

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Wirkung verschiedener amino-amid Lokalanästhetika auf native und sick sinus mutierte Na⁺-Ionenkanäle des Typs SCN5A im menschlichen Herzen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Hanno Scheel
geboren in Preetz

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 16.05.11

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. P. Friederich

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: PD Dr. M. Freitag

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. D. Isbrand

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Aufgaben von Zellen, Zellmembranen und Membranproteinen	1
1.1.1 Zellen	1
1.1.2 Zellmembranen	2
1.1.3 Membranproteine	2
1.1.4 Der spannungsgesteuerte Na ⁺ -Ionenkanal	3
1.1.5 Das Ruhemembranpotential, das Gleichgewichtspotential und das Aktionspotential	6
1.1.6 Die Herzerregung	7
1.2 Durch Mutationen im Natriumkanal verursachte Pathologien am Herzen	9
1.2.1 Das Long-QT Syndrom	10
1.2.2 Brugada-Syndrom	12
1.2.3 Sick-Sinus-Syndrom	14
1.3 Lokalanästhetika	16
1.3.1 Pharmakologie der Lokalanästhetika	16
1.3.2 Lokalanästhetikaintoxikation	18
1.3.3 Vergleich der Toxizität von Bupivacain und Ropivacain	20
2 Fragestellung und Zielsetzung	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Zellen und Zellkultur	25
3.1.1 Zellen	25
3.1.2 Zellkultur	25
3.2 Elektrophysiologie	26
3.2.1 Patch-Clamp-Technik	26
3.2.2 Aufbau des Messstands	28
3.2.3 Praktische Durchführung der Experimente	31
3.2.4 Durchführung der Experimente zur Untersuchung der Eigen- schaften Aktivierung, Inaktivierung und recovery	32
3.2.5 Durchführung der Experimente zur Untersuchung der Ei- genschaften development-of-inactivated-block und recovery- from-inactivated-block	34
3.2.6 Durchführung der Experimente zur Untersuchung zeitabhängiger Effekte	35
3.3 Datenaufnahme	35

3.4	Grundlagen der Datenanalyse	38
3.4.1	Verwendete Programme	38
3.4.2	Mathematische Grundlagen zur Datenanalyse	38
4	Ergebnisse	43
4.1	Wirkung von Bupivacain auf den SCN5A Wildtyp	43
4.1.1	Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens	43
4.1.2	Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens	45
4.1.3	Beeinflussung des recovery-Verhaltens	47
4.1.4	development-of-inactivated-block unter Bupivacain	49
4.1.5	recovery-from-inactivated-block unter Bupivacain	50
4.2	Wirkung von Ropivacain auf den SCN5A Wiltyp	52
4.2.1	Beeinflussung des Aktivierungsverhalten	52
4.2.2	Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens	54
4.2.3	development-of-inactivated-block unter Ropivacain	55
4.2.4	recovery-from-inactivated-block unter Ropivacain	57
4.3	Vergleich der Wirkung von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A Wiltyp	58
4.3.1	Vergleich der Beeinflussung der Aktivierung	58
4.3.2	Vergleich der Beeinflussung der Inaktivierung	59
4.3.3	Vergleich der Inhibition durch Bupivacain und Ropivacain	59
4.3.4	Vergleich des development-of-inactivated-block	60
4.3.5	Inhibition des inaktivierten Zustands des SCN5A Wildtyp unter Bupivacain und Ropivacain	61
4.3.6	Vergleich der recovery-from-inactivated-block	62
4.4	Charakterisierung von SCN5A Wildtyp und Mutante	63
4.4.1	Aktivierungsverhalten von SCN5A Wiltyp und Mutante	63
4.4.2	Inaktivierungsverhalten von SCN5A Wiltyp und Mutante	65
4.4.3	recovery-Verhalten von SCN5A Wiltyp und Mutante	67
4.5	Wirkung von Bupivacain auf den mutierten SCN5A	68
4.5.1	Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens	68
4.5.2	Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens	69
4.5.3	Beeinflussung des recovery-Verhaltens	71
4.6	Vergleich der Wirkung von Bupivacain auf SCN5A Wiltyp und Mu- tante	73
4.6.1	Vergleich der Beeinflussung der Aktivierung	73
4.6.2	Vergleich der Beeinflussung der Inaktivierung	74
4.6.3	Vergleich der Beeinflussung der recovery	74
4.6.4	Vergleich der Inhibition	75
5	Diskussion	76
5.1	Der humane Na ⁺ -Ionen-Kanal SCN5A	76
5.2	Wirkung von Bupivacain auf den humanen Na ⁺ -Ionen-Kanal SCN5A	78
5.3	Wirkung von Ropivacain auf den humanen Na ⁺ -Ionen-Kanal SCN5A und Vergleich mit der Wirkung von Bupivacain	81
5.4	Der mutierte Na ⁺ -Ionen-Kanal	87
5.5	Wirkung von Bupivacain auf den mutierten Na ⁺ -Ionen-Kanal und Vergleich mit der Wirkung auf den Wildtypen.	89
5.6	Limitationen der Studie	92
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick	92

6 Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	95
Danksagungen	103
Eidesstattliche Versicherung	104

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau eines Natriumkanals	4
1.2	Zustände des Na ⁺ -Ionen-Kanals	5
1.3	Aktionspotentiale des menschlichen Herzens	7
1.4	Aktionspotential der menschlichen Herzkammer	9
1.5	Aktionspotential und EKG bei Long-QT-Syndrom	10
1.6	EKG bei Brugada	13
3.1	Patchkonfigurationen	27
3.2	Versuchsaufbau	31
3.3	Aktivierungs-Protokoll	32
3.4	Inaktivierungs-Protokoll	33
3.5	recovery-Protokoll	33
3.6	development-of-inactivated-block-Protokoll	34
3.7	recovery-from-inactivated-block-Protokoll	35
3.8	Schaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers	36
4.1	Stromspuren der Aktivierung des SCN5A Wildtyp unter Bupivacain	43
4.2	Strom- und Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Aktivierung des Wildtypen unter Bupivacain	44
4.3	Änderung der Aktivierungshalbmaxima des Wildtypen durch Bupi- vacain	44
4.4	Stromspuren der Inaktivierung des SCN5A Wildtyps unter Bupivacain	45
4.5	Inaktivierung der SCN5A Mutante unter Bupivacain	46
4.6	Stromspuren der recovery des Wildtypen unter Bupivacain	47
4.7	recovery der SCN5A Wildtyp unter Bupivacain	48
4.8	development-of-inactivated-block des Wildtyps unter Bupivacain . .	49
4.9	Zeitkonstanten des development-of-inactivated-block des Wildtypen unter Bupivacain	50
4.10	Stromspur erzeugt durch das recovery-from-inactivated-block- protokoll unter Bupivacain.	50
4.11	recovery-from-inactivated-block des Wildtyps unter Bupivacain. . .	51
4.12	Stromspuren der Aktivierung des Wildtypen unter Ropivacain . . .	52
4.13	Strom- und Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Aktivierung Wildtypen unter Ropivacain	52
4.14	Änderung der Aktivierungshalbmaxima des Wildtypen durch Ropi- vacain	53
4.15	Stromspuren der Inaktivierung des Wildtyp unter Ropivacain	54
4.16	Inaktivierung des Wildtyp unter Ropivacain	54
4.17	development-of-inactivated-block des Wildtyps unter Ropivacain . .	56
4.18	Zeitkonstanten des development-of-inactivated-block des Wildtypen unter Ropivacain	56
4.19	Stromspur erzeugt durch das recovery-from-inactivated-block- Protokoll unter Ropivacain	57

4.20	recovery-from-inactivated-block des Wildtyps unter Ropivacain . . .	57
4.21	Vergleich der Änderung der Aktivierungshalbmaxima des Wildtypen unter Bupivacain und Ropivacain	58
4.22	Vergleich der Änderung der Inaktivierungshalbmaxima des Wildtypen unter Bupivacain und Ropivacain	59
4.23	Konzentrations-Wirkungskurve von Bupivacain und Ropivacain auf den Wildtyp	59
4.24	Zeitkonstanten aus den monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des development-of-inactivated-block-Protokolls . . .	60
4.25	Konzentrations-Wirkungs-Kurve beider Medikamente auf den inaktivierten Zustand	61
4.26	Vergleich der Zeitkonstanten der it recovery-from-inactivated-block .	62
4.27	Aktivierung von Wildtyp und Mutante	63
4.28	Halbmaxima der Aktivierung von Wildtyp und Mutante	63
4.29	Inaktivierung von Wildtyp und Mutante	65
4.30	Vergleich der recovery von Wildtyp und Mutante	67
4.31	Stromspuren der Aktivierung der SCN5A Mutante unter Bupivacain	68
4.32	Strom- und Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Aktivierung der Mutante unter Bupivacain	68
4.33	Änderung der Aktivierungshalbmaxima der Mutante durch Bupivacain	69
4.34	Stromspuren der Inaktivierung der SCN5A Mutante unter Bupivacain	70
4.35	Inaktivierung der SCN5A Mutante unter Bupivacain	70
4.36	Stromspuren der recovery der Mutante unter Bupivacain	71
4.37	recovery der SCN5A Mutante unter Bupivacain	72
4.38	Vergleich der Änderung der Aktivierungshalbmaxima des Wildtypen und der Mutante unter Bupivacain	73
4.39	Vergleich der Änderung der Inaktivierungshalbmaxima des Wildtypen und der Mutante unter Bupivacain	74
4.40	Vergleich der Änderung der Halbmaxima der recovery des Wildtypen und der Mutante unter Bupivacain	74
4.41	Konzentrations-Wirkungskurve von Bupivacain auf Wildtypen und Mutante	75
5.1	Abhängigkeit der C-Atome des Substituenten zum IC_{50} -Wert	83
5.2	Modell zur klinischen Bedeutung der Unterschiede zwischen Bupivacain und Ropivacain	84
5.3	Aktivierbarkeit von Wildtyp und der Mutante	88
5.4	Restaktivierbarkeit von Wildtyp und der Mutante	89
5.5	Veränderung des Inaktivierungsverhaltens durch Bupivacain und Mutation	90
5.6	Effektive Inhibition von Bupivacain auf Wildtyp und Mutante . . .	91
5.7	Ratio der effektiven Inhibition	91

Tabellenverzeichnis

1.1	Kriterien zur Verdachtsdiagnose LQT	11
1.2	Varianten des angeborenen Long-QT-Syndroms	11
1.3	Ursachen des Sick-Sinus-Syndrom	15
1.4	Symptome des Sick-Sinus-Syndroms	15
1.5	Strukturformel von Ropivacain und Bupivacain.	21
4.1	Parameter der konzentrationsabhängigen Aktivierung des Wildtyp unter Bupivacain	45
4.2	Parameter der konzentrationsabhängigen Inaktivierung des Wildtyp unter Bupivacain	47
4.3	Parameter der konzentrationsabhängigen Erholung des Wildtyp unter Bupivacain	49
4.4	Zeitkonstanten der konzentrationsabhängigen Blockade des inaktivierten Zustands des Wildtyp unter Bupivacain	50
4.5	Zeitkonstanten der konzentrationsabhängigen Blockade des inaktivierten Zustands des Wildtyp unter Bupivacain	51
4.6	Parameter der konzentrationsabhängigen Aktivierung des Wildtyp unter Ropivacain	53
4.7	Parameter der konzentrationsabhängigen Inaktivierung des Wildtyp unter Ropivacain	55
4.8	Zeitkonstanten der konzentrationsabhängigen Blockade des inaktivierten Zustands des Wildtyp unter Ropivacain	57
4.9	Zeitkonstanten der konzentrationsabhängigen Blockade des inaktivierten Zustands des Wildtyp unter Ropivacain	58
4.10	Inhibition von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A im Vergleich	60
4.11	Inhibition von Bupivacain und Ropivacain auf den inaktivierten SCN5A im Vergleich	61
4.12	Parameter der Aktivierung des Wildtyp und der Mutante	64
4.13	Parameter der Inaktivierung des Wildtyp und der Mutante	66
4.14	Parameter der recovery des Wildtyp und der Mutante	67
4.15	Parameter der konzentrationsabhängigen Aktivierung des Wildtyp unter Bupivacain	69
4.16	Parameter der konzentrationsabhängigen Inaktivierung der Mutante unter Bupivacain	71
4.17	Parameter der konzentrationsabhängigen Erholung der Mutante unter Bupivacain	73
4.18	Inhibition von SCN5A Wildtyp und Mutante unter Bupivacain im Vergleich	75
5.1	Literaturdaten von Mittelwerten der Aktivierung, Inaktivierung und recovery	76
5.2	Daten zur Inhibition für Ropivacain	82
5.3	Plasmakonzentrationen von Lokalanästhetika	86

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz
μ	mikro
Ω	Ohm
τ	Zeitkonstante
A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CES	Cauda-Equina-Syndrom
dev	development
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	und andere
g	Leitfähigkeit
HEK	human embryonic kidney
I	Stromstärke
I_{Na}	Natriumstrom
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	Interner Cardioverter-Defibrillator
k.A.	keine Angabe
KHZ	Kilohertz
l	Liter
LQTS	Long-QT-Syndrom

m	Meter
m	milli
M	mega
mg	Milligramm
min	Minute
mol	Mol
n	nano
p	piko
rec	recovery
rel	relativ
s	Sekunden
t	Zeit
TNS	Transientes-Neurologisches-Syndrom
U	Spannung
u.a.	unter anderem
V	Volt
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Regionalanästhesieverfahren gelten als Standard in der Anästhesie für eine Vielzahl operativer Eingriffe. Sie zeichnen sich durch ein hohes Maß an Sicherheit und Zuverlässigkeit aus. Ein seltenes, aber mit schwerwiegenden Folgen behaftetes Ereignis ist die systemische Intoxikation mit Lokalanästhetika (Zimmer *et al.*, 2007; Petitjeans *et al.*, 2002; Gielen *et al.*, 2005). Sie kann Folge einer versehentlichen intravasalen Injektion oder einer Überdosierung sein. Die Nebenwirkungen betreffen hauptsächlich zwei Organe: das ZNS und das Herz. Die Wirkungen auf das ZNS sind reversibel und gut zu therapieren (Zimmer *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu sind die Wirkungen auf das Erregungsleitungssystem des Herzens schwerwiegender und mit höherer Morbidität und Mortalität assoziiert (Zimmer *et al.*, 2007). Es gibt Patientengruppen, die ein erhöhtes Risiko solcher Nebenwirkungen aufweisen. Hierzu gehören unter anderem Patienten mit Mutationen in Genen, die bestimmte Kanäle des kardialen Reizleitungssystems kodieren, bei deren Vorliegen mit einer erhöhten Toxizität zu rechnen ist (Siebrands & Friederich, 2007; Solth *et al.*, 2005). Da pathologische Veränderungen dieser Art präoperativ nicht immer bekannt sind und diesbezüglich keine kostengünstige und einfache Untersuchung existiert, ist es umso wichtiger möglichst nebenwirkungsarme Lokalanästhetika zu entwickeln und zu verwenden.

1.1 Aufgaben von Zellen, Zellmembranen und Membranproteinen

1.1.1 Zellen

Eine Zelle ist die kleinste selbständig funktionierende Einheit eines Organismus. Die Zellen sind auf bestimmte Bereiche und Aufgaben spezialisiert, sie sind differenziert. Die Vielfalt in Aufbau, Größe, Form und Funktion der Zelle spiegelt die Vielfalt der Differenzierungen wider. Allen Zellen sind jedoch bestimmte Funktionseinheiten gemein, wie Zellmembran, Zytoplasma, Zellorganellen, Zytoskelett und Zellkern, die der Erfüllung ihrer Aufgabe dienen und es ermöglichen ihre eigene Struktur zu erhalten. Darüber hinaus sind sie in der Lage zu Wachstum und Vermehrung.

1.1.2 Zellmembranen

Geformt werden die Zellen durch Zellmembranen, die nur 7-10 nm dick sind und hauptsächlich aus Phospholipiden bestehen. Phospholipide sind amphipatische Moleküle, das bedeutet sie haben ein nach innen gerichtetes hydrophiles Ende, den Phosphat-Kopf, und ein nach außen gerichtetes lipophiles Ende, den Lipid-Schwanz. So bildet sich eine Doppelschicht. Verantwortlich für die Wechselwirkungen zwischen den Phospholipiden sind die Van-der-Waals-Kräfte. Die Zusammensetzung dieser Phospholipid-Doppelschicht variiert je nach Anforderungen an die Zelle. Diese Schicht verhält sich wie eine zweidimensionale Flüssigkeit von geringer Viskosität. Zusätzlich finden sich dort zum Beispiel Cholesterine, die die Membran in jener Viskosität beeinflussen und Membranproteine, welche im nächsten Abschnitt genauer erläutert werden.

Essentiell für das Funktionieren biologischer Prozesse ist der Aufbau und das Aufrechterhalten von Konzentrationsgradienten. Dies kann nur durch eine selektive Membran gewährleistet werden. Die Phospholipid-Doppelschicht erfüllt diese Anforderung, sie ist ausschließlich permeabel für lipophile Moleküle und Gase. Das Passieren anderer Moleküle oder Ionen wird durch Proteine reguliert, welche in die Membran integriert sind und den Transport selektiv regulieren können.

1.1.3 Membranproteine

Membranproteine haben vielfältige Aufgaben: Sie können zum Beispiel dem Transport oder als Rezeptoren in einer Signalkaskade dienen. Sie werden von der Zelle je nach Bedarf und Aufgabe in die Zellmembran integriert. Nach dem Fluid-Mosaik-Modell bewegen sie sich frei in der Phospholipid-Doppelschicht und bilden dabei eine regelmäßige Verteilung (Singer & Nicolson, 1972). Man unterscheidet zum einen integrale Proteine, die in die Membran eingebettet sind, und assoziierte oder peripherer Proteine, die der Membran an der Innen- oder Außenseite aufsitzen.

Die Transportproteine bilden eine Untergruppe der integralen Membranproteine. Sie dienen dem Austausch von Molekülen zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle. Dabei sind sie spezifisch für das zu transportierende Molekül. Eingeteilt werden sie in drei Gruppen:

- Energie verbrauchende **Pumpen** transportieren nur 10 bis 1.000 Ionen pro Sekunde aktiv gegen deren Konzentrationsgradienten bzw. gegen ein elektrisches Potential. Die dazu benötigte Energie erhalten sie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat.

Der wichtigste aktive Transporter ist die Na^+/K^+ -ATPase. Sie transportiert 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle hinaus und im gleichen Zyklus 2 K^+ -Ionen in

die Zelle hinein. Sie ist somit elektrogen und schafft dadurch eine wichtige Voraussetzung für die Erregbarkeit der Zelle.

- **Transporter (Carrier)** haben eine höhere Kapazität zum Transfer der Moleküle, sie erreichen Transportraten von 100 bis 10.000 Molekülen pro Sekunde. Sie arbeiten passiv entlang des Konzentrationsgradienten. Entsprechend ihrer Funktion lassen sich Transporter drei verschiedenen Klassen zuordnen:
 - **Uniporter** transportieren Moleküle entlang ihres Konzentrationsgradienten.
 - **Symporter** nutzen den Energiegewinn, der sich aus dem Transport eines Moleküls entlang seines Konzentrationsgradienten ergibt, um ein anderes Molekül entgegen seines Konzentrationsgradienten zu befördern. Die Transportrichtung beider Moleküle ist identisch.
 - **Antiporter** entsprechen den Symportern, mit dem Unterschied, dass hier die beiden Moleküle in entgegengesetzte Richtungen transportiert werden.
- Bei **Kanälen** handelt es sich um wassergefüllte Poren, die das Durchtreten von Molekülen entlang des Konzentrationsgradienten oder aufgrund des elektrischen Potentials ermöglichen. Es handelt sich also ebenfalls um einen passiven Transport. Unter allen integralen Transportproteinen besitzen Kanäle die höchste Transportkapazität mit bis zu 10^8 Molekülen pro Sekunde. Sie lassen sich ebenfalls in drei Gruppen einteilen:
 - Dauerhaft geöffnete Kanäle
 - Ligandengesteuerte Kanäle, die durch einen Transmitter aktiviert werden
 - Spannungsgesteuerte Kanäle, die durch eine Änderung des Membranpotentials geöffnet werden. Auf sie wird im folgenden Abschnitt ausführlicher eingegangen.

1.1.4 Der spannungsgesteuerte Na^+ -Ionenkanal

Die Fähigkeit eines Kanals in offenem oder geschlossenem Zustand vorzuliegen nennt man „gating“ (Hille, 2000). Ursache ist eine Änderung in der Konformation des Proteins. Induziert wird diese bei spannungsgesteuerten Kanälen durch eine Veränderung des Membranpotentials. Ein Beispiel für einen solchen Kanal ist der Na^+ -Ionen-Kanal. Von ihm gibt es zahlreiche Unterformen, allein beim Menschen sind neun Arten bekannt, die sich in ihrer grundlegenden Struktur gleichen (Goldin *et al.*, 2000), Einer von ihnen ist der kardiale $\text{Na}_v1.5$ für den das Gen *SCN5A*

kodiert. An diesem soll der Aufbau eines Na^+ -Ionen-Kanals beispielhaft erläutert werden.

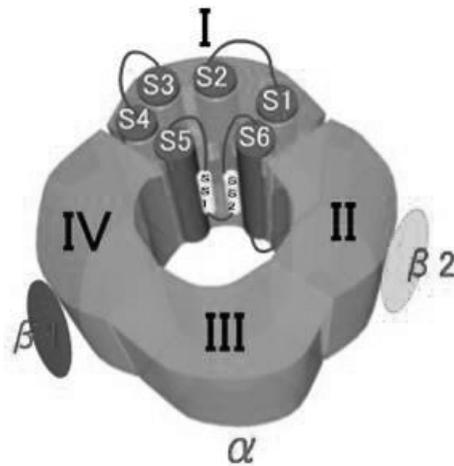


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Natriumkanals. Dargestellt sind die vier Transmembrandomänen (I bis IV) mit der Pore in der Mitte. In Domäne I sind exemplarisch die sechs Transmembransegmente (S1-6) dargestellt.

Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen, besteht der Kanal aus einer α -Untereinheit von etwa 260 kDa sowie assoziierten β -Untereinheiten (Noda, 1993). Die α -Untereinheit besteht aus vier ähnlichen Domänen (DI-IV), die sich jeweils aus sechs Transmembransegmenten (S1-6) zusammensetzen (Vassilev *et al.*, 1988). Die vier Domänen formen in ihrer Mitte eine Pore in die Zellmembran. S5 und S6 sind am stärksten hydrophob; S1, S2 und S3 sind amphipatisch und S4 ist aufgrund positiver Ladungen hydrophil. Dieser Teil schließt bei der Inaktivierung den Kanal. Das zwischen S5 und S6 der DIV lokalisierte P-Segment, steht in Zusammenhang mit der Leitfähigkeit und der Selektivität für Ionen (Stühmer *et al.*, 1989). Desweiteren ist es Bindungsstelle für Toxine, die jene Eigenschaften somit modulieren können. Die Bindungsstellen für Lokalanästhetika hingegen, befinden sich für den humanen kardialen Na^+ -Kanal in dem Segment 6 der Domänen I und IV. In Untersuchungen konnte eine geringere Affinität für Lokalanästhetika nachgewiesen werden, wenn in dieser Region Punktmutationen vorlagen (Nau *et al.*, 2000).

Jede α -Untereinheit agiert mit zwei akzessorischen β -Untereinheiten. U.a. sollen sie Eigenschaften wie „gating“, Erholung von der Inaktivierung und den Stromfluss beeinflussen (Nuss *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 2001). Auch soll die Bindung zu Fettsäuren, Medikamenten und Toxinen moduliert werden (Xiao *et al.*, 2000; Makielski *et al.*, 1996; Messner & Catterall, 1986) und es soll als Adhäsionsmolekül dienen (Ratcliffe *et al.*, 2001).

Die spannungsabhängige Aktivierung

Die Aktivierung ist der Übergang des geschlossenen Zustandes in den offenen Zustand. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung eines Kanals zeigt sich in dem Auswärtsstrom spezifischer Ionen durch die Änderung des elektrischen Feldes (Hodgkin & Huxley, 1952). Unter Berücksichtigung der Primärstruktur der α -Untereinheit entstand die Hypothese, dass der molekulare Aufbau direkt für

die spannungsgesteuerte Aktivierung verantwortlich ist (Catterall, 1986; Guy & Seetharamulu, 1986). Strukturanalysen zeigten, dass das transmembrane Segment 4 positive Aminosäurereste enthält. Zusammen mit zwei weiteren hydrophoben Aminosäureresten geben diese dem Kanal eine zylindrische Form mit einem Band umgebener positiver Ladungen. Eine negative Ladung im Inneren übt Kräfte auf dieses Band aus und zieht das Segment 4 nach innen. Es verlegt im geschlossenen Zustand die Pore. Kommt es nun zu einer Depolarisation der Membran, führt dies zu einer Konformationsänderung. Dadurch werden die Wechselwirkungen beendet und eine Auswärtsbewegung des Segments 4 mit einer Öffnung der Pore wird ermöglicht. Dieses „Auswärtsgleiten“ wird durch das „sliding helix“- (Catterall, 1986) und das „helical screw“-Modell (Guy & Seetharamulu, 1986) beschrieben. Die Auswärtsbewegung des Segments konnte durch Untersuchungen bestätigt werden, welche zeigten, dass modifizierte Enden des Segments bei Depolarisierung - und damit im offenen Zustand - stärker mit extrazellulären und weniger mit intrazellulären Substanzen reagieren, als in geschlossenem Zustand (Yang & Horn, 1995; Yang *et al.*, 1996).

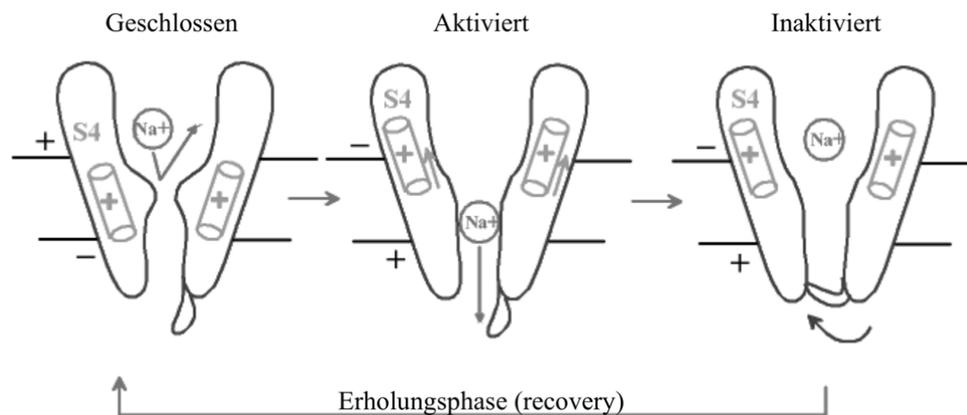


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Zustände des Na^+ -Ionen-Kanals.

Die Inaktivierung

Einige Millisekunden nach Aktivierung erfolgt die Inaktivierung. Armstrong *et al.* stellten bereits 1981 die Hypothese auf, dass eine intrazelluläre Struktur die Pore verlegen und somit inaktivieren würde (Armstrong, 1981). Mithilfe blockierender Antikörper gegen Epitope dieser Struktur konnte eine Schlaufe zwischen Domäne III und IV identifiziert werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Antikörpern an die Schlaufe während der Inaktivierung vermindert ist (Vassilev *et al.*, 1989; Vassilev *et al.*, 1988). Als Antikörper-Bindungsstelle konnte ein Aminosäuren-Triplet bestehend Isoleuzin, Phenylalanin und Methionin (kurz IFM) identifiziert werden (West *et al.*, 1992). Daraus folgt, dass Proteine, die diese

Abfolge der Aminosäuren als Rezeptor nutzen, als Porenblocker fungieren. Es liegt also die Theorie nahe, dass IFM als Teil der Schlaufe zwischen Domäne III und IV an einen Rezeptor in der Pore bindet.

Bevor es zu einer erneuten Aktivierung der Kanäle kommen kann, findet eine Phase der Erholung von der Inaktivierung, auch *recovery* genannt, statt.

1.1.5 Das Ruhemembranpotential, das Gleichgewichtspotential und das Aktionspotential

Die Voraussetzung für die Erregbarkeit von Zellen ist das konstante Aufrechterhalten einer Ionendifferenz zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren. Diese Potentialdifferenz führt zu einer transmembranösen Spannung. Erreicht wird dies durch das Diffusionspotential. Dies ist Folge eines Konzentrationsgradienten und der selektiven Membranpermeabilität für das Gradienten erzeugende Ion. Durch das Bestreben den Konzentrationsgradienten auszugleichen, kommt es zum Fluß des Ions durch bestimmte Membranproteine. Da aber das Anion auf diesem Wege nicht folgen kann, kommt es zum Aufbau eines elektrischen Gradienten, der dem Konzentrationsgradienten entgegen wirkt. Das Ion kann nur fließen, bis beide Kräfte gleich sind, und sich so bei einem bestimmten Potential ein Gleichgewicht einstellt.

Das Gleichgewichtspotential

Das Potential für ein spezifisches Ion, bei dem kein Fluss mehr vorherrscht, ist das Gleichgewichtspotential. Dieses Potential kompensiert die Triebkraft des Konzentrationsgradienten. Berechnet wird es mit der Nernst-Gleichung:

$$E_S = \frac{RT}{z_S F} \cdot \ln \frac{[S]_{ext}}{[S]_{int}} \quad (1.1)$$

S ist hier das spezifische Ion, E_S dessen Gleichgewichtskonstante, z_S dessen Wertigkeit, und $[S]$ seine extra- (*ext*) bzw. intrazelluläre (*int*) Konzentration. R entspricht der Gaskonstante, T der absoluten Temperatur und F der Farady-Konstante.

Das Ruhemembranpotential

Das Ruhemembranpotential (E_M) setzt sich aus den Gleichgewichtspotentialen aller durch die Membran permeablen Ionen zusammen. Das Gleichgewichtspotential für Kalium hat den größten Einfluss auf das Ruhemembranpotential. Es kann somit näherungsweise herangezogen werden. Eine genauere Berechnung lässt sich durch das Zusammenfassen der Gleichgewichtspotentiale für Natrium-, Chlorid- und

Kalium-Ionen erreichen. Die Beeinflussung durch andere Ionen ist zu vernachlässigen. Beschrieben wird dieser Zusammenhang durch die Goldman-Gleichung:

$$E_M = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{P_K[K^+]_{ext} + P_{Na}[Na^+]_{ext} + P_{Cl}[Cl^-]_{int}}{P_K[K^+]_{int} + P_{Na}[Na^+]_{int} + P_{Cl}[Cl^-]_{ext}} \quad (1.2)$$

P bezeichnet die jeweilige Permeabilität. Das Verhältnis von $P_K : P_{Na} : P_{Cl}$ ist ungefähr 1 : 0,03 : 0,1 für eine normale Zelle. z steht hier für die Bilanz der Ladungsträger (in diesem Falle +1).

Das Aktionspotential

Beim Aktionspotential handelt es sich um eine kurzzeitige Änderung des Ruhemembranpotentials einer erregbaren Zelle nach dem „Alles-oder-Nichts-Gesetz“ auf einen überschweligen Reiz.

1.1.6 Die Herzerregung

Im menschlichen Herzen kommen unterschiedliche erregbare Zellen vor. Ihr Zusammenspiel gewährleistet einen reibungslosen Erregungsablauf (siehe hierzu Abbildung 1.3).

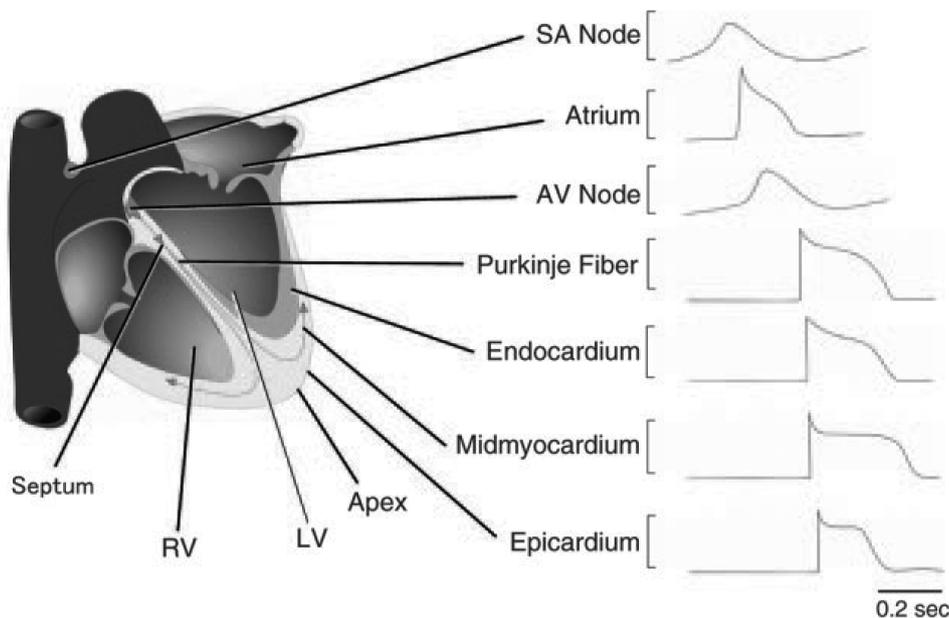


Abbildung 1.3: Darstellung der unterschiedlichen, im menschlichen Herzen vorkommenden Herzaktionspotentiale. Modifiziert nach Nerbonne (Nerbonne & Kass, 2005).

Die Erregung des Herzens beginnt im Sinusknoten (SA Node), er liegt im rechten Vorhof an der Einmündung der V. cava superior. Dort befinden sich Schrittmacherzellen, die durch spontane Depolarisation ein Aktionspotential generieren

(Autorhythmie). Da es sich beim Herzen um ein funktionelles Synzytium handelt, breitet sich die Erregung auf das gesamte Herz aus. Das Reizleitungssystem bestimmt jedoch den Ablauf. Die Erregung ergreift den gesamten Vorhof (Atrium) innerhalb von 100 ms. Da Vorhof und Kammer durch das Herzskelett elektrisch voneinander isoliert sind, muss sich die Erregung über den AV-Knoten (AV Node) ausbreiten, um die Kammer zu erreichen. Dadurch wird die Erregungsausbreitung um ca. 90 ms verzögert, um den Ventrikeln ausreichend Zeit zur optimalen diastolischen Blutfüllung zu geben. Um jetzt eine gleichmäßige Erregung beider Kammern zu gewährleisten, breitet sich der elektrische Impuls über das His-Bündel, den linken und rechten Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fasern auf das gesamte Ventrikelmyokard aus.

Das Herzaktionspotential

Die Aktionspotentiale der unterschiedlichen Zelltypen im menschlichen Herzen unterscheiden sich, um die Anforderungen an den Erregungsablauf zu erfüllen. Dies kann durch die individuelle Zusammensetzung der Membran mit bestimmten Membranproteinen gewährleistet werden. Die Stromverläufe, die sich hieraus in den unterschiedlichen Zellen des Herzens ergeben, sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Es fällt auf, dass bei steigender Entfernung vom Sinusknoten die Dauer der Repolarisationphase zunimmt. Dies ist nötig, um die Refraktärzeit des Ventrikelmyokards zu verlängern. Durch die anhaltende Depolarisation bleiben die Na^+ -Kanäle inaktiviert. Eine erneute Aktivierung ist erst nach Unterschreiten des Membranpotentials von -40 mV möglich, vorher ist das Ventrikelmyokard nicht erneut erregbar. Der Grund für die längere Refraktärzeit der Muskelzellen ist der Schutz vor einer zu schnellen Neuerregung, die die Pumpeffektivität negativ beeinflussen könnte. Dadurch, dass die Refraktärzeit länger ist, als die Erregungsausbreitung über das Herz, ist außerdem gewährleistet, dass durch jedes Sinusknoten-Aktionspotential nur eine Kammererregung folgt.

