

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

## **Bupivacain destabilisiert die Aktionspotentialdauer im zellulären und computergestützten LQT1-Modell**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Roman Zenouzi  
aus Hamburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Freitag**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. D. Isbrandt**

*Meinen Eltern in Dankbarkeit*

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Elektrophysiologie des Herzens .....	3
2.1.1	Das ventrikuläre Aktionspotential .....	3
2.1.2	Ionenkanäle .....	4
2.1.2.1	<i>hH1/SCN5A</i> und $I_{Na}$ .....	5
2.1.2.2	Der L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanal und $I_{Ca,L}$ .....	6
2.1.2.3	Spannungsgesteuerte $K^+$ -Kanäle.....	8
2.1.2.3.1	<i>Kir2.1</i> und $I_{K1}$ .....	9
2.1.2.3.2	<i>Kv4.3</i> und $I_{to}$ .....	9
2.1.2.3.3	Verzögerte $K^+$ -Ströme .....	10
2.1.2.3.3.1	<i>Kv7.1/minK</i> und $I_{Ks}$ .....	10
2.1.2.3.3.2	<i>Kv11.1/MiRP1</i> und $I_{Kr}$ .....	11
2.2	Das Long QT Syndrom (LQTS).....	13
2.2.1	Das kongenitale LQTS.....	14
2.2.1.1	Perioperatives Management von LQTS-Patienten.....	16
2.2.2	Das erworbene LQTS .....	17
2.3	Lokalanästhetika .....	18
2.3.1	Lokalanästhetikaintoxikation.....	19
2.3.2	Bupivacain.....	19
2.3.2.1	Ionenkanalinteraktion von Bupivacain .....	21
2.4	Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen beim LQTS.....	24
2.5	Vorgehensweise dieser Arbeit .....	26
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1	Patch-Clamp.....	28
3.1.1	Die whole-cell Konfiguration .....	28
3.1.2	Voltage-Clamp und Current-Clamp .....	29
3.1.3	Elektrische Eigenschaften der whole-cell Ableitung .....	30
3.1.4	Vorzeichenkonventionen.....	31
3.2	Der Patch-Clamp Versuchsstand .....	32
3.2.1	Messtisch und mechanische Komponenten.....	32
3.2.2	Messkammer und Kammerperfusion .....	32
3.2.3	Elektronische Komponenten .....	33

3.2.4	Patchpipetten.....	34
3.2.5	Versuchslösungen und Chemikalien.....	34
3.2.5.1	Versuchslösungen.....	34
3.2.5.2	Herkunft verwendeter Chemikalien.....	35
3.3	Isolation einzelner Kardiomyozyten vom Dunkin-Hartley Meerschweinchen.....	36
3.4	Durchführung der Versuche.....	37
3.4.1	Erstellen eines Giga-Seals.....	37
3.4.2	Messung von Aktionspotentialen.....	38
3.4.3	Substanzapplikation und Versuchsreihen.....	39
3.4.3.1	Bupivacain.....	39
3.4.3.2	Pharmakologische Induktion von LQT1, LQT2 und LQT3.....	39
3.4.3.3	Versuchsreihen.....	40
3.5	Auswertung der Versuche.....	41
3.5.1	APD90.....	42
3.5.2	Relative APD90 (rAPD90) und relative Differenz der APD90 (rel. $\Delta$ APD90).....	42
3.5.3	Temperatur.....	43
3.6	Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1	Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Myozyten.....	45
4.1.1	Verdünnungsreihe.....	45
4.1.1.1	Membranpotential und Overshoot.....	46
4.1.1.2	APD90 und rAPD90.....	46
4.1.2	Bupivacain (3 $\mu$ mol/L).....	47
4.2	Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential LQT-ähnlicher Myozyten.....	49
4.2.1	Etablierung der LQT-Modelle.....	49
4.2.1.1	LQT1 <sub>C293B</sub> .....	50
4.2.1.2	LQT2 <sub>E4031</sub> .....	50
4.2.1.3	LQT3 <sub>Vera</sub> .....	51
4.2.2	LQT-ähnliche Zellen – Bupivacain (3 $\mu$ mol/L).....	52
4.2.2.1	LQT1 <sub>C293B</sub> – Bupivacain (3 $\mu$ mol/L).....	52
4.2.2.2	LQT2 <sub>E4031</sub> – Bupivacain (3 $\mu$ mol/L).....	54
4.2.2.3	LQT3 <sub>Vera</sub> – Bupivacain (3 $\mu$ mol/L).....	56
4.3	Verlängerungen der APD90 – ein Risikovergleich.....	57
4.4	Computergestützte Simulationen des ventrikulären Aktionspotentials.....	58
4.4.1	LRd – native Myozyten.....	59
4.4.2	LRd – LQT1.....	61
4.4.3	LRd – LQT2.....	62

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>65</b>
5.1	<i>Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Myozyten</i> .....	65
5.2	<i>Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential LQT-ähnlicher Myozyten</i> .....	67
5.2.1	<i>Etablierung von LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub></i> .....	67
5.2.2	<i>Der Effekt von Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub></i> .....	68
5.3	<i>Computergestützte Simulationen von ventrikulären Aktionspotentialen</i> .....	71
5.4	<i>Klinische Implikationen</i> .....	73
5.4.1	<i>Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen</i> .....	74
5.4.2	<i>Genetische Differenzierung von LQT-Subtypen in der Klinik</i> .....	77
5.5	<i>Fragestellung</i> .....	79
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>102</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>103</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>104</b>

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Long QT Syndrom (LQTS) ist eine kardiale Erkrankung, die durch ventrikuläre Tachyarrhythmien vom Torsade de Pointes (TdP) Typ und den plötzlichen Herztod charakterisiert ist. Kardiale Ereignisse sind häufig getriggert von adrenerger Stimulation im Rahmen physischen und emotionalen Stresses (Moss et al. 1985, Roden et al. 1996, Schwartz et al. 1975, Shimizu et al. 1991, Zipes 1991). Auch können viele Substanzen *per se* ein LQTS auslösen und stellen somit für LQTS-Patienten ein besonderes Risiko in ihrer Anwendung dar (Crumb und Caverio 1999). Insofern ist das perioperative Management von LQTS-Patienten von großem Interesse (Anton und Friederich 2010, Booker et al. 2003, Crumb und Caverio 1999, Kies et al. 2005, Pfizenmayer und Friederich 2010).

Kardiotoxizität ist auch im Rahmen einer Lokalanästhetikaintoxikation – einem relativ seltenen, aber prinzipiell lebensbedrohlichen Ereignis – insbesondere mit dem langwirksamen Aminoamid Lokalanästhetikum Bupivacain, beschrieben (Albright 1979, Chang et al. 2001, Davis und de Jong 1982, Kasten 1986, Kotelko et al. 1984, Mallampati et al. 1984, Solomon et al. 1990). Dieser Effekt wird derzeit vor allem auf ihre Interaktion mit kardialen Na<sup>+</sup>-Kanälen zurückgeführt (Butterworth 2010). Allerdings interagieren Lokalanästhetika auch mit kardialen K<sup>+</sup>-Kanälen (Friederich et al. 2004, Siebrands et al. 2006, Siebrands et al. 2005, Solth et al. 2005) und verlängern die ventrikuläre Repolarisation (Bardsley et al. 1998, Bariskaner et al. 2001, Bruelle et al. 1996, Lefrant et al. 2001, Moller und Covino 1990, Scalabrini et al. 2003), so dass auch diese Ionenkanalinteraktion für den arrhythmogenen Effekt von Lokalanästhetika in Frage kommt. Das häufig in der Klinik verwendete Bupivacain zeichnet sich im Vergleich zu anderen Wirkstoffen seiner Substanzgruppe durch eine hohe Affinität zum hERG (human Ether-à-go-go Related Gene)-Kanal, der dem I<sub>Kr</sub> zugrunde liegt, aus (Siebrands und Friederich 2007, Siebrands et al. 2005). Inwieweit sich diese Blockade jedoch auf das ventrikuläre Aktionspotential (AP), insbesondere unter veränderten elektrophysiologischen Bedingungen im Rahmen eines angeborenen oder erworbenen LQTS, auswirkt, ist noch unklar. Ebenso lässt sich bislang keine Aussage über das subtypspezifische Risiko von LQTS-Patienten im Rahmen einer Intoxikation mit Bupivacain treffen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, den Effekt von Bupivacain auf das ventrikuläre AP von nativen Kardiomyozyten sowie in einem erworbenen LQT1, LQT2 und LQT3 *in vitro* Zellmodell des Meerschweinchens mit Hilfe der Patch-Clamp Technik zu charakterisieren. Dabei soll die Hypothese, dass die Bupivacain-induzierte  $I_{Kr}$ -Blockade einen LQT-Subtyp spezifischen Effekt aufweist und insbesondere in bereits  $I_{Ks}$ -defizienten Myozyten (LQT1) von Bedeutung ist, überprüft werden. Darüber hinaus soll die Relevanz potentieller Ionenkanalinteraktionen von Bupivacain durch computergestützte Simulationen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) analysiert werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Welchen Effekt hat Bupivacain auf das ventrikuläre AP, insbesondere auf die Aktionspotentialdauer (APD), nativer Kardiomyozyten?
2. Welchen Effekt hat die Substanz in einem LQT1-, LQT2- bzw. LQT3-ähnlichen Zellmodell? Gibt es hinsichtlich dieses Effekts Unterschiede zwischen den einzelnen LQT-Subtypen?
3. Welche Ionenkanalinteraktionen von Bupivacain liegen diesem Effekt zugrunde?
4. Kann man hieraus ein unterschiedliches Risiko in Bezug auf kardiale Ereignisse bedingt durch eine Intoxikation mit Bupivacain bei Patienten mit einem LQT1-, LQT2- bzw. LQT3-Syndrom ableiten? Sollte man daher im Rahmen des perioperativen Managements eine Differenzierung der LQT-Subtypen vornehmen?



## 2 Einleitung

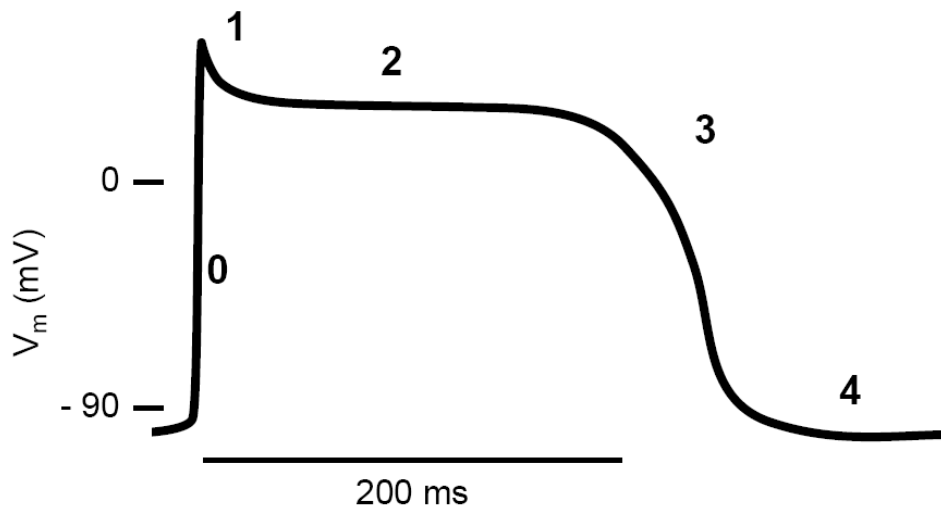
### 2.1 Elektrophysiologie des Herzens

Maßgeblich für die Kontraktion der Herzmuskelzelle und damit die Pumpaktion des Herzens ist eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration – die elektromechanische Kopplung, deren Grundlage das kardiale Aktionspotential (AP) darstellt. Das AP beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener, in der Zellmembran lokalisierter Ionenkanäle, die öffnen und schließen und somit ausgehend von einem Ruhepotential die Zellmembran de- und repolarisieren. Das Ruhemembranpotential entspricht dabei im Wesentlichen dem  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential, bei dem in einem sog. Donnan Equilibrium der  $\text{K}^+$ -Strom entlang des chemischen Gradienten nach extrazellulär dem  $\text{K}^+$ -Strom entlang des elektrischen Gradienten nach intrazellulär gleicht.

#### 2.1.1 Das ventrikuläre Aktionspotential

Ausgehend vom Ruhepotential der Membran antwortet eine Herzmuskelzelle auf einen Stimulus, der die Zellmembran depolarisiert und hierbei einen Schwellenwert erreicht, mit einem AP. Diese Ionenkanalbedingte Spannungsänderung der Membran kann in 5 Phasen eingeteilt werden (siehe Abbildung 1). Phase 0 beschreibt den schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle, der die Zellmembran depolarisiert und sich bei Aufzeichnung der Spannung gegen die Zeit als sog. Aufstrich (Upstroke) im Diagramm darstellt. Der Overshoot bezeichnet in diesem Zusammenhang den Teil des schnellen Aufstrichs, der über ein Membranpotential von 0 mV hinausgeht und somit eine Umpolarisierung der Zellmembran darstellt. In Phase 1 kommt es zu einer kurzen Repolarisation bedingt durch den transienten  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom  $I_{t0}$  und die Inaktivierung von  $I_{\text{Na}}$ . Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt dann in Phase 2 zu einem für das ventrikuläre AP charakteristischen Plateau. Während dieser Phase wirkt der  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingten Depolarisation ein verzögerter  $\text{K}^+$ -Ausstrom, hervorgerufen durch eine schnell aktivierende ( $I_{\text{Kr}}$ ) und eine langsam aktivierende ( $I_{\text{Ks}}$ ) Komponente, entgegen. Phase 3 ist durch eine Repolarisation gekennzeichnet, die durch den verzögerten  $\text{K}^+$ -Ausstrom und die Inaktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen verursacht wird.

Phase 4 schließlich ist die Ruhephase der Zelle; ein bei negativen Membranpotentialen fließender  $K^+$ -Strom ( $I_{K1}$ ) stabilisiert hierbei das Ruhemembranpotential. Die Gesamtdauer des ventrikulären APs beträgt beim Menschen in Abhängigkeit von der Herzfrequenz 200-400 ms.



**Abbildung 1: Das ventrikuläre Aktionspotential.** Dargestellt ist ein typisches ventrikuläres AP, das in 5 Phasen eingeteilt wird. Phase 0 bezeichnet den schnellen  $Na^+$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle. Es resultiert ein schneller Aufstrich (Upstroke). Phase 1 bezeichnet eine kurze Repolarisation durch den transienten  $K^+$ -Auswärtsstrom  $I_{to}$  und die Inaktivierung von  $I_{Na}$ . Phase 2 stellt die Plateauphase dar und kommt durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle zustande. Phase 3 ist durch eine Repolarisation gekennzeichnet, die durch den verzögerten  $K^+$ -Ausstrom und die Inaktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen verursacht wird. Phase 4 schließlich ist die Ruhephase der Zelle.  $V_m$  = Membranpotential.

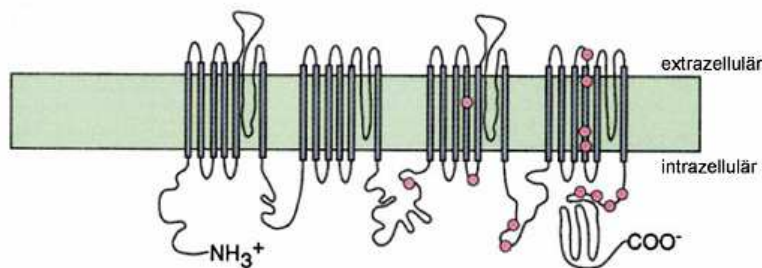
### 2.1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind selektive Poren, die in Zellmembranen lokalisiert sind und den transmembranären Ionenaustausch ermöglichen. Öffnet ein Ionenkanal – ein Prozess, dem verschiedene Stimuli, häufig eine Spannungsänderung der Membran, zugrunde liegen, so fließen in der Sekunde mehr als 100000 Ionen entlang einem chemischen und elektrischen Gradienten durch ihn hindurch und bewegen das Potential der Membran in Richtung des Gleichgewichtspotentials des betreffenden Ions (Catterall 1996, Jan und Jan 1997). Im Folgenden soll auf die für das AP des Ventrikelmuskels wichtigsten Ionenkanäle eingegangen werden.

### 2.1.2.1 *hH1/SCN5A* und $I_{Na}$

In ventrikulären Myozyten wird die schnelle Depolarisation in Phase 0 des APs durch einen  $Na^+$ -selektiven und spannungsgesteuerten  $Na^+$ -Kanal vermittelt. Im Herzen kodiert das Gen *SCN5A* für die in Abbildung 2 dargestellte  $\alpha$ -Untereinheit Nav1.5, dem eigentlichen funktionellen Kanalprotein des kardialen  $Na^+$ -Kanals hH1, und ist auf Chromosom 3p21 lokalisiert (Gellens et al. 1992, George et al. 1995). Nav1.5 besteht analog zu  $Na^+$ -Kanälen anderer Gewebe aus vier homologen Domänen (DI-DIV) mit jeweils sechs Transmembranregionen (S1-S6) (Gellens et al. 1992). Den Selektivitätsfilter für  $Na^+$  stellt eine extrazelluläre Schleife zwischen S5 und S6 dar (P-Segment) (Yellen et al. 1991); positiv geladene Aminosäurereste in S4 bilden durch Verschiebung bei Potentialänderungen den Spannungssensor (Stühmer et al. 1989). Letzterer ist essentiell für die Konformationsänderung des Kanals nach Erreichen des Schwellenpotentials in einen offenen und aktivierten Zustand, in dem  $Na^+$ -Ionen von extra- nach intrazellulär fließen können. Zusätzlich besitzt ein  $Na^+$ -Kanal zwei weitere Zustände: Eine Schleife, die zwischen den DIIS4 und DIVS4 Segmenten zytosolisch lokalisiert ist und die Aminosäuresequenz Isoleucin-Phenylalanin-Methionin (IFM-Sequenz) enthält, dockt an einen Rezeptor, der aus einer Verbindung zwischen S4 und S5 von DIV gebildet wird, und überführt den Kanal innerhalb weniger Millisekunden in einen geschlossenen, inaktivierten Zustand (Cha et al. 1999, McPhee et al. 1998). Nach vollständiger Repolarisation geht der Kanal dann in einen geschlossenen, aktivierbaren Zustand über, um bei einem erneuten Erreichen des Schwellenpotentials wieder den offenen, aktivierten Zustand einzunehmen (sog. Hodgkin Zyklus).

Zu einer Zunahme des  $Na^+$ -Stroms kommt es infolge einer Aktivierung G-Protein gekoppelter  $\beta$ -Rezeptoren mit konsekutiver Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Lipka et al. 1998, Muramatsu et al. 1994); die Reduktion der  $Na^+$ -Leitfähigkeit wird über die Proteinkinase C (PKC) vermittelt und zeigt sich sowohl in einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals als auch in einer Linksverschiebung seiner spannungsabhängigen Inaktivierungscharakteristika (Qu et al. 1994).



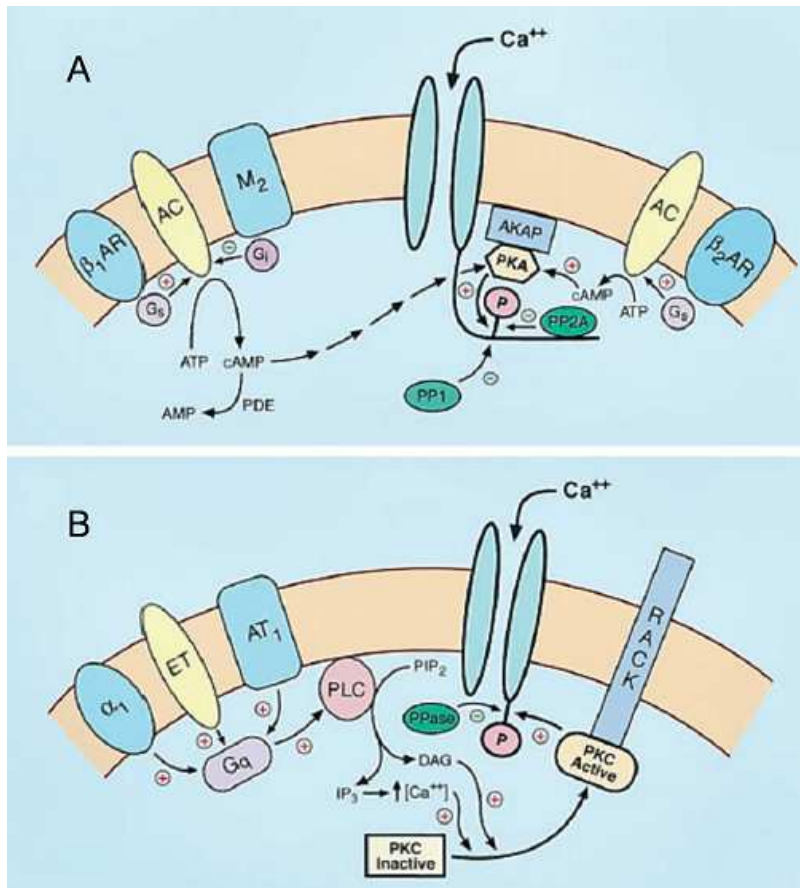
**Abbildung 2: Nav1.5 des kardialen Na<sup>+</sup>-Kanals.** α-Untereinheit mit vier transmembranären Domänen, die aus je sechs Transmembranregionen bestehen. Missensemutationen (rote Markierungen) verursachen LQT3. (Modifiziert nach Keating und Sanguinetti 2001).

#### 2.1.2.2 Der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal und I<sub>Ca,L</sub>

Der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal des Herzens ist ein Heterotetramer, das aus einer α<sub>1</sub>-Untereinheit und akzessorischen α<sub>2</sub>-/δ- und β-Untereinheiten besteht. Bei Depolarisation in Phase 2 des APs öffnet der Kanal; ein daraus resultierender Ca<sup>2+</sup>-Einstrom induziert eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum im Arbeitsmyokard von Vorhof und Ventrikel sowie in Purkinjefasern. Das Gen für die kardiale α<sub>1</sub>-Untereinheit, lokalisiert auf dem Chromosom 12p13.3, gehört zur Klasse Ca<sub>v</sub>1.2 (α<sub>1C</sub>) und kodiert für ein Protein, welches aus vier homologen Domänen (DI-DIV) mit jeweils 6 Transmembransegmenten (S1-S6) besteht und das funktionelle Kanalprotein bildet. Der Selektivitätsfilter ist zwischen den Segmenten S5 und S6 lokalisiert (Cataldi et al. 2002, Klockner et al. 1996, Mikala et al. 1993). Vom geschlossenen in den offenen Zustand gelangt der Kanal durch eine Konformationsänderung, wenn sich der in S4 lokalisierte Spannungssensor bei Depolarisation nach extrazellulär bewegt (Bezannilla 2002).

Analog zu anderen kardialen Ionenkanälen wird der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal über multiple G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert (siehe Abbildung 3). Dabei führt eine β-adrenerge Stimulation der Zelle über die cAMP/PKA Signalkaskade zu einer erhöhten Leitfähigkeit des Kanals. Ein inhibierendes G-Protein, das gekoppelt an muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren aber auch an Adenosin-, Opiat- und ANP (Atriales Natriuretisches Peptid)-Rezeptoren vorliegen kann, hemmt die Adenylatcyclase (AC) und vermindert somit I<sub>Ca,L</sub> (Kamp und Hell 2000). Ein weiterer Mechanismus der PKA-abhängigen Stimulation von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen tritt als Ergebnis einer starken

Depolarisation der Zellmembran auf: Es kommt vermutlich zu einer spannungsabhängigen Konformationsänderung des Kanals, so dass dieser für die PKA-vermittelte Phosphorylierung zugänglicher ist (Sculptoreanu et al. 1993). Auch die PKC spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Regulation von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen: Multiple  $\text{G}_q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren, wie  $\alpha_1$ -adrenerge, Angiotensin II und Endothelin Rezeptoren, aktivieren über die Phospholipase C (PLC)/Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) Signalkaskade die PKC und führen auf diesem Wege zu einer Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und somit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Berridge 1997, Dorn und Brown 1999).



**Abbildung 3: Die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-regulierende Signalkaskaden.** A, Schema der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-regulierenden cAMP/PKA Signalkaskade. Die Stimulation von  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren führt zu einer  $G_s$ -vermittelten Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) und vermehrten Produktion von cAMP, was die PKA zur Phosphorylierung des Kanals stimuliert. PP1 und PP2A sind Phosphatasen und können durch Dephosphorylierung diesem entgegenwirken. Das A-Kinase Anker Protein (AKAP) verbindet die PKA mit dem Kanal. Muskarinische  $M_2$ -Rezeptoren können die  $\beta$ -adrenerge Erhöhung von  $I_{\text{Ca,L}}$  über eine  $G_i$ -vermittelte Inaktivierung der AC opponieren. B, Schema der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-regulierenden PLC/PKC Signalkaskade. Das Resultat der Aktivierung von  $\alpha_1$ -adrenergen,  $AT_1$  (Angiotensin 1) oder ET (Endothelin) Rezeptoren ist die  $G_q$ -vermittelten Aktivierung der PLC, was zu einer Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Aktivierung der PKC führt. Die PKC bindet das RACK-Protein (receptors for activated C kinases) und phosphoryliert den Kanal. Eine Seronin/Tyrosin Phosphatase (PPase) steht dieser Phosphorylierung entgegen.  $IP_3$ =Inositoltrisphosphat;  $PIP_2$ =Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat. (Modifiziert nach Kamp und Hell 2000).

### 2.1.2.3 Spannungsgesteuerte $K^+$ -Kanäle

Spannungsgesteuerte  $K^+$ -Kanäle vermitteln am Herzen u. a. frühe und verzögerte ( $I_{\text{Ks}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ) Auswärtsströme, die der  $\text{Na}^+$ -initiierten und  $\text{Ca}^{2+}$ -getragenen Depolarisation entgegenwirken (Nerbonne 2000). Sie bestehen aus vier zu einem Homo- oder Heterotetramer zusammengelagerten  $\alpha$ -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Der  $K^+$ -selektive Filter befindet sich am

extrazellulären Ende der Pore, die von S5 und S6 gebildet wird, und enthält die Signatursequenz Tyrosin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin (Doyle et al. 1998). Der Spannungssensor ist im S4 Segment, das multiple basische Aminosäuren enthält, lokalisiert (Yellen 2002). Mit der  $\alpha$ -Untereinheit eines  $K^+$ -Kanals können  $\beta$ -Untereinheiten zytoplasmatisch (Kv $\beta$ 1-3, KChIP, KChAP), transmembranär (minK, MiRPs) und als sog. ATP-bindende Kassetten (ABC) in Form von Sulfonylurearezeptoren (SUR) assoziiert sein (An et al. 2000, Coetzee et al. 1999, Hanlon und Wallace 2002, Nerbonne 2000, Pourrier et al. 2003, Roden et al. 2002). Die Koexpression von  $\beta$ -Untereinheiten mit  $\alpha$ -Untereinheiten reguliert zudem die Oberflächenexpression, Kinetik sowie Substanzsensitivität von  $K^+$ -Kanälen (Hanlon und Wallace 2002, Martens et al. 1999).

#### 2.1.2.3.1 *Kir2.1 und $I_{K1}$*

KCNJ2 kodiert für die Kir2.1 Untereinheiten, die als Tetramer  $I_{K1}$  generieren. Dieser einwärtsgerichtete  $K^+$ -Strom stabilisiert bei negativen Membranpotentialen das Ruhemembranpotential, das somit nahezu dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotential entspricht. Bei Depolarisation schließt der Kanal und öffnet wieder bei negativeren Potentialen ab -20 mV. Hierdurch leistet  $I_{K1}$  auch einen Beitrag zur Repolarisation der Zellmembran in der terminalen Phase 3 des APs (Lopatin und Nichols 2001).

#### 2.1.2.3.2 *Kv4.3 und $I_{to}$*

Der transiente Auswärtsstrom  $I_{to}$ , der eine vorübergehende Repolarisation in Phase 1 des APs hervorruft, besteht aus einem spannungsgesteuerten, 4-Aminopyridin-sensitiven,  $Ca^{2+}$ -unabhängigen  $K^+$ -Strom ( $I_{to1}$ ) und einem 4-Aminopyridin-insensitiven,  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$  oder  $K^+$  Strom ( $I_{to2}$ ). Im menschlichen Myokard lässt sich  $I_{to1}$ , getragen durch Kv4.3 – einem schnell inaktivierenden Kanal, dessen biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften bei Expression in *Xenopus* Oozyten denen von  $I_{to}$  ähneln – nachweisen (Dixon et al. 1996, Sah et al. 2003). Die Dichte von  $I_{to1}$  ist dabei in atrialen Myozyten, in den Purkinjefasern, epikardial und in den midmyokardialen M-Zellen höher als im Endokard (Nabauer et al. 1996, Yan und Antzelevitch 1996). Im Meerschweinchen hingegen lässt sich  $I_{to}$  nicht nachweisen (Findlay 2003, Zhabyeyev et al. 2004).

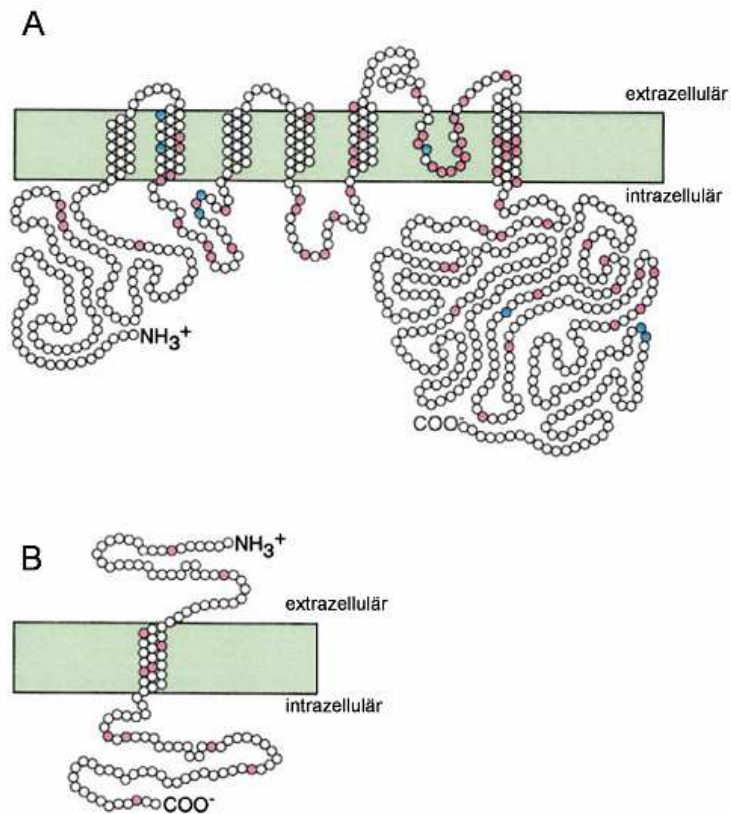
### 2.1.2.3.3 Verzögerte $K^+$ -Ströme

In ventrikulären Myozyten spielen verzögerte  $K^+$ -Ströme im Hinblick auf die Modulation des APs eine ausschlaggebende Rolle. Neben der extrem schnell aktivierenden Stromkomponente  $I_{Kur}$  (ultrarapid) unterscheidet man vor allem  $I_{Kr}$ , die schnell (rapid) aktivierende, von  $I_{Ks}$ , der langsam (slow) aktivierenden Komponente, auf der Basis ihrer pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften (Mitcheson und Sanguinetti 1999).

#### 2.1.2.3.3.1 *Kv7.1/minK* und $I_{Ks}$

$I_{Ks}$ , die langsam aktivierende Komponente des verzögerten Gleichrichter  $K^+$ -Stroms, trägt insbesondere in der späten Plateauphase des ventrikulären APs zur Repolarisation der Zellmembran bei.  $I_{Ks}$  aktiviert bei positiveren Membranpotentialen ab -30 mV und ist durch ein lineares Strom-Spannungsverhältnis, einer fehlenden Inaktivierung und einer langsamen Deaktivierung gekennzeichnet. Letztere führt bei hoher Herzfrequenz zu einer Akkumulation offener Kanäle und einer damit verbundenen schnelleren Repolarisation (Mitcheson und Sanguinetti 1999). Die molekulare Grundlage von  $I_{Ks}$  ist ein Kanalkomplex bestehend aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten *Kv7.1*, kodiert von *KCNQ1*, und vier akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten *minK*, kodiert von *KCNE1* (siehe Abbildung 4) (Barhanin et al. 1996, Sanguinetti et al. 1996, Yang et al. 1997). Das 1996 klonierte Gen für *Kv7.1* ist auf dem Chromosom 11p5.5 lokalisiert (Keating et al. 1991, Wang et al. 1996); in Mutationsanalysen konnten 85 Mutationen aufgedeckt werden. Hierbei handelt es sich vor allem um Missensemutationen, die ca. 40 % der LQT-Syndrome ausmachen. Das Gen für die nur 129 Aminosäure-lange  $\beta$ -Untereinheit *minK* ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Hier sind zehn arrhythmieassoziierte Mutationen, die ca. 5 % der LQT-Syndrome ausmachen, beschrieben (Keating und Sanguinetti 2001, Splawski et al. 2000). Reguliert wird  $I_{Ks}$  über die PKA und PKC. Während die Stimulation der PKA zu einer Erhöhung der Stromamplitude führt (Walsh und Kass 1988, Walsh und Kass 1991), ist der Effekt der PKC auf die  $\beta$ -Untereinheit *minK* speziesabhängig: Während es im Meerschweinchen bei Stimulation der PKC zu einer Erhöhung von  $I_{Ks}$  kommt, konnte bei Ratten und Mäusen eine Reduktion der Stromkomponente nachgewiesen werden (Varnum et al. 1993).





**Abbildung 4: Kv7.1 und seine  $\beta$ -Untereinheit minK.** A,  $\alpha$ -Untereinheit Kv7.1 des  $I_{K_S}$ -generierenden  $\text{K}^+$ -Kanals mit sechs Transmembrandomänen. Missensemutationen (rote Markierungen) und Shiftmutationen bzw. Deletionen (blaue Markierungen) verursachen LQT1. B,  $\beta$ -Untereinheit minK des  $I_{K_S}$ -generierenden  $\text{K}^+$ -Kanals. Missensemutationen (rote Markierungen) führen zu LQT5. (Modifiziert nach Keating und Sanguinetti 2001).

#### 2.1.2.3.3.2 *Kv11.1/MiRP1* und $I_{K_r}$

$I_{K_r}$ , die schnell aktivierende Komponente des verzögerten Gleichrichter  $\text{K}^+$ -Stroms, ist durch eine schnelle Aktivierung bei  $-30$  mV sowie eine noch schnellere Inaktivierung bei positiven Membranpotentialen charakterisiert. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der zu einer ausgeprägten Rektifikation führt und somit die Phase 2 des ventrikulären APs aufrechterhält. Indem  $I_{K_r}$  schneller vom inaktivierten in den aktivierten Zustand übergeht als zu deaktivieren, trägt er in Phase 3 des ventrikulären APs durch einen Auswärtsstrom zur Repolarisation der Zellmembran bei (Sanguinetti und Jurkiewicz 1990, Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006, Shibasaki 1987).

