> .....	13
Abbildung 7: <b>Strom-Spannungskurve des <math>I_{CaL}</math> und des <math>I_{CaT}</math></b> .....	17
Abbildung 8: <b>Schematische Darstellung spannungsabhängiger <math>Ca^{2+}</math>-Kanäle</b> .....	21
Abbildung 9: <b>Vorgänge bei chronischer Druckbe- und entlastung</b> .....	40
Abbildung 10: <b>hHTX nach Ono &amp; Lindsey</b> .....	43
Abbildung 11: <b>Berechnung der linksventrikulären Masse</b> .....	44
Abbildung 12: <b>Versuchsprotokoll zur Messung des <math>I_{CaL}</math></b> .....	64
Abbildung 13: <b>Versuchsprotokoll zur Detektion eines <math>I_{CaT}</math></b> .....	66
Abbildung 14: <b>Die Zeitkonstanten <math>\tau_1</math> und <math>\tau_2</math> der Inaktivierung</b> .....	68
Abbildung 15: <b>Versuchsprotokoll der <i>steady-state</i> Inaktivierung</b> .....	70
Abbildung 16: <b>Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Erholung von einem Vorpuls</b> .....	72
Abbildung 17: <b>Protokoll zur Bestimmung des AP-induzierten <math>Ca^{2+}</math>-Einstroms</b> .....	74
Abbildung 18: <b>Linksventrikuläre Masse</b> .....	76
Abbildung 19: <b>Bestimmung der Zellkapazität</b> .....	77
Abbildung 20: <b>Bestimmung des <math>I_{CaL}</math></b> .....	79
Abbildung 21: <b>Überprüfung der Anwesenheit des <math>I_{CaT}</math></b> .....	81
Abbildung 22: <b>Vergleich der Pulsprotokolle zur Identifikation des <math>I_{CaT}</math></b> .....	82
Abbildung 23: <b>Die Zeitkonstanten <math>\tau_1</math> und <math>\tau_2</math> der Inaktivierung des <math>I_{CaL}</math></b> .....	84
Abbildung 24: <b>Anteil der Inaktivierungskonstanten <math>\tau_2</math></b> .....	85
Abbildung 25: <b>Die Aktivierungskurven der L-Typ <math>Ca^{2+}</math>-Kanäle</b> .....	87
Abbildung 26: <b>Die <i>steady-state</i> Inaktivierung des <math>I_{CaL}</math></b> .....	89
Abbildung 27: <b>Die Erholung des <math>I_{CaL}</math> von einem Vorpuls</b> .....	91
Abbildung 28: <b>Bestimmung der Länge der APs</b> .....	93

Abbildung 29: **Der AP-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom** ..... 95

## **8.Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: <b>Einteilung der Herzinsuffizienz nach der <i>New York Heart Association</i> (NYHA) in vier klinische Stadien</b> .....	2
Tabelle 2: <b>Vergleich der Eigenschaften des L-Typ und des T-Typ <math>Ca^{2+}</math>-Kanals</b> .....	18
Tabelle 3: <b>Darstellung der elektrophysiologischen und metabolischen Veränderungen sowie der Veränderungen des <math>Ca^{2+}</math>-Haushaltes</b> .....	37
Tabelle 4: <b>Lösungen zur Transplantation und Zellisolation</b> .....	58
Tabelle 5: <b>Pipettenlösung</b> .....	59
Tabelle 6: <b>Badlösung</b> .....	59
Tabelle 7: <b>Herkunft der verwendeten Substanzen</b> .....	60

## 9. Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AS	Aortenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	(1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid)
bpm	<i>beats per minutes</i> (Schläge pro Minute)
BTZ	Benzothiazepine
$[Ca^{2+}]_a$	Extrazelluläre Calciumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Zytosolische Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
C	Coulomb
ca.	circa
$Ca^{2+}$	Calcium
$Cd^{2+}$	Cadmium
$C_m$	Zellkapazität
cm	Zentimeter
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
d.h.	das heißt
DHP	Dihydropyridine
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	„et alii“, und weitere
g	Gramm
GΩ	Gigaohm
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino-1-ethansulfonsäure

HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
hHTX	Heterotope Herztransplantation
HMV	Herzminutenvolumen
HTX	Herztransplantation
HVA	<i>high voltage activated channels</i>
I	Strom
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IE	Internationale Einheiten
$I_{Na/Ca}$	$Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscherstrom
$I_{CaL}$	Strom durch den L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanal
$I_{CaT}$	Strom durch den T-Typ $Ca^{2+}$ -Kanal
$I_{to}$	Transienter $K^+$ -Strom
$I_K$	<i>delayed rectifier</i>
$K^+$	Kalium
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
l	Liter
LVAD	<i>left ventrikular assist device</i>
LVA	<i>low voltage gated channels</i>
LVM	Linksventrikuläre Masse
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
$\mu$ l	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