Das Aktionspotential des Ventrikelmyokards und dessen Zusammensetzung durch die unterschiedlichen Ionenströme ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

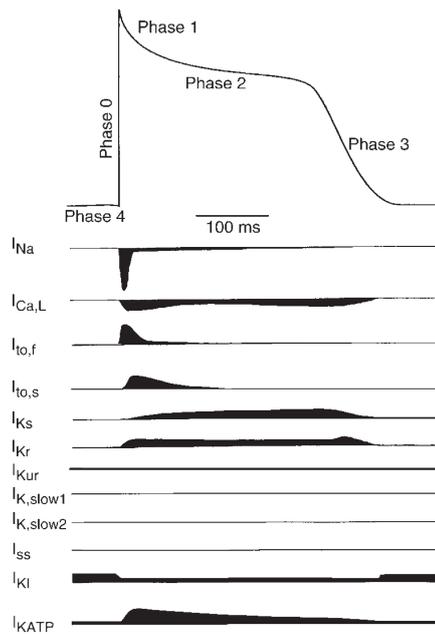


Abbildung 1.4: Verlauf des Aktionspotentials einer myokardialen Zelle. Darunter abgebildet die Ionenströme (Nerbonne & Kass, 2005).

Auf die, durch Aktivierung des schnellen Na_v -Ionen-Kanals (I_{Na}) bedingte, Depolarisation (Phase 0), folgt eine schnelle, aber nur teilweise Repolarisation (Phase 1). Diese wird durch einen transienten, spannungsabhängigen K^+ -Ionen-Einstrom ($I_{to,f}$) bedingt. Die initiale Repolarisation ist in Purkinje-Fasern und Ventrikelzellen besonders ausgeprägt und beeinflusst die Höhe und Dauer des folgenden Aktionspotential-Plateaus (Phase 2). Durch die Membrandepolarisation wird im Weiteren ein spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Ionen-Kanal geöffnet. Der einsetzende Ca^{2+} -Ionen-Strom ($I_{Ca,L}$) ist der wesentliche Grund für die Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion im Arbeitsmyokard (Bers & Perez-Reyes, 1999; Fabiato & Fabiato, 1979). Nach der Inaktivierung der Ca^{2+} -Ionen-Ströme kommt es zum Überwiegen der auswärtsgerichteten K^+ -Ionen-Ströme $I_{to,s}$, I_{Ks} und I_{Kr} . Dies führt zur Repolarisation auf das Ruhemembranpotential (Phase 3).

1.2 Durch Mutationen im Natriumkanal verursachte Pathologien am Herzen

Im folgenden Kapitel werden drei wichtige Krankheiten vorgestellt, die ihren Ursprung in einem Gendefekt des Natrium-Ionen-Kanals kardialer Zellen haben. Dies beeinflusst den geregelten Ablauf der Herzaktionspotentiale und führt zu kardialen Symptomen. Patienten mit einem solchen Defekt könnten eine besondere Risikogruppe für eine Intoxikation mit einem Lokalanästhetikum darstellen.

1.2.1 Das Long-QT Syndrom

1957 wurde von Jervell und Lange-Nielsen die erste Familie mit einem Long-QT Syndrom¹ beschrieben (Jervell & Lange-Nielsen, 1957). Von sechs Kindern gesunder Eltern waren vier taub. Sie litten unter wiederkehrenden Ohnmachtsanfällen in Situation starker emotionaler Erregung. Drei der vier tauben Kinder starben im Alter von vier, fünf und neun Jahren plötzlich beim Spielen. Die aufgezeichneten EKGs der Kinder zeigten Verlängerungen des QT-Intervalls. Nach einem weiteren Fall beschrieben von Levine und Woodworth im Jahre 1958 (Levine & Woodworth, 1958) wurde die Theorie aufgestellt, es handele sich um eine rezessiv-dominant vererbte Krankheit, die durch angeborene Taubheit, QT-Zeitverlängerung und wiederkehrende Synkopen charakterisiert ist. Die Entdeckung weiterer Fälle von QT-Zeitverlängerung und rezidivierenden Synkopen, auch ohne Taubheit, führte zu einer ausführlichen Studie über diesen Symptomkomplex (Moss & Schwartz, 1982).

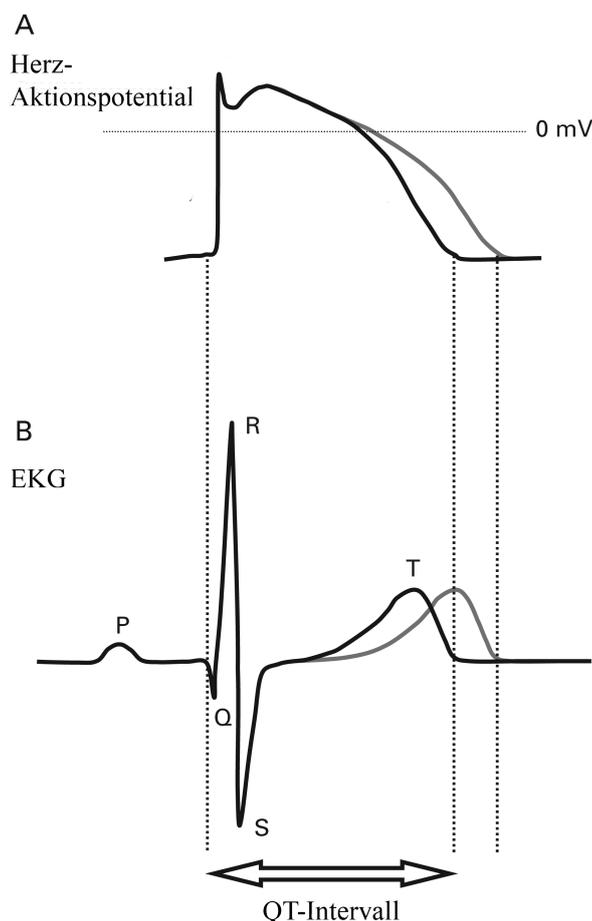


Abbildung 1.5: A. Gezeigt ist das physiologische Herzaktionspotential (schwarz) im Vergleich zu einer verlängerten Repolarisationsphase (grau) mit den Auswirkungen auf das in B gezeigte Oberflächen-EKG, verändert nach Abriel (Abriel *et al.*, 2004).

Die Diagnose wird durch eine auffällige QT-Zeitverlängerung im EKG bei der Abklärung von Synkopen, bei Verwandten eines nachweislich LQTS-Erkrankten oder der Abklärung von angeborener Taubheit gestellt. Eine Scoring-Tabelle mit klinischen Kriterien wurde von Schwartz erstellt und ist in Tabelle 1.1 gezeigt

¹im Weiteren LQTS

(Schwartz *et al.*, 1993).

Befund	Punkte
<hr/>	
EKG	
QT-Zeit	
$\geq 480\text{ms}$	3
460-470ms	2
450ms	1
Torsade de pointes	2
alternierende T-Welle	1
überspitztes T in 3 Ableitungen	1
Bradykardie	0,5
<hr/>	
Krankengeschichte	
Synkope	
unter Streß	2
ohne Streß	1
angeborene Taubheit	0,5
<hr/>	
Familiengeschichte	
Verwandte mit nachgewiesenem LQTS	1
Plötzlicher Herztod eines direkten Verwandten vor dem 30 LJ	0,5
<hr/>	

Tabelle 1.1: Scoring-Tabelle für LQTS. Beurteilung: 1 Punkt geringe Wahrscheinlichkeit; 2-3 Punkte mittlere Wahrscheinlichkeit; ≥ 4 Punkte hohe Wahrscheinlichkeit für LQTS (Schwartz *et al.*, 1993).

Die Ursache für die längere QT-Zeit liegt im prolongierten Aktionspotential der Herzmuskelzelle, wie Abbildung 1.5 zeigt. Ursächlich hierfür kann zum einen eine gesteigerte Permeabilität von Kanälen, die für die Depolarisation verantwortlich sind, sein („gain-of-funktion“), zum anderen aber auch ein Defekt von Kanälen, die für die Repolarisation verantwortlich sind, sein. In der Tabelle 1.2 werden die unterschiedlichen Formen des LQTS mit den defekten Genen und den daraus resultierenden Kanalproteinen gezeigt.

Bezeichnung	Gen	Protein
<i>LQT1</i>	<i>KCNQ1</i> / <i>KvLQT1</i>	I_{Ks} α -Untereinheit K^+ -Kanal
<i>LQT2</i>	<i>KCNH2</i> / <i>HERG</i>	I_{Kr} α -Untereinheit K^+ -Kanal
<i>LQT3</i>	<i>SCN5A</i>	I_{Na} α -Untereinheit Na^+ -Kanal
<i>LQT4</i>	<i>ANK2</i>	ANKRIN- β
<i>LQT5</i>	<i>KCNE1</i> / MinK	I_{Ks} α -Untereinheit K^+ -Kanal
<i>LQT6</i>	<i>KCNE2</i> / MiRP	I_{Kr} α -Untereinheit K^+ -Kanal
<i>LQT7</i>	<i>KCNJ2</i>	I_{Kr} α -Untereinheit K^+ -Kanal

Tabelle 1.2: Varianten des angeborenen Long-QT-Syndroms (modifiziert nach Kass (Kass & Moss, 2003)). Dargestellt sind jeweils die Bezeichnung, das betroffene Gen, sowie das entsprechende Protein.

Wie zu erkennen ist, handelt es sich bei dem LQT3-Syndrom um einen Defekt in

dem SCN5A-Gen. Dieses kodiert für die α -Untereinheit des kardialen Na^+ -Kanals. Er ist für die initiale Depolarisation des Herzaktionspotentials, den sogenannten „upstroke“ während der Phase 0, verantwortlich. Es kommt bei diesem Defekt zu einer „gain-of-function“, einer „Überfunktion“ des Kanals. Sie läßt sich durch eine beeinträchtigte Inaktivierung erklären, diese führt zu einer verlängerten Depolarisation (Bennett *et al.*, 1995). Neben der angeborenen Dysfunktion der Kanäle gibt es noch erworbene Dysfunktionen, die zu einer Verlängerung des QT-Intervalls führen:

- Antiarrhythmika der Klasse IA, IC und III
- Andere Medikamente wie Antibiotika, Antimykotika, psychotrope Substanzen
- Herzkrankheiten (z.B. chronische Herzfehler, Kardiomyopathie)
- Elektrolytverschiebungen (Hypokaliämie, Hypokalziämie und Hypomagnesiämie)
- Neurologische Erkrankungen
- Ernährungsbedingt (z.B. Alkoholismus, Anorexie)

1.2.2 Brugada-Syndrom

1992 beschrieben Brugada und Brugada acht Fälle der Verhinderung des plötzlichen Herztodes durch Defibrillation bei Patienten mit einem charakteristischen EKG-Befund: Rechtsschenkel-Block mit ST-Streckenhebungen.

Die Pathologie konnten Chen *et al.* 1998 (Chen *et al.*, 1998) erstmals auf eine Mutation des SCN5A-Gens zurückführen. Allerdings schien es noch eine weitere Mutation zu geben, die lediglich in der Nähe dieses Gens liegt (Weiss *et al.*, 2002). Eine Mutation im I_{Na} kann aber nur in circa $\frac{1}{3}$ der Fälle nachgewiesen werden. Dies spricht für eine genetische Heterogenität. Es werden zahlreiche andere Gene als Ursache diskutiert, die für I_{to} , I_K , I_{Ca} , für adrenerge und cholinerge Rezeptoren oder auch für akzessorische Proteine an Kanälen kodieren. Die analysierten Defekte im I_{Na} führen alle zu einem Funktionsverlust („loss-of-function“) des Na^+ -Ionen-Kanals, allerdings auf unterschiedliche Weise: (1) Fehler in der Expression, (2) Veränderung in der Spannungs- oder Zeitabhängigkeit der Aktivierung, Inaktivierung oder Erholung, (3) Eintreten in einen Zwischenzustand der Inaktivierung mit längerer Erholung, (4) schneller Inaktivierung oder (5) ein Defekt im Ionenaustausch.

Nach dem zweiten Konsensbericht der Heart Rhythm Society und der European Heart Rhythm Association (Antzelevitch *et al.*, 2005) wird ein Brugada-Syndrom diagnostiziert beim Vorliegen folgender EKG-Veränderungen. **Typ 1:**

Hoher J-Punkt² (>2mm) in den Brustwandableitungen V₁₋₃ mit anschließend deszendierendem ST-Streckenverlauf und Übergang in ein negatives T; die ST-T-Konfiguration wird als „coved type“ bezeichnet und gilt als beweisend für das Vorliegen eines Brugada-Syndroms.

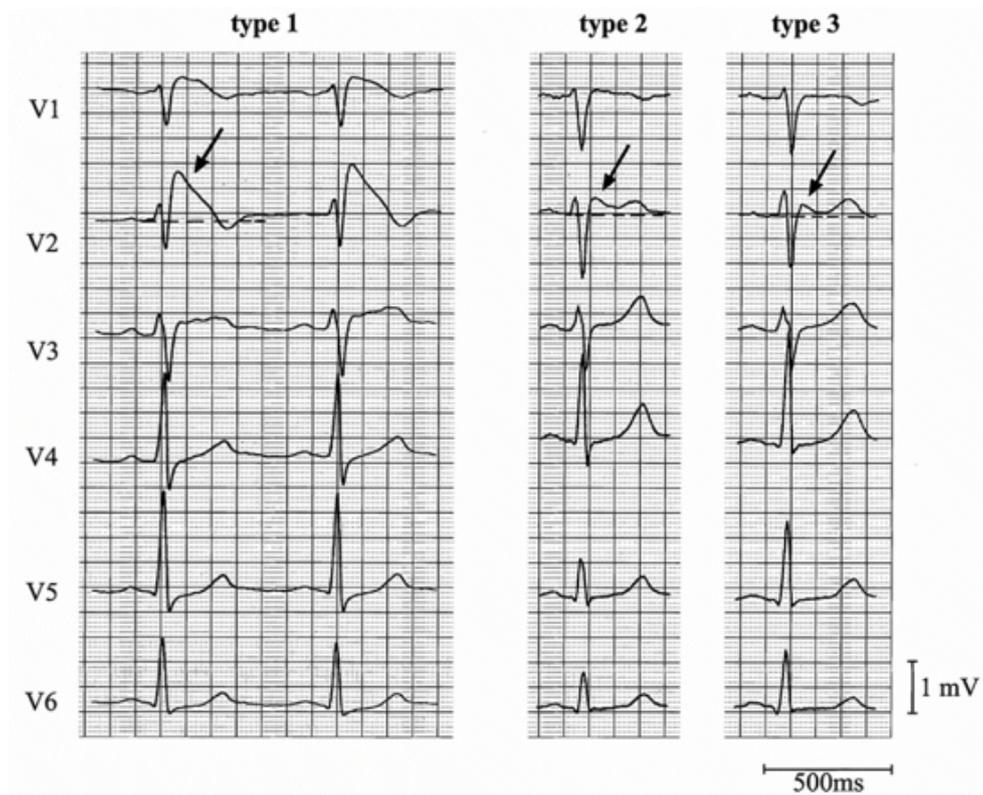


Abbildung 1.6: Es sind Brustwandableitungen V₁ bis V₆ bei Patienten mit Brugada-Syndrom gezeigt. Typ 1 links („coved type“), Typ 2 Mitte und Typ 3 rechts („saddle back“). J-Punkt durch Pfeile gekennzeichnet. Modifiziert nach (Wilde *et al.*, 2002)

Die EKG Veränderungen beim Typ 2 und 3 des Brugada-Syndroms sind nicht spezifisch und müssen sich durch Gabe eines Klasse-I-Antiarrhythmikums in ein Typ 1 EKG umwandeln lassen. **Typ 2:** Hoher J-Punkt (>2mm); Verlauf der ST-Strecke ist konkavartig, sie geht in ein positives oder biphasisches T über; die ST-Strecke bleibt im gesamten Verlauf ≥ 1 mm oberhalb der isoelektrischen Linie. Dieser Verlauf wird als „saddle back“ bezeichnet. Der **Typ 3** entspricht dem Typ 2, die ST-Streckenhebung beträgt jedoch <1mm und erreicht am tiefsten Punkt oft die isoelektrische Linie.

Zusätzlich zu dem Typ 1 EKG-Verlauf, muß mindestens ein zusätzliches Symptom aus der folgenden Liste vorhanden sein:

- Dokumentiertes oder induzierbares Kammerflimmern
- Selbstlimitierende polymorphe Kammertachykardie

²Ende des QRS-Komplexes und Beginn der ST-Strecke

- Positive Familienanamnese für plötzlichen Herztod (<45 Jahre)
- „coved type“ EKG bei Familienangehörigen
- Anamnestische Synkope
- Zustände nächtlicher agonaler Atmung

Das Rezidivrisiko bei symptomatischen Patienten liegt bei circa 30% innerhalb von 3 Jahren. Hier geht die Empfehlung eindeutig zur Implantation eines ICD-Systems (Brugada *et al.*, 1999). Die Frage ob Patienten ohne Symptomatik von dieser Therapie profitieren, ist bis dato offen.

1.2.3 Sick-Sinus-Syndrom

Das Sick-Sinus-Syndrom entsteht aufgrund einer Unfähigkeit des Sinusknotens eine dem Bedarf des Körpers angepasste Vorhoffrequenz zu generieren. So präsentiert sich dieses Krankheitsbild in unterschiedlichen Manifestationen:

- Persistierende Sinusbradykardie
- Intermittierende Episoden von Sinusknotenstillstand oder sinuatrialem Block
- Bradykardie-Tachykardie-Syndrom (Störung der sinuatrialen Erregungsbildung und -leitung mit dem Auftreten von Vorhoftachyarrhythmien)

Dieses Syndrom läßt sich nicht auf eine Ätiologie zurückführen. Es gibt sowohl intrinsische als auch extrinsische Ursachen, die mit einer Schädigung des Sinusknotens einhergehen und in Tabelle 1.3 gezeigt sind.

Intrinsische Ursachen	Extrinsische Ursachen	Angeborene Ursachen
Amyloidose	Cholinesterasemangel	Gendefekte
Arteriitis	Hyperkaliämie	Gefäßanomalien
Kardiomyopathie	Hypoxie	
Chagas-Krankheit	Medikamente	
Leukämie	Digitalis	
Diphtherie	Ca-Kanalblocker	
Hereditäre Erk.	β -Blocker	
Herzverfettung	Sympatikolytika	
Friedreich Ataxie	Antiarrhythmika	
Hämochromatose	Toxine	
Idiopathische Fibrose		
Ischämie/Infarkt		
Metastasen		
Muskeldystrophie		
Myokarditis		
Perikarditis		
Reumatische Erk.		
Sarkoidose		

Tabelle 1.3: Ursachen des Sick-Sinus-Syndroms, übersetzt und modifiziert nach Wahls (Wahls, 1985).

Die für diese Arbeit relevanten Ursachen des Sick-Sinus-Syndroms sind zum einen die angeborenen Erkrankungen, die auf einer genetischen Veränderung des Kanals beruhen und somit dessen Funktion beeinflussen und zum anderen die durch Medikamente hervorgerufenen.

Patienten können asymptomatisch oder nur von geringen Symptomen betroffen sein. Die Symptome lassen sich auf den verminderten Auswurf des Herzens zurückführen, am häufigsten auf eine verminderte zerebrale Perfusion: Die Hälfte der Patienten leidet unter Synkopen oder Präsynkopen. Weitere Symptome zeigt die Tabelle 1.4.

zentral-nervös	kardio-vaskulär	andere
Demenz	Angina Pectoris	Verdauungsbeschwerden
Reizbarkeit	arterielle Thrombembolien	Schwindel
Lethargie	zerebro-vaskuläres Ereignis	Desorientiertheit
Benommenheit	Palpitationen	Flush
Gedächtnisverlust		Müdigkeit
Schlaflosigkeit		Oligurie
(Prä-)Synkope		

Tabelle 1.4: Symptome des Sick-Sinus-Syndrom (Wahls, 1985).

Die Diagnose kann in vielen Fällen schon durch ein Langzeit-EKG gestellt werden, in dem sich SA-Blockierungen, Sinusarrest oder supraventrikuläre Tachykardi-

en zeigen. Ein weiterer Test ist die Denervierung des Sinusknotens durch β -Blocker und Atropin. Es resultiert die autonome Herzfrequenz ohne den Einfluss des vegetativen Nervensystems. Die Soll-Frequenz oder intrinsische Herzfrequenz (IHF) kann mit der Formel nach José berechnet werden (Jose & Collison, 1970):

$$IHF = 118,1 - (0,57 * \text{Alter}) \quad (1.3)$$

Die Abweichung der Ist-Frequenz sollte nicht mehr als 15% betragen.

Eine andere Möglichkeit der Diagnosstellung ist die Atropingabe. Bei Sinusknoten-Gesunden sollte daraus ein Anstieg der Herzfrequenz resultieren. Die Literaturangaben dieser Frequenzsteigerung variieren (+25%, auf 90 bis 100 bpm, +25 bpm) (Roskamm, 2004). Auch ein Belastungs-EKG kann durch einen inadäquaten Frequenzanstieg auf einen geschädigten Sinusknoten hinweisen.

Die Therapie beruht auf der Implantation eines Vorhofschrtrittmachers. Die Prognose richtet sich nach dem Grundleiden. Die Implantation eines Schrittmachersystems kann für Patienten mit einem Gendefekt eine kurative Therapie bedeuten (Adán & Crown, 2003).

1.3 Lokalanästhetika

Mit der Entdeckung der lokalanästhetischen Wirkung von Kokain, erstmals angewendet 1884 von dem Wiener Ophtalmologen Carl Koller (Koller, 1884), begann das Zeitalter der Lokalanästhetika. Aufgrund der starken Nebenwirkungen, wie ausgeprägte Sympathikusstimulation, euphorische Hochphase und periphere Vasokonstriktion (Knuepfer, 2003), wurde die Entwicklung nebenwirkungsärmerer Substanzen vorangetrieben. Die Entwicklung führte über Esterlokanästhetika, wie Procain, welches eine kurze Wirkdauer und ein hohes allergisches Potential hat, zu den heute gebräuchlichen Lokalanästhetika des Säureamidtyps, wie Lidocain (Ruetsch *et al.*, 2001). Eine Untergruppe dieser Klasse sind die Pipecoloxyli-
pidlokanästhetika Mepivacain, Bupivacain und Ropivacain (Ruetsch *et al.*, 2001).

1.3.1 Pharmakologie der Lokalanästhetika

Der grundsätzliche Aufbau aller Lokalanästhetika ist gleich. Das Molekül besteht aus einem lipophilen Anteil, gebildet aus einem aromatischen Ring, und einem hydrophilen Anteil, gebildet aus einem tertiären Amin. Die Art der Bindung zwischen diesen beiden Teilen bedingt die Einteilung in Ester- oder Amidtyp.

Der gewünschte Wirkmechanismus aller Lokalanästhetika ist die hochspezifische Blockade des spannungsgesteuerten Na^+ -Ionen-Kanals in den neuronalen Membranen. Dadurch wird die Entstehung und saltatorische Weiterleitung des

Schmerzreizes unterbunden. Hierzu ist eine Blockade der Kanäle in mindestens drei Ranvier-Schnürringen - entsprechend 3 mm - erforderlich.

Die Eigenschaften eines Lokalanästhetikums werden hauptsächlich durch vier physikochemische Charakteristika definiert.

Potenz

Die Lipophilie, angegeben als Verteilungskoeffizient, erlaubt eine Aussage über die Potenz. Aufgrund der besseren Diffusion der lipophileren Substanzen durch die bindegewebigen Strukturen, kommt es schneller zu einer höheren Konzentration am Wirkort. Die Lipophilie ist bei den Substanzen Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain in angegebener Reihenfolge aufgrund der Länge einer Alkylkette am tertiären Amin zunehmend.

Wirkungseintritt

Der Wirkungseintritt wird durch den pK_a -Wert bestimmt, hierbei handelt es sich um die Dissoziationskonstante. Berechnet wird sie nach der Henderson-Hasselbach-Formel:

$$pK_a = pH - \log \frac{[B]}{[BH^+]} \quad (1.4)$$

Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen ungeladener $[B]$ und geladener $[BH^+]$ Form des Moleküls. Es ist zu erkennen, dass dieses Verhältniss abhängig von dem pH-Wert ist. Sind pH- und pK_a -Wert gleich, so ist das Verhältniss gleich 1; ungeladene und geladene Form liegen in gleicher Konzentration vor. Für die meisten Lokalanästhetika gilt, dass der pK_a -Wert im basischen Bereich liegt und damit über dem physiologischen pH-Wert. Der logarithmische Komplex wird somit negativ und die geladene Form überwiegt gegenüber der ungeladenen. Allerdings kann dieser geladene Zustand die Membran schlechter passieren, was den Wirkungseintritt verzögert. Je größer also der pK_a -Wert oder je niedriger der pH-Wert der Umgebung, umso verzögerter ist der Wirkungseintritt.

Wirkungsdauer

Verschiedene Faktoren werden für die Wirkungsdauer von Lokalanästhetika verantwortlich gemacht. Einer ist die vasodilatative Aktivität, die bei Lidocain am stärksten ausgebildet ist, was u.a. die Halbwertszeit verkürzt. Ein weiterer Faktor ist die Plasmaproteinbindung. Sie ist mit einem Anteil von 6% bei Lidocain sehr gering und bei Bupivacain mit einem Anteil von 96% hoch. Die Theorie besagt zum einen, dass diese hohe Affinität direkt auf die Membranproteine übertragen

werden kann und zum anderen, dass die Medikamente länger in einer wirksamen Konzentration am Wirkort gehalten werden.

Differentialblockade

Die differentielle Blockade der Schmerzübertragung ist der erwünschte Effekt. Da schmerzleitende Fasern die dünnsten Nervenfasern sind kommt es zur Blockade vor den dickeren, motorischen Fasern. Je lipophiler ein Lokalanästhetikum aber ist, umso eher kommt es auch zu einer motorischen Blockade. Da die dickeren, motorischen A α -Fasern, um eine hohe Leitgeschwindigkeit zu erreichen, mit einer fettreichen Myelinschicht umgeben sind, lagern sich lipophilere Substanzen eher an. Es kommt dadurch zu einer geringeren Blockade der A α -Fasern und damit zu einer ausgeprägteren Differentialblockade durch Ropivacain als durch Bupivacain.

1.3.2 Lokalanästhetikaintoxikation

Durch die versehentliche intravasale Injektion und durch die Diffusion der Substanzen in das Gefäßsystem kommt es zu einem Anstieg des Plasmaspiegels und somit zu Nebenwirkungen, die vier verschiedenen Bereiche betreffen können (Brown *et al.*, 1995):

- Allergische Reaktionen
- Hämatologische Effekte
- Lokale Gewebstoxizität
- Systemische Intoxikation.

Alle Lokalanästhetika können durch Sensibilisierung, meist durch aminoether Metabolite (Paraaminobenzoesäure), zu schweren allergischen Reaktionen führen (Macy, 2003; Fernández-Redondo *et al.*, 2001).

Zu substanzspezifischen hämatologischen Effekten kommt es zum Beispiel durch einen Prilocainmetaboliten, der eine Methämoglobinbildung induziert.

Die lokale Gewebetoxizität gliedert sich in Neuro- und Myotoxizität (Lambert *et al.*, 1994). Zu diesen Schäden kommt es allerdings nur bei Konzentrationen im Gewebe, die im normalen Klinikalltag selten erreicht werden (Selander *et al.*, 1979a; Selander *et al.*, 1979b). Von denen durch die Neurotoxizität hervorgerufenen Krankheiten sind vor allem zwei zu nennen: Das „Transiente-Neurologische-Syndrom“ (TNS) (Bang-Vojdanovski *et al.*, 2002; Eberhart *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 1993) und das „Cauda-equina-Syndrom“ (CES) (Jaradeh, 1993; Orendáčová *et al.*, 2001). Die genauen Ursachen hierfür sind unklar, bekannt ist aber die enge Assoziation zu einem endoneuralen Ödem (Kalichman *et al.*, 1988; Kalichman *et al.*, 1989; Kalichman, 1993; Kalichman *et al.*, 1993). Es gibt ferner Hinweise,

dass Lokalanästhetika in der Lage sind, Apoptose in Nervenzellen auszulösen (Kim *et al.*, 1997; Nassogne *et al.*, 1997; Radwan *et al.*, 2002).

Des Weiteren wird der Ca^{2+} -Spiegel der Zelle beeinflusst. Durch Stimulation des Ryanodinrezeptors durch Lokalanästhetika wird Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Gleichzeitig wird die Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Reticulum durch Blockade von membranständigen Ca^{2+} -ATPasen konzentrationsabhängig gehemmt. Diese gesteigerte Ca^{2+} -Konzentration wird hauptsächlich für eine Myotoxizität verantwortlich gemacht (Komai & Lokuta, 1999; Zink *et al.*, 2002; Zink & Graf, 2004; Zink *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise, dass die Stärke dieses Effekts von der Lipophilie abhängt, und somit bei Mepivacain und Ropivacain geringer ausgeprägt ist.

Zu starken systemischen Intoxikationen kommt es bei Erreichen eines substanzspezifischen Plasmaspiegels durch die schon angesprochene Diffusion von der Injektionsstelle aus. Häufiger als Diffusionsphänomene führt die versehentliche intravasale Injektion zu systemischen Intoxikation (Brown *et al.*, 1995). Die Lokalanästhetika werden im Blut an Plasmaproteine gebunden, Lidocain an Albumin und Bupivacain, Ropivacain und Etidocain an α_1 -saures Glykoprotein. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Substanz ein, wobei hauptsächlich letztere durch Diffusion aus der Blutbahn für die toxischen Reaktion verantwortlich gemacht wird. Die Nebenwirkungen der hochpotenten, lipophilen Lokalanästhetika sind geringer, da die Bindungsrate an Plasmaproteine höher ist. Man unterscheidet bei der systemischen Intoxikation zwischen Wirkungen auf das ZNS und das kardiovaskuläre System, wobei das ZNS empfindlicher reagiert und schon geringe Konzentrationen zu Symptomen führen. Dies spiegelt sich in der „CC/CNS ratio“³ wieder (Morishima *et al.*, 1985). Es werden Plasmaspiegel oder Dosierungen ins Verhältnis gesetzt, die einen irreversiblen kardiovaskulären Kollaps, bzw. generalisierte Krampfanfälle auslösen. Somit ergibt sich ein Maß für das Sicherheitsspektrum.

Die Symptomatik der zentralvenösen Intoxikation läßt sich in vier Stadien unterteilen. Initial das Prodromalstadium mit perioraler Taubheit und Geschmacksirritation, gefolgt vom präkonvulsiven Stadium mit Tremor, Tinnitus, Nystagmus und Somnolenz, dem konvulsivem Stadium mit generalisierten, tonisch-klonischen Krämpfen und schließlich dem Stadium der ZNS-Depression mit Koma, Apnoe und Kreislaufkollaps. Die Pathophysiologie beruht in der ersten Phase auf der Hemmung der afferenten und efferenten Gehirnnervenfasern (Scott, 1986). In der zweiten Phase überwiegt die Blockade der kortikalinhibitorischen Neurone (Engleson, 1974). In der dritten Phase kommt es zu einer Blockade der kortikalen Hemmung der Amygdala (Eidelberg, 1963). Die letzte Phase wird durch die totale Blockade exzitatorischer Nervenverbände subkortikaler Zentren verursacht (Tanaka &

³cardiovascular collapse/central nervous system ratio

Yamasaki, 1966), was sich in einem Nulllinien-EEG⁴ widerspiegelt. Bei richtiger Therapie sind alle Stadien reversibel, mit einer bleibenden Schädigung ist nicht zu rechnen.

Zu einer kardiovaskulären Intoxikation kommt es erst bei höheren Plasmakonzentrationen, so dass erste zentralnervöse Symptome als Warnung erkannt werden können. Bei Patienten in Narkose werden solche Symptome nicht erkannt, weshalb Nebenwirkungen kardio-vaskulärer Natur primär in Erscheinung treten.

Es werden direkte und indirekte Wirkungen auf das kardiovaskuläre System unterschieden. Die direkte Wirkung auf das kardiale System beruht auf einer Interaktion der Substanzen mit dem Reizleitungssystem. Durch Interaktion mit den Membranproteinen kommt es zur einer Änderung der Ionenströme, was den Ablauf der Aktionspotentiale beeinflusst. Hier spielen Na⁺-Kanäle eine bedeutende Rolle. Durch die Hemmung des schnellen Na⁺-Einstroms verkürzt sich die Aktionspotentialdauer sowie die effektive Refraktärperiode. Dies zeigt sich im EKG mit einer Verbreiterung des QRS-Komplexes sowie einer PQ-Intervallverlängerung bis hin zur totalen AV-Dissoziation. Ein weiterer Kanal des Reizleitungssystems, der bedeutend durch Lokalanästhetika beeinflusst wird, ist der K⁺-Kanal (Solth *et al.*, 2005; Siebrands *et al.*, 2006). Des weiteren sind Wirkung auf Ca²⁺-Ströme beschrieben, die für die Kontraktion der Myozyten verantwortlich sind (Rossner & Freese, 1997). Die indirekte Wirkung beruht auf einer funktionellen Beeinträchtigung des im Hirnstamm lokalisierten Nucleus tractus solitarii und verschwimmen somit mit den Symptomen der zentralnervösen Intoxikation. Durch die Blockade inhibitorischer Neurone des vegetativen Kerngebiets kommt es zu einer Steigerung des Sympathikotonus (Graf, 2001).

1.3.3 Vergleich der Toxizität von Bupivacain und Ropivacain

Allen Lokalanästhetika ist gemein, dass sie die Übertragung des Schmerzreizes von der Peripherie, dem Ort des Entstehens, zum Zentralen Nervensystem durch die Blockade von spannungsgesteuerten Natriumkanälen verhindern. Die Substanzen unterscheiden sich in ihren Strukturformeln und damit in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften. Dies führt zu unterschiedlichen Interaktionen und Beeinflussungen des Kanals. Die Tabelle 1.5 zeigt unterschiedliche Eigenschaften und die Strukturformeln von Bupivacain und Ropivacain.

⁴Elektroenzephalogramm

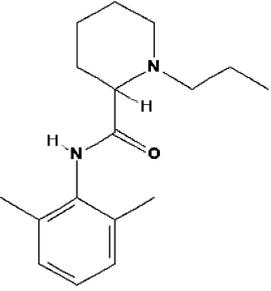
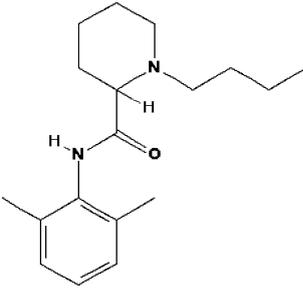
	Ropivacain	Bupivacain
Strukturformel		
Rest	Propyl	Butyl
pK_a -Wert	8,07	8,1
Molekulargewicht	274	288
Verteilungskoeffizient	6,1	27,5
Proteinbindung [%]	94	95
Verteilungsvolumen [l]	59	73
Halbwertszeit [min]	111	162

Tabelle 1.5: Strukturformeln und Eigenschaften von Ropivacain und Bupivacain.

In zahlreichen Studien wurden die unterschiedlichen Wirkungen der beiden Medikamente auf verschiedene Systeme, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, untersucht (Clarkson & Hondeghem, 1985; Komai & Lokuta, 1999; Nancarrow *et al.*, 1989; Rossner & Freese, 1997; Solth *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 2007; Zink *et al.*, 2002; Friederich & Solth, 2004; Valenzuela *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 2000; Knudsen *et al.*, 1997). Schon früh konnten Arlock *et al.* (Arlock, 1988) zeigen, dass es sich beim Mechanismus des Blocks von Bupivacain und Ropivacain um einen „*fast-block*“ handelt, ebenso wie bei Lidocain. Die Erholung des geblockten Zustands ist allerdings viel langsamer als bei Lidocain, welches aufgrund dieses „*fast-out*“ auch als Antiarrhythmikum eingesetzt werden kann.