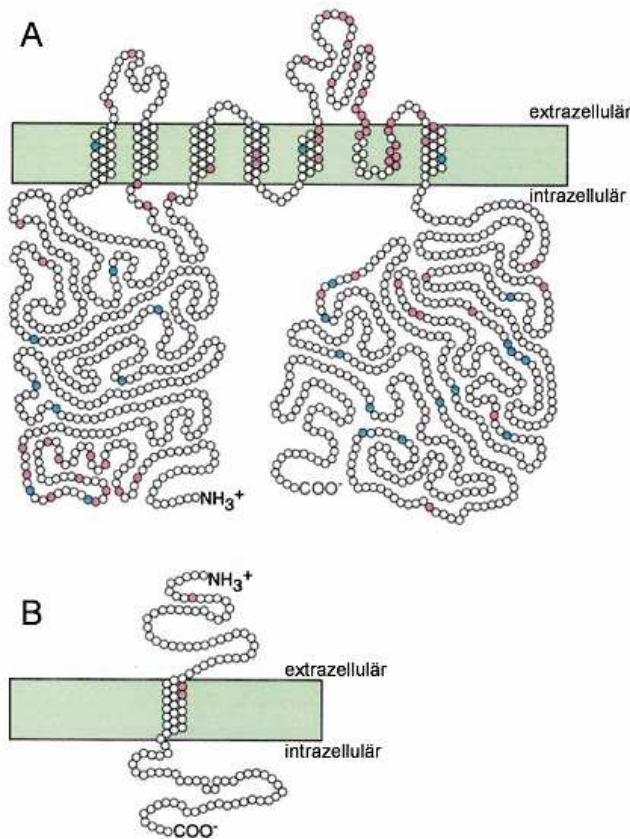
Die molekulare Grundlage von  $I_{K_r}$  ist in Abbildung 5 dargestellt. Als Heterotetramer angeordnet stellt Kv11.1, kodiert von KCNH2 (Chromosom 7q35-q36)

– auch als hERG (human Ether-à-go-go Related Gene) bekannt, die funktionelle  $\alpha$ -Untereinheit des  $I_{Kr}$ -generierenden Kanals dar. Mit diesem sog. hERG-Kanal können  $\beta$ -Untereinheiten wie minK aber vor allem MiRP1 (minK-related protein 1), das von KCNE2 kodiert wird, assoziiert sein. MiRP1 moduliert dabei die Kinetik und Leitfähigkeit, überträgt den direkten stimulierenden Effekt von cAMP auf den hERG-Kanal und reduziert bzw. erhöht seine Sensitivität gegenüber anderen Substanzen (Abbott et al. 1999, Keating und Sanguinetti 2001). In Mutationsanalysen des Kanalkomplexes konnten für hERG 95 eindeutige Mutationen, die ca. 45 % der LQT-Syndrome ausmachen, identifiziert werden; für MiRP1 werden drei Missensemutationen mit ca. 2 % der LQT-Syndrome assoziiert (Keating und Sanguinetti 2001, Splawski et al. 2005).

Ein Mechanismus, der möglicherweise an der Entstehung von ventrikulären Tachyarrhythmien beteiligt sein könnte, ist die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerg vermittelte Regulation von hERG-Kanälen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei Koexpression von hERG-Kanälen und  $\alpha_{1A}$ -Rezeptoren eine adrenerge Stimulation zu einer Reduktion von  $I_{Kr}$  führt (Bian et al. 2001, Jiang et al. 1999). Daten zu anderen  $\alpha$ -Rezeptoren existieren bislang nicht. Allerdings sprechen auch Ergebnisse weiterer Arbeiten, nach denen  $I_{Kr}$  durch eine Aktivierung der PKC (Barros et al. 1998, Kiehn et al. 1998, Thomas et al. 2003) wie auch der PLC (Bian et al. 2001) herabsetzt wird, für einen insgesamt inhibierenden Effekt einer  $\alpha$ -adrenergen Stimulation auf den hERG-Kanal. Der Effekt einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation auf den hERG-Kanal wird in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert (Thomas et al. 2004). Dennoch scheint eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation insgesamt einen inhibierenden Effekt auf den hERG-Kanal auszuüben. So konnte an ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens gezeigt werden, dass der  $\beta_1$ -adrenerge Agonist Isoprenalin zu einer Reduktion von  $I_{Kr}$  führt (Karle et al. 2002). Ebenso konnte im *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem unter Aktivierung der PKA eine depolarisierende Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve mit konsekutiver Reduktion von  $I_{Kr}$  beobachtet werden (Thomas et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in CHO- (Cui et al. 2000) und HEK 293-Zellen (Wei et al. 2002).

Insgesamt scheint eine adrenerge Stimulation sich somit inhibierend auf den hERG-Kanal auszuwirken. Insofern liefert dieser regulatorische Mechanismus möglicherweise eine pathophysiologische Erklärung für die erhöhte Inzidenz

lebensbedrohlicher Arrhythmien in Situationen physischen und emotionalen Stresses – insbesondere von LQTS-Patienten (Priori et al. 1997).

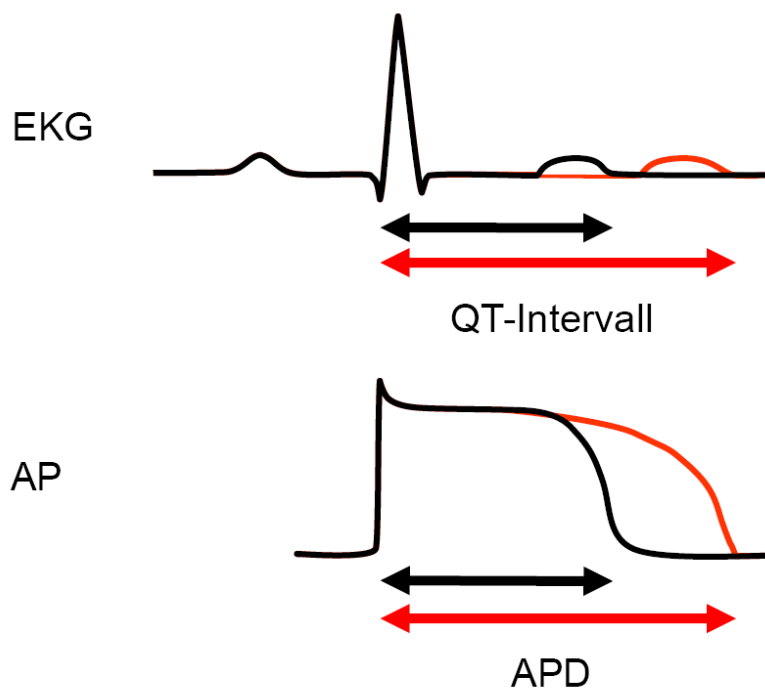


**Abbildung 5: Kv11.1 und seine  $\beta$ -Untereinheit MiRP1.** A,  $\alpha$ -Untereinheit des  $I_{Kr}$ -generierenden  $K^+$ -Kanals (hERG-Kanal) mit 6 Transmembrandomänen. Missensemutationen (rote Markierungen) und Shiftmutationen bzw. Deletionen (blaue Markierungen) führen zu LQT2. B, putative  $\beta$ -Untereinheit MiRP1 des  $I_{Kr}$ -generierenden  $K^+$ -Kanals. Missensemutationen (rote Markierungen) verursachen LQT6. (Modifiziert nach Keating und Sanguinetti 2001).

## 2.2 Das Long QT Syndrom (LQTS)

Das LQTS ist eine Ionenkanalerkrankung, die durch eine Verlängerung des QT-Intervalls im EKG und polymorphe ventrikuläre Tachyarrhythmien vom Torsade de Pointes (TdP) Typ, welche in Kammerflimmern übergehen und somit den plötzlichen Herztod bedingen können, charakterisiert ist (Morita et al. 2008, Moss et al. 1985, Roden et al. 1996, Schwartz et al. 1975, Shimizu et al. 1991, Zipes 1991). Allen Formen

des LQTS ist dabei gemein, dass es auf zellulärer Ebene zu einer Verlängerung des ventrikulären APs kommt (Abbildung 6). Diese Repolarisationsverzögerung resultiert aus der veränderten Aktivität von Ionenkanälen, welche die Zellmembran de- bzw. repolarisieren. Generell wird zwischen dem kongenitalen und erworbenen LQTS unterschieden.



**Abbildung 6: Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen dem QT-Intervall und der Aktionspotentialdauer.** Das QT-Intervall im EKG spiegelt die Aktionspotentialdauer (APD) wider. Kommt es zu einer Verlängerung der QT-Intervalls, so ist dies die Konsequenz einer Verlängerung der APD (Verlängerung jeweils rot dargestellt). AP = Aktionspotential.

### 2.2.1 Das kongenitale LQTS

Die Prävalenz des angeborenen LQTS beträgt schätzungsweise 1/2000 (Schwartz et al. 2009). Wie in Tabelle 1 dargestellt, werden mittlerweile zwölf verschiedene Formen (LQT1 – LQT12) unterschiedenen (Lu und Kass 2010), von denen LQT1, LQT2 und LQT3 mehr als 90% ausmachen (Splawski et al. 2000).

LQT1 wird durch eine Mutation in KCNQ1, das für die  $\alpha$ -Untereinheit des  $I_{Ks}$ -generierenden  $K^+$ -Kanals kodiert, hervorgerufen (Wang et al. 1996). Mutationen von

minK, der  $\beta$ -Untereinheit dieses  $K^+$ -Kanalkomplexes, führen zu LQT5 (Barhanin et al. 1996, Sanguinetti et al. 1996). Eine Mutation in AKAP9, das für Yotiao – einem regulatorischen Adapterprotein von KCNQ1 – kodiert, führt über eine verminderte cAMP-abhängige Phosphorylierung zu LQT8 (Chen et al. 2007). Hingegen kommt es zu einer Verringerung des schnell aktivierenden  $K^+$ -Ausstroms ( $I_{Kr}$ ) bei LQT2 durch eine Mutation in KCNH2 (hERG) (Sanguinetti et al. 1995). Mit dem hERG-Kanal assoziiert ist MiRP1, eine kleine Membranuntereinheit dieses  $K^+$ -Kanalkomplexes. Eine Mutation in KCNE2, das für dieses Protein kodiert, ruft LQT6 hervor (Abbott et al. 1999). LQT4 wird durch eine Mutation in Ankyrin-B verursacht, so dass es über eine beeinträchtigte Verankerung Ankyrin-B-bindender Proteine zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Überladung kommt (Mohler et al. 2003). LQT7 beschreibt die kardiale Manifestation des sog. Andersen Syndroms, einem Symptomenkomplex aus periodischer Paralyse, kardialen Arrhythmien und Dysmorphien, der auf eine Mutation des einwärtsgerichteten  $K^+$ -Kanals Kir2.1 zurückzuführen ist (Plaster et al. 2001). LQT8 kommt durch eine Mutation von Cav1.2, das  $I_{Ca,L}$  generiert, zustande und zeigt sich klinisch als sog. Timothy Syndrom mit zusätzlicher Immunschwäche, intermittierenden Hypoglykämien, kognitiven Defiziten und Autismus (Splawski et al. 2005). Von diesen Fällen einer mutationsbedingten Funktionseinbuße (loss of function) ist LQT3 zu unterscheiden. Hier führt eine Mutation in SCN5A zu einer verminderten Inaktivierung des depolarisierenden  $Na^+$ -Einstroms und damit über einen persistierenden Einwärtsstrom zu einer Funktionszunahme (gain of function) (Wang et al. 1995). Seltenerer gain of function Mutationen, die zu einer Erhöhung von  $I_{Na}$  führen, betreffen das Adapterprotein M-Caveolin (LQT9) (Vatta et al. 2006), die  $\beta_4$ -Untereinheit, kodiert von SCN4B, (LQT10) (Medeiros-Domingo et al. 2007) sowie das mit Nav1.5 assoziierte Strukturprotein  $\alpha_1$ -Synaptophysin (LQT12) (Ueda et al. 2008).

**Tabelle 1: Übersicht der LQT-Subtypen, klassifiziert nach ihrem Pathomechanismus.** (Modifiziert nach Lu und Kass 2010).

Strom	LQT-Subtyp	Genort	Gen	Protein	Funktion	Referenz
$I_{Ks}$	LQT1	11p5.5	KCNQ1	Kv7.1	$\alpha$ -Untereinheit	(Wang et al. 1996)
	LQT5	21q22	KCNE1	minK	$\beta$ -Untereinheit	(Barhanin et al. 1996)
	LQT11	7q21-q22	AKAP9	Yotiao	Adapterprotein	(Chen et al. 2007)
$I_{Kr}$	LQT2	7q35-q36	KCNH2	Kv11.1	$\alpha$ -Untereinheit	(Sanguinetti et al. 1995)
	LQT6	21q22.1	KCNE2	MiRP1	$\beta$ -Untereinheit	(Abbott et al. 1999)
$I_{Na}$	LQT3	3p21	SCN5A	Nav1.5	$\alpha$ -Untereinheit	(Wang et al. 1995)
	LQT4	4q25-q27	ANK2	Ankyrin B	Adapterprotein	(Mohler et al. 2003)
	LQT9	3p25	CAV3	M-Caveolin	( $I_{NaK}$ , $I_{Na-Ca}$ , $I_{Na}$ ) Adapterprotein	(Vatta et al. 2006)
	LQT10	11q23.3	SCN4B	Navb4	$\beta$ -Untereinheit	(Medeiros-D. et al. 2007)
	LQT12	20q11.2	SNTA1	$\alpha$ -1-Syntrophin	Strukturprotein	(Ueda et al. 2008)
$I_{K1}$	LQT7	17q24.3	KCNJ2	Kir2.1	$\alpha$ -Untereinheit	(Plaster et al. 2001)
$I_{Ca,L}$	LQT8	12p13.3	CACNA1C	Cav1.2	$\alpha$ -Untereinheit	(Splawski et al. 2005)

### 2.2.1.1 Perioperatives Management von LQTS-Patienten

Von großem Interesse ist das perioperative Management von LQTS-Patienten. Nicht nur der erhöhte emotionale und physische Stress, sondern auch Medikamente wie Anästhetika, welche bereits für sich genommen eine Verlängerung des QT-Intervalls verursachen können, machen diese Situation für betroffene Patienten hinsichtlich kardialer Ereignisse besonders riskant (Anton und Friederich 2010, Booker et al. 2003, Kies et al. 2005, Pfizenmayer und Friederich 2010). Daneben konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass lebensbedrohliche Arrhythmien in Bezug auf die Umstände ihres Auftretens Genotyp-spezifisch sind (Schwartz et al. 2001). So soll Versuchen mit transgenen Hasen zufolge LQT2 im Gegensatz zu LQT1 ein spezifischer Risikofaktor für Arrhythmien im Rahmen einer Anästhesie mit  $I_{Ks}$ -inhibierenden Medikamenten sein (Odening et al. 2008). Trotz etlicher in der Literatur beschriebener Genotyp-spezifischer Therapieansätze (Compton et al. 1996, Etheridge et al. 2003, Schwartz et al. 1995,

Shimizu et al. 1998, Shimizu et al. 1995, Shimizu et al. 2002) steht ein Genotypspezifischer Ansatz im perioperativen Management – insbesondere hinsichtlich der subtypspezifischen Wahl von Anästhetika – allerdings noch aus.

### 2.2.2 *Das erworbene LQTS*

Eine Vielzahl verschiedener Medikamente sehr unterschiedlicher Substanzklassen wie Antibiotika, Antihistaminika, Antiemetika, Bronchodilatoren und Psychopharmaka können über eine Interaktion mit kardialen Ionenkanälen eine Verlängerung des QT-Intervalls und damit ein erworbenes LQTS hervorrufen (Tabelle 2). Pathophysiologisch beruht dies meist auf einer Blockade von hERG-Kanälen, die dem  $I_{Kr}$  zugrunde liegen. hERG-Kanäle bilden im Gegensatz zu anderen  $K_v$ -Kanälen auf Grund einer fehlenden Prolin-Valin-Prolin Sequenz in der S6-Helix einen großen Hohlraum in der Porenregion, so dass Substanzen ganz unterschiedlicher Struktur zwischen Selektivitätsfilter und Aktivierungstor hochaffin und irreversibel binden können. Die Bindungsstellen sind hier die zwei aromatischen Aminosäuren Tyrosin 652 (Y652) und Phenylalanin 656 (F656), deren Wasserstoffatome und jene der inhibierenden Substanz über  $\pi$ -Elektronen elektrostatisch interagieren. Die Folge dieser Blockade ist eine Abnahme von  $I_{Kr}$ . Die damit verbundene Repolarisationsverzögerung führt zu einer Verlängerung des APs (Mitcheson et al. 2000a, Mitcheson et al. 2000b).

Eine verstärkte Bindungsaffinität des hERG-Kanals zu  $I_{Kr}$ -inhibierenden Substanzen kann außerdem über eine Mutation in dem Gen KCNE2, das für die putative  $\beta$ -Untereinheit MiRP1 kodiert, hervorgerufen werden. Durch Missensemutationen in diesem regulatorischen Protein kann es durch langsames Öffnen und schnelleres Schließen des hERG-Kanals zu einer verzögerten Repolarisation kommen. Dies bleibt in der Regel klinisch stumm bis ein zusätzlicher hERG-Kanal-Inhibitor appliziert wird. So ist insbesondere für die Q9E-hMiRP1 Mutante eine 3-fach höhere Sensitivität gegenüber Clarithromycin beschrieben – es resultiert eine  $I_{Kr}$ -Blockade, die speziell im Rahmen einer Hypokaliämie zu Arrhythmien führen kann (Abbott et al. 1999).

**Tabelle 2: Beispiele für QT-Intervall verlängernde Substanzen.**

<b>Substanzklasse</b>	<b>Substanz</b>	<b>Referenz</b>
Antiarrhythmika	Amiodaron	(Singh 1996)
	Flecainid	(Falk und Fogel 1994)
	Sotalol	(Touboul et al. 1984)
Antibiotika	Moxifloxacin	(Noel et al. 2003)
	Erythromycin	(Milberg et al. 2002)
Antidepressiva	Amitriptylin	(Nishimoto et al. 1994)
	Citalopram	(Grundemar et al. 1997)
Antiemetika	Domperidon	(Drolet et al. 2000)
Antihistaminika	Terfenadin	(Roden 1993)
Bronchodilatoren	Salmeterol	(Milic et al. 2006)
	Terbutalin	(Kuusela et al. 2005)
Lokalanästhetika	Kokain	(O'Leary 2001)
Proteaseinhibitoren	Atazanavir	(Ly und Ruiz 2007)
	Ritonavir	(Anson et al. 2005)
Volatile Anästhetika	Isofluran	(Schmelting et al. 1991)
	Sevofluran	(Han et al. 2010)

### 2.3 Lokalanästhetika

Eine wichtige Substanzgruppe, die eine Verlängerung des QT-Intervalls hervorrufen kann, bilden Lokalanästhetika (Kasten 1986). Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Weiterleitung des neuronalen APs zeit- und spannungsabhängig durch eine reversible Inhibition von Na<sup>+</sup>-Kanälen hemmen (Strichartz und Berde 2000). Hinsichtlich ihrer molekularen Struktur bestehen alle Lokalanästhetika aus einem lipophilen Aromat, einem hydrophilen Amin und einem Bindestück, welches das Lokalanästhetikum entweder als Animoester oder Aminoamid klassifiziert.



### 2.3.1 Lokalanästhetikaintoxikation

Klinisch relevant werden Interaktionen zwischen Lokalanästhetika und kardialen Ionenkanälen im Rahmen einer Lokalanästhetikaintoxikation, welche als Folge unbeabsichtigter intravasaler Injektion, massiver Überdosierung oder gesteigerter Resorption der Substanz in den systemischen Kreislauf ein seltenes Ereignis darstellt, dann aber hinsichtlich ihrer kardialen Komplikationen lebensbedrohlich ist (Strichartz und Berde 2000). Zu einer kardialen Manifestation im Rahmen einer Lokalanästhetikaintoxikation kommt es einer Analyse von 93 Fallberichten zwischen 1979 und 2009 zufolge in über 50 % der Fälle (Di Gregorio et al. 2010). Ventrikuläre Tachyarrhythmien sowie der plötzliche Herztod stellen dabei die denkbar schwerste Folge eines derartigen Ereignisses dar und begründen die insgesamt hohen Gesamtmortalität der Lokalanästhetikaintoxikation (Reiz und Nath 1986).

Die Relevanz von Lokalanästhetikaintoxikationen zeigt sich insbesondere in der geburtshilflichen Anästhesie im Rahmen von Kaiserschnittentbindungen. Dies ist zum einen in dem Wechsel von der Allgemein- hin zur Regionalanästhesie, vor allem der Periduralanästhesie, begründet (Hawkins et al. 1997, Stamer et al. 1998). Zum anderen erhöhen physiologische Veränderungen während der Schwangerschaft, wie etwa die Dilatation der Venen des Periduralraumes, das Risiko einer systemischen Applikation des Lokalanästhetikums *per se* (Bromage 1962). Hinzu kommt, dass durch die physiologische Abnahme der Plasmaproteine während der Schwangerschaft (Song et al. 1970) ein größerer Teil des Lokalanästhetikums ungebunden vorliegt (Tsen et al. 1999). Ob dies einen Einfluss auf die Kardiotoxizität eines Lokalanästhetikums hat, ist jedoch bislang ungeklärt, zumal Berichte über eine erhöhte Toxizität von Bupivacain bei trächtigen Schafen gegenüber nicht trächtigen Schafen (Morishima et al. 1985) nicht reproduziert werden konnten (Santos et al. 1995, Santos und DeArmas 2001).

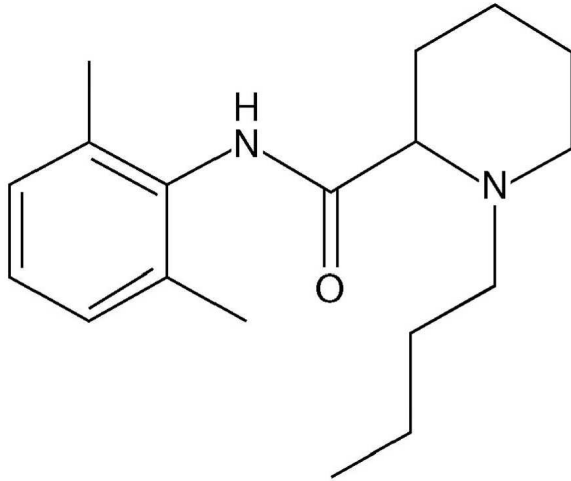
### 2.3.2 Bupivacain

Von großer Bedeutung ist die Kardiotoxizität von Bupivacain – einem Aminoamid Lokalanästhetikum, das sich durch ein Butylende am tertiären Amid auszeichnet und als Razemat gleiche Teile des R- bzw. S-Enantiomers enthält (siehe Abbildung 7). 1957 von Ekenstam erstmals synthetisiert und 1963 zugelassen, gehört es

derzeit zu den wichtigsten langwirksamen Lokalanästhetika in der klinischen Praxis (Ekenstam et al. 1957). 1979 berichtete Albright über sechs Fälle, in denen Bupivacain sowie das ebenfalls sehr lipophile, langwirksame Etidocain zu kardiotoxischen Zwischenfällen führten (Albright 1979). Weitere Fallberichte beschrieben Bupivacainintoxikationen, die zu ventrikulären Arrhythmien und dem plötzlichen Herztod führten und in denen Reanimationsmaßnahmen schwierig oder nicht erfolgreich waren (Davis und de Jong 1982, Mallampati et al. 1984). In Tiermodellen waren durch Bupivacain u. a. Verlängerungen des QT-Intervalls, ventrikuläre Tachykardien vom TdP Typ sowie Kammerflimmern induzierbar (Chang et al. 2001, Kasten 1986, Kotelko et al. 1984, Solomon et al. 1990).

Ausgehend von diesen Beobachtungen sowie der Vorstellung, dass es eine positive Korrelation zwischen der Lipophilie eines Lokalanästhetikums und seiner Kardiotoxizität gebe und das R-Enantiomer von Bupivacain ein höheres Risiko für kardiale Nebenwirkungen als das S-Enantiomer aufweise, fand eine Weiterentwicklung hin zu vermeintlich weniger toxischen Substanzen statt (Heavner 2002). Ropivacain, ein reines S-Enantiomer, ist durch eine Propylgruppe am tertiären Amid gekennzeichnet und erwies sich in verschiedenen Tierversuchen als weniger kardiotoxisch als der Razemat Bupivacain (Bariskaner et al. 2001, Dony et al. 2000, Reiz et al. 1989, Santos und DeArmas 2001). Klinische Anwendung findet außerdem Levobupivacain, das S-Enantiomer von Bupivacain, von dem ebenfalls eine geringere Kardiotoxizität berichtet wird (Bardsley et al. 1998, Foster und Markham 2000).

Trotz dieser vermeintlich sichereren Substanzen findet Bupivacain weiterhin große Verwendung. Insbesondere ein Vergleich der relativen Potenzen unter den Amidlokanästhetika spielt hierbei eine Rolle. Innerhalb der Epidural- und Spinalanästhesie stellt sich analog zur Lipophilie die Rangfolge der Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz wie folgt dar: Bupivacain > Levobupivacain > Ropivacain (Casati und Putzu 2005).



**Abbildung 7: Strukturformel von Bupivacain.** Wie alle Lokalanästhetika besteht Bupivacain aus einer lipophilen aromatischen Ringstruktur, einer Zwischenkette und einer hydrophilen Aminogruppe. Die Zwischenkette kennzeichnet Bupivacain als ein Aminoamid. Bupivacain zeichnet sich darüber hinaus durch ein tertiäres Amid am Butylende aus.

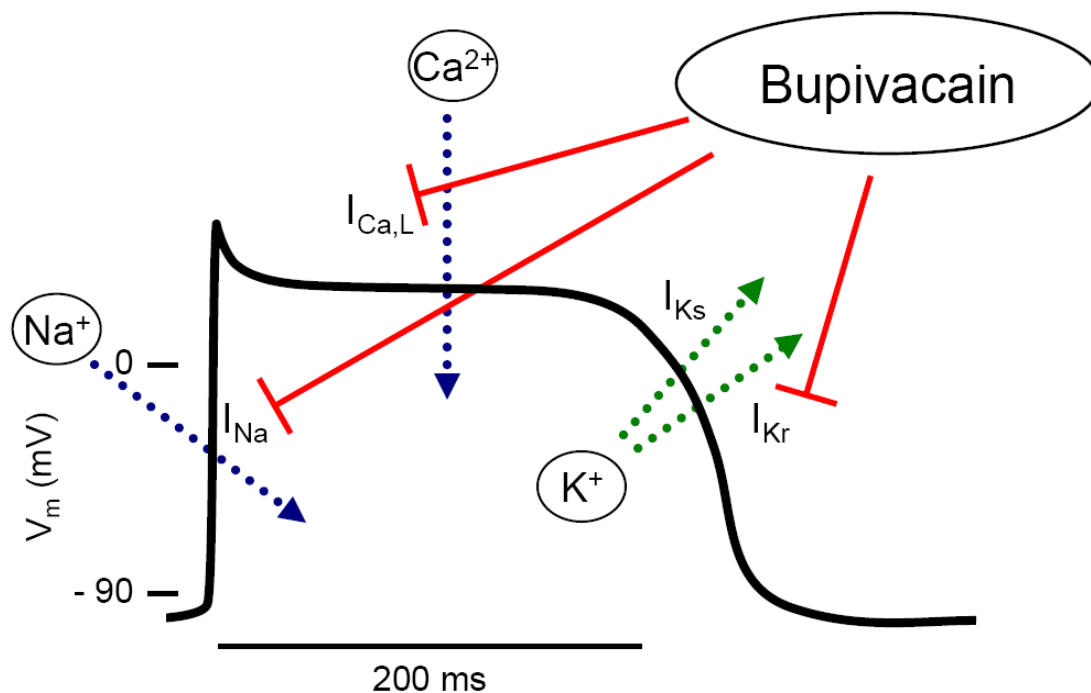
#### 2.3.2.1 Ionenkanalinteraktion von Bupivacain

Verschiedene Mechanismen, über die Bupivacain möglicherweise seinen kardiotoxischen Effekt ausübt, sind vorstellbar. In der Literatur wird insbesondere diskutiert, ob die Kardiotoxizität der Substanz als Folge ihres Effekts auf die Kontraktilität oder auf die Elektrophysiologie des Herzens oder vielmehr als Resultat eines kombinierten Effekts anzusehen ist. Obwohl in diesem Zusammenhang ein negativ inotroper Effekt der Substanz vielfach beschrieben ist, sprechen Fallberichte, in denen Arrhythmien als frühe Zeichen der Kardiotoxizität auftraten, dafür, dass die Kardiotoxizität von Bupivacain vor allem durch den elektrophysiologischen Effekt der Substanz verursacht wird. In Ganztierversuchen und an isolierten Herzen konnte außerdem gezeigt werden, dass der negativ inotrope im Vergleich zum arrhythmogenen Effekt von Bupivacain höhere Konzentrationen der Substanz erfordert. Insofern ist davon auszugehen, dass die Kardiotoxizität von Bupivacain vor allem die Folge eines elektrophysiologischen Effektes und damit einer Ionenkanalinteraktion ist (Butterworth 2010).

Während Einheit darüber herrscht, dass die Hemmung der Reizweiterleitung peripherer Nerven durch Bupivacain über eine  $\text{Na}^+$ -Kanalblockade zustande kommt (Strichartz und Berde 2000), wird der kardiotoxische Effekt der Substanz von verschiedenen Autoren unterschiedlichen kardialen Ionenkanälen zugeordnet.

Insbesondere die Inhibition kardialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle wurde hierbei lange als die einzige Ursache für die Kardiotoxizität des Lokalanästhetikums beschrieben (Clarkson und Hondeghem 1985b). Sowohl für den R- als auch den S-Enantiomer von Bupivacain ist eine Inhibition des humanen  $\text{Na}^+$ -Kanal hH1 nachgewiesen (Nau et al. 2000). In diesem Zusammenhang sind außerdem Regionen im Reizleitungssystem des Herzens beschrieben, in denen – entgegen früherer Annahmen – neuronale  $\text{Na}^+$ -Kanäle gegenüber hH1 prädominieren und möglicherweise den kardiotoxischen Effekt von Bupivacain vermitteln (Butterworth 2010). Allerdings wird mittlerweile die Kardiotoxizität von Bupivacain teilweise auch auf eine Blockade von hERG-Kanälen zurückgeführt (Friederich et al. 2004, Gonzalez et al. 2002, Lipka et al. 1998, Siebrands und Friederich 2007, Siebrands et al. 2005). Die Inhibition von  $I_{\text{Kr}}$  durch Bupivacain ist dabei konzentrations- und spannungsabhängig sowie stereoselektiv (Gonzalez et al. 2002, Siebrands et al. 2005). Essentiell für die reversible Blockade sind – wie für andere Substanzgruppen beschrieben (siehe 2.2.2) – die zwei Aminosäuren Tyrosin 652 (Y652) und Phenylalanin 656 (F656), die im inneren Hohlraum des Kanals lokalisiert sind. So konnte in CHO-Zellen gezeigt werden, dass sich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain nach Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin um das 20- bis 30-fache gegenüber dem Wildtypkanal erhöhen (Siebrands et al. 2005). Threonin 623 (T623), Serin 624 (S624) und Valin 625 (V625) sind weitere Aminosäuren, die tiefer im Hohlraum des Kanals nahe dem Selektivitätsfilter lokalisiert sind und hinsichtlich der hERG-Kanal Blockade durch Bupivacain relevant sind (Siebrands und Friederich 2007). Analog zur Lipophilie von Bupivacain zeigt die Substanz eine vergleichsweise hohe Affinität zu hERG-Kanälen. Sein von Gonzalez et al. beschriebener  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $18 \pm 1,1 \mu\text{mol}$  (Gonzalez et al. 2002) war mit  $22 \pm 2 \mu\text{mol}$  auch unter Verwendung eines anderen Stimulationsprotokolls weitestgehend reproduzierbar (Siebrands et al. 2005). Als weitere Interaktionspartner von Bupivacain wurden die  $\text{K}^+$ -Kanälen Kv1.5 und Kv4.3, welche mit  $I_{\text{Kur}}$  (ultra rapid  $\text{K}^+$  current) und  $I_{\text{to}}$  allerdings nur einen wahrscheinlich geringen Anteil zur Repolarisation der Zellmembran beitragen, identifiziert (Gonzalez et al. 2001, Solth et al. 2005). Die Blockade von  $I_{\text{Ks}}$  fällt im Gegensatz zu  $I_{\text{Kr}}$  vergleichsweise gering aus (Lipka et al. 1998). Auch eine Inhibition von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch Bupivacain ist beschrieben, so dass diese Interaktion als mögliche Ursache des kardiotoxischen bzw. des negativ inotropen Effektes ebenso heranzuziehen ist (Rossner und Freese 1997).

Eine denkbare Inhibition insbesondere von  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Kr}$  durch Bupivacain würde das ventrikuläre AP hinsichtlich seiner Länge maßgeblich beeinflussen (siehe Abbildung 8). Die genaue Auswirkung der Substanz auf die Aktionspotentialdauer (APD) einzelner Kardiomyozyten ist allerdings bislang unklar. Hinsichtlich der Entstehung von ventrikulären Arrhythmien (siehe 2.4) stellt sich insbesondere die Frage, ob Bupivacain durch eine  $I_{Kr}$ -Blockade zu einer Zunahme der APD führt. Auch fehlen bislang Daten darüber, inwieweit Bupivacain im Rahmen eines LQTS die APD beeinflusst und ob hier Repolarisationsverzögerungen möglicherweise häufiger vorkommen. Da davon auszugehen ist, dass die Repolarisation der Zellmembran von Myozyten, denen im Rahmen eines hereditären wie auch erworbenen LQTS eine Komponente des verzögerten  $K^+$ -Ausstroms fehlt, stark von der verbleibenden Komponente abhängt, ist zu erwarten, dass eine  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain in  $I_{Ks}$ -defizienten, also LQT1-ähnlichen Zellen, häufiger zu Repolarisationsverzögerungen führt als in LQT2- bzw. LQT3-ähnlichen Zellen. Ist dies nicht der Fall, führt Bupivacain also in jedem LQT-Modell zu einer überwiegenden Verkürzung der APD, ist demgegenüber davon auszugehen, dass der Effekt von Bupivacain vor allem durch seine Blockade von  $I_{Na}$  und  $I_{Ca,L}$  zustande kommt und eine  $I_{Kr}$ -Blockade hinsichtlich der APD zu vernachlässigen ist. Daher stellt sich auch insbesondere die Frage, ob Bupivacain in verschiedenen Subtypen des LQTS einen unterschiedlichen Effekt auf die APD hat.