$\mu\text{mol/l}$	Mikromol pro Liter
$\text{mmol/l}$	Millimol pro Liter
mod.	Modifiziert
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mV	Millivolt
$\text{Na}^+$	Natrium
nA	Nanoampere
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
n.s.	nicht signifikant
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
$\text{O}_2$	Sauerstoff
pA	Picoamper
PAA	Phenyl-Alkyl-Amine
pF	Picoferrat
PLB	Phospholamban
PNS	Peripheres Nervensystem
R	Widerstand
RAAS	Renin-Angiotensin-System
$R_m$	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	Ribonukleinsäure
$R_{\text{Pip}}$	Pipettenwiderstand
$R_s$	Serienwiderstand
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
s.g.	so genannte
SR	Sarcoplasmatische Retikulum
SERCA	Sarcoplasmatische $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
TEA-Cl	Tetraethyl-Ammoniumchlorid
TGF $\beta$	Tumor Growth Factor

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
V	Spannung
$V_m$	Zellmembranpotential
$V_{pip}$	Kommandospannung, Pipettenpotential
$V_s$	am Serienwiderstand abfallende Spannung
VAD	<i>ventricular Assist Device</i>
VGCC	<i>voltage gated calcium channels</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\Omega$	Ohm
ZNS	zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

### **10. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die stets freundliche Betreuung und besonders für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Person.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Alexander Schwoerer für die exzellente fachliche Betreuung und nachhaltige akademische Förderung.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für vegetative Physiologie möchte ich mich für die selbstverständliche Aufnahme, die angenehme Zusammenarbeit und nicht zuletzt die gemütlichen Kaffeepausen mit Gelegenheit zu nicht nur fachbezogenem, sondern auch zwischenmenschlichem Gedankenaustausch bedanken.

Des Weiteren möchte ich dem Arbeitskreis von Prof. Dr. med. Ali El-Armouche aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie für die Bereitstellung der Daten der molekularbiologischen Untersuchungen danken.

Auch möchte ich mich bei Melanie Ferreira Caetano und Dean Caple für die freundschaftliche Unterstützung und unermüdliche Motivation bedanken.

Der besondere Dank gilt meinen Eltern für das Ermöglichen meiner Ausbildung und die Unterstützung meines Werdegangs durch ihr dauerhaftes Interesse an meinem Fortkommen. Vielen Dank für das Vertrauen in meinen Erfolg und die Liebe auch in schwierigen Zeiten!



## 11. Lebenslauf

### **Angaben zur Person:**

Name: Hanne Irene Broichhausen  
Anschrift: Bachstrasse 108, 22083 Hamburg  
Geburtsdatum: 21.04.1982  
Geburtsort: Aachen  
Eltern: Prof. Dr. Ing. Klaus Dieter Broichhausen  
Dipl.-Übers. Hanne Broichhausen

### **Schulbildung:**

09/1988-06/1992 Grundschule am Ährenfeld, Gröbenzell  
09/1992-06/1999 Gymnasium Gröbenzell  
09/1999- 06/2001 Theresia Gerhardinger Gymnasium, München, Abschluss: Abitur

### **Berufsausbildung:**

10/2001-06/2003 Immatrikuliert für das Fach Pharmazie an der LMU, München  
10/2003 Immatrikuliert für Medizin an der Universität Hamburg  
08/2005 Physikum  
08/2008 Praktischen Jahres  
1.Tertial, 1.Hälfte: Allgemein Chirurgie;  
Maharaj Hospital, Chiang Mai, Thailand  
1.Tertial, 2.Hälfte: Kardiochirurgie, Albertinen Krankenhaus  
2.Tertial: Inneren Medizin: Wyneberg Hospital,  
Kapstadt, Südafrika  
3.Tertial: Anästhesie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

## 12. Eidesstattliche Versicherung

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 einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Schwoerer, A.P., Melynchenko I., Goltz D., Hedinger N., Broichhausen I., El-Armouche A., Eschenhagen T., Volk T., Ehmke H. (2008): Unloaded rat hearts in vivo express a hypertrophic phenotype of cardiac repolarization; *J. Mol. Cell. Cardiol.*; **45(5)**: 633-641

---