Valenzuela *et al.* haben in zwei Arbeiten (Valenzuela *et al.*, 1997; Valenzuela *et al.*, 1995) die Wirkung von Ropivacain und Bupivacain auf den menschlichen Kaliumkanal $k_v1.5$ untersucht. Es zeigte sich für S(-)-Ropivacain eine dreifach und für R(+)-Ropivacain sogar eine 20-fach geringere Hemmung als für Bupivacain auf den Kalium-Strom. Dieser Kanal ist essentiell für die Stabilität des Membranpotentials und für die Repolarisierung nach Aktivierung der Herzzelle. Störungen können somit zu Arrhythmien, Asystolien und ventrikulären Tachykardien führen.

Die Untersuchungen von Nancarrow *et al.* (Nancarrow *et al.*, 1989) an Schafen, zeigten u.a., dass von Ropivacain die doppelte Dosis erforderlich ist, um die Krampfschwelle zu erreichen. Die Wiederholung dieser Studien an Freiwilligen (Scott *et al.*, 1989; Knudsen *et al.*, 1997) konnte diese Daten bestätigen. Die Infusion von bis zu 150 mg Ropivacain führte zu weniger zentralnervösen Störungen als bei 150 mg Bupivacain. Des weiteren lag die tolerierte Dosis für Ropivacain

um 24% über der von Bupivacain. In der Studie von Knudsen wurden die Versuche beim Auftreten von ersten Symptomen beendet. Hierbei handelte es sich immer um Symptompe zentralnervöser Art. Das kardiale Monitoring zeigte aber auch schon zu diesem Zeitpunkt verbreiterte QRS-Komplexe, für Ropivacain geringer ausfallend als für Bupivacain. Der Einfluß von Bupivacain reduzierte die systolische und diastolische Auswurfleistung des linken Ventrikels. Ropivacain reduzierte nur die systolische Auswurfleistung.

Eine Studie von Groban *et al.* (Groban *et al.*, 2001) untersuchte den Effekt einer Überdosis Ropivacain oder Bupivacain am Hund. Diese führte zu kardialem Kollaps. Von denen mit Ropivacain intoxikierten Hunden verstarben trotz Reanimation 10%, von denen mit Bupivacain intoxikierten 50%.

Verschiedene publizierte Arbeiten konnten die oben genannten Effekte nicht bestätigen. So konnten Friederich *et al.* (Friederich *et al.*, 2004) in Untersuchung mit Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain keinen Unterschied in der Wirkung auf den K^+ -Ionen-Kanal HERG feststellen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die axonale Degeneration von Bupivacain 0,5% zu der von physiologischer Kochsalzlösung nicht unterscheidet (Selander *et al.*, 1979a).

In einer Studie von Junca wurden Bupivacain und Ropivacain im Rahmen cervical Plexusblockaden verglichen. Es wurde zum Erreichen einer vergleichbaren Analgesie 150 mg Bupivacain bzw. 225 mg Ropivacain verwendet. Es fanden sich höhere Plasmaspiegel für Ropivacain als für Bupivacain. Zusätzlich waren in der Ropivacaingruppe häufiger additive Analgetikagaben erforderlich. Die Autoren empfahlen deswegen die Verwendung von Bupivacain (Junca *et al.*, 2001).

2 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Wirkung der strukturverwandten Amidlokanaläthetika Bupivacain und Ropivacain auf den humanen Na^+ -Ionen-Kanal SCN5A mittels der Patch-Clamp-Methode vergleichend untersucht werden. Es existieren bereits an unterschiedlichen Spezies durchgeführte Studien bezüglich der Wirkung von Bupivacain auf unterschiedliche Bereiche des kardialen Reizleitungssystems (Arlock, 1988; Clarkson & Hondeghem, 1985; Komai & Lokuta, 1999; Nancarrow *et al.*, 1989; Rossner & Freese, 1997; Solth *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 2007; Zink *et al.*, 2002). Nau führte bereits Experimente bezüglich der Wirkung von Bupivacain auf den kardialen Na^+ -Ionen-Kanal SCN5A durch (Nau *et al.*, 2000). Für Ropivacain fehlen bis lang Studien über die direkte Wirkung auf diesen Natriumstrom I_{Na} des menschlichen Herzen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, welchen Einfluss Strukturvariationen des inhibierenden Medikaments und des Kanals auf den Natriumstrom I_{Na} haben. Ausgehend von Untersuchungen über die Beeinflussung des Natriumstroms durch unterschiedliche Konzentrationen von Bupivacain, wurden hierzu die Experimente durch Einführung von zwei Strukturvariationen erweitert. Zum einen wurde die Struktur des Medikaments verändert, es wurde Ropivacain verwendet, und zum anderen wurde die Struktur des Na^+ -Ionen-Kanals verändert, indem eine mutierte Variante für die Experimente eingesetzt wurde.

Es ergeben sich somit die folgenden Aufgabenstellungen:

- Untersuchung der Wirkung von Bupivacain auf den humanen SCN5A Ionenkanal des menschlichen Herzen
- Untersuchung der Wirkung von Ropivacain auf den humanen SCN5A Ionenkanal des menschlichen Herzen
- Vergleich der gewonnenen Daten von Bupivacain und Ropivacain, Schlussfolgerungen über den Einfluss unterschiedlicher Strukturformeln auf die Interaktion mit dem Ionenkanal und Transfer der Erkenntnisse auf die physiologischen Vorgänge im Reizleitungssystem des Menschen
- Charakterisierung des mutierten SCN5A-Kanals und Vergleich mit dem Wildtyp-Kanal
- Untersuchung der Wirkung von Bupivacain auf einen mutierten SCN5A Ionenkanal des menschlichen Herzen

- Schlussfolgerungen über den Einfluss einer Mutation in den Ionenkanal bezüglich des Effekts von Bupivacain auf die Ströme.

3 Material und Methoden

3.1 Zellen und Zellkultur

3.1.1 Zellen

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messungen wurde die HEK¹ Flp-in 293 Zelllinie der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) als Expressionssystem verwendet. Im Vorfeld wurden sie im ZMNH² entweder mit dem Wildtyp Na⁺-Ionen-Kanal-Gen SCN5A oder mit einer mutierten Variante des Gens (Träger des Sick-Sinus-Syndrom) stabil transfiziert. Die Zellen wurden mittels Kryofixierung konserviert. HEK-Zellen zeichnen sich durch eine geringe Anzahl endogener Kanäle aus. Die Zelllinie besitzt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromicin.

3.1.2 Zellkultur

Die Kultivierung der HEK-293 Zellen erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen des Herstellers Nunc (Roskilde, Dänemark) mit 5 ml Dulbecco's MEM / NUT MIX F-12 (Invitrogen). Dieses war zuvor mit 10% fetalem Kälberserum, 10 IU/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin versetzt worden. Unter Zugabe von 2 μ l des Antibiotikums Hygromicin pro Milliliter Lösung wurden die Zellen im Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius, 5% CO₂-Anteil in der Luft und einer relativen Luftfeuchte von 95% aufbewahrt. Alle zwei Tage wurden die Zellen nach Ablösen vom Flaschenboden durch Zugabe von 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen) in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Nach maximal 50 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue Zellen zur Weiterverwendung aufgetaut. Einen Tag vor Messbeginn erfolgte die Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer. Um für die Messungen eine geeignete Zelldichte zu gewährleisten, wurde eine optimale Verdünnung abgeschätzt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf Poly-Lysin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) beschichteten Kulturschalen (Nunc).

¹human embryonic kidney

²Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Patch-Clamp-Technik

Bei der Patch-Clamp-Technik handelt es sich um ein Messverfahren, mit dem der Ionenstrom durch einzelne Kanäle direkt gemessen werden kann (Neher & Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981; Numberger & Draguhn, 1996). Es ist eine Weiterentwicklung der Voltage-Clamp-Technik, welche bereits von Cole im Jahre 1979 (Marmont, 1949) entwickelt wurde. Beide Techniken beruhen auf dem Applizieren eines Kompensationsstroms, um eine Änderung des Membranpotentials einer zu untersuchenden Zelle zu verhindern. Über eine Elektrode, die sich in einer Messpipette befindet, kann das aktuelle Membranpotential gemessen werden. Es wird ständig mit einem Soll-Potential, welches durch ein Protokoll vorgegeben wird, verglichen. Besteht eine Differenz, so wird der Kompensationsstrom appliziert und aufgezeichnet. Der Unterschied der beiden Verfahren besteht lediglich in der Verwendung zweier Elektroden in der Voltage-Clamp-Methode - eine zur Messung und eine zur Applikation - während die Patch-Clamp-Methode beides über nur eine Elektrode leisten kann. Der aufgezeichnete Kompensationsstrom lässt unmittelbare Schlüsse auf den Membranwiderstand zu, der von Ionenkanälen mitbestimmt wird. Zur Vermeidung von Hintergrundrauschen, welches um ein Vielfaches größer ist als der aufzuzeichnende Strom und diesen somit unkenntlich überlagerte, wurde ein Teil der Membran, der „Patch“, durch einen hohen Abdichtwiderstand von seiner Umgebung elektrisch isoliert. Erwin Neher und Bert Sakmann gelang es durch das Anlegen eines Unterdrucks in einer sauberen Mikroglasspipette, der Patchpipette, einen Abdichtwiderstand in Höhe von mehreren Giga-Ohm herzustellen, das sogenannte „Gigaseal“. Es wurden im Laufe der Zeit mehrere Methoden entwickelt, mit denen der Kontakt zwischen der Pipette und der Zelle hergestellt werden kann; diese sogenannten Patchkonfigurationen werden im Folgenden erläutert:

Patchkonfiguration

Initial wurde eine Glaspipette, an die ein Überdruck angelegt wurde, in die unmittelbare Nähe einer Zelle gebracht. Das Ablassen dieses Überdrucks bringt die Glaspipette in direkten Kontakt mit der Zellmembran. Jetzt ergeben sich mehrere Möglichkeiten für die weitere Konfiguration der Messung, die sogenannten Patchkonfigurationen (siehe Abbildung 3.1).

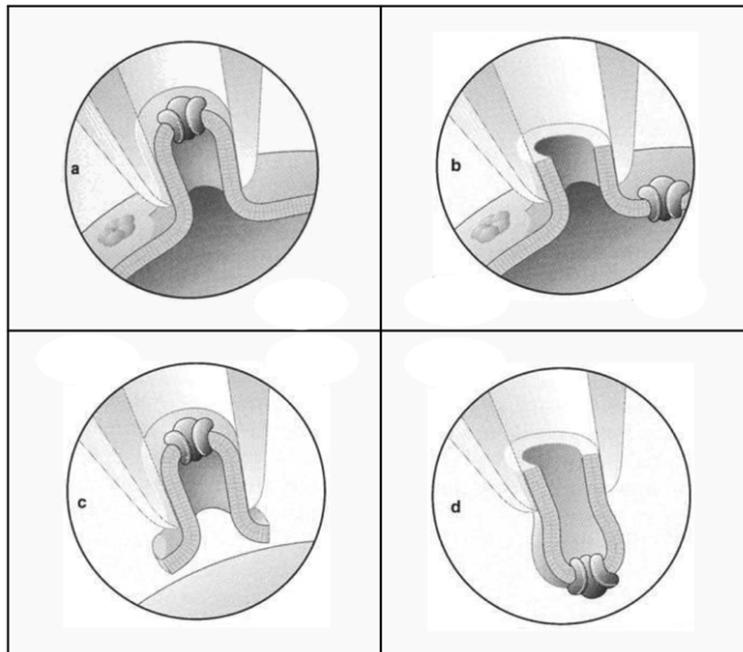


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Patchkonfigurationen modifiziert nach Numberger und Draguhn (Numberger & Draguhn, 1996). (a) Cell-Attached-Konfiguration (b) Whole-Cell-Konfiguration (c) Inside-Out-Konfiguration (d) Outside-Out-Konfiguration

Cell-Attached-Konfiguration (3.1a)

Die Glaspipette sitzt der Membran unmittelbar auf und bildet optimalerweise einen dichten Abschluss. Der Fluss der Ionen durch die in der Membran befindlichen Kanäle kann im Bereich der aufsitzenden Pipettenöffnung bestimmt werden.

Whole-Cell-Konfiguration (3.1b)

Ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration wird durch leichtes Saugen über ein Plastikröhrchen, welches mit der Pipette in Kontakt steht, die Membran durchbrochen. Auf diese Weise wird eine Verbindung zwischen der - bis auf diese kleine Läsion - intakten Zelle und dem Inneren der Pipette hergestellt. Somit kann die Summe aller sich in der Membran befindlichen Ionenkanäle gemessen werden.

Inside-Out-Konfiguration (3.1c)

Durch Zurückziehen der Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators gelangt man von der Cell-Attached-Konfiguration in die Inside-Out-Konfiguration. Es wird der Teil der Zellmembran, der sich in der Pipette befindet, der sogenannte „Patch“ herausgelöst. Das ehemalige Innere der Membran zeigt jetzt nach außen.

Outside-Out-Konfiguration (3.1d)

Liegt jedoch vor dem Zurückziehen die Whole-Cell-Konfiguration vor, gelangt man in die Outside-Out-Konfiguration. Der in der Pipette verbliebene „Patch“ ist

zum Zellinneren geöffnet und die „gezogene“ Membran verschließt sich wieder, so dass es sich nur um eine Reduktion der Zelloberfläche handelt. Die Außenseite zeigt nach wie vor nach außen. Gemessen wird der Strom aller sich in diesem „Patch“ befindlichen Kanäle.

3.2.2 Aufbau des Messstands

Im Folgenden werden die Komponenten eines Messstands, die zur Durchführung der Messungen unerlässlich sind, erläutert.

Schwingungsgedämpfter Tisch

Um die Pipette sicher in der Nähe der Zelle im erforderlichen Mikrometerbereich bewegen zu können, ist es notwendig, den Messstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufzubauen. In diesem Fall wurde das Modell MICRO-g der Firma Technical Manufacturing Corporation (Peabody, MA, USA) genutzt.

Abschirmung

Um die Beeinflussung des empfindlichen Vorverstärkers durch das 50-Hertz-Umgebungsrauschen zu verhindern, wurde um den Messstand auf dem schwingungsgedämpften Tisch ein Faraday'scher-Käfig gebaut.

Mikroskop

Das inverse Mikroskop (Model: Axiovert 35) der Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland) mit den Objektiven von 10- und 40-facher Vergrößerung sowie dem Binokular von 10-facher Vergrößerung. Es ermöglicht durch den Blick von unten ein Heranführen von Mess- und Perfusionspipetten von oben.

Pipettenhalter und Elektrode

Der Pipettenhalter wurde direkt am Vorverstärker angebracht. Seitlich am Halter befand sich eine Öffnung zum Inneren der Pipette. Dort war ein Teflonschlauch angebracht, über den der Über- bzw. Unterdruck angelegt wurde.

Vom Vorverstärker ragte eine chlorierte Silberdrahtelektrode hervor, die in die Intrazellulärlösung, mit der die Pipette befüllt war, eingetaucht wurde und so den elektrischen Kontakt herstellen konnte. Der Draht wurde in einer chloridhaltigen Blaulauge (Clorix, USA) gelagert, um eine bestmögliche Leitfähigkeit zu erhalten.

Mikromanipulator

Der Vorverstärker samt Pipettenhalter und daran befindlicher Pipette war über den Mikromanipulator im Mikrometerbereich steuerbar. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Manipulatoren benutzt: Zum einen die hydraulische Variante der Firma Narishige (Tokyo, Japan) bei der die Pipette über drei kleine Rädchen in

den drei Dimensionen bewegt werden konnte. Zum anderen fand das Model Patch-Man des Herstellers Eppendorf (Hamburg, Deutschland) mit elektrischem Antrieb Verwendung, bei dem die Steuerung der Pipette mit einem Joystick erfolgte.

Vorverstärker

Der Vorverstärker diente der Erfassung der an der Elektrode anliegenden Spannungen, ihrer Aufbereitung und Weitergabe an den Verstärker. Aufgrund der Empfindlichkeit des Vorverstärkers und der geringen Stärke des Signals, war der Vorverstärker möglichst dicht an der Elektrode anzubringen.

Verstärker

Der Patch-Clamp-EPC-9-Verstärker der Firma HEKA Elektronik GmbH (Lambrecht, Deutschland) wurde verwendet, um die Daten des Vorverstärkers zu empfangen und aufzubereiten. Über die ITC16-AD/DA Schnittstelle (HEKA Elektronik GmbH) war er mit dem Messcomputer (s.u.) verbunden, an den er Daten senden und von dem er Steuerbefehle empfangen konnte.

Messcomputer

Ein Power Macintosh G3 der Firma Apple Inc. (Cupertino, CA, USA) diente als Messcomputer. Auf ihm war die Software Pulse+PulseFit 8.50 (HEKA Elektronik GmbH) installiert. Das Programm diente der Konfiguration der Pulsprotokolle zur Ansteuerung des Verstärkers und zur Aufzeichnung der Daten.

Perfusionssystem

Es wurde ein Mehrkanal-Perfusionssystem verwendet, um die Lösungen möglichst zellnah zum Ausschluß von Verdünnungseffekten zu applizieren. Als Reservoir dienten 20 ml Spritzen, aus denen die Lösung - getrieben durch den hydrostatischen Druck und gesteuert über elektronische Ventile des Modells ValveBank 8 II der Firma AutoMate Scientific (San Francisco, CA, USA) - über die Perfusionspipette mit mehreren Eingängen und einem gemeinsamen Ausgang in die Kulturschale flossen. Ein mit Druckluft betriebener Sauger entfernte die überflüssige Lösung aus dem Bad.

Messkammer und Badelektrode

Die Zellkulturschale wurde direkt nach dem Austausch des Kulturmediums gegen die Extrazellulärlösung in den Objekthalter unter das Mikroskop gestellt und diente als Messkammer. Eine ebenfalls zur besseren Leitfähigkeit chlorierte Badelektrode diente zur Erdung der Flüssigkeit des Messbades.

Patchpipetten

Aus Borosilikatglasröhrchen der Firma World Precision Instruments Inc. (Sarasota, FL, USA) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 1,12 mm wurden in dem horizontalen Pipettenziehgerät P-97 des Herstellers Sutter Instrument Company (Novato, CA, USA) Patchpipetten hergestellt. Über unterschiedliche Parameter, wie Temperatur, Zugkraft und Dauer, die am „Puller“ eingestellt werden konnten, war es möglich die Pipetten unterschiedlich zu gestalten. Für diese Experimente wurden Pipetten mit einem Widerstand von 1,5 - 2,5 M Ω verwendet.

Lösungen

Alle Reagenzien wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit deionisiertem Wasser. Bei Bedarf wurden sie autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte nach Anbruch im Kühlschrank bei 4 Grad Celcius. Die Lösungen wurden innerhalb von einer Woche verbraucht oder verworfen. Vor der Benutzung wurden die Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt.

Extrazellulärlösung

Die Extrazellulärlösung setzte sich zusammen aus 145 mMol NaCl, 4 mMol KCl, 1,8 mMol CaCl₂, 1 mMol MgCl₂, 10 mMol HEPES und 10 mMol Glukose. Sie wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,35 titriert.

Intrazellulärlösung

Die Intrazellulärlösung setzte sich zusammen aus 110 mMol CsF, 20 mMol CsCl, 10 mMol NaF, 10 mMol EGTA und 10 mMol HEPES. Sie wurde mit CsOH auf einen pH-Wert von 7,35 titriert.

Medikamentenlösungen

Es wurden racemisches Bupivacain (Sigma) und S(-)-Ropivacain der Firma AstraZeneca (Södertälje, Sweden) für die Experimente verwendet. Das Bupivacain wurde als 1 mMol Stocklösung und das S(-)-Ropivacain als 3 mMol Stocklösung in der Extrazellulärlösung angesetzt und tiefgefroren. Für die einzelnen Experimente wurde die Stocklösung aufgetaut, um daraus die benötigte Konzentration durch Verdünnung herzustellen. Sie wurden ebenfalls bei 4 Grad Celcius gelagert und spätestens nach einer Woche verworfen.

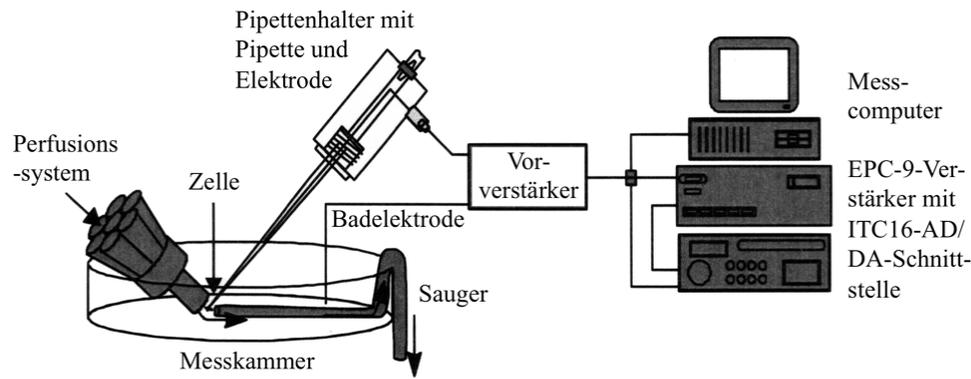


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

3.2.3 Praktische Durchführung der Experimente

Um die Zellen möglichst lange unter optimalen Bedingungen zu halten, wurden die Kulturschalen erst unmittelbar vor den Messungen aus dem Kulturschrank genommen und das Nährmedium durch Extrazellulärlösung ersetzt. Für jedes Experiment wurde eine neue Glaspipette verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass das Befüllen der Pipette zu $\frac{2}{3}$ mit Intrazellulärlösung blasenfrei erfolgte. Nach dem Platzieren der Kulturschale unter dem Mikroskop und dem Einspannen der Glaspipette in den Halter, wurde auf den Inhalt der Pipette ein Überdruck angelegt, der unter anderem ein Eindringen verschmutzender Partikel beim Eintauchen in die Badlösung verhindern sollte.

Die Perfusionspipette, die Badelektrode und der Sauger wurden in der Messkammer platziert. Die Messpipette wurde mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe einer geeigneten Zelle gebracht. Sobald der Überdruck der Pipette auf der Zelle eine Induration sichtbar werden ließ, wurde dieser abgelassen und mit Hilfe eines geringen Unterdrucks ein Gigaseal hergestellt. Die Cell-Attached-Konfiguration war somit hergestellt. Auf diese Weise konnten Widerstände zwischen Badlösung und Flüssigkeit in der Pipette im Bereich mehrerer Giga-Ohm erreicht werden.

Das Membranpotential wurde im Folgenden auf -50 mV eingestellt - ein Potential, bei dem die Zelle erfahrungsgemäß am stabilsten ist - um die Zelle dann durch einen kurzen und kräftigen Sog am Plastikschlauch zu öffnen (Whole-Cell-Konfiguration). Jetzt wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators vorsichtig, axial von der Zelle entfernt. Somit lag nun die Outside-Out-Konfiguration vor. Der „Patch“ konnte nun in 10 mV Schritten auf das angestrebte Haltepotential von -140 mV polarisiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle Kanäle geschlossen und aktivierbar vorliegen. Die Pipette, mit dem sich an der Spitze befindlichen „Patch“ wurde in die Nähe der Perfusionspipette gebracht, um konstante Messbedingungen zu schaffen. Der weitere Ablauf und das benutzte Protokoll richteten sich nach der zu untersuchenden Eigenschaft des Kanals.

3.2.4 Durchführung der Experimente zur Untersuchung der Eigenschaften Aktivierung, Inaktivierung und recovery

Um zu zeigen, dass keine anderen Effekte, außer den medikamentenbedingten, größeren Einfluss auf das Messergebnis nehmen, wurden drei Protokolle für ein Experiment an einem „Patch“ ausgeführt. Ein Pulsprotokoll definiert Änderungen des Membranpotentials in bestimmter zeitlicher Abfolge mit Aufzeichnung der Stromantwort. Für die Untersuchung der unterschiedlichen Kanal-Eigenschaften war jeweils ein spezielles Pulsprotokoll erforderlich (siehe unten). Zuerst fand eine Kontrollmessung (Kontrolle) statt. Hierzu wurde das jeweilige Protokoll unter ständigem Spülen mit der Extrazellulärlösung ausgeführt. Danach wurde das Perfusionssystem auf die Medikamentenlösung umgestellt. Nach 30 s Wartezeit wurde das Protokoll erneut gestartet (Einwasch). Zuletzt wurde das Perfusionssystem wieder auf die Extrazellulärlösung umgestellt und nach weiteren 30 s Spülzeit das Protokoll ein letztes Mal durchgeführt (Auswasch). Danach wurden der „Patch“ und die Pipette verworfen und für das nächste Experiment eine neue Zelle ausgewählt. Es wurden mehrere Experimente für gleiche Konzentrationen durchgeführt, angegeben mit der Zahl n , sowie Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen der Medikamentenlösung.

Aktivierungsprotokoll

Die Aktivierung eines Kanals ist der Übergang des geschlossenen und aktivierbaren Zustands in den offenen Zustand. Um die Öffnung dieser Kanäle in Abhängigkeit vom Membranpotential zu untersuchen, dient das Aktivierungsprotokoll (siehe Abbildung 3.3). Der Kanal wird von dem Haltepotential in Höhe von -140 mV für 20 ms depolarisiert. Diese Depolarisation läuft alle 5 s ab, initial auf ein Potential von -100 mV. Das Potential erhöht sich bei jedem weiteren Ablauf um 10 mV, bis es ein Potential von $+80$ mV erreicht hat. Es ergeben sich somit 19 Abläufe für dieses Protokoll, die Stromantwort auf einen einzelnen Ablauf wird als „Sweep“ bezeichnet.

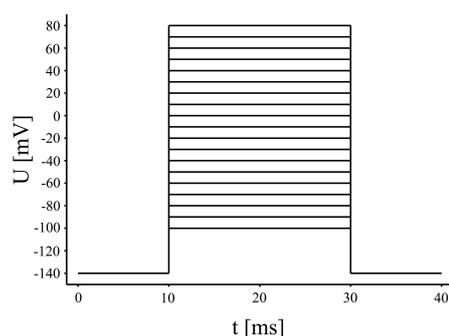


Abbildung 3.3: Gezeigt ist das verwendete Protokoll zur elektro-physiologischen Charakterisierung der Aktivierung.

Inaktivierungsprotokoll

Der Übergang offener Kanäle in einen Zustand, in dem diese geschlossen und nicht aktivierbar sind, nennt man Inaktivierung. Um dieses Schließen der Kanäle in Abhängigkeit vom Membranpotential zu beobachten, dient das Inaktivierungsprotokoll (siehe Abbildung 3.4). Nach einem initialen Puls von 10 ms Länge in Höhe des Haltepotentials von -140 mV, wird ein Vorpuls appliziert um den Kanal dann mit einem 20 ms dauernden Puls auf -40 mV zu aktivieren. Während des Vorpulses werden die Kanäle, abhängig von der jeweiligen Spannung, geöffnet und gehen dann nach etwa einer Millisekunde in einen geschlossenen, inaktivierten Zustand über. Mit dem im Folgenden eingestellten Membranpotential von -40 mV wurden dann alle zuvor nicht inaktivierten Kanäle geöffnet. Dieses Protokoll setzt sich aus 17 Abläufen zusammen, das Potential des Vorpuls wird in 5 mV Schritten geändert; es reicht von -160 mV bis -80 mV.

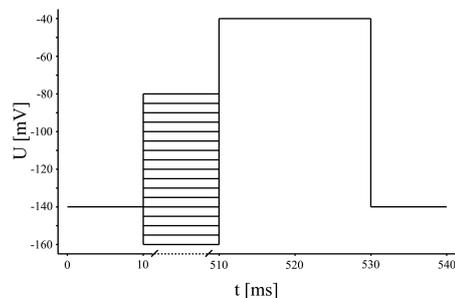


Abbildung 3.4: Gezeigt ist das verwendete Protokoll zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Inaktivierung.

recovery-Protokoll

Recovery ist die Erholung aus der Inaktivierung, also der Übergang eines inaktivierten in einen aktivierbaren Zustand. Um die Zeitabhängigkeit der Rückführung in diesen Zustand zu bestimmen, dient das recovery-Protokoll (siehe Abbildung 3.5). Es handelt sich bei diesem Protokoll um zwei aufeinander folgende Pulse von je 20 ms Länge auf ein Potential von -40 mV, ausgehend vom Haltepotential, welches auch hier -140 mV betrug. Die Dauer des Abstandes der beiden Pulse nahm bei jedem Ablauf exponentiell zu und betrug zwischen 1 und $657,8$ ms. Es ergaben sich 18 Abläufe, aus denen sich dieses Protokoll zusammensetzt.

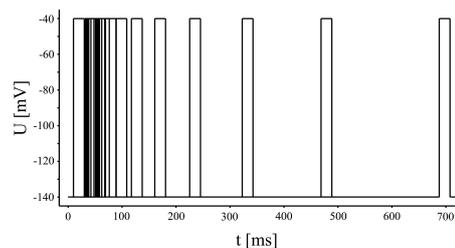


Abbildung 3.5: Gezeigt ist das verwendete Protokoll zur elektrophysiologischen Charakterisierung der recovery.

3.2.5 Durchführung der Experimente zur Untersuchung der Eigenschaften development-of-inactivated-block und recovery-from-inactivated-block

Ein- und Auswaschmessungen am selben „Patch“ konnten aufgrund der zeitlichen Anforderung für einen Durchgang des Protokolls und der damit verbundenen Instabilität der Experimente für die development-of-inactivated-block- und recovery-from-inactivated-block-Messungen nicht durchgeführt werden. Es wurde nach dem Herstellen der Ausgangssituation die Spülung mit dem Medikament der jeweiligen Konzentration gestartet und das Protokoll ausgeführt. Die Kontrollmessungen wurden in unabhängigen Experimenten bestimmt, es wurden frische Kulturschalen verwendet, die noch keinen Medikamentenkontakt hatten.

Um die Ergebnisse der Experimente zur recovery-from-inactivated-block zu bestätigen, wurden in einem zweiten Schritt gepaarte Untersuchungen durchgeführt. Es wurden an einem „Patch“ zwei Messungen, eine unter Ropivacain und eine unter Bupivacain, nacheinander vorgenommen. Die Reihenfolge der Medikamente wurde variiert, um Fehler durch einen „rundown“ oder persistierende Medikamentenwirkung gering zu halten. Zwischen den Experimenten wurde die Messkammer für 30 s mit Extrazellulärlösung gespült.

development-of-inactivated-block-Protokoll

Der inaktivierte Zustand des Kanals ist empfindlicher für die Medikamentenbindung. Um die Zeitabhängigkeit zu bestimmen, mit der das Medikament diesen Block entwickelt, diente das development-of-inactivated-block-Protokoll (siehe Abbildung 3.6). Eine initiale Depolarisierung vom Haltepotential (-140 mV) auf ein Konditionierungspuls (-70 mV) mit unterschiedlicher Dauer von 0 bis maximal 128 s, wurde gefolgt von einem 200 ms Intervall, erneut in Höhe des Haltepotentials. Dann wurde die Membran zur Aktivierung der Kanäle für 10 ms auf -40 mV depolarisiert. Das Ausführen des Protokolls führte zu 10 Abläufen mit unterschiedlicher Dauer des Konditionierungspulses. Aufgrund der Dauer des initialen Pulses von bis zu 128 s wurde dieses nicht in den Stromspuren aufgezeichnet, da das Programm bei der hohen Digitalisierungsrate an seine Grenzen stieß.

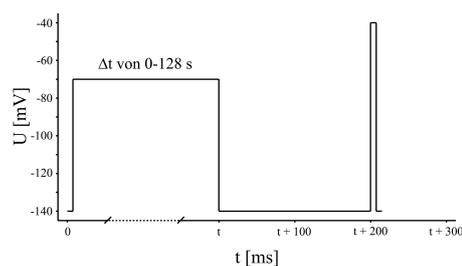


Abbildung 3.6: Gezeigt ist das verwendete Protokoll zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Entwicklung des Blocks im inaktivierten Zustand.

recovery-from-inactivated-block-Protokoll

Um die zeitabhängige Erholung vom Block des inaktivierten Zustands zu bestimmen, ist das recovery-from-inactivated-block-Protokoll entwickelt worden (siehe Abbildung 3.7). Durch das Anlegen eines Konditionierungspulses in Höhe von -70 mV in variabler Länge wird der Kanal in einem inaktivierten Zustand gehalten. Sodann folgt ein Erholungsintervall in Höhe des Haltepotentials mit variierender Länge, um dann durch einen 10 ms Puls in Höhe von -40 mV einen Strom zu evozieren. Die Länge des initialen Konditionierungspulses richtet sich nach der zu untersuchenden Konzentration des Medikaments und leitet sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen mit dem development-of-inactivated-block-Protokolls ab. Das variierende Erholungsintervall erhöht sich in den 12 Abläufen des Protokolls von 1 s auf maximal $58,67$ s.

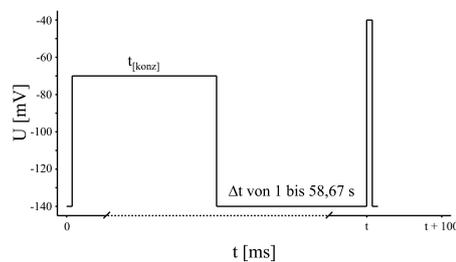


Abbildung 3.7: Gezeigt ist das verwendete Protokoll zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Erholung vom Block des inaktivierten Zustands.

3.2.6 Durchführung der Experimente zur Untersuchung zeitabhängiger Effekte

Bei den Messungen zur Bestimmung von zeitabhängigen Effekten wurde das gleiche Protokoll sechsmal direkt hintereinander an dem selben „Patch“ unter kontinuierlicher Spülung mit Extrazellulärlösung durchgeführt.

3.3 Datenaufnahme

Während der Patch-Clamp-Messungen sollte die Spannung über der Membran auf einem einstellbaren Wert konstant gehalten und gleichzeitig der dafür benötigte Kompensationsstrom gemessen werden. Hierfür stand nur eine Elektrode zur Verfügung, über die sowohl die Spannungsmessung als auch die Applikation des Stroms erfolgen musste. Realisiert wurde dies mit der in Abbildung 3.8 dargestellten Schaltung. Die Sollspannung wurde vom Computer entsprechend der dort im Programm eingestellten Messprotokolle an den Verstärker übermittelt.