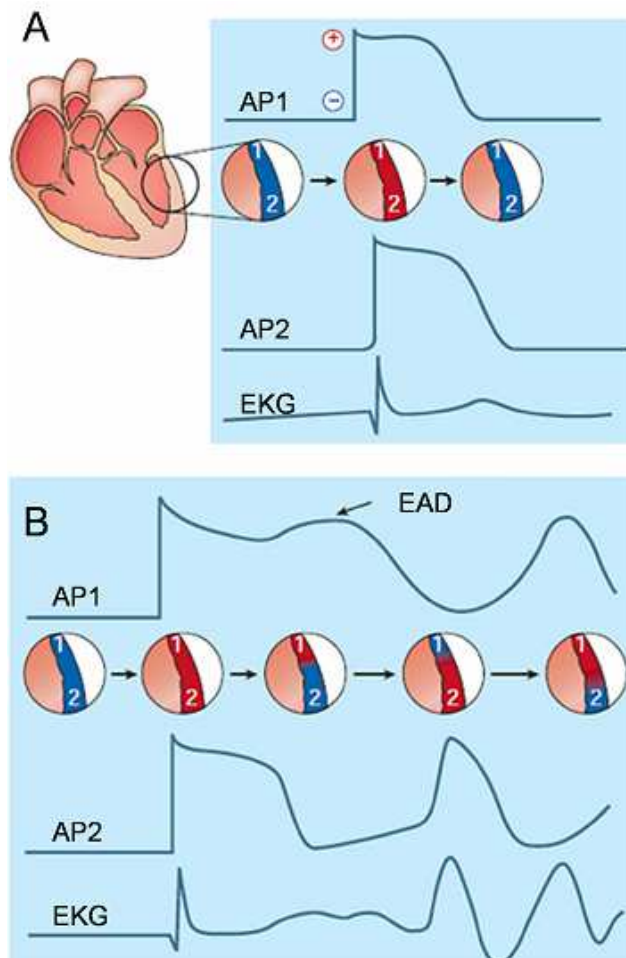
**Abbildung 8: Auswirkung der Blockade von ionalen Strömen durch Bupivacain auf das ventrikuläre Aktionspotential.** Bupivacain interagiert mit verschiedenen Ionenkanälen und beeinflusst infolgedessen möglicherweise die Aktionspotentialdauer (APD). Dabei führen  $I_{Na}$  und  $I_{Ca,L}$  über einen Einwärtsstrom (blaue Pfeile) von  $Na^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Ionen zu einer Depolarisation, die verzögerten  $K^+$ -Ströme  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$  über einen Auswärtsstrom (grüne Pfeile) von  $K^+$ -Ionen zu einer Repolarisation der Zellmembran. Bupivacain ist ein potenter Inhibitor von  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Kr}$  (rote Linien). Während die Substanz somit möglicherweise durch eine Blockade von  $I_{Na}$  und  $I_{Ca,L}$  eine Verkürzung der APD bewirken kann, ist eine Verlängerung der APD durch eine  $I_{Kr}$ -Blockade denkbar. Insofern ist das Verhältnis der Blockade von  $I_{Na}$  und  $I_{Ca,L}$  zu  $I_{Kr}$  für die APD maßgeblich. Da  $I_{Ks}$  nur geringfügig durch Bupivacain inhibiert wird, nimmt der Strom bei gleichzeitiger  $I_{Kr}$ -Blockade möglicherweise die Rolle einer Repolarisationsreserve ein.  $V_m$  = Membranpotential.

#### 2.4 Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen beim LQTS

Die schwerwiegendste Komplikation des LQTS ist die ventrikuläre Arrhythmie vom TdP Typ, die in Kammerflimmern übergehen und den plötzlichen Herztod bedingen kann. Abbildung 9 zeigt einen möglichen zu Grunde liegenden Mechanismus. Dabei werden u. a. frühe (EADs, Early After Depolarizations) und späte (LADs, Late After Depolarizations) Nachdepolarisationen, die während der Phase 2 und 3 des APs (EAD) bzw. nach vollständiger Repolarisation der Zellmembran (LAD) auftreten, für einen entsprechenden Verlauf verantwortlich gemacht. Depolarisieren sie die Zellmembran bis hin zu dem Schwellenpotential, an dem  $Na^+$ -Kanäle erneut öffnen, so kann eine Spontanaktivität der betroffenen Zelle einsetzen, die möglicherweise zu einer kreisenden Erregung führt und somit in einer ventrikulären Tachyarrhythmie resultiert

(Marban 2002). Die Manifestation von EADs ist gewöhnlich mit einer Repolarisationsverzögerung der Zellmembran und damit einer abnormen Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD), wie sie beispielsweise beim angeborenen oder erworbenen LQTS vorzufinden ist, assoziiert (Antzelevitch und Sicouri 1994). Der pharmakologische Einfluss auf die Entstehung von EADs wird vor allem durch eine Verminderung von repolarisierenden  $K^+$ -Strömen, Zunahme des transsarkolemmalen  $Ca^{2+}$ -Stroms (January et al. 1988), Erhöhung der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Marban et al. 1986), Verzögerung der  $Na^+$ -Kanalaktivierung (el-Sherif 1991, el-Sherif et al. 1988) oder durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation (Priori und Corr 1990) vermittelt. LADs sind vor allem mit einer  $Ca^{2+}$ -Überladung der Zelle assoziiert, was u. a. Folge einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation sein kann oder aber im Rahmen einer Digitalisintoxikation auftritt (Antzelevitch und Sicouri 1994). Eine erhöhte Affinität zu Nachdepolarisationen zeigt dabei eine spezifische Zellpopulation – die sog. M-Zellen, welche subepikardial lokalisiert sind und sich durch elektrophysiologische Charakteristika ähnlich denen von Purkinjefasern mit ausgeprägten Aktionspotentialverlängerungen auszeichnen (Antzelevitch et al. 1999, Sicouri und Antzelevitch 1991).

Ein weiterer Mechanismus, der für die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien eine wichtige Rolle zu spielen scheint, besteht in der Dispersion der Repolarisation von aufeinander folgenden APs, so dass benachbarte Zellen mit kürzerem AP vorzeitig erregt werden können. Dieser Mechanismus wäre insbesondere in Regionen des Herzens zu erwarten, an deren Grenzen sich scharfe Übergänge hinsichtlich elektrophysiologischer Charakteristika finden (Habbab und el-Sherif 1990). Auch hier kämen somit M-Zellen in Betracht.



**Abbildung 9: Entstehung von Arrhythmien beim Long QT Syndrom.** A, Aktionspotentiale AP1 und AP2 zweier benachbarter Areale des linken Ventrikels im normalen Myokard. Negativ polarisierte (ruhende) Areale sind blau, depolarisierte Areale sind rot dargestellt. Es resultiert ein normales Elektrokardiogramm (EKG). B, in Teilen des linken Ventrikels (AP1) kommt es zu einer frühen Nachdepolarisation (EAD). Benachbarte, bereits repolarisierte Areale (AP2) werden vorzeitig erregt, was eine ventrikuläre Tachykardie initiiert (EKG). (Modifiziert nach Marban 2002).

## 2.5 Vorgehensweise dieser Arbeit

Die Ausführungen über den Pathomechanismus von Herzrhythmusstörungen beim LQTS machen deutlich, dass eine Repolarisationsverzögerung der Zellmembran hinsichtlich der Entstehung von Arrhythmien beim kongenitalen wie auch erworbenen LQTS eine entscheidende Variabel darstellt. Aus diesem Grund soll im Rahmen der vorliegenden Untersuchung der Effekt von Bupivacain auf das ventrikuläre AP einzelner, nativer Myozyten sowie nach pharmakologischer Induktion eines LQT-ähnlichen Zustandes untersucht werden. Die hierzu verwendeten Zellen entstammen dem linken Ventrikel vom Dunkin-Hartley Meerschweinchen. Jene sind insbesondere geeignet, da die Elektrophysiologie des Herzens dieser Spezies gut charakterisiert ist



und der des Menschen ähnelt. Vor allem die regionale Verteilung der einzelnen Stromkomponenten ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$ ) ist mit dem menschlichen Herzen vergleichbar (Bryant et al. 1997, Davie et al. 2004, Doerr et al. 1990, Main et al. 1998, Varro et al. 1993). Kernstück der Untersuchung ist die Aufzeichnung der APD. Diese – speziell ihre substanzinduzierte Verlängerung – kann als präklinisches Instrument zur Abschätzung des Risikos von Medikamenten, Tachyarrhythmien hervorzurufen, herangezogen werden (Redfern et al. 2003). Im Folgenden wird daher einer Zunahme der APD90 (Aktionspotentialdauer von der Depolarisation bis zur 90 %-igen Repolarisation) um  $> 5\%$  ein erhöhtes Arrhythmogenitätsrisiko zugeschrieben.

Im weiteren Verlauf dieser Analyse sollen die Ergebnisse aus den Patch-Clamp Versuchen in ein computergestütztes Simulationsprogramm, dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) (Luo und Rudy 1991, Siebrands et al. 2006) übertragen werden, um die in Frage kommenden Ionenkanalinteraktionen von Bupivacain zu quantifizieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patch-Clamp

Die im Rahmen der vorliegenden Analyse verwendete Patch-Clamp Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann veröffentlicht und stellt eine Weiterentwicklung des Voltage-Clamp Verfahrens dar (Neher und Sakmann 1976). Hiermit ist es möglich, den Strom einzelner Ionenkanäle unter Minimierung des elektrischen Hintergrundrauschens aufzuzeichnen. Mit einer Glaspipette, die mit einer definierten Elektrolytlösung (Pipettenlösung) gefüllt ist, wird dabei unter einem hohen elektrischen Abdichtwiderstand (dem sog. Seal) ein Kontakt zwischen Pipette und einem Membranfleck (Patch) hergestellt. Extrem hohe Abdichtwiderstände im Bereich von 10-100 G $\Omega$ , die durch Anlegen eines Unterdrucks und Verwenden sauberer und polierter Pipettenoberflächen erreicht werden können, werden als Giga-Seals bezeichnet. Sie ermöglichen hohe Auflösungen bei geringem Hintergrundrauschen durch die Reduktion von Leckströmen, die zwischen Pipette und dem Patch in das Zellbad fließen (Hamill et al. 1981). Die molekulare Grundlage für das Zustandekommen einer derartig hohen elektrischen Isolation ist dabei teilweise ungeklärt (Milton und Caldwell 1990). Hinzu kommt, dass Giga-Seals mechanisch überaus stabil sind, so dass man unter Bildung eines Membranvesikels minutenlange Versuche auch unter Lösungswechsel durchführen kann (Hamill et al. 1981, Horn und Patlak 1980).

Ausgehend von der nach Sealbildung erreichten cell-attached Konfiguration kann man je nach Fragestellung verschiedene Messkonfigurationen vornehmen. In dieser Arbeit wurde die whole-cell Konfiguration verwendet, auf die im Folgenden eingegangen wird.

#### 3.1.1 Die whole-cell Konfiguration

Um die Spannung der Zellmembran zu messen und APs zu generieren, wurde die whole-cell Konfiguration verwendet. Hierbei durchbricht man ausgehend von der cell-attached Konfiguration unter Erhalt des Seals den Membranbereich unterhalb der Pipette durch Applikation hochfrequenter und hochamplitudiger Wechselspannung und

anschließenden Über- bzw. Unterdrücken (ruptured patch). Mit dem Durchbrechen der Zellmembran kommt es zum Lösungsaustausch zwischen Pipette und Zellinnern. Ein erheblich höheres Pipetten- als Zellvolumen führt hierbei dazu, dass die intrazelluläre Ionenkonzentration im Wesentlichen an die der Elektrolytlösung der Pipette angeglichen wird. Diese Äquilibration geschieht dabei innerhalb weniger Sekunden (Marty und Neher 1995, Pusch und Neher 1988). Nicht außer Acht gelassen werden darf die Tatsache, dass es bei der ruptured patch Technik zur whole-cell Ableitung intrazellulär auch zu einem Verlust von Makromolekülen bis zu einer Größe von 20 kD kommt. Insbesondere der Verlust von Second-Messenger-Systemen, die mit Ionenkanälen interagieren und diese in ihrer Funktion beeinflussen, kann zu einem sog. Rundown der Kanäle, also einer fortschreitenden Abnahme gemessener Ströme, führen. Alternativ ist daher neben der verwendeten ruptured patch Technik die perforated patch Technik beschrieben, bei der man mit Nystatin oder Amphotericin eine Porenbildung in der Zellmembran unter Vermeidung einer Diffusion größerer Moleküle herbeiführt (Horn und Marty 1988, Rae et al. 1991). Letztere wurde in dieser Arbeit auf Grund der großen Dauer bis zur Herstellung eines elektrischen Zugangs in die Zelle jedoch nicht verwendet.

### *3.1.2 Voltage-Clamp und Current-Clamp*

Hinsichtlich der elektrischen Registrierkonfiguration unterscheidet man bei einem elektrischen Zugang zu einer Zelle die Voltage-Clamp von den Current-Clamp Messungen. Voltage-Clamp Messungen sind dadurch gekennzeichnet, dass dem durch die Membran fließenden Strom ein gleich großer Kompensationsstrom mit Hilfe eines Vorverstärkers entgegengesetzt und dadurch eine Änderung des Membranpotentials verhindert wird (sog. Spannungsklemme). Im Current-Clamp Modus hingegen wird der Strom in der Membran fest vorgegeben und die Änderung des Membranpotentials gemessen. Letzterer Modus ist somit Ausgangspunkt für die Messung des Membranpotentials und Generierung von APs.

### 3.1.3 Elektrische Eigenschaften der whole-cell Ableitung

In der whole-cell Ableitung ist die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden. Dabei wird der Kompensationsstrom  $I$ , der in der Voltage-Clamp Konfiguration die Spannung konstant hält, gemessen. Stellt man sich die Zellmembran als Ohmschen Widerstand vor, gilt dabei:

$$I = (U_{soll} - E_m) \cdot g$$

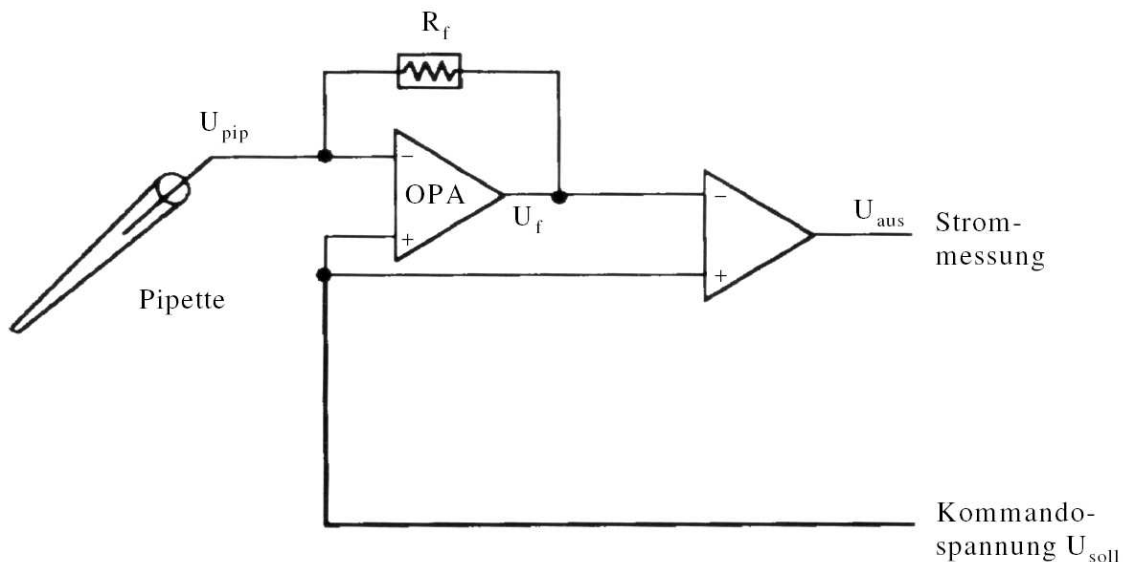
$U_{soll}$  ist hierbei die Spannung, die im Versuch festgelegt wird. Sie wird auch als Soll- bzw. Kommandospannung bezeichnet.  $E_m$  stellt das Gleichgewichtspotential dar, also das Potential, bei dem kein Strom über die Membran fließt. Die Leitfähigkeit  $g$  lässt sich dann bei Messung des Kompensationsstromes  $I$  errechnen.

Um den Kompensationsstrom  $I$  bei gleichzeitigem Anlegen einer Kommandospannung  $U_{soll}$  mit nur einer Elektrode zu messen, gehört zu den wichtigsten Funktionseinheiten eines Patch-Clamp Verfahrens ein sog. Strom-Spannungs-Wandler, der im Vorverstärker lokalisiert ist. Er besteht im Wesentlichen aus einem Operationsverstärker und einem Rückkopplungswiderstand (Abbildung 10). An dem Operationsverstärker liegen die Spannung der Pipette  $U_{pip}$  und die Kommandospannung  $U_{soll}$ , also die im Versuch gewünschte Spannung, an. Der Eingangswiderstand des Operationsverstärkers liegt dabei im Bereich von  $10^{12} \Omega$ , so dass durch die angelegte Spannung idealisiert kein Strom in ihn hineinfließt. Kommt es zu einer Differenz zwischen Pipettenspannung  $U_{pip}$  und Kommandospannung  $U_{soll}$ , so erzeugt der Operationsverstärker eine vielfache und proportionale Spannung dieser Differenz zwischen seinem Ausgang und der Pipette. Diese Spannung erzeugt einen Strom, der über den Rückkopplungswiderstand nur in die Pipette fließen kann und somit die Pipettenspannung  $U_{pip}$  der Kommandospannung  $U_{soll}$  angleicht (Numberger und Draguhn 1996).

Allerdings entspricht jene Kommandospannung  $U_{soll}$  nicht der tatsächlich an der Zellmembran anliegenden Spannung  $U_m$ , da dem Membranwiderstand  $R_m$  der Serienwiderstand  $R_s$  vorgeschaltet ist. Dieser entsteht durch Membranbestandteile, die beim Durchbrechen der Zellmembran in die Pipettenöffnung gelangen und würde somit im Idealfall, also bei freier Pipettenöffnung, dem Pipettenwiderstand  $R_{pip}$  entsprechen. Je höher jedoch der Serienwiderstand  $R_s$  ist, desto größer ist auch der Abfall der

Kommandospannung  $U_{\text{soll}}$  noch vor der Zellmembran, so dass das eigentliche Membranpotential  $U_m$  umso mehr vom Kommandopotential abweicht.

Das mittlere Ruhemembranpotential aller Versuche dieser Arbeit lag bei  $-84,59 \pm 0,33 \text{ mV}$  ( $n = 429$ ); der mittlere Pipettenwiderstand betrug  $4,02 \pm 0,12 \text{ M}\Omega$  ( $n = 127$ ).



**Abbildung 10: Aufbau des Vorverstärkers.** Der Operationsverstärker (OPA) misst die Differenz zwischen der Kommandospannung  $U_{\text{soll}}$  und dem Pipettenpotential  $U_{\text{pip}}$  und gibt sie als  $U_f$  an seinem Ausgang an. Über den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  fließt der die Differenz ausgleichende Strom  $I_f$  in die Pipette. Die Differenz zwischen  $U_{\text{soll}}$  und  $U_f$  ist die Ausgangsspannung und ist direkt proportional zu  $I_f$ . (Modifiziert nach Numberger und Draguhn 1996).

### 3.1.4 Vorzeichenkonventionen

Die Richtung der Ladungsverschiebungen wird definitionsgemäß aus der Perspektive der Zelle aufgezeichnet. Ist das Zellinnere verglichen mit dem Zelläußeren negativ, liegen negative Membranpotentiale vor, es besteht dann eine sog. Membranhyperpolarisation; von einem positiven Membranpotential und somit einer Membrandepolarisation spricht man hingegen bei vergleichsweise positivem Zellinneren zum Extrazellularraum. In den Abbildungen werden Membranhyperpolarisation definitionsgemäß nach unten, Membrandepolarisation nach oben dargestellt.

## 3.2 *Der Patch-Clamp Versuchsstand*

### 3.2.1 *Messtisch und mechanische Komponenten*

Um die Bewegungen zwischen Zelle und Pipette bei Patch-Clamp Experimenten zu minimieren, ist es notwendig, den Messplatz vor Erschütterungen zu schützen. Hierzu wurde ein durch Luftkissen schwingungsgedämpfter Steintisch (T-250, Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Auf ihm befanden sich Mikroskop, Messkammer, Mikromanipulator, Pipettenhalter und Vorverstärker. Zur Optimierung des Signal-Rauschverhältnisses war des Weiteren der gesamte Messstand von einem geerdeten, faradayschen Käfig zur elektrischen Abschirmung umgeben.

Zur optischen Beurteilung der Zellen wurde als Mikroskop das Modell Axiovert 25 (Zeiss) verwendet. Varelkontrastobjektive und 10-fach vergrößernde Okulare ermöglichten eine 100- bzw. 400-fache Vergrößerung. Der inverse Aufbau des Mikroskops, bei dem das Objektiv nach oben gerichtet ist und man somit das Präparat von unten betrachtet, erlaubte ausreichenden Platz für Pipette, Badperfusion und andere Aufbauten. Zusätzlich war das Mikroskop über eine Kamera (CCD-Iris, Sony) mit einem Monitor verbunden. Dies ermöglichte auch während der Versuche die optische Zustandskontrolle der gepatchten Zelle, um eine mögliche Veränderung bzgl. Form und Größe frühzeitig erkennen zu können.

Zur präzisen Annäherung der Pipette an die Zelle wurde ein motorgetriebener Mikromanipulator (HS6/3 Märzhäuser) verwendet. An ihm waren Vorverstärker und Pipettenhalter (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) befestigt. Er war über einen Schlauch mit einem Mundstück bzw. einer Glasspritze verbunden, so dass Über- und Unterdrücke an der Zelle aufgebaut und gehalten werden konnten. Der Druck wurde dabei mit einem flüssigkeitsgefüllten Glasrohr gemessen.

### 3.2.2 *Messkammer und Kammerperfusion*

Alle Versuche wurden in einer einfachen, runden Messkammer (Eigenbau der Werkstatt) mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Höhe von 4 mm durchgeführt. Zum Objektiv hin wurde sie durch ein Deckgläschen begrenzt. In ihrer Wand befanden sich zwei Aussparungen, von denen eine für den Zulauf der Kammerperfusion genutzt

wurde. Innerhalb der Messkammer befanden sich Mess- und Referenzelektrode sowie Temperatursonde und Absaugpipette. Letztere hielt das Volumen der Badlösung durch ständigen Unterdruck bei maximal 1,26 ml konstant. Die Temperaturregelung geschah über ein Temperaturkontrollsystem (TC-20, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland). Hierbei konnte sowohl die Temperatur der Kammer direkt über eine Heizplatte als auch die Temperatur der Kammerperfusion mittels einer Perfusionsheizung (HPT-2A Heated Perfusions Tube, ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY, USA) reguliert werden, so dass die Temperatur im Bad auch unter Lösungswechsel stets 37° C betrug. Die Badperfusion und Applikation von Substanzen wurden mit einem computergesteuerten Perfusionssystem (Octaflow™, ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY, USA) durchgeführt. Aus maximal acht 60 ml-Spritzen konnten dabei Lösungen unter gleich bleibender Fließgeschwindigkeit bei einem durch das Perfusionssystem voreingestellten Druck über Perfusionsschläuche in einem sog. Millimanifold (ALA MLF-8, ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY, USA) konfluieren, um dann in einem Schlauch über die Perfusionsheizung in das Bad zu fließen. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug dabei ca. 5 ml/min.

### *3.2.3 Elektronische Komponenten*

Zu den wichtigsten elektronischen Komponenten eines Patch-Clamp-Amplifiers gehören Vorverstärker und Hauptverstärker. Ersterer misst den Strom und legt über den beschriebenen Strom-Spannungs-Wandler Mechanismus (siehe 3.1.3) eine Kommandospannung zwischen Pipette und Zellinnern an. Er war erschütterungsfrei am Mikromanipulator befestigt. Der Hauptverstärker fungiert als Steuereinheit und ermöglicht eine Verstärkung und Filterung des Signals. Verwendet wurde der EPC-9 (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland), ein Verstärker, der nach dem Prinzip des Rückkopplungswiderstandes arbeitet und sowohl für Einzelkanalableitungen als auch Ganzzellmessungen geeignet ist. Die digitale Steuerung des EPC-9 erfolgte mit einer entsprechenden Software („Pulse“, HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) über einen Apple PowerMacintosh 9500/200. Die Referenzelektrode, bestehend aus einem Silber/Silberchlorid-Pellet, befand sich im Zellbad; die Silberdraht-Messelektrode des Vorverstärkers, die sich mit den vorderen 3-4 mm in der Pipettenlösung der Messpipette befand, wurde regelmäßig mit einer 100 mmol/L KCl-Lösung chloriert.

### 3.2.4 Patchpipetten

Die verwendeten Patchpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (GC150-15, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd., England) an dem jeweiligen Versuchstag hergestellt. Die Maße der Glaskapillaren betragen wie folgt: Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 0,86 mm, Länge: 7,5 cm. Zur Herstellung der fertigen Patchpipetten wurden die Glaskapillaren der Länge nach halbiert und mit Hilfe eines Pipettenziehgeräts (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA) zwei Pipetten aus je einer Hälfte hergestellt. Dazu wurde die Glaskapillare in das Pipettenziehgerät eingespannt sowie die Temperatur des Glühfilaments, Zuggeschwindigkeit, Zugkraft und Anzahl der Ziehstufen programmiert. In mehreren Zyklen wurde nun die Glaskapillare intermittierend erhitzt und der Länge nach auseinander gezogen, so dass sie in der Mitte immer dünner wurde und man letztlich zwei Pipetten durch Zerreißen an der dünnsten Stelle erhielt. Anschließend wurde jede Pipette mit Hilfe eines Glühdrahtes unter dem Mikroskop (Leitz LaborLux S, Leica) an ihrer Spitze angeschmolzen, um ihre Oberfläche zu glätten. Das Befüllen der Patchpipette erfolgte zunächst von ihrer Spitze aus, indem die Pipettenspitze bei gleichzeitigem Anlegen eines Unterdrucks von hinten in ein Becherglas mit Pipettenlösung getaucht wurde (sog. tip filling). Nach diesem Schritt wurde die Pipette schließlich von hinten mit einer Spinalkanalpunktionsnadel mit Pipettenlösung aufgefüllt (sog. back filling), um zuletzt die hinteren 2/3 der Pipettenlösung erneut aus der Pipette zu entfernen und durch Klopfen noch verbliebene Luftblasen in ihrer Spitze zu beseitigen.

### 3.2.5 Versuchslösungen und Chemikalien

#### 3.2.5.1 Versuchslösungen

Nachfolgend sind in Tabelle 3 die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen zusammengestellt.



**Tabelle 3: Verwendete Lösungen.** HEPES entspricht 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, EGTA entspricht Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat.

Bezeichnung	Bestandteile (mmol/L)	Titriert mit
Tyrode	NaCl 138, KCl 4, MgCl <sub>2</sub> 1, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,33, Glukose 10, HEPES 10	NaOH auf pH 7,4
Badlösung	NaCl 138, KCl 4, MgCl <sub>2</sub> 1, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,33, Glukose 10, HEPES 10, CaCl <sub>2</sub> 2	NaOH auf pH 7,4
Pipettenlösung	Glutaminsäure 120, KCl 10, MgCl <sub>2</sub> 2, EGTA 10, HEPES 10, Na <sub>2</sub> ATP 2	KOH auf pH 7,2

### 3.2.5.2 Herkunft verwendeter Chemikalien

Nachfolgend sind in Tabelle 4 die verwendeten Substanzen mit dem jeweiligen Hersteller aufgeführt.

**Tabelle 4: Herkunft verwendeter Substanzen.** HEPES entspricht 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, EGTA entspricht Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat, DMSO entspricht Dimethylsulfoxid.

Substanz	Hersteller
Bupivacain	SIGMA (B-5274)
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Chromanol 293B	Tocris
DMSO	SIGMA (D-2650)
EGTA	SIGMA (E-4378)
E-4031	Tocris
Glukose	Merck
Glutaminsäure	Fluka
Heparin	Merck

HEPES	SIGMA (H-3375)
KCl	Merck
Kollagenase	Biochrom AG
MgCl <sub>2</sub>	SIGMA (M-9272)
Na <sub>2</sub> ATP	SIGMA (A-2383)
NaCl	J.T. Baker
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Protease	SIGMA (P-5147)
Thiopenthal	Altana Pharma Deutschland GmbH
Veratridin	SIGMA (V-5754)

### 3.3 Isolation einzelner Kardiomyozyten vom Dunkin-Hartley Meerschweinchen

Genehmigt von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit u. Verbraucherschutz – Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg stammten die in allen Versuchen verwendeten Kardiomyozyten aus der freien Wand des linken Ventrikels männlicher Dunkin-Hartley Meerschweinchen (250-500 g, Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Der Methode von Isenberg und Klöckner folgend (Isenberg und Klockner 1982, Volk et al. 1999) wurde hierbei ein enzymatischer Verdau mittels Perfusion des explantierten Herzens über die Langendorff Apparatur durchgeführt. Dabei wurden die Meerschweinchen im Vorfeld durch eine intraperitoneale Injektion von Thiopenthal-Na<sup>+</sup> (100 mg/kg KG) narkotisiert und ihnen bei ausreichender Hypnose über einen Parasternalschnitt das Herz explantiert, um dieses dann zügig in eine kardioplege Lösung (Tyrode mit ca. 4° C) zu legen. Nach einer raschen Freipräparation zur Darstellung der Aorta und Entfernung von Fett und Herzbeutel wurde anschließend die Aorta mit Hilfe der Langendorff Apparatur kannüliert und sofort mit 50 ml Tyrode (+5 µl Heparin 1000 IU/L) retrograd perfundiert. Die Perfusion wurde dann 5 Minuten ausschließlich mit Tyrode, anschließend 12 Minuten mit kollagenase- (Typ CLS II, 200 U/ml Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und proteasehaltiger (Typ XIV, 0,7 U/ml, SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) Tyrode und schließlich 5 Minuten mit 200 µmol/L Ca<sup>2+</sup>-angereicherter Tyrode fortgesetzt. Alle Perfusionslösungen hatten dabei eine Temperatur von 37° C und waren mit 100 % O<sub>2</sub> äquillibriert. Nach diesem Schritt wurde die freie Wand des

linken Ventrikels vom Rest des Herzens isoliert und in mit 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ -angereicherter Tyrode durch Zupfen und Schwenken ein weiteres Ablösen einzelner Zellen aus dem Zellverband induziert. Die somit entstandene Zellsuspension wurde dann durch Mullkompressen (Mullkompressen Set, 10x10 cm, 12-fach, steril, Fuhrmann Verbandstoffe GmbH) gefiltert und bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde aufbewahrt, bis sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Behältnis mit der Badlösung aufgefüllt. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden ausschließlich stäbchenförmige Zellen, die eine deutliche Querstreifung aufwiesen und nicht zu Spontankontraktionen neigten, verwendet.

### *3.4 Durchführung der Versuche*

#### *3.4.1 Erstellen eines Giga-Seals*

Zur Durchführung eines Versuches wurden etwa 0,05 mL der gewonnenen Zellsuspension mit einer Pipette in das mit Badlösung gefüllte und auf ca. 20° C temperierte Zellbad überführt. Nach wenigen Minuten hatten sich die Zellen auf dem Deckgläschen abgesetzt, so dass jetzt eine geeignete, stäbchenförmige, quergestreifte Zelle, die nicht spontan kontrahierte, mit Hilfe der 100- bzw. 400-fachen Vergrößerung des Mikroskops ausgesucht werden konnte. Eine mit Pipettenlösung gefüllte, unbenutzte und saubere Pipette wurde nun im Pipettenhalter unter luftdichtem Verschluss fixiert, so dass die Pipettenlösung etwa die vorderen 3-4 mm der chlorierten Silber-Messelektrode bedeckte. Unter Verwendung der Glasspritze wurde dann ein leichter Überdruck im Pipetteninneren angelegt, um durch ständiges Ausströmen von Pipettenlösung ein Verschmutzen der Pipettenspitze im Zellbad zu verhindern. Nach dem Eintauchen der Pipette in das Zellbad wurde zur Korrektur von Grenzschichtpotentialen die Einstellung des Nullpunktes hinsichtlich des Potentials am Verstärker vorgenommen; d.h. das gemessene Potential wurde als Null definiert. Mit dem Mikromanipulator wurde nun die Pipettenspitze an die ausgesuchte Zelle unter visueller Kontrolle herangeführt, wobei der Computer einen bevorstehenden Kontakt mit der Zelloberfläche durch eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes anzeigte. Der angelegte Überdruck auf der Pipette wurde jetzt auf ein Minimum reduziert und die

Pipettenspitze unter der 400-fachen Vergrößerung des Mikroskops soweit mit der Zelloberfläche in Kontakt gebracht, bis sich der Pipettenwiderstand im Vergleich zum Ausgangswert in etwa verdoppelt hatte. Zur Ausbildung eines Giga-Seals wurde dann mit Hilfe der Glasspritze ein Unterdruck in der Pipette aufgebaut und die unter der Pipettenmündung liegende Membran angesaugt. Lag der elektrische Abdichtwiderstand im Bereich von mehreren  $G\Omega$ , so konnte ausgehend von der nun erreichten cell-attached Konfiguration durch die ruptured patch Technik in den whole-cell Modus übergegangen werden. Die Zelle wurde dann auf  $-90$  mV geklemmt (Voltage-Clamp) und über das Perfusionssystem kontinuierlich Badlösung appliziert. Anschließend fand eine Bestimmung der Zellkapazität  $C_m$  und des Serienwiderstands  $R_s$  statt. Danach konnte in den Current-Clamp Modus gewechselt werden. Hier wurden durch Stromreize APs generiert und gemessen.

#### *3.4.2 Messung von Aktionspotentialen*

APs wurden im Current-Clamp Modus, in dem das Membranpotential bei vorgegebenem Strom gemessen wurde, generiert. Durch Stromreize mit einer maximalen Stromstärke von  $1000$  mA, einer maximalen Länge von  $20$  ms und einer Frequenz von  $0,5$  Hz wurde dabei die Zellmembran depolarisiert und die Reizantwort der Zelle als Spannung gegen die Zeit aufgezeichnet. Mit geringen Stromreizen beginnend wurde zunächst die Reizschwelle der Zellmembran ausgemacht. Kam es zu einer Reizantwort in Form eines APs, so wurde die Temperatur mittels Bad- und Perfusionserwärmung auf  $37^\circ$  C hochgeregelt und die Frequenz kontinuierlicher Stromreize auf  $1$  Hz erhöht. Mit Zunahme der Temperatur kam es dabei zu einer Verkürzung der APD. Bei konstanter Temperatur und APD wurden  $30$  APs für die Kontrollgruppe gemessen. Danach konnten verschiedene Substanzen über das Perfusionssystem eingewaschen werden. Die Einwaschzeit betrug hierbei ca.  $3$  Minuten.  $30$  APs wurden auch hier erst gemessen, wenn sich hinsichtlich der APD ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Es wurde darauf geachtet, dass die Temperatur dem Ausgangswert in der Kontrollgruppe entsprach. Die Anzahl der eingewaschenen Substanzen hing von der jeweiligen Versuchsreihe ab und betrug maximal vier.

### 3.4.3 Substanzapplikation und Versuchsreihen

Die Applikation aller Substanzen geschah über das Perfusionssystem (Octaflow<sup>TM</sup>). Alle Substanzen waren in Badlösung gelöst und wurden ca. 3 min eingewaschen. 30 anschließend aufgezeichnete APs wurden ausgewertet.

#### 3.4.3.1 Bupivacain

Um den Effekt des Lokalanästhetikums Bupivacain auf die APD und Entstehung von Arrhythmien zu untersuchen, wurde es sowohl in Versuchsreihen mit nativen Myozyten als auch in solchen, bei denen vorher ein LQT-ähnlicher Zustand induziert worden war, eingewaschen. Dazu wurde ausgehend von einer Bupivacain-Stammlösung (1 mmol/L) zunächst eine logarithmische Verdünnungsreihe (0,001-300  $\mu\text{mol/L}$ ) erstellt, wobei es in maximal vier verschiedene Konzentrationen pro Versuch in aufsteigender Reihenfolge in die Extrazellulärlösung appliziert wurde. In den LQT-Modellen wurde Bupivacain in einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/L}$  eingewaschen.

#### 3.4.3.2 Pharmakologische Induktion von LQT1, LQT2 und LQT3

In geeigneten Zellen wurde ein LQT1-, LQT2- oder LQT3-ähnlicher Zustand jeweils durch pharmakologische Interaktion mit dem betreffenden Ionenkanal induziert. Zur Induktion von  $I_{Ks}$ -defizienten, LQT1-ähnlichen Zellen wurde eine selektive  $I_{Ks}$ -Blockade mittels Chromanol 293B (10  $\mu\text{mol/L}$ ) durchgeführt (Bosch et al. 1998, Schwoerer et al. 2010).  $I_{Kr}$ -defiziente, LQT2-ähnliche Zellen wurden mit dem selektiven  $I_{Kr}$ -Inhibitor E4031 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) induziert (Sanguinetti und Jurkiewicz 1990, Sanguinetti et al. 1991, Schwoerer et al. 2010). Veratridin (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) verhindert die Inaktivierung von  $I_{Na}$  und wurde zur Induktion von LQT3-ähnlichen Zellen verwendet (Gerhardy et al. 1998, Hiraoka et al. 1992, Milberg et al. 2005a, Ulbricht 1998). Zur Herstellung der Stammlösung wurde das wasserlösliche E4031 in destilliertem Wasser gelöst; Chromanol 293B und Veratridin hingegen sind nicht wasserlöslich und wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Die maximale Badkonzentration von DMSO betrug 14 nmol/L, welche in früheren Untersuchungen keinen Effekt auf das AP zeigte.

Um den pharmakologisch induzierten Kanaldefekt von dem genetisch determinierten LQTS abzugrenzen, werden im Folgenden die Bezeichnungen LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> sowie LQT3<sub>Vera</sub> verwendet.

#### 3.4.3.3 *Versuchsreihen*

Wenn im Rahmen eines Patch-Clamp Versuchs unterschiedliche Substanzen appliziert wurden, so wurde die nachfolgende Substanz, wie in Tabelle 5 dargestellt, immer zusätzlich zu den vorherig applizierten Substanzen dem Zellbad zugeführt. Zunächst wurde im Rahmen einer Verdünnungsreihe der Effekt von Bupivacain auf das AP untersucht. Die Ergebnisse der Versuche, in denen nativen Zellen 3 µmol/L Bupivacain appliziert wurden, gehen dabei im Folgenden nicht nur in das Kapitel „4.1.1 *Verdünnungsreihe*“ ein. Sie sind darüber hinaus gesondert in dem Kapitel „4.1.2 *Bupivacain (3 µmol/L)*“ dargestellt. Die Ergebnisse der Versuchsreihen, in denen zunächst LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> bzw. LQT3<sub>Vera</sub> induziert und dann zusätzlich 3 µmol/L Bupivacain appliziert wurde, sind in ihrer Darstellung in die Kapitel „4.2.1 *Etablierung der LQT-Modelle*“ und „4.2.2 *LQT-ähnliche Zellen – Bupivacain (3 µmol/L)*“ aufgeteilt.

**Tabelle 5: Patch-Clamp Versuchsreihen.** Aufgeführt sind die einzelnen Versuchsreihen dieser Arbeit, wobei ausgehend von Kontrollmessungen (Kontrolle) verschiedene Lösungen additiv zur vorherigen Lösung appliziert wurden. Zu beachten ist, dass 32 Versuche der Verdünnungsreihe, in denen nativen Myozyten 3 µmol/L Bupivacain appliziert wurde, im Ergebnisteil zusätzlich gesondert aufgeführt werden. n = Anzahl der Versuche.

Versuchsreihe	Kontrolle	+ Lösung 1	+ Lösung 2	+ Lösung 3
Verdünnungsreihe	Native Myozyten (n = 67)	Bupivacain in ansteigenden Konzentrationen 0,01 – 300 µmol/L		
LQT1 <sub>C293B</sub>	Native Myozyten (n = 33)	Chromanol 293B (n = 33)	3 µmol/L Bupivacain (n = 33)	
LQT2 <sub>E4031</sub>	Native Myozyten (n = 18)	E4031 (n = 18)	3 µmol/L Bupivacain (n = 18)	
LQT3 <sub>Vera</sub>	Native Myozyten (n = 16)	Veratridin (n = 16)	3 µmol/L Bupivacain (n = 16)	

### 3.5 Auswertung der Versuche

Aus den über die Steuersoftware („Pulse“, HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) auf der Festplatte des Apple PowerMacintosh 9500/200 gespeicherten Daten wurden zunächst jeweils 30 APs ausgesucht, über eine zweite Software („Igor“, WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, USA) ausgewertet und nach nach „Excel“ („Office 2007“, Microsoft, USA) überführt. Für die statistische Auswertung sowie graphische Abbildungen wurde das Programm „Prism 4.0“ (Graphpad Software, San Diego, USA) verwendet. Alle dargestellten Werte entsprechen dabei dem arithmetischen Mittel mehrerer Versuche, wobei der Standardfehler vom Mittelwert – im Folgenden SEM („Standard Error of the Mean“) genannt – die Abweichung von diesem angibt. Die statistische Signifikanz wurde mit einer stets einfaktoriellen ANOVA („analysis of variance“) gefolgt von einem gepaarten Bonferroni Multiple Comparison Test oder einem gepaarten t-Test bestimmt. Um das Risiko von Aktionspotentialverlängerungen unterschiedlicher Modelle miteinander zu vergleichen, wurde mit einem Chi Quadrat

Test auf statistische Signifikanz getestet. Generell ist von einem signifikanten Unterschied die Rede, wenn  $p < 0,05$ . Graphisch ist dies für die Zufallswahrscheinlichkeit wie folgt dargestellt: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.5.1 APD90

Die Länge des APs wurde definiert als die Zeit zwischen Depolarisation und 90 %-iger Repolarisation abzüglich der Reizstromdauer und wird im Folgenden als APD90 bezeichnet. Um der Streuung hinsichtlich der APD gerecht zu werden, wurde dabei für jeden Versuch das arithmetische Mittel aus 30 gemessenen APs bestimmt. Die APD90 wird im Folgenden entweder als absoluter Messwert in Millisekunden angegeben oder prozentual in ein Verhältnis zur Kontrollgruppe gesetzt.

### 3.5.2 Relative APD90 (rAPD90) und relative Differenz der APD90 (rel. $\Delta$ APD90)

Zur besseren Vergleichbarkeit der APD und ihrer Veränderung wird teilweise auf eine relative Darstellung zurückgegriffen. Die relative APD90 (rAPD90) berechnet sich nach der Formel:

$$rAPD90 (\%) = \frac{APD90_{nachBadwechsel}}{APD90_{vorBadwechsel}} \cdot 100$$

Um den relativen Unterschied hinsichtlich der APD90 durch das Einwaschen einer Substanz gegenüber der vorherigen Substanz bzw. Kontrollgruppe auszudrücken, wurde die relative Differenz der APD90 bestimmt. Diese ist definiert als Quotient aus der Differenz von APD90 nach Badwechsel und vorheriger APD90 auf der einen Seite und vorheriger APD90 auf der anderen Seite:

$$rel. \Delta APD90 = \frac{APD90_{nachBadwechsel} - APD90_{vorBadwechsel}}{APD90_{vorBadwechsel}}$$



Ist die  $\text{rel.}\Delta\text{APD90} > 0,05$ , so wird im Folgenden von einer Verlängerung der APD90 gesprochen; von einer Verkürzung der APD90 ist die Rede bei einem Wert der  $\text{rel.}\Delta\text{APD90}$  von  $< - 0,05$ . Liegt der Wert der  $\text{rel.}\Delta\text{APD90}$  dazwischen, so wird kein Effekt auf die APD90 angenommen. In den jeweiligen Abbildungen sind diese definierten Grenzen durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Die Anzahl der Versuche, in denen es innerhalb einer Versuchsreihe zu einer Verlängerung der APD90 gekommen ist, kann in ein Verhältnis zur Gesamtzahl der Versuche gestellt werden und wird dann als relatives Risiko für eine Verlängerung der APD90 bezeichnet.

### 3.5.3 Temperatur

Die Temperatur eines Versuchs entspricht dem arithmetischen Mittel aus 30 Messpunkten, die zu dem Zeitpunkt des jeweiligen APs aufgezeichnet wurden. Es wurden lediglich solche Versuche ausgewertet, in denen es zwischen allen Lösungswechsel maximal zu einer Temperaturschwankung von  $0,5^\circ\text{C}$  gekommen ist. Die mittlere Temperatur aller Versuche betrug  $35,88 \pm 0,03^\circ\text{C}$  ( $n = 429$ ).

### 3.6 Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen

1991 veröffentlichten Luo und Rudy als Weiterentwicklung des Beeler-Reuter Modells ein mathematisches Modell zur Simulation von ventrikulären APs des Meerschweinchens (Luo und Rudy 1991). Es basiert auf Einzelzell- und Einzelkanalmessungen und ist im Laufe der Zeit durch stetige Aktualisierungen zu einem dynamischen Computerzellmodell erweitert worden (Luo-Rudy dynamic model, LRd), mit dessen Hilfe APs u. a. unter Veränderung der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle sowie Regulation der intra- bzw. extrazellulären Ionenkonzentration simuliert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse aus Patch-Clamp Experimenten in eine modifizierte Version des LRd transferiert, um die in Frage kommenden Ionenkanalinteraktionen von Bupivacain zu quantifizieren (Schwoerer et al. 2010, Siebrands et al. 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen wurden mit einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz durchgeführt. Entsprechend der elektrophysiologischen Gegebenheiten des Meerschweinchenherzens wurde der transiente Auswärtsstrom  $I_{\text{to}}$

auf Null gesetzt. Unter einer Simulation von 2000 Aktionspotentialzyklen waren die letzten 10 Zyklen identisch, so dass im Ergebnisteil hierzu weder Mittelwerte noch Standardfehler angegeben sind.

Um den Effekt von Bupivacain auf das AP in LQT1 und LQT2 zu simulieren, wurde für LQT1 eine  $I_{Ks}$ - bzw. LQT2 eine  $I_{Kr}$ -Blockade von je 75 % angenommen. Hierunter sind Aktionspotentialverlängerungen beschrieben, die sich weitestgehend mit denen, die man in herkömmlichen Patch-Clamp Experimenten beobachtet, decken (Schwoerer et al. 2010). Eine darüber hinausgehende Inhibition von  $I_{Ks}$  bzw.  $I_{Kr}$  hingegen führt zu einem Verlust der Repolarisation (Schwoerer et al. 2010) bzw. erlaubt keine zusätzliche Simulation mit einer  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Myozyten

#### 4.1.1 Verdünnungsreihe

Der konzentrationsabhängige Effekt von Bupivacain auf das AP nativer Myozyten wurde im Rahmen einer Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,01 bis 300  $\mu\text{mol/L}$  untersucht. Die Anzahl dieser Versuche sowie Mittelwerte  $\pm$  SEM von APD90, Membranpotential und Overshoot sind nachfolgend in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Bupivacain Verdünnungsreihe – *in vitro* Effekt auf die APD90, Membranpotential ( $V_m$ ) und Overshoot.** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = Anzahl der Versuche, \*\*\* p < 0,001 ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test vs. Kontrolle (0  $\mu\text{mol/L}$ , tabellarisch fett aufgeführt).

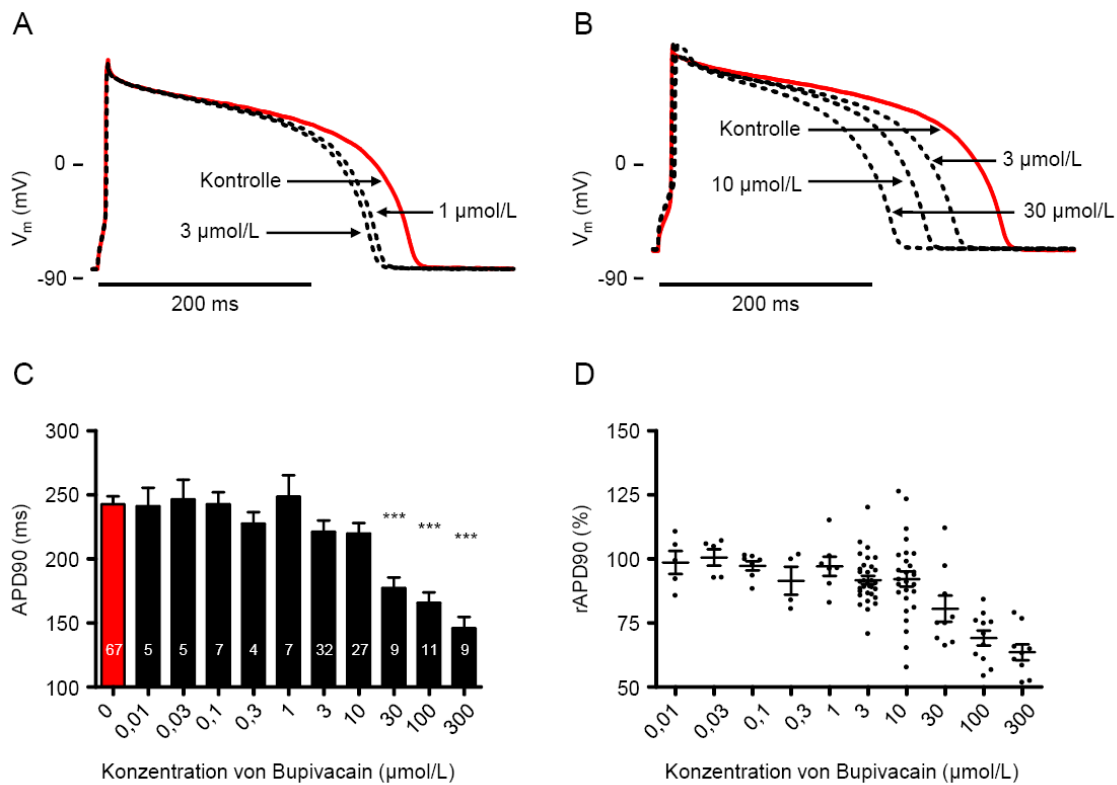
<b>Bupivacain (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>0</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
<b>Anzahl (n)</b>	67	5	5	7	4	7	32	27	9	11	9
<b>APD90 (ms)</b>	<b>242,7 <math>\pm</math>51,2</b>	241,2 $\pm$ 32,0	246,5 $\pm$ 34,6	242,8 $\pm$ 24,8	227,6 $\pm$ 17,8	248,8 $\pm$ 44,2	221,2 $\pm$ 49,8	219,9 $\pm$ 42,3	177,3 $\pm$ 24,8 (***)	165,7 $\pm$ 27,3 (***)	146,1 $\pm$ 26,1 (***)
<b><math>V_m</math> (mV)</b>	<b>-84,7 <math>\pm</math>7,0</b>	-84,3 $\pm$ 5,6	-83,9 $\pm$ 6,1	-83,8 $\pm$ 5,1	-85,5 $\pm$ 4,0	-81,9 $\pm$ 5,1	-87,7 $\pm$ 10,3	-82,3 $\pm$ 4,0	-80,9 $\pm$ 4,0	-82,6 $\pm$ 3,3	-80,8 $\pm$ 3,7
<b>Over- shoot (mV)</b>	<b>51,7 <math>\pm</math>14,9</b>	48,8 $\pm$ 6,8	49,8 $\pm$ 6,7	50,7 $\pm$ 5,5	49,3 $\pm$ 4,6	59,2 $\pm$ 14,5	46,8 $\pm$ 12,5	52,6 $\pm$ 10,4	55,0 $\pm$ 14,8	43,0 $\pm$ 14,2	20,3 $\pm$ 10,0 (***)

#### 4.1.1.1 *Membranpotential und Overshoot*

In Tabelle 6 sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Membranpotential und Overshoot angegeben. Ausgehend von einem Wert von  $-84,7 \pm 7,0$  mV (Kontrolle) hatte Bupivacain in allen gemessenen Konzentrationen keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential ( $V_m$ ) der Zelle. Der Overshoot betrug unter Kontrollbedingungen  $51,7 \pm 14,9$  mV. Er wurde erst durch die Konzentration von  $300 \mu\text{mol/L}$  signifikant auf  $20,3 \pm 10,0$  mV reduziert ( $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ). In allen übrigen Konzentrationen zeigte Bupivacain keinen signifikanten Effekt auf den Overshoot.

#### 4.1.1.2 *APD90 und rAPD90*

In Abbildung 11 A und B sind repräsentative APs vor (Kontrolle) und nach Applikation von Bupivacain ( $1\text{-}30 \mu\text{mol/L}$ ) dargestellt. Tabelle 6 und Abbildung 11 C zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM aller Versuche der Verdünnungsreihe. Bupivacain führte insgesamt zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung der APD90 mit einer signifikanten Reduktion der APD90 ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/L}$ . Dieser Effekt ist Ausdruck einer Blockade depolarisierender Ströme durch Bupivacain. Entgegen dieser klaren, konzentrationsabhängigen Verkürzung der APD90 zeigte Bupivacain allerdings insbesondere bei einer Konzentration von  $3$  und  $10 \mu\text{mol/L}$  einen heterogenen Effekt mit sowohl Verkürzungen als auch Verlängerungen der APD90 (Abbildung 11 D). Da gerade Repolarisationsverzögerungen hinsichtlich der Entstehung von Arrhythmien von Interesse sind (Antzelevitch und Sicouri 1994) und eine Bupivacain-Plasmakonzentration von  $3 \mu\text{mol/L}$  im Rahmen einer Lokalanästhetikaintoxikation vorstellbar ist (Butterworth 2010, Colley und Heavner 1981, Davis und de Jong 1982, Favier et al. 2003), wird im Folgenden daher auf diese Konzentration näher eingegangen.

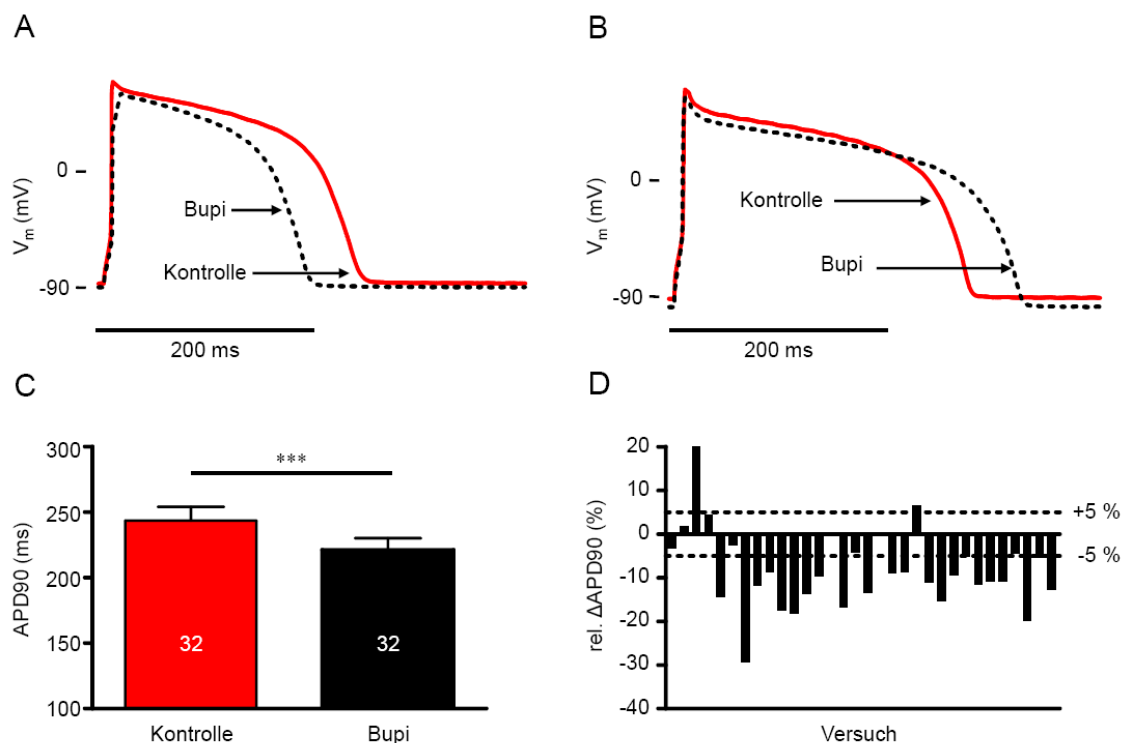


**Abbildung 11: *In vitro* Effekt von Bupivacain auf die APD90 nativer Zellen.** A und B, repräsentative APs vor (Kontrolle, rot) und nach (1-30 µmol/L, schwarz/gestrichelt) Applikation von Bupivacain in Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30 µmol/L. Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt,  $V_m$  = Membranpotential. C, durchschnittliche APD90 ± SEM nativer Zellen (rot) sowie nach (schwarz) Applikation von Bupivacain in einer Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,01 bis 300 µmol/L. Zahlenwerte in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test vs. Kontrolle. D, Relation der APD90 nach Applikation von Bupivacain in Konzentrationen von 0,01 bis 300 µmol/L und der jeweiligen Kontroll-APD90 mit Mittelwert ± SEM; jeder Punkt repräsentiert einen Einzelversuch.

#### 4.1.2 Bupivacain (3 µmol/L)

In der Abbildung 12 A und B sind repräsentative APs vor (Kontrolle) und nach Applikation von 3 µmol/L Bupivacain (Bupi) dargestellt. Wie in 4.1.1.2 beschrieben hatte Bupivacain in diesem Konzentrationsbereich einen heterogenen Effekt und führte sowohl zu Verkürzungen als auch Verlängerungen der APD90. Abbildung 12 C zeigt den Mittelwert ± SEM der APD90 nativer Zellen (Kontrolle) und nach Applikation von 3 µmol/L Bupivacain (Bupi). Ausgehend von einer mittleren APD90 von  $243,5 \pm 10,6$  ms (Kontrolle) verkürzte sich die APD90 nach Applikation von Bupivacain auf  $221,2 \pm 8,8$  ms (Bupi) signifikant um  $22,3 \pm 1,5$  ms (~ 9 %) ( $n = 32$ ,  $p < 0,001$ ).

Abbildung 12 D stellt die relative Differenz der APD90 durch Bupivacain für jeden Einzelversuch dar. Dabei wird – wie im Folgenden dieser Arbeit auch – zwischen Versuchen, in denen die getestete Substanz zu einer relativen Zunahme der APD90 um mehr als 5 % (Verlängerung der APD90), zu einer relativen Abnahme der APD90 um mehr als 5 % (Verkürzung der APD90) und zu einer dazwischen liegenden relativen Veränderung der APD90 (kein Effekt auf die APD90) führt, unterschieden (siehe 3.5.2). 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain führten in 2/32 Zellen zu einer Verlängerung der APD90 und in 22/32 Zellen zu einer Verkürzung der APD90. In 8/32 Zellen zeigte die Substanz keinen Effekt auf die APD90. Verlängerte Bupivacain die APD90, so betrug die Verlängerung  $25,9 \pm 7,7$  ms ( $\sim 11$  %), verkürzte Bupivacain die APD90, so ergab sich eine Verkürzung von  $33,8 \pm 3,7$  ms ( $\sim 13$  %). Das Risiko für eine Verlängerung der APD90 durch 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain in nativen Myozyten lag somit bei 0,063 ( $\sim 6$  %).



**Abbildung 12: Heterogener *in vitro* Effekt von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Zellen.** A und B, repräsentative APs je einer nativen Zelle vor (Kontrolle, rot) und nach (Bupi, schwarz/gestrichelt) Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain. Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt,  $V_m$  = Membranpotential. C, mittlere APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwert in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*\*\*  $p < 0,001$  gepaarter t-Test. D, relative Differenz der APD90 in Prozent zwischen Bupivacain und Kontrolle. Jeder Balken repräsentiert einen Einzelversuch. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90.

#### 4.2 Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential LQT-ähnlicher Myozyten

In Tabelle 7 sind Mittelwerte  $\pm$  SEM der APD90 sowie die Anzahl der Versuche der Versuchsreihen mit LQT-ähnlichen Myozyten zusammengefasst. Dabei wurde zunächst LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> bzw. LQT3<sub>Vera</sub> durch Applikation von Chromanol 293B, E4031 bzw. Veratridin induziert und im weiteren Verlauf zusätzlich 3  $\mu$ mol/L Bupivacain appliziert.

**Tabelle 7: Mittlere APD90 der Versuchsreihen mit LQT-ähnlichen Myozyten.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) sowie die Anzahl der Versuche (n) für die Versuchsreihen LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>. Ausgehend von der APD90 nativer Myozyten (Kontrolle) wurde die APD90 nach Induktion des jeweiligen LQT-Modells mit 10  $\mu$ mol/L Chromanol 293B (C293B), 10  $\mu$ mol/L E4031 (E4031) bzw. 0,5  $\mu$ mol/L Veratridin (Vera) sowie nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu$ mol/L Bupivacain (C293B/E4031/Vera + Bupi) bestimmt.

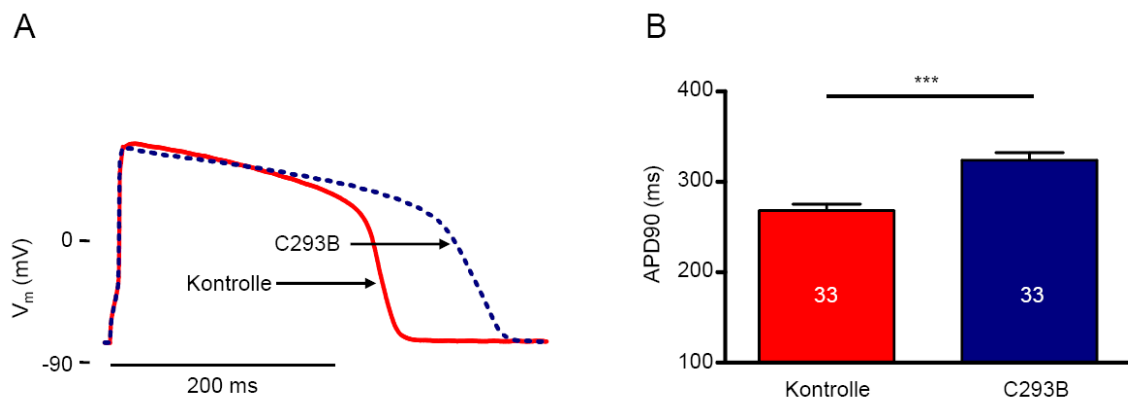
LQT1 <sub>C293B</sub>	Kontrolle	C293B	C293B + Bupi
APD90 $\pm$ SEM (ms)	268,5 $\pm$ 6,9	324,1 $\pm$ 8,4	315,5 $\pm$ 10,0
Anzahl (n)	n = 33	n = 33	n = 33
LQT2 <sub>E4031</sub>	Kontrolle	E4031	E4031 + Bupi
APD90 $\pm$ SEM (ms)	235,5 $\pm$ 10,4	295,2 $\pm$ 18,1	272,4 $\pm$ 14,1
Anzahl (n)	n = 18	n = 18	n = 18
LQT3 <sub>Vera</sub>	Kontrolle	Vera	Vera + Bupi
APD90 $\pm$ SEM (ms)	264,8 $\pm$ 7,5	492,8 $\pm$ 33,1	358,5 $\pm$ 22,4
Anzahl (n)	n = 16	n = 16	n = 16

##### 4.2.1 Etablierung der LQT-Modelle

Ein LQT-ähnlicher Zustand der Zelle wurde pharmakologisch induziert. Im Folgenden werden die Bezeichnungen LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub> für die einzelnen Zellmodelle verwendet (siehe 3.4.3.2).

#### 4.2.1.1 LQT1<sub>C293B</sub>

Ein LQT1-ähnlicher Zustand wurde mit dem hierfür etablierten selektiven I<sub>Ks</sub>-Inhibitor Chromanol 293B induziert (Bosch et al. 1998, Schwoerer et al. 2010). Abbildung 13 A stellt ein repräsentatives AP vor (Kontrolle) und nach (C293B) Applikation von 10 µmol/L Chromanol 293B dar. Abbildung 13 B zeigt den Mittelwert ± SEM der APD90 nativer Zellen (Kontrolle) und nach Applikation von 10 µmol/L Chromanol 293B (C293B). Ausgehend von einer mittleren APD90 von 268,5 ± 6,9 ms (Kontrolle) verlängerte sich die APD90 nach Applikation von Chromanol 293B signifikant um 55,6 ± 5,7 ms auf 324,1 ± 8,4 ms (C293B) (n = 33, p < 0,001). Dies entspricht einer relativen Verlängerung der APD90 von ~ 21 %. In allen Versuchen kam es zu einer Verlängerung der APD90.



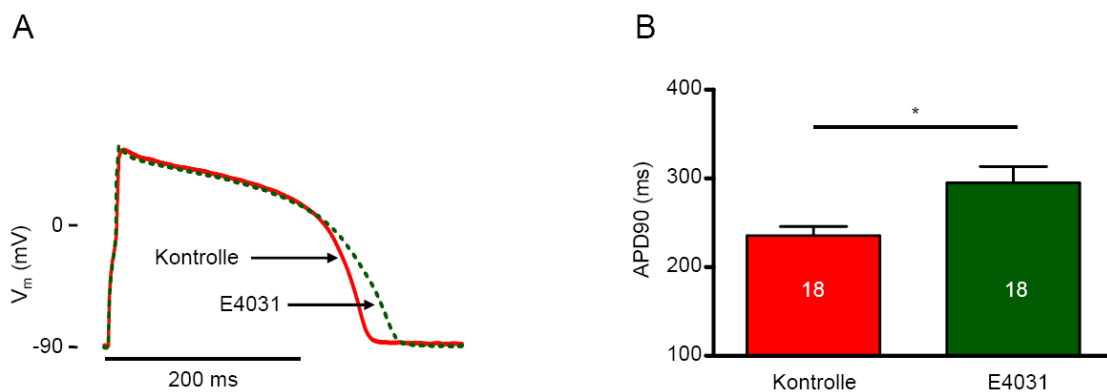
**Abbildung 13: *In vitro* Effekt von Chromanol 293B auf das Aktionspotential nativer Zellen.** A, repräsentatives AP vor (Kontrolle, rot) sowie nach (C293B, blau/gestrichelt) Applikation von 10 µmol/L Chromanol 293B. Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt; V<sub>m</sub> = Membranpotential. B, durchschnittliche APD90 ± SEM aller Versuche. Zahlenwerte in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*\*\* p < 0,001 ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test.

#### 4.2.1.2 LQT2<sub>E4031</sub>

Ein LQT2-ähnlicher Zustand wurde mit dem hierfür etablierten selektiven I<sub>Kr</sub>-Inhibitor E4031 induziert (Sanguinetti und Jurkiewicz 1990, Sanguinetti et al. 1991, Schwoerer et al. 2010). Abbildung 14 A stellt ein repräsentatives AP vor (Kontrolle) sowie nach (E4031) Applikation von 10 µmol/L E4031 dar. Abbildung 14 B zeigt den



Mittelwert  $\pm$  SEM der APD90 nativer Zellen (Kontrolle) und nach Applikation von 10  $\mu\text{mol/L}$  E4031 (E4031). Ausgehend von einer mittleren APD90 von  $235,5 \pm 10,4$  ms (Kontrolle) verlängerte sich die APD90 nach Applikation von E4031 signifikant um  $59,7 \pm 16,5$  ms auf  $295,2 \pm 18,1$  ms (E4031) ( $n = 18$ ,  $p < 0,05$ ). Dies entspricht einer relativen Verlängerung der APD90 von  $\sim 25$  %. In allen Versuchen kam es zu einer Verlängerung der APD90.

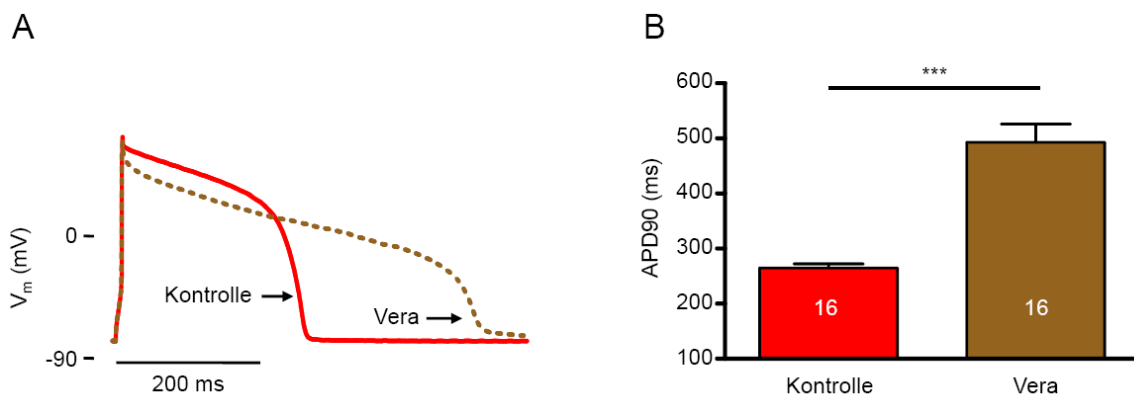


**Abbildung 14: *In vitro* Effekt von E4031 auf das Aktionspotential nativer Zellen.** A, repräsentatives AP vor (Kontrolle, rot) sowie nach (E4031, grün/gestrichelt) Applikation von 10  $\mu\text{mol/L}$  E4031. Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt;  $V_m$  = Membranpotential. B, durchschnittliche APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwerte in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*  $p < 0,05$  ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test.

#### 4.2.1.3 *LQT3<sub>Vera</sub>*

Ein *LQT3*-ähnlicher Zustand wurde mit Veratridin, welches die  $\text{Na}^+$ -Kanalinaktivierung verhindert (Gerhardy et al. 1998, Hiraoka et al. 1992, Milberg et al. 2005a, Ulbricht 1998), induziert. Abbildung 15 A zeigt ein repräsentatives AP vor (Kontrolle) und nach (*Vera*) Applikation von 0,5  $\mu\text{mol/L}$  Veratridin. Abbildung 15 B zeigt den Mittelwert  $\pm$  SEM der APD90 nativer Zellen (Kontrolle) und nach Applikation von 0,5  $\mu\text{mol/L}$  Veratridin (*Vera*). Ausgehend von einer mittleren APD90 von  $264,8 \pm 7,5$  ms (Kontrolle) verlängerte sich die APD90 nach Applikation von Veratridin signifikant um  $228,0 \pm 32,7$  ms auf  $492,8 \pm 33,1$  ms (*Vera*) ( $n = 16$ ,

$p < 0,001$ ). Dies entspricht einer relativen Verlängerung der APD90 von  $\sim 86\%$ . In allen Versuchen kam es zu einer Verlängerung der APD90.



**Abbildung 15: *In vitro* Effekt von Veratridin auf das Aktionspotential nativer Zellen.** A, repräsentatives AP vor (Kontrolle, rot) sowie nach (Vera, braun/gestrichelt) Applikation von  $0,5\ \mu\text{mol/L}$  Veratridin. Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt;  $V_m$  = Membranpotential. B, durchschnittliche APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwerte in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test.