Kam es zu einer Abweichung zwischen Pipettenpotential U_{pip} und Sollspannung U_{soll} , so wurde diese Differenz vom Operationsverstärker (OPV1) ausgeglichen und durch den Widerstand R_f floß solange ein Strom, bis keine Spannungsdifferenz mehr bestand. Auf diese Weise wurden Abweichungen zwischen Ist- und Sollpotential abgeglichen und außerdem eine Spannung über R_f erzeugt. Diese

war zu dem in der Pipette injizierten Strom proportional. Mittels eines weiteren Operationsverstärkers (OPV2) wurde davon die Sollspannung abgezogen. Die erhaltene Signalspannung U_{aus} wurde anschließend an das Messprogramm übergeben. Für hinreichend schnelle und störungsfreie Messungen waren allerdings einige Kompensationsmechanismen nötig, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

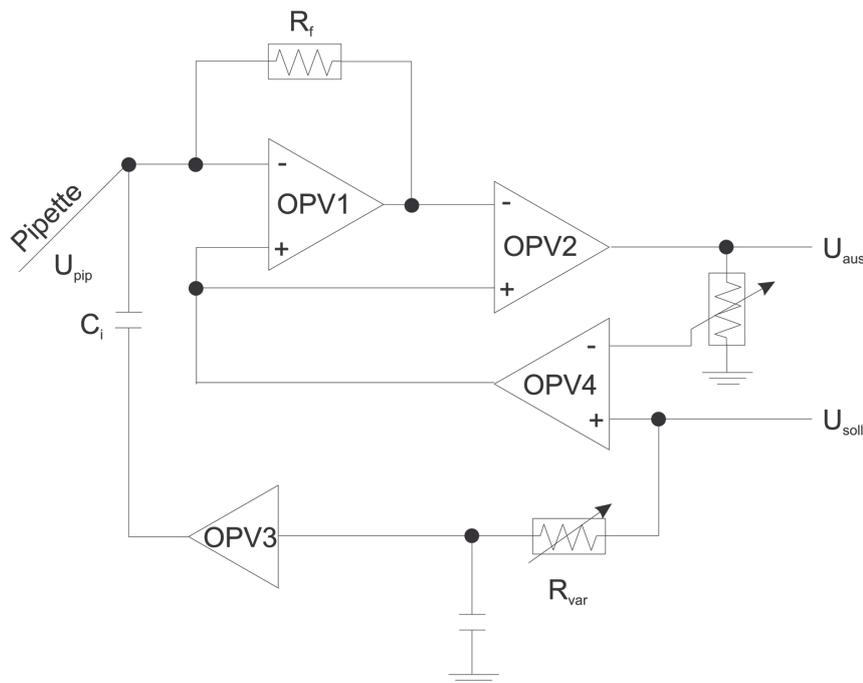


Abbildung 3.8: Schaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers inklusive Serienwiderstandskompensation nach Numberger und Graghun (Numberger & Draguhn, 1996)

Korrektur der dynamischen Eigenschaften des Vorverstärkers

Da die Sollspannung entsprechend der Vorgaben des Messprotokolls rechteckförmig geändert wurde, war die Geschwindigkeit des Spannungsausgleichs durch den Vorverstärker entscheidend. Der Spannungsausgleich mußte nahezu instantan erfolgen, um auch schnelle Ionenkanäle ausmessen zu können. Der Widerstand R_f konnte nicht als idealer Widerstand betrachtet werden, da er über einen kapazitiven Anteil verfügte. Die Reaktion des Stroms auf eine senkrecht ansteigende Spannung erfolgte daher exponentiell und damit deutlich zu langsam. Dies wurde mit Korrekturschaltkreisen kompensiert, die in den Verstärker integriert waren, und die die Antwortzeiten auf wenige μs herabsetzten.

Kapazitätskompensation

Bei Änderung der Kommandospannung kam es durch die kapazitiven Eigenschaften von Pipette und Patchoberfläche zunächst zu Artefakten im Messsignal. Um diese zu minimieren, wurde die Sollspannung zur Kapazitätskompensation zusätzlich über einem RC-Glied (R_{var} und C_i , siehe Abbildung 3.8) und einen Operationsverstärker (OPV3) an die Pipette angelegt. Der variable Widerstand R_{var} wurde dabei vom Messcomputer automatisch so dimensioniert, dass sich eine optimale Kapazitätskompensation ergab.

Kompensation des Serienwiderstandes

Durch den zwischen Verstärker und „Patch“ bestehenden Widerstand würde im Zellinneren eine Spannung entstehen, die geringer wäre als die Sollspannung. Zum Ausgleich dieses Verlustes musste ein zusätzlicher, zur Kommandospannung proportionaler Anteil über einen weiteren Operationsverstärker (OPV4) addiert werden.

Leckstromkompensation

Ständig geöffnete Kanäle im „Patch“ verursachten, zusammen mit einem gering verbleibenden Strom zwischen Membran und Pipette, ein Hintergrundsignal, den so genannten Leckstrom. Dieser konnte von dem Messcomputer gesondert aufgezeichnet werden, wobei nach dem Durchlauf des Messprotokolls ein zweites Protokoll gleicher Form, aber mit stark reduzierter Spannung, mehrfach hintereinander ausgeführt wurde. Dies stellte sicher, dass der zu messende Kanal geschlossen war und nur der unspezifische Strom registriert wurde. Dieser wurde vom Messcomputer gemittelt, auf die Amplitude des Messprotokolls extrapoliert und später vom Messsignal subtrahiert.

Filterung und Digitalisierung der Messwerte

Vor ihrer Digitalisierung erfolgte eine Filterung der Signale durch zwei in den Verstärker integrierte Filter: Einem Bessel-Filter³ als Vorfilter mit 10 kHz sowie einem weiteren Bessel-Filter mit 2,9 kHz. Die Digitalisierung erfolgte mit einer Samplingrate von 20 kHz. Die weitere Analyse der Daten fand entweder in dem Programm PulseFit (HEKA Elektronik GmbH) oder in anderen Programmen (siehe 3.4.1) statt. Dazu wurden die Daten aus dem Messprogramm - unter Verwendung eines 1 kHz-Filters zur Rauschunterdrückung - in ASCII-Dateien exportiert.

³Filter mit bestimmten Eigenschaften, benannt nach deutschem Mathematiker.

3.4 Grundlagen der Datenanalyse

3.4.1 Verwendete Programme

Die Rohdaten wurden hinsichtlich der Leitfähigkeits-Spannungs- und Leitfähigkeits-Zeit-Beziehung mit dem Programm PulseFit 8.50 (HEKA Electronic GmbH) untersucht. Aus den Daten wurde eine Tabelle im Programm Excel der Firma Microsoft (Redmond, WA, USA) zur weiteren Analyse (s.u.) erstellt. Zur graphische Darstellung der Daten diente das Programm Kaleidagraph 3.51 der Firma Synergy Software (Reading, PA, USA).

3.4.2 Mathematische Grundlagen zur Datenanalyse

Normalisierung

Um die Darstellung der Werte mit Standardabweichung zu ermöglichen, wurden die Daten auf zwei verschiedene Arten normalisiert. Zum einen wurden die Werte eines Experiments durch den jeweiligen Maximal- bzw. Minimalwert des Experiments geteilt; dieses ermöglichte die vergleichende Darstellung von Halbmaximalwerten und Steigungen. Zum anderen wurden die Werte der Experimente unter Einwaschbedingungen auf den Maximal- bzw. Minimalwert des Mittels von Kontroll- und Auswaschmessung normalisiert, wodurch ein Vergleich von maximalen Strömen ermöglicht wurde.

Gleichgewichtspotential für Natriumionen

Die passive Diffusion von Ionen wird durch zwei Größen bestimmt: Den Konzentrationsgradienten und den Spannungsgradienten. Das Gleichgewichtspotential entspricht dem Potential, bei dem sich Spannungsgradienten und Konzentrationsgradienten gegenseitig aufheben, so dass kein passiver Ionenfluss stattfindet. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung

$$E_S = \frac{RT}{z_S F} \ln \frac{[S]_{ext}}{[S]_{int}} \quad (3.1)$$

wurde das Gleichgewichtspotential bei bekannter extrazellulärer (*ext*) und intrazellulärer (*int*) Ionkonzentration berechnet. *S* ist hier das spezifische Ion, E_S dessen Gleichgewichtskonstante, z_S dessen Wertigkeit und $[S]$ dessen Konzentration. *R* entspricht der Gaskonstante, *T* der absoluten Temperatur und *F* der Faraday-Konstante.

Setzt man die Na^+ -Konzentrationen der für die Experimente verwendeten Lösungen in diese Gleichung ein, so erhält man bei einer Temperatur von 293 °K ein Gleichgewichtspotential von 67,5 mV.

Das Gleichgewichtspotential wird auch als Umkehr- oder Nernstpotential bezeichnet.

Die Berechnung des Gleichgewichtspotentials ist wichtig zur Bestimmung der Leitfähigkeit.

Leitfähigkeitsberechnung

Nach dem Ohmschen Gesetz definiert sich die Leitfähigkeit mit

$$g = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad (3.2)$$

Die Spannung U entspricht der elektrochemischen Triebkraft E , die sich wiederum aus zwei Potentialen zusammensetzt: Dem Membranpotential E_M und dem Nernstpotential E_S , welches bereits bestimmt wurde.

$$U \sim E = E_M - E_S \quad (3.3)$$

Fügt man die Gleichungen zusammen, so ergibt sich die von Hodgkin und Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952) entwickelte Gleichung zur Bestimmung der Leitfähigkeit von Ionenkanälen:

$$g_S = \frac{I_S}{(E_M - E_K)} \quad (3.4)$$

Setzt man die mit dem Aktivierungsprotokoll erhaltenen Ströme in Abhängigkeit zum angelegten Membranpotential ein, so lässt sich die Leitfähigkeit für Natriumkanäle berechnen. Dargestellt wird die Leitfähigkeit gegen das Membranpotential mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion (s.u.) in dem Programm Kaleidagraph 3.51 (Synergy Software).

Inhibitionsbestimmung des aktivierten Zustandes

Zur Berechnung der Inhibition dienten die Untersuchungen zum Aktivierungsverhalten unter verschiedenen Konzentrationen der Medikamente. Es wurde der Mittelwert der Stromflussmaxima aus Kontroll- und Auswaschmessung mit dem Stromflussmaximum der Einwaschmessung in Relation gesetzt. Die normalisierte Inhibition wurde graphisch gegen die Konzentration durch eine Hill-Funktion (s.u.) in Kaleidagraph 3.51 (Synergy Software) dargestellt. Es konnte aus dieser Graphik ein IC_{50} -Wert bestimmt werden, die Konzentration, bei der die Hälfte der Kanäle inhibiert sind.

Inhibitionsbestimmung des inaktivierten Zustandes

Zur Ermittlung der Inhibition der inaktivierten Kanäle dienten die Untersuchungen des development-of-inactivated-block unter verschiedenen Konzentrationen der Medikamente. Es wurden Strommaximum und -minimum in Relation gesetzt

und ein Korrekturwert subtrahiert. Die Stromantwort auf den ersten Puls des Protokolls diente als Strommaximum. Hier war die Dauer des Konditionierungsintervalls, welches den Kanal im inaktivierten Zustand hält, gleich 0 s. Die Medikamente konnten also noch nicht mit dem inaktivierten Zustand des Kanals interagieren. Als Stromminimum diente der Endpunkt der monoexponentiellen Darstellung des Stroms in Abhängigkeit zur Länge des Konditionierungsintervalls. Ein Korrekturwert war erforderlich, da sich in den Kontrollmessungen zeigte, dass die Experimente einem erheblichen medikamentenunabhängigen Effekt unterliegen. Dieser Korrekturwert wurde wie folgt berechnet: Es wurde angenommen, dass zum Zeitpunkt der fünffachen Zeitkonstante (τ_{dev}) der jeweiligen Konzentration die maximale Inhibition vorherrscht. Dieser Wert wurde in die monoexponentielle Funktion, welche die Kontrollmessung beschreibt, eingesetzt. Es ergibt sich ein konzentrationsabhängiger Wert, der zum Zeitpunkt der maximalen Inhibition den medikamentenunabhängigen Anteil beschreibt. Die so ermittelten Werte wurden graphisch gegen die Konzentration aufgetragen und durch eine Hill-Funktion in Kaleidagraph 3.51 (Synergy Software) dargestellt. Es konnte aus dieser Graphik ein IC_{50} -Wert bestimmt werden, die Konzentration, bei der die Hälfte der Kanäle inhibiert sind.

Verwendete Funktion zur graphischen Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Experimente in Kaleidagraph 3.51 (Synergy Software) wurden unterschiedliche Funktionen verwendet, die im Folgenden aufgeführt werden.

Monoexponentielle Funktion

Gezeigt sind die monoexponentiellen Funktionen zur Darstellung der Strom-Zeit-Beziehungen der recovery

$$f = M_2 - \left(\exp \left(\frac{-M_0}{M_1} \right) \right) \quad (3.5)$$

sowie zur Darstellung der Strom-Zeit-Beziehungen des development-of-inactivated-block und der recovery-from-inactivated-block.

$$f = M_2 * \left(\exp \left(\frac{-M_0}{M_1} \right) + M_3 \right) \quad (3.6)$$

M_0 entspricht der Dauer der Repolarisation und M_1 der Zeitkonstante τ . M_2 entspricht dem maximalen Strom, in der normalisierten Darstellung war dieser gleich 1. M_3 stellt den Endpunkt der Funktion dar.

Hill-Funktion

Zur Beschreibung der Beziehung von Konzentration zur Wirkung wurde die applizierte Medikamentenkonzentration gegen die Inhibition aufgetragen und mit der Hill-Funktion

$$f = \frac{M_3^{M_2}}{M_1^{M_2} + M_3^{M_2}} \quad (3.7)$$

dargestellt. M_1 stellt die maximale Inhibition (bei der normalisierten Darstellung gleich 1), M_2 den Hill-Koeffizienten und M_3 den IC_{50} -Wert dar.

Diese Formel leitet sich von der Michaelis-Menten-Funktion ab, welche in der Enzymkinetik die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt.

Der Hill-Koeffizient gibt darüber Auskunft, ob es sich um einen kooperativen Prozess handelt. (1) Bei Werten größer 1 liegt eine positive Kooperativität vor. Mit der Bindung eines Liganden an das Substrat wird die Affinität für einen weiteren Liganden erhöht. Somit liegen hauptsächlich Proteine mit Liganden an allen Bindungsstellen und Proteine ganz ohne Liganden vor. (2) Bei einem Hill-Koeffizient kleiner 1 liegt eine negative Kooperativität vor. Mit der Bindung eines Liganden an das Substrat nimmt die Affinität für einen weiteren Liganden ab, die Liganden behindern sich. In diesem Fall ist der Bindungsgrad der Proteine gleichmäßiger und hängt von der Ligandenkonzentration ab. (3) Ist der Hill-Koeffizient gleich 1, so handelt es sich um einen unabhängigen Prozess.

Die Konzentration, bei der die Hälfte des untersuchten Effektes eingetreten ist, nennt man IC_{50} -Wert, mithin also diejenige Konzentration, die nötig ist, um die Hälfte der Kanäle zu inhibieren.

Boltzmann-Funktion

Um die Strom-Spannungs-Beziehung der Aktivierung und Inaktivierung darzustellen, wurde die Boltzmann-Funktion genutzt.

$$f = \frac{M_3}{1 + \exp\left(\frac{M_1 - M_0}{M_2}\right)} \quad (3.8)$$

Auf diese Weise konnten Informationen über die maximale Leitfähigkeit (M_3 , in der normalisierten Darstellung gleich 1) des Kanals und den Aktivierungs-, bzw. Inaktivierungsmittelpunkt (M_1) ermittelt werden. Das ist der Punkt, an dem die Hälfte der maximalen Leitfähigkeit erreicht bzw. noch vorhanden ist. M_2 gibt, ausgehend vom Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmittelpunkt, die Potentialdifferenz an, innerhalb derer die Leitfähigkeit auf 26,89 % (entsprechend $1/(1 + \exp(1))$) des Maximalwertes abfällt (bzw. auf 73,11 % ansteigt). M_2 ist damit ein Maß für die Steigung der Kurve. M_0 ist das Membranpotential.

Statistische Verfahren

Die Daten wurden außerdem in dem Programm Excel (Microsoft) mit den integrierten statistischen Verfahren TTest und der einfaktoriellen Varianzanalyse auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Bupivacain auf den SCN5A Wildtyp

4.1.1 Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens

Untersucht wurde die Aktivierung des Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Aktivierungsprotokolls aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.1 zeigen die Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

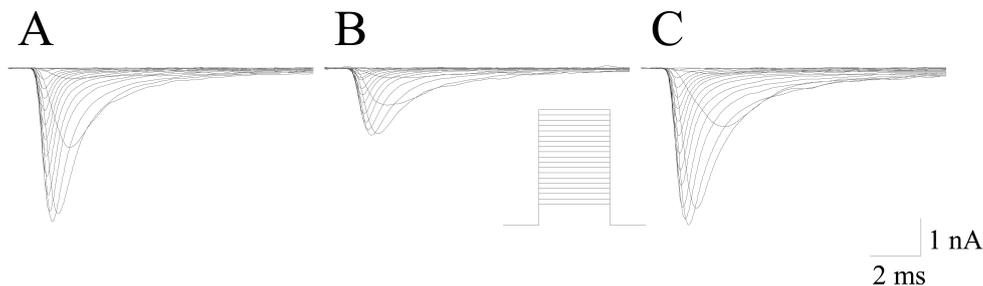


Abbildung 4.1: Original Stromspuren des SCN5A Wildtyp-Kanals erzeugt durch das Aktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Bupivacain der Konzentration $100 \mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Abbildung 4.2A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergeben. In der Abbildung 4.2B wird die aus diesen Daten berechnete Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dargestellt.

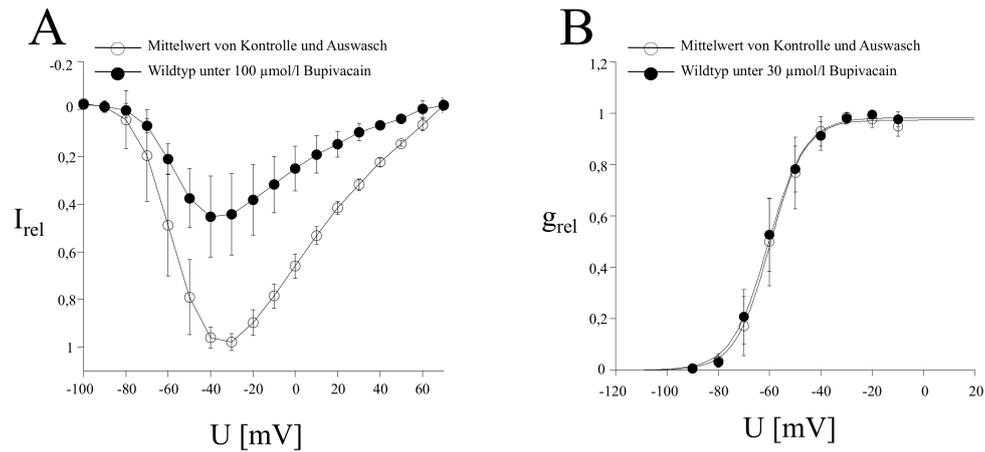


Abbildung 4.2: A. Strom-Spannungs-Beziehung der Aktivierung des SCN5A Wildtyp. Weiße Kreise als Mittelwert zwischen Kontroll- und Auswaschbedingungen, schwarze Kreise unter Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. B. zeigt die daraus berechnete und normalisierte Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung, weiße Kreise als Mittelwert zwischen Kontroll- und Auswaschbedingungen, schwarze Kreise unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.3. Eine signifikante Änderung der Aktivierung konnte für die Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain ($p=0,009$) gezeigt werden. Die Analyse der Daten auf einfaktorielles Varianz ergab, dass sich der Shift unter steigender Konzentration des Lokalanästhetikums nicht signifikant entwickelt ($p=0,100$).

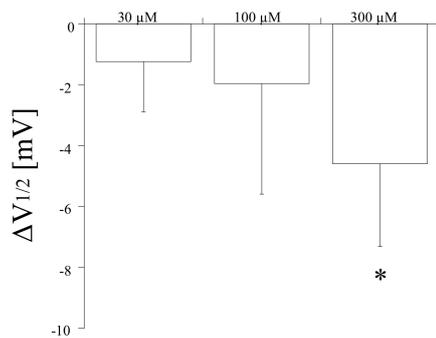


Abbildung 4.3: Gezeigt ist die Veränderung der Aktivierungshalbmaxima des Wildtypen unter dem Einfluss von 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$), 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=9$) und 300 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$) Bupivacain. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Die Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der untersuchten Konzentrationen zusammen.

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-59,8 \pm 3,9 \text{ mV}$	$-61,1 \pm 3,6 \text{ mV}$	0,096
Steigungsfaktor	$6,6 \pm 1,9$	$6,2 \pm 1,5$	0,017
n	7		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-55,9 \pm 6,8 \text{ mV}$	$-57,9 \pm 3,9 \text{ mV}$	0,167
Steigungsfaktor	$7,1 \pm 1,1$	$6,2 \pm 1,2$	0,056
n	9		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-56,1 \pm 3,0 \text{ mV}$	$60,7 \pm 2,9 \text{ mV}$	0,009
Steigungsfaktor	$6,9 \pm 1,1$	$4,7 \pm 2,3$	0,076
n	6		

Tabelle 4.1: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Aktivierung von SCN5A. $V_{1/2}$ entspricht dem Aktivierungsmittelpunkt.

4.1.2 Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens

Untersucht wurde die Inaktivierung des Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Inaktivierungsprotokolls (siehe eingelassene Abbildung) aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.4 zeigen die Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

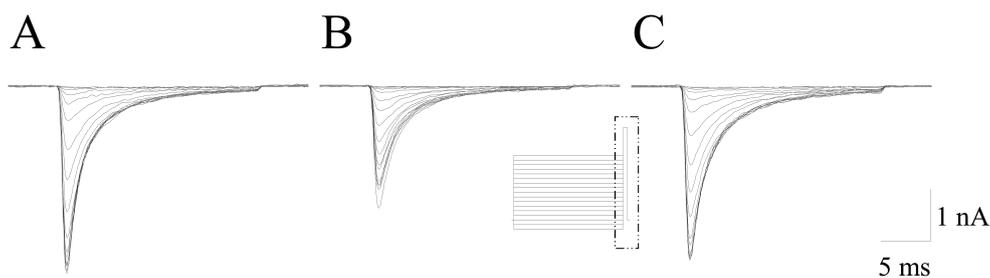


Abbildung 4.4: Original Stromspuren des SCN5A Wildtyp-Kanals erzeugt durch das Inaktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Bupivacain der Konzentration 30 $\mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Abbildung 4.5A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen - in diesem Fall gleichzeitig die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung -, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergeben. Sie werden dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion.

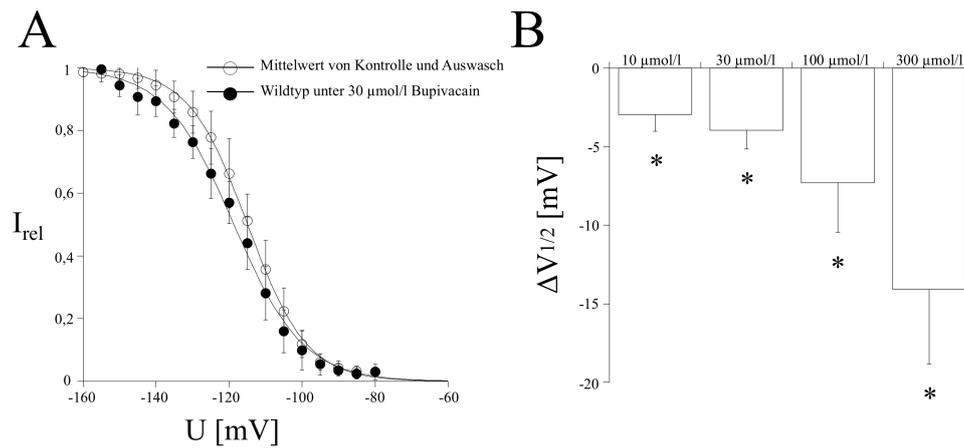


Abbildung 4.5: A. Strom-Spannungs-Beziehungen der Inaktivierung des SCN5A Wildtyp ($n=8$). Weiß als Mittelwert der Kontroll- und Auswaschmessung. Schwarz unter Applikation von Bupivacain der Konzentration 30 $\mu\text{mol/l}$. B. Änderung der Inaktivierungshalbmaxima des SCN5a Wildtyp unter 10 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$), 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=8$), 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$) und 300 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$) Bupivacain. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.5B. Bupivacain negativiert den Inaktivierungsmittelpunkt des SCN5A Wildtyps in den untersuchten Konzentrationen signifikant. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt eine signifikante Entwicklung dieser Änderung in Abhängigkeit zu der Konzentration ($p<0,001$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert die Tabelle 4.2.

	Kontrolle / Auswasch	10 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-117,3 \pm 7,4 \text{ mV}$	$-120,3 \pm 8,2 \text{ mV}$	0,003
Steigungsfaktor	$-7,0 \pm 1,2$	$-8,0 \pm 1,7$	0,049
n	5		

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-114,8 \pm 3,3 \text{ mV}$	$-118,8 \pm 3,4 \text{ mV}$	<0,001
Steigungsfaktor	$-7,8 \pm 1,5$	$-9,4 \pm 1,6$	<0,001
n	8		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-106,8 \pm 5,5 \text{ mV}$	$-114,1 \pm 5,9 \text{ mV}$	<0,001
Steigungsfaktor	$-6,9 \pm 0,9$	$-8,2 \pm 1,5$	0,006
n	7		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-105,1 \pm 3,9 \text{ mV}$	$-119,2 \pm 7,7 \text{ mV}$	<0,001
Steigungsfaktor	$-7,0 \pm 0,9$	$-9,3 \pm 1,9$	0,063
n	6		

Tabelle 4.2: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Inaktivierung von SCN5A. $V_{1/2}$ entspricht dem Inaktivierungsmittelpunkt.

4.1.3 Beeinflussung des recovery-Verhaltens

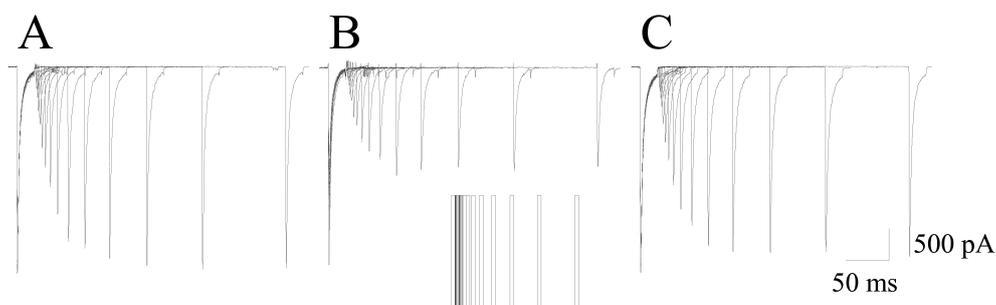


Abbildung 4.6: Stromspuren des SCN5A Wildtypen erzeugt durch das recovery-Protokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. C. Auswaschbedingungen.

Untersucht wurde die Erholung des Kanals von der Inhibition durch das Medikament im aktiven Zustand. Stromspuren, die unter Verwendung des recovery-Protokolls (siehe eingelassene Abbildung) unter Kontrollbedingungen, unter der Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen aufgezeichnet wurden, sind in Abbildung 4.6 zu sehen. Es zeigt sich eine Abhängigkeit des Stroms von der Dauer der Erholung.

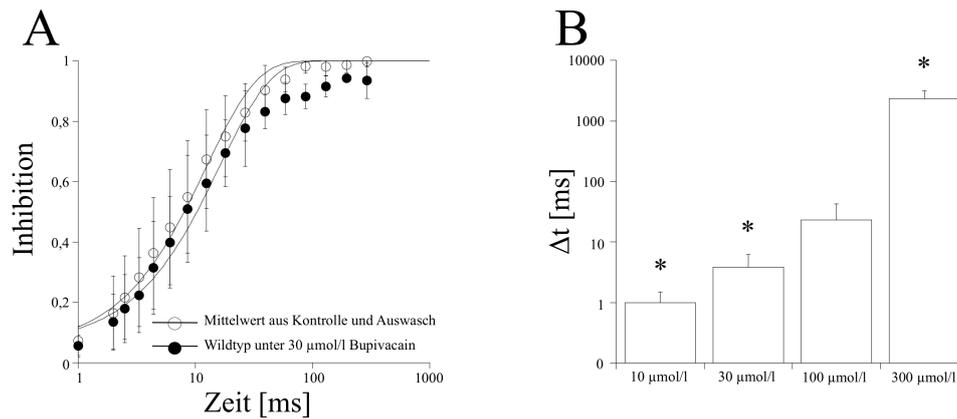


Abbildung 4.7: A. Strom-Zeit-Beziehung der recovery des SCN5A Wildtyp ($n=6$). Weiß als Mittelwert der Kontroll- und Auswaschmessung, schwarz unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. B. Änderung der Zeitkonstanten der recovery des SCN5A Wildtyps unter 10 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$), 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$), 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$) und 300 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$) Bupivacain. Dargestellt mit logarithmischer y-Achse. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. .

Abbildung 4.7A zeigt eine normalisierte Strom-Zeit-Beziehung, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergibt. Sie wird durch eine monoexponentielle Funktion dargestellt. Die daraus resultierenden Änderungen der Zeitkonstanten (τ_{rec}) zeigt das Säulendiagramm 4.7B mit einer logarithmischen y-Achse. Bupivacain beeinflusst den Mittelpunkt der recovery bis auf die Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ signifikant. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt eine signifikante Entwicklung der Werte in Abhängigkeit zur Konzentration ($p < 0,001$). Die Tabelle 4.3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

	Kontrolle / Auswasch	10 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	$6,6 \pm 2,5$ ms	$7,5 \pm 2,6$ ms	0,011
n		5	

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	$12,8 \pm 6,7$ ms	$16,7 \pm 8,3$ ms	0,01
n		6	

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	$27,0 \pm 6,3$ ms	$50,3 \pm 20,5$ ms	0,054
n		5	

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	$15,6 \pm 4,8$ ms	$2319,2 \pm 797,1$ ms	<0,001
n		6	

Tabelle 4.3: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Erholung von SCN5A. τ_{rec} entspricht der Zeitkonstante der Erholung.

4.1.4 development-of-inactivated-block unter Bupivacain

Zur Untersuchung der Auswirkung des Medikaments auf den inaktivierten Zustand des SCN5A Wildtyp, wurde das development-of-inactivated-block-Protokoll verwendet. Ein exemplarischer Auszug aus einer Stromspur unter dem Einfluss von Bupivacain, zeigt Abbildung 4.8A. Es ist die Abhängigkeit des Stroms von der Zeit für das Intervall der Medikamentenbindung zu erkennen.

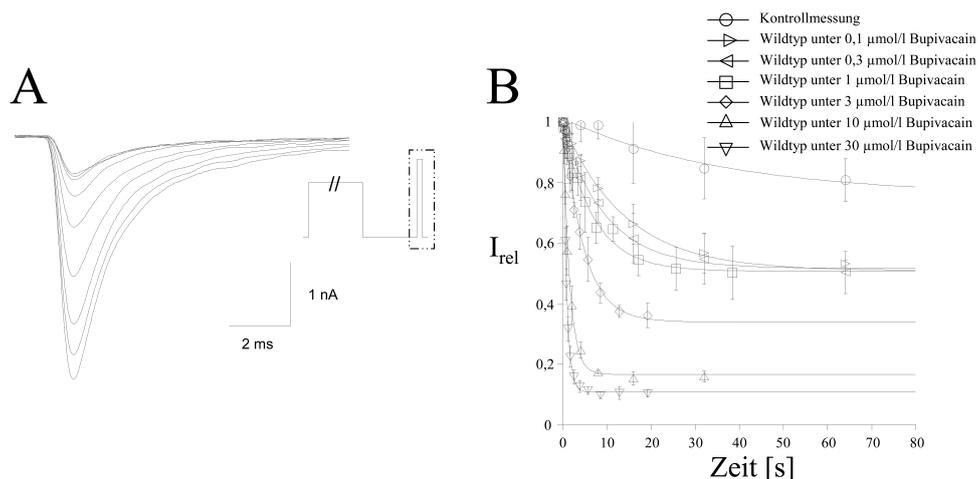


Abbildung 4.8: A. Stromspur erzeugt durch das development-of-inactivated-block-Protokoll (eingelassene Grafik) unter Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. B. zeigt die Strom-Zeitbeziehung des development-of-inactivated-block unter Kontrollbedingungen, sowie unter dem Einfluss von Bupivacain der Konzentrationen 0,1 $\mu\text{mol/l}$ ($n=3$), 0,3 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$), 1 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$), 3 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$), 10 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$) und 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$).

Die normalisierten Strom-Zeit-Beziehungen zur Entwicklung des Blocks unter verschiedenen Konzentrationen von Bupivacain sind in Abbildung 4.8B gezeigt. Die graphische Darstellung erfolgte durch monoexponentielle Funktionen.

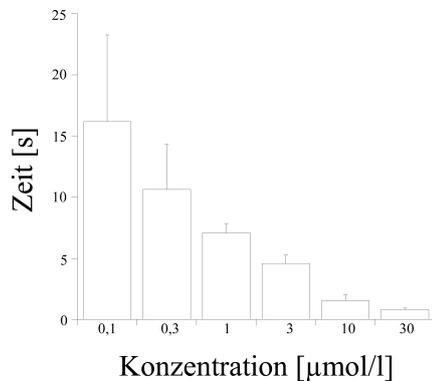


Abbildung 4.9: Säulendiagramm der Zeitkonstanten aus den monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des development-of-inactivated-block-Protokolls des SCN5A Wildtyp unter Bupivacain.

Die Mittelwerte der Zeitkonstanten dieser monoexponentiellen Funktionen von Experimenten gleicher Konzentrationen sind in dem Säulendiagramm 4.9 dargestellt. Es ergab sich bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der Kontroll- und den Zeitkonstanten der Einwaschbedingungen. Durch die einfaktorielle Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Zeitkonstanten abhängig von der Konzentration sind ($p < 0,001$). Auch bei der Konzentration von $0,1 \mu\text{mol/l}$ war noch ein Effekt nachweisbar. Die Tabelle 4.4 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Bupivacain der Konzentration:	τ_{dev}	n	p-Wert
Kontrolle	$41,4 \pm 29,3 \text{ s}$	3	
$0,1 \mu\text{mol/l}$	$16,2 \pm 7,1 \text{ s}$	3	0,272
$0,3 \mu\text{mol/l}$	$10,6 \pm 3,7 \text{ s}$	7	0,210
$1 \mu\text{mol/l}$	$7,1 \pm 0,8 \text{ s}$	5	0,180
$3 \mu\text{mol/l}$	$4,6 \pm 0,7 \text{ s}$	5	0,162
$10 \mu\text{mol/l}$	$1,5 \pm 0,5 \text{ s}$	5	0,143
$30 \mu\text{mol/l}$	$0,8 \pm 0,1 \text{ s}$	6	0,139

Tabelle 4.4: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Blockade des inaktivierten SCN5A. τ_{dev} entspricht der Zeitkonstante der Entwicklung.

4.1.5 recovery-from-inactivated-block unter Bupivacain

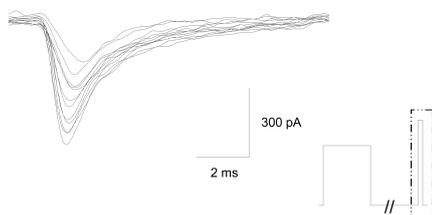


Abbildung 4.10: Ausschnitt aus einer Stromspur erzeugt durch das recovery-from-inactivated-block-Protokoll (eingelassene Grafik) unter dem Einfluss von $10 \mu\text{mol/l}$ Bupivacain.

Einen exemplarischen Ausschnitt einer Stromantwort auf das recovery-from-inactivated-block-Protokoll des SCN5A Wildtyp unter Bupivacain zeigt die Abbildung 4.10. Es ist die Abhängigkeit des Stromes von der Zeit des Intervalls für die Erholung zu erkennen.