#### 4.2.2 LQT-ähnliche Zellen – Bupivacain ( $3\ \mu\text{mol/L}$ )

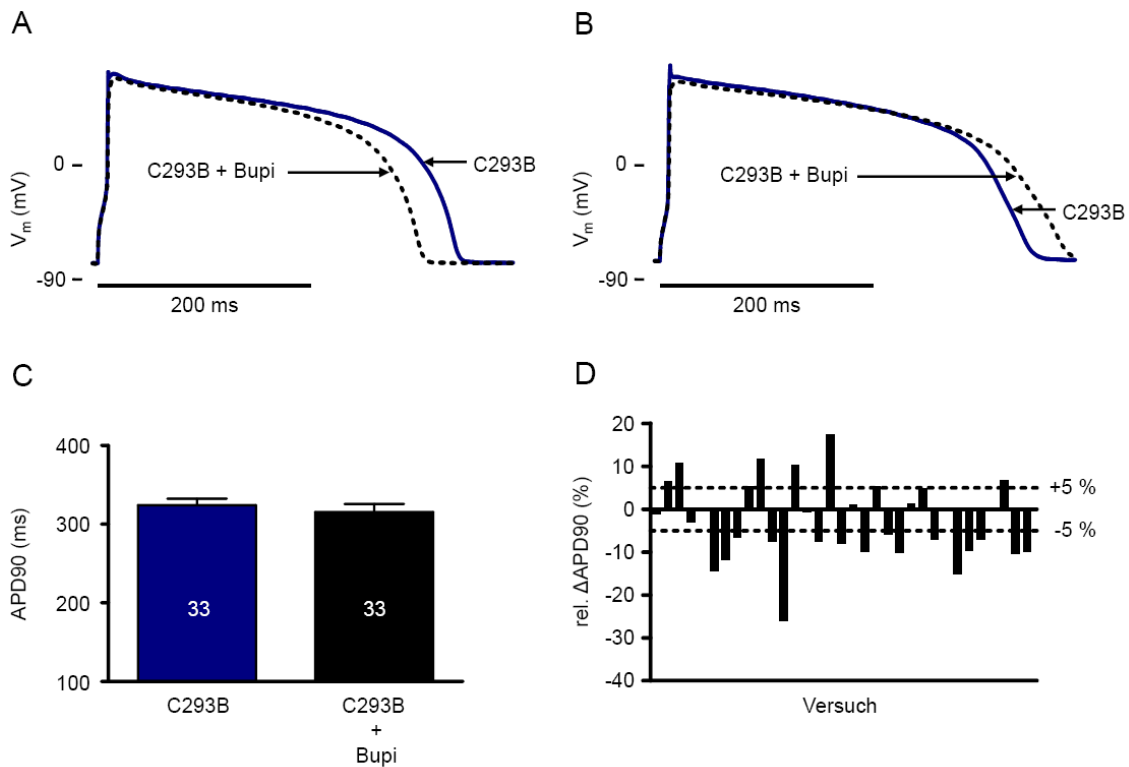
In nativen Myozyten führte Bupivacain in einer Konzentration von  $3\ \mu\text{mol/L}$  sowohl zu Verkürzungen als auch Verlängerungen der APD90. Vor dem Hintergrund, dass Repolarisationsverzögerungen für die Entstehung von Arrhythmien von Interesse und im Rahmen einer Intoxikation mit Bupivacain Plasmakonzentrationen von  $3\ \mu\text{mol/L}$  vorstellbar sind (siehe 4.1.1.2), wurde daher Bupivacain in einer Konzentration von  $3\ \mu\text{mol/L}$  in den LQT-Modellen verwendet.

##### 4.2.2.1 LQT1<sub>C293B</sub> – Bupivacain ( $3\ \mu\text{mol/L}$ )

In der Abbildung 16 A und B sind repräsentative APs nach Induktion von LQT1<sub>C293B</sub> (C293B) sowie nach zusätzlicher Applikation von  $3\ \mu\text{mol/L}$  Bupivacain (C293B + Bupi) dargestellt. Ausgehend von einer Verlängerung des APs durch Chromanol 293B gegenüber Kontrollmyozyten (siehe 4.2.1.1) führte die zusätzliche

Gabe von Bupivacain sowohl zu Aktionspotentialverkürzungen als auch -verlängerungen. Im Mittel hatte Bupivacain jedoch, wie in Abbildung 16 C gezeigt, keinen Effekt auf die APD90. So betrug die mittlere APD90 nach Applikation von Bupivacain  $315,5 \pm 10,0$  ms (C293B + Bupi) und war damit weitestgehend unverändert im Vergleich zum Ausgangswert von  $324,1 \pm 8,4$  ms (C293B). Diese nur leichte Veränderung der APD90 ist Ausdruck einer in LQT1<sub>C293B</sub> erhöhten Varianz des Effekts von Bupivacain auf die APD90 mit Verkürzungen der APD90 bis ~ 100 ms und Verlängerungen der APD90 bis ~ 50 ms.

Die relative Differenz zwischen der APD90 LQT1-ähnlicher Zellen nach zusätzlicher Applikation von Bupivacain und der APD90 LQT1-ähnlicher Zellen allein ist für jeden Einzelversuch in Abbildung 16 D dargestellt. Nach Applikation von Bupivacain ergab sich in 16/33 Versuchen eine Verkürzung sowie in 8/33 Versuchen eine Verlängerung der APD90. In 9/33 Versuchen hatte die Substanz keinen Effekt auf die APD90. Kam es zu einer Verkürzung der APD90, so betrug diese im Mittel  $33,3 \pm 4,6$  ms (~ 11 %); verlängerte Bupivacain die APD90, so betrug die mittlere Verlängerung  $29,8 \pm 4,8$  ms (~ 9 %). Das Risiko für eine Verlängerung der APD90 durch 3 µmol/L Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub> lag somit bei 0,24 (~ 24 %).

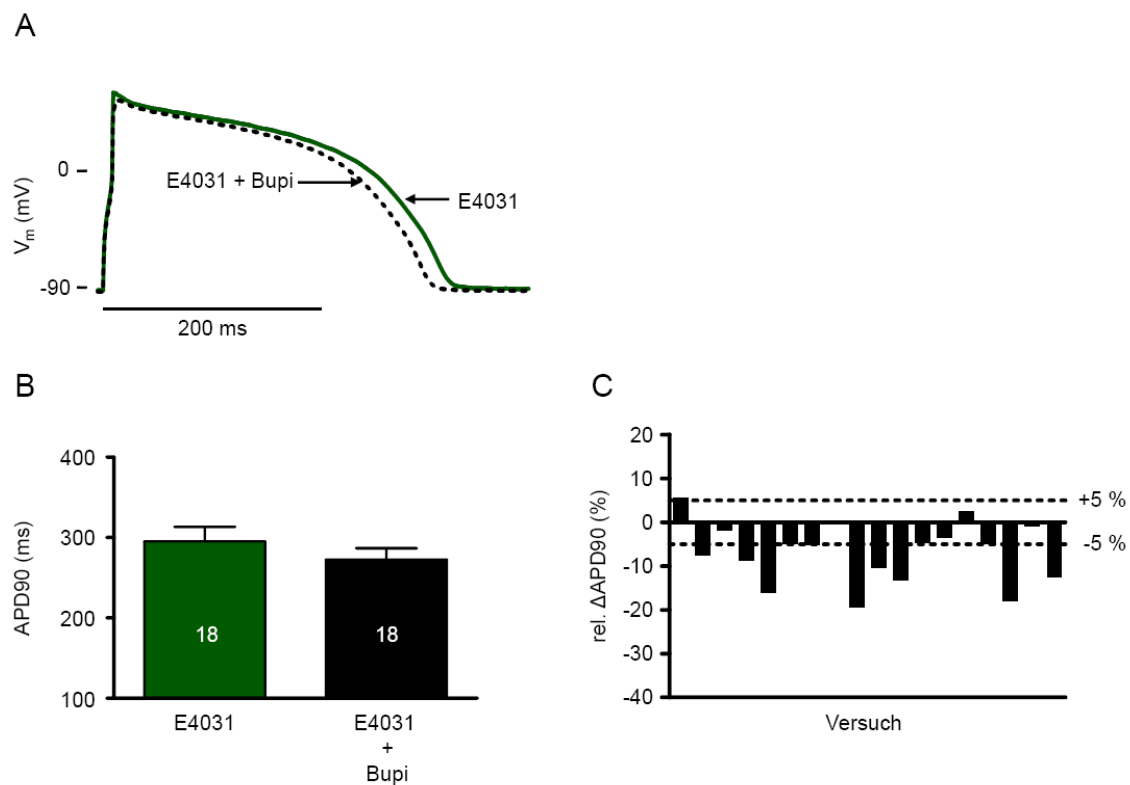


**Abbildung 16: Heterogener *in vitro* Effekt von Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub>.** A und B, repräsentative APs nach Induktion von LQT1<sub>C293B</sub> (C293B, blau) mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Chromanol 293B sowie nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain (C293B + Bupi, schwarz/gestrichelt). Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt,  $V_m$  = Membranpotential. C, mittlere APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwert in Säulen = Anzahl (n) der Versuche. D, relative Differenz der APD90 in Prozent zwischen C293B + Bupi und C293B. Jeder Balken repräsentiert einen Einzelversuch. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90.

#### 4.2.2.2 LQT2<sub>E4031</sub> – Bupivacain (3 $\mu\text{mol/L}$ )

In Abbildung 17 A ist ein repräsentatives AP nach Induktion von LQT2<sub>E4031</sub> (E4031) und nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain (E4031 + Bupi) dargestellt. Ausgehend von einer Verlängerung des APs durch E4031 gegenüber Kontrollmyozyten (siehe 4.2.1.2) führte die zusätzliche Gabe von Bupivacain tendenziell zu einer Verkürzung des APs. Die mittlere APD90 LQT2-ähnlicher Zellen verringerte sich dabei durch die Gabe von Bupivacain, wie in Abbildung 17 B gezeigt, von  $295,2 \pm 18,1$  ms (E4031) um  $22,7 \pm 6,0$  ms auf  $272,4 \pm 14,1$  ms (E4031 + Bupi). Dies entspricht einer tendenzielle Verkürzung der APD90 um  $\sim 8$  % ( $n = 18$ ,  $p > 0,05$ ). Gegenüber LQT1<sub>C293B</sub> ist die Varianz des Effekts von Bupivacain auf die APD90 der einzelnen Zelle mit Verkürzungen der APD90 bis  $\sim 100$ ms und Verlängerungen der APD90 bis lediglich  $\sim 13$  ms deutlich geringer.

Die relative Differenz zwischen der APD90 LQT2-ähnlicher Zellen nach zusätzlicher Applikation von Bupivacain und der APD90 LQT2-ähnlicher Zellen allein ist für jeden Einzelversuch in Abbildung 17 C dargestellt. Nach Applikation von Bupivacain ergab sich in 9/18 Versuche eine Verkürzung der APD90 und in 1/18 Versuchen eine Verlängerung der APD90. In 8/18 Versuchen hatte die Substanz keinen Effekt auf die APD90. Kam es zu einer Verkürzung der APD90, so betrug diese im Mittel  $40,9 \pm 7,8$  ms ( $\sim 13$  %); die Verlängerung der APD90 betrug 13,5 ms ( $\sim 6$  %). Das Risiko für eine Verlängerung der APD90 durch 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain in LQT2<sub>E4031</sub> lag somit bei 0,056 ( $\sim 6$  %).

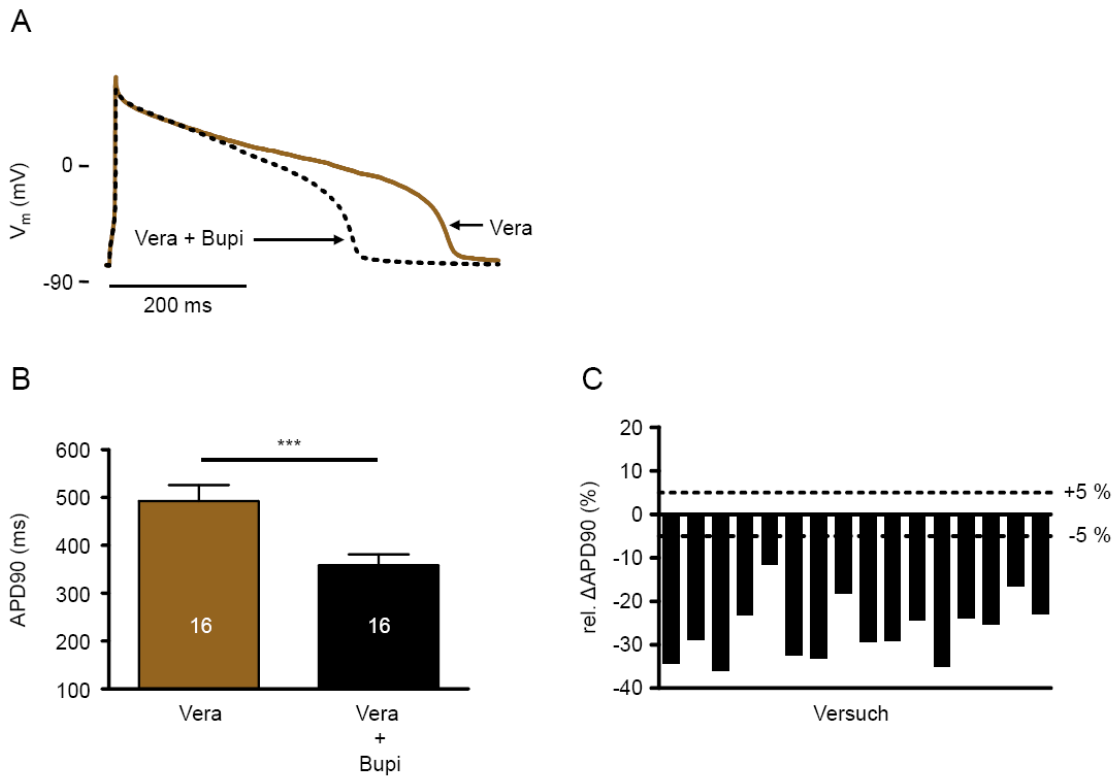


**Abbildung 17: In vitro Effekt von Bupivacain in LQT2<sub>E4031</sub>.** A, repräsentatives AP nach Induktion von LQT2<sub>E4031</sub> (CE4031, grün) mit 10  $\mu\text{mol/L}$  E4031 sowie nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain (E4031 + Bupi, schwarz/gestrichelt). Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt,  $V_m$  = Membranpotential. B, mittlere APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwert in Säulen = Anzahl (n) der Versuche. C, relative Differenz der APD90 in Prozent zwischen E4031 + Bupi und E4031. Jeder Balken repräsentiert einen Einzelversuch. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90.

#### 4.2.2.3 *LQT3<sub>Vera</sub> – Bupivacain (3 $\mu\text{mol/L}$ )*

In Abbildung 18 A ist ein repräsentatives AP nach Induktion von LQT3<sub>Vera</sub> (Vera) und nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain (Vera + Bupi) dargestellt. Ausgehend von einer Verlängerung des APs durch Veratridin gegenüber Kontrollmyozyten (siehe 4.2.1.3) führte die zusätzliche Gabe von Bupivacain zu einer Verkürzung des APs. Die mittlere APD90 LQT3-ähnlicher Zellen verringerte sich dabei durch die Gabe von Bupivacain, wie in Abbildung 18 B gezeigt, signifikant von  $492,8 \pm 33,1$  ms (Vera) um  $134,3 \pm 13,7$  ms auf  $358,5 \pm 22,4$  ms (Vera + Bupi) ( $n = 16$ ,  $p < 0,001$ ). Dies entspricht einer Verkürzung der APD90 von  $\sim 27$  %.

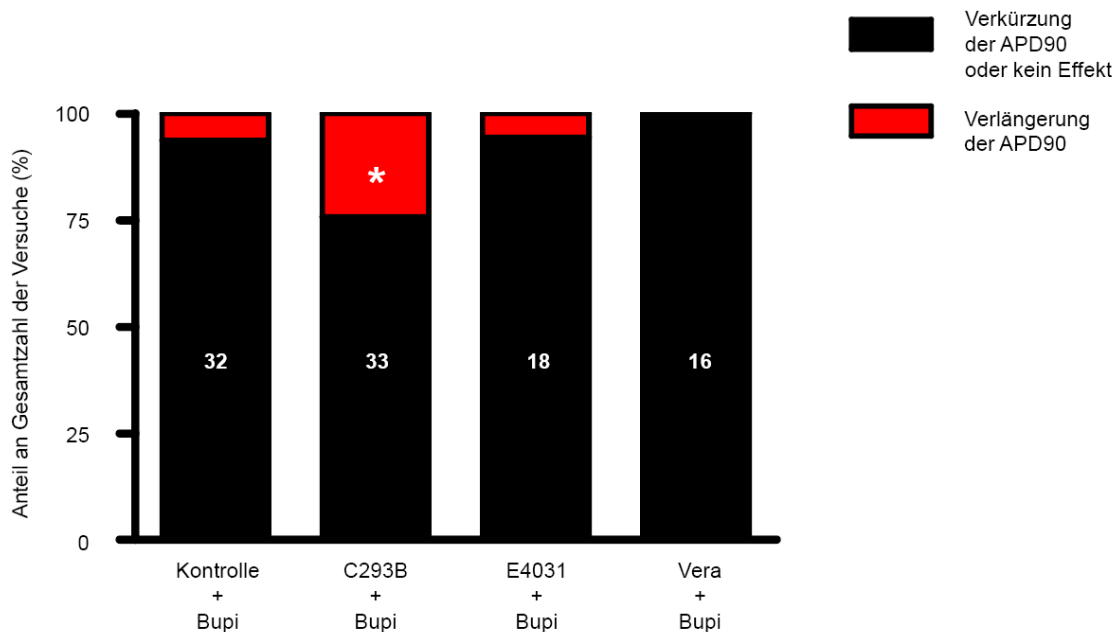
Die relative Differenz zwischen der APD90 LQT3-ähnlicher Zellen nach zusätzlicher Applikation von Bupivacain und der APD90 LQT3-ähnlicher Zellen allein ist für jeden Einzelversuch in Abbildung 18 C dargestellt. Bupivacain führte in allen Versuchen zu einer Verkürzung der APD90. Das Risiko für eine Verlängerung der APD90 durch 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain in LQT3<sub>Vera</sub> lag somit bei 0 (0 %).



**Abbildung 18: *In vitro* Effekt von Bupivacain in LQT3<sub>Vera</sub>.** A, repräsentatives AP nach Induktion von LQT3<sub>Vera</sub> (Vera, braun) mit 0,5  $\mu$ mol/L Veratridin sowie nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu$ mol/L Bupivacain (Vera + Bupi, schwarz/gestrichelt). Zur Verdeutlichung ist jeweils ein durchschnittliches AP aus 30 konsekutiven APs dargestellt,  $V_m$  = Membranpotential. B, mittlere APD90  $\pm$  SEM aller Versuche. Zahlenwert in Säulen = Anzahl (n) der Versuche, \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA + gepaarter Bonferroni Multiple Comparison Test. C, relative Differenz der APD90 in Prozent zwischen Vera + Bupi und Vera. Jeder Balken repräsentiert einen Einzelversuch. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90.

#### 4.3 Verlängerungen der APD90 – ein Risikovergleich

Bupivacain führte in den einzelnen Zellmodellen (native Myozyten, LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>) zu Veränderungen der Aktionspotentialdauer unterschiedlichen Ausmaßes. Dabei war die Varianz der individuellen Veränderung der APD90 durch Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub> ( $\sigma^2 = 890,7$  ms) höher als in nativen Myozyten ( $\sigma^2 = 536,0$  ms). Dies ist u. a. Ausdruck einer erhöhten Inzidenz von Verlängerungen der APD90 in LQT1<sub>C293B</sub> (Abbildung 19). So war das Risiko für Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub> (C293B + Bupi) mit ~ 24 % um den Faktor 3,9 häufiger als in nativen Myozyten (Kontrolle + Bupi) ( $p < 0,05$ ). Mit einem Risiko von ~ 5 % bzw. 0 % in LQT2<sub>E4031</sub> (E4031 + Bupi) bzw. LQT3<sub>Vera</sub> (Vera + Bupi) hingegen waren Verlängerungen der APD90 in den übrigen LQT-Modellen nicht häufiger als unter Kontrollbedingungen.



**Abbildung 19: Häufigkeit von Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in nativen Myozyten und in LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>.** Aktionspotentialveränderungen (schwarz = Verkürzung der APD90 oder kein Effekt; rot = Verlängerung der APD90 > 5 %) beziehen sich auf die APD90 nach Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain (+ Bupi) gegenüber Kontrollmyozyten (Kontrolle) oder nach Induktion von LQT1<sub>C293B</sub> (C293B), LQT2<sub>E4031</sub> (E4031) oder LQT3<sub>Vera</sub> (Vera). Zahlenwert in Säulen = Anzahl (n) der Versuche; \*  $p < 0,05$  Chi Quadrat Test vs. Kontrolle + Bupi.

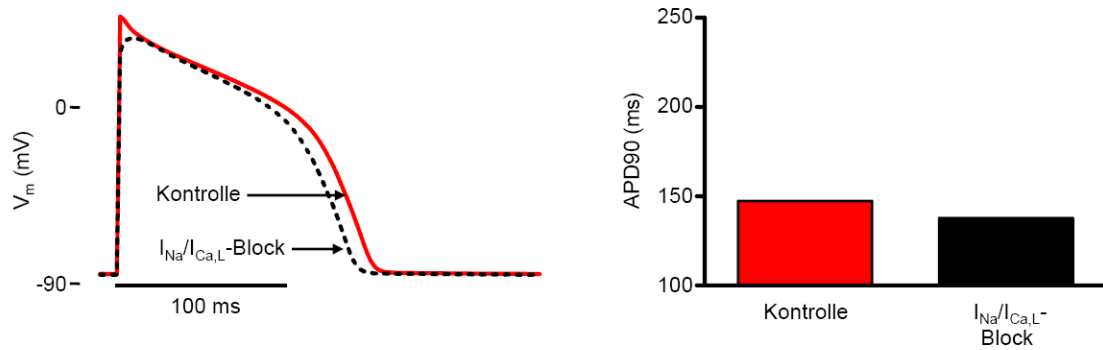
#### 4.4 Computergestützte Simulationen des ventrikulären Aktionspotentials

In den Patch-Clamp Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bupivacain die APD destabilisiert und insbesondere in LQT1-ähnlichen Myozyten zu einer erhöhten Inzidenz von Verlängerungen der APD90 führt. Um den unterschiedlichen Effekt von Bupivacain in nativen, LQT1-ähnlichen bzw. LQT2-ähnlichen Myozyten zu verstehen und die hierfür zu Grunde liegenden Kanalinteraktionen von Bupivacain, insbesondere die  $I_{K_r}$ -Blockade, zu quantifizieren, wurden daher computergestützte Simulationen von APs mit Hilfe des LRd durchgeführt. Zunächst wurden dabei APs simuliert, um denkbare Kombinationen der Ionenkanalblockade aufzudecken, die – wie Bupivacain in nativen Myozyten zeigte – einerseits zu einer Verkürzung und andererseits zu einer Verlängerung der APD90 führen. Diese Werte wurden dann in ein  $I_{K_s}$ - (LQT1) bzw.  $I_{K_r}$ -defizientes (LQT2) Modell überführt, wobei für LQT1 eine  $I_{K_s}$ - bzw. LQT2 eine  $I_{K_r}$ -Blockade von je 75 % angenommen wurde.

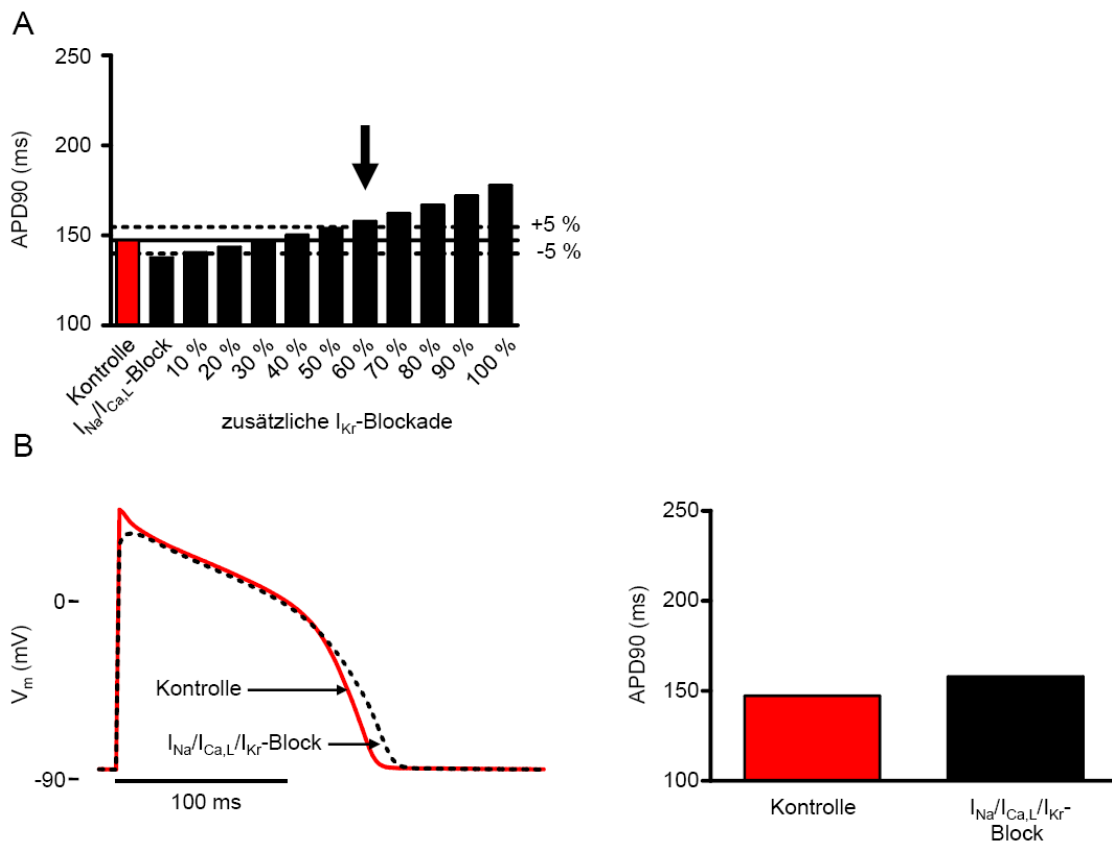


#### 4.4.1 LRD – native Myozyten

Vor dem Hintergrund, dass Bupivacain in nativen Myozyten vorwiegend zu einer Aktionspotentialverkürzung führte, und in Kenntnis seiner Interaktion mit depolarisierenden Strömen, wurde zunächst lediglich eine  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade durch die Substanz angenommen. Hierunter zeigte sich im LRD eine mit ansteigender Blockade zunehmende Verkürzung der APD. Eine mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Experimenten vergleichbare Verkürzung der APD90 fand sich bei einer  $I_{Na}$ - bzw.  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 %. Wie in Abbildung 20 dargestellt, verkürzte sich unter dieser Kombination der  $Na^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Kanalblockade die APD90 von 147,4 ms (Kontrolle) um 9,6 ms (~ 7 %) auf 137,8 ms ( $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block). Dieser Wert ist vergleichbar mit der mittleren Verkürzung der APD90 durch 3  $\mu$ mol/L aus den Patch-Clamp Experimenten (~ 9 %) und auch die Höhe der  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade ist durch Bupivacain in diesem Konzentrationsbereich vorstellbar (Mio et al. 2004, Nau et al. 2000, Szabo et al. 2008, Zapata-Sudo et al. 2001). Darüber hinaus legt die kontinuierliche Verkürzung der APD bei steigender  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade nahe, dass der in den Patch-Clamp Experimenten beobachtete heterogene Effekt mit sowohl Aktionspotentialverkürzungen als auch -verlängerungen nicht über eine Blockade dieser Stromkomponenten vermittelt sein kann. Daher wurde im weiteren Verlauf die o. g. Kombination einer  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade verwendet und eine zusätzliche, zunehmende  $I_{Kr}$ -Blockade simuliert. Abbildung 21 A zeigt die kontinuierliche Verlängerung der APD90 mit zunehmender  $I_{Kr}$ -Blockade. Ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 % kam es dabei zu einer Verlängerung der APD90 gegenüber dem Kontrollwert. Unter dieser zusätzlichen  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 % verlängerte sich, wie in Abbildung 21 B dargestellt, die APD90 von 147,4 ms (Kontrolle) um 10,7 ms (~ 7 %) auf 158,1 ms ( $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{Kr}$ -Block).



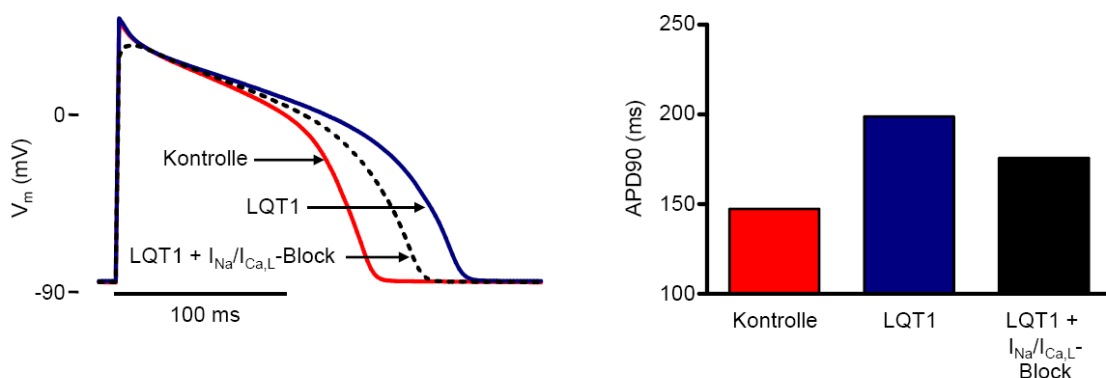
**Abbildung 20: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen – Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in nativen Myozyten.** APs und APD90 nativer Myozyten (Kontrolle, rot) sowie unter Annahme einer  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % durch Bupivacain ( $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz).  $V_m$  = Membranpotential.



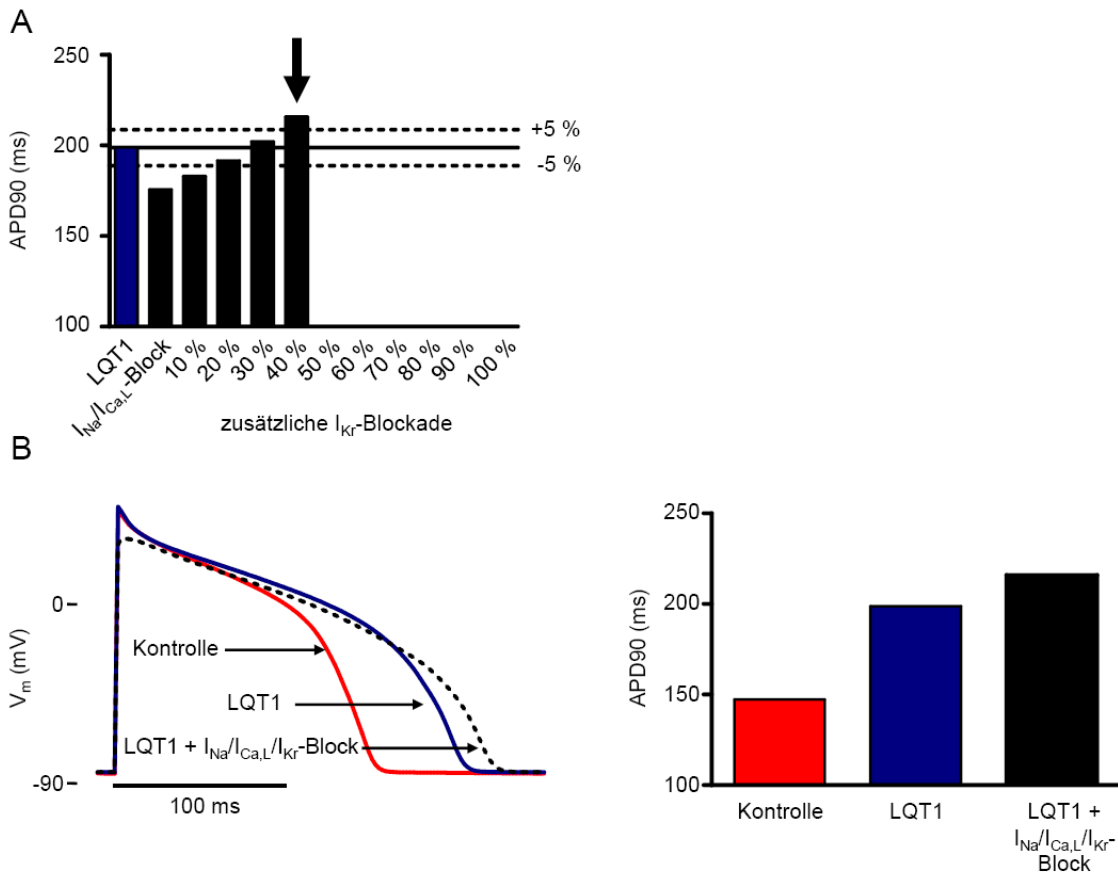
**Abbildung 21: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen – Simulation einer zunehmenden  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain in nativen Myozyten.** A, APD90 nativer Zellen (Kontrolle, rot) sowie unter Annahme einer  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % ( $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz) und zusätzlicher, zunehmender  $I_{Kr}$ -Blockade (10-100%, schwarz) durch Bupivacain. Ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 % (Pfeil) kam es zu einer Verlängerung der APD90 gegenüber der Kontrolle (schwarze, durchgezogene Linie). Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90. B, APs und APD90 nativer Zellen (Kontrolle, rot) sowie unter Annahme einer  $I_{Na}$ -,  $I_{Ca,L}$ - sowie  $I_{Kr}$ -Blockade von 55, 50 bzw. 60 % durch Bupivacain ( $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{Kr}$ -Block, schwarz).  $V_m$  = Membranpotential.

#### 4.4.2 LRD – LQT1

Der simulierte Effekt von Bupivacain auf die APD90 in LQT1 ohne zusätzliche  $I_{Kr}$ -Blockade ist in Abbildung 22 dargestellt. Ausgehend von einer APD90 von 147,4 ms nativer Zellen (Kontrolle) kam es durch eine  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % zu einer Verlängerung der APD90 um 51,4 ms ( $\sim 35\%$ ) auf 198,8 ms (LQT1) und bei zusätzlicher  $I_{Na}$ - bzw.  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % weiterhin zu einer Verkürzung der APD90 auf 175,7 ms (LQT1 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block). Dies entspricht einer Verkürzung der APD90 um 23,1 ms ( $\sim 12\%$ ) gegenüber LQT1. Auch in diesem Modell wurde eine zusätzliche  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain simuliert. Abbildung 23 A zeigt, dass es dabei gegenüber LQT1 bereits ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 40 % zu einer Verlängerung der APD90 kam. Wie in Abbildung 23 B dargestellt, führte ausgehend von der oben beschriebenen Verlängerung der APD90 durch eine  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % auf 198,8 ms (LQT1) eine gleichzeitige  $I_{Na}$ -,  $I_{Ca,L}$ - bzw.  $I_{Kr}$ -Blockade von 55, 50 bzw. 40 % zu einer weiteren Verlängerung der APD90 um 17,1 ms ( $\sim 9\%$ ) auf 215,9 ms (LQT1 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{Kr}$ -Block). Darüber hinausgehende Blockaden von  $I_{Kr}$  hingegen führten zu einem Verlust der Repolarisation.



**Abbildung 22: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) - Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in LQT1.** APs und APD90 nativer Myozyten (Kontrolle, rot), unter einer  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % (LQT1, blau) sowie unter Annahme einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % (LQT1 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz) durch Bupivacain.  $V_m$  = Membranpotential.