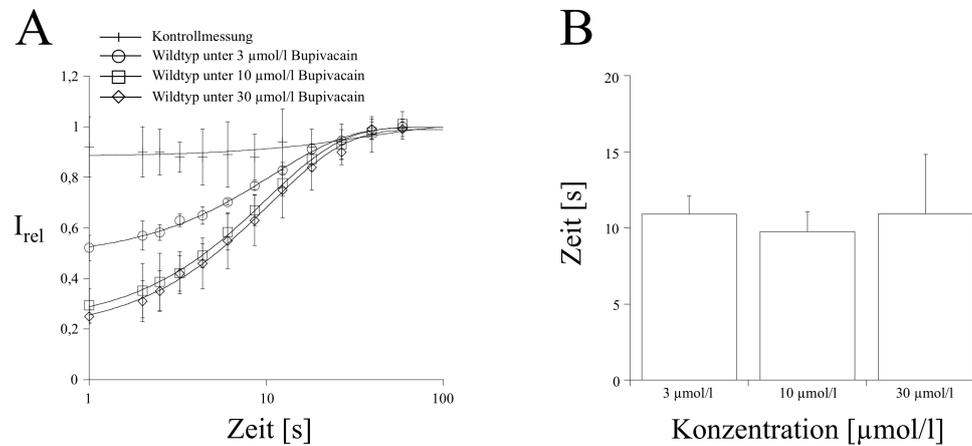


Abbildung 4.11: A. Strom-Zeit-Beziehung der recovery-from-inactivated-block unter Kontrollbedingungen, sowie unter 3 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$), 10 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$) und 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$) Bupivacain. Zur anschaulicheren Darstellung mit logarhythmischer x-Achse. B. Säulendiagramm der Zeitkonstanten der monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des recovery-from-inactivated-block-Protokolls des SCN5A Wildtyps unter Bupivacain

Die normalisierten Strom-Zeit-Beziehungen unter verschiedenen Konzentrationen Bupivacain sind in Abbildung 4.11A mit Hilfe monoexponentieller Funktionen graphisch dargestellt. Die Mittelwerte der Zeitkonstanten dieser monoexponentiellen Funktionen von Experimenten gleicher Konzentrationen sind in dem Säulendiagramm 4.11B dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zeitkonstanten zu der entsprechenden Kontrollmessung nachgewiesen werden. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keinen signifikanten Einfluss der Medikamentenkonzentration auf die Dauer der Erholung ($p=0,73$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt die Tabelle 4.5.

Bupivacain der Konzentration:	$\tau_{rec_{inac}}$	n	p-Wert
Kontrolle	$6,87 \cdot 10^{12} \pm 1,94 \cdot 10^{13} \text{ s}$	8	
3 $\mu\text{mol/l}$	$11,0 \pm 1,2 \text{ s}$	5	0,35
10 $\mu\text{mol/l}$	$10,0 \pm 1,5 \text{ s}$	7	0,35
30 $\mu\text{mol/l}$	$10,9 \pm 3,8 \text{ s}$	6	0,35

Tabelle 4.5: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Zeitkonstanten der Erholung des inaktivierten SCN5A. $\tau_{rec_{inac}}$ entspricht der Zeitkonstante der Erholung.

4.2 Wirkung von Ropivacain auf den SCN5A Wiltyp

4.2.1 Beeinflussung des Aktivierungsverhalten

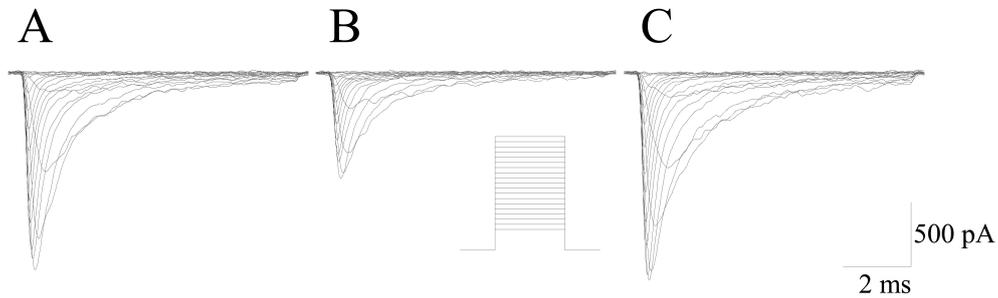


Abbildung 4.12: Original Stromspuren des SCN5A Wildtyp erzeugt durch das Aktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Ropivacain der Konzentration 300 $\mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Untersucht wurde die Aktivierung des Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Aktivierungsprotokolls (siehe eingelassene Abbildung) aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.12 zeigen die Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

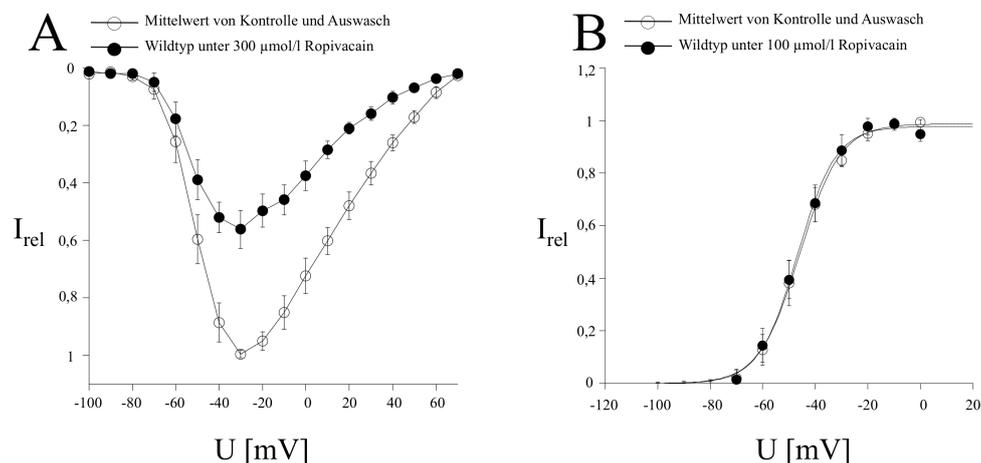


Abbildung 4.13: A. Strom-Spannungs-Beziehungen der Aktivierung des SCN5A Wiltyps ($n=6$). Weiß als Mittelwert der Kontrolle und Auswaschmessung. Schwarz unter Applikation von Ropivacain der Konzentration 300 $\mu\text{mol/l}$. B. zeigt die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung berechnet aus den Daten des Wildtyps unter Kontrollbedingungen (weiße Kreise, $n=6$) sowie unter 100 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain (schwarze Kreise, $n=6$).

Abbildung 4.13A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichs-

messungen ergeben. In der Abbildung 4.13B wird die aus diesen Daten berechnete Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dargestellt.

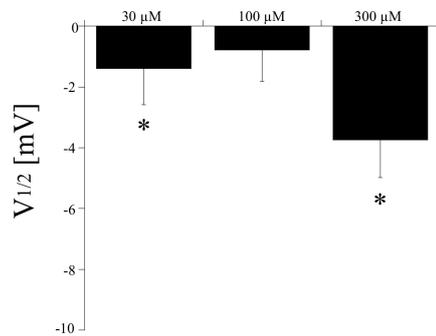


Abbildung 4.14: Gezeigt ist die Änderung der Aktivierungshalbmaxima des SCN5A Wildtyp-Kanals unter dem Einfluss von 30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain (jeweils $n=6$). * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.14. Eine signifikante Änderung der Aktivierung konnte für die Konzentrationen 30 und 300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain ($p<0,05$) gezeigt werden. Die Analyse der Daten auf einfaktorielles Varianz ergab, dass der Shift unter steigender Konzentration des Lokalanästhetikums signifikant zunimmt ($p=0,001$).

Die Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse der untersuchten Konzentrationen zusammen.

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-49,0 \pm 3,9$ mV	$-50,4 \pm 4,0$ mV	0,033
Steigungsfaktor	$7,51 \pm 0,8$	$6,9 \pm 0,4$	0,121
n	6		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-46,3 \pm 2,7$ mV	$-47,1 \pm 2,4$ mV	0,116
Steigungsfaktor	$7,4 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,7$	0,174
n	6		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-49,0 \pm 3,1$ mV	$-52,7 \pm 3,0$ mV	0,009
Steigungsfaktor	$7,2 \pm 1,0$	$6,3 \pm 0,7$	0,085
n	6		

Tabelle 4.6: Einfluss verschiedener Ropivacain-Konzentrationen auf die Aktivierung von SCN5A. $V_{1/2}$ entspricht dem Aktivierungsmittelpunkt.

4.2.2 Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens

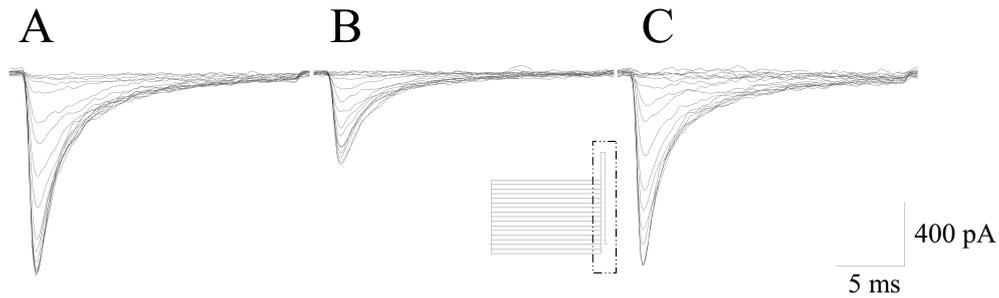


Abbildung 4.15: Auszüge aus Stromspuren des SCN5A Wildtyps erzeugt durch das Inaktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Ropivacain der Konzentration $300 \mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Untersucht wurde die Inaktivierung des Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Inaktivierungsprotokolls (siehe eingelassene Abbildung) aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.15 zeigen die Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

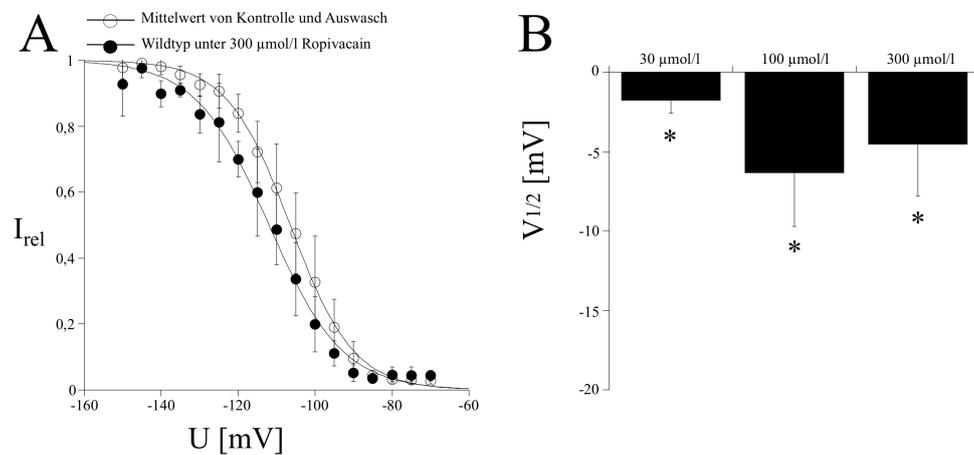


Abbildung 4.16: A. Strom-Spannungs-Beziehungen der Inaktivierung des SCN5A Wildtyps ($n=5$). Weiß als Mittelwert der Kontrolle und Auswaschmessung. Schwarz unter Applikation von $300 \mu\text{mol/l}$ Ropivacain. B. Änderung der Inaktivierungshalbmaxima der SCN5A Mutante unter $30 \mu\text{mol/l}$ ($n=5$), $100 \mu\text{mol/l}$ ($n=6$) und $300 \mu\text{mol/l}$ ($n=5$) Ropivacain. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Abbildung 4.16A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen - in diesem Fall gleichzeitig die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung -, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergeben. Sie werden dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.16B. Ropivacain negativiert den Inaktivierungsmittelpunkt des SCN5A Wildtyps in den untersuchten Konzentrationen signifikant. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keine signifikante Entwicklung dieser Änderung in Abhängigkeit zu der Konzentrationen ($p=0,054$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert die Tabelle 4.7.

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-104,5 \pm 5,0 \text{ mV}$	$-106,2 \pm 8,2 \text{ mV}$	0,008
Steigungsfaktor	$-8,0 \pm 1,9$	$-6,2 \pm 0,1$	0,092
n	5		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-109,0 \pm 8,0 \text{ mV}$	$-115,4 \pm 8,9 \text{ mV}$	0,005
Steigungsfaktor	$-7,1 \pm 0,5$	$-7,9 \pm 1,6$	0,174
n	6		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-106,2 \pm 4,0 \text{ mV}$	$-110,7 \pm 4,54 \text{ mV}$	0,037
Steigungsfaktor	$-7,6 \pm 1,4$	$-8,1 \pm 1,6$	0,415
n	5		

Tabelle 4.7: Einfluss verschiedener Ropivacain-Konzentrationen auf die Inaktivierung von SCN5A. $V_{1/2}$ entspricht dem Inaktivierungsmittelpunkt.

4.2.3 development-of-inactivated-block unter Ropivacain

Zur Untersuchung der Auswirkung des Medikaments auf den inaktivierten Zustand des SCN5A Wildtyps, wurde das development-of-inactivated-block-Protokoll verwendet. Ein exemplarischer Auszug aus einer Stromspur unter dem Einfluss von Ropivacain, zeigt Abbildung 4.17A. Es ist die Abhängigkeit des Stroms von der Zeit für das Intervall der Medikamentenbindung zu erkennen.

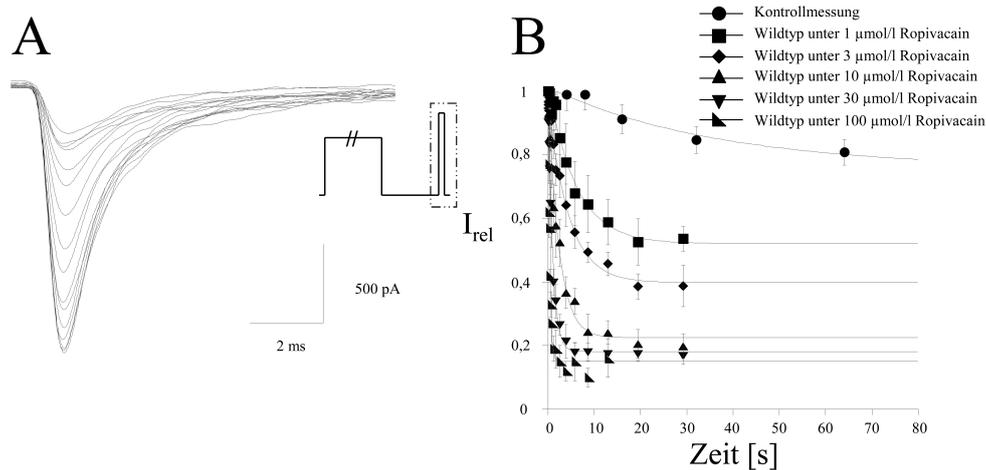


Abbildung 4.17: A. Stromspur erzeugt durch das development-of-inactivated-block-Protokoll (eingelassene Grafik) unter Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain. B. zeigt die Strom-Zeitbeziehung des development-of-inactivated-block der Kontrollmessung sowie unter dem Einfluss von Ropivacain der Konzentration 1 ($n=6$), 3 ($n=6$), 10 ($n=6$), 30 ($n=7$) und 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$).

Die normalisierten Strom-Zeit-Beziehungen zur Entwicklung des Blocks unter verschiedenen Konzentrationen von Ropivacain sind in Abbildung 4.17B gezeigt. Die graphische Darstellung erfolgte durch monoexponentielle Funktionen.

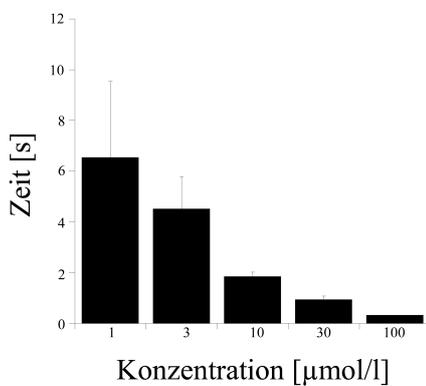


Abbildung 4.18: Säulendiagramm der Zeitkonstanten aus den monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des development-of-inactivated-block-Protokolls des SCN5A Wildtyps unter Ropivacain

Die Mittelwerte der Zeitkonstanten dieser monoexponentiellen Funktionen von Experimenten gleicher Konzentrationen sind in dem Säulendiagramm 4.18 dargestellt. Es ergab sich zu keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der Kontroll- und den Zeitkonstanten der Einwaschbedingungen. Durch die einfaktorielle Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Zeitkonstanten abhängig von der Konzentration sind ($p < 0,001$). Die Tabelle 4.8 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Ropivacain der Konzentration:	τ_{dev}	n	p-Wert
Kontrolle	$41,4 \pm 29,3$ s	3	
1 $\mu\text{mol/l}$	$6,6 \pm 3,0$ s	6	0,175
3 $\mu\text{mol/l}$	$4,5 \pm 1,3$ s	6	0,161
10 $\mu\text{mol/l}$	$1,9 \pm 0,2$ s	6	0,145
30 $\mu\text{mol/l}$	$0,95 \pm 0,1$ s	7	0,140
100 $\mu\text{mol/l}$	$0,3 \pm 0,01$ s	5	0,136

Tabelle 4.8: Einfluss verschiedener Ropivacain-Konzentrationen auf die Blockade des inaktivierten SCN5A. τ_{dev} entspricht der Zeitkonstante der Entwicklung.

4.2.4 recovery-from-inactivated-block unter Ropivacain

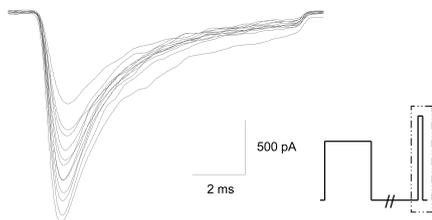


Abbildung 4.19: Ausschnitt aus einer Stromspur erzeugt durch das recovery-from-inactivated-block-Protokoll (eingelassene Grafik) unter dem Einfluss von 10 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain.

Einen exemplarischen Ausschnitt einer Stromantwort auf das recovery-from-inactivated-block-Protokoll des SCN5A Wildtyps unter Ropivacain zeigt die Abbildung 4.19. Es ist die Abhängigkeit des Stroms von der Zeit des Intervalls für die Erholung zu erkennen.

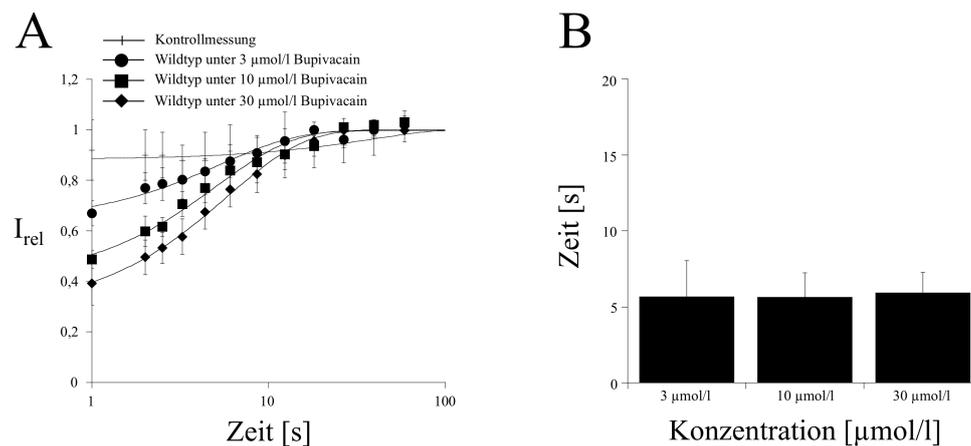


Abbildung 4.20: A. Strom-Zeit-Beziehung der recovery-from-inactivated-block der Kontrollmessung sowie unter 3 $\mu\text{mol/l}$ ($n=9$), 10 $\mu\text{mol/l}$ ($n=5$) und 30 $\mu\text{mol/l}$ ($n=11$) Ropivacain zur anschaulicheren Darstellung mit logarithmischer x-Achse. B. Säulendiagramm der Zeitkonstanten des recovery-from-inactivated-block-protokolls des SCN5A Wildtyps unter Ropivacain.

Die normalisierten Strom-Zeit-Beziehungen unter verschiedenen Konzentrationen Ropivacain sind in Abbildung 4.20A mit Hilfe monoexponentieller Funktio-

nen graphisch dargestellt. Die Mittelwerte der Zeitkonstanten dieser monoexponentiellen Funktionen von Experimenten gleicher Konzentrationen sind in dem Säulendiagramm 4.20B dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zeitkonstanten zu der entsprechenden Kontrollmessung nachgewiesen werden. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keinen signifikanten Einfluss der Medikamentenkonzentration auf die Dauer der Erholung ($p=0,203$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt die Tabelle 4.9.

Ropivacain der Konzentration:	$\tau_{rec_{inac}}$	n	p-Wert
Kontrolle	$6,87 \cdot 10^{12} \pm 1,94 \cdot 10^{13}$ s	8	
3 $\mu\text{mol/l}$	$7,1 \pm 2,7$ s	15	0,35
10 $\mu\text{mol/l}$	$5,3 \pm 1,5$ s	5	0,35
30 $\mu\text{mol/l}$	$5,9 \pm 1,3$ s	11	0,35

Tabelle 4.9: Einfluss verschiedener Ropivacain-Konzentrationen auf die Zeitkonstanten der Erholung des inaktivierten SCN5A. $\tau_{rec_{inac}}$ entspricht der Zeitkonstante der Erholung.

4.3 Vergleich der Wirkung von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A Wiltyp

Für einen direkten Vergleich jeweils korrespondierender Ergebnisse werden im folgenden Kapitel die bereits bekannten Daten aus den beiden voran gegangenen Kapiteln 4.1 und 4.2 noch einmal vergleichend dargestellt.

4.3.1 Vergleich der Beeinflussung der Aktivierung

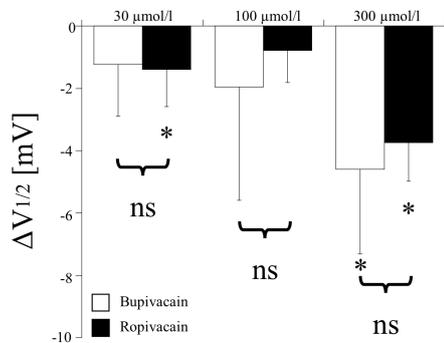


Abbildung 4.21: Gezeigt ist die Veränderung der Aktivierungshalbmultiplexima des Wildtypen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain (weiß, $n=6-9$) und Ropivacain (schwarz, jeweils $n=6$) im Vergleich. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz, ns keine Signifikanz.

Abbildung 4.21 zeigt die Differenz der Aktivierungsmittelpunkte zwischen Einwasch und Kontrollbedingungen des Wildtypen unter dem Einfluss von Bupivacain und Ropivacain im direkten Vergleich. Die Änderung des Aktivierungsmittelpunktes des SCN5A Wiltyp-Kanals durch den Einfluss von Bupivacain ist bei

einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ signifikant, bei Ropivacain zeigte sich eine signifikante Änderung bei Konzentrationen von 30 und 300 $\mu\text{mol/l}$. Zwischen den Medikamenten konnte bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied in der Höhe des Shifts gesehen werden.

4.3.2 Vergleich der Beeinflussung der Inaktivierung

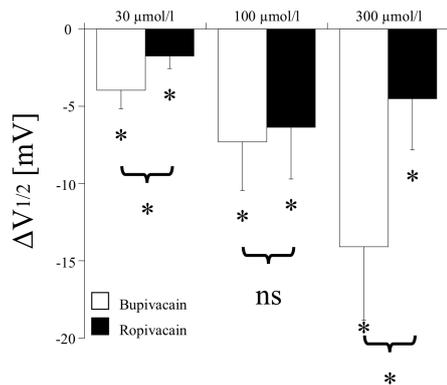


Abbildung 4.22: Gezeigt ist die Veränderung der Inaktivierungshalbmaxima des Wildtypen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain (weiß, n=6-8) und Ropivacain (schwarz, n=5-6) im Vergleich. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz, ns keine Signifikanz.

In dem Säulendiagramm 4.22 werden die Änderungen der Inaktivierungshalbmaxima des Wildtypen unter dem Einfluss von Bupivacain und Ropivacain vergleichend dargestellt. Wie erwähnt, induzieren Bupivacain und Ropivacain in den untersuchten Konzentrationen bei dem Wildtyp eine signifikante Änderung des Inaktivierungsmittelpunkts. Der Unterschied unter dem Einfluss von Bupivacain und Ropivacain ist bei den Konzentrationen von 30 ($p=0,002$) und 300 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0,004$) signifikant. Der Einfluss ist bei den verglichenen Konzentrationen für Bupivacain größer, es verschiebt den Inaktivierungsmittelpunkt stärker als Ropivacain.

4.3.3 Vergleich der Inhibition durch Bupivacain und Ropivacain

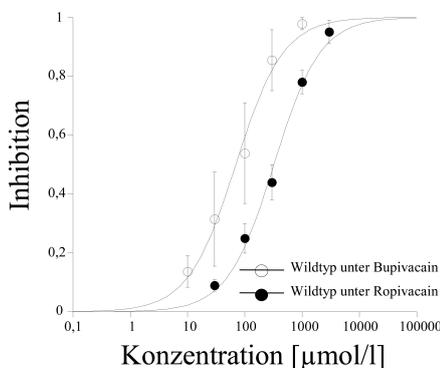


Abbildung 4.23: Konzentrations-Wirkungskurve von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A Wildtyp-Kanal

Aus den Stromspuren in Abbildung 4.1 und 4.12 ist zu erkennen, dass der Stromfluß durch beide Medikamente reversibel gehemmt wird. Der Vergleich des maximalen Stromflusses von Kontroll- und Auswaschmessung mit dem maximalen Stromfluss

des Einwasches, ergibt für jede Konzentration eine Inhibition. In Abbildung 4.23 ist die Abhängigkeit der Inhibition von der Konzentration mit einer Hill-Funktion (siehe Gleichung 3.7) dargestellt. Der IC_{50} -Wert für den SCN5A Wildtypen unter Bupivacain beträgt $69,5 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$ und unter Ropivacain $320 \pm 30 \mu\text{mol/l}$. Die Hill-Koeffizienten sind für beide Funktionen 1. Die Werte für die Inhibition unterscheiden sich zu jeder vergleichbaren Konzentration signifikant voneinander (siehe Tabelle 4.10).

Konzentration	Inhibition Bupivacain	Inhibition Ropivacain	p-Wert
10 $\mu\text{mol/l}$	$0,14 \pm 0,05$	nicht untersucht	
30 $\mu\text{mol/l}$	$0,31 \pm 0,16$	$0,09 \pm 0,02$	0,004
100 $\mu\text{mol/l}$	$0,54 \pm 0,17$	$0,25 \pm 0,05$	<0,001
300 $\mu\text{mol/l}$	$0,86 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,06$	<0,001
1000 $\mu\text{mol/l}$	$0,98 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,04$	<0,001
3000 $\mu\text{mol/l}$	nicht untersucht	$0,95 \pm 0,04$	

Tabelle 4.10: Die Inhibition erhoben aus den Daten der Aktivierung von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A Wildtyp im Vergleich.

4.3.4 Vergleich des development-of-inactivated-block

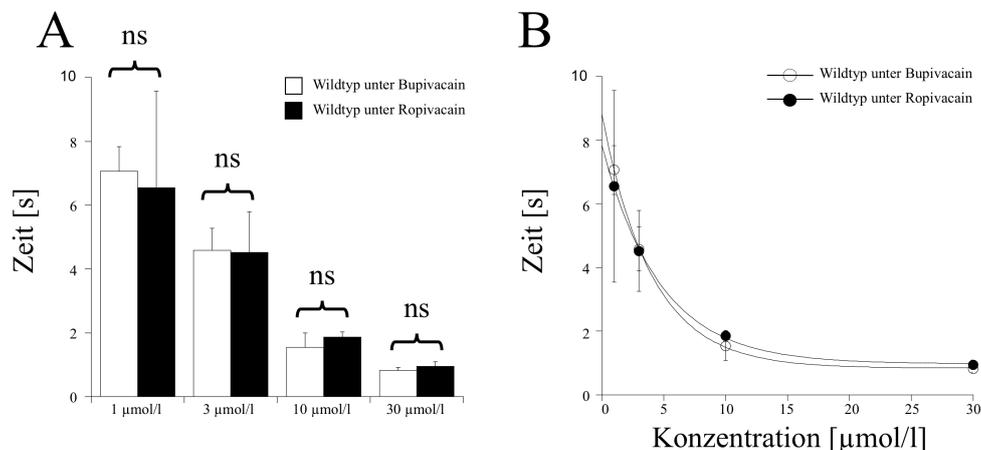


Abbildung 4.24: A. Säulendiagramm der Zeitkonstanten aus den monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des development-of-inactivated-block-Protokolls unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain (weiß, $n=5-6$) und Ropivacain (schwarz, $n=6-7$) im Vergleich. B. Die Zeitkonstanten folgen einer monoexponentiellen Funktion.

Abbildung 4.24A zeigt die Zeitkonstanten des development-of-inactivated-block von Bupivacain und Ropivacain auf den SCN5A Wildtyp-Kanal im Vergleich. Die Zeitkonstanten zwischen den Medikamenten unterscheiden sich bei keiner Konzentration signifikant voneinander. Aus Abbildung 4.24B ist zu erkennen, dass die

Zeitkonstanten einer monoexponentiellen Funktion folgen. Die τ -Werte der Funktionen sind für Bupivacain 4 und für Ropivacain 4,7.

4.3.5 Inhibition des inaktivierten Zustands des SCN5A Wildtyp unter Bupivacain und Ropivacain

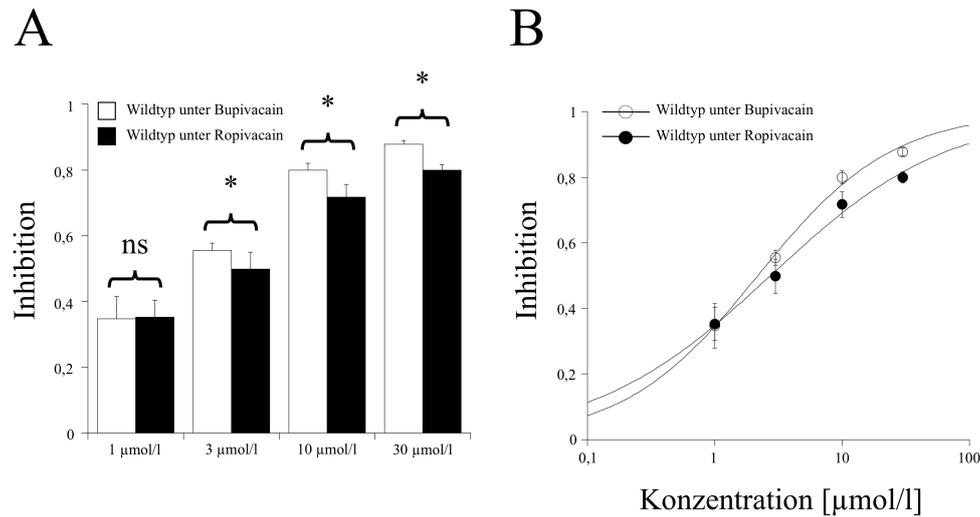


Abbildung 4.25: A. Säulendiagramm der Inhibition des inaktivierten SCN5A Wildtyp Kanal. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz, ns keine Signifikanz. B. Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Bupivacain und Ropivacain auf den inaktivierten SCN5A Wildtyp-Kanal.

Das Säulendiagramm der ermittelten Inhibition für Bupivacain und Ropivacain auf den inaktivierten SCN5A ist in Abbildung 4.25A zu sehen. Die Inhibition der beiden Medikamente unterscheidet sich bis auf die Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$ signifikant voneinander. Aus Abbildung 4.25B ist zu erkennen, dass diese Daten einer Hill-Funktion folgen. Die IC_{50} -Werte sind für Bupivacain $2,2 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$ und für Ropivacain $2,8 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$. Die Hill-Koeffizienten der Funktion sind für Bupivacain $0,82 \pm 0,06$ und für Ropivacain $0,58 \pm 0,02$.

Konzentration	Bupivacain	Ropivacain	p-Wert
1 $\mu\text{mol/l}$	$0,35 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,05$	0,759
3 $\mu\text{mol/l}$	$0,56 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,04$	0,030
10 $\mu\text{mol/l}$	$0,80 \pm 0,008$	$0,69 \pm 0,05$	0,003
30 $\mu\text{mol/l}$	$0,88 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$	<0,001

Tabelle 4.11: Die Inhibition von Bupivacain und Ropivacain auf den inaktivierten SCN5A Wildtyp erhoben aus den Daten der Entwicklung des inaktivierten Block im Vergleich.

4.3.6 Vergleich der recovery-from-inactivated-block

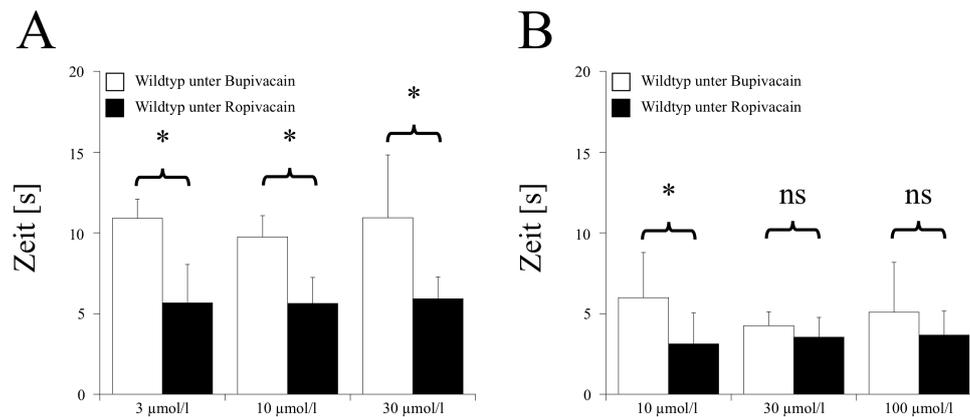


Abbildung 4.26: A. Säulendiagramm der Zeitkonstanten aus den monoexponentiellen Funktionen der Strom-Zeit-Beziehung des recovery-from-inactivated-block des SCN5A Wildtyp unter Einfluss von Bupivacain (weiß, n=5-7) und Ropivacain (schwarz, n=5-11) der ungepaarten Experimente. B. Darstellung der Zeitkonstanten aus den gepaarten Experimenten der Konzentration 10 µmol/l (n=7), 30 µmol/l (n=6) und 100 µmol/l (n=6). An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz.

Der Vergleich der Mittelwerte der Zeitkonstanten der recovery-from-inactivated-block unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain und Ropivacain ist in Abbildung 4.26A gezeigt. Die Zeitkonstanten sind von der Konzentration des Medikaments unabhängig. Der Vergleich zwischen den Werten für Ropivacain und Bupivacain zeigte für alle Konzentrationen einen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse der gepaarten Experimente zeigt das Säulendiagramm 4.26B. Auch hier konnte rechnerisch mit der einfaktoriellen Varianzanalyse kein Einfluss der Konzentration auf die Zeitkonstante nachgewiesen werden. Der signifikante Unterschied der Zeitkonstanten zwischen den beiden Medikamenten konnte für die Konzentration von 10 µmol/l bestätigt werden.

4.4 Charakterisierung von SCN5A Wildtyp und Mutante

4.4.1 Aktivierungsverhalten von SCN5A Wildtyp und Mutante

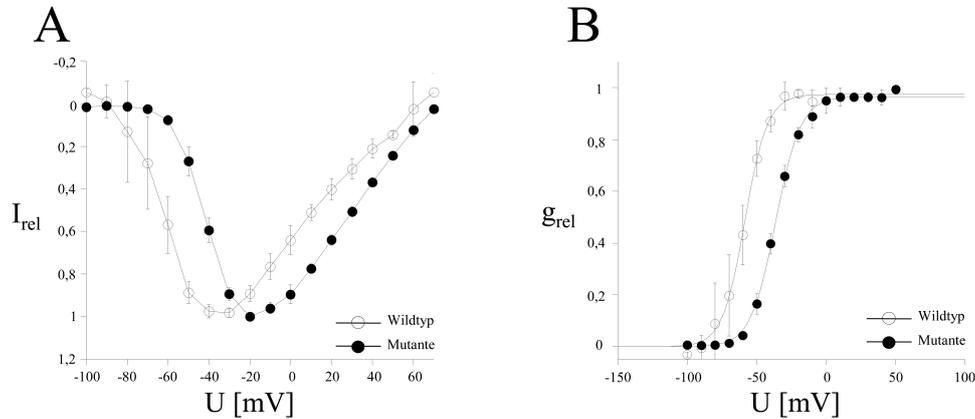


Abbildung 4.27: A. Strom-Spannungs-Beziehung des SCN5A Wildtyp-Kanals ($n=4$) und des mutierten Kanals ($n=5$). B. zeigt die daraus berechnete Abhängigkeit der relativen Leitfähigkeit vom Membranpotential.

Untersucht wurde das Aktivierungsverhalten des SCN5A Wildtypen im Vergleich zur Mutante. Hierzu wurde das Aktivierungsprotokoll (siehe Abschnitt 3.2.4) genutzt. Es wurde an dem selben „Patch“ sechsmal ausgeführt und mit t und dem Index von 0 bis 5 gekennzeichnet. Auf eine exemplarische Stromspur wurde hier verzichtet, sie ist gleich der Kontrollmessung in Abbildung 4.1A für den Wildtypen und in 4.31A für die Mutante. Die Strom-Spannungs-Beziehung des Zeitpunktes $t=1$ aus den Mittelwerten des maximalen Stroms aller Experimente zu diesem Zeitpunkt ist in Abbildung 4.27A dargestellt. Die aus diesen Daten berechnete und normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung ist durch eine Boltzmann-Funktion (Gleichung 3.8) in Abbildung 4.27B graphisch dargestellt.

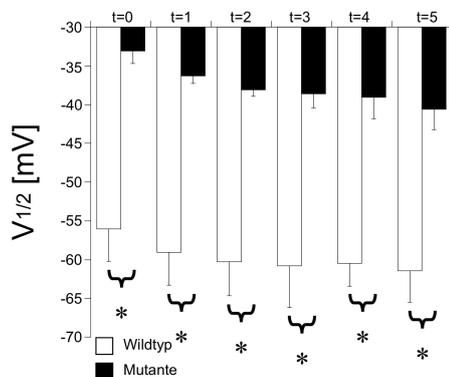


Abbildung 4.28: Gezeigt sind Halbmaxima der Aktivierung des SCN5A Wildtyp und der Mutante in zeitlicher Abhängigkeit. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz.

Durch die Darstellung der absoluten Werte der einzelnen Experimente mit der Boltzmann-Funktion (Gleichung 3.8), konnte für jeden Zeitpunkt ein Mittelwert

der halbmaximalen Aktivierung mit Standardabweichung berechnet werden. Diese Werte sind in Abhängigkeit von der Zeit in Abbildung 4.28 gezeigt. Die Aktivierungshalbmaxima von Wildtyp zur Mutante unterscheiden sich zu jedem Zeitpunkt mit $p < 0,05$ signifikant voneinander. Die Tabelle 4.12 fasst die erhobenen Werte zusammen. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt für die Aktivierungsmittelpunkte des Wildtyp-Kanals keine signifikante Entwicklung über die Zeit ($p=0,534$), allerdings für die Aktivierungsmittelpunkte des mutierten Kanals ($p<0,001$).

	Wildtyp	Mutante	p-Wert
$t = 0$			
$V_{1/2}$	$-56,0 \pm 4,2$ mV	$-33,1 \pm 1,6$ mV	$<0,001$
Steigungsfaktor	$8,2 \pm 3,4$	$9,1 \pm 1,7$	0,671
n	4	5	
$t = 1$			
$V_{1/2}$	$-59,0 \pm 4,2$ mV	$-36,3 \pm 1,0$ mV	0,001
Steigungsfaktor	$7,9 \pm 2,5$	$9,0 \pm 1,2$	0,463
n	4	5	
$t = 2$			
$V_{1/2}$	$-60,3 \pm 4,4$ mV	$-38,1 \pm 0,8$ mV	0,002
Steigungsfaktor	$7,4 \pm 2,2$	$8,8 \pm 1,1$	0,324
n	4	5	
$t = 3$			
$V_{1/2}$	$-60,8 \pm 5,4$ mV	$-38,6 \pm 1,8$ mV	0,002
Steigungsfaktor	$7,7 \pm 1,2$	$8,8 \pm 0,7$	0,201
n	4	5	
$t = 4$			
$V_{1/2}$	$-60,5 \pm 2,9$ mV	$-39,1 \pm 2,7$ mV	$<0,001$
Steigungsfaktor	$7,2 \pm 0,7$	$9,6 \pm 1,5$	0,018
n	4	5	
$t = 5$			
$V_{1/2}$	$-61,5 \pm 4,1$ mV	$-40,6 \pm 2,6$ mV	$<0,001$
Steigungsfaktor	$7,2 \pm 0,7$	$9,2 \pm 1,1$	0,015
n	4	5	

Tabelle 4.12: Einfluss der Zeit auf den Aktivierungsmittelpunkt ($V_{1/2}$) des SCN5A Wildtypen und der Mutante im Vergleich.

4.4.2 Inaktivierungsverhalten von SCN5A Wiltyt und Mutante

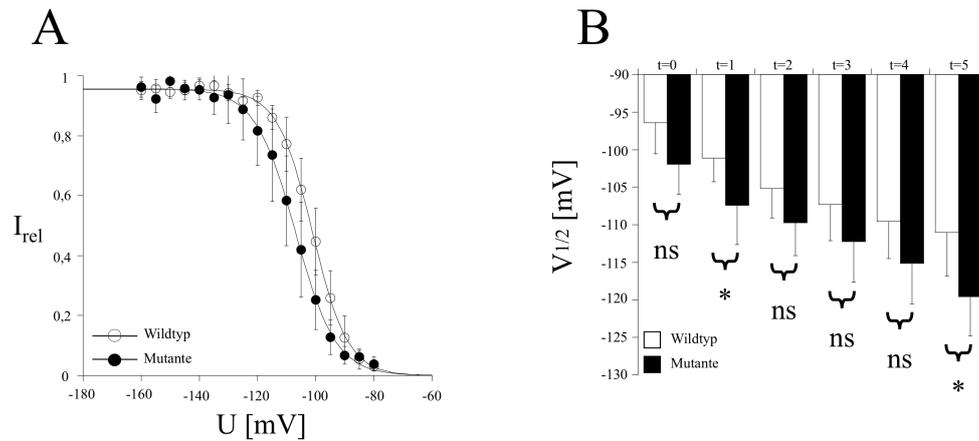


Abbildung 4.29: A. Strom-Spannungs-Beziehung der Inaktivierung von SCN5A Wiltyt ($n=5$) und Mutante ($n=6$). B. Halbmaxima der Inaktivierung von SCN5A Wildtyp und Mutante in Abhängigkeit von der Zeit. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: * Signifikanz, ns keine Signifikanz.

In Abbildung 4.29A wird das normalisierte Mittel der Strom-Spannungs-Beziehungen der Experimente zum Zeitpunkt $t=1$ gezeigt, die durch das Inaktivierungsprotokoll ermittelt wurde. Die graphische Darstellung erfolgte mit der Boltzmann-Funktion (Gleichung 3.8). Stromspuren sind hier nicht gezeigt, sie entsprechen den Kontrollmessungen, gezeigt in den Abbildungen 4.4A für den Wildtyp und 4.34A für die Mutante. Die Mittelwerte der Inaktivierungshalbmaxima aus der Darstellung der absoluten Werte mit einer Boltzmann-Funktion, werden in dem Säulendiagramm 4.29B gezeigt. Die Inaktivierungshalbmaxima von Wildtyp zu Mutante unterscheiden sich zu den Zeitpunkten $t=1$ und $t=5$ mit $p < 0,05$ signifikant voneinander, für alle anderen Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied nicht nachgewiesen werden. Die Inaktivierungshalbmaxima sind in der Tabelle 4.13 dargestellt. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt sowohl für den Wildtyp, als auch für den mutierten Kanal, eine signifikante Entwicklung über die Zeit (jeweils $p < 0,001$).

	Wildtyp	Mutante	p-Wert
<i>t</i> = 0			
$V_{1/2}$	$-96,4 \pm 4,1$ mV	$-102,0 \pm 4,0$ mV	0,051
Steigungsfaktor	$-5,4 \pm 0,8$	$-5,3 \pm 0,7$	0,799
<i>n</i>	5	6	
<i>t</i> = 1			
$V_{1/2}$	$-101,2 \pm 3,1$ mV	$-107,4 \pm 5,2$ mV	0,037
Steigungsfaktor	$-5,9 \pm 0,6$	$-6,6 \pm 1,4$	0,290
<i>n</i>	5	6	
<i>t</i> = 2			
$V_{1/2}$	$-105,2 \pm 3,9$ mV	$-109,8 \pm 4,4$ mV	0,101
Steigungsfaktor	$-6,4 \pm 0,9$	$-6,8 \pm 0,8$	0,408
<i>n</i>	5	6	
<i>t</i> = 3			
$V_{1/2}$	$-107,3 \pm 4,8$ mV	$-112,5 \pm 5,4$ mV	0,145
Steigungsfaktor	$-6,1 \pm 0,6$	$-7,3 \pm 0,9$	0,040
<i>n</i>	5	6	
<i>t</i> = 4			
$V_{1/2}$	$-109,5 \pm 5,0$ mV	$-115,1 \pm 5,4$ mV	0,108
Steigungsfaktor	$-6,4 \pm 0,7$	$-7,8 \pm 1,7$	0,104
<i>n</i>	5	6	
<i>t</i> = 5			
$V_{1/2}$	$-111,0 \pm 5,7$ mV	$-119,6 \pm 5,2$ mV	0,033
Steigungsfaktor	$-6,6 \pm 1,0$	$-8,4 \pm 1,5$	0,045
<i>n</i>	6	5	

Tabelle 4.13: Einfluss der Zeit auf den Inaktivierungsmittelpunkt ($V_{1/2}$) des SCN5A Wildtypen und der Mutante im Vergleich.

4.4.3 recovery-Verhalten von SCN5A Wildtyp und Mutante

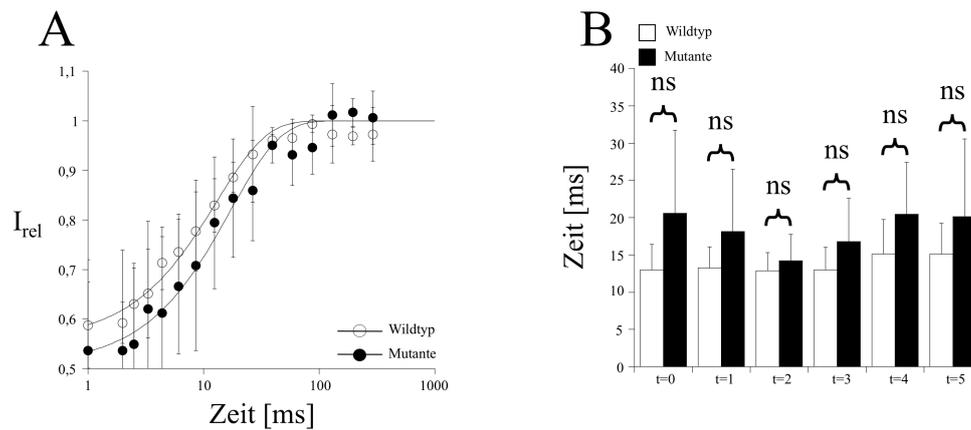


Abbildung 4.30: A. Strom-Zeit-Beziehung der recovery von SCN5A Wildtyp ($n=5$) und Mutante ($n=5$). B. Zeitkonstanten der recovery von SCN5A Wildtyp und Mutante in Abhängigkeit von der Zeit. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: ns keine Signifikanz.

Der in Abbildung 4.30A gezeigte Zusammenhang zwischen Strom und Zeit beruht auf Ergebnissen des recovery-Protokolls, die mit einer monoexponentiellen Funktion (Gleichung 3.5) und einer logarithmischen x-Achse graphisch dargestellt wurden. Es handelt sich hier um die Experimente zum Zeitpunkt $t=1$. Die Zeitkonstanten von Wildtyp und Mutant, die sich aus der graphischen Darstellung durch die monoexponentiellen Funktion der absoluten Werte der einzelnen Experimente ergeben, sind im zeitlichen Verlauf in Abbildung 4.30B als Säulendiagramm dargestellt. Die Zeitkonstanten von Mutante und Wildtyp unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Die Tabelle 4.14 fasst die Ergebnisse zusammen. Durch die einfaktorielle Varianzanalyse konnte keine signifikante Entwicklung in Abhängigkeit zur Zeit nachgewiesen werden (Wildtyp: $p=0,789$; Mutante: $p=0,780$).

t	Wildtyp τ_{rec}	Mutante τ_{rec}	p-Wert
0	$13,0 \pm 3,4$ ms	$20,6 \pm 11,1$ ms	0,207
1	$13,3 \pm 2,8$ ms	$18,1 \pm 8,3$ ms	0,274
2	$12,9 \pm 2,4$ ms	$14,2 \pm 3,6$ ms	0,508
3	$13,0 \pm 3,0$ ms	$16,8 \pm 5,8$ ms	0,247
4	$15,1 \pm 4,6$ ms	$20,5 \pm 6,9$ ms	0,193
5	$15,1 \pm 4,1$ ms	$20,1 \pm 10,4$ ms	0,359

Tabelle 4.14: Einfluss der Zeit auf die Zeitkonstanten der recovery des SCN5A Wildtypen und der Mutante im Vergleich (jeweils $n=5$).

4.5 Wirkung von Bupivacain auf den mutierten SCN5A

4.5.1 Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens

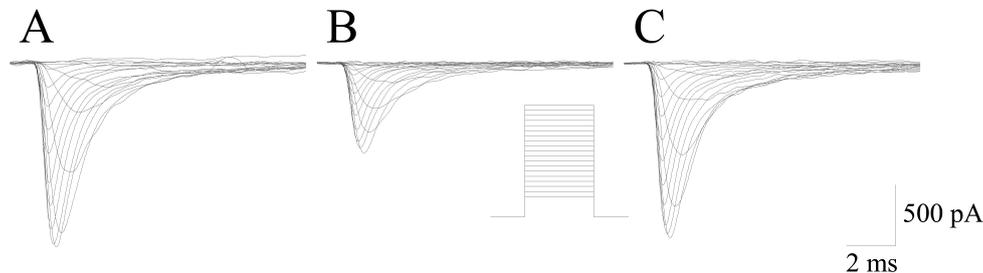


Abbildung 4.31: Original Stromspuren des mutierten SCN5A Kanals erzeugt durch das Aktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Bupivacain der Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Untersucht wurde die Aktivierung des Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Aktivierungsprotokolls (siehe eingelassene Abbildung) aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.31 zeigen die Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

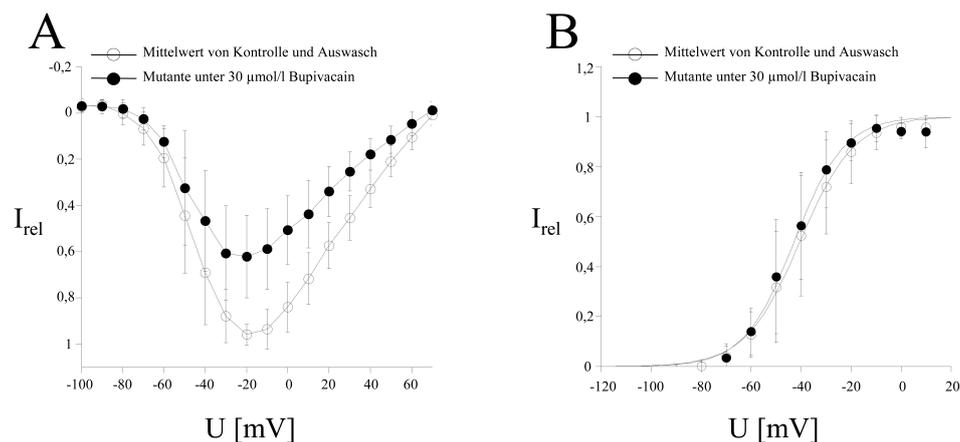


Abbildung 4.32: A. Strom-Spannungs-Beziehung der Aktivierung der SCN5A Mutante ($n=9$). Weiße Kreise als Mittelwert zwischen Kontroll- und Auswaschbedingungen, schwarze Kreise unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. B. zeigt die daraus berechnete und normalisierte Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung.

Abbildung 4.32A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichs-

messungen ergeben. In der Abbildung 4.32B wird die aus diesen Daten berechnete Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dargestellt.

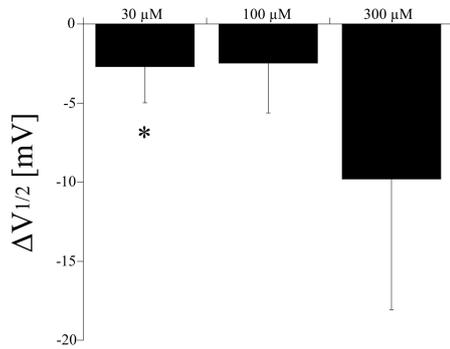


Abbildung 4.33: Gezeigt ist die Veränderung der Aktivierungshalbmaxima der Mutante unter dem Einfluss von 30 $\mu\text{mol/l}$ (n=9), 100 $\mu\text{mol/l}$ (n=6) und 300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain (n=5). * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.33. Eine signifikante Änderung der Aktivierung konnte für die Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain (p=0,008) gezeigt werden. Die Analyse der Daten auf einfaktorielles Varianz ergab, dass der Shift unter steigender Konzentration des Lokalanästhetikums signifikant zunimmt (p=0,027). Die Tabelle 4.15 fasst die Ergebnisse der untersuchten Konzentrationen zusammen.

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	-40,7 ± 9,2 mV	-43,4 ± 8,2 mV	0,008
Steigungsfaktor	8,9 ± 2,2	8,1 ± 2,3	0,012
n		9	

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	-47,6 ± 9,4 mV	-50,1 ± 9,4 mV	0,116
Steigungsfaktor	8,9 ± 1,2	7,5 ± 2,2	0,070
n		6	

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	-35,0 ± 3,8 mV	44,8 ± 5,5 mV	0,057
Steigungsfaktor	8,9 ± 0,8	6,2 ± 1,8	0,037
n		5	

Tabelle 4.15: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Aktivierung von SCN5A. $V_{1/2}$ entspricht dem Aktivierungsmittelpunkt.

4.5.2 Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens

Untersucht wurde die Inaktivierung des mutierten Kanals unter Kontrollbedingungen, unter Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen. Die Daten wurden unter Verwendung des Inaktivierungsprotokolls (siehe eingeklammerte Abbildung) aufgenommen. Die Stromspuren in Abbildung 4.34 zeigen die

Abhängigkeit des Stroms durch den Kanal vom Membranpotential und die Reversibilität der Medikamentenwirkung.

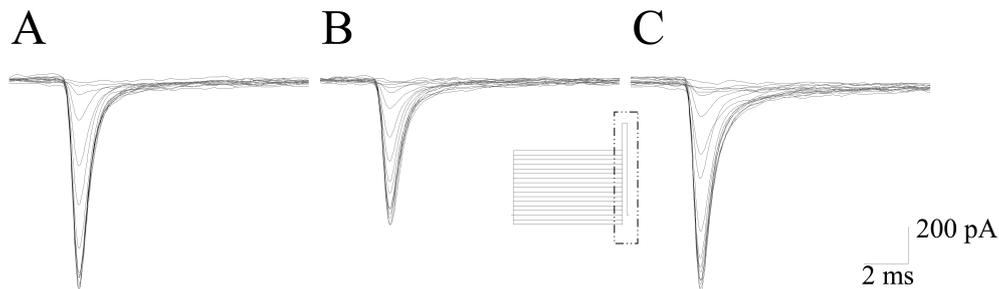


Abbildung 4.34: Original Stromspuren des mutierten SCN5A Kanals erzeugt durch das Inaktivierungsprotokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von Bupivacain der Konzentration $30 \mu\text{mol/l}$. C. Auswaschbedingungen.

Abbildung 4.35A zeigt normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen - in diesem Fall gleichzeitig die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung -, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergeben. Sie werden dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion.

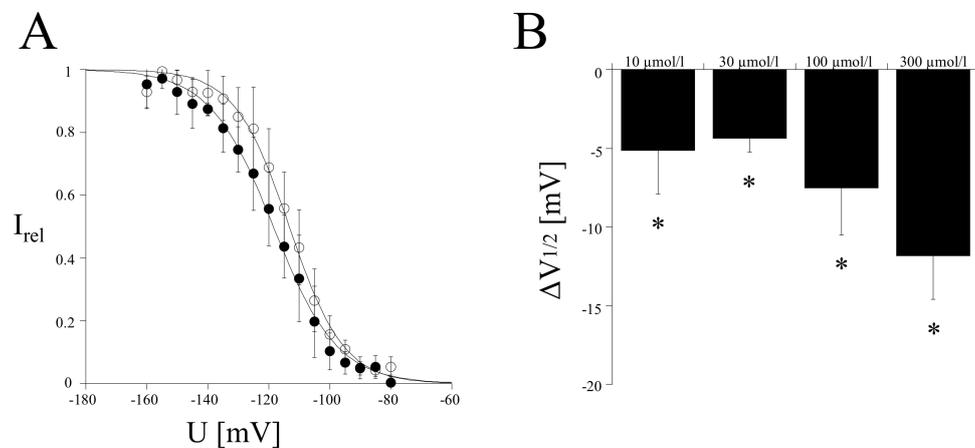


Abbildung 4.35: A. Strom-Spannungs-Beziehungen der Inaktivierung der SCN5A Mutante. Weiß als Mittelwert der Kontroll- und Auswaschmessung. Schwarz unter Applikation von Bupivacain der Konzentration $30 \mu\text{mol/l}$. B. Änderung der Inaktivierungshalbmaxima der SCN5A Mutante unter 10 ($n=5$), 30 ($n=6$), 100 ($n=7$) und $300 \mu\text{mol/l}$ ($n=6$) Bupivacain. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Die daraus resultierenden Änderungen der Halbmaxima bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigt das Säulendiagramm 4.35B. Bupivacain negativiert den Inaktivierungsmittelpunkt des mutierten SCN5A in den untersuchten Konzentrationen signifikant ($p < 0,05$). Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt eine signifikante

Änderung in Abhängigkeit zu der Konzentrationen ($p=0,001$). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert die Tabelle 4.16.

	Kontrolle / Auswasch	10 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-106,8 \pm 6,0 \text{ mV}$	$-112,0 \pm 5,0 \text{ mV}$	0,014
Steigungsfaktor	$-7,3 \pm 0,4$	$-8,0 \pm 1,0$	0,053
n	5		

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-112,9 \pm 4,4 \text{ mV}$	$-117,2 \pm 4,9 \text{ mV}$	<0,001
Steigungsfaktor	$-8,1 \pm 1,4$	$-9,0 \pm 1,7$	0,033
n	6		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-104,6 \pm 4,7 \text{ mV}$	$-112,1 \pm 6,7 \text{ mV}$	<0,001
Steigungsfaktor	$-7,4 \pm 0,6$	$-8,1 \pm 1,1$	0,029
n	7		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
$V_{1/2}$	$-103,7 \pm 6,8 \text{ mV}$	$-115,5 \pm 8,5 \text{ mV}$	0,003
Steigungsfaktor	$-7,3 \pm 0,8$	$-9,4 \pm 0,4$	0,006
n	4		

Tabelle 4.16: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Inaktivierung des mutierten SCN5A.

4.5.3 Beeinflussung des recovery-Verhaltens

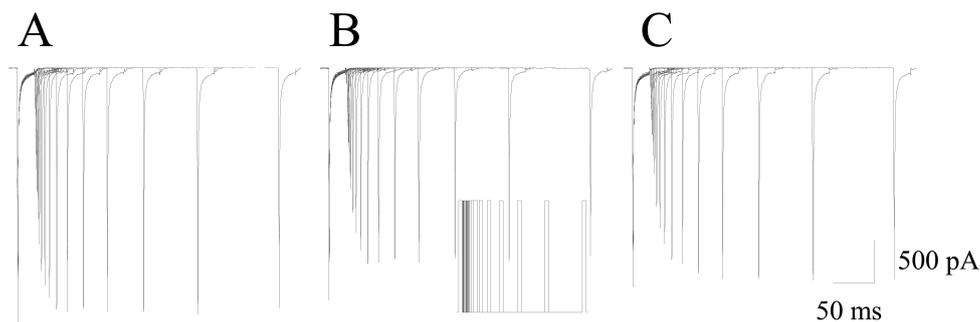


Abbildung 4.36: Stromspuren der SCN5A Mutante erzeugt durch das recovery-Protokoll (eingelassene Grafik). A. Kontrollbedingungen. B. unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. C. Auswaschbedingungen.

Untersucht wurde die Erholung des Kanals von der Inhibition durch das Medikament im aktiven Zustand. Stromspuren, die unter Verwendung des recovery-Protokoll (siehe eingelassene Abbildung) unter Kontrollbedingungen, unter der

Applikation des Medikaments und unter Auswaschbedingungen aufgezeichnet wurden, sind in Abbildung 4.36 zu sehen. Es zeigt sich eine Abhängigkeit des Stroms zur Dauer der Erholung.

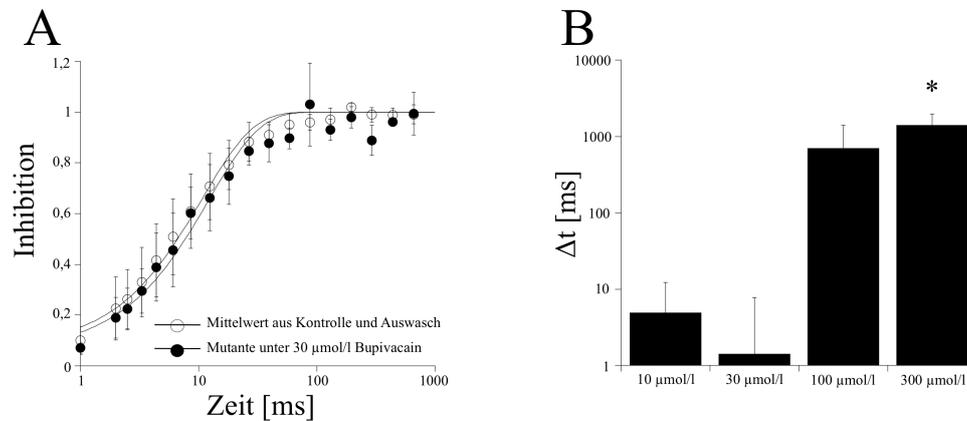


Abbildung 4.37: A. Strom-Zeit-Beziehung der recovery der SCN5A Mutante (n=6). Weiß als Mittelwert der Kontroll- und Auswaschmessung. Schwarz unter Applikation von 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain. B. Änderung der Zeitkonstante der recovery des SCN5A Wildtyps unter 10 (n=5), 30 (n=6), 100 (n=6) und 300 $\mu\text{mol/l}$ (n=6) Bupivacain. Dargestellt mit logarithmischer y-Achse.* signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Abbildung 4.37A zeigt eine normalisierte Strom-Zeit-Beziehung, die sich als Mittel aus allen Experimenten unter gleichen Bedingungen mit ihren Vergleichsmessungen ergibt. Sie wird durch eine monoexponentielle Funktion dargestellt. Die daraus resultierenden Änderungen der Zeitkonstanten (τ_{rec}) zeigt das Säulendiagramm 4.37B mit einer logarithmischen y-Achse. Bupivacain beeinflusst den Mittelpunkt der recovery des Mutanten bis auf die Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ (p=0,005) nicht signifikant. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt eine signifikante Entwicklung der Werte in Abhängigkeit zur Konzentration (p<0,001). Die Tabelle 4.17 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

	Kontrolle / Auswasch	10 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	16,1 \pm 10,7 ms	21,0 \pm 16,9 ms	0,210
n	5		

	Kontrolle / Auswasch	30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	10,8 \pm 4,7 ms	12,2 \pm 4,9 ms	0,608
n	6		

	Kontrolle / Auswasch	100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	25,3 \pm 10,2 ms	724,6 \pm 690,5 ms	0,088
n	5		

	Kontrolle / Auswasch	300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain	p-Wert
τ_{rec}	16,8 \pm 4,6 ms	1408,6 \pm 562,2 ms	0,005
n	5		

Tabelle 4.17: Einfluss verschiedener Bupivacain-Konzentrationen auf die Erholung der SCN5A Mutante. τ_{rec} entspricht der Zeitkonstante der Erholung.

4.6 Vergleich der Wirkung von Bupivacain auf SCN5A Wiltyp und Mutante

Für einen direkten Vergleich jeweils korrespondierender Ergebnisse werden im folgenden Kapitel bereits bekannte Daten aus den voran gegangenen Kapiteln 4.1 und 4.5 noch einmal vergleichend dargestellt.

4.6.1 Vergleich der Beeinflussung der Aktivierung

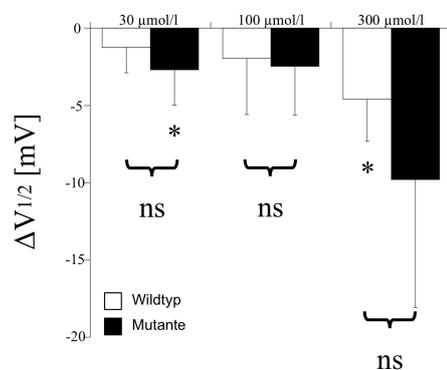


Abbildung 4.38: Gezeigt ist die Veränderung der Aktivierungshalbmultiplexima des Wildtypen (weiß, $n=6-9$) und der Mutante (schwarz, $n=5-9$) unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain im Vergleich. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: ns keine Signifikanz.

Abbildung 4.38 zeigt die Differenz der Aktivierungsmittelpunkte zwischen Einwasch und Kontrollbedingungen des Wildtypen und der Mutante unter dem Einfluss von Bupivacain im direkten Vergleich. Die Änderung der Aktivierung des

SCN5A Wiltyp-Kanals durch den Einfluss von Bupivacain ist bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ signifikant, bei der Wirkung auf die Mutante zeigt sich eine signifikante Beeinflussung bei der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$. Die beiden Medikamente unterscheiden sich zu keiner Konzentration signifikant in der Höhe des Shifts ($p > 0,05$).

4.6.2 Vergleich der Beeinflussung der Inaktivierung

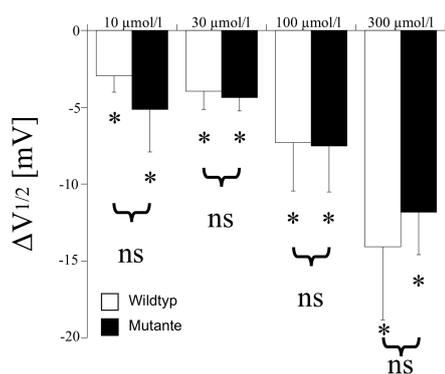


Abbildung 4.39: Gezeigt ist die Veränderung der Inaktivierungshalbmaxima des Wildtypen (weiß, $n=5-8$) und der Mutante (schwarz, $n=5-7$) unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain im Vergleich. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: ns keine Signifikanz.

In dem Säulendiagramm 4.39 werden die Änderungen der Inaktivierungshalbmaxima von Wildtyp und Mutante unter dem Einfluss von Bupivacain vergleichend dargestellt. Wie erwähnt, induziert Bupivacain bei Wildtyp und Mutante eine Änderung des Inaktivierungsmittelpunkts. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ist zu keinem Zeitpunkt signifikant ($p > 0,05$).

4.6.3 Vergleich der Beeinflussung der recovery

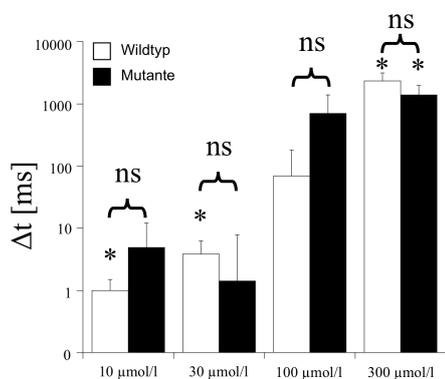


Abbildung 4.40: Gezeigt ist die Veränderung der Halbmaxima der recovery des Wildtypen (weiß, $n=5-6$) und der Mutante (schwarz, $n=5-6$) unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Bupivacain im Vergleich. * signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollmessung. An der Klammer das Ergebnis des Vergleichs untereinander: ns keine Signifikanz.

In dem Säulendiagramm 4.40 werden die Änderungen der Halbmaxima der recovery von Wildtyp und Mutante unter dem Einfluss von Bupivacain vergleichend dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante konnte bei keiner Konzentration gefunden werden ($p > 0,05$).

4.6.4 Vergleich der Inhibition

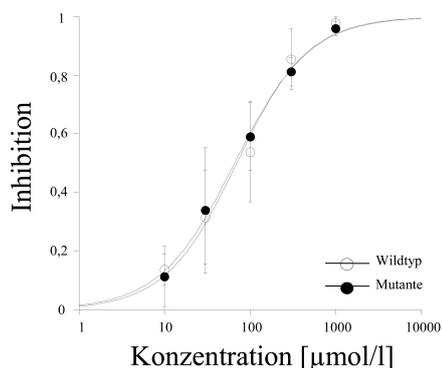


Abbildung 4.41: Konzentrations-Wirkungskurve von Bupivacain auf den SCN5A Wildtypen und die Mutante.

Aus den Stromspuren in Abbildung 4.1 und 4.31 ist zu erkennen, dass Bupivacain den Stromfluß durch die Kanäle reversibel hemmt. Der Vergleich des Mittels aus maximalen Stromflusses von Kontroll- und Auswaschmessung mit dem maximalen Stromfluss des Einwasches, ergibt für jede Konzentration eine Inhibition. In Abbildung 4.41 ist die Abhängigkeit der Inhibition des Wildtypen und der Mutante von der Bupivacain-Konzentration mit einer Hill-Funktion (siehe Gleichung 3.7) dargestellt. Der IC_{50} -Wert für den SCN5A Wildtypen beträgt $69,5 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$ und für den Mutant $65,7 \pm 4,0 \mu\text{mol/l}$. Es konnte bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied der Inhibition zwischen Wildtyp und Mutante durch Bupivacain nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.18). Die Hill-Koeffizienten sind für beide Funktionen eins.

Konzentration	Inhibition Wildtyp	Inhibition Mutante	p-Wert
10 $\mu\text{mol/l}$	$0,14 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,10$	0,617
30 $\mu\text{mol/l}$	$0,31 \pm 0,16$	$0,34 \pm 0,21$	0,789
100 $\mu\text{mol/l}$	$0,54 \pm 0,17$	$0,59 \pm 0,21$	0,498
300 $\mu\text{mol/l}$	$0,86 \pm 0,09$	$0,81 \pm 0,05$	0,354
1000 $\mu\text{mol/l}$	$0,98 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$	0,146

Tabelle 4.18: Die Inhibition von Bupivacain auf SCN5A Wildtyp und Mutant erhoben aus den Daten der Aktivierung im Vergleich.

5 Diskussion

5.1 Der humane Na⁺-Ionen-Kanal SCN5A

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind in Herzzellen für den schnellen Natrium-einwärtsstrom verantwortlich. Dies entspricht der Depolarisation zu Beginn des Herz-Aktionspotentials.

Unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik in der Outside-Out-Konfiguration wurden das Aktivierungs-, das Inaktivierungs- und das recovery-Verhalten dieses Kanals untersucht. Es zeigte sich die erwartete Abhängigkeit des Stromes durch den Kanal vom Membranpotential mit sigmoidalem Verlauf in der $g(U)$ - bzw. $I(U)$ -Darstellung. Der Vergleich der erhobenen Werte für die halbmaximale Aktivierung, bzw. Inaktivierung, mit den jeweiligen Steigungsfaktoren, ist in der Tabelle 5.1 im Vergleich zu Literaturdaten gezeigt. Es sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die von Nau et al. (Nau *et al.*, 2000) publizierten Daten stimmen mit den hier gewonnen Ergebnissen hingegen gut überein.

	Daten dieser Arbeit	(Nagatomo <i>et al.</i> , 1998)	(Makita <i>et al.</i> , 2000)	(Nau <i>et al.</i> , 2000)
Aktivierung				
$V_{1/2}$ in mV	$-56,0 \pm 4,2$	$43,9 \pm 1$	$-40,6 \pm 1,2$	$-52,0 \pm 2,5$
Steigungsfaktor	$8,2 \pm 3,4$	$7,6 \pm 0,64$	$-8,9 \pm 1,2$	$8,3 \pm 0,4$
n	4	8	9	5
Inaktivierung				
$V_{1/2}$ in mV	$-96,4 \pm 4,1$	$-90,5 \pm 1,1$	$-69,2 \pm 0,8$	$-100,1 \pm 2,2$
Steigungsfaktor	$-5,4 \pm 0,8$	$5,7 \pm 0,11$	$4,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,1$
n	5	8	20	6
recovery				
τ_{rec} in ms	$13,0 \pm 3,4$			59 ± 12
n	5			5

Tabelle 5.1: Vergleich der eigenen Ergebnisse von Aktivierungs- und Inaktivierungsmittelpunkten ($V_{1/2}$) sowie recovery-Zeiten (τ_{rec}) mit Literaturdaten. Unterschiedliche Vorzeichen der Steigungsfaktoren ergeben sich aus der Darstellung.

Es gibt mehrere Ansätze diese Differenzen zu erklären:

- (1) Unterschiedliche Umgebungstemperatur: Nagatomo et al. (Nagatomo *et al.*, 1998) geben eine Verschiebung um ca. +4 mV des Aktivierungsmittelpunkts und

um ca. +5 mV des Inaktivierungsmittelpunkts für die Steigerung der Experimentaltemperatur um 10 °C an. Da die in der Tabelle 5.1 angegebenen Daten alle bei Raumtemperatur ermittelt wurden, lassen sich hierdurch lediglich minimale Unterschiede erklären.

(2) Unterschiedlicher Expressionssysteme: So haben Makita et al. (Makita *et al.*, 2000) zum Beispiel *Xenopus* Oocyten verwendet. Es kann durch unterschiedliche Proteinausstattung an akzessorischen und regulatorischen Proteinen zu Variationen in den Messergebnissen kommen.

(3) Unterschiedliches Milieu: Zu einer geringen Beeinflussung kommt es durch Differenzen in verwendeten intra- und extrazellulären Lösungen.

(4) Unterschiedliche Messkonfiguration: Es ist anzunehmen, dass unterschiedliche Messkonfigurationen den größten Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse nehmen. Es wird ein hyperpolarisierender Shift bei Messung in der Outside-Out-Konfiguration im Vergleich zu der Whole-Cell-Konfiguration für K^+ -Ionen-Kanäle vorbeschrieben. Dieser soll nach Friederich (Friederich *et al.*, 2003) bei etwa 14 mV liegen. Da die Daten von Nau et al. in der Whole-Cell-Konfiguration mit den eigenen Daten in der Outside-Out-Konfiguration gut übereinstimmen, wird in dieser Arbeit ein anderes Model zur Erklärung dieses hyperpolarisierenden Shiftes entwickelt:

Die Daten, die sich aus den Outside-Out konfigurierten Messungen ergeben, sind zeitabhängig. Wie durch die eigenen Daten gezeigt wird, findet eine Veränderung, sowohl der Aktivierungshalbmaxima der Mutante, als auch der Inaktivierungshalbmaxima von Mutante und Wildtyp in Abhängigkeit von der Zeit statt. Bei der Outside-Out-Konfiguration wird lediglich ein kleines Stück der Zellmembran zur Messung benutzt. So kann das Fehlen einer intakten Zelle zur Erklärung dienen. Die Struktur der Membranproteine und damit deren Funktion kann in diesem „Patch“ nicht aufrechterhalten werden. Es ist also von Bedeutung einen standardisierten Ablauf einzuhalten, um den Einfluss durch artifizielle Faktoren gering zu halten. Erst hierdurch ist es möglich in einem artifiziellen System repetitiv standardisierte Messbedingungen zu erzeugen, wodurch Messreihen mit hoher Präzision durchgeführt werden können und vergleichbare Ergebnisse liefern. Detaillierte Beschreibungen über den genauen zeitlichen Ablauf der experimentellen Einzelschritte lassen sich aus den in Tabelle 5.1 zitierten Studien nicht finden. Es kann also angenommen werden, dass Varianzen im experimentellen Ablauf zu Messungenauigkeiten führen, welche Diskrepanzen in den Ergebnissen zu den eigenen Daten erklären könnte.

Die deutliche Differenz der Zeit der recovery (siehe Tabelle 5.1) lässt sich durch diese Theorie allerdings nicht erklären. Für die recovery konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit keine Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnte sein, dass es aufgrund der Outside-Out-Konfiguration zu dem Wegfall eines regulatorischen Proteins und somit zu einer schnelleren Erholung kommt,

als in der Whole-Cell-Konfiguration. Eine andere Erklärung könnte die Verwendung unterschiedlicher Protokolle zum Gewinn dieser Daten sein. Das von Nau et al. benutzte Protokoll hält den Kanal länger im inaktivierten Zustand.

5.2 Wirkung von Bupivacain auf den humanen Na⁺-Ionen-Kanal SCN5A

Beim Zusammentreffen eines Lokalanästhetikum-Moleküls mit einem spannungsgesteuerten Natriumkanal, kann es zu einer reversiblen Bindung zwischen beiden Molekülen kommen. Potentielle Bindungsstellen für Wirkstoffe wurden, wie bereits in der Einleitung erwähnt, in bestimmten Transmembransegmenten des Kanals identifiziert. Es wird angenommen, dass es dort zu Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren und dem positiv geladenen Teil des Lokalanästhetikums kommt (Catterall, 2000; Ragsdale *et al.*, 1996). Andere Untersuchungen gehen davon aus, dass im Ruhezustand des Kanals hydrophobe Wechselwirkungen bei der Bindung des Medikaments überwiegen, während beim inaktivierten Kanal hauptsächlich Wechselwirkungen zwischen π -Elektronen und Kationen bestehen (Li *et al.*, 1999).

Wie in den exemplarisch gezeigten Stromspuren zu erkennen ist, kommt es durch den Einfluss des rasch wirkenden Lokalanästhetikums Bupivacain zu einer reversiblen, konzentrationsabhängigen Verringerung der Leitfähigkeit des Kanals im Ruhezustand. Die Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC_{50}) des Kanals im Ruhezustand beträgt $69,5 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$. Der Hill-Faktor ist in diesem Fall annähernd 1. Somit scheint weder eine positive noch eine negative Kooperativität vorzuliegen.

Werte aus der Literatur für die mittlere Inhibition liegen für Bupivacain auf den SCN5A-Kanal für das R(+)-Enantiomer bei $63,8 \pm 5,5 \mu\text{mol/l}$ und für das S(-)-Enantiomer bei $76,4 \pm 7,9 \mu\text{mol/l}$ (Nau *et al.*, 2000), im Mittel also einer Konzentration von ungefähr $70 \mu\text{mol/l}$ und unterstützen damit die Daten dieser Arbeit.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen Bupivacains auf das Aktivierungs-, das Inaktivierungs- und das recovery-Verhalten des Kanals untersucht. Da der Stromfluss für höhere Konzentrationen des Medikamentes stark abnimmt und die Messungen so zunehmend ungenau werden, sind die Ergebnisse bei diesen Konzentrationen kritisch zu betrachten. Für geringere Konzentrationen konnte aber gezeigt werden, dass Bupivacain zu keiner signifikanten Veränderung des Aktivierungsmittelpunktes führt. Es findet bei steigender Bupivacainkonzentration jedoch eine Veränderung der Inaktivierung statt. Dabei wird das Potential halbmaximaler Leitfähigkeit zu negativeren Werten verschoben. Für das recovery-Verhalten zeigt sich ebenfalls eine signifikante Beeinflussung. Die Zeit bis zur

kompletten Erholung nimmt in Abhängigkeit zur Konzentration zu.

Die Wirkung von Lokalanästhetika auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle ist im offenen sowie im inaktivierten Zustand des Kanals erheblich stärker ausgeprägt als im Ruhezustand. Die Empfindlichkeit liegt ein bis zwei Zehnerpotenzen höher (Ragsdale *et al.*, 1996).

Nau *et al.* (Nau *et al.*, 2000) haben den Effekt der beiden Enantiomere von Bupivacain auf den inaktivierten Zustand des SCN5A untersucht. Sie geben die Zeitkonstanten bis zur Entwicklung des Blockes bei der Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ R(+)-Bupivacain mit $1,8 \pm 0,1$ s und für S(-)-Bupivacain mit $1,5 \pm 0,1$ s an. Dies entspricht im Mittel annähernd dem Wert für razemisches Bupivacain dieser Arbeit von $1,54 \pm 0,46$ s. Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Entwicklung des Blocks bei anderen Konzentrationen zeigen, dass die Zeitkonstanten abhängig sind von der Konzentration. Sie steigen bei abnehmenden Konzentrationen. Es ist aufgefallen, dass ein Effekt auf den inaktivierten Zustand des SCN5A bis hin zu einer Konzentration von nur 0,1 $\mu\text{mol/l}$ nachgewiesen werden konnte. Die Zeitkonstanten folgen einem monoexponentiellen Verlauf.

Wie beschrieben, wurde der residuelle Strom nach Entwicklung des Blockes im inaktivierten Zustand genutzt, um die Inhibition zu ermitteln. Der so ermittelte Wert setzt sich aus zwei Faktoren zusammen, den medikamentenbedingten und den medikamentenunabhängigen. Wie bereits diskutiert wurde, unterliegen die Experimente einem zeitabhängigen Geschehen. Da es sich in diesem Fall um ein Protokoll von langer Dauer handelt, ist davon auszugehen, dass dieser medikamentenunabhängige Effekt erheblichen Einfluss nimmt. Dies ist auch an den Kontrollmessungen in Abbildung 4.8 und 4.17 zu sehen. Sie unterliegen einem deutlichen „run down“. Die Stärke des Stroms nimmt mit zunehmender Dauer des Experimentes ab. Vom residuellen Strom mußte also noch ein Korrekturwert subtrahiert werden. Dieser Korrekturwert wurde wie in 3.4.2 beschrieben berechnet.

Vergleiche diesbezüglich mit den von Nau *et al.* (Nau *et al.*, 2000) publizierten Werten, zeigen einen Unterschied. Nau gibt für das R(+)-Enantiomer einen IC₅₀-Wert von $3,03 \pm 0,09$ und für das S(-)-Enantiomer von $4,45 \pm 0,14$ $\mu\text{mol/l}$ an, was im Mittel 3,74 $\mu\text{mol/l}$ ergibt, höher als der in dieser Studie ermittelte Wert von $2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/l}$. Nau *et al.* haben für die Entwicklung des maximalen Blocks in ihrem Protokoll für den inaktivierenden Präpuls eine Länge von 10 s angenommen. Für Konzentration unter 10 $\mu\text{mol/l}$ ist diese Zeit nach den Ergebnissen dieser Arbeit unzureichend: Bei 3 $\mu\text{mol/l}$ ergibt sich bereits eine Zeitkonstante der Entwicklung des Blocks von 4,6 s. Um eine komplette Bindung zu gewährleisten (man geht von dem fünffachen Wert aus) wären somit 23 s für den inaktivierenden Präpuls erforderlich. Nimmt man also an, dass nach 10 s Bindungszeit für die Experimente

von Nau bei den Konzentrationen für 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ zu geringe Inhibitionen erzielt wurden, könnte dies den Unterschied zu den Daten dieser Arbeit erklären. Der IC_{50} -Wert würde ohne diesen methodischen Unterschied geringer ausfallen. Ebenfalls wurden zeitabhängige Effekte außer acht gelassen.

Die Erholung des Kanals aus dem Block des inaktivierten Zustandes wurde durch das recovery-from-inactivated-block-Protokoll untersucht. Um eine komplette Bindung des Medikaments an den inaktivierten Kanal während der Messung zu garantieren, wurde die fünffache Zeitkonstante, die sich für die jeweilige Konzentration aus den Experimenten des development-of-inactivated-block-Protokolls ergab, als Zeit für den Inaktivierungspräpuls zugrunde gelegt. Nau et al. stellen ihre Ergebnisse mit einer biexponentiellen Funktion dar. Sie erhalten somit eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die langsame Zeitkonstante untersucht. Das Protokoll beginnt erst bei Messungen von einer Sekunde. Für diese Bedingungen geben Nau et al. unter dem Einfluss des R(+)-Enantiomers einen Wert von $2,1 \pm 0,1$ s und unter dem des S(-)-Enantiomer von $1,3 \pm 0,1$ s an. Dies ergibt im Mittel 1,7 s, wesentlich schneller, als der in dieser Studie ermittelte Wert mit $10 \pm 1,5$ s. Für eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ gibt Nau 3,07 bzw. 1,84 s an. Wie valide diese Ergebnisse bei der starken Inhibition sind, bleibt offen, genauso wie die Frage, ob sich ein signifikanter Unterschied zwischen den 10 $\mu\text{mol/l}$ und den 100 $\mu\text{mol/l}$ Daten ergibt. Für die Daten der vorliegenden Arbeit konnte keine Abhängigkeit der Erholung von der Konzentration nachgewiesen werden. Diese Tatsache legt die Hypothese einer einigen diskreten Bindungsstelle am Kanal nahe. Die Dissoziation ist konstant und somit nicht abhngig von mehreren Vorgngen, sonder nur von einem.

Es zeigt sich, wie erwartet, dass der inaktivierte Zustand wesentlich empfindlicher (Faktor 32) als der Ruhezustand ist. Es konnte ein Effekt bei einer geringen Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ nachgewiesen werden. Der Grund hierfür kann in der Konformationsänderung des Kanals liegen. Dadurch wird ein Bereich mit einer hohen Affinität für den Liganden erst zugänglich.

Des weiteren zeigt sich eine zu erwartende Abhängigkeit, sowohl der Inhibition als auch der Entwicklung des Blocks von der Konzentration. Die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens eines Medikamentenmoleküls auf die ungesättigten Kanäle ist erhöht. Wie schnell sich der Kanal aber wieder erholt, wenn er beim Ruhemembranpotential gehalten wird, ist unabhängig von der Konzentration.

5.3 Wirkung von Ropivacain auf den humanen Na⁺-Ionen-Kanal SCN5A und Vergleich mit der Wirkung von Bupivacain

In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss von Ropivacain auf die Eigenschaften des Na⁺-Kanals untersucht.

(1) Bei der Beeinflussung des Aktivierungsmittelpunkts konnte bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medikamenten festgestellt werden. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. Für Ropivacain ergibt sich eine konzentrationsabhängige Änderung des Aktivierungsmittelpunktes zur Hyperpolarisation, die für Bupivacain nicht nachgewiesen werden konnte. Diese wäre aber zu erwarten gewesen, wenn sich die Medikamente in ihrer Wirkung nicht unterscheiden. Es kommt hier die Frage nach der Genauigkeit der Messungen auf. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain fließt weniger als die Hälfte, bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain nur noch 15% des Stroms. Die aufgezeichneten Messwerte wurden durch diese hohe Inhibition ungenau, so dass keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Die graphische Auswertung der Ropivacain-Ergebnisse zeigt keine einheitliche Änderung unter zunehmender Konzentration. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ ist die Differenz kleiner als bei den angrenzenden Konzentrationen. Durch den geringeren inhibierenden Effekt bei diesen Konzentrationen - für 300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain verbleiben 56% des Stromes - sind die Messungen genauer und damit die Standardabweichungen geringer. So konnte hier mit der einfaktoriellen Varianzanalyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen Höhe der Konzentration und dem Shift nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung der Medikamente auf die Aktivierung nachweisen läßt, kann ebenfalls an der hohen Standardabweichung durch ungenaue Messungen liegen. Dies erlaubt aber auch die Annahme, dass der Einfluss durch beide Medikamente gleich ist. Dies heißt, dass der strukturelle Unterschied der Moleküle keinen Einfluss auf die Stärke der Aktivierungsbeeinflussung nimmt.

(2) Die Untersuchungen konnten eindeutig zeigen, dass der Inaktivierungsmittelpunkt durch beide Medikamente signifikant beeinflusst wird. Betrachtet man die Wirkung gleicher Konzentrationen, so ist die Beeinflussung durch Bupivacain höher. Bei der Betrachtung equipotenter Konzentrationen liegt die Beeinflussung durch Bupivacain sogar um ein 10-faches höher. Dies bedeutet, dass man von Ropivacain wesentlich höhere Dosen applizieren kann, höher als erforderlich, um dieselbe Wirkung wie von Bupivacain zu erreichen, bevor die gleiche Nebenwirkung eintritt.

Betrachtet man das Säulendiagramm (4.22), so liegt die Theorie nahe, dass sich entweder für 100 $\mu\text{mol/l}$ oder 300 $\mu\text{mol/l}$ Ropivacain eine fehlerhafte Messung

ergeben hat. Da bei 300 $\mu\text{mol/l}$ eine höhere Inhibition des Stromflusses vorliegt und somit die Messung ungenauer wird, ist diese als fehlerhafte Messung wahrscheinlicher. Die Änderung des Inaktivierungsmittelpunkts ist hyperpolarisierend. Das bedeutet, dass unter dem Einfluss von Lokalanästhetika bei einem bestimmten Potential weniger Kanäle aktiviert werden können. Sie sind noch in einem geschlossenen, nicht aktivierbaren Zustand. Betrachtet man die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Medikamente, so kann man darauf schließen, dass der Unterschied in der Lipophilie hierfür verantwortlich ist. Daten die von Stephan Binder in der selben Arbeitsgruppe für Mepivacain erhoben wurden (Binder, 2006) unterstützen diese Hypothese. Das polarere Mepivacain mit lediglich einem Methylrest beeinflusst den Inaktivierungsmittelpunkt bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ um lediglich -3,8 mV und bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ um -9 mV.

(3) Aus den Stromspuren ist zu erkennen, dass die Medikamente den Kanal reversibel hemmen. Der Vergleich der Inhibition zeigt, dass der IC_{50} -Wert für Ropivacain um den Faktor 4,6 höher liegt. Das heißt, dass von Ropivacain höhere Dosen erforderlich sind, um den selben Effekt zu erreichen. Die unterschiedliche Hydrophilie wird hierfür verantwortlich gemacht. Die Daten über das strukturverwandte, hydrophilere Mepivacain aus der Arbeit von Stephan Binder (Binder, 2006) liefern einen IC_{50} -Wert von $1069 \pm 182 \mu\text{mol/l}$, welcher die Theorie stützt. Daten aus der Literatur, bei denen ebenfalls vergleichende Versuche mit Ropivacain und Bupivacain an biologischen Modellen durchgeführt wurden, zeigen, dass für Ropivacain der IC_{50} höher ist (siehe Tabelle 5.2). Die errechnete Ratio impliziert einen zwei- bis fünffach höherer IC_{50} -Wert. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich eine Ratio von 4,6, was den Erwartungen entspricht.

Haltepotential	Ropivacain IC_{50}	Bupivacain IC_{50}	Ratio
TTX-S			
-120 mV	$242,6 \pm 22,5$	$66 \pm 6^*$	3,68
-80 mV	$115,5 \pm 34,8$	$26,3 \pm 6,2$	4,39
TTX-R			
ca. -105 mV	$64,2 \pm 16,5$	$31,7 \pm 5,2^+$	2,03
-80 mV	$53,6 \pm 14,4$	$27,6 \pm 3,3$	1,94
eigene Daten			
-140 mV	320 ± 30	$69,5 \pm 8,2$	4,6

Tabelle 5.2: Alle Werte erhoben an Hinterhornnervenzellen der Ratte, Ausnahme eigene Daten. Alle Daten von Oda et al. (Oda *et al.*, 2000), Ausnahme * von Bräu et al. (Bräu *et al.*, 2000) und + von Scholz et al. (Scholz & Vogel, 2000). Werte in $\mu\text{mol/l} \pm$ Standardabweichung. TTX-S = tetrodotoxin-sensibel, TTX-R = tetrodotoxin-resistent.

Des weiteren konnten Siebrands et al. für HERG-Kanäle zeigen, dass die inhibitorische Potenz von Amino-Amid-Lokalanästhetika mit der Lipophilie korreliert

(Siebrands *et al.*, 2005). Mit zunehmender Anzahl der Kohlenstoffatome in der substituierten Seitenkette nimmt die Lipophilie von Lokalanästetika zu. Die Strukturformel von Bupivacain weist vier, die von Ropivacain nur drei Kohlenstoffatome in der Seitenkette auf. Aufgrund dieses Unterschieds in der molekularen Struktur erklärt sich der Unterschied in den ermittelten IC₅₀ Konzentrationen. Betrachtet man die IC₅₀-Konzentration in Abhängigkeit der Kettenlänge des Substituenten in einem Graphen, so zeigt sich unter Hinzunahme der Daten von Stephan Binder über Mepivacain (ein Kohlenstoffatom als Substituent) (Binder, 2006) ein monoexponentieller Zusammenhang. Es lässt sich so eine Voraussage der inhibitorischen Potenz für Medikamente mit anderen Substituenten ableiten (siehe Abbildung 5.1).

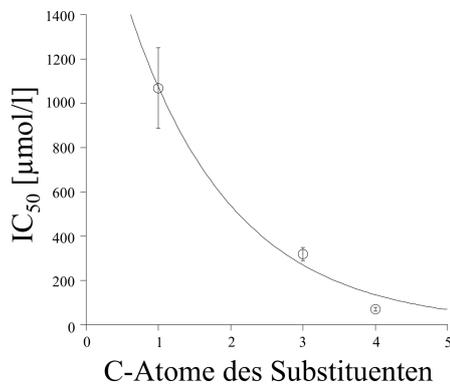


Abbildung 5.1: Durch die monoexponentielle Darstellung wird die Abhängigkeit der Kettenlänge des Substituenten zur IC₅₀-Konzentration verdeutlicht.

(4) Vergleicht man die Untersuchungen zur Entwicklung des Blocks des inaktivierten Zustandes, zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitkonstanten für gleiche Konzentrationen von Bupivacain und Ropivacain gibt. Es ist also davon auszugehen, dass die Lipophilie des Medikaments keinen Einfluss auf die Entwicklung des Blockes im inaktivierten Zustandes hat. Eher scheint der Block abhängig von Form und/oder Größe des Medikaments zu sein. Interessant wären hier Experimente mit dem ebenfalls strukturverwandten Mepivacain.

(5) Im Gegensatz zu der Entwicklung des Blocks des inaktivierten Zustands zeigte sich, dass die Erholung nicht konzentrationsabhängig, sondern medikamentenabhängig ist. Bupivacain löst sich langsamer vom inaktivierten Kanal, die Lipophilie scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden, unter Inkaufnahme eines sehr langen Protokolls und damit größeren Nebenwirkungen, gepaarte Versuche durchgeführt. Um die Fehler trotzdem möglichst gering zu halten, wurde die Reihenfolge der Medikamente variiert. Die Konzentrationsunabhängigkeit und der signifikante Unterschied bei 10 µmol/l zwischen Ropivacain und Bupivacain konnte bestätigt werden. Bei der Beherrschung der kardialen Nebenwirkung kann die Dauer der Dissoziation vom Kanal von entscheidender Bedeutung sein. Dieses „slower-out“ könnte eine Erklärung für die erhöhte Rate an frustrierten Reanimationen nach Bupivacainintoxikation in der Arbeit von Groban (Groban *et al.*, 2001) liefern. Es konnten alle mit Lidocain und 90% der mit Ropivacain intoxikierten Hunde erfolgreich reanimiert werden, aber lediglich

50% der Bupivacain intoxikierten.

(6) Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des inaktivierten Zustandes von Ropivacain zeigt einen Unterschied zu der von Bupivacain. Die Tatsache, dass Bupivacain den inaktivierten Zustand stärker inhibiert und länger benötigt um abzu-diffundieren, führt auf der Basis der Überlegungen von Clarkson und Hondeghem (Clarkson & Hondeghem, 1985) zu dem in Abbildung 5.2 dargestellten Modell.

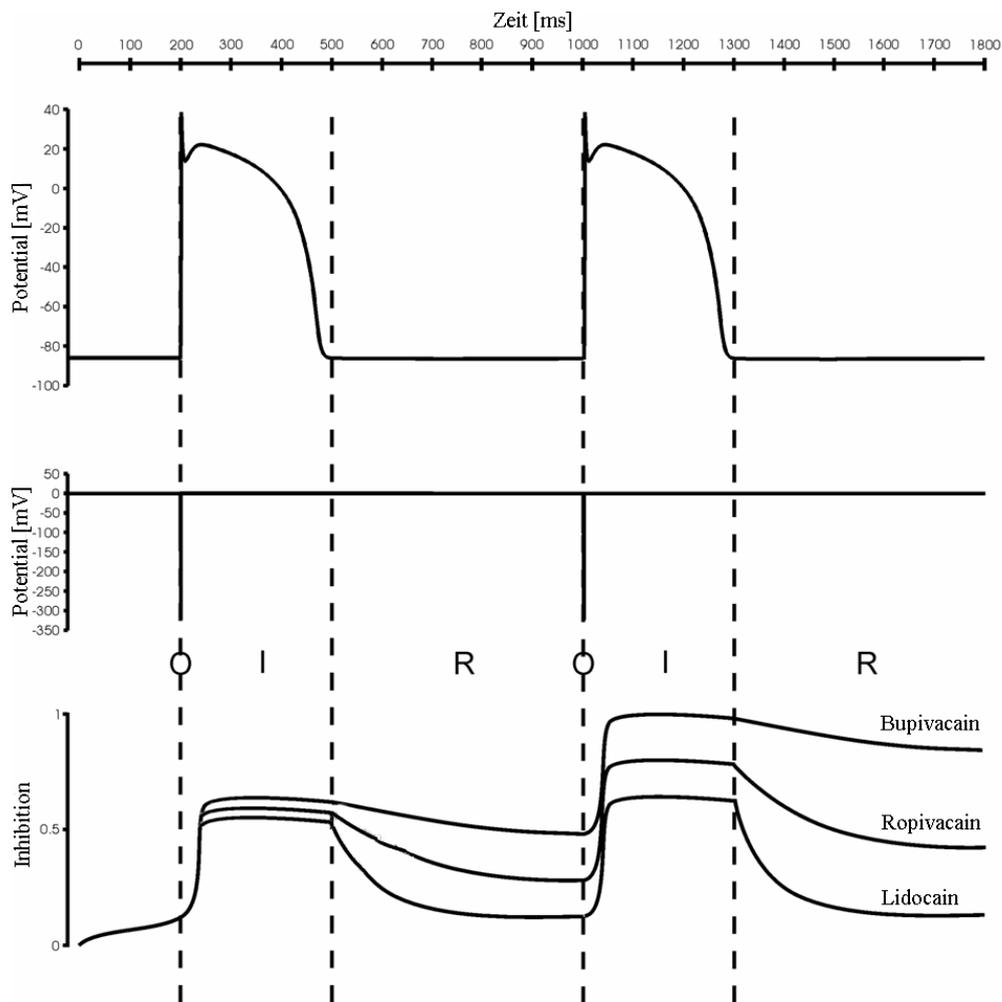


Abbildung 5.2: Modell zur klinischen Bedeutung der Unterschiede zwischen Bupi- und Ropivacain. Gezeigt ist das Herzaktionspotential (oben), der Anteil des Natriumionenkanals (Mitte) und der hypothetische Verlauf der Inhibition von Lokalanästhetika (unten). Die jeweiligen Zustände des Kanals sind mit den Buchstaben O für offen, I für inaktiviert, geschlossen und nicht aktivierbar und R für Ruhezustand, geschlossen aber aktivierbar gekennzeichnet.

Das Modell beschreibt die Tatsache, dass Lokalanästhetika schnell an den Kanal binden, sich aber nur langsam wieder lösen. Dies führt zu einer progredienten Inhibition, wenn die Zeit der Erholung sich durch höhere Frequenzen weiter verkürzt. Clarkson und Hondeghem haben in ihrer Arbeit die Wirkung von Bupivacain und Lidocain auf Myocyten des Meerschweinchens verglichen. Sie konnten zeigen, dass beide Medikamente schnell binden, aber Bupivacain sich langsamer wieder löst und so schon bei niedrigeren Herzfrequenzen eine höhere

Wirkung erzielt.

Bei beiden in dieser Arbeit untersuchten Faktoren - Inhibition des inaktivierten Zustandes und Erholung aus diesem Zustand - weist Bupivacain im Vergleich zu Ropivacain die schlechteren Eigenschaften auf. Dies wird in der Abbildung 5.2 in der unteren Zeile veranschaulicht. Die Inhibition des Kanals erfolgt für alle Medikamente gleich schnell in der Phase O, auf für die Medikamente unterschiedliche Inhibitionsniveaus in der Phase I. Die Zeit der Erholung in der Phase R reicht nicht aus, damit das Medikament den Kanal wieder vollständig verlassen kann. Hier unterscheiden sich die Medikamente wie beschrieben. Zur nächsten Phase der Aktivierung stehen jetzt weniger Kanäle zur Verfügung, somit verstärkt sich der Effekt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass selbst eine geringe Konzentration von nur 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain noch eine nachweisbare Wirkung erzielt, was bei zu hoher Herzfrequenz klinisch Relevant werden kann. Je höher die Frequenz ist, umso kürzer wird die Diastole und damit die entsprechende Phase R. Die genannten Effekte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit entscheidend für die kardialen Nebenwirkungen von Lokalanästhetika verantwortlich. Es konnte somit gezeigt werden, dass die zu erwartenden Nebenwirkungen von Ropivacain im Zusammenhang mit dem humanen Natriumionenkanal des Herzens geringer ausfallen könnten.

		Ropivacain [mg/l]	Bupivacain [mg/l]	Ropivacain [μmol/l]	Bupivacain [μmol/l]
Grenzwert für die Plasmakonzentration nach Herstellerangaben		k.A.	0,11-0,2	k.A.	0,38
i.v.- Infusion (Knudsen <i>et al.</i> , 1997)	Symptom- beginn	0,35	0,1	1,28	0,35
	nach maxi- maler Do- sis	0,56	0,3	2,02	1,04
maximale Spiegel bei Gabe via PDK (Gottschalk <i>et al.</i> , 2003)		0,06	0,006	0,22	0,02
interskalenäre Plexus- blockade, Dosis: je 200 mg (Borgeat <i>et al.</i> , 2004)		0,103	0,084	0,38	0,29
cervikale Plexus- blockade, Dosis: 225 mg Ropivacain; 150 mg Bupivacain (Junca <i>et al.</i> , 2001)		0,255	0,151	0,93	0,52
minimal verwendete Konzentration in dieser Arbeit		0,274	0,029	1	0,1

Tabelle 5.3: Plasmakonzentrationen von Bupivacain und Ropivacain in unterschiedlichen Studien am Menschen. Die Daten wurde umgerechnet auf mg/l. Es handelt sich bei allen Literaturwerten um die ungebundene Konzentration im Blut, ggf. erfolgte eine Umrechnung. Für Ropivacain wurde eine Proteinbindung von 94% angenommen, für Bupivacain von 95%.

Für die Einschätzung inwiefern die gewonnen in-vitro Daten im klinischen Alltag relevant sind wurden die verwendeten Lokalanästhetikakonzentrationen mit zuvor publizierten Plasmaspiegeln von Bupivacain und Ropivacain verglichen (siehe Tabelle 5.3). Es handelt sich in allen Fällen um Studien an Menschen. Die Umrechnung der Werte erfolgte auf mg/l bzw. μmol/l. Es ist zu erkennen, dass die von Knudsen (Knudsen *et al.*, 1997) gemessenen Werte, bei denen die ersten neurologischen Symptome auftreten, deutlich über den in dieser Arbeit

gemessenen Werten liegen. Es scheint also schon früh zu kardialen Symptomen zu kommen, was Knudsen in seiner Studie bereits feststellte. Bei seinen Patienten kam es in einem frühen Stadium zu QRS-Veränderungen im EKG.

Der Plasmaspiegel der beiden Medikamente während der kontinuierlichen Gabe über einen Peridualekatheter wurde von Gottschalk (Gottschalk *et al.*, 2003) untersucht. Der maximal erreichte Spiegel liegt unter der minimal wirksamen Konzentration der vorliegenden Arbeit. Für beide Medikamente ergibt sich der selbe Sicherheitsrahmen. Die Ratio von wirksamer Minimalkonzentration zum Plasmaspiegel bei PDK-Applikation ist für beide Medikamente gleich 5.

Bei den wesentlich gefäßnäheren Verfahren der cervikalen und interskalären Plexusblockade kommt es zu höheren Spiegeln im Plasma (Borgeat *et al.*, 2004; Junca *et al.*, 2001). Für Bupivacain liegen diese Konzentrationen das 10-fache über der Konzentration von 0,029 mg/l (0,1 $\mu\text{mol/l}$), für die in dieser Arbeit noch ein Effekt nachgewiesen werden konnte. Die entsprechende Konzentration für Ropivacain bleibt unter diesem Wert, obwohl in der Studie von Junca (Junca *et al.*, 2001) eine höhere Dosis Ropivacain erforderlich war, um den gleichen Effekt wie bei Bupivacain zu erreichen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Plexusblockaden mit Bupivacain Plasmaspiegel erreicht werden, welche in dieser Arbeit zu einem nachweisbaren Effekt auf den kardialen Na^+ -Kanal führen. Obwohl die Plasmakonzentration von Ropivacain nach Plexusblockaden höher ist, bleibt diese unterhalb der Grenze eines nachweisbaren Effekts dieser Arbeit.

5.4 Der mutierte Na^+ -Ionen-Kanal

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit Experimenten zur Medikamentenwirkung auf Na^+ -Kanäle, die eine Mutation aufweisen. Die Unterschiede zum Wildtyp-Kanal werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

(1) Der Vergleich der Werte der halbmaximalen Aktivierung, die sich aus den Untersuchungen für die Mutante und den Wildtyp ergeben, zeigt für alle Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied. Der Aktivierungsmittelpunkt wird durch die Mutation um 22,1 mV in Richtung Depolarisation verschoben. Die Konsequenz dieser Tatsache zeigt Abbildung 5.3. Bei einer Depolarisation zur Aktivierung der Kanäle, in dieser Abbildung um 100 mV vom Haltepotential von -140 mV auf -40 mV, können weniger Kanäle geöffnet werden. Es lassen sich 87% der Wildtyp-Kanäle aktivieren, liegt die Mutation vor, hingegen nur noch 40%. Hinzu kommt, dass durch die Experimente zur Zeitabhängigkeit gezeigt werden konnte, dass die Mutation eine zeitabhängige Änderung des Aktivierungsmittelpunktes induziert. Für den Wildtyp konnte eine solche Änderung nicht nachgewiesen werden.