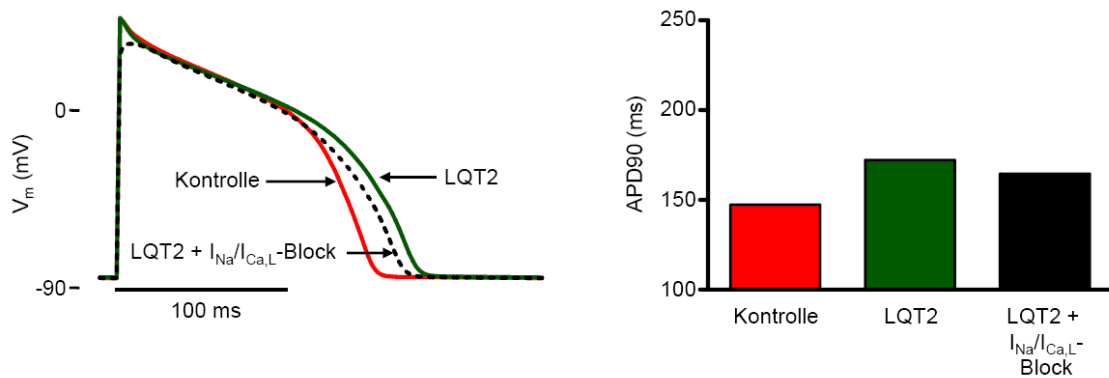


**Abbildung 23: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) - Simulation einer zunehmenden  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain in LQT1.** A, APD90 unter einer  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % (LQT1, blau) sowie unter Annahme einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % ( $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz) und zusätzlicher, zunehmender  $I_{Kr}$ -Blockade (10-100%, schwarz) durch Bupivacain. Ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 40 % (Pfeil) kam es zu einer Verlängerung der APD90 gegenüber LQT1 (schwarze durchgezogene Linie). Eine weitere  $I_{Kr}$ -Blockade führte zu einem Verlust der Repolarisation. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90. B, APs und APD90 nativer Zellen (Kontrolle, rot), unter einer  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % (LQT1, blau) sowie unter einer zusätzlichen  $I_{Na}$ -,  $I_{Ca,L}$ - sowie  $I_{Kr}$ -Blockade von 55, 50 bzw. 60 % durch Bupivacain ( $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{Kr}$ -Block, schwarz).  $V_m$  = Membranpotential.

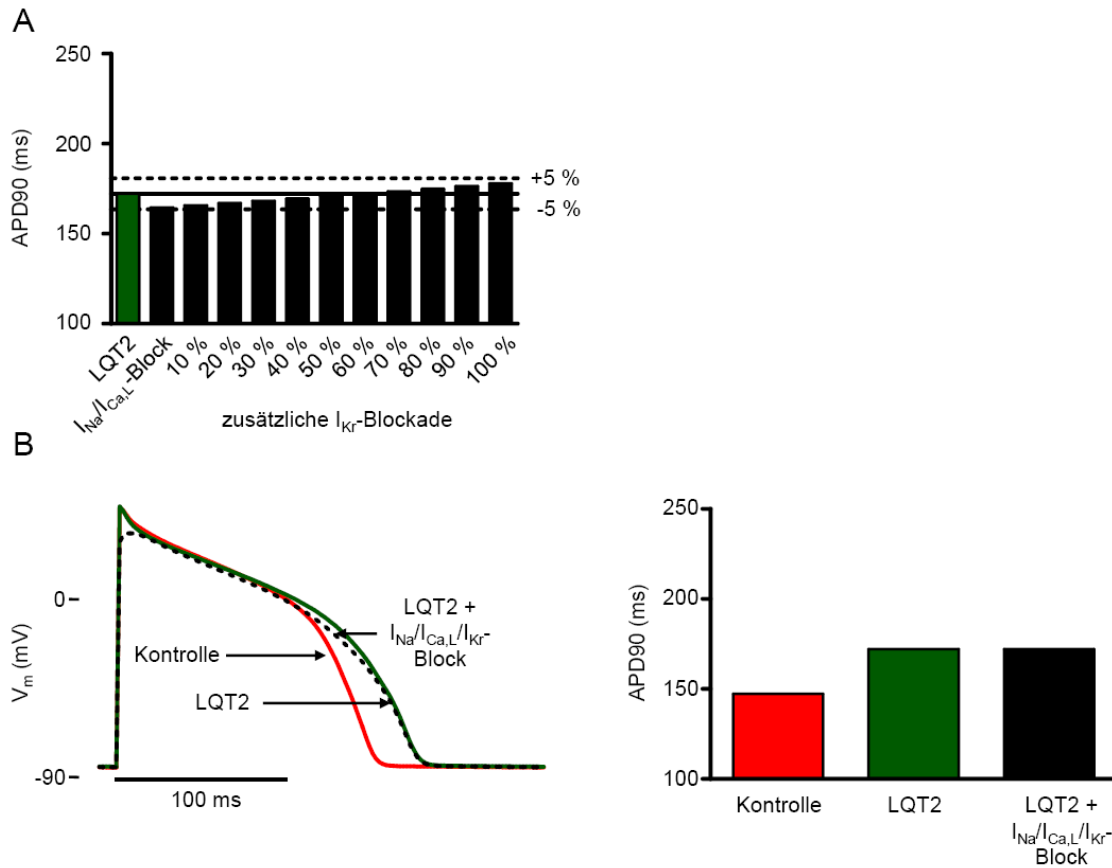
#### 4.4.3 LRd – LQT2

Der simulierte Effekt von Bupivacain auf die APD90 in LQT2 ohne zusätzliche  $I_{Kr}$ -Blockade ist in Abbildung 24 dargestellt. Ausgehend von einer APD90 von 147,4 ms nativer Zellen (Kontrolle) kam es durch eine  $I_{Kr}$ -Blockade von 75 % zu einer Verlängerung der APD90 um 24,8 ms (~ 17 %) auf 172,2 ms (LQT2) und bei zusätzlicher  $I_{Na}$ - bzw.  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % weiterhin zu einer Verkürzung der APD90 auf 164,61 ms (LQT2 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block). Dies entspricht einer Verkürzung der APD90 um 7,5 ms (~ 5 %) gegenüber LQT2. Auch in diesem Modell wurde eine

zusätzliche  $I_{K_r}$ -Blockade durch Bupivacain simuliert. Abbildung 25 A zeigt, dass hierbei selbst bei Simulation einer maximalen  $I_{K_r}$ -Blockade gegenüber LQT2 keine Verlängerung der APD90 induzierbar war. Der Effekt einer zusätzlichen  $I_{K_r}$ -Blockade von 60 %, unter der es im nativen Simulationsmodell zu einer Verlängerung der APD90 kam, ist in Abbildung 25 B dargestellt. Ausgehend von der oben beschriebenen Verlängerung der APD90 durch eine  $I_{K_r}$ -Blockade von 75 % auf 172,2 ms (LQT2) zeigte sich dabei unter einer  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 und 50 % sowie einer zusätzlichen Blockade von 60 % des verbleibenden Reststroms von  $I_{K_r}$  die APD90 unverändert (LQT1 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{K_r}$ -Block).



**Abbildung 24: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) - Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in LQT2.** APs und APD90 nativer Myozyten (Kontrolle, rot), unter einer  $I_{K_r}$ -Blockade von 75 % (LQT2, grün) sowie unter Annahme einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % (LQT2 +  $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz) durch Bupivacain.  $V_m$  = Membranpotential.



**Abbildung 25: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) - Simulation einer zunehmenden  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain in LQ2.** A, APD90 unter einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 75 % (LQ2, grün) sowie unter Annahme einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % ( $I_{Na}/I_{Ca,L}$ -Block, schwarz) und zusätzlicher, zunehmender Blockade des verbleibenden Reststroms von  $I_{Kr}$  (10-100%, schwarz) durch Bupivacain. Die gestrichelten Linien definieren die Grenzen zu Verlängerung (+5 %) und Verkürzung (-5 %) der APD90. B, APs und APD90 nativer Zellen (Kontrolle, rot), unter einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 75 % (LQ2, grün) sowie unter einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % und Blockade von 60 % des Reststroms von  $I_{Kr}$  durch Bupivacain ( $I_{Na}/I_{Ca,L}/I_{Kr}$ -Block, schwarz).  $V_m$  = Membranpotential.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Myozyten

Bupivacain führte im Rahmen der zugrunde liegenden Untersuchung in nativen Myozyten zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung des APs mit einer signifikanten Reduktion der APD90 ab 30  $\mu\text{mol/L}$ . Dieser Effekt ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen Bupivacain die APD50 bzw. APD90 ventrikulärer Myozyten des Kaninchens ab 10 bzw. 100  $\mu\text{mol/L}$  signifikant reduzierte (Shibuya et al. 1993, Szabo et al. 2008). Die Dauer des ventrikulären APs ist abhängig von der Balance de- bzw. repolarisierender Ströme. Bupivacain ist als potenter Inhibitor sowohl von  $\text{Na}^+$ - (Nau et al. 2000) als auch L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Rossner und Freese 1997) beschrieben, so dass die Verkürzung der APD90 auf diese Kanalinteraktionen zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus vermittelt die Interaktion mit L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vermutlich auch den negativ inotropen Effekt der Substanz (Clarkson und Hondeghem 1985a, Shibuya et al. 1993).

Bupivacain zeigte des Weiteren eine signifikante Reduktion des Overshoots bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{mol/L}$ . Diese Modifikation der Phase 1 des ventrikulären APs ist ebenso auf eine Inhibition von  $\text{Na}^+$ -Kanälen zurückzuführen (Hagiwara und Nakajima 1965). Wie in dieser Arbeit findet sich in der Literatur kein Hinweis darauf, dass Bupivacain das Ruhemembranpotential beeinflusst (Shibuya et al. 1993). Da insbesondere  $I_{K1}$  letzteres stabilisiert (Snyders 1999), ist davon auszugehen, dass, obwohl sich hinsichtlich einer Blockade jener Stromkomponente durch Bupivacain widersprüchliche Aussagen finden (Castle 1990, Courtney und Kendig 1988), diese zumindest funktionell zu vernachlässigen sein könnte.

Obwohl Bupivacain im Mittel zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung des APs führte, hatte die Substanz in einer Konzentration von 3 bzw. 10  $\mu\text{mol/L}$  einen heterogenen Effekt und führte in einzelnen Versuchen zu einer deutlichen Verlängerung der APD90. Dieser Effekt kann nicht auf die Blockade depolarisierender Ströme ( $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{Ca,L}}$ ) zurückgeführt werden. Da Repolarisationsverzögerungen allerdings die Entstehung von EADs begünstigen und u. a. auf diesem Wege zu ventrikulären Arrhythmien führen können (Antzelevitch und Sicouri 1994), könnte dieser Effekt von Bupivacain von klinischer Relevanz sein. Die häufigste Ursache einer medikamentös erworbenen Repolarisationsverzögerung des Herzens ist eine Blockade von hERG-

Kanälen (Mitcheson et al. 2000a). Bupivacain ist als potenter Inhibitor von hERG-Kanälen beschrieben (Friederich et al. 2004, Gonzalez et al. 2002), eine  $I_{Ks}$ -Blockade durch Bupivacain ist vergleichsweise gering (Lipka et al. 1998). Im Meerschweinchen lässt sich  $I_{to}$ , ein mögliches Ziel von Bupivacain (Gonzalez et al. 2001, Solth et al. 2005), nicht nachweisen (Findlay 2003, Zhabyeyev et al. 2004). Insofern sind die Verlängerungen der APD90 dieser Arbeit am ehesten mit einer hERG-Kanal Blockade zu erklären. Dies ermöglicht prinzipiell die Annahme, dass letztere auch im Rahmen einer Bupivacainintoxikation eine Rolle für die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien spielen könnte.

Interessanterweise zeigte Bupivacain in dem genannten Konzentrationsbereich einen heterogenen Effekt mit nur wenigen Verlängerungen und mehrheitlicher Verkürzung der APD90. Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich in den transmuralen Unterschieden der elektrophysiologischen Eigenschaften, insbesondere der Dichte der verzögerten  $K^+$ -Ströme  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$ . So ist in der freien Wand des linken Ventrikels des Meerschweinchens die Dichte von  $I_{Ks}$  in midmyokardialen und subepikardialen signifikant höher als in subendokardialen Zellen (Bryant et al. 1998). Da  $I_{Ks}$  bei verzögerter Repolarisation vermutlich als eine Repolarisationsreserve zu werten ist (Cheng und Kodama 2004), könnte sich somit in subendokardialen Zellen eine hERG-Kanal Blockade durch Bupivacain stärker niederschlagen als in anderen Schichten. M-Zellen, die tief subepikardial gelegen sind und ebenfalls eine geringere Dichte von  $I_{Ks}$  aufweisen (Liu und Antzelevitch 1995), könnten ebenfalls Ursprung von Aktionspotentialverlängerungen durch eine hERG-Kanal Blockade sein. Ihre Repolarisationsverzögerungen sind typischerweise lang (Sicouri und Antzelevitch 1995) und ihre Sensitivität gegenüber Typ III Antiarrhythmika im Vergleich mit anderen Zellen besonders hoch (Sicouri und Antzelevitch 1993, Sicouri et al. 1996). Da es Evidenz für ihre Existenz sowohl im Herzen des Meerschweinchens (Sicouri et al. 1996) als auch des Menschen (Drouin et al. 1995) gibt, kommen sie damit durchaus für die Verlängerungen der APD90 dieser Arbeit in Frage und könnten möglicherweise auch Ort von Aktionspotentialverlängerungen durch Bupivacain beim Menschen sein. Vor dem Hintergrund, dass in allen Zellmodellen dieser Untersuchung (native Myozyten, LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>) auf dieselbe Methodik zur Zellisolation zurückgegriffen wurde, dienen diese Überlegungen allerdings nicht als Erklärungsmodell für die unterschiedliche Inzidenz von Aktionspotentialverlängerungen in den einzelnen Versuchsreihen (siehe dazu 5.2.2).



## 5.2 *Der Effekt von Bupivacain auf das Aktionspotential LQT-ähnlicher Myozyten*

### 5.2.1 *Etablierung von LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>*

Chromanol 293B ist in der Literatur als ein geeignetes Instrument zur selektiven I<sub>Ks</sub>-Blockade beschrieben. In isolierten ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens konnte bereits gezeigt werden, dass 10 µmol/L der Substanz zu einer Inhibition des Stroms von ca. 80 % führen (Bosch et al. 1998). Unter Versuchsbedingungen, die mit denen dieser Arbeit vergleichbar sind, kam es nach Applikation von 10 µmol/L Chromanol 293B zu einer Aktionspotentialverlängerung von ca. 60 ms (Schwoerer et al. 2010). Mit einer mittleren Aktionspotentialverlängerung von  $55,6 \pm 5,7$  ms stimmen damit die Resultate dieser Arbeit mit denen aus der Literatur weitestgehend überein.

E4031, ein selektiver Inhibitor von I<sub>Kr</sub>, zeigte in isolierten papillären Myozyten des Meerschweinchens eine maximale Verlängerung der Repolarisation des APs von ca. 50 % bei einer Konzentration von 1 µmol/L (Sanguinetti et al. 1991). In isolierten, ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens verlängerten 10 µmol/L der Substanz – bei mit dieser Arbeit vergleichbaren Versuchsbedingungen – die APD90 um ca. 40 ms (Schwoerer et al. 2010). Berücksichtigt man die hierbei geringere APD90 unter Kontrollbedingungen, so deckt sich jene Verlängerung zumindest relativ betrachtet weitestgehend mit der Verlängerung der APD90 von  $59,7 \pm 16,5$  ms dieser Arbeit.

Veratridin verhindert die Inaktivierung von Na<sup>+</sup>-Kanälen und ist zur Modellierung von LQT3 etabliert (Gerhardy et al. 1998, Hiraoka et al. 1992, Milberg et al. 2005a, Ulbricht 1998). Die Verlängerung der APD90 ist in dieser Arbeit mit  $228,0 \pm 32,7$  ms allerdings deutlich ausgeprägter als unter Chromanol 293B und E4031. Vor dem Hintergrund, dass das QT<sub>c</sub>-Intervall als elektrokardiographisches Korrelat zum ventrikulären AP keine Differenzierung der LQT-Subtypen erlaubt (Zareba 2006), wäre jedoch für die LQT3-Modellierung ein LQT1<sub>C293B</sub> und LQT2<sub>E4031</sub> entsprechender Wert erstrebenswert. Auch ein Blick in die Literatur gestattet zunächst nur eine unzureichende Beurteilung des Effekts von Veratridin. Denn während ausgeprägte Aktionspotentialverlängerungen durch die Substanz für Kardiomyozyten von Ratten (Nand et al. 1997) und Kaninchen (Milberg et al. 2005b) beschrieben sind, so fehlen jedoch Daten über den Effekt auf das ventrikuläre AP des Meerschweinchens. Vergleicht man allerdings den Effekt von Veratridin dieser Arbeit mit erhobenen Daten zu ATX-II (Anemonia Toxin-II), einer ebenfalls etablierten Substanz zur Induktion von

LQT3, wird deutlich, dass derartig ausgeprägte Verlängerungen der APD90 in einem zellulären LQT3-Modell durchaus beschrieben wurden. Dabei führte ATX-II in einer Konzentration von 20-30 nmol/L in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens zu einer Verdopplung der APD90 (Nishio et al. 1991). 100 nmol/L derselben Substanz verlängerten die APD90 endokardialer und epikardialer Zellen bzw. von M-Zellen des linken Ventrikels des Kaninchens von  $268 \pm 20$  auf  $494 \pm 43$  ms und  $228 \pm 15$  auf  $375 \pm 30$  ms bzw.  $287 \pm 12$  auf  $530 \pm 36$  ms (Shimizu und Antzelevitch 2000).

Obwohl mit Chromanol 293B, E4031 und Veratridin hoch selektive Substanzen verwendet wurden, die den genetischen Defekt des entsprechenden Ionenkanals imitieren, ist allerdings unklar, inwieweit diese Substanzen – insbesondere auch im Zusammenspiel mit Bupivacain – neben dem gewünschten Effekt noch andere Funktionen der Zelle beeinflussen. Vor diesem Hintergrund scheint eine LQT-Modellierung mit Hilfe von transgenen Tieren von Vorteil zu sein. Während in diesem Zusammenhang transgene Hasen mit einem LQT1- bzw. LQT2-Syndrom beschrieben sind (Odening et al. 2008), existieren jedoch bislang keine transgenen Meerschweinchen, so dass für diese Spezies lediglich die pharmakologische LQT-Modellierung in Frage kommt. Letzteres Instrument hat allerdings gegenüber der molekularbiologischen LQT-Modellierung einen ausschlaggebenden Vorteil. So ist hiermit nicht nur die Induktion eines Zustandes möglich, der dem angeborenen LQTS ähnelt. Über die pharmakologische Modulation von Ionenkanälen wird darüber hinaus die in der Klinik weitaus häufigere Form des LQTS, nämlich das medikamentös-erworbene LQTS, vermittelt. In diesem Zusammenhang sind zahlreiche Medikamente verschiedener Substanzgruppen beschrieben, die *per se* ein LQTS hervorrufen können (Crumb und Caverio 1999). Die Kombination dieser Substanzen mit Lokalanästhetika ist in der Klinik keine Seltenheit. Insofern stellt der pharmakologische Ansatz dieser Arbeit eine Methodik dar, welche den Effekt von Bupivacain nicht nur hinsichtlich des angeborenen LQTS, sondern auch im Hinblick auf die klinisch relevantere Form des erworbenen LQTS zu untersuchen ermöglicht.

### 5.2.2 Der Effekt von Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub>, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>

Während 3  $\mu$ mol/L Bupivacain keinen signifikanten Effekt auf die mittlere APD90 in LQT1<sub>C293B</sub> und LQT2<sub>E4031</sub> hatten, führte die Applikation der Substanz in LQT3<sub>Vera</sub> zu einer signifikanten Reduktion der APD90. Dieser Effekt sowie die

Reduktion der APD90 einzelner Myozyten in LQT1<sub>C293B</sub> und LQT2<sub>E4031</sub> können auf die Na<sup>+</sup>- (Nau et al. 2000) bzw. L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalblockade (Rossner und Freese 1997) von Bupivacain zurückgeführt werden. In LQT1<sub>C293B</sub> fand sich nach Applikation von Bupivacain im Vergleich zu nativen Myozyten eine erhöhte Varianz der APD90. Verlängerungen der APD90 waren hier, nicht aber in LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>, signifikant häufiger als unter Kontrollbedingungen. Dieser Effekt ist nicht mit Hilfe der Na<sup>+</sup>- bzw. L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalblockade von Bupivacain zu erklären, da eine Blockade depolarisierender Ströme zu einer Verkürzung der APD90 führen würde. In LQT1-ähnlichen Myozyten ist I<sub>Ks</sub> deutlich reduziert. Der Anteil an der Repolarisation der Zellmembran, den die schnelle Komponente des verzögerten K<sup>+</sup>-Stroms I<sub>Kr</sub> leistet, ist infolge dessen deutlich erhöht. Daher ist es vorstellbar, dass die beschriebene I<sub>Kr</sub>-Blockade durch Bupivacain, die in nativen Myozyten lediglich mit einer Wahrscheinlichkeit von ~ 6 % zu Verlängerungen der APD90 führte, in einer I<sub>Ks</sub>-defizienten Zelle weitaus bedeutsamer ist. In LQT2-ähnlichen Myozyten hingegen ist I<sub>Kr</sub> deutlich reduziert (Kurokawa et al. 2008). Eine zusätzliche I<sub>Kr</sub>-Blockade hat daher bei erhaltenem I<sub>Ks</sub> nur einen geringen Effekt auf die Repolarisation der Zellmembran. Dies ist eine mögliche Erklärung für das in LQT2<sub>E4031</sub> mit nativen Myozyten vergleichbare Risiko für Verlängerungen der APD90. In LQT3-ähnlichen Myozyten ist die Inaktivierung von I<sub>Na</sub> bei erhaltenen I<sub>Ks</sub> und I<sub>Kr</sub> reduziert. Wie für den klassischen Na<sup>+</sup>-Kanalblocker Tetrodotoxin beschrieben (Eskinder et al. 1993), antagonisiert Bupivacain hierbei am ehesten die langsame Na<sup>+</sup>-Kanalaktivierung durch Veratridin, so dass die daraus resultierende Aktionspotentialverkürzung gegenüber der Repolarisationsverzögerung durch eine I<sub>Kr</sub>-Blockade überwiegt. Dementsprechend kam es in LQT3<sub>Vera</sub> nach Applikation von Bupivacain durchgehend zu Aktionspotentialverkürzungen. Bupivacain zeigte folglich in dieser Arbeit ein LQT-Subtyp spezifisches Risiko für Verlängerungen der APD90, wonach in einem I<sub>Ks</sub>-defizienten Zellmodell (LQT1<sub>C293B</sub>) die I<sub>Kr</sub>-Interaktion von Bupivacain hinsichtlich einer Verlängerung der APD90 funktionell weitaus relevanter war als in nativen Myozyten, LQT2<sub>E4031</sub> und LQT3<sub>Vera</sub>.

Vor dem Hintergrund, dass im Rahmen der Zellisolation dieser Arbeit nicht zwischen den einzelnen Zellschichten, nämlich Subendo-, Subepi- und Midmyokard, unterschieden wurde, für diese jedoch und insbesondere auch für M-Zellen unterschiedliche elektrophysiologische Charakteristika beschrieben sind (siehe 5.1), stellt sich allerdings auch die Frage, ob die häufigeren Verlängerungen der APD90 in

LQT1<sub>C293B</sub> nicht vielmehr ein Resultat einer zufällig vermehrten Wahl bestimmter Zelltypen in LQT1<sub>C293B</sub> und weniger als Folge der pharmakologisch induzierten I<sub>Ks</sub>-Defizienz zu werten sind. Vor allem eine zufällig häufigere Untersuchung von subendokardialen Zellen und M-Zellen, für die I<sub>Ks</sub> generell von geringerer Bedeutung für die Repolarisation ist (Bryant et al. 1998, Liu und Antzelevitch 1995), könnte in diesem Zusammenhang vortäuschen, dass Bupivacain einen LQT-Subtyp spezifischen Effekt aufweist. Dies hieße, dass der beobachtete Effekt von Bupivacain nicht LQT-Subtyp-spezifisch sondern lediglich Zelltyp-spezifisch ist. Folgende Überlegungen sprechen allerdings gegen diese Annahme: Bei einer zufälligen Wahl bestimmter Zelltypen wäre zu erwarten gewesen, dass sich die mittlere APD90 der nativen Zellen, die im weiteren Verlauf in LQT1<sub>C293B</sub> unter Bupivacain eine Verlängerung der APD90 zeigten, von der APD90 aller anderen Zellen in LQT1<sub>C293B</sub> unterscheidet, da verschiedenen Zellschichten unterschiedliche Aktionspotentiallängen aufweisen und insbesondere M-Zellen durch ein typischerweise langes AP charakterisiert sind (Shimizu und Antzelevitch 2000). Die Mittelwerte der APD90 der Zellen, die im weiteren Verlauf in LQT1<sub>C293B</sub> unter Bupivacain eine Verlängerung der APD90 zeigten bzw. bei denen Bupivacain keinen Effekt auf die APD90 hatte oder zu einer Verkürzung der APD90 führte, sind allerdings mit  $265,5 \pm 13,5$  ms (n = 8) bzw.  $269,4 \pm 8,0$  ms (n = 25) nahezu identisch. Auch scheint die Wahrscheinlichkeit gering, dass im Rahmen einer konstanten Zellisolation in den Versuchen mit Chromanol 293B vermehrt Zellen, die von vornherein ein höheres Ansprechen auf Klasse III Antiarrhythmika aufweisen, untersucht wurden. Insbesondere die zufällig häufigere Untersuchung von M-Zellen in LQT1<sub>C293B</sub> ist unwahrscheinlich, da diese bislang erst von einer Arbeitsgruppe an isolierten Kardiomyozyten des Meerschweinchen beschrieben wurden (Sicouri et al. 1996) und ihre Existenz insbesondere für diese Spezies daher fraglich ist. Während die vereinzelt Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in nativen Myozyten möglicherweise auf spezifische Zellpopulationen zurückzuführen sind, sind die signifikant häufigeren Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub> somit am ehesten Folge der pharmakologisch induzierte I<sub>Ks</sub>-Defizienz.

Wie bereits dargestellt, war im Gegensatz zu LQT3<sub>Vera</sub> in nativen Zellen, LQT1<sub>C293B</sub> und LQT2<sub>E4031</sub> der Effekt von Bupivacain auf die APD90 heterogen, so dass sich in diesen Modellen – mit unterschiedlichem Ausmaß – sowohl Verlängerungen als auch Verkürzungen der APD90 fanden. Der Nettoeffekt von Bupivacain auf das AP hängt dabei von der Blockade jeder einzelnen Stromkomponente, also insbesondere von

$I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Kr}$ , und dem relativen Beitrag dieser Ströme zum AP ab. Insbesondere letzterer kann jedoch von Zelle zu Zelle variieren sowie vom individuellen Expressionsmuster der Ionenkanäle und dem zellulären Metabolismus moduliert werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die beobachtete Variabilität der Aktionspotentialveränderungen in den einzelnen Modellen sein. Inwieweit das Ausmaß der  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain darüber bestimmt, ob eine Zelle bei bestehender  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade eine Verlängerung oder Verkürzung der APD90 zeigt, wurde mit Hilfe der computergestützten Simulationen untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

### 5.3 Computergestützte Simulationen von ventrikulären Aktionspotentialen

Die Modulation der APD90 durch Bupivacain resultiert, wie beschrieben, aus einer Blockade depolarisierender ( $I_{Na}$  und  $I_{Ca,L}$ ) und repolarisierender ( $I_{Kr}$ ) Ströme. Um die Höhe der jeweiligen Ionenkanalblockade durch Bupivacain zu quantifizieren, wurden im Rahmen dieser Untersuchung computergestützte Simulationen von APs mit Hilfe des LRd durchgeführt.

Unter einer  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade von 55 bzw. 50 % stellte sich dabei im LRd eine Verkürzung der APD90 von  $\sim 7$  % ein, die sich mit der mittleren Verkürzung der APD90 der *in vitro* Versuche ( $\sim 9$  %) deckt. Da darüber hinaus eine  $I_{Na}$ - bzw.  $I_{Ca,L}$ -Blockade dieser Größenordnung durch 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain beschrieben ist (Mio et al. 2004, Nau et al. 2000, Szabo et al. 2008, Zapata-Sudo et al. 2001), war diese Kombination der Ionenkanalblockade Ausgangslage für die weiteren Simulationen mit dem LRd.

3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain führten in wenigen isolierten, nativen Myozyten zu einer Verlängerung der APD90. Dieser Effekt ist am ehesten auf die  $I_{Kr}$ -Blockade durch die Substanz zurückzuführen (siehe 5.1). Den Simulationen mit Hilfe des LRd zufolge war unter der beschriebenen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade zusätzlich eine  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 % notwendig, damit sich eine Verlängerung der APD90 einstellte. Vergleicht man die Verlängerung der APD90 nativer Zellen, die in den Patch-Clamp Versuchen unter 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain eine Verlängerung der APD90 zeigten ( $\sim 12$  %), fällt die Verlängerung im LRd mit  $\sim 7$  % allerdings verhältnismäßig gering aus. Dennoch legen die in der Literatur beschriebenen  $IC_{50}$ -Werten für eine  $I_{Kr}$ -Blockade von  $18 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/L}$  (Gonzalez et al. 2002) und  $22 \pm 2$   $\mu\text{mol/L}$  (Siebrands et al. 2005) nahe,

dass eine  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 % in dem untersuchten Konzentrationsbereich durchaus vorstellbar ist.

In den computergestützten Simulationen zu LQT1 führte eine  $I_{Ks}$ -Blockade von 75 % zu einer Verlängerung der APD90 um ~ 35 %. Damit ist dieser Wert im Vergleich zur mittleren Verlängerung der APD90 durch Chromanol 293B von ~ 21 % hoch. Der simulierte Effekt von Bupivacain mit einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade führte zu einer Verkürzung der APD90 von ~ 12 %; dieser Wert deckt sich damit mit der mittleren Verkürzung der APD90 von ~ 11 % isolierter Zellen, die in LQT1<sub>C293B</sub> nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain eine Verkürzung der APD90 zeigten. In den computergestützten Simulationen einer zusätzlichen  $I_{Kr}$ -Blockade konnte gezeigt werden, dass es in LQT1 bei bestehender  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade bereits ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 40 % zu einer Verlängerung der APD90 kommt. Gegenüber dem nativen Simulationsmodell reduziert sich damit die zum Erreichen einer Verlängerung der APD90 notwendige  $I_{Kr}$ -Blockade von 60 auf 40 %. Mit einem Wert von ~ 9 % ist die Verlängerung der APD90 in der computergestützten Simulation vergleichbar mit der mittleren Verlängerung der APD90 isolierter Zellen, die in LQT1<sub>C293B</sub> nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain eine Verlängerung der APD90 zeigten (~ 9 %).

In den computergestützten Simulationen zu LQT2 führte eine  $I_{Kr}$ -Blockade von 75 % zu einer Verlängerung der APD90 von ~ 19 %. Gegenüber der mittleren Verlängerung der APD90 durch E4031 von ~ 25 % fällt dieser Wert damit vergleichsweise gering aus. Der simulierte Effekt von Bupivacain mit einer zusätzlichen  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca,L}$ -Blockade führte zu einer Verkürzung der APD90 von ~ 5 % und ist damit niedriger als die mittlere Verkürzung der APD90 von ~ 13 % isolierter Zellen, die in LQT2<sub>E4031</sub> nach zusätzlicher Applikation von 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain eine Verkürzung der APD90 zeigten. Die Simulationen einer zusätzlichen  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain ergaben, dass gegenüber LQT2 selbst bei einer kompletten  $I_{Kr}$ -Blockade keine Verlängerung der APD90 induzierbar war. Analog dazu war mit ~ 6 % auch das Risiko für eine Verlängerung der APD90 in LQT2<sub>E4031</sub> gering.

Obwohl sich nicht alle Ergebnisse der computergestützten Simulationen mit den Resultaten aus den Patch-Clamp Versuchen decken, zeigen die Simulationen mit Hilfe des LRd doch mögliche Ionenkanalinteraktionen durch Bupivacain auf, welche als Ursache für den unterschiedlichen Effekt, den die Substanz in nativen, LQT1- und LQT2-ähnlichen Myozyten hatte, in Betracht kommen. Die Simulationen legen nahe, dass Bupivacain in einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/L}$  zu etwa 50 %  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -

Kanäle inhibiert. Diese kombinierte Ionenkanalblockade führte in den computergestützten Simulationen zu einer relevante Aktionspotentialverkürzung, die weitestgehend mit den Resultaten aus den Versuchen mit isolierten Myozyten übereinstimmt. Darüber hinaus wird in den computergestützten Simulationen deutlich, dass das Ausmaß einer zusätzlichen  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain den Nettoeffekt der Substanz auf die APD90 maßgeblich beeinflusst. Vor dem Hintergrund, dass das Ausmaß dieser Ionenkanalblockade von Zelle zu Zelle unterschiedlich ausfallen kann, liefert dies eine mögliche Erklärung für die Variabilität der Aktionspotentialveränderungen in den einzelnen Zellmodellen.

Die unterschiedliche Bedeutung einer  $I_{Kr}$ -Blockade in den einzelnen Zellmodellen wird deutlich, wenn man den Effekt der zunehmenden  $I_{Kr}$ -Blockade in den Simulationsmodellen miteinander vergleicht. Während es in LQT1 bereits ab einer  $I_{Kr}$ -Blockade von 40 % zu einer Verlängerung der APD90 kam, so war in nativen Zellen eine Blockade von 60 % notwendig, um eine Verlängerung der APD90 zu induzieren. In LQT2 führte hingegen auch eine komplette  $I_{Kr}$ -Blockade nicht zu einer Verlängerung der APD90. Analog dazu waren in isolierten Myozyten Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in LQT1<sub>C293B</sub> am häufigsten und signifikant häufiger als in nativen Myozyten. In LQT2<sub>E4031</sub> kam es in lediglich 1/18 Versuchen zu einer Verlängerung der APD90 durch Bupivacain. Dieser Vergleich der Ergebnisse aus den computergestützten Simulationen mit den Resultaten aus den Patch-Clamp Versuchen unterstreicht, dass der aktionspotentialverlängernde Effekt von Bupivacain im Rahmen einer  $I_{Kr}$ -Blockade zu bewerten ist und in einem  $I_{Ks}$ -defizienten System schon eine geringere  $I_{Kr}$ -Blockade funktionell relevant ist.

#### 5.4 *Klinische Implikationen*

In dieser Arbeit führten 3  $\mu\text{mol/L}$  Bupivacain in einem zellulären Modell des Meerschweinchens in LQT1-ähnlichen Zellen signifikant häufiger zu Verlängerungen der APD90 als in Kontrollmyozyten. In LQT2- und LQT3-ähnlichen Myozyten hingegen war das Risiko für Verlängerungen der APD90 nicht erhöht. Dieser Effekt ist am ehesten auf eine  $I_{Kr}$ -Blockade durch Bupivacain zurückzuführen. Es stellt sich damit die Frage, inwieweit dieses Ergebnis auch auf das menschliche Herz übertragbar ist und welche klinischen Konsequenzen sich daraus ergeben.

#### 5.4.1 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Eine erhöhte Varianz der APD90 mit signifikant häufigeren Verlängerungen der APD90 in LQT1<sub>C293B</sub> gegenüber nativen Myozyten fand sich nach Applikation von Bupivacain in einer Konzentration von 3 µmol/L. Um die Ergebnisse auch für das menschliche Myokard zu diskutieren, stellt sich die Frage, inwieweit eine entsprechend hohe Plasmakonzentration beim Menschen überhaupt realistisch ist und ob diese die Schwelle zur Kardiotoxizität bereits überschreitet. In diesem Zusammenhang berichteten bereits Colley und Heavner von Plasmakonzentrationen von bis zu 1,23 µg/mL (4,3 µmol/L), die an 5 Patienten nach Kopfhautinfiltration mit 2 mg/kg 0,25 %-igen Bupivacain vor Kraniotomie gemessen wurden (Colley und Heavner 1981). Noch höhere Plasmakonzentrationen sind im Rahmen massiver Überdosierung von Bupivacain (Davis und de Jong 1982) oder insbesondere nach versehentlicher intravasaler Injektion des Lokalanästhetikums zu erwarten. So veröffentlichten Favier et al. einen Fallbericht, nach dem 30 Minuten nach versehentlicher i. v.-Injektion von Bupivacain eine Plasmakonzentration von 1,6 µg/mL (5,6 µmol/L) gemessen werden konnte (Favier et al. 2003).

Für eine genaue Betrachtung, inwieweit die in dieser Arbeit verwendete Konzentration im Rahmen einer klinischen Applikation vorkommen kann, muss weiterhin zwischen der totalen und freien Plasmakonzentration unterschieden werden. Letztere, also die Protein-ungebundene Plasmakonzentration von Bupivacain, ist nämlich nicht nur diejenige, die am ehesten mit der verwendeten Konzentration der *in vitro* Versuche verglichen werden kann, sie vermittelt darüber hinaus als sog. aktive Plasmakonzentration den pharmakologischen und toxischen Effekt der Substanz (Tucker 1986). In diesem Zusammenhang untersuchten Hasselstrom et al. Patienten, die vor und nach Cholezystektomie Bupivacain i. v. erhielten. Bei einer mittleren totalen Plasmakonzentration von maximal ~ 4 µg/ml (13,9 µmol/L) lag der Mittelwert der freien Plasmakonzentration von Bupivacain hierbei bei maximal ~ 0,2 µg/ml (0,7 µmol/L) (Hasselstrom et al. 1985). Insofern liegt auch dieser Wert in dem in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsbereich.

Hinsichtlich der Toleranz einer erhöhten Plasmakonzentration von Bupivacain existieren interindividuelle Schwankungen. Als Grenze zur Toxizität für das zentrale Nervensystem (ZNS) wird dabei eine totale Plasmakonzentration von 2-4 µg/mL (6,9-13,9 µmol/L) angenommen (Tucker 1986). Andere Autoren gehen davon aus, dass



bereits eine totale Plasmakonzentration von 1,6 µg/mL (5,55 µmol/L) zu einer milden, neurologischen Symptomatik führen könne (Reynolds 1987). Das kardiovaskuläre System (CVS) weist tierexperimenteller Studien zufolge eine im Vergleich zum ZNS höhere Resistenz gegenüber Lokalanästhetika auf. Dabei wird das Verhältnis der toxischen Dosis für das CVS zur toxischen Dosis für das ZNS mit 4:5 angegeben (Reynolds 1987). So konnte beispielsweise an Schafen, denen Bupivacain intrakoronar infundiert wurde, gezeigt werden, dass bereits eine totale Plasmakonzentration von 8 µmol/L ventrikuläre Tachykardien hervorruft (Chang et al. 2001). Die Schwelle zur Kardiotoxizität von Bupivacain wird darüber hinaus durch weitere Faktoren moduliert und u. a. durch Hypoxie und Azidose (Rosen et al. 1983) sowie Hyperkaliämie (Avery et al. 1984) herabgesetzt werden. Insofern ist davon auszugehen, dass die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung hervorgerufenen Verlängerungen der APD90 in einem Konzentrationsbereich liegen, der nicht nur infolge einer Bupivacainintoxikation beim Menschen realistisch erscheint sondern auch bereits toxisch sein kann.

Das in dieser Arbeit verwendete zelluläre Modell des Meerschweinchens ist als Methode zur Vorhersage von substanzinduzierten QT-Verlängerungen beim Menschen etabliert; es liefert Daten, die sich mit denen aus telemetrischen Untersuchungen an Tieren und Menschen decken (Davie et al. 2004). Auch ist für viele Substanzen, die das QT-Intervall verlängern können, ein ähnlicher Effekt auf Myozyten des Meerschweinchens bzw. des Menschen beschrieben (Davie et al. 2004). Daneben sind ventrikulären Myozyten beider Spezies im Hinblick auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften sehr ähnlich; insbesondere die regionale Verteilung der  $I_{Na}$ -,  $I_{Ks}$ - und  $I_{Kr}$ -generierenden Ionenkanäle ist vergleichbar (Bryant et al. 1997, Davie et al. 2004, Doerr et al. 1990, Main et al. 1998, Varro et al. 1993). Daher sind die Bupivacain-induzierten Verlängerungen der APD90 dieser Arbeit als ein geeigneter Surrogatorparameter für Verlängerungen des QT-Intervalls durch die Substanz auch beim Menschen anzusehen. Da Verlängerungen des QT-Intervalls als potentiell arrhythmogen zu werten sind (Antzelevitch und Sicouri 1994), stellen die Verlängerungen der APD90 darüber hinaus auch einen geeigneten Surrogatorparameter für die Arrhythmogenität von Bupivacain beim Menschen dar. Insofern kann die APD90 und ihre Verlängerung, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Redfern et al. 2003), als ein präklinisches Instrument zur Abschätzung des Risikos einer Substanz – in diesem Falle von Bupivacain, Tachyarrhythmien hervorzurufen, herangezogen werden. Somit ist zu vermuten, dass im Rahmen einer Intoxikation mit Bupivacain Patienten mit einem angeborenen oder

erworbenen LQT1-Syndrom gegenüber Patienten ohne  $I_{Ks}$ -Defizienz ein erhöhtes Risiko für QT-Intervall Verlängerungen und daraus resultierenden ventrikulären Herzrhythmusstörungen haben. Um diese Vermutung zu untermauern, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Vorstellbar sind in diesem Zusammenhang tier telemetrische Versuche, bei denen in einem *in vivo* LQT-Modell der Effekt von Bupivacain auf das gesamte Herz charakterisiert werden könnte.

Ein wichtiger Aspekt ist, dass der durch  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$  jeweils zur Repolarisation der Zellmembran geleistete Beitrag speziesspezifisch ist. Während nämlich im Ventrikelmyokard des Meerschweinchens der Beitrag beider Komponenten nahezu identisch ist (Sanguinetti und Jurkiewicz 1990), wird der Hauptanteil des Auswärtsstroms im Ventrikelmyokard des Hundes (Varro et al. 2000) und des Kaninchens (Cheng et al. 1999) durch  $I_{Kr}$  vermittelt und  $I_{Ks}$  spielt hinsichtlich der Repolarisation nur eine untergeordnete Rolle. Verlässliche Daten über die relative Bedeutung von  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$  für die Repolarisation menschlicher ventrikulärer Zellen liegen hingegen nicht vor. So betrifft zum Einen die Mehrzahl der elektrophysiologischen Untersuchungen von humanen Myozyten das kranke Herz, wodurch von einer veränderten Kanalexpression auszugehen ist, zum Anderen ist selbst aus molekularbiologischen Expressionsstudien nicht auf den funktionellen, elektrophysiologischen Beitrag der einzelnen Komponenten zu schließen. Dennoch zeigen die oben aufgeführten Beispiele, dass  $I_{Ks}$  beim Meerschweinchen einen mit anderen Spezies vergleichsweise hohen Beitrag zur Repolarisation leistet, der möglicherweise beim Menschen so nicht zu erwarten ist (Cheng und Kodama 2004). Dies hätte zur Folge, dass bedingt durch die verminderte Repolarisationsreserve durch  $I_{Ks}$  beim Menschen Repolarisationsverzögerungen im Rahmen einer hERG-Kanalblockade durch Bupivacain häufiger und in stärkerer Form vorkämen als beim Meerschweinchen. Insofern ist es möglich, dass die Verlängerungen der APD90, die in dieser Arbeit nach Applikation von Bupivacain nur sporadisch auftraten, beim menschlichen Ventrikelmyokard von größerer Relevanz sind. Dies würde bedeuten, dass im Rahmen einer Intoxikation mit Bupivacain auch beim herzgesunden, nicht  $I_{Ks}$ -defizienten Patienten häufiger QT-Intervall Verlängerungen und möglicherweise auch ventrikuläre Arrhythmien zu erwarten wären als es die Daten dieser Arbeit vermuten lassen.

#### 5.4.2 Genetische Differenzierung von LQT-Subtypen in der Klinik

Die vorangegangenen Ausführungen machen deutlich, dass Patienten mit einem erworbenen bzw. angeborenen LQT1-Syndrom im Gegensatz zu LQT2- und LQT3-Patienten möglicherweise ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien infolge einer Intoxikation mit Bupivacain haben. Es stellt sich demnach die Frage, ob sich daraus die Notwendigkeit einer Differenzierung der LQT-Subtypen bei Patienten mit einem LQTS, insbesondere im Rahmen des perioperativen Managements, ableiten lässt. Während die derzeitigen Empfehlungen dahin gehen, bei LQTS-Patienten QT-Intervallverlängernde Medikamente generell zu vermeiden, ist die genetische Subtypenanalyse noch nicht verbreitet verfügbar (Zipes et al. 2006). Insbesondere die Annahme, dass die Existenz multipler einzelner Mutationen auf verschiedenen Genen ein systematisches Screening ganzer Genregionen erfordert, hat die Einführung einer genetischen Differenzierung als klinische Routinediagnostik von LQTS-Patienten bislang verhindert (Napolitano et al. 2005). Dabei ermöglicht die genetische Analyse eine Risikostratifizierung der betroffenen Patienten (Priori et al. 2003) und dient vor dem Hintergrund, dass insbesondere LQT1-Patienten von einer medikamentösen  $\beta$ -Blockade profitieren (Tester und Ackerman 2011), der LQT-Subtyp spezifischen Therapieentscheidung (Napolitano et al. 2005). Darüber hinaus können auf der Grundlage einer Subtypenanalyse betroffenen Patienten Subtyp-spezifische Empfehlungen hinsichtlich der Lebensführung und Vermeidung von Situationen mit einem erhöhten Risiko für kardiale Ereignisse gemacht werden (Zipes et al. 2006). Auch die Schlussfolgerung der vorliegenden Untersuchung, dass LQT1-Patienten im Rahmen einer Intoxikation mit Bupivacain möglicherweise ein höheres Risiko für ventrikuläre Arrhythmien haben als LQT2- bzw. LQT3-Patienten, spricht für die Etablierung einer Genotyp-spezifischen Differenzierung der Betroffenen. Infolge dieser könnte dann insbesondere für Erstere eine Lokalanästhesie mit alternativen Substanzen zu Bupivacain in Erwägung gezogen werden. So ist etwa das weniger lipophile Mepivacain, das  $I_{Kr}$  mit einem  $IC_{50}$  von  $156,2 \pm 11,1 \mu\text{mol/L}$  vergleichsweise schwach inhibiert (Siebrands et al. 2005), für seine geringere Kardiotoxizität bekannt (Tagariello et al. 2001) und kommt daher vor allem bei kurzen Operationszeiten bei LQT1-Patienten als Alternative zu Bupivacain in Betracht. Das bislang als sicherstes, langwirksames Aminoamid-Lokalanästhetikum angesehene, reine S-Enantiomer Ropivacain (Graf 2001, Wang et al. 2001) inhibiert  $I_{Kr}$  mit einem  $IC_{50}$  von

23,9 ± 1,6 µmol/L vergleichsweise stark; ähnliches gilt für Levobupivacain (IC<sub>50</sub> = 12,7 ± 1,4 µmol/L) (Siebrands et al. 2005), so dass diese Substanzen möglicherweise bei LQT1-Patienten keine Alternative zu Bupivacain darstellen. Inwieweit sie allerdings in einem zellulären LQT1-Modell vermehrt zu Verlängerungen der APD90 führen, ist bisher noch nicht geklärt und könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Risikoreduktion von kardialen Ereignissen insbesondere bei LQT1-Patienten besteht darin, bei diesen großzügiger auf Adjuvantien zurückzugreifen und dadurch die Dosis des potentiell I<sub>Kr</sub>-inhibierenden Lokalanästhetikums zu verringern. In diesem Zusammenhang kann auf eine wachsende Zahl von Medikamenten zurückgegriffen werden, die nicht nur den analgetischen Effekt erhöhen sondern auch eine verbesserte Sicherheit für den Patienten bewirken (Buckenmaier und Bleckner 2005).

Vor dem Hintergrund, dass derzeit hunderte Mutationen in 12 verschiedenen LQTS-assoziierten Genen identifiziert sind (Tester und Ackerman 2011), ist die Effizienz einer genetischen Differenzierung entscheidend. Vorstellbar sind hierbei mehrstufige Analysestrategien, die zunächst häufigere Mutationen einschließen und erst bei negativem Testergebnis seltenere Mutationen und LQT-Subtypen berücksichtigen (Napolitano et al. 2005). Darüber hinaus können Zuordnungen zwischen Pheno- und Genotyp eine phenotyp-gerichtete, genetische Differenzierung unterstützen. Beispielsweise lassen in diesem Zusammenhang belastungsassoziierte kardiale Ereignisse eher ein LQT1-Syndrom vermuten, während kardiale Ereignisse infolge eines auditorischen Triggers bzw. während des Schlafes auf ein LQT2- bzw. LQT3-Syndrom hindeuten (Tester und Ackerman 2011). Weiterhin sind klinische Testverfahren, etwa in Gestalt einer Erfassung lagerungs- und übungsbedingter Veränderungen der QT/RR-Relation, hilfreich, um den LQT-Subtyp einzugrenzen und ggf. genetische Tests darauf abzustimmen (Wong et al. 2010). Für eine genetische Mutationsanalyse kommen Patienten in Frage, bei denen zum Einen der klinische Verdacht besteht, was insbesondere auch ein QT<sub>c</sub>-Intervall von ≥ 500 ms einschließt, oder bei denen es zu medikamenten-induzierten TdPs gekommen ist. Da lediglich 12 % der Patienten eine Neumutation aufweisen, kommen darüber hinaus auch Angehörige von LQTS-Patienten in Betracht (Napolitano et al. 2005, Tester und Ackerman 2011). Problematisch ist allerdings, dass viele Träger mit LQTS-Mutationen ein unauffälliges QT<sub>c</sub>-Intervall zeigen und somit der klinischen Diagnose entgehen (Napolitano et al.

2005). Diese Patienten würden von einem weiter reichenden Screening profitieren. Allerdings kann nicht in allen Fällen bei klinischem Verdacht eine genetische Analyse die Diagnose sichern, da 20-25 % aller LQTS-Patienten noch immer keinem Genotyp zugeordnet werden können (Tester und Ackerman 2011). Dies macht deutlich, dass auch in Zukunft die Entdeckung neuer Mutationen und LQT-Subtypen erforderlich ist.

### 5.5 Fragestellung

Auf die eingangs aus der Arbeitshypothese abgeleiteten Fragen (siehe 1) wird im Folgenden eingegangen.

1. Bupivacain führte zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung der APD90 nativer ventrikulärer Kardiomyozyten des Meerschweinchens. In einzelnen Versuchen führte die Applikation von Bupivacain in einer Konzentration von 3 und 10  $\mu\text{mol/L}$  allerdings zu teilweise deutlichen Verlängerungen der APD90.
2. In einem LQT1-ähnlichen Modell führte die Applikation von Bupivacain in einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/L}$  zu einer im Vergleich mit nativen Myozyten erhöhten Varianz mit signifikant häufigeren Verlängerungen der APD90. In einem LQT2- bzw. LQT3-ähnlichen Modell waren Verlängerungen der APD90 nicht häufiger als in nativen Myozyten.
3. Die computergestützten Simulationen mit dem LRd legen nahe, dass die Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain auf eine  $I_{Kr}$ -Blockade zurück zu führen sind. Im Hinblick auf die Aktionspotentiallänge gewinnt dabei eine  $I_{Kr}$ -Blockade unter  $I_{Ks}$ -defizienten Bedingungen (LQT1) an Relevanz.
4. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass LQT1-Patienten im Gegensatz zu LQT2- bzw. LQT3-Patienten möglicherweise ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien in Folge einer Intoxikation mit Bupivacain haben. Dies macht deutlich, dass eine genetische Differenzierung der LQT-Subtypen im Rahmen des perioperativen Managements in Zukunft sinnvoll werden könnte.

## 6 Zusammenfassung

Das Long QT Syndrom (LQTS) ist eine kardiale Erkrankung, die durch ventrikuläre Tachyarrhythmien und den plötzlichen Herztod charakterisiert ist. Neben dem angeborenen LQTS, deren häufigsten Formen die Subtypen LQT1, LQT2 und LQT3 darstellen, können viele Substanzen zu einem erworbenen LQTS führen. Insofern ist das perioperative Management von LQTS-Patienten von wachsendem Interesse. Auch das Lokalanästhetikum Bupivacain ist für seine Kardiotoxizität bekannt. Dies wird derzeit insbesondere auf seine Interaktion mit kardialen  $\text{Na}^+$ -Kanälen zurückgeführt. Daneben inhibiert Bupivacain auch den  $\text{I}_{\text{Kr}}$ -generierenden hERG (human Ether-à-go-go Related Gene)-Kanal, so dass auch diese Interaktion als Ursache für die Kardiotoxizität der Substanz in Frage kommt.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Bupivacain auf das ventrikuläre Aktionspotential (AP) nativer Myozyten sowie nach pharmakologischer Induktion von LQT1, LQT2 und LQT3 mit Hilfe der Patch-Clamp Technik in einem *in vitro* Zellmodell des Meerschweinchens charakterisiert. Anschließend wurde die Relevanz potentieller Ionenkanalinteraktionen von Bupivacain durch computergestützte Simulationen mit dem Luo-Rudy dynamic model (LRd) analysiert. Bupivacain führte dabei in nativen Myozyten zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung des APs. In einzelnen Zellen konnten bei einer Konzentration von 3 und 10  $\mu\text{mol/L}$  allerdings z. T. beträchtliche Aktionspotentialverlängerungen beobachtet werden. Bei einer erhöhten Varianz der individuellen Veränderung der Aktionspotentialdauer durch Bupivacain waren Aktionspotentialverlängerungen hierbei in LQT1-ähnlichen Myozyten signifikant häufiger als in nativen Myozyten. In LQT2- und LQT3-ähnlichen Zellen hingegen war die Inzidenz von Aktionspotentialverlängerungen gegenüber nativen Myozyten nicht erhöht. In den computergestützten Simulationen ventrikulärer APs konnte gezeigt werden, dass in  $\text{I}_{\text{Ks}}$ -defizienten Zellen (LQT1) im Gegensatz zu nativen und  $\text{I}_{\text{Kr}}$ -defizienten Zellen (LQT2) schon eine geringe hERG-Kanal Blockade zu Aktionspotentialverlängerungen führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die hERG-Kanal Blockade von Bupivacain, welche unter normalen Umständen nur wenig Einfluss auf das ventrikuläre AP hat, in LQT1-ähnlichen Zellen, in denen  $\text{I}_{\text{Ks}}$ , die zweite Komponente des verzögerten  $\text{K}^+$ -Stroms, reduziert ist, in Form von Aktionspotentialverlängerungen an

Relevanz gewinnt. Da Aktionspotentialverlängerungen eine wichtige Rolle in der Pathogenese ventrikulärer Tachyarrhythmien spielen, ist als Ursache für die Kardiotoxizität von Bupivacain demnach seine Interaktion mit dem hERG-Kanal und möglicherweise weniger mit kardialen Na<sup>+</sup>-Kanälen anzusehen. Daneben unterstreicht der unterschiedliche Effekt von Bupivacain in den einzelnen LQT-Modellen die Forderung nach einer Differenzierung der Genotypen von LQTS-Patienten im Rahmen des perioperativen Managements.

## 7 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, G. W., SESTI, F., SPLAWSKI, I., BUCK, M. E., LEHMANN, M. H., TIMOTHY, K. W., KEATING, M. T., GOLDSTEIN, S. A. (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 97, 175-87.
- ALBRIGHT, G. A. (1979) Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. *Anesthesiology*, 51, 285-7.
- AN, W. F., BOWLBY, M. R., BETTY, M., CAO, J., LING, H. P., MENDOZA, G., HINSON, J. W., MATTSSON, K. I., STRASSLE, B. W., TRIMMER, J. S., RHODES, K. J. (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, 403, 553-6.
- ANSON, B. D., WEAVER, J. G., ACKERMAN, M. J., AKINSETE, O., HENRY, K., JANUARY, C. T., BADLEY, A. D. (2005) Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors. *Lancet*, 365, 682-6.
- ANTON, D., FRIEDERICH, P. (2010) Automated perioperative QT monitoring in a patient with long QT syndrome 2. *Br J Anaesth*, 105, 701-2.
- ANTZELEVITCH, C., SICOURI, S. (1994) Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. *J Am Coll Cardiol*, 23, 259-77.
- ANTZELEVITCH, C., SHIMIZU, W., YAN, G. X., SICOURI, S., WEISSENBURGER, J., NESTERENKO, V. V., BURASHNIKOV, A., DI DIEGO, J., SAFFITZ, J., THOMAS, G. P. (1999) The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10, 1124-52.
- AVERY, P., REDON, D., SCHAEZNER, G., RUSY, B. (1984) The influence of serum potassium on the cerebral and cardiac toxicity of bupivacaine and lidocaine. *Anesthesiology*, 61, 134-8.
- BARDSLEY, H., GRISTWOOD, R., BAKER, H., WATSON, N., NIMMO, W. (1998) A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 46, 245-9.
- BARHANIN, J., LESAGE, F., GUILLEMARE, E., FINK, M., LAZDUNSKI, M., ROMEY, G. (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, 384, 78-80.
- BARISKANER, H., TUNCER, S., ULUSOY, H., DOGAN, N. (2001) Effects of bupivacaine and ropivacaine on hemodynamic parameters in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 23, 89-92.
- BARROS, F., GOMEZ-VARELA, D., VILORIA, C. G., PALOMERO, T., GIRALDEZ, T., DE LA PENA, P. (1998) Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol*, 511 ( Pt 2), 333-46.
- BERRIDGE, M. J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 499 ( Pt 2), 291-306.
- BEZANILLA, F. (2002) Voltage sensor movements. *J Gen Physiol*, 120, 465-73.
- BIAN, J., CUI, J., MCDONALD, T. V. (2001) HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res*, 89, 1168-76.
- BOOKER, P. D., WHYTE, S. D., LADUSANS, E. J. (2003) Long QT syndrome and anaesthesia. *Br J Anaesth*, 90, 349-66.



- BOSCH, R. F., GASPO, R., BUSCH, A. E., LANG, H. J., LI, G. R., NATTEL, S. (1998) Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 38, 441-50.
- BROMAGE, P. R. (1962) Spread of analgesic solutions in the epidural space and their site of action: a statistical study. *Br J Anaesth*, 34, 161-78.
- BRUELLE, P., LEFRANT, J. Y., DE LA COUSSAYE, J. E., PERAY, P. A., DESCH, G., SASSINE, A., ELEDJAM, J. J. (1996) Comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of several amide local anesthetic drugs in anesthetized dogs. *Anesth Analg*, 82, 648-56.
- BRYANT, S. M., SHIPSEY, S. J., HART, G. (1997) Regional differences in electrical and mechanical properties of myocytes from guinea-pig hearts with mild left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 35, 315-23.
- BRYANT, S. M., WAN, X., SHIPSEY, S. J., HART, G. (1998) Regional differences in the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub>) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res*, 40, 322-31.
- BUCKENMAIER, C. C., 3RD, BLECKNER, L. L. (2005) Anaesthetic agents for advanced regional anaesthesia: a North American perspective. *Drugs*, 65, 745-59.
- BUTTERWORTH, J. F. T. (2010) Models and mechanisms of local anesthetic cardiac toxicity: a review. *Reg Anesth Pain Med*, 35, 167-76.
- CASATI, A., PUTZU, M. (2005) Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 19, 247-68.
- CASTLE, N. A. (1990) Bupivacaine inhibits the transient outward K<sup>+</sup> current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 255, 1038-46.
- CATALDI, M., PEREZ-REYES, E., TSIEN, R. W. (2002) Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*, 277, 45969-76.
- CATTERALL, W. A. (1996) Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, 28, 219-30.
- CHA, A., RUBEN, P. C., GEORGE, A. L., JR., FUJIMOTO, E., BEZANILLA, F. (1999) Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na<sup>+</sup> channel fast inactivation. *Neuron*, 22, 73-87.
- CHANG, D. H., LADD, L. A., COPELAND, S., IGLESIAS, M. A., PLUMMER, J. L., MATHER, L. E. (2001) Direct cardiac effects of intracoronary bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in the sheep. *Br J Pharmacol*, 132, 649-58.
- CHEN, L., MARQUARDT, M. L., TESTER, D. J., SAMPSON, K. J., ACKERMAN, M. J., KASS, R. S. (2007) Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20990-5.
- CHENG, J., KAMIYA, K., LIU, W., TSUJI, Y., TOYAMA, J., KODAMA, I. (1999) Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilideclass III agents. *Cardiovasc Res*, 43, 135-47.
- CHENG, J. H., KODAMA, I. (2004) Two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 137-45.
- CLARKSON, C. W., HONDEGHEM, L. M. (1985a) Evidence for a specific receptor site for lidocaine, quinidine, and bupivacaine associated with cardiac sodium channels in guinea pig ventricular myocardium. *Circ Res*, 56, 496-506.

- CLARKSON, C. W., HONDEGHEM, L. M. (1985b) 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, 396-405.
- COETZEE, W. A., AMARILLO, Y., CHIU, J., CHOW, A., LAU, D., MCCORMACK, T., MORENO, H., NADAL, M. S., OZAITA, A., POUNTNEY, D., SAGANICH, M., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., RUDY, B. (1999) Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 233-85.
- COLLEY, P. S., HEAVNER, J. E. (1981) Blood levels of bupivacaine after injection into the scalp with and without epinephrine. *Anesthesiology*, 54, 81-4.
- COMPTON, S. J., LUX, R. L., RAMSEY, M. R., STRELICH, K. R., SANGUINETTI, M. C., GREEN, L. S., KEATING, M. T., MASON, J. W. (1996) Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation*, 94, 1018-22.
- COURTNEY, K. R., KENDIG, J. J. (1988) Bupivacaine is an effective potassium channel blocker in heart. *Biochim Biophys Acta*, 939, 163-6.
- CRUMB, W., CAVERO, I. I. (1999) QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. *Pharm Sci Technol Today*, 2, 270-280.
- CUI, J., MELMAN, Y., PALMA, E., FISHMAN, G. I., MCDONALD, T. V. (2000) Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr Biol*, 10, 671-4.
- DAVIE, C., PIERRE-VALENTIN, J., POLLARD, C., STANDEN, N., MITCHESON, J., ALEXANDER, P., THONG, B. (2004) Comparative pharmacology of guinea pig cardiac myocyte and cloned hERG (I(Kr)) channel. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 15, 1302-9.
- DAVIS, N. L., DE JONG, R. H. (1982) Successful resuscitation following massive bupivacaine overdose. *Anesth Analg*, 61, 62-4.
- DI GREGORIO, G., NEAL, J. M., ROSENQUIST, R. W., WEINBERG, G. L. (2010) Clinical presentation of local anesthetic systemic toxicity: a review of published cases, 1979 to 2009. *Reg Anesth Pain Med*, 35, 181-7.
- DIXON, J. E., SHI, W., WANG, H. S., MCDONALD, C., YU, H., WYMORE, R. S., COHEN, I. S., MCKINNON, D. (1996) Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*, 79, 659-68.
- DOERR, T., DENGGER, R., DOERR, A., TRAUTWEIN, W. (1990) Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. *Pflugers Arch*, 416, 230-7.
- DONY, P., DEWINDE, V., VANDERICK, B., CUIGNET, O., GAUTIER, P., LEGRAND, E., LAVAND'HOMME, P., DE KOCK, M. (2000) The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. *Anesth Analg*, 91, 1489-92.
- DORN, G. W., 2ND, BROWN, J. H. (1999) Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc Med*, 9, 26-34.
- DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T., MACKINNON, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- DROLET, B., ROUSSEAU, G., DALEAU, P., CARDINAL, R., TURGEON, J. (2000) Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*, 102, 1883-5.

- DROUIN, E., CHARPENTIER, F., GAUTHIER, C., LAURENT, K., LE MAREC, H. (1995) Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J Am Coll Cardiol*, 26, 185-92.
- EKENSTAM, B. A. F., EGNER, B., PETTERSON, G. N. (1957) N-alkyl pyrrolidine and N-alkyl piperidine carboxylic acid amines. *Acta Chem Scand*, 11, 1183-1190.
- EL-SHERIF, N., ZEILER, R. H., CRAELIUS, W., GOUGH, W. B., HENKIN, R. (1988) QTU prolongation and polymorphic ventricular tachyarrhythmias due to bradycardia-dependent early afterdepolarizations. Afterdepolarizations and ventricular arrhythmias. *Circ Res*, 63, 286-305.
- EL-SHERIF, N. (1991) Early afterdepolarizations and arrhythmogenesis. Experimental and clinical aspects. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 84, 227-34.
- ESKINDER, H., SUPAN, F. D., TURNER, L. A., KAMPINE, J. P., BOSNJAK, Z. J. (1993) The effects of halothane and isoflurane on slowly inactivating sodium current in canine cardiac Purkinje cells. *Anesth Analg*, 77, 32-7.
- ETHERIDGE, S. P., COMPTON, S. J., TRISTANI-FIROUZI, M., MASON, J. W. (2003) A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations. *J Am Coll Cardiol*, 42, 1777-82.
- FALK, R. H., FOGEL, R. I. (1994) Flecainide. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 5, 964-81.
- FAVIER, J. C., DA CONCEICAO, M., FASSASSI, M., ALLANIC, L., STEINER, T., PITTI, R. (2003) Successful resuscitation of serious bupivacaine intoxication in a patient with pre-existing heart failure. *Can J Anaesth*, 50, 62-6.
- FINDLAY, I. (2003) Is there an A-type K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H598-604.
- FOSTER, R. H., MARKHAM, A. (2000) Levobupivacaine: a review of its pharmacology and use as a local anaesthetic. *Drugs*, 59, 551-79.
- 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, 93-101.
- GELLENS, M. E., GEORGE, A. L., JR., CHEN, L. Q., CHAHINE, M., HORN, R., BARCHI, R. L., KALLEN, R. G. (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 554-8.
- GEORGE, A. L., JR., VARKONY, T. A., DRABKIN, H. A., HAN, J., KNOPS, J. F., FINLEY, W. H., BROWN, G. B., WARD, D. C., HAAS, M. (1995) Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet*, 68, 67-70.
- GERHARDY, A., SCHOLTYSIK, G., SCHAAD, A., HALTNER, R., HESS, T. (1998) Generating and influencing Torsades de Pointes--like polymorphic ventricular tachycardia in isolated guinea pig hearts. *Basic Res Cardiol*, 93, 285-94.
- GONZALEZ, T., LONGOBARDO, M., CABALLERO, R., DELPON, E., TAMARGO, J., VALENZUELA, C. (2001) Effects of bupivacaine and a novel local anesthetic, IQB-9302, on human cardiac K<sup>+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 573-83.
- GONZALEZ, T., ARIAS, C., CABALLERO, R., MORENO, I., DELPON, E., TAMARGO, J., VALENZUELA, C. (2002) Effects of levobupivacaine,

- ropivacaine and bupivacaine on HERG channels: stereoselective bupivacaine block. *Br J Pharmacol*, 137, 1269-79.
- GRAF, B. M. (2001) The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem*, 1, 207-14.
- GRUNDEMAR, L., WOHLFART, B., LAGERSTEDT, C., BENGTSSON, F., EKLUNDH, G. (1997) Symptoms and signs of severe citalopram overdose. *Lancet*, 349, 1602.
- HABBAB, M. A., EL-SHERIF, N. (1990) Drug-induced torsades de pointes: role of early afterdepolarizations and dispersion of repolarization. *Am J Med*, 89, 241-6.
- HAGIWARA, S., NAKAJIMA, S. (1965) Tetrodotoxin and manganese ion: effects on action potential of the frog heart. *Science*, 149, 1254-5.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
- HAN, D. W., PARK, K., JANG, S. B., KERN, S. E. (2010) Modeling the effect of sevoflurane on corrected QT prolongation: a pharmacodynamic analysis. *Anesthesiology*, 113, 806-11.
- HANLON, M. R., WALLACE, B. A. (2002) Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry*, 41, 2886-94.
- HASSELSTROM, L., NORTVED-SORENSEN, J., KEHLET, H., JUEL-CHRISTIANSEN, N., BRYNJOLFF, I., MUNCK, O., TUCKER, G. T. (1985) The influence of systemically administered bupivacaine on cardiovascular function in cholecystectomised patients. *Acta Anaesthesiol Scand*, 29, 76.
- HAWKINS, J. L., KOONIN, L. M., PALMER, S. K., GIBBS, C. P. (1997) Anesthesia-related deaths during obstetric delivery in the United States, 1979-1990. *Anesthesiology*, 86, 277-84.
- HEAVNER, J. E. (2002) Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. *Reg Anesth Pain Med*, 27, 545-55.
- HIRAOKA, M., SUNAMI, A., FAN, Z., SAWANOBORI, T. (1992) Multiple ionic mechanisms of early afterdepolarizations in isolated ventricular myocytes from guinea-pig hearts. *Ann N Y Acad Sci*, 644, 33-47.
- HORN, R., PATLAK, J. (1980) Single channel currents from excised patches of muscle membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 6930-4.
- HORN, R., MARTY, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*, 92, 145-59.
- ISENBERG, G., KLOCKNER, U. (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers Arch*, 395, 6-18.
- JAN, L. Y., JAN, Y. N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol*, 505 ( Pt 2), 267-82.
- JANUARY, C. T., RIDDLE, J. M., SALATA, J. J. (1988) A model for early afterdepolarizations: induction with the Ca<sup>2+</sup> channel agonist Bay K 8644. *Circ Res*, 62, 563-71.
- JIANG, M., DUN, W., FAN, J. S., TSENG, G. N. (1999) Use-dependent 'agonist' effect of azimilide on the HERG channel. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 1324-36.
- KAMP, T. J., HELL, J. W. (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*, 87, 1095-102.
- KARLE, C. A., ZITRON, E., ZHANG, W., KATHOFER, S., SCHOELS, W., KIEHN, J. (2002) Rapid component I(Kr) of the guinea-pig cardiac delayed rectifier K(+) current is inhibited by beta(1)-adrenoreceptor activation, via cAMP/protein kinase A-dependent pathways. *Cardiovasc Res*, 53, 355-62.

- KASTEN, G. W. (1986) Amide local anesthetic alterations of effective refractory period temporal dispersion: relationship to ventricular arrhythmias. *Anesthesiology*, 65, 61-6.
- KEATING, M., ATKINSON, D., DUNN, C., TIMOTHY, K., VINCENT, G. M., LEPPERT, M. (1991) Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science*, 252, 704-6.
- KEATING, M. T., SANGUINETTI, M. C. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, 104, 569-80.
- KIEHN, J., KARLE, C., THOMAS, D., YAO, X., BRACHMANN, J., KUBLER, W. (1998) HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem*, 273, 25285-91.
- KIES, S. J., PABELICK, C. M., HURLEY, H. A., WHITE, R. D., ACKERMAN, M. J. (2005) Anesthesia for patients with congenital long QT syndrome. *Anesthesiology*, 102, 204-10.
- KLOCKNER, U., MIKALA, G., SCHWARTZ, A., VARADI, G. (1996) Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem*, 271, 22293-6.
- KOTELKO, D. M., SHNIDER, S. M., DAILEY, P. A., BRIZGYS, R. V., LEVINSON, G., SHAPIRO, W. A., KOIKE, M., ROSEN, M. A. (1984) Bupivacaine-induced cardiac arrhythmias in sheep. *Anesthesiology*, 60, 10-8.
- KUROKAWA, J., TAMAGAWA, M., HARADA, N., HONDA, S., BAI, C. X., NAKAYA, H., FURUKAWA, T. (2008) Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human IKr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol*, 586, 2961-73.
- KUUSELA, T. A., JARTTI, T. T., TAHVANAINEN, K. U., KAILA, T. J. (2005) Prolongation of QT interval by terbutaline in healthy subjects. *J Cardiovasc Pharmacol*, 45, 175-81.
- LEFRANT, J. Y., DE LA COUSSAYE, J. E., RIPART, J., MULLER, L., LALOURCEY, L., PERAY, P. A., MAZOIT, X., SASSINE, A., ELEDJAM, J. J. (2001) The comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of ropivacaine and bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. *Anesth Analg*, 93, 1598-605, table of contents.
- LIPKA, L. J., JIANG, M., TSENG, G. N. (1998) Differential effects of bupivacaine on cardiac K channels: role of channel inactivation and subunit composition in drug-channel interaction. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 9, 727-42.
- LIU, D. W., ANTZELEVITCH, C. (1995) Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res*, 76, 351-65.
- LOPATIN, A. N., NICHOLS, C. G. (2001) Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol*, 33, 625-38.
- LU, J. T., KASS, R. S. (2010) Recent progress in congenital long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*.
- LUO, C. H., RUDY, Y. (1991) A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ Res*, 68, 1501-26.
- LY, T., RUIZ, M. E. (2007) Prolonged QT interval and torsades de pointes associated with atazanavir therapy. *Clin Infect Dis*, 44, e67-8.
- MAIN, M. C., BRYANT, S. M., HART, G. (1998) Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp Physiol*, 83, 747-61.

- MALLAMPATI, S. R., LIU, P. L., KNAPP, R. M. (1984) Convulsions and ventricular tachycardia from bupivacaine with epinephrine: successful resuscitation. *Anesth Analg*, 63, 856-9.
- MARBAN, E., ROBINSON, S. W., WIER, W. G. (1986) Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J Clin Invest*, 78, 1185-92.
- MARBAN, E. (2002) Cardiac channelopathies. *Nature*, 415, 213-8.
- MARTENS, J. R., KWAK, Y. G., TAMKUN, M. M. (1999) Modulation of Kv channel alpha/beta subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med*, 9, 253-8.
- MARTY, A., NEHER, E. (1995) Single-Channel Recordings. *Plenum Press, New York and London*, 31-51.
- MCPHEE, J. C., RAGSDALE, D. S., SCHEUER, T., CATTERALL, W. A. (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*, 273, 1121-9.
- MEDEIROS-DOMINGO, A., KAKU, T., TESTER, D. J., ITURRALDE-TORRES, P., ITTY, A., YE, B., VALDIVIA, C., UEDA, K., CANIZALES-QUINTEROS, S., TUSIE-LUNA, M. T., MAKIELSKI, J. C., ACKERMAN, M. J. (2007) SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 116, 134-42.
- MIKALA, G., BAHINSKI, A., YATANI, A., TANG, S., SCHWARTZ, A. (1993) Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca<sup>2+</sup> channel pore. *FEBS Lett*, 335, 265-9.
- MILBERG, P., ECKARDT, L., BRUNS, H. J., BIERTZ, J., RAMTIN, S., REINSCH, N., FLEISCHER, D., KIRCHHOF, P., FABRITZ, L., BREITHARDT, G., HAVERKAMP, W. (2002) Divergent proarrhythmic potential of macrolide antibiotics despite similar QT prolongation: fast phase 3 repolarization prevents early afterdepolarizations and torsade de pointes. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 218-25.
- MILBERG, P., REINSCH, N., OSADA, N., WASMER, K., MONNIG, G., STYPMANN, J., BREITHARDT, G., HAVERKAMP, W., ECKARDT, L. (2005a) Verapamil prevents torsade de pointes by reduction of transmural dispersion of repolarization and suppression of early afterdepolarizations in an intact heart model of LQT3. *Basic Res Cardiol*, 100, 365-71.
- MILBERG, P., REINSCH, N., WASMER, K., MONNIG, G., STYPMANN, J., OSADA, N., BREITHARDT, G., HAVERKAMP, W., ECKARDT, L. (2005b) Transmural dispersion of repolarization as a key factor of arrhythmogenicity in a novel intact heart model of LQT3. *Cardiovasc Res*, 65, 397-404.
- MILIC, M., BAO, X., RIZOS, D., LIU, F., ZIEGLER, M. G. (2006) Literature review and pilot studies of the effect of QT correction formulas on reported beta2-agonist-induced QTc prolongation. *Clin Ther*, 28, 582-90.
- MILTON, R. L., CALDWELL, J. H. (1990) How do patch clamp seals form? A lipid bleb model. *Pflugers Arch*, 416, 758-62.
- MIO, Y., FUKUDA, N., KUSAKARI, Y., AMAKI, Y., TANIFUJI, Y., KURIHARA, S. (2004) Comparative effects of bupivacaine and ropivacaine on intracellular calcium transients and tension in ferret ventricular muscle. *Anesthesiology*, 101, 888-94.
- MITCHESON, J. S., SANGUINETTI, M. C. (1999) Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem*, 9, 201-16.

- MITCHESON, J. S., CHEN, J., LIN, M., CULBERSON, C., SANGUINETTI, M. C. (2000a) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12329-33.
- MITCHESON, J. S., CHEN, J., SANGUINETTI, M. C. (2000b) Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol*, 115, 229-40.
- MOHLER, P. J., SCHOTT, J. J., GRAMOLINI, A. O., DILLY, K. W., GUATIMOSIM, S., DUBELL, W. H., SONG, L. S., HAUROGNE, K., KYNDT, F., ALI, M. E., ROGERS, T. B., LEDERER, W. J., ESCANDE, D., LE MAREC, H., BENNETT, V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 421, 634-9.
- MOLLER, R., COVINO, B. G. (1990) Cardiac electrophysiologic properties of bupivacaine and lidocaine compared with those of ropivacaine, a new amide local anesthetic. *Anesthesiology*, 72, 322-9.
- MORISHIMA, H. O., PEDERSEN, H., FINSTER, M., HIRAOKA, H., TSUJI, A., FELDMAN, H. S., ARTHUR, G. R., COVINO, B. G. (1985) Bupivacaine toxicity in pregnant and nonpregnant ewes. *Anesthesiology*, 63, 134-9.
- MORITA, H., WU, J., ZIPES, D. P. (2008) The QT syndromes: long and short. *Lancet*, 372, 750-63.
- MOSS, A. J., SCHWARTZ, P. J., CRAMPTON, R. S., LOCATI, E., CARLEEN, E. (1985) The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation*, 71, 17-21.
- MURAMATSU, H., KIYOSUE, T., ARITA, M., ISHIKAWA, T., HIDAKA, H. (1994) Modification of cardiac sodium current by intracellular application of cAMP. *Pflugers Arch*, 426, 146-54.
- NABAUER, M., BEUCKELMANN, D. J., UBERFUHR, P., STEINBECK, G. (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*, 93, 168-77.
- NAND, V., DOGGRELL, S. A., BARNETT, C. W. (1997) Effects of veratridine on the action potentials and contractility of right and left ventricles from normo- and hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24, 570-6.
- NAPOLITANO, C., PRIORI, S. G., SCHWARTZ, P. J., BLOISE, R., RONCHETTI, E., NASTOLI, J., BOTTELLI, G., CERRONE, M., LEONARDI, S. (2005) Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA*, 294, 2975-80.
- NAU, C., WANG, S. Y., STRICHARTZ, G. R., WANG, G. K. (2000) Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. *Anesthesiology*, 93, 1022-33.
- NEHER, E., SAKMANN, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- NERBONNE, J. M. (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*, 525 Pt 2, 285-98.
- NISHIMOTO, M., HASHIMOTO, H., OZAKI, T., TAGUCHI, T., OHARA, K., NAKASHIMA, M. (1994) Effects of imipramine and amitriptyline on intraventricular conduction, effective refractory period, incidence of ventricular arrhythmias induced by programmed stimulation, and on electrocardiogram after myocardial infarction in dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 328, 39-53.
- NISHIO, M., OHMURA, T., KIGOSHI, S., MURAMATSU, I. (1991) Supersensitivity to tetrodotoxin and lignocaine of sea anemone toxin II-treated sodium channel in guinea-pig ventricular muscle. *Br J Pharmacol*, 104, 504-8.

- NOEL, G. J., NATARAJAN, J., CHIEN, S., HUNT, T. L., GOODMAN, D. B., ABELS, R. (2003) Effects of three fluoroquinolones on QT interval in healthy adults after single doses. *Clin Pharmacol Ther*, 73, 292-303.
- NUMBERGER, M., DRAGUHN, A. (1996) Patch-Clamp-Technik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. Oxford.*
- O'LEARY, M. E. (2001) Inhibition of human ether-a-go-go potassium channels by cocaine. *Mol Pharmacol*, 59, 269-77.
- ODENING, K. E., HYDER, O., CHAVES, L., SCHOFIELD, L., BRUNNER, M., KIRK, M., ZEHENDER, M., PENG, X., KOREN, G. (2008) Pharmacogenomics of anesthetic drugs in transgenic LQT1 and LQT2 rabbits reveal genotype-specific differential effects on cardiac repolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H2264-72.
- PFIZENMAYER, H., FRIEDERICH, P. (2010) [Perioperative monitoring of the QT interval]. *Anaesthesist*, 59, 633-5.
- PLASTER, N. M., TAWIL, R., TRISTANI-FIROUZI, M., CANUN, S., BENDAHOU, S., TSUNODA, A., DONALDSON, M. R., IANNACCONE, S. T., BRUNT, E., BAROHN, R., CLARK, J., DEYMEER, F., GEORGE, A. L., JR., FISH, F. A., HAHN, A., NITU, A., OZDEMIR, C., SERDAROGLU, P., SUBRAMONY, S. H., WOLFE, G., FU, Y. H., PTACEK, L. J. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*, 105, 511-9.
- POURRIER, M., SCHRAM, G., NATTEL, S. (2003) Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol*, 194, 141-52.
- PRIORI, S. G., CORR, P. B. (1990) Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol*, 258, H1796-805.
- PRIORI, S. G., NAPOLITANO, C., PAGANINI, V., CANTU, F., SCHWARTZ, P. J. (1997) Molecular biology of the long QT syndrome: impact on management. *Pacing Clin Electrophysiol*, 20, 2052-7.
- PRIORI, S. G., SCHWARTZ, P. J., NAPOLITANO, C., BLOISE, R., RONCHETTI, E., GRILLO, M., VICENTINI, A., SPAZZOLINI, C., NASTOLI, J., BOTTELLI, G., FOLLI, R., CAPPELLETTI, D. (2003) Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*, 348, 1866-74.
- PUSCH, M., NEHER, E. (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch*, 411, 204-11.
- QU, Y., ROGERS, J., TANADA, T., SCHEUER, T., CATTERALL, W. A. (1994) Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3289-93.
- RAE, J., COOPER, K., GATES, P., WATSKY, M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods*, 37, 15-26.
- REDFERN, W. S., CARLSSON, L., DAVIS, A. S., LYNCH, W. G., MACKENZIE, I., PALETHORPE, S., SIEGL, P. K., STRANG, I., SULLIVAN, A. T., WALLIS, R., CAMM, A. J., HAMMOND, T. G. (2003) Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res*, 58, 32-45.
- REIZ, S., NATH, S. (1986) Cardiotoxicity of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth*, 58, 736-46.



- REIZ, S., HAGGMARK, S., JOHANSSON, G., NATH, S. (1989) Cardiotoxicity of ropivacaine--a new amide local anaesthetic agent. *Acta Anaesthesiol Scand*, 33, 93-8.
- REYNOLDS, F. (1987) Adverse effects of local anaesthetics. *Br J Anaesth*, 59, 78-95.
- RODEN, D. M. (1993) Torsade de pointes. *Clin Cardiol*, 16, 683-6.
- RODEN, D. M., LAZZARA, R., ROSEN, M., SCHWARTZ, P. J., TOWBIN, J., VINCENT, G. M. (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*, 94, 1996-2012.
- RODEN, D. M., BALSER, J. R., GEORGE, A. L., JR., ANDERSON, M. E. (2002) Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol*, 64, 431-75.
- ROSEN, M. A., BAYSINGER, C. L., SHNIDER, S. M., DAILEY, P. A., NORTON, M., CURTIS, J. D., COLLINS, M., DAVIS, R. L. (1983) Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg*, 62, 802-8.
- ROSSNER, K. L., FREESE, K. J. (1997) Bupivacaine inhibition of L-type calcium current in ventricular cardiomyocytes of hamster. *Anesthesiology*, 87, 926-34.
- SAH, R., RAMIREZ, R. J., OUDIT, G. Y., GIDREWICZ, D., TRIVIERI, M. G., ZOBEL, C., BACKX, P. H. (2003) Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I<sub>to</sub>). *J Physiol*, 546, 5-18.
- SANGUINETTI, M. C., JURKIEWICZ, N. K. (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*, 96, 195-215.
- SANGUINETTI, M. C., JURKIEWICZ, N. K., SCOTT, A., SIEGL, P. K. (1991) Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circ Res*, 68, 77-84.
- SANGUINETTI, M. C., JIANG, C., CURRAN, M. E., KEATING, M. T. (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell*, 81, 299-307.
- SANGUINETTI, M. C., CURRAN, M. E., ZOU, A., SHEN, J., SPECTOR, P. S., ATKINSON, D. L., KEATING, M. T. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, 384, 80-3.
- SANGUINETTI, M. C., TRISTANI-FIROUZI, M. (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, 440, 463-9.
- SANTOS, A. C., ARTHUR, G. R., WLODY, D., DE ARMAS, P., MORISHIMA, H. O., FINSTER, M. (1995) Comparative systemic toxicity of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes. *Anesthesiology*, 82, 734-40; discussion 27A.
- SANTOS, A. C., DEARMAS, P. I. (2001) Systemic toxicity of levobupivacaine, bupivacaine, and ropivacaine during continuous intravenous infusion to nonpregnant and pregnant ewes. *Anesthesiology*, 95, 1256-64.
- SCALABRINI, A., CORREGIARI, F., ROCHA E SILVA, M. (2003) Effects of hypertonic sodium chloride solution on the electrophysiologic alterations caused by bupivacaine in the dog heart. *Braz J Med Biol Res*, 36, 531-9.
- SCHMELING, W. T., WARLTIER, D. C., MCDONALD, D. J., MADSEN, K. E., ATLEE, J. L., KAMPINE, J. P. (1991) Prolongation of the QT interval by enflurane, isoflurane, and halothane in humans. *Anesth Analg*, 72, 137-44.
- SCHWARTZ, P. J., PERITI, M., MALLIANI, A. (1975) The long Q-T syndrome. *Am Heart J*, 89, 378-90.

- SCHWARTZ, P. J., PRIORI, S. G., LOCATI, E. H., NAPOLITANO, C., CANTU, F., TOWBIN, J. A., KEATING, M. T., HAMMOUDE, H., BROWN, A. M., CHEN, L. S. (1995) Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na<sup>+</sup> channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation*, 92, 3381-6.
- SCHWARTZ, P. J., PRIORI, S. G., SPAZZOLINI, C., MOSS, A. J., VINCENT, G. M., NAPOLITANO, C., DENJOY, I., GUICHENEY, P., BREITHARDT, G., KEATING, M. T., TOWBIN, J. A., BEGGS, A. H., BRINK, P., WILDE, A. A., TOIVONEN, L., ZAREBA, W., ROBINSON, J. L., TIMOTHY, K. W., CORFIELD, V., WATTANASIRICHAIGOON, D., CORBETT, C., HAVERKAMP, W., SCHULZE-BAHR, E., LEHMANN, M. H., SCHWARTZ, K., COUMEL, P., BLOISE, R. (2001) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*, 103, 89-95.
- SCHWARTZ, P. J., STRAMBA-BADIALE, M., CROTTI, L., PEDRAZZINI, M., BESANA, A., BOSI, G., GABBARINI, F., GOULENE, K., INSOLIA, R., MANNARINO, S., MOSCA, F., NESPOLI, L., RIMINI, A., ROSATI, E., SALICE, P., SPAZZOLINI, C. (2009) Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 120, 1761-7.
- SCHWOERER, A. P., KEBERNIK, J., EHMKE, H., FRIEDERICH, P. (2010) The subtype-specific effects of droperidol on action potential duration in cellular and computational models of long QT syndrome. *Anesth Analg*, 111, 638-46.
- SCULPTOREANU, A., ROTMAN, E., TAKAHASHI, M., SCHEUER, T., CATTERALL, W. A. (1993) Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10135-9.
- SHIBASAKI, T. (1987) Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol*, 387, 227-50.
- SHIBUYA, N., MOMOSE, Y., ITO, Y. (1993) Effects of bupivacaine on contraction and membrane potential in isolated canine papillary muscles. *Pharmacology*, 47, 158-66.
- SHIMIZU, W., OHE, T., KURITA, T., TAKAKI, H., AIHARA, N., KAMAKURA, S., MATSUHISA, M., SHIMOMURA, K. (1991) Early afterdepolarizations induced by isoproterenol in patients with congenital long QT syndrome. *Circulation*, 84, 1915-23.
- SHIMIZU, W., OHE, T., KURITA, T., KAWADE, M., ARAKAKI, Y., AIHARA, N., KAMAKURA, S., KAMIYA, T., SHIMOMURA, K. (1995) Effects of verapamil and propranolol on early afterdepolarizations and ventricular arrhythmias induced by epinephrine in congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 26, 1299-309.
- SHIMIZU, W., KURITA, T., MATSUO, K., SUYAMA, K., AIHARA, N., KAMAKURA, S., TOWBIN, J. A., SHIMOMURA, K. (1998) Improvement of repolarization abnormalities by a K<sup>+</sup> channel opener in the LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 97, 1581-8.
- SHIMIZU, W., ANTZELEVITCH, C. (2000) Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 35, 778-86.
- SHIMIZU, W., TANABE, Y., AIBA, T., INAGAKI, M., KURITA, T., SUYAMA, K., NAGAYA, N., TAGUCHI, A., AIHARA, N., SUNAGAWA, K., NAKAMURA, K., OHE, T., TOWBIN, J. A., PRIORI, S. G., KAMAKURA, S.

- (2002) Differential effects of beta-blockade on dispersion of repolarization in the absence and presence of sympathetic stimulation between the LQT1 and LQT2 forms of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 39, 1984-91.
- SICOURI, S., ANTZELEVITCH, C. (1991) A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res*, 68, 1729-41.
- SICOURI, S., ANTZELEVITCH, C. (1993) Drug-induced afterdepolarizations and triggered activity occur in a discrete subpopulation of ventricular muscle cells (M cells) in the canine heart: quinidine and digitalis. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 4, 48-58.
- SICOURI, S., ANTZELEVITCH, C. (1995) Electrophysiologic characteristics of M cells in the canine left ventricular free wall. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 6, 591-603.
- SICOURI, S., QUIST, M., ANTZELEVITCH, C. (1996) Evidence for the presence of M cells in the guinea pig ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 7, 503-11.
- SIEBRANDS, C. C., 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, 102-12.
- SIEBRANDS, C. C., 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, 511-20.
- SIEBRANDS, C. C., FRIEDERICH, P. (2007) Structural requirements of human ether-a-go-go-related gene channels for block by bupivacaine. *Anesthesiology*, 106, 523-31.
- SINGH, B. N. (1996) Antiarrhythmic actions of amiodarone: a profile of a paradoxical agent. *Am J Cardiol*, 78, 41-53.
- SNYDERS, D. J. (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*, 42, 377-90.
- SOLOMON, D., BUNEGIN, L., ALBIN, M. (1990) The effect of magnesium sulfate administration on cerebral and cardiac toxicity of bupivacaine in dogs. *Anesthesiology*, 72, 341-6.
- SOLTH, A., SIEBRANDS, C. C., FRIEDERICH, P. (2005) Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 channels by bupivacaine and its modulation by the pore mutation Kv4.3V401I. *Anesthesiology*, 103, 796-804.
- SONG, C. S., MERKATZ, I. R., RIFKIND, A. B., GILLETTE, P. N., KAPPAS, A. (1970) The influence of pregnancy and oral contraceptive steroids on the concentration of plasma proteins. Studies with a quantitative immunodiffusion method. *Am J Obstet Gynecol*, 108, 227-31.
- SPLAWSKI, I., SHEN, J., TIMOTHY, K. W., LEHMANN, M. H., PRIORI, S., ROBINSON, J. L., MOSS, A. J., SCHWARTZ, P. J., TOWBIN, J. A., VINCENT, G. M., KEATING, M. T. (2000) Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*, 102, 1178-85.
- SPLAWSKI, I., TIMOTHY, K. W., DECHER, N., KUMAR, P., SACHSE, F. B., BEGGS, A. H., SANGUINETTI, M. C., KEATING, M. T. (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8089-96; discussion 8086-8.
- STAMER, U. M., MESSERSCHMIDT, A., WULF, H. (1998) Anaesthesia for caesarean section--a German survey. *Acta Anaesthesiol Scand*, 42, 678-84.

- STRICHARTZ, G. R., BERDE, C. B. (2000) Local anesthetics. *In: Miller RD (ed) Anesthesia, Churchill Livingstone, Philadelphia 5th edition*, 491-521.
- STÜHMER, W., CONTI, F., SUZUKI, H., WANG, X. D., NODA, M., YAHAGI, N., KUBO, H., NUMA, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339, 597-603.
- SZABO, A., SZENTANDRASSY, N., BIRINYI, P., HORVATH, B., SZABO, G., BANYASZ, T., MARTON, I., MAGYAR, J., NANASI, P. P. (2008) Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology*, 108, 693-702.
- TAGARIELLO, V., CAPORUSCIO, A., DE TOMMASO, O. (2001) Mepivacaine: update on an evergreen local anaesthetic. *Minerva Anestesiol*, 67, 5-8.
- TESTER, D. J., ACKERMAN, M. J. (2011) Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation*, 123, 1021-37.
- THOMAS, D., ZHANG, W., KARLE, C. A., KATHOFER, S., SCHOLS, W., KUBLER, W., KIEHN, J. (1999) Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem*, 274, 27457-62.
- THOMAS, D., ZHANG, W., WU, K., WIMMER, A. B., GUT, B., WENDT-NORDAHL, G., KATHOFER, S., KREYE, V. A., KATUS, H. A., SCHOELS, W., KIEHN, J., KARLE, C. A. (2003) Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovasc Res*, 59, 14-26.
- THOMAS, D., KIEHN, J., KATUS, H. A., KARLE, C. A. (2004) Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, I(Kr), and the underlying hERG ion channel. *Basic Res Cardiol*, 99, 279-87.
- TOUBOUL, P., ATALLAH, G., KIRKORIAN, G., LAMAUD, M., MOLEUR, P. (1984) Clinical electrophysiology of intravenous sotalol, a beta-blocking drug with class III antiarrhythmic properties. *Am Heart J*, 107, 888-95.
- TSEN, L. C., TARSHIS, J., DENSON, D. D., OSATHANONDH, R., DATTA, S., BADER, A. M. (1999) Measurements of maternal protein binding of bupivacaine throughout pregnancy. *Anesth Analg*, 89, 965-8.
- TUCKER, G. T. (1986) Pharmacokinetics of local anaesthetics. *Br J Anaesth*, 58, 717-31.
- UEDA, K., VALDIVIA, C., MEDEIROS-DOMINGO, A., TESTER, D. J., VATTA, M., FARRUGIA, G., ACKERMAN, M. J., MAKIELSKI, J. C. (2008) Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9355-60.
- ULBRICHT, W. (1998) Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 133, 1-54.
- VARNUM, M. D., BUSCH, A. E., BOND, C. T., MAYLIE, J., ADELMAN, J. P. (1993) The min K channel underlies the cardiac potassium current I<sub>Ks</sub> and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11528-32.
- VARRO, A., LATHROP, D. A., HESTER, S. B., NANASI, P. P., PAPP, J. G. (1993) Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol*, 88, 93-102.
- VARRO, A., BALATI, B., IOST, N., TAKACS, J., VIRAG, L., LATHROP, D. A., CSABA, L., TALOSI, L., PAPP, J. G. (2000) The role of the delayed rectifier

- component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol*, 523 Pt 1, 67-81.
- VATTA, M., ACKERMAN, M. J., YE, B., MAKIELSKI, J. C., UGHANZE, E. E., TAYLOR, E. W., TESTER, D. J., BALJEPALLI, R. C., FOELL, J. D., LI, Z., KAMP, T. J., TOWBIN, J. A. (2006) Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*, 114, 2104-12.
- VOLK, T., NGUYEN, T. H., SCHULTZ, J. H., EHMKE, H. (1999) Relationship between transient outward K<sup>+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Physiol*, 519 Pt 3, 841-50.
- WALSH, K. B., KASS, R. S. (1988) Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science*, 242, 67-9.
- WALSH, K. B., KASS, R. S. (1991) Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C. *Am J Physiol*, 261, C1081-90.
- WANG, Q., SHEN, J., SPLAWSKI, I., ATKINSON, D., LI, Z., ROBINSON, J. L., MOSS, A. J., TOWBIN, J. A., KEATING, M. T. (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 80, 805-11.
- WANG, Q., CURRAN, M. E., SPLAWSKI, I., BURN, T. C., MILLHOLLAND, J. M., VANRAAY, T. J., SHEN, J., TIMOTHY, K. W., VINCENT, G. M., DE JAGER, T., SCHWARTZ, P. J., TOUBIN, J. A., MOSS, A. J., ATKINSON, D. L., LANDES, G. M., CONNORS, T. D., KEATING, M. T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, 12, 17-23.
- WANG, R. D., DANGLER, L. A., GREENGRASS, R. A. (2001) Update on ropivacaine. *Expert Opin Pharmacother*, 2, 2051-63.
- WEI, Z., THOMAS, D., KARLE, C. A., KATHOFER, S., SCHENKEL, J., KREYE, V. A., FICKER, E., WIBLE, B. A., KIEHN, J. (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channels in a human cell line. *Chin Med J (Engl)*, 115, 668-76.
- WONG, J. A., GULA, L. J., KLEIN, G. J., YEE, R., SKANES, A. C., KRAHN, A. D. (2010) Utility of treadmill testing in identification and genotype prediction in long-QT syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 3, 120-5.
- YAN, G. X., ANTZELEVITCH, C. (1996) Cellular basis for the electrocardiographic J wave. *Circulation*, 93, 372-9.
- YANG, W. P., LEVESQUE, P. C., LITTLE, W. A., CONDER, M. L., SHALABY, F. Y., BLANAR, M. A. (1997) KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4017-21.
- YELLEN, G., JURMAN, M. E., ABRAMSON, T., MACKINNON, R. (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science*, 251, 939-42.
- YELLEN, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35-42.
- ZAPATA-SUDO, G., TRACHEZ, M. M., SUDO, R. T., NELSON, T. E. (2001) Is comparative cardiotoxicity of S(-) and R(+) bupivacaine related to enantiomer-selective inhibition of L-type Ca(2+) channels? *Anesth Analg*, 92, 496-501.
- ZAREBA, W. (2006) Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol*, 39, S101-6.
- ZHABYEYEV, P., ASAI, T., MISSAN, S., MCDONALD, T. F. (2004) Transient outward current carried by inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in guinea pig

ventricular myocytes dialyzed with low-K<sup>+</sup> solution. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C1396-403.

ZIPES, D. P. (1991) The long QT interval syndrome. A Rosetta stone for sympathetic related ventricular tachyarrhythmias. *Circulation*, 84, 1414-9.

ZIPES, D. P., CAMM, A. J., BORGGREFE, M., BUXTON, A. E., CHAITMAN, B., FROMER, M., GREGORATOS, G., KLEIN, G., MOSS, A. J., MYERBURG, R. J., PRIORI, S. G., QUINONES, M. A., RODEN, D. M., SILKA, M. J., TRACY, C., SMITH, S. C., JR., JACOBS, A. K., ADAMS, C. D., ANTMAN, E. M., ANDERSON, J. L., HUNT, S. A., HALPERIN, J. L., NISHIMURA, R., ORNATO, J. P., PAGE, R. L., RIEGEL, B., BLANC, J. J., BUDAJ, A., DEAN, V., DECKERS, J. W., DESPRES, C., DICKSTEIN, K., LEKAKIS, J., MCGREGOR, K., METRA, M., MORAIS, J., OSTER SPEY, A., TAMARGO, J. L., ZAMORANO, J. L. (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 114, e385-484.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das ventrikuläre Aktionspotential.....	4
Abbildung 2: Nav1.5 des kardialen Na <sup>+</sup> -Kanals .....	6
Abbildung 3: Die L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal-regulierende Signalkaskaden .....	8
Abbildung 4: Kv7.1 und seine $\beta$ -Untereinheit minK.....	11
Abbildung 5: Kv11.1 und seine $\beta$ -Untereinheit MiRP1 .....	13
Abbildung 6: Pathophysiologischer Zusammenhang zwischen dem QT-Intervall und der Aktionspotentialdauer .....	14
Abbildung 7: Strukturformel von Bupivacain.....	21
Abbildung 8: Auswirkung der Blockade von ionalen Strömen durch Bupivacain auf das ventrikuläre Aktionspotential.....	24
Abbildung 9: Entstehung von Arrhythmien beim Long QT Syndrom.....	26
Abbildung 10: Aufbau des Vorverstärkers .....	31
Abbildung 11: <i>In vitro</i> Effekt von Bupivacain auf die APD90 nativer Zellen.....	47
Abbildung 12: Heterogener <i>in vitro</i> Effekt von 3 $\mu$ mol/L Bupivacain auf das Aktionspotential nativer Zellen.....	48
Abbildung 13: <i>In vitro</i> Effekt von Chromanol 293B auf das Aktionspotential nativer Zellen .....	50
Abbildung 14: <i>In vitro</i> Effekt von E4031 auf das Aktionspotential nativer Zellen.....	51
Abbildung 15: <i>In vitro</i> Effekt von Veratridin auf das Aktionspotential nativer Zellen .....	52
Abbildung 16: Heterogener <i>in vitro</i> Effekt von Bupivacain in LQT1 <sub>C293B</sub> .....	54
Abbildung 17: <i>In vitro</i> Effekt von Bupivacain in LQT2 <sub>E4031</sub> .....	55
Abbildung 18: <i>In vitro</i> Effekt von Bupivacain in LQT3 <sub>Vera</sub> .....	57
Abbildung 19: Häufigkeit von Verlängerungen der APD90 durch Bupivacain in nativen Myozyten und in LQT1 <sub>C293B</sub> , LQT2 <sub>E4031</sub> und LQT3 <sub>Vera</sub> .....	58
Abbildung 20: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen – Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in nativen Myozyten .....	60
Abbildung 21: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen – Simulation einer zunehmenden I <sub>Kr</sub> -Blockade durch Bupivacain in nativen Myozyten .....	60
Abbildung 22: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo- Rudy dynamic model (LRd) - Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in LQT1.....	61
Abbildung 23: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo- Rudy dynamic model (LRd) - Simulation einer zunehmenden I <sub>Kr</sub> -Blockade durch Bupivacain in LQT1.....	62
Abbildung 24: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo- Rudy dynamic model (LRd) - Verkürzung der APD90 durch Bupivacain in LQT2.....	63
Abbildung 25: Computergestützte Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen mit dem Luo- Rudy dynamic model (LRd) - Simulation einer zunehmenden I <sub>Kr</sub> -Blockade durch Bupivacain in LQT2.....	64

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der LQT-Subtypen, klassifiziert nach ihrem Pathomechanismus .....	16
Tabelle 2: Beispiele für QT-Intervall verlängernde Substanzen. ....	18
Tabelle 3: Verwendete Lösungen .....	35
Tabelle 4: Herkunft verwendeter Substanzen.....	35
Tabelle 5: Patch-Clamp Versuchsreihen .....	41
Tabelle 6: Bupivacain Verdünnungsreihe – <i>in vitro</i> Effekt auf die APD90, Membranpotential ( $V_m$ ) und Overshoot. ....	45
Tabelle 7: Mittlere APD90 der Versuchsreihen mit LQT-ähnlichen Myozyten .....	49



## 10 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
ABC	ATP Binding Cassette
AC	Adenylatcyclase
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD50	Aktionspotentialdauer bis zur 50 %-igen Repolarisation
APD90	Aktionspotentialdauer bis zur 90 %-igen Repolarisation
ATP	Adenosintriphosphat
ATX-II	Anemonia Toxin-II
° C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinese Hamster Ovary
C <sub>m</sub>	Zellkapazität
CVS	Kardiovaskuläre System
D	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	Early After Depolarization
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
E <sub>m</sub>	Gleichgewichtspotential
G	Giga
g	Leitfähigkeit, Gramm
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hERG	human Ether-à-go-go Related Gene
hH1	human-Heart-1
Hz	Hertz
I	Strom

IC <sub>50</sub>	Konzentration der halbmaximalen Inhibition
I <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -Strom
I <sub>K1</sub>	einwärtsgerichteter K <sup>+</sup> -Kanal
I <sub>Kr</sub>	schnelle Komponente des K <sup>+</sup> -Stroms
I <sub>Ks</sub>	langsame Komponente des K <sup>+</sup> -Stroms
I <sub>Kur</sub>	ultra schnelle Komponente des K <sup>+</sup> -Stroms
I <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -Strom
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
I <sub>to</sub>	transienter K <sup>+</sup> -Auswärtsstrom
i. v.	intra venös
k	Kilo
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KChIP	K <sup>+</sup> Channel Interacting Protein
KChAP	K <sup>+</sup> Channel Associated Protein
KG	Körpergewicht
LAD	Late After Depolarization
LQTS	Long QT Syndrom
LRd	Luo-Rudy dynamic model
μ	micro
M	Mega
m	milli
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
minK	minimal K <sup>+</sup> Channel
MiRP1	minK Related Protein 1
n	Anzahl, Nano
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydroperoxid
Ω	Ohm
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

R	Widerstand
$R_m$	Membranwiderstand
$R_{pip}$	Pipettenwiderstand
$R_s$	Serienwiderstand
s	Sekunde
$\sigma^2$	Varianz
SEM	Standard Error of the Mean
SUR	Sulfonylurearezeptoren
TdP	Torsades de Pointes
U	Spannung
$U_{pip}$	Pipettenspannung
$U_{soll}$	Kommandospannung
V	Volt
vs.	Versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **11 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Patrick Friederich danke ich für die Überlassung des Themas und der immer freundlichen und konstruktiven Zusammenarbeit. Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Heimo Ehmke, in dessen Institut ich auf ausgezeichnete wissenschaftliche Bedingungen zurückgreifen konnte. Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie möchte ich mich herzlich für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt der exzellenten Betreuung durch Herrn Dr. med. Alexander P. Schwoerer, der zuletzt auch das Interesse, über diese Arbeit hinaus wissenschaftlich tätig zu bleiben, in mir geweckt hat.

## 12 Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name	Roman Zenouzi
Geburtsdatum	29.09.1982
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Hufnerstraße 40, 22305 Hamburg

### Ausbildung:

10/2004 – 11/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg Ärztliche Prüfung am 03.11.2010
10/2003 – 07/2004	Grundwehrdienst im Standortsanitätszentrum Boostedt
08/1988 – 06/2003	Schulische Ausbildung mit Abschluss Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Geesthacht
08/1999 – 07/2000	Horizon High-School, Denver, USA

### Beschäftigung:

Seit 03/2011	I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
--------------	--

### Publikationen:

Schwoerer, A. P., Zenouzi, R., Ehmke, H., Friederich, P. (2011) Bupivacaine destabilizes action potential duration in cellular and computational models of long QT syndrome 1. *Anesth Analg*, 113, 1365-73.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Roman Zenouzi

Hamburg, März 2012