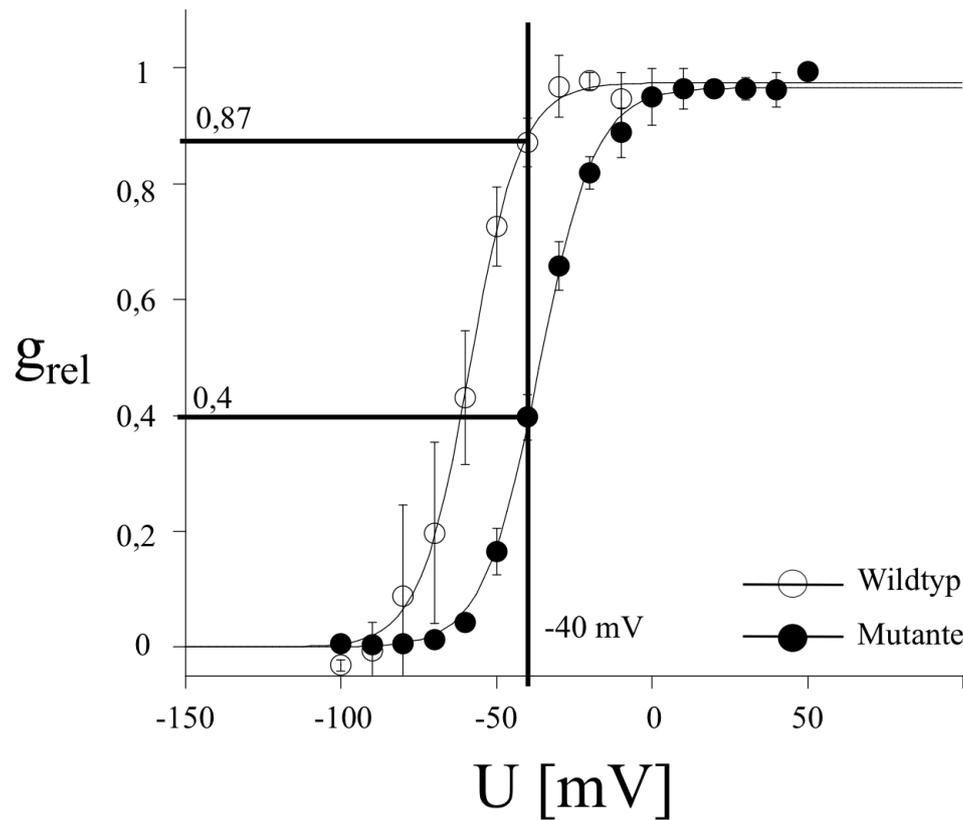


Abbildung 5.3: Gezeigt ist die unterschiedliche Aktivierung von SCN5A Mutante und Wildtyp. Bei einem Aktivierungspuls von 100 mV auf -40 mV sind 87% der Wildtypkanäle und nur 40% der mutierten Kanäle aktiviert.

(2) Für den Inaktivierungsmittelpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zu den Zeitpunkten $t=1$ und $t=5$ nachgewiesen werden. Nimmt man die Werte zu allen Zeitpunkten zusammen und vergleicht diese, so ergibt sich eine eindeutige Signifikanz ($p=0,0009$). Der Inaktivierungsmittelpunkt verschiebt sich um $5,9$ mV zu einem negativeren Potential. Die klinische Relevanz veranschaulicht Abbildung 5.4. Bei einem Ruhemembranpotential von -105 mV wären 62% der Wildtyp-Kanäle aktivierbar, beim mutierten Kanal hingegen 42%. Die verbleibenden Kanäle lägen in einem geschlossenen, inaktivierbaren Zustand vor.

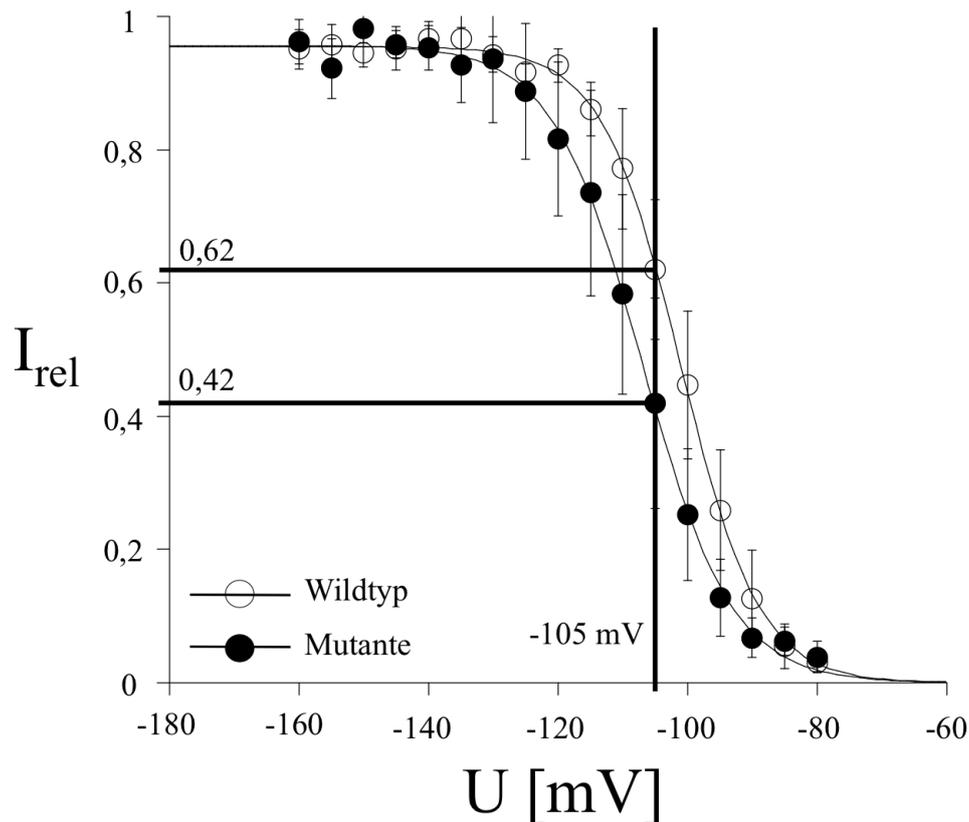


Abbildung 5.4: Gezeigt ist die unterschiedliche Inaktivierung von SCN5A Mutante und Wildtyp. Bei einem Potential von -105mV verbleiben 62% aller Kanäle des Wildtyps und 42% aller Kanäle der Mutante aktivierbar.

(3) Das *recovery*-Verhalten wird durch die Mutation nicht beeinflusst.

5.5 Wirkung von Bupivacain auf den mutierten Na^+ -Ionen-Kanal und Vergleich mit der Wirkung auf den Wildtypen.

(1) Der Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp zeigt bei keiner Bupivacainkonzentration einen signifikanten Unterschied in der Wirkung. Die Werte für die mittlere Inhibition auf den Kanal im Ruhezustand (IC_{50}) liegen für den Wildtypen bei $69,5 \pm 8,2$ und für die Mutante bei $65,7 \pm 4 \mu\text{mol/l}$. In mehreren Untersuchungen konnten bestimmte Regionen des Proteins als Rezeptor für das Lokalanästhetikum detektiert werden (Nau *et al.*, 2000; Starmer *et al.*, 1984). Die Mutation dieses Kanals liegt nicht im Bereich des Rezeptors. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Mutation ohne direkten Einfluß auf die inhibitorische Potenz von Bupivacain bleibt.

(2) Es ist davon auszugehen, dass Bupivacain die Eigenschaften des Kanals beeinflusst. Wie gezeigt, verändert es den Inaktivierungsmittelpunkt bei allen Kon-

zentrationen. Auf eine Beeinflussung des Aktivierungsmittelpunkts kann aus diesen Daten nicht geschlossen werden. Bei der Mutante stehen, wie bereits im vorangehenden Abschnitt diskutiert, weniger Kanäle bei einem bestimmten Potential zur Verfügung. Jetzt kommt ein weiterer Effekt hinzu: Durch den Einfluss des Medikaments kommt es nicht nur zu einer Inhibition der Kanäle, sondern auch zu einer Beeinflussung des Inaktivierungsmittelpunkts, was die Anzahl der aktivierbaren Kanälen weiter reduziert.

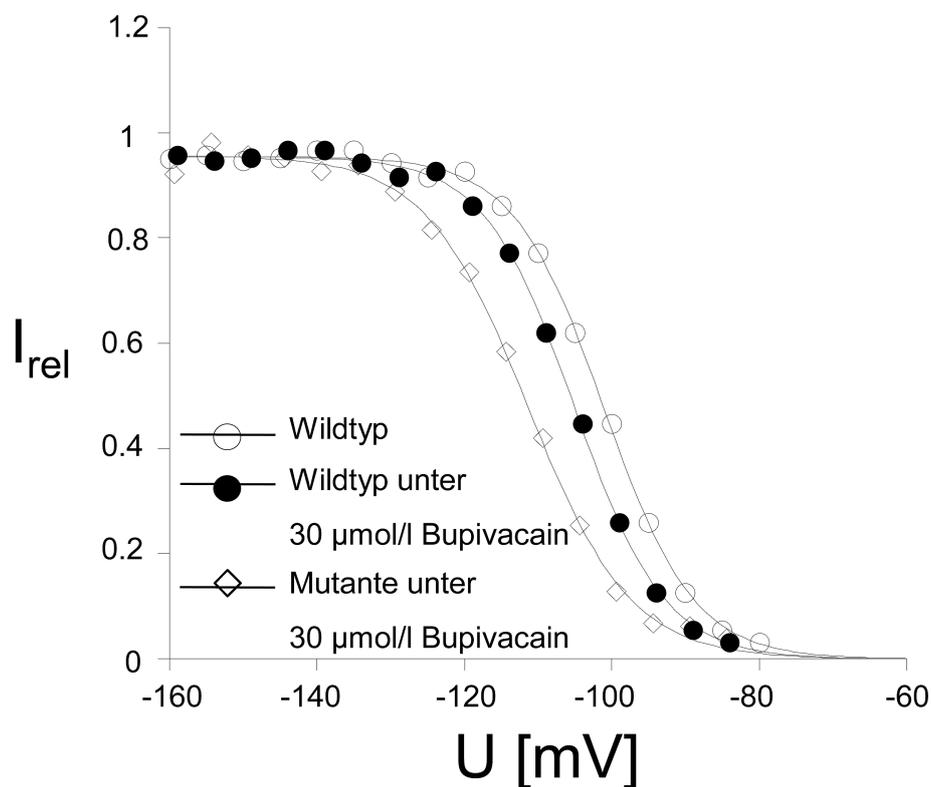


Abbildung 5.5: Gezeigt ist die errechnete Darstellung der Inaktivierungsverschiebung durch die Beeinflussung von Medikament und Mutation.

Abbildung 5.5 zeigt berechnete Strom-Spannungs-Beziehungen. Von der Ausgangskurve, die zur Charakterisierung des Inaktivierungsverhaltens des Wildtypen dient, wurde der Mittelwert des Shiftes subtrahiert, der durch 30 $\mu\text{mol/l}$ Bupivacain hervorgerufen wird. In einem weiteren Schritt wurde die Differenz der Inaktivierungshalbmaxima von Wildtyp und Mutante subtrahiert und ebenfalls als Funktion dargestellt.

Aus der Abbildung ist somit ersichtlich, dass die Gabe eines Lokalanästhetikums einen Teil des Effekts simuliert, der durch diese Mutation hervorgerufen wird, die in ihrem Gesamtbild eine schwere kardiale Funktionsstörung zur Folge hat. Ferner kann die Gabe dieses Medikamentes bei vorbestehender, vielleicht unerkannter Mutation, diesen Effekt dramatisch verstärken.

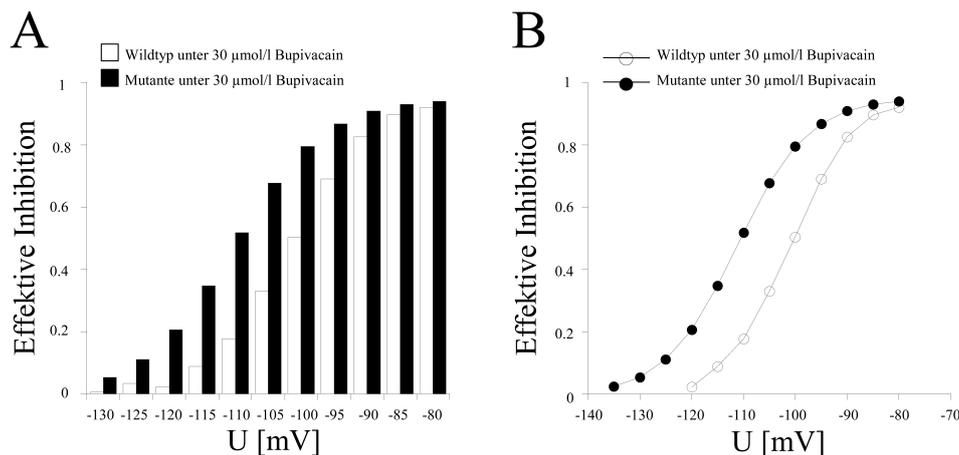


Abbildung 5.6: A. Vergleich der potentiell zur Verfügung stehenden Kanäle bei einem bestimmten Potential für Wildtyp und Mutante unter dem Einfluss von 30 μmol/l Bupivacain liefert die hier gezeigte effektive Inhibition. B. Die effektive Inhibition folgt einer Boltzmann-Funktion.

Vergleicht man nun den normalisierten Strom von Wildtyp und Mutante unter 30 μmol/l, der zu bestimmten Potentialen noch evoziert werden kann und subtrahiert diesen von 1, so erhält man die effektive Inhibition. Somit ergibt sich ein Maß für den Anteil an Kanälen, der noch zur Aktivierung zur Verfügung steht. Die Abbildung 5.6A zeigt diese effektive Inhibition der Ströme des Wildtypen im Vergleich mit der Mutante, unter dem Einfluss von 30 μmol/l Bupivacain. Die effektive Inhibition, dargestellt in Abhängigkeit zum Aktivierungspotential, folgt, wie in Abbildung 5.6B gezeigt, einer Boltzmann-Funktion.

Setzt man die Werte für diese effektive Inhibition zu gleichen Potentialen von Wildtyp und Mutante ins Verhältnis, ergibt sich die Ratio der effektiven Inhibition, gezeigt in Abbildung 5.7.

Bei dem annähernd halbmaximalen Potential von -105 mV wirkt Bupivacain in der Konzentration von 30 μmol/l auf die Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, doppelt so stark. Vergessen werden darf bei dieser Betrachtung nicht, dass ein Drittel der Kanäle zusätzlich noch durch die Wirkung der 30 μmol/l Bupivacain inhibiert werden.

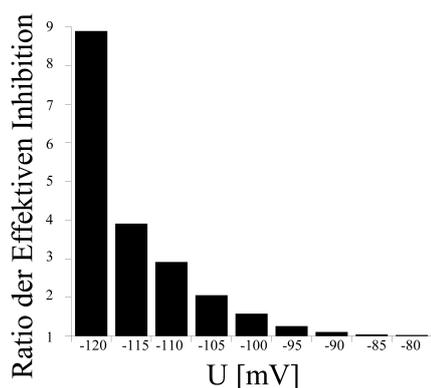


Abbildung 5.7: Gezeigt ist die Ratio der effektiven Inhibition von 30 μmol/l Bupivacain auf Wildtyp und Mutante bei verschiedenen Potentialen.

Somit ist durch die kombinierte Wirkung von Mutation und Medikation auf den Inaktivierungsmittelpunkt, der Strom, bzw. die Anzahl der aktivierbaren Kanäle, um die Hälfte reduziert.

5.6 Limitationen der Studie

Grundlage der Studie sind Experimente am Zellmodell. Untersucht wurde ein Teil des komplexen Ionen-Stroms der humanen Herzerregung. Die Versuchsanordnung lässt Aussagen über die Ströme in isolierten Natriumkanälen zu. Ob diese Aussagen auf das komplexe humane Modell übertragbar sind, wurde nicht untersucht. Dafür müssten auch Wechselwirkungen mit anderen Kanälen, die einen relevanten Einfluss haben, berücksichtigt werden (Friederich & Solth, 2004; Friederich *et al.*, 2004; Solth *et al.*, 2005).

Die gewählte Outside-Out-Konfiguration bildet nur einen geringen Anteil der Zelloberfläche ab. Ob diese Reduktion einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse nimmt kann ebenfalls nicht mit Sicherheit verneint werden. Diese Limitationen implizieren die Notwendigkeit weiterer Studien am komplexen Zellmodell und auf tierexperimenteller Ebene, um so die Pathophysiologie der Lokalanästhetika-Intoxikation am Herzen möglichst genau abbilden zu können. Um die entwickelte Theorie zum Modell von Clarkson und Hondeghem (Clarkson & Hondeghem, 1985) zu unterstützen wären ähnliche Experimente, wie in deren Studie mit Ropivacain erforderlich.

Eine weitere Einschränkung bezüglich der Aussagekraft dieser Studie stellt das Fehlen von Untersuchungen mit Mepivacain dar. Beim Vergleich von drei strukturverwandten Medikamenten wäre die Validität deutlich erhöht. Experimente mit Mepivacain am selben Expressionssystem scheinen unabdingbar.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass das Nebenwirkungspotential von Ropivacain gegenüber dem von Bupivacain geringer ist. Für Konzentrationen, die im Blut nach Regionalanästhesieverfahren erreicht werden, konnte für Bupivacain noch ein Effekt auf den isolierten Na⁺-Strom nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Bupivacain den Effekt einer kardialen Funktionsstörung simuliert. Es muss bezüglich der Wirkungen und Nebenwirkungen für jeden Patienten eine Risikoabwägung erfolgen. Ein Patient mit vorbestehender Erkrankung an einem kardialen Ionen-Kanal sollte immer das nebenwirkungsärmere Medikament erhalten, ein vorbestehender Funktionsdefekt könnte agraviert werden. Bei allen anderen Patienten sollte man sich der Gefahr der möglichen Nebenwir-

kung bewußt sein. Die Entwicklung von Lokalanästetika mit optimalem Wirkungs-/Nebenwirkungsverhältnis muss voranschreiten.

6 Zusammenfassung

Durch die versehentliche intravasale Applikation oder Diffusion von Lokalanästhetika kann es zu schwerwiegenden kardialen Funktionsstörungen kommen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Lokalanästhetika auf den Na^+ -Strom des menschlichen Herzens untersucht. Dazu wurde in der Patch-clamp-Methode der Na^+ -Ionenfluss am isolierten Na^+ -Kanal SCN5A und einer mutierten Variante unter dem Einfluss von Ropivacain und Bupivacain gemessen. Es wurden die unterschiedlichen Eigenschaften Aktivierung, Inaktivierung und recovery von Wildtyp und Mutante nativ und unter dem Einfluss der Lokalanästhetika untersucht. Desweiteren wurden Experimente bzgl. der Entwicklung und der Erholung des Blockes des inaktivierten Wildtypkanals unter diesen Medikamenten durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten:

(1) Wildtyp unter dem Einfluss von Ropivacain und Bupivacain: Für Ropivacain und Bupivacain konnte in allen untersuchten Konzentrationen eine signifikante Beeinflussung des Inaktivierungsmittelpunktes beim Wildtypkanal nachgewiesen werden. Die Konzentrationswirkungskurve von Ropivacain und Bupivacain auf den Wildtypkanal unterscheidet sich signifikant. Die Entwicklung des Blocks des inaktivierten Wildtypkanals unterscheidet sich zu keiner Konzentration signifikant. Die Erholung aus diesem Block ist konzentrationsunabhängig und unterscheidet sich signifikant von Ropivacain zu Bupivacain. Die Inhibition des inaktivierten Zustandes ist signifikant unterschiedlich.

(2) Wildtyp und Mutante: Wildtyp-Kanal und mutierter Kanal unterscheiden sich signifikant im Aktivierungs- und Inaktivierungsmittelpunkt.

(3) Wildtyp und Mutante unter dem Einfluss von Bupivacain: Es kommt zu einer gleichartigen Veränderung des Inaktivierungsmittelpunktes von Wildtyp und Mutante unter dem Einfluss von Bupivacain. Die Inhibition bleibt durch die Mutation unbeeinflusst.

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse untermauern bereits publizierte Daten. Es konnte anhand weiterführender Untersuchung am biologischen Modell gezeigt werden, dass das zu erwartete Nebenwirkungspotential von Ropivacain gegenüber Bupivacain geringer ist.

Literaturverzeichnis

- Abriel H, Schläpfer J, Keller D, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R & Kappenberger L (2004) Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss Med Wkly*, **134**(47-48): 685–694.
- Adán V & Crown L (2003) Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician*, **67**(8): 1725–1732.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Riera A, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H & Wilde A (2005) Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*, **111**(5): 659–670.
- Arlock P (1988) Actions of three local anaesthetics: lidocaine, bupivacaine and ropivacaine on guinea pig papillary muscle sodium channels (V_{max}). *Pharmacol Toxicol*, **63**(2): 96–104.
- Armstrong C (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev*, **61**(3): 644–683.
- Bang-Vojdanovski B, Hannibal H & Eberhardt M (2002) Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia with 4 Anaesthesist, **51**(12): 989–992.
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N & George AL Jr (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, **376**(6542): 683–5.
- Bers DM & Perez-Reyes E (1999) Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*, **42**(2): 339–360.
- Binder S (2006) Elektrophysiologische Untersuchungen humaner Ionenkanäle mit der Patch-Clamp Methode und biophysikalische Modellierung der Ergebnisse. Diplomarbeit, Institut für Angewandte Physik und Zentrum für Mikrostrukturforschung Universität Hamburg.
- Borgeat A, Ekatodramis G & Blumenthal S (2004) Interscalene brachial plexus anesthesia with ropivacaine 5 mg/mL and bupivacaine 5 mg/mL: effects on electrocardiogram. *Reg Anesth Pain Med*, **29**(6): 557–63.
- Bräu ME, Branitzki P, Olschewski A, Vogel W & Hempelmann G (2000) Block of neuronal tetrodotoxin-resistant Na^+ currents by stereoisomers of piperidine local anesthetics. *Anesth Analg*, **91**(6): 1499–1505.
- Brown DL, Ransom DM, Hall JA, Leicht CH, Schroeder DR & Offord KP (1995) Regional anesthesia and local anesthetic-induced systemic toxicity: seizure frequency and accompanying cardiovascular changes. *Anesth Analg*, **81**(2): 321–328.

- Brugada P, Brugada R, Brugada J & Geelen P (1999) Use of the prophylactic implantable cardioverter defibrillator for patients with normal hearts. *Am J Cardiol*, **83**(5B): 98D–100D.
- Catterall WA (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem*, **55**: 953–985.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **26**(1): 13–25.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA & Wang Q (1998) Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, **392**(6673): 293–296.
- Clarkson CW & Hondeghem LM (1985) Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology*, **62**(4): 396–405.
- Eberhart LH, Morin AM, Kranke P, Geldner G & Wulf H (2002) [Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia. A quantitative systematic overview (meta-analysis) of randomized controlled studies]. *Anaesthesist*, **51**(7): 539–546.
- Eidelberg E (1963) Phase Reversal of electrical activity in the cerebral cortex. A discussion. *Bol Inst Estud Med Biol Univ Nac Auton Mex*, **21**: 427–431.
- Engleson S (1974) The influence of acid-base changes on central nervous system toxicity of local anaesthetic agents. I. An experimental study in cats. *Acta Anaesthesiol Scand*, **18**(2): 79–87.
- Fabiato A & Fabiato F (1979) Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol*, **41**: 473–484.
- Fernández-Redondo V, León A, Santiago T & Toribio J (2001) Allergic contact dermatitis from local anaesthetic on peristomal skin. *Contact Dermatitis*, **45**(6): 358.
- Friederich P, Dilger JP, Isbrandt D, Sauter K, Pongs O & Urban BW (2003) Biophysical properties of Kv3.1 channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Receptors Channels*, **9**(6): 387–396.
- Friederich P & Solth A (2004) Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. *Anesthesiology*, **101**(6): 1347–1356.
- Friederich P, Solth A, Schillemeit S & Isbrandt D (2004) Local anaesthetic sensitivities of cloned HERG channels from human heart: comparison with HERG/MiRP1 and HERG/MiRP1 T8A. *Br J Anaesth*, **92**(1): 93–101.
- Gielen M, Slappendel R & Jack N (2005) Successful defibrillation immediately after the intravascular injection of ropivacaine. *Can J Anaesth*, **52**(5): 490–492.

- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN & Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **28**(2): 365–8.
- Gottschalk A, Burmeister MA, Freitag M, Böhme C & Standl T (2003) [Plasma levels of ropivacaine and bupivacaine during postoperative patient controlled thoracic epidural analgesia]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **38**(11): 705–9.
- Graf BM (2001) The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem*, **1**(3): 207–214.
- Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL & Butterworth J (2001) Cardiac resuscitation after incremental overdosage with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg*, **92**(1): 37–43.
- Guy HR & Seetharamulu P (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(2): 508–512.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**(2): 85–100.
- Hille B (2000) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, 3. Auflage.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, **117**(4): 500–544.
- Jaradeh S (1993) Cauda equina syndrome: a neurologist's perspective. *Reg Anesth*, **18**(6 Suppl): 473–480.
- Jervell A & Lange-Nielsen F (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J*, **54**(1): 59–68.
- Jose AD & Collison D (1970) The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res*, **4**(2): 160–167.
- Junca A, Marret E, Goursot G, Mazoit X & Bonnet F (2001) A comparison of ropivacaine and bupivacaine for cervical plexus block. *Anesth Analg*, **92**(3): 720–4.
- Kalichman MW (1993) Physiologic mechanisms by which local anesthetics may cause injury to nerve and spinal cord. *Reg Anesth*, **18**(6 Suppl): 448–452.
- Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC & Myers RR (1993) Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol*, **52**(3): 234–240.
- Kalichman MW, Powell HC & Myers RR (1988) Pathology of local anesthetic-induced nerve injury. *Acta Neuropathol (Berl)*, **75**(6): 583–589.
- Kalichman MW, Powell HC & Myers RR (1989) Quantitative histologic analysis of local anesthetic-induced injury to rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther*, **250**(1): 406–413.

- Kass RS & Moss AJ (2003) Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest*, **112**(6): 810–815.
- Kim M, Lee YS, Mathews HL & Wurster RD (1997) Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Exp Cell Res*, **231**(2): 235–241.
- Knudsen K, Suurkula MB, Blomberg S, Sjövall J & Edvardsson N (1997) Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br J Anaesth*, **78**(5): 507–514.
- Knuepfer MM (2003) Cardiovascular disorders associated with cocaine use: myths and truths. *Pharmacol Ther*, **97**(3): 181–222.
- Koller C (1884) On the use of cocaine for producing anaesthesia of the eye. *Lancet* II, 990–992.
- Komai H & Lokuta AJ (1999) Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel of skeletal and cardiac muscles. *Anesthesiology*, **90**(3): 835–843.
- Lambert LA, Lambert DH & Strichartz GR (1994) Irreversible conduction block in isolated nerve by high concentrations of local anesthetics. *Anesthesiology*, **80**(5): 1082–1093.
- Levine SA & Woodworth CR (1958) Congenital deaf-mutism, prolonged QT interval, syncopal attacks and sudden death. *N Engl J Med*, **259**(9): 412–417.
- Li HL, Galue A, Meadows L & Ragsdale DS (1999) A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. *Mol Pharmacol*, **55**(1): 134–141.
- Macy E (2003) Local anesthetic adverse reaction evaluations: the role of the allergist. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **91**(4): 319–320.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z & Kyle JW (1996) Coexpression of beta 1 with cardiac sodium channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol*, **49**(1): 30–9.
- Makita N, Shirai N, Wang DW, Sasaki K, George AL, Kanno M & Kitabatake A (2000) Cardiac Na⁽⁺⁾ channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by beta(1)-subunit. *Circulation*, **101**(1): 54–60.
- Marmont G (1949) Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol*, **34**(3): 351–382.
- Messner DJ & Catterall WA (1986) The sodium channel from rat brain. Role of the beta 1 and beta 2 subunits in saxitoxin binding. *J Biol Chem*, **261**(1): 211–5.
- Morishima HO, Pedersen H, Finster M, Hiraoka H, Tsuji A, Feldman HS, Arthur GR & Covino BG (1985) Bupivacaine toxicity in pregnant and nonpregnant ewes. *Anesthesiology*, **63**(2): 134–139.

- Moss AJ & Schwartz PJ (1982) Delayed repolarization (QT or QTU prolongation) and malignant ventricular arrhythmias. *Mod Concepts Cardiovasc Dis*, **51**(3): 85–90.
- Nagatomo T, Fan Z, Ye B, Tonkovich GS, January CT, Kyle JW & Makielski JC (1998) Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na⁺ channels. *Am J Physiol*, **275**(6 Pt 2): 2016–2024.
- Nancarrow C, Rutten AJ, Runciman WB, Mather LE, Carapetis RJ, McLean CF & Hipkins SF (1989) Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanisms of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine in the sheep. *Anesth Analg*, **69**(3): 276–283.
- Nassogne MC, Louahed J, Evrard P & Courtoy PJ (1997) Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice. *J Neurochem*, **68**(6): 2442–2450.
- Nau C, Wang SY, Strichartz GR & Wang GK (2000) Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. *Anesthesiology*, **93**(4): 1022–33.
- Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**(5554): 799–802.
- Nerbonne JM & Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, **85**(4): 1205–1253.
- Noda M (1993) Structure and function of sodium channels. *Ann N Y Acad Sci*, **707**: 20–37.
- Numberger M & Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag.
- Nuss HB, Chiamvimonvat N, Pérez-García MT, Tomaselli GF & Marbán E (1995) Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (μ 1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, **106**(6): 1171–91.
- Oda A, Ohashi H, Komori S, Iida H & Dohi S (2000) Characteristics of ropivacaine block of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg*, **91**(5): 1213–1220.
- Orendáčová J, Cízková D, Kafka J, Lukáčová N, Marsala M, Sulla I, Marsala J & Katsube N (2001) Cauda equina syndrome. *Prog Neurobiol*, **64**(6): 613–637.
- Petitjeans F, Mion G, Puidupin M, Tourtier JP, Hutson C & Saissy JM (2002) Tachycardia and convulsions induced by accidental intravascular ropivacaine injection during sciatic block. *Acta Anaesthesiol Scand*, **46**(5): 616–617.
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA & Scheuer T (2001) Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci*, **18**(5): 570–80.

- Radwan IAM, Saito S & Goto F (2002) The neurotoxicity of local anesthetics on growing neurons: a comparative study of lidocaine, bupivacaine, mepivacaine, and ropivacaine. *Anesth Analg*, **94**(2): 319–24.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T & Catterall WA (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(17): 9270–9275.
- Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R & Catterall WA (2001) Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol*, **154**(2): 427–34.
- Roskamm H (2004) *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*. Springer.
- Rossner KL & Freese KJ (1997) Bupivacaine inhibition of L-type calcium current in ventricular cardiomyocytes of hamster. *Anesthesiology*, **87**(4): 926–934.
- Ruetsch YA, Böni T & Borgeat A (2001) From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr Top Med Chem*, **1**(3): 175–182.
- Schneider M, Ettlin T, Kaufmann M, Schumacher P, Urwyler A, Hampl K & von Hochstetter A (1993) Transient neurologic toxicity after hyperbaric subarachnoid anesthesia with 5% lidocaine. *Anesth Analg*, **76**(5): 1154–1157.
- Scholz A & Vogel W (2000) Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain*, **89**(1): 47–52.
- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM & Crampton RS (1993) Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*, **88**(2): 782–784.
- Scott DB (1986) Toxic effects of local anaesthetic agents on the central nervous system. *Br J Anaesth*, **58**(7): 732–735.
- Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GM, Bloomfield P & Lundh R (1989) Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. *Anesth Analg*, **69**(5): 563–569.
- Selander D, Brattsand R, Lundborg G, Nordborg C & Olsson Y (1979a) Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application of bupivacaine (Marcain). *Acta Anaesthesiol Scand*, **23**(2): 127–136.
- Selander D, Edshage S & Wolff T (1979b) Paresthesiae or no paresthesiae? Nerve lesions after axillary blocks. *Acta Anaesthesiol Scand*, **23**(1): 27–33.
- Siebrands CC, Binder S, Eckhoff U, Schmitt N & Friederich P (2006) Long QT 1 mutation KCNQ1A344V increases local anesthetic sensitivity of the slowly activating delayed rectifier potassium current. *Anesthesiology*, **105**(3): 511–520.
- Siebrands CC & Friederich P (2007) Inhibition of HERG channels by the local anaesthetic articaine. *Eur J Anaesthesiol*, **24**(2): 148–153.

- Siebrands CC, Schmitt N & Friederich P (2005) Local anesthetic interaction with human ether-a-go-go-related gene (HERG) channels: role of aromatic amino acids Y652 and F656. *Anesthesiology*, **103**(1): 102–112.
- Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**(23): 720–31.
- Solth A, Siebrands CC & Friederich P (2005) Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 channels by bupivacaine and its modulation by the pore mutation Kv4.3V401I. *Anesthesiology*, **103**(4): 796–804.
- Starmer CF, Grant AO & Strauss HC (1984) Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. *Biophys J*, **46**(1): 15–27.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H & Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, **339**(6226): 597–603.
- Tanaka K & Yamasaki M (1966) Blocking of cortical inhibitory synapses by intravenous lidocaine. *Nature*, **209**(5019): 207–208.
- Valenzuela C, Delpón E, Franqueza L, Gay P, Snyders DJ & Tamargo J (1997) Effects of ropivacaine on a potassium channel (hKv1.5) cloned from human ventricle. *Anesthesiology*, **86**(3): 718–728.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J & Snyders DJ (1995) Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J*, **69**(2): 418–427.
- Vassilev P, Scheuer T & Catterall WA (1989) Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(20): 8147–8151.
- Vassilev PM, Scheuer T & Catterall WA (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, **241**(4873): 1658–1661.
- Wahls SA (1985) Sick sinus syndrome. *Am Fam Physician*, **31**(3): 117–24.
- Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, Angelilli A, Villanueva F, McNamara DM & London B (2002) Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation*, **105**(6): 707–713.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL & Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(22): 10910–10914.
- Wilde AAM, Antzelevitch C, Borggreffe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RNW, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA & Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology (2002) Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*, **106**(19): 2514–9.

- Xiao YF, Wright SN, Wang GK, Morgan JP & Leaf A (2000) Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**(1): H35–46.
- Yang N, George AL & Horn R (1996) Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **16**(1): 113–122.
- Yang N & Horn R (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, **15**(1): 213–218.
- Zimmer C, Piepenbrink K, Riest G & Peters J (2007) Cardiotoxic and neurotoxic effects after accidental intravascular bupivacaine administration. Therapy with lidocaine propofol and lipid emulsion. *Anaesthesist*, **56**(5): 449–453.
- Zink W & Graf BM (2004) Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med*, **29**(4): 333–340.
- Zink W, Graf BM, Sinner B, Martin E, Fink RHA & Kunst G (2002) Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca²⁺ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity. *Anesthesiology*, **97**(3): 710–716.
- Zink W, Missler G, Sinner B, Martin E, Fink RHA & Graf BM (2005) Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology*, **102**(4): 793–798.

Danksagungen

Um die Motivation und das Durchhaltevermögen aufzubringen, diese Arbeit zu vollenden, war die Unterstützung vieler Freunde und Verwandter nötig. Bei all jenen möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Mein Dank gilt insbesondere:

- Herrn Professor Dr. Patrick Friederich für das jahrelange Vertrauen
- Dr. Cornelia Siebrands und Dr. Mark Andree Punke für die gute Zusammenarbeit im Labor und für die Beantwortung der zahlreichen elektrophysiologischen, biochemischen und methodischen Fragen
- Herrn Professor Dr. O. Pongs und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg für die nette Arbeitsatmosphäre
- Meiner Mutter, Dirk, Florian und Andrea für den letzten Motivationsschub und das Korrekturlesen.

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

Unterschrift: