Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Subtypspezifische Effekte von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential in zellulären und computersimulierten Modellen des Long QT-Syndroms

Dissertation

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

vorgelegt von: Julia Kebernik aus Bad Oldesloe

Hamburg 2013

A	\n	gen	ommen	von	der
---	----	-----	-------	-----	-----

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.11.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Dr. med. Alexander Schwoerer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Zöllner

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Willelms



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Ein	leitu	ng	. 1
	1.1.	Gru	ndlagen der Herzaktion	. 2
	1.1	.1.	Das ventrikuläre Aktionspotential	. 3
	1.2.	Das	Long QT-Syndrom (LQTS)	. 4
	1.2	.1.	Das kongenitale LQTS: LQTS1, LQTS2 und LQTS3	. 5
	1.2	.2.	Das erworbene LQTS	. 9
	1.2	.3.	Konzepte der Arrhythmogenese	10
	1.2	.4.	Subtypspezifische Aspekte des LQTS	12
	1.3.	Das	LQTS im Tiermodell	14
	1.4.	Das	LQTS in der Anästhesie	15
	1.4	.1.	Perioperatives Management von LQTS-Patienten	15
	1.4	.2.	Anästhetika bei LQTS-Patienten	17
	1.5.	Dro	peridol als Antiemetikum	18
	1.5	.1.	Die zelluläre Wirkung von Droperidol	19
	1.6.	Ziele	e dieser Arbeit	20
2.	Ma	ateria	l und Methodik	22
	2.1.	Isola	ation linksventrikulärer Kardiomyozyten	22
	2.1	.1.	Herzentnahme	22
	2.1	.2.	Zellisolation	22
	2.1	.3.	Zellseparation	23
	2.2.	Die	Patch-Clamp-Technik	24
	2.2	.1.	Voltage-Clamp und Current-Clamp	25
	2.2	.2.	Elektrische Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration	25
	2.3.	Der	Patch-Clamp-Messplatz (Setup)	26
	2.3	.1.	Mikroskop und Videotechnik	26
	2.3	.2.	Der Messtisch und mechanische Komponenten	26
	2.3	.3.	Kammerperfusion und Temperaturregulierung	28
	2.3	.4.	Elektronische Komponenten	29
	2.3	.5.	Die Patch-Pipetten	29
	2.4.	Dur	chführung der Patch-Clamp-Experimente	30
	2.4	.1.	Das Versuchsprotokoll	31

	2.5.	Aus	wertung der Experimente	35
	2.5	.1.	Statistik	36
	2.6.	Com	nputergestützte Simulation	36
	2.7.	Che	mikalien und Lösungen	37
	2.7	.1.	Versuchslösungen für die Zellisolation	37
	2.7	.2.	Versuchslösungen für die Patch-Clamp-Experimente	37
	2.7	.3.	Herkunft der verwendeten Chemikalien	38
3.	Erg	ebni	sse	39
	3.1.	In vi	tro Patch-Clamp-Experimente	39
	3.1	.1.	Der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential	39
	3.1	.2.	Etablierung der LQTS-Modelle	41
	3.1	.3.	Der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential im LQTS-Modell	44
	3.2.	Com	nputergestützte Simulation ventrikulärer Aktionspotentiale	48
	3.2	.1.	Simulation von LQTS1- und LQTS2-Myozyten	50
	3.2	.2.	Simulation von Droperidol in LQTS1- und LQTS2-Myozyten	51
	3.2	.3.	Zusammenfassung: Computergestützte Simulation	54
4.	Dis	kussi	ion	56
	4.1.	Der	Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential	56
	4.2.	Der	Effekt von Droperidol auf pharmakologisch induzierte LQTS-Modelle	60
	4.1.2.	Et	tablierung der LQTS-Modelle	60
	4.2.	Sub	typspezifische Effekte von Droperidol in den LQTS-Modellen	61
	4.3.	Inte	raktionen von Droperidol mit depolarisierenden Ionenströmen	65
	4.4.	Met	hodenkritik	66
	4.4	.1.	Das pharmakologisch induzierte LQTS-Modell im Meerschweinchen	66
	4.4	.2.	Die Entstehung von Arrhythmien	67
	4.4	.3.	Droperidol in antiemetischer Dosierung	67
	4.5.	Imp	likationen	68
5.	Anl	hang		69
	5.1.	Zusa	ammenfassung	69
	5.2.	Lite	raturverzeichnis	70
	5.3.	Abb	ildungsverzeichnis	79
	5.4.	Tab	ellenverzeichnis	80
	5.5.	Abk	ürzungsverzeichnis	81

5.6.	Danksagung	82
5.7.	Lebenslauf	83
5.8.	Eidesstattliche Versicherung	84

1. EINLEITUNG

Im Jahr 1856 berichtete der deutsche Mediziner F. Meissner von einem taubstummen Mädchen, das in der Schule tot zusammenbrach, während es öffentlich gerügt wurde. In der Familie des Kindes waren zwei Geschwister des Mädchens bereits an einem plötzlichen Herztod verstorben. Eines starb, nachdem es heftig erschrocken war, das andere während eines Wutanfalls (Meissner, 1856).

Die Ursache des plötzlichen Herztodes ist komplex und blieb bisher in vielen Fällen auf zellulärer Ebene ungeklärt. In den 70ern brachte die Entdeckung des Long QT-Syndroms (LQTS) großes Verständnis in die Pathophysiologie des plötzlichen Herztodes und die Entstehung von lebensbedrohlichen Arrhythmien (Saenen und Vrints 2008). Das LQTS ist eine Ionenkanalerkrankung des Herzens. Durch abnorme Funktion spezifischer kardialer Ionenströme wird eine pathologische Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials verursacht. Klinisch Auftreten von Synkopen sowie ein plötzlicher Herztod charakteristisch. Elektrokardiographisch kennzeichnend sind eine Verlängerung der QT-Zeit und ventrikuläre Tachykardien vom Typ Torsade de Pointes (TdP) (Morita et al. 2008, Schwartz et al. 1975, Zipes 1991). In der Ätiologie der Krankheit werden zwei Formen unterschieden, das kongenitale LQTS und das erworbene LQTS. Das erworbene LQTS wird durch eine Vielzahl von Medikamenten hervorgerufen, die in der Regel die schnell aktivierende Komponente (IKr) des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters (I_K) inhibieren (Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006). Bei der kongenitalen Form sind bisher zwölf Genmutationen bekannt, die für ein LQTS verantwortlich sind. Die häufigsten Subtypen sind das LQTS1, das LQTS2 und das LQTS3 (Morita et al. 2008).

Eine besondere Herausforderung stellt das LQTS in der Anästhesie dar (Anton & Friederich 2010, Booker et al. 2003, Kies et al. 2005, Pfizenmayer & Friederich 2010). Die Krankheit an sich gewährt eine erhöhte Inzidenz von lebensbedrohlichen Arrhythmien. Zudem wird die perioperative Phase von vielen Triggerfaktoren begleitet, die die Entstehung von Arrhythmien provozieren. Hierzu zählt u.a. eine Vielzahl von Anästhetika, die Einfluss auf die kardiale Repolarisation ausüben. Noch komplexer wird die Behandlung von LQTS-Patienten durch die Existenz der verschiedenen Subtypen, die unterschiedliche Risikofaktoren in der perioperativen Behandlung darstellen. Medikamente, die das QT-Intervall verlängern, gelten bei LQTS-Patienten generell als kontraindiziert (Kies et al. 2005), obwohl deren Interaktionen mit kardialen Ionenströmen und eine mögliche subtypspezifische Wirkung auf zellulärer Ebene nicht ausreichend geklärt sind. Zu diesen Medikamenten gehört auch das hoch potente Antiemetikum Droperidol, das in der Anästhesie ein Mittel der ersten Wahl gegen Übelkeit und Erbrechen darstellt (Gan et al. 2003, Scuderi 2003). Aufgrund von komplexen Ionenkanalinteraktionen neben der bekannten IKr Blockade kann die genaue Wirkung dieser Substanz nicht abschließend beurteilt werden. Auch ist nicht geklärt, ob Droperidol bei LQTS-Patienten generell kardiotoxisch wirkt und ob die Substanz eine subtypspezifische Wirkung bei LQTS-Patienten zeigt. Erste experimentelle Studien wiesen bereits darauf hin, dass Medikamente, die mit kardialen Kaliumkanälen interagieren, subtypspezifische Auswirkung auf die Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials zeigen (Odening et al. 2008). Da Droperidol mit vielen verschiedenen kardialen Ionenkanälen interagiert, ist die Wirkung in den unterschiedlichen LQTS-Subtypen nicht vorhersagbar und soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.1. Grundlagen der Herzaktion

Jeder einzelne physiologische Herzschlag wird ausgelöst durch elektrische Signale. Diese werden von autonomen Schrittmacherzellen im Sinusknoten generiert und geordnet weitergeleitet. Die Weiterleitung der Erregung setzt sich über die Vorhöfe, den AV-Knoten, das His-Bündel, die Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fasern fort, bis sie schließlich die Kammermuskulatur erreicht. Nach vollständiger Erregungsausbreitung erfolgt die Erregungsrückbildung. Eine graphische Darstellung der Erregungsausbreitung und -rückbildung ist mittels des Elektrokardiogramms (EKG) möglich (Abbildung 1). Über Ableitungselektroden an der Körperoberfläche wird dabei die Summe der Potentiale aller erregten Muskelfasern registriert und graphisch als Kurve dargestellt. Die Erregungsausbreitung der Vorhöfe bildet im EKG die P-Welle, die der Kammern den QRS-Komplex. Die Erregungsrückbildung der Vorhöfe fällt zeitlich mit der Erregung der Kammern zusammen, daher ist sie im EKG nicht sichtbar. Die Erregungsrückbildung der Kammern bildet die T-Welle. Die Gesamtdauer der Kammererregung kann dem QT-Intervall entnommen werden. Dies ist abhängig von der Herzfrequenz und nimmt bei steigenden Herzfrequenzen ab und bei sinkenden Herzfrequenzen zu. Um dies zu berücksichtigen, wird zur Beurteilung des QT-Intervalls die frequenzkorrigierte QT-Zeit (QTc) verwendet.

Die Basis der elektrischen Potentiale und damit Grundlage für die Erregungsentstehung im Kammermyokard ist auf zellulärer Ebene das Aktionspotential der ventrikulären Herzmuskelzellen (Abbildung 1). Das QT-Intervall im EKG wird gebildet aus dem gesamten zeitlichen Verlauf aller ventrikulären Aktionspotentiale. Die Depolarisationsphase Aktionspotentiale führt zur Erregung der Kammern (QRS-Komplex im EKG), die Plateauphase bildet elektrokardiographisch die ST-Strecke und die Repolarisationsphase der Aktionspotentiale bildet die Erregungsrückbildung (T-Welle). Das QT-Intervall im EKG ist abhängig von dem zeitlichen Verlauf aller ventrikulären Aktionspotentiale. Verlängerte Aktionspotentiale bedingen somit ein verlängertes QT-Intervall.

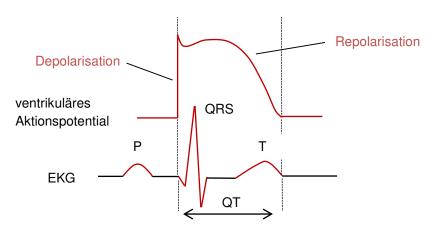


Abbildung 1: Das Aktionspotential ist die zelluläre Basis des EKGs

Oben schematische Darstellung eines ventrikulären Aktionspotentials, unten schematische Darstellung eines EKGs. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird hier der Verlauf des längsten Aktionspotentials im Ventrikel dargestellt. Die Depolarisationsphasen aller ventrikulären Aktionspotentiale bilden den QRS-Komplex des EKGs; die Repolarisationsphasen der Aktionspotentiale die T-Welle. Das QT-Intervall wird gebildet aus dem gesamten zeitlichen Verlauf aller ventrikulären Aktionspotentiale. P-Welle = Erregungsausbreitung in den Vorhöfen; QRS-Komplex = Erregungsausbreitung in den Kammern; T-Welle = Erregungsrückbildung in den Kammern; QT-Intervall = Gesamtdauer der Kammererregung.

1.1.1. Das ventrikuläre Aktionspotential

Das Aktionspotential ist das Resultat eines zeitlichen Zusammenspiels mehrerer Ionenströme durch die Zellmembran. Ionenkanäle, Austauschsysteme und Pumpen ermöglichen den Ionen das Durchdringen der Zellmembran von extrazellulär nach intrazellulär und umgekehrt. Der Fluss durch die Ionenkanäle folgt dabei einer elektrochemischen Triebkraft. Diese ergibt sich aus der Membranpotentialdifferenz und dem Konzentrationsgradienten. Die verschiedenen Ionen passieren den für sie selektiven Kanal und verändern dabei das Membranpotential, indem sie depolarisierend oder repolarisierend wirken und so die elektrische Ladung der Zellmembran bestimmen. Die für die Entstehung des ventrikulären Aktionspotentials entscheidenden Ionenströme sind in Abbildung 2 dargestellt. Natrium- und Calciumionen fließen einwärts, während Kaliumionen auswärts fließen.

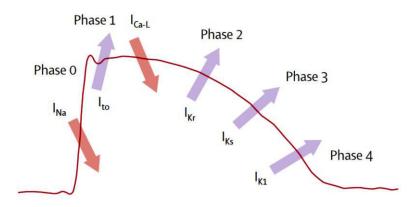


Abbildung 2: Das ventrikuläre Aktionspotential

Dargestellt ist ein ventrikuläres Aktionspotential, mit den im Text beschriebenen Phasen. Die Pfeile stellen die Ioneneinwärtsstöme (rot) und Ionenauswärtsströme (lila) dar. I_{Na} = schneller Natriumeinwärtsstrom, I_{to} = transienter Kaliumauswärtsstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumeinwärtsstrom, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = Kaliumeinwärtsgleichrichter. Abbildung modifiziert nach (Morita et al. 2008).

Das ventrikuläre Herzaktionspotential wird in 4 Phasen eingeteilt. Diese werden in Abbildung 2 veranschaulicht. Ausgangspunkt ist das Ruhemembranpotential im Bereich von -90 mV. Diesem Potential liegt die Aufrechterhaltung einer ungleichen Ionenverteilung von Kaliumionen und Natriumionen zu Grunde. Im Gegensatz zu den Schrittmacherzellen im Sinusknoten gibt es in den ventrikulären Zellen des Arbeitsmyokards keine Spontanerregung. Hier wird das Aktionspotential einer Zelle ausgelöst, indem sie von ihrer Nachbarzelle depolarisiert wird. Wird dabei das Schwellenpotential (ca. -70 mV bis -60 mV) erreicht, öffnen sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle, durch die ein schneller Natriumeinwärtsstrom (I_{Na}) eine Depolarisation bewirkt (Phase 0). Die Depolarisation der Zellmembran endet mit der fast vollständigen Inaktivierung der Natriumkanäle bei einem Spitzenpotential von ca. +20 - +30 mV. Bei diesem Maximalwert der Depolarisation bewirkt der kurz repolarisierende Kaliumstrom $(I_{to},$ transienter Kaliumauswärtsstrom) eine Frührepolarisation in Form einer charakteristischen Kerbe (Phase 1). Die darauf folgende Plateauphase (Phase 2) ist durch ein sensibles Gleichgewicht zwischen dem depolarisierenden L-Typ Calciumeinwärtsstrom (I_{Ca-L}) und dem repolarisierenden verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichter (I_K) gekennzeichnet. Der I_K besteht aus einer langsam aktivierenden Komponente I_{Ks} (s = slow, langsam) und einer schnell aktivierenden Komponente I_{Kr} (r = rapid, schnell) (Sanguinetti et al. 1990). I_{Kr} trägt durch eine schnelle Aktivierung bei -30 mV sowie eine schnelle Inaktivierung bei positiven Membranpotentialen eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der Plateauphase bei. I_{Ks} aktiviert bei Membranpotentialen ab -30 mV und ist durch eine fehlende Inaktivierung und langsame Deaktivierung gekennzeichnet. Er trägt insbesondere in der späten Plateauphase zur Repolarisation der Zellmembran bei (Mitcheson und Sanguinetti 1999). Während der Plateauphase ist die Bilanz zwischen Einwärts- und Auswärtsströmen ausgeglichen, so dass schon geringe Ströme ausreichen, um das sensible Gleichgewicht zwischen Depolarisation und Repolarisation zu stören und hierdurch die Dauer des Aktionspotentials zu beeinflussen. Erst mit zunehmender Inaktivierung Calciumeinwärtsstroms überwiegen in Phase 3 (Repolarisationsphase) die repolarisierenden Kaliumauswärtsströme I_{Kr} und I_{Ks}. Mit zunehmend negativem Membranpotential wird ein weiterer Kaliumkanal aktiviert, der Kaliumeinwärtsgleichrichter (I_{K1}). Er ist hauptsächlich für das Ruhemembranpotential bei -90 mV verantwortlich (Phase 4) (Marban 2002, Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006).

1.2. Das Long QT-Syndrom (LQTS)

Das LQTS ist eine kardiale Ionenkanalkrankheit, die typischerweise durch ein verlängertes QT-Intervall im EKG und das sporadische Auftreten von lebensbedrohlichen ventrikulären Tachykardien vom Typ TdP charakterisiert ist (Morita et al. 2008, Schwartz et al. 1975, Zipes 1991). Bei Tachykardien vom Typ TdP handelt es sich um eine Sonderform der polymorphen ventrikulären Tachykardien mit hoher Frequenz (150-300/min). Übersetzt bedeutet der französische Ausdruck TdP "Spitzenumkehrtachykardie", was sich auf das schraubenförmige Bild der Kammerkomplexe um die isoelektrische Linie im EKG bezieht (Abbildung 3). Sistiert eine TdP, so kann sie sich klinisch in Schwindel oder einer Synkope äußern, geht sie jedoch in Kammerflimmern über, so kann es zu lebensbedrohlichen Ereignissen wie einem reanimationsbedürftigen Herzstillstand oder einem plötzlichen Herztod kommen (Morita et al. 2008).

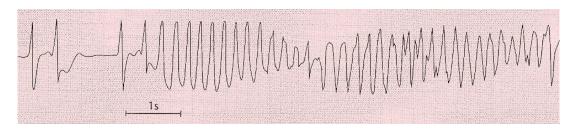


Abbildung 3: Spitzenumkehrtachykardie ("Torsade de Pointes") im EKG Frequenz 210/min. Langzeit-EKG-Registrierung, 25mm/s. Dauer des QT-Intervalls 620ms. Abbildung modifiziert nach (von Olshausen 2005).

Das LQTS wird klassifiziert in eine kongenitale und eine erworbene Form. Ursache des kongenitalen LQTS sind Mutationen von Genen, die für kardiale Ionenkanaluntereinheiten kodieren. Häufiger als das kongenitale LQTS tritt das erworbene LQTS auf (Antzelevitch & Olivia 2006). Diese Form wird typischerweise durch Medikamente verursacht, welche die zelluläre Repolarisation beeinträchtigen.

1.2.1. Das kongenitale LQTS: LQTS1, LQTS2 und LQTS3

Bisher sind zwölf Gene (Subtypen) des kongenitalen LQTS bekannt. Sechs von ihnen werden der autodominanten Form (Romano-Ward-Syndrom) und zwei der rezessiven Form (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom), die mit kongenitaler Taubheit einhergeht, untergeordnet. Fünf Subtypen werden als LQTS ähnlich bezeichnet (Goldenberg & Moss 2008). Einen Überblick über alle LQTS-Formen verleiht Tabelle 1.

Tabelle 1: Kongenitale Subtypen des LQTS					
LQTS Typ	Chromosom	Gen	Protein	Ionenstrom	Anteil an allen LQTS
Romano-Ward-Syn	idrom				LQIS
1	11p15.5	KCNQ1	KvLQT1	I _{Ks}	42-54 %
2	7q35-36	KCNH2	hERG,	I_{Kr}	35-45 %
3	3p24-21	SCN5A	Nav1.5	I _{Na}	1.7-8 %
5	21q22	KCNE1	MinK	I_{Ks}	≤1 %
6	21q22	KCNE2	MiRP1	I_{Kr}	≤1 %
LQTS-ähnlich					
4	4q24-27	ANK2	Ankyrin-B		≤1 %
7	17q23	KCNJ2	Kir2.1	I _{K1}	
8	12p13.3	CACNA1C	Cav1.2	I _{Ca}	selten
9	3p25.3	CAV3	Caveolin-3	I_{Na}	selten
10	11q23.3	SCN4B	NaVβ4	I _{Na}	≤ 0.1 %
Jervell-Lange-Niel	sen-Syndrom				
11	11p15.5	KCNQ1	KvLQT1	I _{Ks}	1-7 %
12	21q22	KCNE1	MinK	I_{Ks}	≤1 %

Tabelle 1 informiert über die Subtypen des kongenitalen LQTS. Dazu sind jeweils das betroffene Chromosom, das betroffene Gen, das betroffene Protein und der betroffene Ionenstrom beschrieben. I_{Na} = schneller Natriumeinwärtsstrom, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = Kaliumeinwärtsgleichrichter. I_{Ca} = Calciumeinwärtsstrom. Tabelle modifiziert nach (Morita et al. 2008).

Circa 80 % der bisher identifizierten Mutationen beim LQTS sind mit den Subtypen LQTS1, LQTS2 und LQTS3 assoziiert. Der am häufigsten auftretende Subtyp ist das LQTS1. Der Anteil an allen kongenitalen LQTS liegt zwischen 42-54 %. Charakterisiert wird das LQTS1 durch ein pathologisches Strömungsverhalten von I_{Ks} . Der Anteil des LQTS2 liegt zwischen 35-45 %. Der betroffene Ionenstrom ist hier I_{Kr} . Das LQTS3 liegt prozentual zwischen 1.7-8 %. Für die Pathologie verantwortlich ist eine Funktionsstörung von I_{Na} .

Alle anderen Subtypen treten sehr selten auf (Morita et al. 2008). Genaue Angaben zur Prävalenz des kongenitalen LQTS sind ungenau. Aktuell geschätzte Zahlen in der Literatur liegen bei 1:2500 bis 1: 20000 (Schwartz et al. 2009).

1.2.1.1. LQTS1: KvLQT1-Kaliumkanaldefekt

Der häufigste Subtyp ist das LQTS1. Er ist für circa 42-54 % aller LQTS assoziierten Mutationen verantwortlich (Morita et al. 2008). Das KCNQ1-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11p15.5 und kodiert für die porenbildende Alpha-Untereinheit des KvLQT1-Kanals. Der zum Kanal zugehörige Ionenstrom ist I_{Ks} (Barhanin et al. 1995, Saenen & Vrints 2008,

Sanguinetti et al. 1996). Ein funktionsfähiger KvLQT1 im Herzen besteht aus vier Alpha-Untereinheiten, die zusammen ein Homotetramer bilden (Abbildung 4A). Jede Alpha-Untereinheit besteht aus 676 Aminosäuren und besitzt sechs Transmembransegmente (S1-S6) mit einem intrazellulärem N- und C-Terminus (Abbildung 4B). Diese Bauweise aus einem Homotetramer mit jeweils sechs transmembranen Segmenten ist typisch für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle). Zur Ausbildung eines aktiven KvLQT1 am Herzen interagiert das Homotetramer zusammen mit der akzessorischen Beta-Untereinheit minK (kodiert von KCNE1; Abbildung 4C) über das C-terminale Ende der Alpha-Untereinheit (Jespersen et al. 2005, Yellen 2002).

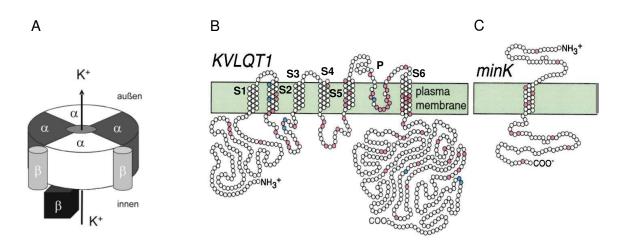


Abbildung 4: Schematisches Modell des KvLQT1-Kanals

A: Die Zusammensetzung des KvLQT1 besteht aus vier Alpha-Untereinheiten und einer unbekannten Anzahl von minK Beta-Untereinheiten. B: Jede Alpha-Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Zwischen S5 und S6 befindet sich der P-Loop (P). Vier P-Loops, eine aus jeder Alphauntereinheit, bilden die Kanalpore. S4 weist eine hohe Dichte positiver Aminosäurereste auf und dient als Spannungssensor für die Kanalöffnung und Kanalschließung. Jeder Kreis stellt eine der 676 Aminosäuren dar, aus denen eine Alpha-Untereinheit aufgebaut ist. Bekannte Mutationen sind durch farbige Kreise kenntlich gemacht. C: akzessorische Beta-Untereinheit minK. Abbildung modifiziert nach (Keating & Sanguinetti 2001).

Mutationen, die das LQTS1 betreffen, sind überwiegend Missense-Mutationen (Keating & Sanguinetti 2001, Splawski et al. 2000). Abbildung 4 markiert Missense-Mutationen farblich rot und Shiftmutationen bzw. Deletionen blau. Mutierte KvLQT1-Untereinheiten bewirken eine Reduktion von I_{Ks} (loss of function). Hierdurch wird während der Plateauphase des Aktionspotentials das Gleichgewicht zwischen depolarisierenden Einwärts- und repolarisierenden Auswärtsströmen zu Gunsten der Depolarisation verschoben. Die Plateauphase wird verlängert und die Repolarisation des Membranpotentials verzögert. Es resultiert eine Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials.

Physiologisch spielt der KvLQT1 eine bedeutende Rolle bei der adäquaten Anpassung der Aktionspotentialdauer an die Herzfrequenz. Unter langsamen Herzfrequenzen wird der KvLQT1 deaktiviert, so dass sich die Repolarisationsphase verzögert und die Dauer des Aktionspotentials verlängert. Unter schnellen Frequenzen erfolgt keine komplette Deaktivierung des Kanals, so dass ein größerer I_{Ks} Anteil an der Repolarisation beteiligt ist und ein kürzeres Aktionspotential resultiert (Clancy et al. 2003, Mitcheson und Sanguinetti 1999). Im LQTS1 kann durch den pathologischen Funktionsverlust von I_{Ks} unter tachykarden Herzfrequenzen die Dauer des Aktionspotentials der Herzfrequenz nicht mehr angepasst werden. Diese Theorie passt zu der

klinischen Beobachtung, dass LQTS1-Patienten überwiegend bei schnellen Herzfrequenzen Arrhythmien entwickeln (Schwartz et al. 2001).

1.2.1.2. LQTS2: hERG-Kaliumkanaldefekt

Das LQTS2 ist der zweithäufigste Subtyp und für circa 35-45 % aller LQTS assoziierten Mutationen verantwortlich (Morita et al. 2008). Das KCNH2-Gen liegt auf Chromosom 7q35-q36 und kodiert im Herzen für die porenbildende Alpha-Untereinheit des hERG-Kanals (hERG = human ether a go go related gene). Der betroffene Ionenstrom ist der I_{Kr} (Saenen & Vrints 2008, Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006, Sanguinetti et al. 1995). Wie auch der KvLQT1-Kanal weist der hERG-Kanal die typische Bauweise eines spannungsabhängigen Kaliumkanals vom Kv-Typ auf. Er besitzt homotetramere Alpha-Untereinheiten, die sich aus jeweils 1159 Aminosäuren mit sechs transmembranen Domänen (S1-S6) zusammenstellen. Zur Ausbildung eines aktiven hERG-Kanals am Herzen interagiert das Homotetramer zusammen mit der akzessorischen Beta-Untereinheit MiRP1 (minK-related protein 1, Abbildung 5), welche für die Modulation der Kinetik und Leitfähigkeit, Übertragung der cAMP stimulierenden Effekte sowie Regulierung der Sensitivität gegenüber anderen Substanzen verfügbar ist (Kieting und Sanguinetti 2001).

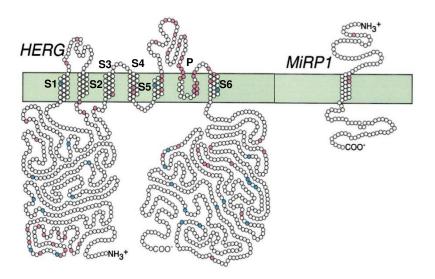


Abbildung 5: Schematisches Modell des hERG-Kanals

Jede Alpha-Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Zwischen S5 und S6 befindet sich ein ungewöhnlich langer S5-Linker und die Kanalpore (P). S4 stellt mit positiven Ladungen den Spannungssensor dar. Die S5-S6 Schleife bildet die kaliumselektive Pore. Jeder Kreis stellt eine der 1159 Aminosäuren dar, aus denen eine Alpha-Untereinheit aufgebaut ist. Bekannte Mutationen sind durch farbige Kreise (rot, blau) kenntlich gemacht. Abbildung modifiziert nach (Kieting & Sanguinetti 2001).

In Mutationsanalysen konnten für das LQTS2 Missense-Mutationen (rote Markierungen Abbildung 5) und Shiftmutationen bzw. Deletionen (blaue Markierungen Abbildung 5) identifiziert werden (Keating & Sanguinetti 2001, Splawski et al. 2000). Diese bewirken eine Reduktion von I_{Kr} (loss of function). Während Phase 3 des Aktionspotentials kommt es zu einem großen I_{Kr} Ausstrom, der die Repolarisation erheblich beeinträchtigt. Eine Reduktion von I_{Kr} verzögert die Repolarisation, was eine Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials bewirkt (Splawski et al. 2000). Bei schnellen Herzfrequenzen spielt der I_{Ks} zur adäquaten Anpassung der

Aktionspotentialdauer eine entscheidende Rolle (Kapitel 1.2.1.1.). Die physiologische Funktionsfähigkeit von I_{Ks} bleibt im LQTS2 erhalten. Dieser Mechanismus erklärt, warum die Gefahr unter schnellen Herzfrequenzen Arrhythmien zu entwickeln für LQTS2-Patienten im Vergleich zu LQTS1-Patienten geringer ist (Schwartz et al. 2001).

1.2.1.3. LQTS3: Nav1.5-Natriumkanaldefekt

Das LQTS3 entsteht durch Mutationen im SCN5A-Gen. SCN5A liegt auf Chromosom 3p21 und kodiert für die Alpha-Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals (Nav1.5) (Gellens et al. 1992). Der Nav1.5-Kanal setzt sich zusammen aus einer Pore formenden Alpha- und einer regulatorischen Beta-Untereinheit. Die Alpha-Untereinheit besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich in vier homologe Domänen aufteilt (DI - DIV; Abbildung 6). Jede der vier Domänen besteht aus sechs transmembranösen Segmenten (S1-S6).

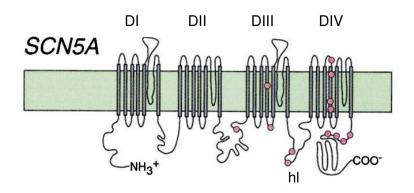


Abbildung 6: Schematisches Modell des Nav1.5-Kanals

Die Alphauntereinheit des Nav1.5 besteht aus vier Domänen (DI – DIV), die jeweils aus sechs transmembranösen Segmenten (S1-S6) gebaut ist. Der P-Loop jeweils zwischen S5 und S6 verleiht dem Kanal seine Natriumselektivität. S4 dient als Spannungssensor zum Öffnen und Schließen des Kanals. Zwischen DIII und DIV befindet sich die "hinged lid" (hl). Bekannte Mutationen sind in der Abbildung durch farbige Kreise kenntlich gemacht. Abbildung modifiziert nach (Kieting & Sanguinetti 2001).

Zwischen S5 und S6 bildet sich eine extrazelluläre Schleife (P-Loop), diese verleiht dem Kanal seine Natriumselektivität. Positiv geladene Aminosäurereste in S4 ermöglichen dem Kanal nach Erreichen des Schwellenpotentials eine Konformationsänderung in einen offenen und aktivierten Zustand. Natriumionen fließen im offenen Zustand des Kanals von extra- nach intrazellulär. (Booker et al. 2003, Gellens et al. 1992). Der Nav1.5-Kanal wechselt schon nach kurzer Aktivierungszeit wieder in einen geschlossenen inaktivierten Zustand. Nur ca. 1 % der Natriumkanäle bleibt offen und trägt zur Depolarisation in der Plateauphase bei. Für die schnelle Inaktivierung besitzt der Kanal eine aufklappbare Proteindomäne zwischen Domäne III und IV in der Pore ("hinged lid"). Diese Domäne gibt dem Kanal die Eigenschaft nach der Aktivierung nur kurz offen zu bleiben und schnell wieder zu inaktivieren. Nach abgeschlossener Repolarisation geht der Kanal dann wieder in einen geschlossenen, aktivierbaren Zustand über. Bei erneutem Erreichen des Schwellenpotentials wird der Kanal aktiviert und öffnet sich (Cha et al. 1999).

Mutationen im SCN5A-Gen führen zu Strukturveränderungen der Domäne III und IV des Natriumkanals. Das Spektrum der Mutation erzeugt Natriumkanäle, die nur inkomplett inaktivieren oder nach erfolgter Inaktivierung wieder vorzeitig öffnen. Die pathologische

Funktionszunahme (gain of function) des Na⁺-Stromes erzeugt eine zusätzliche depolarisierende Kraft während der Plateauphase, die die Repolarisation verzögert und die Aktionspotentialdauer verlängert (Booker et al. 2003, Wang et al. 1995).

LQTS3-Patienten haben ein besonders hohes Risiko unter langsamen Herzfrequenzen Arrhythmien zu entwickeln. Ein großer Anteil dieser Patienten entwickelt tödliche Arrhythmien während des Schlafes und selten während körperlicher Aktivität (Schwartz et al. 2001). Dieses ist zum einen dadurch erklärbar, dass die physiologische Funktionsfähigkeit von I_{Ks} unter schnellen Frequenzen das Aktionspotential der Herzfrequenz anzupassen im LQTS3 erhalten bleibt. Zudem kommt es infolge einer physiologischen Aktivierung G-Protein gekoppelter β-Rezeptoren unter schnellen Herzfrequenzen zu einer Zunahme des Natriumstromes. Der Natrium-Konzentrationsgradient über der Zellmembran nimmt ab und letztlich resultiert ein reduzierter Natriumstrom nach intrazellulär. Dieser Effekt gewinnt bei LQTS3-Patienten an Bedeutung während der Plateauphase, in der dadurch der pathologisch erhöhte Natriumeinwärtsstrom (gain of function) wieder reduziert wird (Booker et al. 2003, Muramatsu et al. 1994).

1.2.2. Das erworbene LQTS

Neben dem kongenitalen LQTS existiert die erworbene Form dieser Krankheit. Typischerweise wird bei der erworbenen Form die Verlängerung des QT-Intervalls und Aktionspotentials durch Medikamente verursacht, welche die zelluläre Repolarisation in Kardiomyozyten beeinträchtigen.

Therapeutisch essentiell ist die Verlängerung des QT-Intervalls für die Wirkung von Antiarrhythmika. Hierzu gehören u.a. die Wirkstoffe Sotalol, Chinidin und Amiodaron. Allerdings ist es bei der Anwendung dieser Substanzen in Einzelfällen auch zu einer unerwünschten exzessiven Verlängerung des QT-Intervalls und im Zusammenhang hiermit auch zu lebensbedrohlichen TdP gekommen (Roden 2008). Bei Medikamenten mit nicht kardialer Indikation ist die Verlängerung des QT-Intervalls eine unerwünschte Nebenwirkung. Inzwischen weiß man, dass eine große Vielfalt von Medikamenten eine unerwünschte Verlängerung der QT-Zeit bewirken kann. Hierzu gehören Medikamente aus unterschiedlichen Substanzklassen wie z.B. Antibiotika, Antidepressiva, Antimalariamittel, Antihistaminika und Bronchodilatatoren. Darunter fallen auch Medikamente, die sehr gebräuchlich im klinischen Alltag eingesetzt werden, wie z.B. Erythromycin, Levofloxacin, Cipralex, Haldol, Amitriptylin, Salmeterol und Terfenadin. Eine Liste mit Medikamenten, die Einfluss auf das QT-Intervall ausüben, wird auf verschiedenen Webseite aufgeführt und regelmäßig aktualisiert (Arizona Center of Education and Research on Therapeutics 2013).

Die medikamentös induzierte Verlängerung der QT-Zeit wird insbesondere durch eine pharmakologische Inhibition von den Kaliumkanälen KvLQT1 und hERG verursacht. Eine Mehrheit der Medikamente blockiert den hERG-Kanal und reduziert den repolarisierenden I_{Kr} (Roden 2008). Bedingt durch seine Struktur, stellt der hERG-Kanal ein toxikologisches Ziel für chemische Substanzen dar. Im Vergleich zu anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen weist dieser Kanal, bedingt durch eine fehlende Prolin-Valin-Prolin Sequenz in der S6-Helix, eine größere und besser zugängliche Porenregion auf. Das Vorhandensein zweier aromatischer Aminosäurereste (Tyrosin 652 und Phenylalanin 656) am C-terminalen Ende von S6 verleiht dem hERG-Kanal potentielle Stellen für Interaktionen mit aromatischen Gruppen von anderen

Substanzen. Aus dieser Blockade resultiert eine Abnahme von I_{Kr}, was eine Verzögerung der Repolarisation und damit eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer bewirkt (Mitcheson et al. 2000a, Mitcheson et al. 2000b, Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006).

Für das Auftreten von einem pharmakologisch induzierten LQTS und einer TdP-Arrhythmie konnten Risikofaktoren identifiziert werden. Hierzu gehört das kongenitale LQTS, Elektrolytstörungen, insbesondere Hypokaliämie und Hypomagnesiämie, das weibliche Geschlecht, Bradykardie, die gleichzeitige Einnahme von Medikamenten, die das QT-Intervall verlängern und eine Hypothermie (Roden 2004).

1.2.3. Konzepte der Arrhythmogenese

Eine Komplikation des LQTS ist das Auftreten von TdP-Arrhythmien. Diese können sistieren oder in Kammerflimmern übergehen und den plötzlichen Herztod begünstigen.

In der Pathophysiologie der Arrhythmogenese wird zwischen mehreren Konzepten unterschieden. Ein Mechanismus, der für die Entstehung von TdP bei LQTS-Patienten verantwortlich zu sein scheint, ist die getriggerte Aktivität. Hierbei spielt die Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials und das Auftreten von frühen (EADs, Early After Depolarizations) und späten (LADs, Late After Depolarizations) Nachdepolarisationen eine wesentliche Rolle. Sind diese Depolarisationen hinreichend stark und erreichen das Schwellenpotential, an dem Natriumkanäle öffnen, können sie in benachbarten Myozyten erneute Aktionspotentiale auslösen, zu kreisenden Erregungen führen und somit in einer TdP Arrhythmie resultieren (Marban 2002).

Abbildung 7 veranschaulicht das Konzept getriggerte Aktivität und die Entstehung von TdP. In der Abbildung 7A, 7B und 7C ist das Aktionspotential jeweils oben und das dazugehörige EKG unten dargestellt. Abbildung 7A zeigt zunächst den Zustand bei physiologischer Aktionspotentialdauer (durchgezogene Linie). Infolge eines LQTS kann es zu übermäßigen Verlängerungen der Aktionspotentialdauer kommen (gestrichelte Linie). Diese Verlängerungen werden im EKG als eine Verlängerung des QT-Intervalls erkennbar. Bei einer Verlängerung des Aktionspotentials wird die Entstehung von EADs begünstigt (Roden 2004). EADs entstehen durch eine Reaktivierung von L-Typ Calciumkanälen und Na⁺/Ca²⁺-Austauschern während der Phase 2 und 3 des Aktionspotentials (Abbildung 7B) (Marban et al. 1986). Im EKG können die Nachdepolarisationen des Ventrikels als pathologische Verlängerung der T-Welle sichtbar werden. Sind die EADs hinreichend stark, kann eine getriggerte Aktivität entstehen, die zu lebensbedrohlichen TdP-Arrhythmien führen kann (Abbildung 7C) (Marban 2002, Marban et al. 1986, Roden 2004). Im EKG kann dieses als R auf T Extrasystole (RaTE) sichtbar werden, wobei die R-Zacke der Extrasystole in die T-Welle der vorigen Herzaktion fällt. Die RaTE wird häufig vor dem Auftreten von Kammertachykardien gesehen, besonders bei TdP-Tachykardien (Abbildung 7D).

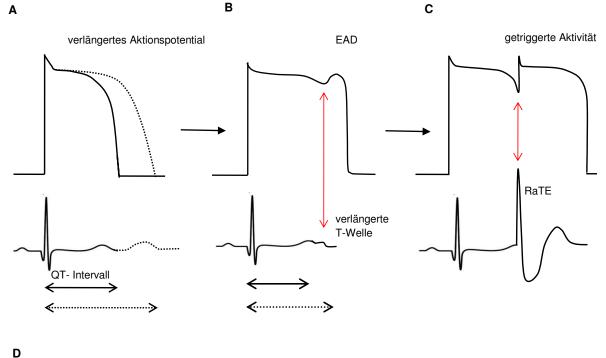




Abbildung 7: Entstehung von TdP-Arrhythmien

Schematische Abbildung. **A:** Aktionspotential normal (durchgezogene Linie) und verlängert (gestrichelte Linie). Darunter entsprechendes EKG mit QT-Intervall. **B:** Aktionspotential mit EAD (oben), im EKG ist die frühe Nachdepolarisation als verlängerte T-Welle erkennbar (unten). **C:** Eine EAD von ausreichender Stärke kann eine RaTE bewirken, die eine TdP-Arrhythmie auslösen kann. **D:** Elektrokardiographisches Bild einer TdP-Arrhythmie ausgelöst durch eine RaTE. EAD = early afterdepolarization (frühe Nachdepolarisation); RaTE = R auf T Extrasystole. Abbildung 7D modifiziert nach (Yan et al. 2001).

Ein weiteres Konzept, welches für die Arrhythmogenese beim LQTS zur Diskussion steht, ist die erhöhte transmurale Dispersion der Repolarisation (TDR). Zustande kommt die transmurale Dispersion dadurch, dass in den unterschiedlichen Zellschichten des linken Ventrikels (subepikardial, midendokardial und subendokardial) aufgrund einer unterschiedlichen Ionenkanalausstattung unterschiedlich lange und konfigurierte Aktionspotentiale nachweisbar sind (Antzelevitch 2001). Shimizu et al. führte Experimente an linksventrikulären Gewebestücken vom Hund durch, in denen transmembrane Aktionspotentiale aus Endokard, M-Zellen und Epikard zeitgleich mit einem transmuralen EKG aufgezeichnet wurden. Die Versuche ergaben, dass im pharmakologisch induzierten LQT1, -2 und -3 Modell eine erhöhte TDR mit einem erhöhten Auftreten von TdP korreliert (Shimizu et al. 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen unter nahezu identischer Methodik kam auch Aiba et al. (Aiba et al. 2005).

1.2.4. Subtypspezifische Aspekte des LQTS

Die Feststellung, dass die verschiedenen LQTS-Varianten mit Genen für verschiedene kardiale Ionenkanäle assoziieren, hat bedeutende Auswirkungen auf die Diagnostik und Analyse von LQTS-Patienten. Das LQTS wird in zwölf Subtypen unterteilt. Die häufigsten drei sind LQTS1-3 (Kapitel 1.2.1). Die Erforschung ihrer Pathophysiologie und Klinik brachte Erkenntnisse über relevante Unterschiede zwischen diesen Subtypen. Diese sind entscheidend für eine erfolgreiche Diagnostik und Therapie des LQTS (Schwartz et al. 2001).

Nach der Entdeckung der drei LQTS-Gene wurde man darauf aufmerksam, dass kardiale Ereignisse durch bestimmte Auslöseimpulse provoziert werden. Klinische Studien hierüber belegten diese Annahme und zeigten, dass die Trigger für kardiale Ereignisse subtypspezifisch sind und für jeden Subtyp ein charakteristisches Muster erkennbar ist (Abbildung 8). Beim LQTS1 ist die Assoziation von kardialen Ereignissen mit einer Sympathikusaktivierung charakteristisch. Die meisten Ereignisse treten während physischer Belastung (62 %) oder durch emotionalen Stress (26 %) auf, hingegen nur selten während körperlicher Ruhe (3%). Dies steht im starken Kontrast zum LQTS3, bei dem tödliche Ereignisse häufiger während Ruhephasen oder Schlaf (39 %) als bei körperlicher Anstrengung (13 %) auftreten. Das LQTS2 nimmt diesbezüglich eine Mittelstellung ein. Hier tritt die Symptomatik weniger bei körperlicher Anstrengung (13 %) auf, sondern mehr unter emotionalem Stress (43 %) und während Ruhephasen (29 %). Häufigster Triggerfaktor ist hier ein plötzliches emotionales Ereignis in Form eines auditorischen Stimulus (z.B. Telefonklingeln, Wecker oder Sirenenalarm).

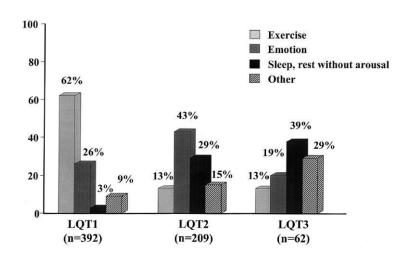


Abbildung 8: Triggerfaktoren für Arrhythmien

Ermittelt wurde der Genotyp von 663 LQTS-Patienten und in Bezug gesetzt zu den klassifizierenden Triggerfaktoren. Als Triggerfaktoren wurden physischer Stress (Exercise), emotionaler Stress (Emotion), Schlaf ohne Wecken und Anderes (other) gewählt. Erläuterungen im Text. Abbildung modifiziert nach (Schwartz et al. 2001).

Die Kenntnis über genotypspezifische Trigger ist essentiell für ein erfolgreiches perioperatives Management und für die Therapie der LQTS-Patienten. Für alle Patienten mit LQTS gilt als primäre Therapie eine Lebensstilanpassung. Diese beinhaltet das Vermeiden von Arrhythmie triggernden Faktoren. Da Arrhythmietrigger subtypspezifisch sind, muss für jeden Genotyp eine individuelle Lebensstilanpassung erfolgen. Alle Subtypen sollten nur zu einem begrenzten Grad sportlich aktiv sein. Vor allem gilt dies für LQTS1-Patienten oder Patienten, die bei körperlicher Belastung schon einmal symptomatisch geworden sind. Leistungssport und Wettkampfsportarten

sind für sie kontraindiziert. Schwimmen und Tauchen gilt als spezifischer Triggerfaktor beim LQTS1 und sollte deshalb unbedingt gemieden werden (Schwartz et al. 2001). Charakteristisch für Patienten mit LQTS2 ist, dass die Symptomatik bei ihnen durch emotionale Schrecksituationen getriggert werden kann. Das plötzliche Gewecktwerden aus dem Schlaf durch ein Alarmsignal oder laute Geräusche stellt eine besondere Gefahr dar. Bei LQTS3-Patienten besteht ein hohes Risiko für ein kardiales Ereignis während der Ruhephasen oder des Nachtschlafes (Crotti et al. 2008).

ß-Rezeptorenblocker stellten bisher die medikamentöse Basistherapie des LQTS dar (Crotti et al. 2008). Das Ziel der Therapie besteht in der antiarrhythmischen Wirkung und der Herzfrequenzsenkung. Moss et al. zeigten in einer Studie über die Effektivität von β-Rezeptorenblocker, dass das Risiko für kardiale Ereignisse signifikant gesenkt werden konnte (Goldenberg & Moss 2008, Moss et al. 2000). Jedoch muss bei dem Einsatz von Betablockern der Subtyp beachtet werden. Bei LQTS3-Patienten ist die Therapie mit β-Rezeptorenblocker weniger effektiv, da für sie ein höheres Risiko besteht bei langsamen Herzfrequenzen symptomatisch zu werden (Schwartz et al. 2001). LQTS3-Patienten können daher von Schrittmachern profitieren, welche dann auch den sicheren Gebrauch von β-Rezeptorenblockern erlauben würden (Morita et al. 2008).

Für die Entwicklung von medikamentösen genotypspezifischen Therapien wurden verschiedene Präparate mit spezifischer Wirkung auf Abnormitäten der Kalium- und Natriumkanäle getestet. Hierzu gehört u.a. Nikorandil, ein spezifischer Kaliumkanalöffner. Er zeigte sich in einer Tierstudie (Shimizu & Antzelevitch 2000) und Patientenstudie für das LQTS1 wirksam. Für LQTS1 und LQTS2-Patienten wird der Calciumkanalblocker Verapamil empfohlen (Shimizu et al. 2005). Bei LQTS3-Patienten gibt es erste klinische Erfahrungen mit Natriumkanalblockern wie Mexiletin (Shimizu et al. 2005, Shimizu & Antzelevitch 1997). Entscheidend bei diesem Therapieansatz ist, dass die Medikamente je nach Subtyp den betroffenen Ionenkanal angreifen und so in Zukunft die Grundlage einer genotypspezifischen Therapie bilden (Shimizu et al. 2005).

Um Medikamente subtypspezifisch einsetzen zu können, ist eine Subtypbestimmung in der Diagnostik essentiell. Die Diagnostik des LQTS basiert hauptsächlich auf Eigen- und Familienanamnese, der Klinik des Patienten und den EKG-Befunden (Goldenberg & Moss 2008). Der Subtyp ist hieraus jedoch nicht sicher ableitbar. Die Klinik des Patienten kann Hinweise auf einen möglichen Subtyp liefern. Da kardiale Ereignisse jedoch nur zu begrenzter Wahrscheinlichkeit in den einzelnen Subtypen auftreten, ist sie nicht immer hilfreich. Obwohl das LQTS an sich durch eine Verlängerung des QT-Intervalls mittels EKG diagnostiziert werden kann, ist es nicht immer möglich den spezifischen Subtyp anhand des EKGs zu identifizieren. Zwar wurden verschiedene T-Wellen Anomalitäten den einzelnen LQTS-Subtypen zugeteilt (Moss et al. 1995, Zhang et al. 2000), im klinischen Alltag zeigte sich diese Diagnostikmethode jedoch als unzuverlässig (Kanters et al. 2004). Seit einiger Zeit ermöglicht die genetische Untersuchung für LQTS-Patienten eine sichere Diagnosestellung. Trotzdem ist einschränkend anzuführen, dass die molekulare Diagnostik bei den LQTS noch nicht in der Lage ist, alle prinzipiell möglichen und krankheitsrelevanten Mutationen in einem betroffenen Gen zu erkennen. Bei etwa 75% der klinisch gesicherten LQTS-Patienten können Mutationen in einem der Gene KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 oder SCN5A nachgewiesen werden. Etwa 30% der Fälle können aufgrund unerkannter Mutationen derzeit molekulargenetisch nicht geklärt werden. Derzeit ist die Durchführung der molekularen Diagnostik aufgrund der genetischen Heterogenität

äußerst zeit- und kostenintensiv, so dass sie nur in spezialisierten Zentren durchgeführt wird und der klinischen Routine nur bedingt zur Verfügung steht. Die Diagnose ist strengen Indikationen unterlegen. Sie ist nur dann indiziert, wenn bereits eine klinische Diagnose gestellt wurde. Sie dient dann zur Subtypbestimmung oder zum Screening bei positiver Familienanamnese.

1.3. Das LQTS im Tiermodell

Viele Mechanismen in der Pathophysiologie des LQTS und im Zusammenhang damit auch die Entstehung von Arrhythmien sind nicht vollständig geklärt. Die vorhergehenden Kapitel beschreiben jedoch, dass sowohl beim angeborenen als auch beim erworbenen LQTS die Verlängerung des Aktionspotentials eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Arrhythmogenese einnimmt. Die Entstehung von lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen bei Dysfunktion der Kanäle KvLQT1 (LQTS1) und hERG (LQTS2) verdeutlicht, wie essentiell die repolarisierenden Kaliumströme I_{Ks} und I_{Kr} für den Menschen sind und von welcher großen Bedeutung es ist, diese zu analysieren, um genauere Mechanismen über die Pathophysiologie des LQTS zu verstehen. Da humanes Gewebe für diese Zwecke nur limitiert verfügbar ist, ist es nötig, auf Tiermodelle zurückzugreifen, in denen das LQTS pharmakologisch simuliert und elektrophysiologisch analysiert werden kann.

Tierexperimentell anerkannte Spezies für LQTS-Experimente sind das Meerschweinchen (Bosch et al. 1998, Sanguinetti et al. 1991, Schwoerer et al. 2007, Yang et al. 2004), der Hase (Aiba et al. 2005, Milberg et al. 2005, Studenik et al. 2001) und der Hund (Antzelevitch 2007, Shimizu & Antzelevitch 1997, Yan et al. 2001). Für die Experimente dieser Arbeit sollte ein Modell verwendet werden, welches hohe Stromdichten von I_{Ks} und I_{Kr} aufweist, um abnorme Ionenkanalfunktionen genau zu analysieren. Des Weiteren galt es als wichtig, dass die regionale Verteilung der einzelnen Stromkomponenten mit dem menschlichen Herzen vergleichbar ist. Für diese Experimente wurden daher linksventrikuläre Kardiomyozyten vom Dunkin-Hartley Meerschweinchen gewählt. Die Elektrophysiologie des Meerschweinchens wurde bereits sehr gut erforscht (Bryant et al. 1997, Davie et al. 2004, Doerr et al. 1990, Main et al. 1998), so dass es heute das klassische Tiermodell zur Untersuchung der Kaliumströme I_{Ks} und I_{Kr} darstellt.

Ein weiterer Grund, der für die Anwendung dieses Modells spricht, ist, dass vorausgehende Experimente dieser Arbeitsgruppe über die Wirkung von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential ebenfalls an Meerschweinchenmyozyten durchgeführt wurden (Schwoerer et al. 2007) und somit bereits Grundlagen über die Wirkung der Substanz existieren. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit eine computergestützte Simulation angewendet werden, um Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente genauer interpretieren zu können. Hierfür wurde das etablierte Luo-Rudy-dynamic-Modell (Luo & Rudy 1991, 1994) eingesetzt, eine computergestützte Simulation ventrikulärer Aktionspotentiale des Meerschweinchens.

Über das LQTS existieren in vitro Studien, die an isolierten Einzelzellen (Bosch et al. 1997, Davie et al. 2004, Gerhardy et al. 1998, Priori et al. 1996, Sanguinetti et al. 1991, Yang et al. 2004), an Gewebestücken aus dem linken Ventrikel (Aiba et al. 2005, Shimizu & Antzelevitch 1998, 2000) oder am gesamten Herzen (Milberg et al. 2005, Wu et al. 2004, Yang et al. 2004) durchgeführt wurden. In vivo Studien dahingegen existieren nur wenige (Odening et al. 2008, Yang et al.

2004). In vitro Experimente an isolierten Einzelzellen ermöglichen eine elektrophysiologische Charakterisierung auf zellulärer Ebene mittels der Patch-Clamp-Technik in einer gewählten Herzregion. Bedeutung gewinnt diese Methode bei der Anwendung von Pharmaka, deren Effekt auf einzelne Ionenkanäle oder auf ein regionales Aktionspotential analysiert werden soll. Da das Herz auf zellulärer Ebene keine Homogenität aufweist, sind Einzelzellversuche da von Nutzen, wo es um Charakterisierung elektrophysiologischer Eigenschaften in verschiedenen Herzregionen geht. Bei Experimenten an Gewebestücken oder am ganzen Herzen wird nicht mehr der Effekt einer Substanz auf lokaler zellulärer Ebene analysiert, sondern die Auswirkung auf einen größeren Zellzusammenschluss gewertet. Mit Hilfe eines transmuralen EKGs kann z.B. die Veränderung des QT-Intervalls und der TDR analysiert werden. (Aiba et al. 2005, Antzelevitch 2005, Shimizu et al. 2000).

In dieser Arbeit sollte in in vitro Experimenten untersucht werden, ob es durch Droperidol zu einer substanzinduzierten Verlängerung der Aktionspotentialdauer kommt. Für die Messung von Aktionspotentialen eignen sich besonders gut Einzelzellversuche. Hierfür wurden linksventrikuläre Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband isoliert und mittels der Patch-Clamp-Technik Aktionspotentiale unter verschieden definierten Bedingungen ausgelöst und analysiert.

1.4. Das LQTS in der Anästhesie

Sowohl Patienten mit einem kongenitalen als auch mit einem erworbenen LQTS sind in der perioperativen Phase einem erhöhten Risiko von TdP-Arrhythmien ausgesetzt (Booker et al. 2003, Kies et al. 2005, Kim et al. 2010, Mandal et al. 2011). Bei bislang asymptomatischen Patienten kann sich ein LQTS in der perioperativen Phase erstmanifestieren (Mandal et al. 2011). Mögliche Triggerfaktoren der ventrikulären Tachykardie sind zahlreich und müssen in der perioperativen Phase vermieden werden. Für Anästhesisten sind Kenntnisse von Arrhythmietriggern und die Fähigkeit einer akuten Behandlung der TdP notwendig. Subtypspezifische Triggerfaktoren machen die Behandlung der LQTS-Patienten komplex. Es existieren bisher keine definitiven Richtlinien zum subtypspezifischen Umgang mit LQTS-Patienten in der Anästhesie (Booker et al. 2003, Kies et al. 2005).

1.4.1. Perioperatives Management von LQTS-Patienten

Da sich bei bislang asymptomatischen LQTS-Patienten die Krankheit in der perioperativen Phase erstmanifestieren kann, sollte bereits in der Prämedikation Hinweisen nachgegangen werden, die den Verdacht auf ein nichtdiagnostiziertes LQTS nahelegen. Anästhesie bei unbehandelten LQTS-Patienten trägt ein sehr hohes Risiko für das intraoperative Auftreten von TdP mit sich. Hinweise können eine positive Eigenanamnese oder Familienanamnese bezüglich kardialer Ereignisse oder ein auffälliger EKG-Befund (abnorme T-Wellen Morphologie, verlängerte QT-Zeit) sein. Der Erfassung aller LQTS-Patienten sind allerdings Grenzen gesetzt, denn nur 60% weisen eine Verlängerung der QT-Zeit auf (Schwartz et al. 1993), 40% weisen zum Zeitpunkt der Diagnose keine klinischen Symptome auf (Ackermann 1998). Ist der Verdacht auf ein nichtdiagnostiziertes LQTS gegeben, sollte eine nähergehende Diagnostik erfolgen.

Narkose und Operation werden von zahlreichen Faktoren begleitet, die zur Ausprägung von TdP -Arrhythmien prädisponieren. Deshalb müssen geeignete prophylaktische Maßnahmen getroffen werden. In der vorhandenen Literatur existieren Empfehlungen für das perioperative Management von LQTS-Patienten (siehe Tabelle 2). Obwohl bereits subtypspezifische Triggerfaktoren für Arrhythmien und subtypszpezifische Therapieansätze beschrieben wurden (Moss et al. 1999, Schwartz et al. 2001), berücksichtigen diese Empfehlungen jedoch keine subtypspezifischen Aspekte (Booker et al. 2003, Kies et al. 2005). Die wichtigsten Prinzipien für das Management aller LQTS-Patienten sind demnach die Therapie mit ß-Rezeptorenblocker, das Vermeiden einer unkontrollierten Sympathikusaktivierung und das Vermeiden von QT-verlängernden Faktoren. Speziell empfohlen wird u.a. das Vermeiden von Angst, Unruhe, Stress und lauten Geräuschen, keine Verabreichung von Medikamenten, die das QT-Intervall verlängern, das Vermeiden einer Hypothermie, sowie Elektrolytstörungen (Hypokaliämie, Hypomagnesiämie und Hypocalciämie) und das Vermeiden eines erhöhten intrathorakalen Drucks. Des Weiteren wird empfohlen eine ausreichende vegetative Abschirmung sowie Beta-Blockade (vor allem bei Intubation und Laryngoskopie), ein Zwölfkanal-EKG zur sicheren Interpretation von Herzrhythmusstörungen, die Kenntnis über die Akutbehandlung der TdP, die ständige Bereitschaft zur Defibrillation, ein zentral venöser Zugang und ein adäquater Volumenstatus (Booker et al. 2003, Kies et al. 2005). Von diesen Empfehlungen profitieren v.a. LQTS1 und LQTS2-Subtypen, bei denen Arrhythmien überwiegend durch Sympathikusstimulation, physischen Stress (LQTS1) und emotionalen Stress (LQTS2) getriggert werden (Abbildung 8). Die optimale Behandlung der verschiedenen Subtypen unterscheidet sich jedoch maßgeblich voneinander. Beim LQTS3 z.B. wirkt im Gegensatz zum LQTS1 und LQTS2 physische Ruhe und bradykarde Zustände arrhythmietriggernd. Beta-Blocker sind bei diesen Patienten nicht empfehlenswert. Für ein optimales Management wäre demnach die Kenntnis des Subtyps vorteilhaft. Eine Subtypbestimmung anhand der T-Wellenmorphologie im EKG hat sich hierfür jedoch nicht bewährt (Kanters et al. 2004). Und auch die genetische Diagnostik des kongenitalen LQTS ist bisher im präoperativen Kontext aufgrund einer langen Dauer der Diagnostik und hohen Kosten nur selten realisierbar. Da nur 1-8% aller LQTS-Patienten dem LQTS3-Typ angehören, werden alle Patienten mit unbekanntem Subtyp wie LQTS1 und LQTS2 behandelt (Booker et al. 2003, Katz, 2005, Kies et al. 2005).

Tabelle 2: Perioperatives Management von LQTS-Patienten			
präoperativ	- diagnostische Abklärung		
	- Therapie mit ß-Rezeptorenblocker		
	- ruhige Atmosphäre, Vermeiden von Angst		
	 ausreichende Prämedikation, Anxiolyse 		
	- Elektrolytkontrolle		
	 unkontrollierte Sympathikusaktivierung vermeiden 		
	- EKG-Monitoring (Zwölf-Kanal)		
	- ICD/Schrittmacherkontrolle		
	 keine QT-Intervall verlängernde Medikation 		
	Defibrillationsbereitschaft		
intraoperativ	 Fortsetzung EKG-Monitoring (12-Kanal) 		
	- Zentralvenöser Zugang		
	- Normothermie, Normovolämie		
	- Elektrolytkorrektur		
	- Defibrillationsbereitschaft		
	 hohe intrapulmonale Drücke vermeiden 		
	 unkontrollierte Sympathikusaktivierung vermeiden 		
	 keine QT-Intervall verlängernde Medikation 		
postoperativ	- Extubation in ausreichender Narkosetiefe		
	- Therapie mit ß-Rezeptorenblocker		
	 Überwachung auf "intermediate care"/EKG-Monitoring 		
	- ruhige Atmosphäre		
	- adäquate Analgesie		

Zusammenfassung der derzeitigen Empfehlungen über das perioperative Management bei Patienten mit LQTS. Tabelle modifiziert nach (Booker et al. 2003).

1.4.2. Anästhetika bei LQTS-Patienten

Diverse gebräuchliche Anästhetika beeinflussen die kardiale Repolarisation, indem sie Einfluss auf kardiale Ionenkanäle ausüben. Im EKG ist eine Verlängerung der Repolarisation typischerweise als Verlängerung des QT-Intervalls erkennbar. An gesunden Patienten konnte diese Wirkung durch klinische Studien nachgewiesen werden. So wurde z.B. für Sevofluran, Halothan und Isofluran (Kuenszberg et al. 2000, Schmeling et al. 1991) von einer Verlängerung der QT-Zeit berichtet. In vitro Patch-Clamp-Experimente wurden eingesetzt, um die Wirkung dieser Substanzen auf zellulärer Ebene zu erklären. Hierbei kam man zu dem Ergebnis, dass etliche Anästhetika die kardiale Repolarisation signifikant beeinflussen, indem sie mit kardialen Kaliumkanälen interagieren (Baum 1993, Buljubasic et al. 1996, Suzuki et al. 2003).

Da beim LQTS die kardiale Repolarisation geschwächt ist, gelten Medikamente, die das QT-Intervall verlängern, hier generell als kontraindiziert. Grund für diese Kontraindikation ist die Annahme, dass eine zusätzliche medikamentös induzierte Verlängerung des QT-Intervalls neben der bestehenden Repolarisationsschwäche bei LQTS-Patienten zu einer exzessiven Verlängerung des QT-Intervalls und Arrhythmien führen könnte. Da bisher jedoch keine klinischen Studien hierüber existieren, konnte der tatsächliche Effekt und die zelluläre Wirkung von Substanzen, die das QT-Intervall verlängern, bei LQTS-Patienten bisher nicht geklärt werden. Erst neuere experimentelle Studien konzentrieren sich darauf, die Wirkung von Anästhetika im LQTS-Modell zu untersuchen (Odening et al. 2008). Dabei wurde auch berücksichtigt, dass Medikamente, die mit kardialen Kaliumkanälen interagieren, einen möglichen subtypspezifischen Effekt auf die kardiale Repolarisation ausüben.

Wird so z.B. in einem angeborenen LQTS die Komponente des verzögerten Kaliumgleichrichters (I_K) medikamentös blockiert, die schon durch die genetische Mutation reduziert ist (im LQTS1 z.B. I_{Ks}), besteht die Möglichkeit, dass die jeweils andere Komponente des I_K (im Beispiel dann I_{Kr}) den Ausfall kompensieren kann. Werden jedoch beide Komponenten des (I_K) durch eine genetische Mutation und eine medikamentöse Blockade reduziert, ist das Risiko höher, dass dieser Verlust nicht mehr kompensiert werden kann und die Repolarisation erheblich verzögert eintrifft. Dies widerspricht der bisherigen Annahme, dass generell bei LQTS- Patienten I_{Kr} blockierende Substanzen gemieden werden sollten, sondern es spricht vielmehr für ein subtypspezifisches Einsetzen von Medikamenten.

Aufgrund der Erkenntnis, dass subtypspezifische Arrhythmietrigger und subtypspezifische Therapieansätze existieren (vergleiche Abbildung 8), ist anzunehmen, dass mit kardialen Ionenkanälen interagierende Anästhetika einen subtypspezifischen Effekt bei LQTS-Patienten zeigen. Daher sollte auch die medikamentöse Anästhesie subtypspezifisch orientiert sein. Odening zeigte am in vivo LQTS-Modell des Hasen, dass Tiere mit einem LQTS2 (reduzierter I_{Kr}) außerordentlich empfindlich auf eine I_{Ks} Blockade reagieren. Die I_{Ks} Blocker Isofluran und Propofol erzeugten tödliche Arrhythmien im LQTS2-Modell (reduzierter I_{Kr}), nicht aber im LQTS1-Modell (reduzierter I_{Ks}) (Odening et al. 2008). Aus diesen Versuchen läßt sich ableiten, dass LQTS2-Patienten einem höheren Risiko für Arrhythmien bei Verwendung mit I_{Ks} blockenden Substanzen als LQTS1 Patienten ausgesetzt sind und dass es notwendig ist, die genaue Wirkungsweise von gebräuchlichen Anästhetika zu kennen und deren Auswirkungen auf die Subtypen des LQTS in experimentellen Studien zu testen.

1.5. Droperidol als Antiemetikum

Droperidol ist ein Neuroleptikum aus der Gruppe der Butyrophenone. Allerdings erlangte es nie Bedeutung in der Psychiatrie. Stattdessen wird es seit über 30 Jahren in der Anästhesie verwendet (Gan et al. 2003). Als Dopamin D2-Rezeptorantagonist wird es weit verbreitet bei Kindern und Erwachsenen zur Prophylaxe und Therapie von Übelkeit und Erbrechen in der postoperativen Phase (PONV, postoperative nausea and vomiting) eingesetzt (McKeage et al. 2006). Nicht nur aus kommerziellen Gründen, sondern auch wegen seiner hoch potenten antiemetischen Wirkung wurde Droperidol in der Anästhesie zum Mittel der ersten Wahl (Gan et al. 2003). Die antiemetische Dosierung beträgt 0.625-1.25 mg.

Im Jahr 2001 gab die US Food and Drug Adminastration (FDA) wegen eines erhöhten kardialen Risikos für Droperidol eine Black-Box-Warnung heraus. Diese wies darauf hin, dass bei der Verwendung von höheren Konzentrationen mehrere Fälle von QT-Verlängerungen und TdP mit schwerwiegenden Folgen gemeldet wurden. Die Konsequenz dieser Black-Box-Warnung war, dass der Gebrauch von Droperidol in der Anästhesie drastisch zurückging (Scuderi 2003). Noch im selben Jahr erfolgte die Marktrücknahme von Droperidol durch den damaligen Hersteller (Janssen). Auch in Europa wurde der Verkauf der Substanz von der Schweizer Heilmittelbehörde Swissmedic eingestellt. Die Rechtfertigung der Black-Box-Warnung und Rücknahme des Präparates blieben jedoch umstritten (Habib & Gan 2008, Ludwin & Shafer 2008).

In mehreren Studien wurden die der FDA gemeldeten Fälle, die zur Black-Box-Warnung geführt hatten, untersucht. Es konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen der Gabe von niedrig dosiertem Droperidol (0.625-1.25 mg) und den kardialen Zwischenfällen hergestellt werden (Habib & Gan 2003, Nutall et al. 2007). Zhang untersuchte die Verlängerung des QT-Intervalls in Bezug zur Dosis von Droperidol und zeigte, dass die Substanz in antiemetischer Dosierung (0.625-1.25 mg) keine statistisch relevante Verlängerung des QT-Intervalls bewirkte. In höheren Dosierungen dagegen führte Droperidol zu einer statistisch relevanten Verlängerung des QT-Intervalls, löste aber dennoch keine Arrhythmien aus (Guy et al. 1991). Eine unter Placebo-Kontrolle durchgeführte klinische Studie zeigte ebenfalls, dass Droperidol in antiemetischer Dosierung keine Arrhythmien auslöste (White et al. 2005).

2006 bewilligte Swissmedic die Neuzulassung von Droperidol in der Schweiz. In Deutschland wurde Droperidol 2008 mit dem Handelsnamen "Xomolix" neu zugelassen. Heute ist die alleinige Indikation von Xomolix die Prävention und Therapie der PONV mit einer empfohlenen Dosis von 0.625-1.25 mg für Kinder ab 2 Jahre und Erwachsene. Als kontraindiziert gilt Droperidol für Patienten mit einem verlängerten QT-Intervall oder einem kongenitalen LQTS.

Bis heute konnte in keinem Fall sicher nachgewiesen werden, dass Droperidol in antiemetischer Dosierung Arrhythmien ausgelöst hat (Scuderi 2003).

1.5.1. Die zelluläre Wirkung von Droperidol

Um den zellulären Wirkungsmechanismus von Droperidol zu erklären, wurden bereits elektrophysiologische Einzelzellstudien im Tiermodell durchgeführt. Vergleicht man bisherige Studien über die Wirkung von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential, so stellt man fest, dass diese zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. So bewirkte Droperidol in unterschiedlichen Experimenten eine Verlängerung (Adamantidis et al. 1993, Drolet et al. 1999) oder eine Verkürzung (Adamantidis et al. 1993, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971) Aktionspotentialdauer, in anderen blieb der Effekt ganz aus (Carmeliet et al. 1976, Shiga et al. 2005). Verantwortlich für die Effekte der Substanz wurden Interaktionen mit verschiedenen Ionenkanälen gemacht, die das Gleichgewicht zwischen Einwärts- und Auswärtsströmen verschieben. Einige Autoren beschreiben eine Interaktion mit depolarisierenden Strömen, wie dem Natriumkanal (Carmeliet et al. 1976, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971) und/oder Calciumkanal (Mironneau et al. 1975, Shiga et al. 2005). Neuere Studien beschreiben Droperidol als potenten I_{Kr} Blocker. Des Weiteren konnte eine Interaktion mit I_{Ks} ausgeschlossen werden. wurde in linksventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens konzentrationsabhängige Wirkung auf die Aktionspotentialdauer beobachtet (Drolet et al. 1999, niedrigen Konzentrationen verlängert Droperidol et al. 2007). In Aktionspotentialdauer, in höheren Konzentrationen verkürzt Droperidol die Aktionspotentialdauer (Abbildung 9).

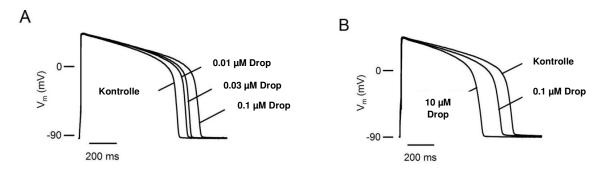


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Wirkung von Droperidol

A: Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Droperidol in Konzentrationen von $0.01\text{-}0.1~\mu\text{M}$. In diesem Konzentrationsbereich verlängerte Droperidol die Aktionspotentialdauer. **B:** Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Droperidol $10~\mu\text{M}$ und $1~\mu\text{M}$. In diesen Konzentrationen verkürzte Droperidol das Aktionspotential. V_m = Membranpotential; Drop = Droperidol. Abbildung modifiziert nach (Schwoerer et al. 2007).

Diese konzentrationsabhängige Wirkung lässt vermuten, dass Droperidol neben der hERG-Blockade noch einen weiteren Ionenkanal oder Transporter beeinflusst. Ob es sich hierbei, wie schon von einigen Autoren vermutet, um depolarisierende Ströme wie I_{Ca-L} oder I_{Na} handelt, konnte bisher noch nicht geklärt werden; genausowenig, welchen Einfluss die Substanz auf die kardiale Repolarisation ausübt. Sicher ist nur, dass die Wirkung von Droperidol komplex ist und die Substanz mit mehreren Ionenkanälen interagiert.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Droperidol gilt für LQTS-Patienten aufgrund seiner Eigenschaft, die QT-Zeit zu verlängern, prinzipiell als kontraindiziert. Als I_{Kr} blockende Substanz verzögert Droperidol die kardiale Repolarisation und verlängert die Aktionspotentialdauer. Eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer kann die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen und TdP begünstigen. Es wird angenommen, dass Droperidol bei LQTS-Patienten zu einer exzessiven Verlängerung der QT-Zeit führt und die Entstehung von TdP-Arrhythmien begünstigt. Die tatsächliche Kardiotoxizität von Droperidol bei LQTS-Patienten ist jedoch unbekannt. Hierüber existieren keine experimentellen Studien. Auch ist noch ungeklärt, ob mögliche subtypspezifische Effekte bestehen.

Für I_{Ks} blockende Substanzen wurde bereits ein subtypspezifischer Effekt im LQTS-Modell beschrieben. Bei ihrer Verwendung stellte das LQTS2-Modell (reduzierter I_{Kr}) ein höheres Risiko für die Ausbildung von Arrhythmien dar als das LQTS1-Modell (reduzierter I_{Ks}) (Odening et al. 2008). Als mögliche Erklärung für diese Versuche gilt, dass bei der Applikation von I_{Ks} Blockern in das LQTS2-Modell neben der pathologischen I_{Kr} Reduktion zusätzlich medikamentös I_{Ks} , die zweite Komponente von I_{Ks} blockiert wird. In diesem Modell wären dann beide Komponenten von I_{Ks} blockiert, was zu einer exzessiven Verlängerung der Aktionspotentialdauer führen könnte und die Entstehung von EADs und TdP begünstigt. Im LQTS1 ist I_{Ks} nahezu vollständig reduziert. Die Applikation von I_{Ks} Blockern würde hier keine größeren Effekte mehr bewirken, zudem in diesem Modell immer noch I_{Kr} unbeeinflusst bliebe und I_{Ks} möglicherweise kompensieren könnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse und Erklärungen ist anzunehmen, dass auch Droperidol, als potenter I_{Kr} Blocker, im LQTS-Modell einen subtypspezifischen Effekt zeigt. Im LQTS1-Modell würde Droperidol zu der bestehenden I_{Ks} Blockade eine zusätzliche I_{Kr} Blockade bewirken, wodurch die kardiale Repolarisation erheblich verzögert werden würde. Das LQTS2 ist durch eine pathologische I_{Kr} Blockade charakterisiert. Da auch Droperidol I_{Kr} blockiert, wäre hier nur eine Komponente des I_{K} betroffen. Daraus folgend würde Droperidol im LQTS1-Modell einen stärkeren Effekt auf die Aktionspotentialdauer ausüben als im LQTS2-Modell (Aiba et al. 2005). Da bisher die zelluläre Wirkung von Droperidol nicht eindeutig identifiziert wurde und die Substanz wie oben beschrieben auch Effekte auf depolarisierende Ionenaustauschsysteme wie z.B. den Natrium- oder Calciumkanal ausübt, würde bei relevanter Blockade dieser Kanäle möglicherweise eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer im LQTS2-Modell zu erwarten sein. Somit könnten diese bisher nicht näher charakterisierten Effekte in den LQTS-Modellen demaskiert werden.

Aufgrund dieser genannten Überlegungen waren die Ziele der vorliegenden Arbeit

- 1. die zelluläre Wirkung von Droperidol in gesunden Kardiomyozyten näher zu identifizieren und
- 2. die Effekte von Droperidol in Kardiomyozyten mit LQTS1, LQTS2 und LQTS3 auf eine Subtypspezifität zu prüfen.

Um diesen Zielen nachzukommen, wurden isolierte linksventrikuläre Myozyten des Meerschweinchens und die Patch-Clamp-Technik eingesetzt. Es wurden zunächst die Effekte von Droperidol auf das Aktionspotential in gesunden Kardiomyozyten ermittelt und anschließend die Wirkung der Substanz in den pharmakologisch induzierten LQTS-Modellen. Eine Verlängerung des Aktionspotentials kann zur Abschätzung des Risikos von Arrhythmieauftreten herangezogen werden. Eine Zunahme der Aktionspotentialdauer wurde daher einem erhöhten Arrhythmogenitätsrisiko zugeschrieben.

Um die Relevanz weiterer Ionenkanalinteraktionen von Droperidol zu demaskieren und analysieren, wurden in silico-Versuche durchgeführt. Dabei wurde die computergestützte Simulation nach dem Luo-Rudy-dynamic-Modell angewendet (Luo & Rudy 1991, Schwoerer et al. 2007, Siebrands et al. 2006,).

2. MATERIAL UND METHODIK

In der vorliegenden Arbeit wurden in vitro Patch-Clamp-Versuche an Einzelzellen und eine computergestützte Simulation nach dem Luo-Rudy-dynamic-Modell durchgeführt. In den in vitro Versuchen sollte der Effekt von Droperidol auf das linksventrikuläre Aktionspotential unter physiologischen Bedingungen und in den LQTS-Modell 1-3 untersucht werden. Hierfür wurden isolierte linksventrikuläre Myozyten von männlichen **Dunkin-Hartley** Meerschweinchen eingesetzt. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurden zunächst Aktionspotentiale unter physiologischen Bedingungen gemessen und anschließend unter dem Einfluss von Droperidol. Um den Effekt von Droperidol in den LQTS-Modellen zu analysieren, wurde in die isolierten Kardiomyozyten pharmakologisch das LQTS1-, LQTS2und LQTS3-Modell induziert. Verwendet wurden der selektive I_{Ks} Blocker Chromanol 293B (LQTS1), der selektive I_{Kr} Blocker E4031 (LQTS2) und das Alkaloid Veratridin, welches spannungsabhängige Natriumkanäle (I_{Na}) öffnet und deren Inaktivierung aufhebt (LQTS3). Anschließend wurde eine computergestützte Simulation nach dem Luo-Rudy-dynamic-Modell durchgeführt, um molekulare Ziele von Droperidol und eine mögliche subtypspzifische Wirkung der Substanz im LQTS-Modell näher zu identifizieren.

2.1. Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten

Alle Experimente wurden an Kardiomyozyten von männlichen Dunkin-Hartley Meerschweinchen (343 ± 18 g Gewicht, n=29, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Für sämtliche Versuche lagen von den jeweils zuständigen Behörden entsprechende Genehmigungen vor. Die Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten basierte auf der von Tytgat (Tytgat 1994) publizierten Methode.

2.1.1. Herzentnahme

Die Meerschweinchen wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Thiopental-Natrium (200 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Herz über eine Sternotomie zügig entnommen und in eine eiskalte modifizierte Tyrode (T-) überführt. Diese verhinderte das Weiterschlagen des Herzens nach wenigen Schlägen. Das Herz wurde vom umgebenden Perikard, Binde- und Fettgewebe befreit, die Aorta freipräpariert, in Höhe des Aortenbogens eröffnet und mittels einer Glaskanüle kanüliert (Abbildung 10).

2.1.2. Zellisolation

Mit der Glaskanüle wurde das Herz dann freihängend unter Verwendung einer Langendorff-Apparatur montiert und sofort mit 50 ml *Tyrode T*- (Heparin 1000 I.E.) retrograd durchströmt. Anschließend wurde die Aorta für fünf Minuten mit *Tyrode T*- perfundiert. Es folgte eine

Perfusion für weitere 12 Minuten mit 25 ml Tyrode T-, die zusätzlich Kollagenase (200 U/ml) und Protease (0.7 U/ml; Enzymlösung) enthielt. Die Enzymlösung wurde in diesen 12 Minuten mehrmals rezirkuliert. Um den Verdauungsprozess zu stoppen, wurde anschließend für fünf Minuten mit $Tyrode\ T$ + perfundiert. Alle Lösungen hatten eine Temperatur von 37 °C und waren mit $100\ \%$ O₂ äquilibriert.

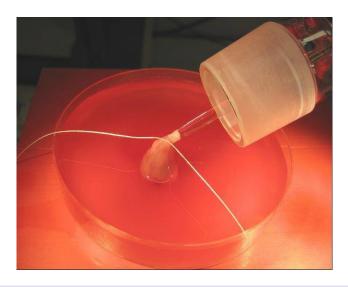


Abbildung 10: Abbildung einer kanülierten Aorta mit Herz
Nach dem Verdauungsprozess an der Langendorff-Apparatur wurde das Herz in *Tyrode T+* abgelegt.

Daraufhin wurde das Herz von der Kanüle getrennt und in *Tyrode T*+ abgelegt. Anschließend wurde es entlang des Septums in zwei Hälften geteilt, der linke Ventrikel eröffnet und Gewebeproben aus der Wand des linken Ventrikels gewonnen.

2.1.3. Zellseparation

Die Gewebeproben wurden in ein kleines Becherglas mit *Tyrode T*+ überführt und durch weiteres Zupfen und sanftes Schwenken im Wärmebad aus ihrem Zellverband gelöst. Nach einer groben Filtration durch Mullkompressen (Mullkompressen Set, 10x10 cm, 12-fach, steril, Fuhrmann Verbandstoffe GmbH) wurden die Zellen in *Tyrode T*+ zum Absetzen ca. 1 Stunde aufbewahrt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Behältnis mit Badlösung aufgefüllt. Für die elektrophysiologischen Versuche wurden Myozyten mit deutlicher Querstreifung und ohne spontane Kontraktion verwendet.

2.2. Die Patch-Clamp-Technik

1976 entwickelten Erwin Neher und Bert Sakmann aus Göttingen die Patch-Clamp-Technik (patch = Membranfleck, clamp = Klemme) (Neher & Sakmann 1976). Dieses Verfahren ermöglichte es erstmals, den Stromfluss von Ionen im Bereich von Picoampere (pA) durch einzelne Kanäle in der Zellmembran zu messen. Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine saubere Glaspipette (Patchpipette) mit einer Elektrolytlösung (Pipettenlösung) gefüllt und mit Hilfe eines Mikromanipulators vorsichtig in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks saugt sich die Pipettenspitze an der Zellmembran fest und isoliert den darunter liegenden Membranfleck elektrisch von seiner Umgebung. Liegt der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran im Bereich mehrerer Gigaohm (G Ω), so spricht man von einem Gigaseal. Erst eine Abdichtung im Gigaseal Bereich ermöglicht die Registrierung von Stromsprüngen, welche durch einzelne Schaltvorgänge von Ionenkanälen verursacht werden. Die mechanische Belastbarkeit einer solchen Verbindung zwischen Pipette und Zelle ist so hoch, dass Messungen an Herzmuskelzellen durchaus über einen Zeitraum von einer halben Stunde stabil vorgenommen werden können.

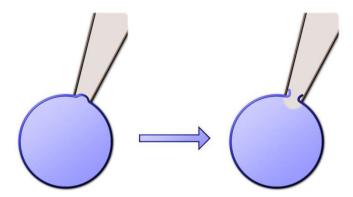


Abbildung 11: Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Nach Anlegen eines leichten Unterdrucks und Bildung eines Gigaseals befindet sich die Zelle in der Cell-Attached-Konfiguration (links). Mittels kurzen Über- oder Unterdruckimpulsen wird die Zellmembran zerstört (Ruptured-Patch-Technik) und es entsteht ein Zugang von der Pipette zur Zelle (rechts, Whole-Cell-Konfiguration). Abbildung modifiziert nach (Hamil et al. 1981).

Nach Erreichen einer elektrischen Abdichtung durch Herstellung eines Gigaseals befindet sich die Zelle in der so genannten Cell-Attached-Konfiguration. Die Cell-Attached-Konfiguration ist die Ausgangsposition für die Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzellkonfiguration) (Hamil et al. 1981). Um von der Cell-Attached-Konfiguration zu der Whole-Cell-Konfiguration zu gelangen, muss die Pipette Zugang zur Zelle durch die Zellmembran bekommen (Abbildung 11). Die übliche Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, um eine Ganzzellableitung zu erlangen, ist die Ruptured-Patch-Technik. In der Cell-Attached-Konfiguration wird zuerst die Zellmembran durch einen kurzen Strompuls destabilisiert und dann der Membranfleck unter der Patchpipette durch vorsichtige Applikation von Über- oder Unterdruckimpulsen mechanisch zerstört. In der Whole-Cell-Konfiguration besteht ein direkter elektrischer Kontakt zwischen Pipetteninnenraum und dem Zellinneren. Da das Volumen der Patchpipette sehr viel größer ist als das der Zelle, kommt es darüber hinaus zu einem Lösungsaustausch, wobei Elektrolytzusammensetzung in der Zelle nach kurzer Zeit praktisch der der verwendeten Pipettenlösung entspricht. In der Whole-Cell-Konfiguration können Ströme gemessen werden, die

über die gesamte Zellmembran fließen. Des Weiteren kann das Zellmembranpotential bestimmt und verändert werden.

2.2.1. Voltage-Clamp und Current-Clamp

Ist ein elektrischer Zugang zur Zelle gebildet, wird generell zwischen zwei elektrischen Registrierkonfigurationen unterschieden: Bei der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) wird das Membranpotential festgelegt (geklemmt) und die Ströme, die für die Aufrechterhaltung dieses Potentials notwendig sind, aufgezeichnet. Bei der Stromklemme (Current-Clamp) hingegen wird der Gesamtstromfluss über die Zellmembran vorgegeben und das resultierende Membranpotential registriert. Als Sonderfall gilt die sogenannte Nullstromklemme. Hierbei wird der Gesamtstrom über die Zellmembran auf 0 pA geklemmt. Das dabei registrierte Membranpotential entspricht weitgehend dem Ruhemembranpotential (Hamil et al. 1981).

2.2.2. Elektrische Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration

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

Der Serienwiderstand (R_s) entspricht dem zwischen dem Silberdraht der Messelektrode und dem im Zytosol zu findenden elektrischen Widerstand. Idealerweise ist dieser genauso groß wie der elektrische Widerstand der Pipette (R_{pip}). Beim Rupturieren der Zelle können jedoch Membranbestandteile und auch Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette gelangen, so dass sich der Zugangswiderstand meist auf das zwei- bis dreifache des Pipettenwiderstandes erhöht. Darüber hinaus kann sich der R_s im Verlauf des Versuches ändern und muss daher ständig kontrolliert werden. Durch gezielte vorsichtige Überdruckimpulse ist es möglich, die Pipettenspitze von Membranpartikeln und Organellen "freizuräumen" und so einen erhöhten R_s wieder zu senken.

In Reihe zum Serienwiderstand liegt der Membranwiderstand R_m , so dass für den Gesamtwiderstand R_{ges} insgesamt gilt:

$$R_{ges} = R_s + R_m$$
.

Für die an der Membran effektiv anliegende Spannung V_m gilt dementsprechend (mit V_s als der am Serienwiderstand abfallenden Spannung):

$$V_m = V_{pip} - V_s$$
.

Nur für den Fall, dass R_s deutlich kleiner ist als R_m kann man davon ausgehen, dass der größte Teil der Kommandospannung an der Membran abfällt und das Zellmembranpotential tatsächlich V_{pip} entspricht. Steigt R_s hingegen stark an, so fällt die Kommandospannung in zunehmendem

Maße daran ab und V_m weicht immer mehr von V_{pip} ab, wodurch es zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse kommen kann. Somit wurden nur Zellen mit einem niedrigen R_s ($\leq 10~M\Omega$) für die Versuche verwendet.

2.3. Der Patch-Clamp-Messplatz (Setup)

2.3.1. Mikroskop und Videotechnik

Um die Pipettenspitze präzise auf die Zellmembran aufsetzen zu können, ist eine gute Optik essentiell. Hierfür wurde ein inverses Lichtmikroskop (Axiovert 25C, Zeiss) verwendet. Durch dieses wurde die Versuchskammer von oben beleuchtet. Die Objektive wurden von unten an die Versuchskammer herangeführt. Zur besseren Darstellung der Zelloberflächen wurden Varelkontrast-Objektive von Zeiss verwendet, die zusammen mit 10-fach vergrößernden Okularen eine 100- bzw. 400-fache Vergrößerung erlaubten. Das Mikroskop war mit einem Kreuztisch ausgestattet, der über einen Zweiachsenmanipulator innerhalb einer Ebene in zwei Richtungen bewegt werden konnte. Im Kreuztisch befand sich die Versuchskammer. Eine an das Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera (Sony) ermöglichte es, während des Versuches über einen Monitor die Zelle zu beobachten.

2.3.2. Der Messtisch und mechanische Komponenten

2.3.2.1. Messtisch und Käfig

Da selbst die geringsten Bewegungen zwischen Präparat und Pipette den Zugang zur Zelle zerstören können, muss der Messplatz von mechanischen Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung abgeschirmt werden. Dazu wurde der Versuchsstand auf einem Luftkissen gelagerten, welcher auf einem schwingungsgedämpften Steintisch (T-250, Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland) aufgebaut war. Auf dem schwingungsgedämpften Tisch waren Mikroskop, Mikromanipulator, Pipettenhalter und Vorverstärker aufgebaut. Um die Messapparatur gegen elektromagnetische Felder der Umgebung zu schützen, wurde der Versuchsstand von einem Faradaykäfig aus Eisen umgeben, der getrennt vom schwingungsgedämpften Tisch auf einem festen Übertisch stand. Eine Übersicht über das gesamte Setup illustriert Abbildung 12.



Abbildung 12: Darstellung des Setups

Faraday-Käfig (1), Mikromanipulator mit Vorverstärker und Pipettenhalterung (2), inverses Mikroskop (3), Versuchskammer (4), Schlauchsystem zum Perfusionssystem (5), Glasspritze zur Erzeugung eines Über- bzw. Unterdrucks (6), schwingungsgedämpfter Tisch (7), Steuerung Mikromanipulator (8).

2.3.2.2. Mikromanipulator

Um die Patchpipette präzise auf die nur wenige Mikrometer große Zelle aufsetzen zu können, wurde ein motorisierter Mikromanipulator (HS6/3 Märzhäuser) verwendet. Dieser war an dem Vorverstärker montiert. Über einen Joystick konnte der Mikromanipulator gezielt in alle Richtungen gesteuert werden.

2.3.2.3. Pipettenhalter

Die Pipette wurde in einen Pipettenhalter (HEKA Elektronic, Lambrecht, Deutschland) eingesetzt, der direkt am Vorverstärker befestigt war. In ihm wurde die Pipette sicher und stabil fixiert. An den seitlichen Eingang des Pipettenhalters war ein Schlauch angeschlossen, über den man sowohl mittels einer Glasspritze als auch eines Mundstückes Über- und Unterdruck im Pipetteninneren anlegen konnte. Die Druckmessung erfolgte dabei über ein flüssigkeitsgefülltes, u-förmiges Glasrohr.

2.3.2.4. Versuchskammer

Die kreisförmige Versuchskammer (Abbildung 13 (1); Eigenbau der Werkstatt) hatte einen Durchmesser von circa 2 cm und war 4 mm hoch. Der Boden der Kammer bestand aus einem

angeklebten Deckglas. In der Wand der Messkammer befanden sich zwei Aussparungen für Zuund Ablauf. Eine von diesen wurde als Zulauf (2) für die Applikation von Testsubstanzen und Badlösungen verwendet. Innerhalb der Versuchskammer befanden sich jeweils eine Referenzelektrode (3) sowie Absaugpipette (4) und Temperatursonde (5).



Abbildung 13: Darstellung der Versuchskammer

Versuchskammer (1), Zulauf (2), Referenzelektrode (3), Absaugpipette mit Halterung (4), Temperatursonde mit Halterung (5), Pipettenhalter mit Patchpipette (6), Vorverstärker (7).

2.3.3. Kammerperfusion und Temperaturregulierung

Für die pharmakologische Applikation in den Experimenten wurde die gesamte Badlösung in der Kammer in wenigen Sekunden ausgetauscht. Dies wurde mittels eines computergesteuerten Perfusionssystems (Octaflow TM, ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY, USA) gesteuert. Das Perfusionssystem bestand aus maximal acht 60 ml Vorratsbehältern, aus denen die Zufuhr von Badlösungen unter konstanter Fließgeschwindigkeit der Zellkammer zugeführt werden konnte. Der Flüssigkeitspegel in der Versuchskammer wurde über eine Absaugpipette eingestellt. Dazu wurde die Absaugung so positioniert, dass sie sich leicht oberhalb des gewünschten Flüssigkeitspegels befand. Wurde über den Zulauf eine Badlösung appliziert, so stieg der Flüssigkeitspegel in der Messkammer, überflüssige Badlösung wurde abgesaugt.

Die Temperaturregulierung erfolgte 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 des Kammerzuflusses über eine Perfusionsheizung (HPT-2A Heated Perfusions Tube, ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, USA) reguliert werden. Die Temperatur in der Versuchskammer konnte so auch unter Zufluss annährend konstant bei 36 °C gehalten werden.

2.3.4. Elektronische Komponenten

Der Patch-Clamp-Verstärker besteht in der Regel aus einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker. Der Vorverstärker misst das Stromsignal und wandelt es in eine Messspannung um. Der nachgeschaltete Hauptverstärker kann diese Spannung weiter verstärken und filtern und dient außerdem als Steuereinheit. Zur Anwendung kam bei diesen Versuchen der EPC-9 (HEKA Elektronic, Lambrecht, Deutschland). Er wurde digital von einem Apple Power Macintosh 9500/200 angesteuert. Die Steuer- und Auswertesoftware ("Pulse", HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) erlaubte die Sicherung der gewonnenen Versuchsdaten in Echtzeit auf die Festplatte.

Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid-Pellet und wurde in die Versuchskammer getaucht. Die Messelektrode des Vorverstärkers bestand aus einer Silber/Silberchlorid-Messelektrode, die zuvor in einer 100 mmol/l KCl-Lösung chloriert wurde. Sie wurde von hinten in die Patchpipette eingeführt.

2.3.5. Die Patch-Pipetten

Die verwendeten Patch-Pipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät, Modell Flaming/Brown P-97 (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA) aus 7.5 cm langen Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von 1.5 mm und einem Innendurchmesser von 0.86 mm gezogen (GC150-15, Clark Elektromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd. England). Das Ziehgerät war über die Parameter Heiztemperatur, Zuggeschwindigkeit, Zugkraft und Anzahl der Ziehstufen programmierbar. Die Kapillaren wurden horizontal in das Ziehgerät eingespannt, durch einen mittig angebrachten Heizdraht aus Platinlegierung erhitzt, dadurch erweicht und gleichzeitig gezogen. Erreichte die Ausziehgeschwindigkeit den eingestellten Maximalwert, wurde der Zug unterbrochen und die Kapillare abgekühlt. Daraufhin begann der nächste Zyklus mit erneutem Erhitzen. Nach sieben Durchgängen riss die Kapillare auseinander und es entstanden zwei circa 4 cm lange, an der Spitze dünn ausgezogene Kapillaren, die Patch-Pipetten. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die Pipettenspitze mittels eines Heizdrahtes unter dem Mikroskop (Leitz Labor Lux S., Leica) angeschmolzen, um Unebenheiten durch den Ziehvorgang zu beseitigen und so den Abdichtungsvorgang an der Zelle zu erleichtern. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Pipetten mit einem Widerstand von $3.7 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ (n=85) verwendet.

2.4. Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Mit einer Pipette wurden etwa 0.05 ml der Zellsuspension aufgenommen und in die mit einer Badlösung gefüllte Versuchskammer überführt. Nach etwa fünf Minuten hatten sich die Zellen auf dem Kammerboden abgesetzt. Bei 400-facher Vergrößerung wurde dann eine einzelne Zelle ausgewählt, die über die typische Querstreifung verfügte und nicht spontan kontrahierte. Jetzt wurde die Patch-Pipette mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt. Dazu wurde sie auf eine Einwegspritze aufgesetzt und mit angelegtem Unterdruck für einige Sekunden in ein mit Pipettenlösung gefülltes Becherglas eingetaucht. Die Pipettenspitze füllte sich in den vorderen 0.5 mm. Die restliche Pipette wurde von hinten mit einer Spinalkanalpunktionsnadel gefüllt. Dabei eventuell entstandene Luftblasen wurden durch leichtes Klopfen mit den Fingern vorsichtig entfernt. In diesem Zustand wurde die Pipette in den Pipettenhalter eingesetzt. Dabei ragte die Silber/Silberchlorid-Messelektrode ca. 3-4 mm in die Pipettenflüssigkeit hinein. Um die Pipettenspitze vor Verstopfungen durch Schmutzpartikel zu schützen, wurde mittels der Glasspritze ein leichter Überdruck auf die Pipette angelegt, so dass kontinuierlich ein geringer Pipettenlösungsstrom ausfloss.

Unter visueller Kontrolle wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators von oben in das Zellbad gefahren. Nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde zunächst der Nullwert für das Potential festgelegt. Im Computer war nach Eintauchen der Pipette ins Bad eine rechteckförmige Stromantwort auf den Kommandospannungspuls sichtbar. Die Größe des Stromimpulses diente als Maß für die Pipettenöffnung. Die Pipettenspitze wurde nahe an die ausgewählte Zelle herangefahren. Je näher man dabei der Zelloberfläche kam, desto höher wurde der Wert des Pipettenwiderstandes. Dieser konnte am Computer beobachtet werden. Die Pipette wurde sanft auf die Oberfläche der Zelle aufgesetzt. Nach Aufheben des angelegten Überdrucks wurde ein leichter Unterdruck ausgeübt, was im Idealfall zu einer Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit einem Widerstand von >1 G Ω führte. Mit der Herstellung dieses Gigaseals war die Cell-Attached-Konfiguration erreicht. Durch kurze Überdruckimpulse wurde nun die Zellmembran durchbrochen (Ruptured-Patch-Technik) und ein Zugang zum Intrazellulärraum geschaffen (Whole-Cell-Konfiguration). Bei Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (Abbildung 14), wurde im Voltage-Clamp Modus die Zelle auf -90 mV geklemmt. Mit automatischen Routinen des EPC-9 wurden anschließend die Zellkapazität (Cm) und der Zugangswiderstand (R_s) gemessen. C_m lag bei den hier durchgeführten Versuchen im Mittel bei 118 ± 7 pF (n=85), R_s bei 7 ± 2 M Ω (n=85). Anschließend wurde in den Current-Clamp-Modus gewechselt. In diesem Modus wurde das Membranpotential bei vorgegebener Stromstärke gemessen.



Abbildung 14: Darstellung einer Kardiomyozyte 400-fache Vergrößerung einer Kardiomyozyte während eines Patch-Clamp-Versuches im Whole-Cell-Modus. Deutlich zu erkennen ist die Querstreifung der Zelle.

2.4.1. Das Versuchsprotokoll

2.4.1.1. Auslösung von Aktionspotentialen

Im Current-Clamp-Modus wurde zunächst das Schwellenpotential für die Auslösung von Aktionspotentialen bestimmt. Dabei wurden durch zunehmende Rechteckstrominjektionen mit einer maximalen Stromstärke von 1000 pA, einer maximalen Länge von 10 ms und einer Frequenz von 0.5 Hz Depolarisationen der Zellmembran ausgelöst. War der Reizstrom zu schwach (Abbildung 15A), führte dies lediglich zu einer lokalen Antwort, während bei Erreichen des Schwellenpotentials als Reizantwort der Zelle ein Aktionspotential ausgelöst wurde (Abbildung 15B). Nach Bestimmung des Schwellenpotentials wurden unter Zufluss der Badlösung Aktionspotentiale über den gesamten Zeitraum des Versuches ausgelöst. Die Reizstromstärke betrug circa das 1.5 fache des Schwellenreizes. Die Dauer der Aktionspotentiale wurde bei 90 % der Repolarisation gemessen (APD₉₀).

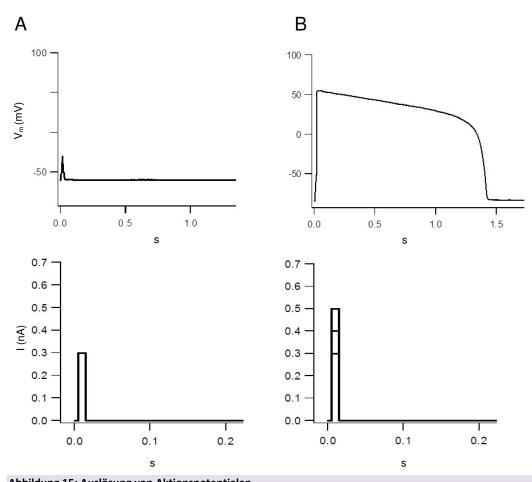


Abbildung 15: Auslösung von Aktionspotentialen

Oben: Zu den Reizströmen gehörende repräsentative Reizantworten. Unten: Pulsprotokolle. A: Eine Strominjektion bei 300 pA über 10 ms führte lediglich zu einer lokalen Antwort in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens. B: Eine Strominjektion bei 500 pA über 10 ms löste ein Aktionspotential aus. I = Stromgröße, V_m= Membranpotential, mV = Millivolt, nA = Nanoamper, S = Sekunden.

2.4.1.2. Regulierung der Temperatur

Alle Versuche wurden annähernd bei physiologischer Temperatur (36 °C) durchgeführt. Hierfür wurde ein Temperaturkontrollsystem (TC-20, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verwendet, mit welchem es möglich war, die Temperatur des Badzuflusses und des Zellbades festzulegen und annähernd konstant zu halten. Nachdem die Aktionspotentiale durch Bestimmung des Schwellenpotentials erfolgreich ausgelöst werden konnten, wurde die Temperatur des Zellbades mittels Bad- und Perfusionsheizung auf 36 °C geregelt. Abbildung 16 zeigt, dass mit zunehmender Temperatur die Aktionspotentialdauer kürzer wurde. Der Zustand, in dem die Aktionspotentialdauer und die Temperatur beide einen konstanten Wert besitzen, wird als "steady-state-condition" bezeichnet. Im steady-state wurden mindestens 30 Aktionspotentiale unter Zufluss der Badlösung aufgezeichnet. Diese stellten die Aktionspotentialdauer unter Kontrollbedingungen dar. Die Temperatur eines Versuchs entspricht dem arithmetischen Mittel aus 30 Messpunkten, die zu dem Zeitpunkt der Auslösung des Aktionspotentials gemessen wurde. Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 36.2 °C (n = 85) durchgeführt. Nur Versuche mit Temperaturschwankungen ≤ 0.5 °C wurden in die Wertung mit einbezogen.

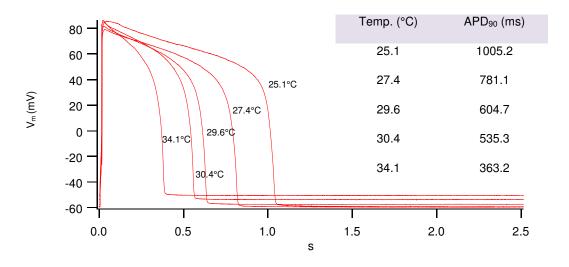


Abbildung 16: Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer von der Temperatur

Aktionspotentiale ausgelöst mit einer Reizstromstärke von 400 pA über 10 ms in unterschiedlichen Temperaturbereichen. Bei einer Temperaturerhöhung von 9.2 °C verkürzte sich die APD₉₀ ausgehend von 1005 ms auf 363 ms (36 %). APD₉₀ = Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation, Temp. = Temperatur, mV = Millivolt, S = Sekunden, ms = Millisekunden.

2.4.1.3. Applikation der Substanzen

Alle Substanzen wurden über das Perfusionssystem OctaflowTM dem Bad jeweils zugeführt. Nach drei Minuten Einwaschzeit wurden im steady-state mindestens 30 Aktionspotentiale in Folge während des Zuflusses aufgezeichnet.

2.4.1.3.1. Droperidol

Um den Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer zu untersuchen, wurde die Substanz sowohl in Versuchsreihen mit nativen Kardiomyozyten als auch in Versuchsreihen mit pharmakologisch induziertem LQTS eingewaschen. In den nativen Kardiomyozyten wurde Droperidol zunächst in verschiedenen Konzentrationen (0.1, 0.3, 0.6, 1 μ M) angewendet, um mögliche konzentrationsabhängige Effekte auf die Aktionspotentialdauer zu erkennen. Eine Konzentration um 0.6 μ M entspricht einer antiemetischen Dosierung (Schwoerer et al. 2007). In dieser Konzentration entspricht die hERG Inhibition maximal 50 % (Drolet et al. 1999). Es wurden maximal drei verschiedene Konzentrationen pro Versuch appliziert. Anschließend wurde die Konzentration mit maximaler Verlängerung der Aktionspotentialdauer für weitere Versuchsreihen in den LQTS-Modellen ausgewählt.

Für die Versuche wurde Droperidol in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend mit der Standardbadlösung in die genannten Konzentrationen gebracht. Vorherige Versuche zeigten, dass DMSO keine Auswirkung auf das Aktionspotential ausübt (Schwoerer et al. 2007).

Die Substanz wurde über das Perfusionssystem dem Bad zugeführt. Nach drei Minuten Einwaschzeit und erfüllten steady-state Konditionen wurden mindestens 30 Aktionspotentiale während des Zuflusses der Substanz aufgenommen. Diese geben die Aktionspotentialdauer unter

Einfluss von Droperidol wieder. In Abbildung 17 wird die beschriebene Versuchsreihe 1 veranschaulicht.

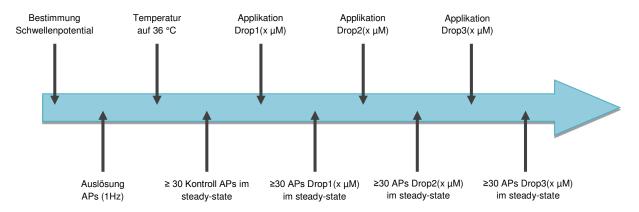


Abbildung 17: Versuchsreihe 1: Droperidol in verschiedenen Konzentrationen

Der blaue Pfeil stellt den Ablauf einer Versuchsreihe dar. Nach Bestimmung des Schwellenpotentials wurden Aktionspotentiale in einer Frequenz von 1 Hz ausgelöst und die Temperatur im Bad auf 36 °C reguliert. Unter steady-state Bedingungen wurden \geq 30 Kontroll-Aktionspotentiale aufgezeichnet. Anschließend wurde Droperidol in einer beliebigen Konzentration x μ M eingewaschen (3 Min) und \geq 30 Aktionspotentiale aufgezeichnet. Maximal drei verschiedene Konzentrationen wurden pro Versuch appliziert. AP = Aktionspotential; Drop = Droperidol.

2.4.1.3.2. Pharmakologische Induktion der LQTS-Modelle

Um das LQTS1-Modell pharmakologisch zu induzieren, wurde der selektive I_{Ks} Blocker Chromanol 293B verwendet (Aiba et al. 2005, Bosch et al. 1997, Shimizu & Antzelevitch 1998, Shimizu & Antzelevitch 2000, Yang et al. 2004). Für die Versuche wurde Chromanol 293B in DMSO gelöst und mit der Standardbadlösung (Tabelle 4) auf eine Konzentration von 10 μ M gebracht. Mit der Substanz Chromanol 293B wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Um den Effekt von Chromanol 293B auf die Aktionspotentialdauer zu erkennen, wurde die APD $_{90}$ unter Kontrollbedingungen mit der APD $_{90}$ nach Applikation von Chromanol 293B verglichen (Versuchsreihe 2). Um die Wirkung von Droperidol im LQTS1-Modell zu erkennen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe zunächst Chromanol 293B appliziert und nach Sicherstellung, dass das LQTS1-Modell erfolgreich etabliert wurde, Chromanol 293B ($10~\mu$ M) + Droperidol ($0.6~\mu$ M) appliziert (Versuchsreihe 3). Die APD $_{90}$ unter Kontrollbedingungen wurde mit der APD $_{90}$ nach Applikation von Chromanol 293B und Chromanol 293B + Droperidol verglichen.

Um das LQTS2-Modell pharmakologisch zu induzieren, wurde der selektive I_{Kr} Blocker E4031 appliziert (Aiba et al. 2005, Davie et al. 2004, Mitcheson & Hancox 1999, Sanguinetti & Jurkiewicz 1990, Sanguinetti et al. 1991). Für die Versuche wurde E4031 in H_2O gelöst und mit der Standardbadlösung auf eine Konzentration von $10~\mu M$ gebracht. Analog zum LQTS1-Modell wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: Versuchsreihe 4: E4031 ($10~\mu M$) und Versuchsreihe 5: E4031 ($10~\mu M$) + Droperidol ($0.6~\mu M$).

Um das LQTS3-Modell zu induzieren, wurde das Alkaloid Veratridin (Gerhardy et al. 1998, Milberg et al. 2005, Sunami et al. 1993, Ulbricht 1998) verwendet. Veratridin wurde in DMSO gelöst und durch Hinzugabe der Standardbadlösung auf eine Konzentration von 0.5 µM gebracht. Es wurden ebenfalls zwei Versuchsreihen durchgeführt: Versuchsreihe 6: Veratridin (0.5 µM) und

Versuchsreihe 7: Veratridin $(0.5 \mu M)$ + Droperidol $(0.6 \mu M)$. Die Versuchsreihen wurden analog zu der, wie in Abbildung 17 dargestellten, durchgeführt.

2.5. Auswertung der Experimente

Alle Messdaten wurden während der Versuche von der Steuersoftware des EPC-9 PULSE (Heka Electronic, Lambrecht, Deutschland) auf der computerinternen Festplatte gespeichert und konnten später zur Auswertung mit Hilfe der Software PULSE FIT (Heka Electronic, Lambrecht, Deutschland) dargestellt werden.

Unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss der zu testenden Substanzen wurden jeweils 30 Aktionspotentiale unter steady-state-Bedingungen ausgewählt und zur weiteren Analyse in IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) importiert. Von den jeweils 30 ausgewählten Aktionspotentialen wurden folgende Parameter gewählt, um die Effekte auf das Aktionspotential zu analysieren: das Ruhemembranpotential (V_m), der Overshoot, die Aktionspotentialamplitude (APA), die Aktionspotentialdauer bei 50 % und 90 % der Repolarisation (APD $_{50}$, $_{90}$) und die Temperatur. Diese Werte wurden in EXCEL (Microsoft Corporation, Redmond, USA) importiert und weiter analysiert. V_m gibt das Potential zu Beginn des Aktionspotentials an (Ruhemembranpotential). Da hierfür hauptsächlich der einwärtsgleichrichtende Kaliumstrom I_{K1} verantwortlich ist, kann der Wert V_m zur Einschätzung der Funktionsfähigkeit von I_{K1} verwendet werden. Der Overshoot im Aktionspotential steht für den Wert, bis zu dem eine Potentialumkehr ins Positive während des Aufstrichs in Phase 0 stattfindet. Da dieser Aufstrich durch den schnellen Natriumeinwärtsstrom I_{Na} zustande kommt, gibt er Auskunft über dessen Funktion. Die APA ist die Differenz aus Overshoot und V_m .

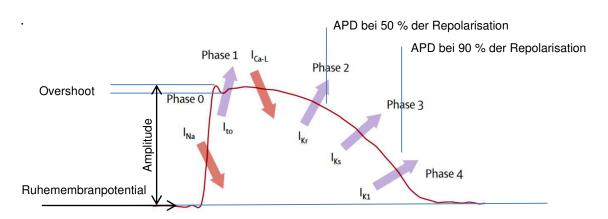


Abbildung 18: Aktionspotential mit den ausgewählten Analyseparametern

Ruhemembranpotential, Amplitude, Overshoot, APD bei 50 % der Repolarisation und APD bei 90 % der Repolarisation. Abbildung modifiziert nach (Morita et al. 2008).

2.5.1. Statistik

Alle angegebenen Werte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten, Abweichungen werden als Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Für die statistische Auswertung sowie für die Erstellung von Abbildungen wurde PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Signifikanzen wurden unter Verwendung einer gepaarten ANOVA oder eines zweiseitigen Students t-test berechnet. Als signifikant wurden dabei Unterschiede mit p<0.05 gewertet. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit p gilt dabei: *=p<0.05; **p<0.01;***=p<0.001.

2.6. Computergestützte Simulation

1991 veröffentlichten Luo und Rudy ein mathematisches Modell zur Simulation von ventrikulären Aktionspotentialen des Meerschweinchens (Luo & Rudy 1991). Es basiert auf Einzelzell- und Einzelkanalmessungen und ist im weiteren Verlauf zu einem dynamischen Computerzellmodell erweitert worden, dem Luo-Rudy-dynamic- Modell (Luo & Rudy 1994). Mit diesem Programm ist es möglich, Aktionspotentiale unter anderem unter Veränderung der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle sowie Regulation der intra- bzw. extrazellulären Ionenkonzentration zu simulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse aus den Patch-Clamp-Experimenten in eine modifizierte Version des Lou-Rudy-dynamic-Modells transferiert, um mögliche Erklärungen für die in den Versuchen beobachteten Aktionspotential-Veränderungen aufzudecken.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen betreffen das Midmyokard, die Stimulationsfrequenz betrug 4 Hz. Entsprechend den elektrophysiologischen Gegebenheiten des Meerschweinchenherzens wurde der transiente Auswärtsstrom I_{to} auf null gesetzt. Unter einer Simulation von 2000 Aktionspotential-Zyklen waren die letzten 10 Zyklen nahezu identisch. Es wurden die Mittelwerte angegeben.

2.7. Chemikalien und Lösungen

2.7.1. Versuchslösungen für die Zellisolation

Tabelle 3: Lösungen / Zellisolation					
Bezeichnung	Bestandteile (mM)	рН	titriert mit		
Modifizierte Tyrode (T-) (Ca ²⁺ -frei)	$NaCl 138$, KCl 4, $MgCl_2 1$, $NaH_2PO_4 0.33$, Glukose 10, HEPES 10	7.30	NaOH		
Modifizierte Tyrode (T+) (mit CaCl ₂ angereichert)	NaCl 138, KCl 4, MgCl ₂ 1, NaH ₂ PO ₄ 0.33, Glukose 10, HEPES 10, CaCl ₂	7.30	NaOH		
Enzymlösung (25ml)	Tyrode (T-) + 13E Protease + 4180 E Kollagenase				

2.7.2. Versuchslösungen für die Patch-Clamp-Experimente

	Tabelle 4: Lösungen / Patch-Clamp-Ve	ersuche		
Bezeichnung	Bestandteile (mM)	рН	titriert mit	
Pipettenlösung	K-Glutamat 120, KCl 10, MgCl ₂ 2, EGTA 10, HEPES 10, Na ₂ -ATP 2	7.20	КОН	
Standardbadlösung (modifizierte Tyrode)	NaCl 138, KCl 4, MgCl ₂ 1, NaH ₂ PO ₄ 0.33, CaCl ₂ , Glukose 10, HEPES 10	7.30	NaOH	
Badlösung LQTS1	Chromanol 293B gelöst in DMSO, mit der Standardbadlösung auf eine Konzentration von 10 µM gebracht			
Badlösung LQTS2	E4031 gelöst in H ₂ O, mit der Standardbadlösung auf eine Konzentration von 10 μM gebracht			
Badlösung LQTS3	Veratridin gelöst in DMSO, mit der Standardbadlösung auf eine Konzentration von 0.5 μM gebracht			
Badlösung Droperidol	Droperidol gelöst in DMSO, mit der Standardbadlösung auf eine Konzentration von 0.1 µM 0.3 µM, 0.6 µM und 1 µM gebracht			

2.7.3. Herkunft der verwendeten Chemikalien

Tabelle 5: Herkunft verwendeter Chemikalien					
Substanz	Hersteller				
ATP (Natrium-Salz)	SIGMA (A-2383)				
CaCl ₂	Merck				
Chromanol 293B	Tocris				
D-Mannitol	SIGMA (M-9546)				
Droperidol	SIGMA (D-1414)				
E4031	Tocris				
Glukose	Fluka				
Glutamat	SIGMA (H-3375)				
HEPES	SIGMA (P-5147)				
KCI	Merck				
КОН	Merck				
Kollagenase (Typ CLS II, 200U ml ⁻¹)	Biochrom AG				
MgCl ₂	Merck				
NaCl	J.T. Baker				
NaOH	Merck				
Protease (Typ XIV, 0.7 U ml ⁻¹)	SIGMA (P-5147)				
Veratridin	SIGMA (V-5754)				

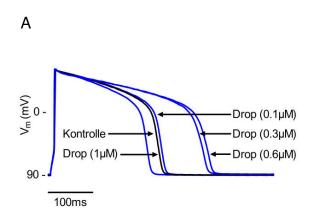
3. ERGEBNISSE

3.1. In vitro Patch-Clamp-Experimente

3.1.1. Der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential

Um die Wirkung von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential in isolierten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde die Substanz unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Konzentrationen appliziert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0.1-1 μM eingesetzt. Vorausgehende Experimente dieser Arbeitsgruppe wurden ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich durchgeführt (Schwoerer et al. 2007). Der gewählte Konzentrationsbereich richtet sich nach der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) für hERG. Bei einer antiemetischen Behandlung eines Patienten kann eine Plasmakonzentration in diesem Bereich erreicht werden (Drolet et al. 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Droperidol einen konzentrationsabhängigen Effekt auf das linksventrikuläre Aktionspotential ausübt. Niedrigere Konzentrationen (0.1, 0.3 und 0.6 μ M) verlängerten die Aktionspotentialdauer, während eine höhere Konzentration (1 μ M) die Aktionspotentialdauer verkürzte. Abbildung 19A stellt repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach der Applikation von Droperidol dar. Während in einer Konzentration von 0.1 μ M Droperidol keinen signifikanten Effekt auf die APD90 ausübte (Abbildung 19B), verlängerte Droperidol in einer Konzentration von 0.3 μ M und 0.6 μ M die APD90 jeweils um 55 ± 15 ms (n=6, P <0.05) und um 67 ± 7 ms (n=4, P <0.01). Dies entspricht einer prozentualen Verlängerung der APD90 um 23 % und 28 %. Bei noch höheren Konzentrationen (1 μ M) bewirkte Droperidol eine Verkürzung der APD90 um 11 % (n=4, P <0.01).



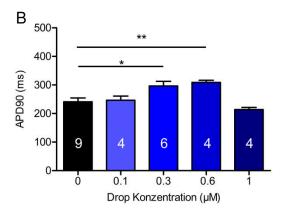


Abbildung 19: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer

Konzentrationsabhängige Effekte von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer von isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 0.1-1 μ M Droperidol. Die dargestellten Aktionspotentiale bilden repräsentative Aktionspotentiale aus 30 aufgenommen Daten. Der SEM ist zur besseren Übersicht nicht dargestellt. **B:** Mittelwerte der APD₉₀ aus allen Versuchen. Droperidol 0 μ M entspricht den Kontrollbedingungen. APD₉₀ = Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation; V_m = Membranpotential; Drop = Droperidol. *P<0.05; **P<0.01. Statistik: 1way ANOVA Bonferroni´s Multiple Comparison Test.

Zur weiteren Analyse über die Interaktion von Droperidol mit kardialen Ionenkanälen und die Wirkung auf das ventrikuläre Aktionspotential wurden neben der APD_{50} und APD_{90} die Parameter V_m , Overshoot und APA gemessen. Droperidol zeigte in keiner Konzentration einen signifikanten Effekt auf V_m , Overshoot und APA (Tabelle 6).

Tabelle 6: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential					
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Kontrolle	-83 ± 1	52 ± 1	135 ± 2	220 ± 13	241 ± 13
Droperidol (0.1 μM)	-85 ± 1	56 ± 3	142 ± 3	214 ± 12	246 ± 14
Droperidol (0.3 μM)	-81 ± 1	68 ± 4	149 ± 3	262 ± 15	297 ± 16*
Droperidol (0.6 μM)	-79 ± 1	68 ± 5	147 ± 4	275 ± 6*	309 ± 8**
Droperidol (1 μM)	-84 ± 2	54 ± 3	138 ± 2	185 ± 6	214 ± 7*

Angaben der Werte als Mittelwert und SEM; n=9

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation; *P<0.05 vs. Kontrolle; ** P<0.01 vs. Kontrolle, Statistik: 1way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Für die folgenden Versuche galt es nun, eine geeignete Droperidolkonzentration zu wählen, in der Droperidol in die LQTS-Modelle appliziert werden sollte. Da das Ziel dieser Arbeit war, LQTS-subtypspezifische Effekte von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential und bisher unklare Ionenkanalinteraktionen der Substanz zu demaskieren, wurde eine Konzentration gewählt, in der Droperidol eine deutliche Verlängerung der Aktionspotentialdauer in den Kontrollmyozyten erzeugte, und somit von einer effektiven hERG Blockade ausgegangen werden kann. Für diese Konzentration konnte angenommen werden, dass ein möglicher subtypspezifischer Effekt in den LQTS-Modellen leicht nachweisbar sein wird. Demzufolge wurde für die nachfolgenden Versuche eine Droperidolkonzentration von 0.6 μM gewählt.

3.1.2. Etablierung der LQTS-Modelle

3.1.2.1. Das LQTS1-Modell

Das LQTS1 wird verursacht durch eine Reduktion des kardialen I_{Ks} . Um das LQTS1-Modell pharmakologisch zu induzieren, wurde die Substanz Chromanol 293B gewählt. Chromanol 293B wird in der Literatur als selektiver I_{Ks} Blocker beschrieben und wurde bereits in mehreren Studien für die Etablierung des LQTS1-Modells erfolgreich eingesetzt (Bosch et al. 1997, Clancy et al. 2003, Shimizu & Antzelevitch 1998, Yang et al. 2004). Aus vorherigen Studien an Myozyten des Meerschweinchens ist bekannt, dass die IC_{50} von Chromanol für I_{Ks} bei 1.02 μ M liegt (Bosch et al. 1997). Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 10 μ M gewählt. Bei dieser Konzentration kann von einer pharmakologisch nahezu maximal möglichen I_{Ks} Blockade ausgegangen werden.

Chromanol 293B bewirkte in den isolierten Kardiomyozyten eine signifikante Verlängerung der APD $_{90}$ um 77 ± 14 ms (n=11, P<0.001; Abbildung 20B). Dieses entspricht einem prozentualen Zuwachs der APD $_{90}$ von 38 %. Abbildung 20A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach pharmakologischer Induktion des LQTS1-Modells. In Bezug auf V_m , Overshoot und APA wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet (Tabelle 7).

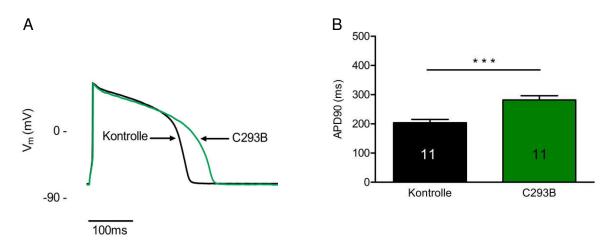


Abbildung 20: Effekt von Chromanol 293B auf die Aktionspotentialdauer

In vitro Effekte von Chromanol 293B (LQTS1-Modell) auf das Aktionspotential. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Applikation von Chromanol 293B (LQTS1-Modell, 10 μ M; grün). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation) aus allen Experimenten. V_m = Membranpotential; C293B = Chromanol 293B. Zahlen in den Säulen = n. **** P<0.001 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test.

	Tabelle 7: Eff	ekte von Chromanol 29	3B auf das Aktions	potential	
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Kontrolle	-82 ± 1	53 ± 3	136 ± 3	182 ± 11	204 ± 11
Chromanol 293B (10 μM)	-81 ± 1	56 ± 2	137 ± 2	255 ± 15***	282 ± 15 ***

Angaben der Werte als Mittelwert und SEM; n=11

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test.

3.1.2.2. Das LQTS2-Modell

Das LQTS2 wird verursacht durch eine Reduktion des kardialen I_{Kr} . Um das LQTS2-Modell pharmakologisch zu induzieren, wurde die Substanz E4031 verwendet. E4031 wird als selektiver I_{Kr} Blocker beschrieben und wurde bereits in mehreren Studien für die Etablierung des LQTS2-Modells erfolgreich eingesetzt (Aiba, et al. 2005, Davie et al. 2004, Sanguinetti & Jurkiewicz 1990, Sanguinetti et al. 1991, Yamauchi et al. 2002). In Meerschweinchenmyozyten liegt die I_{S0} von E4031 für I_{Kr} bei 0.397 μ M (Sanguinetti & Jurkiewicz 1990). Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Konzentration von $10~\mu$ M gewählt. Bei dieser Konzentration kann von einer maximal möglichen pharmakologischen I_{Kr} Inhibition ausgegangen werden.

E4031 bewirkte in isolierten Kardiomyozyten des Meerschweinchens eine signifikante Verlängerung der APD $_{90}$ um 40 ± 10 ms (20 %; n=14, P<0.001; Abbildung 21B). Abbildung 21A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen und nach pharmakologischer Induktion des LQTS2-Modells. In Bezug auf V_m , Overshoot und APA wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet (Tabelle 8).

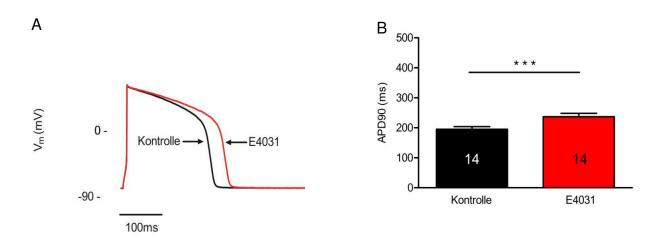


Abbildung 21: Effekt von E4031 auf die Aktionspotentialdauer

In vitro Effekte von E4031 auf das Aktionspotential. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Applikation von E4031 (LQTS2-Modell, $10~\mu M$; rot). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation) aus allen Experimenten. V_m = Membranpotential; Zahlen in den Säulen = n. *** P<0.001 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test

	Tabelle	8: Effekt von E4031 au	f das Aktionspoter	tial	
	V _m	Overshoot	APA	APD ₅₀	APD ₉₀
	(mV)	(mV)	(mV)	(ms)	(ms)
Kontrolle	-82 ± 1	59 ± 5	141 ± 5	167 ± 8	200 ± 7
E4031 (10 μM)	-82 ± 1	60 ± 5	142 ± 5	199 ± 12***	240 ± 10***

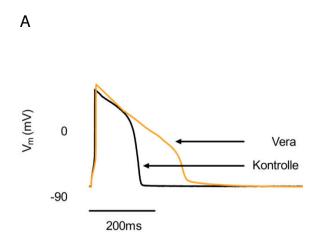
Angaben der Werte als Mittelwert und SEM; n=14

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test.

3.1.2.3. Das LQTS3-Modell

Ursache des LQTS3 ist ein persistierender Natriumstrom I_{Na} , der die Inaktivierung der schnellen Natriumkanäle verzögert. Hierdurch kommt es zu depolarisierenden Natriumeinwärtsströmen während der Plateauphase. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich Veratridin zur pharmakologischen Induktion des LQTS3-Modells (Gerhardy et al. 1998, Hiraoka et al. 1992, Milberg et al. 2005, Ulbricht 1998).

Abbildung 22A stellt repräsentative Aktionspotentiale aus isolierten Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen und nach der Applikation von Veratridin $0.5~\mu M$ dar. Veratridin verlängerte die APD $_{90}$ um $150~\pm~24$ ms (97 %; n=11, P<0.001, Abbildung 22B). Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit vorherigen Studien (Milberg et al. 2005). Veratridin zeigte auf weitere Parameter des Aktionspotentials wie V_m , Overshoot und APA keinen signifikanten Effekt (Tabelle 9).



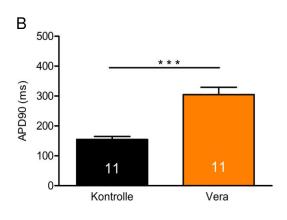


Abbildung 22: Effekt von Veratridin auf die Aktionspotentialdauer

In vitro Effekte von Veratridin auf das Aktionspotential. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Applikation von Veratridin (LQTS3-Modell, 0.5 μ M; orange). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation) aus allen Experimenten. V_m = Membranpotential; Vera = Veratridin, Zahlen in den Säulen = n. ***P<0.001 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test.

	Tabelle 9:	Effekt von Veratridin a	auf das Aktionspot	ential	
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD50 (ms)	APD90 (ms)
Kontrolle	-76 ± 2	58 ± 4	135 ± 2	133 ± 10	155 ± 10
Veratridin (0.5 μM)	-75 ± 2	55 ± 5	130 ± 3	209 ± 20 **	305 ± 25***

Angaben der Werte als Mittelwerte und SEM; n=11

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001, ** P<0.01 vs. Kontrolle. Statistik: Students t-Test.

3.1.3. Der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential im LQTS-Modell

3.1.3.1. Droperidol im LQTS1-Modell

Um subtypspezifische Effekte von Droperidol auf das Aktionspotential zu identifizieren, wurde Droperidol in pharmakologische LQTS-Modelle appliziert. Abbildung 23A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale nach pharmakologischer Induktion des LQTS1-Modells und zusätzlicher Applikation von Droperidol. Im LQTS1-Modell erzeugte Droperidol eine Verlängerung der APD90 um 74 ± 9 ms (32 %; n=12, P<0.001; Abbildung 23B). Droperidol zeigte auf weitere Parameter des Aktionspotentials wie V_m, Overshoot und APA im LQTS1-Modell keinen signifikanten Effekt (Tabelle 10).

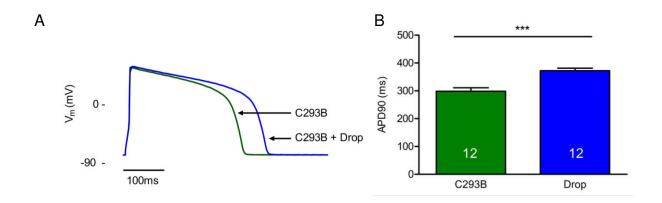


Abbildung 23: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS1-Modell In vitro Effekte von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale nach Applikation von Chromanol 293B (LQTS-1 Modell, $10~\mu$ M; grün) und zusätzlicher Applikation von Droperidol ($0.6~\mu$ M; blau). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation) aus allen Experimenten. V_m = Membranpotential; Drop = Droperidol; C293B = Chromanol 293B. Zahlen in den Säulen = 0.888 =

Tabelle 10: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell					
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Chromanol 293B (10 µM)	-78 ± 1	67 ± 3	146 ± 3	267 ± 12	298 ± 13
Chromanol 293B + Droperidol (0.6 µM)	-76 ± 1	70 ± 4	147 ± 4	330 ± 9***	372 ± 9***

Angaben der Werte als Mittelwerte; n=12

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001 vs. C293B. Statistik: Students t-Test.

3.1.3.1.1. E4031 im LQTS1-Modell

Um den Effekt von Droperidol mit dem einer selektiven I_{Kr} Blockade zu vergleichen, wurde in LQTS1-ähnliche Zellen E4031 appliziert. Abbildung 24A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale nach pharmakologischer Induktion des LQTS1-Modells und nach zusätzlicher Applikation von E4031 in einer Konzentration von 10 μ M. Im LQTS1-Modell verlängerte E4031 die APD90 um weitere 69 \pm 23 ms (29 %; n=11, P<0.001; Abbildung 24B). Dieser Effekt ist vergleichbar mit der durch Droperidol bewirkten Verlängerung im LQTS1-Modell (Abbildung 23, Verlängerung der APD90 um 32 %) und illustriert, dass die Wirkung von Droperidol (0.6 μ M) im LQTS1-Modell mit einem potenten I_{Kr} Blocker vergleichbar ist. E4031 zeigte auf weitere Parameter des Aktionspotentials wie V_m , Overshoot und APA im LQTS1-Modell keinen signifikanten Effekt (Tabelle 11). Diese Versuchsreihe verdeutlicht, dass Droperidol in der verwendeten Konzentration als I_{Kr} Blocker fungiert.

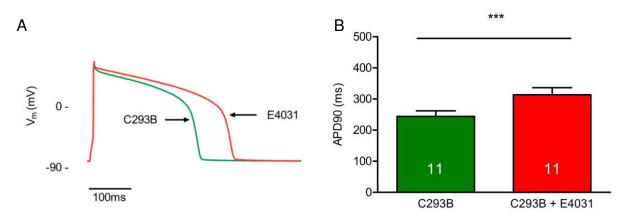


Abbildung 24: Effekt von E4031 auf die Aktionspotentialdauer im LQTS1-Modell

In vitro Effekte von E4031 auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale im LQTS1-Modell nach Applikation von Chromanol 293B (10 μ M; grün) und anschließend zusätzlicher Applikation von E4031 (10 μ M; rot). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation) aus allen Versuchen. V_m = Membranpotential; C293B = Chromanol 293B. Zahlen in den Säulen = n. *** P<0.001 vs. C293B. Statistik: Students t-Test.

Tabelle 11: Effekte von E4031 auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell					
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Chromanol 293B (10 μM)	-79 ± 1	59 ± 2	138 ± 2	212 ± 16	244 ± 18
Chromanol 293B + E4031 (10 μM)	-78 ± 1	61 ± 2	139 ± 2	263 ± 18***	313 ± 23***

Angaben der Werte als Mittelwerte; n=11

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001 vs. C293B. Statistik: Students t-Test.

3.1.3.2. Droperidol im LQTS2-Modell

Um die Wirkung von Droperidol im LQTS2-Modell zu analysieren, wurde zur Etablierung des LQTS2-Modells zunächst der selektive I_{Kr} Blocker E4031 und anschließend Droperidol appliziert. Abbildung 25A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale nach pharmakologischer Induktion des LQTS2-Modells und nach zusätzlicher Applikation von Droperidol. Nach der Applikation von Droperidol in das LQTS2-Modell ließ sich eine Verkürzung der APD $_{90}$ um 24 \pm 8 ms beobachten (n=11, P<0.001, Abbildung 25B). Dies entspricht einer prozentualen Verkürzung um 12 %. Droperidol zeigte auf weitere Parameter des Aktionspotentials wie V_{m} , Overshoot und APA im LQTS2-Modell keinen signifikanten Effekt (Tabelle 12).

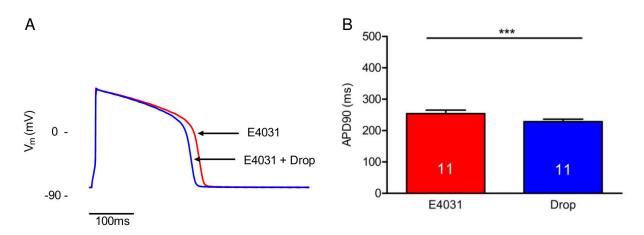


Abbildung 25: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS2-Modell In vitro Effekte von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS2-Modell. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale nach Applikation von E4031 (LQTS2-Modell, $10~\mu$ M; rot) und zusätzlicher Applikation von Droperidol ($0.6~\mu$ M; blau). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation) aus allen Experimenten. V_m = Membranpotential; Drop = Droperidol. Zahlen in den Säulen = n. *** P<0.001 vs. E4031. Statistik: Students t-Test.

Tabelle 12: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS2-Modell						
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	
E4031 (10 μM)	-82 ± 1	63 ± 8	145 ± 8	208 ± 11	254 ± 11	
E4031 + Droperidol	-82 ± 1	54 ± 4	136 ±4	191 ± 6	229 ± 7***	
(0.6 μM)						

Angaben der Werte als Mittelwerte; n=11

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. *** P<0.001 vs. E4031. Statistik: Students t-Test.

3.1.3.3. Droperidol im LQTS3-Modell

Um die Wirkung von Droperidol im LQTS3-Modell zu analysieren, wurde nach der pharmakologischen Induktion des LQTS3-Modells Droperidol appliziert. Abbildung 26A veranschaulicht repräsentative Aktionspotentiale nach pharmakologischer Induktion des LQTS3-Modells und nach zusätzlicher Applikation von Droperidol. Droperidol verlängerte im LQTS3-Modell die APD $_{90}$ um 33 \pm 9 ms (13 %; n=6, P<0.05; Abbildung 26B). Auf die Parameter V_{m} , Overshoot und APA zeigte Droperidol im LQTS3-Modell keinen signifikanten Effekt (Tabelle 13).

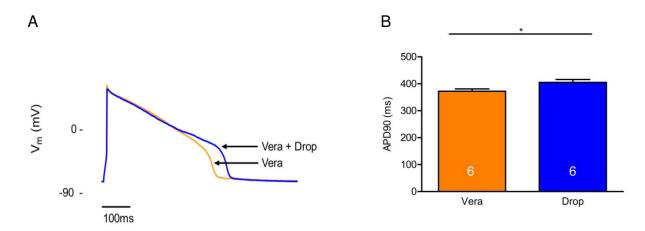


Abbildung 26: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS3-Modell

In vitro Effekte von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS3-Modell. **A:** Repräsentative Aktionspotentiale nach der Applikation von Veratridin (LQTS3-Modell, $0.5~\mu$ M; orange) und zusätzlicher Applikation von Droperidol ($0.6~\mu$ M; blau). **B:** Mittelwerte der APD₉₀ (Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation) aus allen Versuchen. V_m = Membranpotential; Vera = Veratridin; Drop = Droperidol; die Zahlen in den Säulen = n. * P< $0.05~\nu$ s. Vera. Statistik: Students t-Test.

Tabelle 13: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS3-Modell						
	V _m (mV)	Overshoot (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	
Veratridin (0.5 μM)	-85 ± 1	45 ± 2	128 ± 1	270 ± 4	372 ± 9	
Veratridin +	-85 ± 1	46 ± 2	130 ± 1	285 ± 12*	405 ± 11*	
Droperidol (0.6 μM)						

Angaben der Werte als Mittelwerte; n=6

 V_m = Ruhemembranpotential; APA = Amplitude des Aktionspotentials; APD₅₀ und APD₉₀ = Dauer des Aktionspotentials bei 50 % bzw. 90 % der Repolarisation. * P<0.05 vs. Vera. Statistik: Students t-Test.

3.2. Computergestützte Simulation ventrikulärer Aktionspotentiale

Um mögliche Erklärungen der in vitro Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu finden, wurde das Luo-Rudy-dynamic-Modell eingesetzt. Mit Hilfe von diesem Modell sollten die Ionenkanalinteraktionen von Droperidol näher analysiert werden.

In den in vitro Versuchen dieser Arbeit verlängerte Droperidol im LQTS1-Modell das Aktionspotential (Abbildung 23), während die Substanz im LQTS2-Modell das Aktionspotential verkürzte (Abbildung 25). In nativen Kontrollmyozyten verlängerte Droperidol in niedrigeren Konzentrationen die Dauer des Aktionspotentials, in höheren Konzentrationen bewirkte die Substanz eine Verkürzung des Aktionspotentials (Abbildung 18). Eine konzentrationsabhängige Wirkung der Substanz wurde bereits in früheren Experimenten beschrieben (Schwoerer et al. 2007). Basierend auf diesen Ergebnissen vermuteten wir, dass Droperidol hauptsächlich mit zwei Ionenströmen interagiert:

Erstens mit dem repolarisierenden I_{Kr}.

Wie bereits beschrieben, bewirkt Droperidol eine Blockade des hERG-Kanals (Drolet et al. 1999, Schwoerer et al. 2007). Dominiert diese Blockade, so kann hierdurch die gemessene Aktionspotentialverlängerung erklärt werden.

Zweitens mit einem unbekannten Ionenstrom, z.B. mit einem depolarisierenden Strom.

Droperidol bewirkte in den in vitro Versuchen dieser Arbeit auch eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer im LQTS2. Diese ist nicht durch eine alleinige I_{Kr} Reduktion erklärbar. Der Nettoeffekt einer Aktionspotentialverkürzung könnte jedoch z.B. durch eine weitere dominierende Blockade von einem depolarisierenden Ionenstrom erklärt werden.

Mit Hilfe des Luo-Rudy-Modells wurden in der vorliegenden Arbeit Aktionspotentiale von midmyokardialen Myozyten in LQTS1- und LQTS2- ähnlichen Zustand computergestützt simuliert. Da das LQTS1 und LQTS2 die häufigsten Subtypen darstellen (Tabelle 1), es bisher kein computersimuliertes Modell für das LQTS3 existiert und nur wenige experimentelle Daten über das LQTS3 vorliegen, wurde auf diesen LQTS-Subtyp in der Simulation verzichtet.

Nach der Simulation von LQTS1- und LQTS2- ähnlichen Bedingungen wurden anschließend die zellulären Effekte von Droperidol simuliert. Da von Droperidol nur die I_{Kr} Reduktion bekannt ist, wurden zur Identifikation weiterer unbekannter Interaktionen verschiedene Ionenströme eingesetzt. Gesucht wurde der Interaktionsstrom X, durch dessen Inhibition in LQTS1-Myozyten das Aktionspotential verlängert und in LQTS2-Myozyten das Aktionspotential verkürzt wird:

 $I(X + I_{Kr}) + LQTS1 = Verlängerung des Aktionspotentials.$

II $(X + I_{Kr}) + LQTS2 = Verkürzung des Aktionspotentials.$

Als Komponente X wurden in der Simulation vier verschiedene Ionenströme eingesetzt. Bereits veröffentlichte Studien gehen von einer Interaktion mit depolarisierenden Strömen aus (Schwoerer et al. 2007). Als mögliche Interaktionsströme von Droperidol wurden bereits vorgeschlagen der schnelle Natriumstrom (I_{Na}) und der L-Typ Calciumstrom (I_{Ca-L}) (Adamantidis et al. 1995, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971, Mironneau et al. 1975, Schwoerer et al. 2007, Shiga

et al. 2005). Diese beiden Ströme wurden für die Simulation ausgewählt. Des Weiteren entschieden wir uns für den Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatasestrom (I_{NaK}) und den Natrium-Calcium-Austauscherstrom (I_{NaCa}). Die Wirkung dieser Ströme ist komplex. Physiologisch verlängern sie das Aktionspotential, dessen Blockade bewirkt eine Verkürzung. In Abbildung 27 sind die für das Aktionspotential grundlegenden Ionenaustauschsysteme bildlich Kaliumkanäle bewirken einen selektiven Ionenausstrom Repolarisationskräfte. Natrium- und Calciumkanäle bewirken einen selektiven Ioneneinstrom und sind Depolarisationskräfte. Der Natrium-Calcium-Transporter ist elektrogen, drei Natriumionen werden für ein Calciumion einwärts transportiert. Nicht in der Abbildung aufgeführt ist die Natrium-Kalium ATPase. Unter Hydrolyse von ATP werden hierüber drei Natriumionen nach extrazellulär und zwei Kaliumionen nach intrazellulär befördert. Kardiale Ionenströme sind grundlegend für die Länge des Aktionspotentials. Eine Blockade der Repolarisationskräfte bewirkt eine Verlängerung des Aktionspotentials, eine Blockade der Depolarisationskräfte eine Verkürzung.

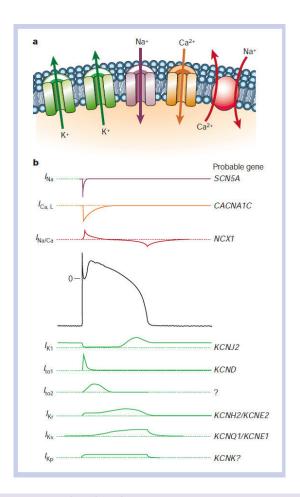


Abbildung 27: Ventrikuläres Aktionspotential mit beteiligten Ionenströmen

A: Die wichtigsten Ionenkanäle und Ströme, die grundlegend für das Aktionspotential sind. Kaliumkanäle bewirken einen selektiven Ionenausstrom. **B:** Oben depolarisierende Ionenströme. Mittig Aktionspotential. Unten repolarisierende Ionenströme. Abbildung modifiziert nach (Marban 2002).

3.2.1. Simulation von LQTS1- und LQTS2-Myozyten

Das LQTS1 ist durch einen reduzierten Anteil von I_{Ks} charakterisiert, das LQTS2 durch einen reduzierten Anteil von I_{Kr} . Zur Simulation von LQTS1- und LQTS2-Myozyten wurde die Leitfähigkeit der entsprechenden Kaliumkanalkomponente reduziert. Um ein passendes Ausmaß der I_{Kr} und I_{Ks} Reduktion zu finden, wurden zunächst ansteigende Schweregrade an Kaliumstromreduktionen simuliert. Abbildung 28 veranschaulicht den Effekt auf die Aktionspotentialdauer bei 25 %, 50 %, 75 % und 100 % I_{Ks} und I_{Kr} Reduktion.

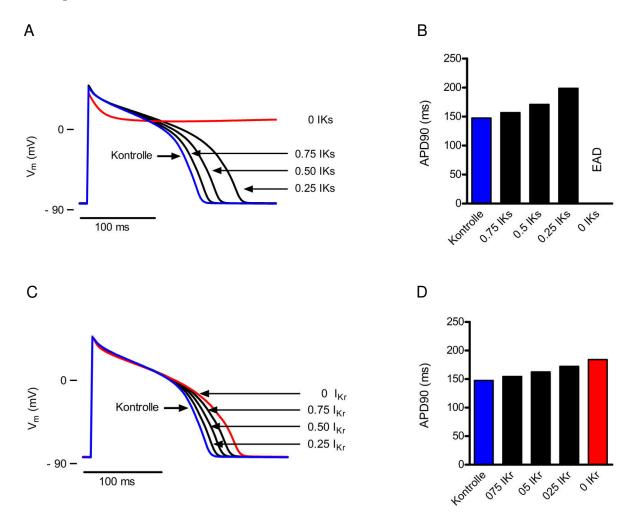


Abbildung 28: Modellierung von LQTS1- und LQTS2-Myozyten
Computergestützte Simulation. Aktionspotentiale einer LQTS1- (A) und LQTS2-Myozyte (C). Resultierende APD₉₀ sind in B und D angegeben. Für LQTS1- und LQTS2-Myozyten wurden ansteigende Schweregrade an Kaliumstromverlusten eingesetzt; 0.75, 0.5, 0.25, 0 entspricht 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Reduktion von I_{Ks} und I_{Kr}. V_m = Membranpotential; EAD = early afterdepolarization (frühe Nachdepolarisation), APD₉₀ = Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation.

Wie erwartet und wie auch die Ergebnisse der in vitro Experimente dieser Arbeit zeigen, führte die Reduktion des I_{Ks} zu einer Verlängerung des Aktionspotentials. Dies illustriert Abbildung 28 A und B. Beachtenswert dabei ist, je höher der Leitfähigkeitsverlust von I_{Ks} , desto ausgeprägter die Verlängerung des Aktionspotentials. Anders als in den in vitro Versuchen dieser Arbeit traten in der Simulation bei 100 % Strominhibition frühe Nachdepolarisationen und ein Verlust der Repolarisation (Abbildung 28A, "0 I_{Ks} ") auf. Die Dauer des Aktionspotentials war hier nicht mehr messbar. Abbildung 28 C und D verdeutlicht, dass auch die Reduktion des I_{Kr} in der Simulation eine Aktionspotentialverlängerung ergab. Auch hier war erkennbar, je höher der

Leitfähigkeitsverlust, desto ausgeprägter die Verlängerung des Aktionspotentials. Anders als in den modellierten LQTS1-Myozyten wurde hier bei 100% Strominhibition von I_{Kr} das Aktionspotential als maximale Verlängerung gemessen.

In den in vitro Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde für die pharmakologische Induktion des LQTS1- und LQTS2-Modells eine Konzentration gewählt, in der man von einer maximal möglichen Strominhibition von I_{Ks} und I_{Kr} ausgehen kann. Um in der Simulation ein vergleichbares Ausmaß der Aktionspotentialverlängerung wie in den in vitro Experimenten zu erzielen, wurden in den folgenden Simulationen die LQTS1-Myozyten durch 75 % I_{Ks} Reduktion imitiert. Die LQTS2-Myozyten wurden in den folgenden Simulationen durch 100 % I_{Kr} Reduktion imitiert.

3.2.2. Simulation von Droperidol in LQTS1- und LQTS2-Myozyten

In den in vitro Experimenten dieser Arbeit bewirkte Droperidol in einer Konzentration von 0.6 μ M eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer um 28 % (Abbildung 19). Um in der Simulation einen vergleichbaren Effekt der Substanz zu erzielen, wurde der I_{Kr} auf 25 % reduziert. Eine Droperidolkonzentration von 0.6 μ M entspricht nahezu einer Stromreduktion um 50 % (Schwoerer et al. 2007, Guy et al. 1991). Da die Computersimulation jedoch bei zu langen Aktionspotentialen frühe Nachdepolarisationen generiert, wurde bewusst eine moderate I_{Kr} Blockade gewählt. Um eine zweite Ionenkanalinteraktion von Droperidol zu demaskieren, wurden vier Ionenströme ausgewählt, die ein potentielles zelluläres Ziel von Droperidol darstellen: I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{NaK} und I_{NaCa} . Jeder dieser vier Ströme wurde in verschiedenen Reduktionsausmaßen mit der I_{Kr} Reduktion kombiniert und in der LQTS1- und LQTS2-Myozyte simuliert. Da die Zahl der getesteten Stromreduktionen für jeden der vier Ströme sehr hoch ist, wird im Folgenden nur ein Teil der Experimente wiedergegeben. Ziel der Simulation war es, eine Kombination zu identifizieren, die mit den Ergebnissen der in vitro Versuche dieser Arbeit übereinstimmt.

Abbildung 29 illustriert die beschriebenen Effekte der eingesetzten Ionenströme mit unterschiedlich stark ausgeprägter Strominhibition in modellierten LQTS1-Myozyten. Dargestellt ist jeweils die resultierende APD90. Gesucht wurden Kombinationen, die in LQTS1-Myozyten das Aktionspotential verlängern. Ausgehend von der Aktionspotentialdauer in simulierten LQTS1-Myozyten kam es durch eine zusätzliche I_{Kr} (25 %) und I_{Na} Blockade (10 und 25 %) zu einer Verlängerung der APD90 gegenüber simulierten LQTS1- Myozyten. Bei einer Blockade von 50% I_{Na} war die APD90 aufgrund der Entstehung von EADs nicht mehr messbar. Die kombinierte I_{Kr} und I_{Ca,L} Blockade bewirkte bei 10 % sowie 25% I_{Ca,L} Blockade eine signifikante Verlängerung der APD90 gegenüber LQTS1-Myozyten. Ebenfalls kam es zu einer Verlängerung der APD90 unter gemeinsamer I_{Kr} und I_{NaK} Blockade (10%), zunehmende Stromreduktion von I_{NaK} (25 % und 50%) führte jedoch zu einer Verkürzung der APD90. I_{NaCa}, in einem Ausmaß von 10% und 25% blockiert, verlängerte die APD90 der LQTS1-Myozyte. 50% Reduktion des Stroms führte zu keiner signifikanten Änderung der APD90.

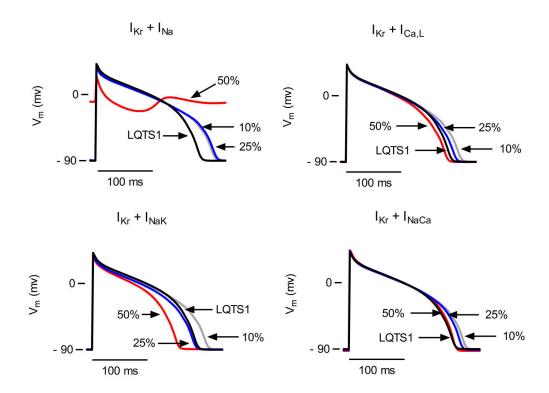


Abbildung 29: Simulierte Ionenkanalkombinationen in LQTS1-Myozyten

Computergestützte Simulation. Aktionspotential resultierend aus kombinierter Ionenkanalinteraktion in LQTS1-Myozyten (schwarzes Aktionspotential). Jedes weitere Aktionspotential präsentiert die Kombination aus zwei Kanalblockierungen: 25 % I_{Kr} Blockade mit zusätzlicher Blockade des jeweils eingesetzten Stromes 10 % (grau), 25 % (blau) und 50 % (rot).

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die eben beschriebenen Ergebnisse der Simulation graphisch vereinfacht in Abbildung 30 noch einmal dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass sieben der getesteten Stromkombinationen die APD₉₀ in LQTS1-Myozyten signifikant verlängert haben.

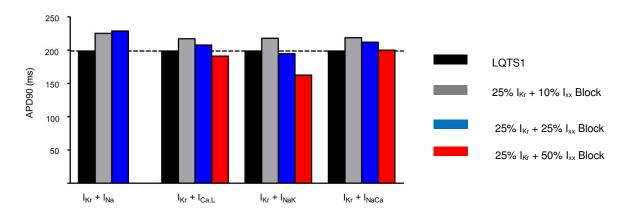


Abbildung 30: Effekte der Ionenkanalkombinationen auf die APD90 in LQTS1-Myozyten

Computergestützte Simulation. Dargestellt sind die zu den Kombinationen ergebenen APD $_{90}$ (Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation). Die gestrichelte Linie stellt die APD $_{90}$ der LQTS1-Myozyten dar. Sieben der getesteten Kombinationen verlängerten die Aktionspotentialdauer. I_{Na} = schneller Na $^+$ -Strom; I_{Ca-L} = L-Typ Ca $^{2+}$ -Strom; I_{NaK} = Na $^+$ -K $^+$ Adenosintriphosphatase; I_{NaCa} = Na $^+$ -Ca $^{2+}$ -Austauschstrom.

Analog zu den Versuchen in den modellierten LQTS1-Myozyten wurden dieselben Ionenströme und Inhibitionsausmaße auch in modellierten LQTS2-Myozyten eingesetzt. Die jeweils resultierende APD $_{90}$ veranschaulicht Abbildung 31. Ausgehend von der Aktionspotentialdauer in simulierten LQTS2-Myozyten kam es durch kombinierte I_{Kr} Blockade und I_{Na} Blockade zu einer Verlängerung der APD $_{90}$. Je höher die Stromblockade von I_{Na} , desto bedeutender die Verlängerung der APD $_{90}$. Eine Verkürzung der APD $_{90}$ wurde bei kombinierter I_{Kr} und $I_{Ca,L}$ Blockade gemessen. Während diese bei 10 % noch nicht signifikant war, kam es zu einer zunehmenden Verkürzung der APD $_{90}$ bei 25 % und 50 % Blockade. Ebenfalls wurde eine Verkürzung der APD $_{90}$ durch die Blockade des depolarisierenden I_{NaK} herbeigeführt. Ansteigende Stromreduktion verstärkte den Effekt. Unter 10% und 25% Reduktion von I_{NaCa} , war kein signifikanter Effekt auf die APD $_{90}$ zu beobachten, erst unter einer Stromreduktion von 50% wurde die APD $_{90}$ der LQTS2-Myozyten signifikant verkürzt.

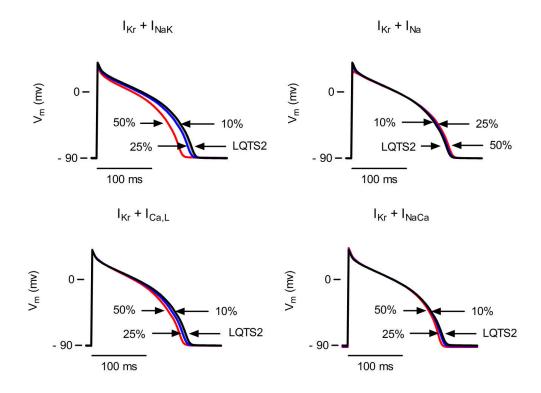


Abbildung 31: Simulierte Ionenkanalkombinationen in LQTS2-Myozyten
Computergestützte Simulation. Aktionspotentiale resultierend aus kombinierter Ionenkanalinteraktion in LQTS2-Myozyten (schwarzes Aktionspotential). Jedes weitere Aktionspotential präsentiert die Kombination aus zwei Kanalblockierungen: 25 % I_{Kr} Blockade mit zusätzlicher Blockade des jeweils eingesetzten Stromes 10 % (grau), 25 % (blau) und 50 % (rot).

In Abbildung 32 ist erkennbar, dass sechs der getesteten Stromkombinationen die APD₉₀ in LQTS2-Myozyten verkürzten.

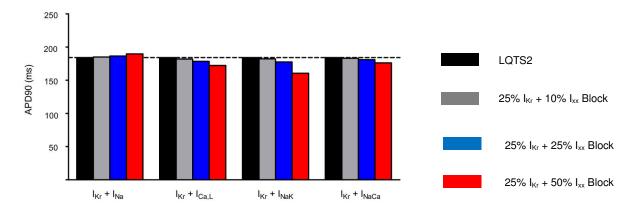


Abbildung 32: Effekte der Ionenkanalkombinationen auf die APD₉₀ in LQTS2-Myozyten

Gezeigt werden die zu den Kombinationen errechnete APD $_{90}$ (Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation). Die gestrichelte Linie stellt die APD $_{90}$ der LQTS2-Myozyten dar. I_{Na} = schneller Na $^+$ -Strom; I_{Ca-L} = L-Typ Ca $^{2+}$ -Strom; I_{NaK} = Na $^+$ -Ck $^+$ Adenosintriphosphatase-Strom; I_{NaCa} = Na $^+$ -Ca $^{2+}$ -Austauschstrom.

3.2.3. Zusammenfassung: Computergestützte Simulation

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse aus der computergestützten Simulation stellt Tabelle 14 dar.

Tabelle 14: Droperidol in LQTS1- und LQTS2-Myozyten					
	Strom Blo	Strom Blockade		uer des Aktionspotentials	
	I _{Kr}	I _{xx}	In LQTS1	In LQTS2	
I _{Kr} + I _{Na}	25 %	10 %	$\uparrow \uparrow$	±	
	25 %	25 %	$\uparrow \uparrow$	±	
	25 %	50 %	EAD	\uparrow	
I _{Kr} + I _{Ca-L}	25 %	10 %	$\uparrow \uparrow$	±	
	25 %	25 %	↑	\downarrow	
	25 %	50 %	\downarrow	$\downarrow \downarrow$	
I _{Kr} + I _{NaK}	25 %	10 %	$\uparrow \uparrow$	±	
	25 %	25 %	\downarrow	\downarrow	
	25 %	50 %	$\downarrow \downarrow$	$\downarrow \downarrow$	
I _{Kr} + I _{NaCa}	25 %	10 %	$\uparrow \uparrow$	±	
	25 %	25 %	$\uparrow \uparrow$	\downarrow	
	25 %	50 %	±	\	

Eine I_{Kr} Reduktion von 25 % wurde mit mehreren Ionenstromreduktionen kombiniert. Das Ausmaß der Blockade ist in Prozent angegeben. Der Effekt auf das Aktionspotential wurde wie angegeben klassifiziert: $\uparrow \uparrow \geq 10$ ms, $\uparrow \downarrow 3-10$ ms Verlängerung oder Verkürzung der Aktionspotentialdauer, \pm kein Effekt auf die Aktionspotentialdauer. Rote Pfeile präsentieren die Kombination, die die Verlängerung und Verkürzung der Aktionspotentialdauer bewirkte, die vereinbar mit den in vitro Ergebnissen dieser Arbeit ist. LQTS = Long QT-Syndrom; EAD = Early after-depolarization (frühe Nachdepolarisation); I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumgleichrichters; I_{Na} =schneller Na*-Strom; I_{Ca-L} = L-Typ Ca²*-Strom; I_{NaK} = Na*K*-Adenosintriphosphatasestrom; I_{NaCa} = Na*Ca²*-Austauscherstrom.

Gesucht wurde ein Ionen-Transportsystem durch dessen Inhibition gemeinsam mit 25 % I_{Kr} Reduktion in LQTS1-Myozyten eine Verlängerung und in LQTS2-Myozyten einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer bewirkt. Tabelle 14 verdeutlicht, dass zwei Kombinationen von den eingesetzten Ionenkanalstromblockaden prinzipiell mit den Ergebnissen der in vitro Experimente kompatibel sind (rote Pfeile; Tabelle 14). Die Blockade von 25 % I_{Kr} kombiniert mit

- $\begin{tabular}{ll} 1. & 25 \% & Reduktion von I_{Ca-L} \\ & und der mit \end{tabular}$
- 2. 25 % Reduktion von I_{NaCa}.

4. DISKUSSION

4.1. Der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential

Um die kardiotoxischen Nebenwirkungen von Droperidol näher zu analysieren, wurden mehrere Studien durchgeführt, welche die elektrophysiologischen Eigenschaften der Substanz näher untersuchten. Da als möglicher Maßparameter für das Auftreten einer QT-Verlängerung und TdP-Arrhythmie die Aktionspotentialdauer genutzt werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Evaluation des Aktionspotentials durchgeführt. In der Literatur existieren diesbezüglich mehrere Studien, die jedoch uneinheitliche Ergebnisse über die Wirkung von Droperidol beschreiben. So beschreibt Hauswirth in Purkinje-Fasern vom Schaf eine Aktionspotentialverkürzung in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁵ M. In einem höheren Konzentrationsbereich (5x10⁻⁵ M) verstärkte sich der beobachtete Effekt. Weitere Parameter des Aktionspotentials (Membranpotential, Depolarisationsgeschwindigkeit und Amplitude) blieben dabei unverändert (Hauswirth 1968). Ebenfalls eine Aktionspotentialverkürzung konnte Kern et al. im Vorhofgewebe vom Frosch nachweisen. Dabei wurden ähnliche Konzentrationsbereiche (5x10⁻⁵ M) wie bei Hauswirth angewendet. Weiterführende Voltage-Clamp-Messungen ließen vermuten, dass Droperidol möglicherweise eine Reduktion des Natriumeinwärtstroms bewirkt (Kern et al. 1971). Im Gegensatz zu diesen beschriebenen Aktionspotentialverkürzungen ergaben die Versuche von Drolet et al. in isolierten Kardiomyozyten des Meerschweinchens eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (monophasisch). Dabei war beachtlich, je höher der Konzentrationsbereich, desto ausgeprägter die Verlängerung (10 nmol/L 7.3 %; 300 nmol/L 25.7 %). In weiterführenden Patch-Clamp-Versuchen an isolierten Meerschweinchenmyozyten konnte Drolet eine Reduktion von I_{Kr} nachweisen, welche die gemessene Aktionspotentialverlängerung erklärbar machte (Drolet et al. 1999). Eine konzentrationsabhängige Verlängerung der Aktionspotentialdauer wurde auch in den Versuchen von Weissenburger et al. an Pukinje-Fasern des Hasen beschrieben. Er untersuchte einzelne und kombinierte Effekte von Droperidol und mittels intrazellulärer Glasmikroelektrodentechnik. Dabei physiologischen Temperaturen in einem Konzentrationsbereich von 0.001 bis 10 µM eine zunehmende Aktionspotentialverlängerung und das Auftreten von EADs unter Droperidol nachgewiesen werden (Weissenburger et al. 2009). Berücksichtigt man die Tatsache, dass die genannten Studien unterschiedliche Methodik und Droperidolkonzentrationen verwendet haben, so wäre ein konzentrationsabhängiger Effekt der Substanz denkbar. Dies zeigte Adamantidis et al. in Purkinje-Fasern von Hasen und Meerschweinchen. Mittels Mikroelektrodentechnik konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer nachgewiesen werden. In niedrigen Konzentrationen (0.01 - 0.03 µM) bewirkte Droperidol eine Verlängerung des Aktionspotentials, in höheren Konzentrationen (1 - 30 µM) eine Verkürzung. Neben einer ausgeprägteren Verkürzung der Aktionspotentialdauer Konzentrationsbereich von 30 µM auch andere Parameter des Aktionspotentials beeinträchtigt (Amplitude, Ruhemembranpotential) (Adamantidis et al. 1993). Kompatibel zu den Ergebnissen von Adamantidis waren Versuche der Arbeitsgruppe von Schwoerer et al.. In isolierten linksventrikulären Myozyten des Meerschweinchens verlängerte Droperidol in niedrigen Konzentrationen (0.05 und 0.1 µM) die Dauer des Aktionspotentials, während es in höheren Konzentrationsbereichen (0.3 µM) zu einer Verkürzung kam (Schwoerer et al. 2007). Die Tatsache einer konzentrationsabhängigen Wirkung lässt vermuten, dass Droperidol

Ionenkanalebene sehr komplex wirkt und wahrscheinlich Wirkung auf mehrere molekuläre Ziele ausübt. Tabelle 15 verleiht einen zusammenfassenden Überblick über die im Text erwähnten Studien und deren Ergebnis im Hinblick auf die Aktionspotentialdauer.

Quelle	Modell	Konzentration	Effekt auf APD
Adamantidis et al. 1993	Purkinje-Fasern des Hasen und Meerschweinchens	0.01-0.3 μM 10 und 30 μM	Verlängerung und EADs Verkürzung
Drolet et al. 1999	isolierte Meerschweinchen- kardiomyozyen	0.01 – 0.3 μM	Verlängerung
Weissenburger et al. 2009	Purkinje-Fasern von Hasen	0.001 to 10 μM	Verlängerung
Kern et al. 1971	Vorhofgewebe Frosch	5×10-5 M/l	Verkürzung
Hauswirth 1968	Purkinje-Fasern von Schafen	10μΜ-50 μΜ	Verkürzung
Schwoerer et al. 2007	isolierte Meerschweinchen- kardiomyozyen	0.05 und 0.1 μM 0.3 μM	Verlängerung Verkürzung
Shiga et al. 2005	isolierte Rattenkardiomyozyten	0.03-1 μΜ	Kein Effekt
Carmeliet et al. 1976	Vorhof Meerschweinchen, Papillarmuskel Hund, Katze und Kuh, Purkinje-Fasern vom Hund, Kuh und Schaf	0.25 -5 mg/l	Kein Effekt

In den in vitro Versuchen der vorliegenden Arbeit führte Droperidol konzentrationsabhängig (0.1, 0.3, 0.6 µM) zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Abbildung 19). Die Eigenschaft von Droperidol als potenten hERG-Inhibitor kann diese Aktionspotentialverlängerung erklären. Die Wirkung einer Substanz auf die Länge des ventrikulären Aktionspotentials wird hauptsächlich dadurch bestimmt, welchen Einfluss sie auf die Balance zwischen Einwärts- (depolarisierenden) und Auswärtsströmen (repolarisierenden) ausübt. Blockiert sie überwiegend die repolarisierenden Auswärtsströme (oder verstärkt depolarisierende Einwärtsströme), wird die Repolarisation verzögert und die Aktionspotentialdauer verlängert. Blockiert die Substanz hingegen überwiegend depolarisierende Einwärtsströme (oder verstärkt repolarisierende Auswärtsströme), wirkt sich dies verkürzend auf die Aktionspotentialdauer aus.

Der elektrophysiologische Effekt wird in Abbildung 33 veranschaulicht. Dort wird eine ventrikuläre Kardiomyozyte des Meerschweinchens mit wichtigsten ihren Ionenaustauschsystemen schematisch dargestellt. Bei physiologischer Funktionsweise aller Gleichgewicht Ionenaustauschsysteme besteht ein zwischen Depolarisations-Repolarisationskraft der Zelle. Durch dieses Gleichgewicht wird die Dauer des Aktionspotentials bestimmt. Eine dominierende Blockade des repolarisierenden Auswärtsstroms I_{Kr} (roter Block) durch Droperidol verschiebt die Balance zwischen depolarisierenden Einwärtsrepolarisierenden Auswärtsströmen zu Gunsten der depolarisierenden Ströme und verlängert die Aktionspotentialdauer.

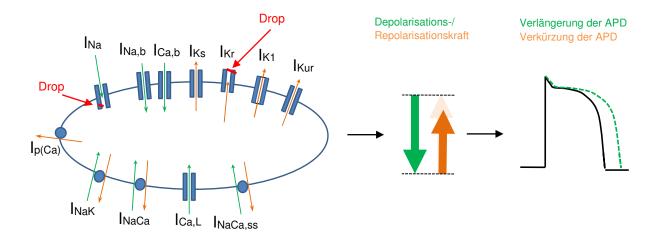


Abbildung 33: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol in niedrigen Konzentrationen

Schematisches Diagramm einer ventrikulären Kardiomyozyte des Meerschweinchens mit ihren wichtigsten Ionenaustauschsystemen, die die Aktionspotentialdauer beeinflussen. Die Flussrichtung der Ionen ist jeweils durch einen Pfeil nach extrazellulär oder intrazellulär gekennzeichnet. Repolarisierende Ströme sind orange, depolarisierende Ströme grün gekennzeichnet. **A:** In niedrigen Konzentrationen (0.3 μ M – 0.6 μ M) bewirkt Droperidol eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Hier dominiert eine I_{Kr} Blockade.

 I_{Na} = schneller Natriumstrom, $I_{Na,b}$ = Hintergrundnatriumstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumstrom, $I_{p(Ca)}$ = Calciumpumpe, $I_{Ca,b}$ = Hintergrundcalciumstrom, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = einwärtsgleichrichtender Kaliumstrom, I_{Kur} = ultraschneller Kaliumauswärtsstrom, I_{NaK} = Natrium-Kalium Adenosintriphosphatasestrom, Drop = Droperidol, grüne Pfeile = depolarisierende Einwärtsströme, orange Pfeile = repolarisierende Auswärtsströme, roter Block = Inhibition des betroffenen Austauschsystems, schwarzes Aktionspotential = physiologisches Aktionspotential, grün gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch Droperidol.

In einer Konzentration von 1 μ M bewirkte Droperidol in den in vitro Versuchen dieser Arbeit eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer (Abbildung 19). Dieser Effekt ist nicht allein durch eine I_{Kr} Blockade erklärbar. In vorherigen Studien über die zellulären Effekte von Droperidol wurden neben der I_{Kr} Blockade weitere Interaktionen mit depolarisierenden Strömen, wie I_{Na} (Carmeliet et al. 1976, Hauswirt 1968, Kern et al. 1971) und/oder I_{Ca-L} (Mironneau et al. 1975, Shiga et al. 2005) vorgeschlagen. Basierend auf diesem Konzept könnte die vorbeschriebene und in dieser Arbeit gemessene Aktionspotentialverkürzung durch zelluläre Interaktionen mit depolariserenden Strömen erklärt werden. Falls diese Interaktion einen dominierenden Effekt einnimmt, verschiebt sich die Balance zwischen depolarisierenden Einwärts- und repolarisierenden Auswärtsströmen zu Gunsten der repolarisierenden Ströme und die Aktionspotentialdauer wird verkürzt (Abbildung 34). Mögliche depolarisierende Ströme wurden bisher in der Literatur noch nicht genauer identifiziert. In Abbildung 34 wurde als möglicher depolarisierender Interaktionsstrom beispielhaft I_{Na} gewählt.

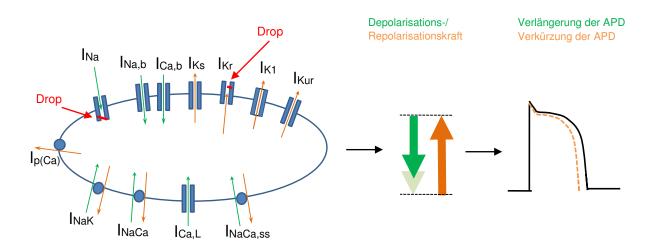


Abbildung 34: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol in höheren Konzentrationen

Schematisches Diagramm einer ventrikulären Kardiomyozyte des Meerschweinchens mit ihren wichtigsten Ionenaustauschsystemen, die die Aktionspotentialdauer beeinflussen. Die Flussrichtung der Ionen ist jeweils durch einen Pfeil
nach extrazellulär oder intrazellulär gekennzeichnet. Repolarisierende Ströme sind orange, depolarisierende Ströme grün
gekennzeichnet. In höheren Konzentrationen (1 μ M) bewirkt Droperidol eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer. Hier
dominiert möglicherweise die Interaktion mit depolarisierenden Strömen, beispielhaft dargestellt ist eine I_{Na} Blockade.
I_{Na} = schneller Natriumstrom, I_{Na,b} = Hintergrundnatriumstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumstrom, I_{p(Ca)} = Calciumpumpe, I_{Ca,b} =
Hintergrundcalciumstrom, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Ks} =
langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = einwärtsgleichrichtender
Kaliumstrom, I_{Kur} = ultraschneller Kaliumauswärtsstrom, I_{NaK} = Natrium-Kalium Adenosintriphosphatasestrom, Drop =
Droperidol, grüne Pfeile = depolarisierende Einwärtsströme, orange Pfeile = repolarisierende Auswärtsströme, roter Block =
Inhibition des betroffenen Austauschsystems, schwarzes Aktionspotential = physiologisches Aktionspotential, orange
gestricheltes Aktionspotential = verkürztes Aktionspotential bewirkt durch Droperidol.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Übereinstimmung zu den vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe über die Auswirkung von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer (Schwoerer et al. 2007). In niedrigeren Konzentrationen bewirkte Droperidol eine Aktionspotentialverlängerung, in höheren Konzentrationen eine Verkürzung.

Die in den vorherigen Studien beschriebenen uneinheitlichen Ergebnisse über die Wirkung von Droperidol (Tabelle 15) sind vereinbar mit diesem Ergebnis, wenn berücksichtigt wird, dass unterschiedliche Methodik und verschiedene Konzentrationsbereiche angewendet wurden. In

unterschiedlichen Präparationen von unterschiedlichen Spezies scheinen in bestimmten Konzentrationen unterschiedliche Ionenkanalinteraktionen zu dominieren.

4.2. Der Effekt von Droperidol auf pharmakologisch induzierte LQTS-Modelle

4.1.2. Etablierung der LQTS-Modelle

In der vorliegenden Arbeit wurde das LQTS1-Modell pharmakologisch durch Chromanol 293B (10 μ M) in isolierte Kardiomyozyten des Meerschweinchens induziert. Chromanol 293B wird in der Literatur als selektiver I_{Ks} Blocker beschrieben. Bosch et al. zeigte in isolierten ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens, dass Chromanol 293B I_{Ks} um 80 % inhibiert (Bosch et al. 1998). In den Versuchen dieser Arbeit konnte durch die Verwendung von Chromanol 293B und die Reduktion des Repolarisationsstroms I_{Ks} eine Verlängerung der APD $_{90}$ um 37 % beobachtet werden. Die Parameter V_m , Overshoot und APA wurden nicht von der Substanz Chromanol 293B beeinflusst, was für die Eigenschaft von Chromanol 293B als selektiven I_{Ks} Blocker spricht. Die Resultate dieser Arbeit stimmen mit der Literatur weitesgehend überein und weisen auf eine erfolgreiche pharmakologische Induktion des LQTS1-Modells hin (Bosch et al. 1998, Yang et al. 2004).

Für die pharmakologische Etablierung des LQTS2-Modells wurde in dieser Arbeit E4031 (10 μM) verwendet. Sanguinetti et al. beschreibt durch den Einsatz dieser Substanz eine Aktionspotentialverlängerung von ca. 26% in isolierten linksventrikulären Myozyten des Meerschweinchens (Sanguinetti et al. 1991). Durch Reduktion von I_{Kr} konnte in der vorliegenden Arbeit, wie erwartet, eine Verlängerung der APD₉₀ beobachtet werden. Die APD₉₀ wurde unter I_{Kr} Blockade 20 % länger als in den Kontrollmyozyten gemessen. Die Parameter V_m, Overshoot und APA wurden nicht von der Substanz E4031 beeinflusst. Dies unterstützt bisherige Ergebnisse, dass E4031 als selektiver I_{Kr} Blocker (Kapitel 3.2.2.) wirkt und deutet darauf hin, dass in dieser Arbeit das LQTS2-Modell erfolgreich pharmakologisch induziert werden konnte (Sanguinetti et al. 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde das LQTS3-Modell pharmakologisch durch das Alkaloid Veratridin (0.5 μM) induziert. Bisherige Einzelzellversuche mit Veratridin untersuchten die Wirkung der Substanz auf Ionenkanalebene (Sunami et al. 1993, Ulbricht 1998). Weitere prüften die Arrhythmogenität an isolierten Herzen des Meerschweinchens (Milberg et al. 2005, Gerhardy et al. 1998). Es existieren jedoch keine Versuche, in denen die Aktionspotentialdauer in isolierten Einzelzellen des Meerschweinchens untersucht wurde, so dass das hier eingesetzte LQTS3-Modell keinem etablierten Modell entspricht. Auffällig ist, dass die Verlängerung des Aktionspotentials deutlich ausgeprägter als im LQTS1- und LQTS2-Modell ist. Eine weitere Substanz, die zur Induktion des LQTS3-Modells verwendet wird ist ATX-II (Anemonia Toxin-II). In ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens bewirkte ATX-II ebenfalls stark ausgeprägte Verlängerungen der Aktionspotentialdauer (Nisho et al. 1991, Shimizu & Antzelevitch 2000). Aufgrund der mangelnden Studienlage des pharmakologische LQTS3-Modells und der niedrigen Prävalenz im Vergleich zum LQTS1 und LQTS2 wurden die Ergebnisse aus den in vitro Versuchen in den in silico Versuchen nicht verwendet.

4.2. Subtypspezifische Effekte von Droperidol in den LQTS-Modellen

In den in vitro Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte Droperidol subtypspezifische Effekte im LQTS1, 2 und 3-Modell. Im LQTS1 und 3-Modell bewirkte Droperidol (0.6 μM) eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Die bedeutendste Verlängerung wurde im LQTS1-Modell gemessen (32 %, Abbildung 23). Im Gegensatz hierzu bewirkte Droperidol im LQTS2-Modell eine signifikante Verkürzung der Aktionspotentialdauer (12 %, Abbildung 25).

In den Versuchen in Kapitel 3.1.3.1.1. wurde der selektive I_{Kr} -Blocker E4031 in das LQTS1-Modell appliziert. Es konnte nahezu derselbe Effekt auf das Aktionspotential (29 % Verlängerung; Abbildung 24B) beobachtet werden, wie in den Versuchen in Kapitel 3.1.3.1., in denen Droperidol im LQTS1-Modell eine Verlängerung um 32 % (Abbildung 23B) bewirkte. Das Ergebnis dieser Versuche bestätigte bisherige Experimente: Wie E4031 bei 10 μ M entfaltet Droperidol in einem Konzentrationsbereich von 0.6 μ M seinen Haupteffekt als selektiver I_{Kr} Blocker (Schwoerer et al. 2007).

Eine mögliche Erklärung für das subtypspezifische Verhalten von Droperidol kann durch unterschiedlich stark ausgeprägte Repolarisationsphasen gefunden werden. Die ventrikuläre Repolarisation ist überwiegend von den beiden Kaliumstromkomponenten I_{Ks} und I_{Kr} abhängig (Sanguinetti & Jurkiewicz 1990). Bisherige Studien zeigten, dass das LQTS1-Modell definiert ist durch eine Reduktion von I_{Ks} (Zipes 1991). In den in vitro Versuchen dieser Arbeit wird im LQTS1-Modell I_{Ks} nahezu vollständig reduziert (pharmakologische Inhibition durch Chromanol 293B). Infolge dessen ist hier die Repolarisation verstärkt von I_{Kr} abhängig (Bosch et al. 1997, Yang et al. 2004). Das LQTS2-Modell ist definiert durch eine Reduktion von I_{Kr} (Zipes 1991). Die Repolarisationsphase ist hier überwiegend von I_{Ks} abhängig. Im LQTS3-Modell ist keine Komponente des I_{K} an der verzögerten Repolarisation beteiligt, sondern eine fehlende Inaktivierung von I_{Na} bewirkt hier die Verlängerung des Aktionspotentials (Wang et al. 1995).

Die bedeutende Verlängerung des Aktionspotentials im LQTS1-Modell wäre demnach dadurch erklärbar, dass in diesem Modell nach Applikation von Droperidol eine erhebliche Schwächung der repolarisierenden Ströme stattfindet. Abbildung 35 veranschaulicht diese Überlegung. Chromanol 293B bewirkt in diesem Modell eine I_{Ks} Reduktion und somit eine Minderung der Repolarisationskraft (oranger Pfeil). Das Aktionspotential wird verlängert (grün gestricheltes Aktionspotential). Durch weitere Applikation von Droperidol wird zudem I_{Kr} reduziert. In diesem Modell sind beide Komponenten von I_{K} blockiert. Es kommt zu einem deutlichen Überwiegen der depolarisierenden Einwärtsströme, einer deutlichen Verzögerung der Repolarisation und Verlängerung der Aktionspotentialdauer (rot gestricheltes Aktionspotential).

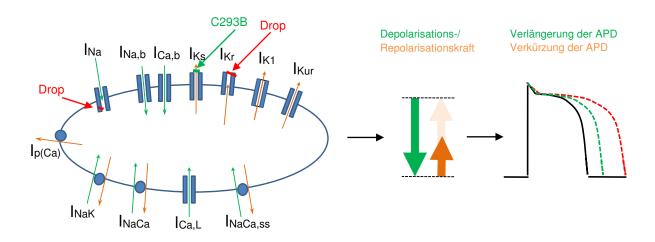


Abbildung 35: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS1-Modell

Chromanol 293B (10 μ M) bewirkt durch eine I_{Ks} Blockade eine Minderung der Repolarisationskraft (oranger Pfeil), das Aktionspotential wird verlängert (grün gestrichelt). Droperidol (0.6 μ M) bewirkt im LQTS1-Modell durch eine I_{Kr} Blockade eine weitere Reduktion der Repolarisationsströme, die Aktionspotentialdauer wird verlängert (rot gestricheltes Aktionspotential). I_{Na} = schneller Natriumstrom, I_{Na,b} = Hintergrundnatriumstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumstrom, I_{p(Ca)} = Calciumpumpe, I_{Ca,b} = Hintergrundcalciumstrom, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichtens, I_{Ku} = einwärtsgleichrichtender Kaliumstrom, I_{Kur} = ultraschneller Kaliumauswärtsstrom, I_{NaK} = Natrium-Kalium Pumpe, Drop = Droperidol, C293B = Chromanol 293B, grüne Pfeile = depolarisierende Einwärtsströme, orange Pfeile = repolarisierende Auswärtsströme, schwarzes Aktionspotential = physiologisches Aktionspotential, grün gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch C293B, rot gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch Droperidol im LQTS1-Modell

Im LQTS2-Modell reduziert E4031 I_{Kr} nahezu vollständig. Durch die entstandene Reduktion der repolarisierenden Kräfte (Abbildung 36; oranger Pfeil) wird die Dauer des Aktionspotentials verlängert (grün gestricheltes Aktionspotential). Da hERG in diesem Modell durch E4031 schon nahezu vollständig blockiert wird, bewirkt Droperidol hier keine weitere I_{Kr} Reduktion. In den in vitro Versuchen wird eine Aktionspotentialverkürzung beobachtet (rot gestricheltes Aktionspotential). Dieser Effekt ist z.B. durch eine Blockade von depolarisierenden Austauschsystemen erklärbar. Beispielhaft wurde in dieser Abbildung eine Droperidolinteraktion mit I_{Na} gewählt. I_{Ks} scheint in diesem Modell die I_{Kr} Reduktion relativ gut kompensieren zu können, so dass dies zu der Annahme führt, dass bei erhaltenem I_{Ks} eine zusätzliche I_{Kr} Blockade keine wesentliche Auswirkung auf die Repolarisationsverzögerung hat.

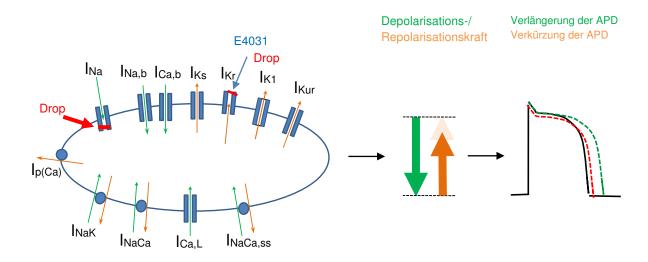


Abbildung 36: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS2-Modell

E4031 (10 μ M) bewirkt durch eine I_{Kr} Blockade eine Reduktion der Repolarisationsströme und somit Verlängerung des Aktionspotentials. Droperidol bewirkt im LQTS2-Modell keine weitere Verlängerung des Aktionspotentials. Das Aktionspotential wird verkürzt. I_{Na} = schneller Natriumstrom, I_{Na,b} = Hintergrundnatriumstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumstrom, I_{p(Ca)} = Calciumpumpe, I_{Ca,b} = Hintergrundcalciumstrom, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = einwärtsgleichrichtender Kaliumstrom, I_{Kur} = ultraschneller Kaliumauswärtsstrom, I_{NaK} = Natrium-Kalium Pumpe, Drop = Droperidol, C293B = Chromanol 293B, grüne Pfeile = depolarisierende Einwärtsströme, orange Pfeile = repolarisierende Auswärtsströme, schwarzes Aktionspotential = physiologisches Aktionspotential, grün gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch E4031, rot gestricheltes Aktionspotential = verkürztes Aktionspotential bewirkt durch Droperidol im LQTS2-Modell.

Im LQTS3-Modell bewirkt Veratridin durch eine verminderte Inaktivierung von I_{Na} eine Stärkung der Depolarisationskräfte (Abbildung 37; grüner Pfeil). Das Aktionspotential wird verlängert (grün gestricheltes Aktionspotential). Droperidol bewirkt in diesem Modell eine I_{Kr} Blockade. Hierdurch werden die Repolarisationskräfte geschwächt (oranger Pfeil) und das Aktionspotential verlängert (rot gestricheltes Aktionspotential). Scheinbar ist in diesem Modell die zweite Komponente des I_{Ks} , der I_{Ks} , in der Lage die Repolarisation zu gewährleisten. Die Aktionspotentialverlängerung in diesem Modell ist gegenüber dem LQTS1-Modell geringer ausgeprägt.

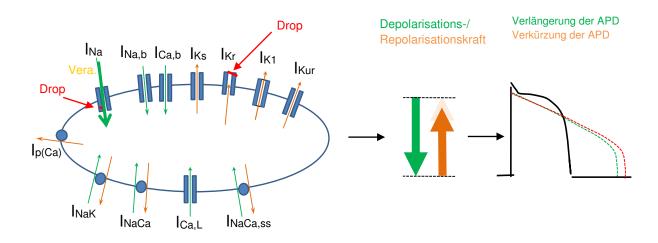


Abbildung 37: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS3-Modell

Veratridin (0.5 μ M) bewirkt durch eine verminderte I_{Na}-Inaktivierung eine Stärkung der Depolarisationsströme (grüner Pfeil), das Aktionspotential wird verlängert (grün gestrichelt). Droperidol (0.6 μ M) bewirkt im LQTS3-Modell durch eine I_{Kr}-Blockade eine Reduktion der Repolarisationsströme, die Aktionspotentialdauer wird verlängert.

 I_{Na} = schneller Natriumstrom, $I_{Na,b}$ = Hintergrundnatriumstrom, I_{Ca-L} = L-Typ Calciumstrom, $I_{p(Ca)}$ = Calciumpumpe, $I_{Ca,b}$ = Hintergrundcalciumstrom, I_{Kr} = schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{Ks} = langsam aktivierende Komponente des verzögerten Kaliumauswärtsgleichrichters, I_{K1} = einwärtsgleichrichtender Kaliumstrom, I_{Kur} = ultraschneller Kaliumauswärtsstrom, I_{NaK} = Natrium-Kalium Pumpe, Drop = Droperidol, C293B = Chromanol 293B, grüne Pfeile = depolarisierende Einwärtsströme, orange Pfeile = repolarisierende Auswärtsströme, schwarzes Aktionspotential = physiologisches Aktionspotential, grün gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch Veratridin, rot gestricheltes Aktionspotential = verlängertes Aktionspotential bewirkt durch Droperidol im LQTS3-Modell.

Aus den beschriebenen Überlegungen wurden folgende Schlussfolgerungen abgeleitet. Zum einen, dass bei alleiniger I_{Kr} Blockade der I_{Ks} den Verlust der Repolarisationskraft I_{Kr} relativ gut kompensieren kann. Des Weiteren dass eine I_{Ks} Reduktion (wie im LQTS1) eine besondere Gefahr für die Applikation von Droperidol darstellt, da hierunter eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer auftreten könnte. Zudem läßt die Verkürzung der Aktionspotentialdauer im LQTS2-Modell vermuten, dass das subtypische Verhalten von Droperidol nicht alleine durch den I_{K} erklärbar ist, sondern, dass weitere Interaktionen existieren, z.B. mit depolarisierenden Strömen, wie schon in der Literatur vorgeschlagen (Carmeliet et al. 1976, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971, Mironneau et al. 1975, Shiga et al. 2005).

4.3. Interaktionen von Droperidol mit depolarisierenden Ionenströmen

Um weitere bisher nicht identifizierte Ionenkanalinteraktionen von Droperidol näher zu analysieren, wurde in dieser Arbeit eine computergestützte Simulation, basierend auf dem Luo-Rudy-dynamic-Modell, angewendet (Luo et al. 2008, Schwoerer et al. 2007, Siebrands et al. 2006)

In dieser Simulation wurde die Eigenschaft von Droperidol als I_{Kr} Inhibitor mit weiteren potentiellen Interaktionen der Substanz kombiniert. Hierfür wurden Ionenströme gewählt, welche die zelluläre Depolarisation beeinflussen (I_{Na} , I_{Ca-L} , I_{NaK} , und I_{NaCa}) (Adamantidis et al. 1993, Carmeliet et al. 1976, Drolet et al. 1999, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971, Mironneau et al. 1975, Schwoerer et al. 2007, Shiga et al. 2005) und deren Strömstärken in dem Luo-Rudy-dynamic-Modell gut reduzierbar sind.

Die Ergebnisse der computergestützten Simulation dieser Arbeit zeigen, dass als potentielles pharmakologisches Ziel neben I_{Kr} auch I_{Ca-L} , I_{NaCa} , und I_{NaK} in Frage kommen. Eine Interaktion mit dem I_{Ca-L} wurde bisher schon vorgeschlagen (Adamantidis et al. 1993, Mironneau et al. 1975, Schwoerer et al. 2007, Shiga et al. 2005) und ist in dieser Kombination schon von anderen Pharmaka wie Verapamil bekannt (Shiga et al. 2005). Nach der computergestützten Simulation könnten auch I_{NaK} und I_{NaCa} ein potentielles Ziel von Droperidol darstellen. Bisherige Studien diskutierten I_{Na} als molekulares Ziel von Droperidol (Carmeliet et al. 1976, Hauswirth 1968, Kern et al. 1971). Das Ergebnis der durchgeführten Simulation spricht jedoch gegen den bisher in der Literatur beschriebenen Verdacht. Eine I_{Kr} Blockade in Kombination mit einer I_{Na} Blockade bewirkte in LQTS1-Myozyten zwar eine Verlängerung, in LQTS2-Myozyten jedoch keine Verkürzung der Aktionspotentialdauer.

Allgemein wurde in dieser Simulation davon ausgegangen, dass die unbekannte Interaktion von Droperidol eine Reduktion der Depolarisationsströme bewirkt. Denkbar wäre jedoch auch z.B. eine Aktivierung von repolarisierenden Strömen. Für diese Arbeit wurden nicht beliebig viele Simulationen mit unterschiedlichen Stromkomponenten durchgeführt. So wurde beispielsweise auch auf aktivierende Effekte bzw. auf die Kombination von vier oder noch mehr Kanalinteraktionen verzichtet. Daher ist nicht auszuschließen, dass Droperidol noch mit weiteren Ionenaustauschsystemen interagiert. Ebenfalls berücksichtigt werden muss, dass Droperidol weitere Effekte haben könnte, die indirekt auf die Elektrophysiologie wirken, beispielsweise könnte es die Puffereigenschaften im Zytosol ändern.

4.4. Methodenkritik

4.4.1. Das pharmakologisch induzierte LQTS-Modell im Meerschweinchen

Für die in vitro Versuche dieser Arbeit wurden isolierte linksventrikuläre Kardiomyozyten des Meerschweinchens verwendet. Da die Versuche unter kontrollierten Bedingungen außerhalb des Organismus in isolierten Einzelzellen durchgeführt wurden, sind sie nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragbar. Wie der Organismus Herz als Zusammenschluss vieler Einzelzellen unter physiologischen Bedingungen reagiert, lässt sich aus diesen Versuchen nicht direkt ableiten. Zudem kommt, dass sie in der Spezies Meerschweinchen durchgeführt wurden. Es bestehen erhebliche Unterschiede zwischen dem Herzen des Menschen und dem des Meerschweinchens. Offensichtlich ist die unterschiedliche Herzgröße, woraus resultiert, dass die Herzfrequenz des Meerschweinchens mit 270-300/ Minute in Ruhe viel schneller ist als die des Menschen (60-90/ Minute). Dieses Resultat spiegelt wieder, dass Unterschiede in der Ionenkanalausstattung existieren. Vergleicht man z.B. die Aktionspotentialkonfiguration von Mensch und Meerschweinchen, so sind Unterschiede in der frühen Repolarisationsphase erkennbar (Abbildung 38).

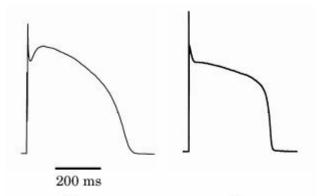


Abbildung 38: Aktionspotentialkonfiguration von Mensch und Meerschweinchen

Aufzeichnung von Aktionspotentialen in isolierten Kardiomyozyten verschiedener Spezies (Mensch links und

Meerschweinchen rechts). Unterschiede findet man während der frühen Phase der Repolarisation. Das menschliche

Aktionspotential weist hier die charakteristische Kerbe, die durch I_{to} vermittelt wird, auf. Abbildung modifiziert nach (Kääb

& Näbauer 2001).

Die charakteristische Kerbe im menschlichen Aktionspotential wird durch die Existenz von I_{to} verursacht, der hier eine Frühdepolarisation bewirkt. Dieser Ionenstrom existiert nicht im Meerschweinchen, stellt aber ein potentielles pharmakologisches Ziel von Droperidol dar. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Auswirkung einer I_{to} Blockade auf das Aktionspotential stellt beim Menschen jedoch eine untergeordnete Rolle dar, so dass dieser Unterschied in der Stromexistenz kein maßgeblicher Faktor ist. Ein maßgeblich bestimmender Vorteil des hier angewendeten Tiermodells ist, dass die regionale Verteilung von I_{Ks} und I_{Kr} mit dem menschlichen Herzen vergleichbar ist (Bryant et al. 1997, Davie et al. 2004). So stellt das zelluläre Modell des Meerschweinchens heute ein etabliertes Modell dar, um mögliche pharmakologisch induzierte QT-Verlängerungen zu untersuchen (Davie et al. 2004). Die in dieser Arbeit erhobenen Aktionspotentialverlängerungen können somit als ein Maßparameter angesehen werden, um mögliche QT-Verlängerungen und damit auch das Auftreten von tödlichen Arrhythmien beim Menschen abzuschätzen. Zu berücksichtigen dabei ist jedoch, dass die relative Bedeutung von I_{Kr} und I_{Ks} für die menschliche Repolarisation nicht ausreichend geklärt ist,

während im Meerschweinchen der Beitrag für den Ablauf der Repolarisation von I_{Kr} und I_{Ks} als nahezu identisch beschrieben wird (Sanguinetti & Jurkiewicz 1990).

Die LQTS-Modelle wurden in dieser Arbeit pharmakologisch induziert. Das pharmakologisch induzierte LQTS1 und LQTS2 stellt jeweils ein etabliertes Modell in Meerschweinchenmyozyten dar (Bosch et al. 1998, Sanguinetti et al. 1991). Dahingegen wurden noch keine LQTS-Modelle an transgenen Meerschweinchen in der Literatur beschrieben, lediglich an transgenen Hasen (Odening et al. 2008). Die Verwendung des pharmakologischen LQTS in dieser Arbeit ist als Vorteil anzusehen, wenn man bedenkt, dass hierdurch das für die Klinik relevantere, erworbene LQTS imitiert wird, wie es auch durch den Einsatz von Droperidol in der Anästhesie hervorgerufen werden kann.

4.4.2. Die Entstehung von Arrhythmien

Die Entstehung von Herzrhythmusstörungen ist sehr komplex. Es existieren mehrere Modellvorstellungen zur Arrhythmogenese auf zellulärer und molekularer Ebene. Diese Arbeit stützt sich auf die Theorie, dass ein verlängertes Aktionspotential frühe Nachdepolarisationen verursacht und diese über ein Reentry Mechanismus TdP-Arrhythmien auslösen (Marban 2002, Marban et al. 1986, Roden 2004). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben dieser Theorie Modellvorstellungen Arrhythmogenese noch weitere zur existieren, z.B. Aktionspotentialverkürzung, wie beim Short QT-Syndrom (Saenen & Vrints 2008). Zudem muss gesagt werden, dass weder beim Menschen noch im Tiermodell ein fixer Grenzwert die Aktionspotentialdauer beschrieben wird, ab dem Arrhythmien auftreten. Daher wird die Dauer des Aktionspotentials in dieser Arbeit als Maß für die prinzipielle Wirkung von Droperidol genommen. Dabei wird angenommen je länger die Aktionspotentialdauer, desto höher die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien bewirkt durch Droperidol. Genauere Aussagen über die Entstehung von Arrhythmien kann anhand der erhobenen Ergebnisse nicht gemacht werden. Um weiterführende Informationen über das Auftreten von Arrhythmien durch Droperidol zu bekommen, sind weitere in vivo-Studien, z.B. am Meerschweinchen nötig. Dabei sollte die Wirkung von Droperidol anhand von EKG-Aufzeichnungen (QT-Zeit, Arrhythmien) in vivo LQTS-Modell analysiert werden.

4.4.3. Droperidol in antiemetischer Dosierung

Die Dosierung, in der Droperidol für eine antiemetische Therapie bei Patienten eingesetzt wird, beträgt 0.625-1.25 mg. In den in vitro Versuchen dieser Arbeit bewirkte Droperidol in einer Konzentration von 0.6 µM eine relevante Aktionspotentialverlängerung im LQTS1 und LQTS3-Modell. Um die Ergebnisse der in vitro Versuche dieser Arbeit für den Menschen diskutieren zu können und um dabei speziell der Frage nachzugehen, ob eine antiemetische Konzentration möglicherweise kardiotoxisch wirkt, orientiert sich die in den in vitro Versuchen dieser Arbeit eingesetzte Konzentration an der klinischen freien Plasmakonzentration. In bisher veröffentlichten Studien zur Evaluation der Pharmakokinetik von Droperidol wurde die freie Plasmakonzentration unter Einsatz einer antiemtischen Dosierung bestimmt. Es ergab sich, dass Droperidol in antiemetischer Konzentration annäherungsweise eine freie Plasmakonzentration von 0.03 µM

erreicht (Fischler et al. 1986, Lehmann et al. 1988). Der in den in vitro Versuchen dieser Arbeit eingesetzte Konzentrationsbereich von 0.6 µM liegt um das Zehnfache über der zu erwartenden Plasmakonzentration in der Klinik. Dieser Faktor ist zu vernachlässigen, wenn man bedenkt, dass die tatsächliche klinische Konzentration individuell und nicht immer eindeutig bestimmbar ist, so dass der eingesetzte Konzentrationsbereich in der Klinik durchaus vorstellbar ist.

4.5. Implikationen

Nachdem QT-Verlängerungen und lebensbedrohliche Arrhythmien im Zusammenhang mit der Applikation von Droperidol bekannt wurden, hat die FDA 2001 Droperidol für Patienten mit einem LQTS als kontraindiziert erklärt (Scuderi 2003). Diese Erklärung blieb umstritten (Habib & Gan 2008, Ludwin & Shafer 2008).

In den Versuchen dieser Arbeit zeigte Droperidol in Meerschweinchenkardiomyozyten eine subtypspezifische Wirkung auf das ventrikuläre Aktionspotential im LQTS1-, LQTS2- und LQTS3-Modell. Eine bedeutende Verlängerung der Aktionspotentialdauer war im LQTS1-Modell messbar. Geht man davon aus, dass eine Aktionspotentialverlängerung eine mögliche Ursache für die Entstehung von Arrhythmien darstellt, so deutet dies darauf hin, dass bei Verabreichung von Droperidol hinsichtlich der Wirkung zwischen den LQTS-Subtypen differenziert werden sollte. Die Applikation von Droperidol oder anderen I_{Kr} blockenden Substanzen stellt möglicherweise ein besonderes Risiko für eine Verlängerung des QT-Intervalls und die Entstehung von TdP bei angeborenen oder erworbenen LQTS1 gegenüber Patienten ohne I_{Ks} Defiziet dar. Auf der Basis dieser erhobenen Daten und Interpretation ist die von der FDA erklärte Kontraindikation bezüglich Droperidol bei LQTS-Patienten nicht gerechtfertigt. Generell sollte Droperidol mit großer Vorsicht verwendet werden, da die Wirkung der Substanz auf zellulärer Ebene nicht ausreichend geklärt ist. Jedoch scheint für die Anwendung bei LQTS-Patienten viel mehr eine subtypspezifische Herangehensweise gerechtfertigt zu sein, anstelle einer generellen Kontraindikation (Ludwin & Shafer 2008).

Um einem subtypspezifischen Management von LQTS-Patienten in der Anästhesie gerecht zu werden, müssen potentielle Triggerfaktoren für Arrhythmien gemieden werden. Ein besonders hohes Risiko stellen Pharmaka dar, die mit kardialen Ionenkanälen interagieren. Um diese sicher bei LQTS-Patienten einsetzen zu können, ist die genaue Kenntnis der zellulären Wirkungsweise vor der Verwendung essentiell, genauso wie die Kenntnis des Subtyps. Da sich die Subtypbestimmung anhand der T-Wellenmorphologie im EKG hierfür nicht bewähren konnte, sollte ein größerer Schwerpunkt auf die genetische Subtypbestimmung v.a. im präoperativen Kontext gelegt werden. Allerdings sind dieser Diagnostik bisher Grenzen gesetzt. Aktuell gelingt es nur bei 70 % der LQTS-Patienten den Subtyp zu bestimmen. Um einen sicheren Gebrauch von Pharmaka bei LQTS-Patienten zu gewährleisten, sind weitere Experimente notwendig, die in Zukunft eine sichere Subtypbestimmung gewährleisten.

5. ANHANG

5.1. Zusammenfassung

Das Long QT-Syndrom ist eine Ionenkanalerkrankung des Herzen, die durch das Auftreten von Torsade de Pointes Arrhythmien (TdP) sowie den plötzlichen Herztod gekennzeichnet ist. Es existiert eine kongenitale sowie eine erworbene Form. Für das kongenitale LQTS sind mehrere Subtypen bekannt. Die drei häufigsten sind die Subtypen LQTS1, LQTS2 und LQTS3. Das erworbene LQTS wird durch eine Vielzahl von Medikamenten, welche die zelluläre Repolarisation beeinflussen, ausgelöst. Eine besondere Herausforderung stellt das LQTS daher im perioperativen Management dar. Droperidol, ein hochpotentes Antiemetikum, gilt als Mittel der Wahl in der Anästhesie zur Prophylaxe von postoperative nausea and vomiting (PONV; engl. = postoperative Übelkeit und Erbrechen). Die genaue Wirkung von Droperidol auf zellulärer Ebene ist aufgrund von komplexen Ionenkanalinteraktionen bisher nicht eindeutig identifiziert worden. In Diskussion steht eine kardiotoxische Wirkung der Substanz generell und vor allem auch bei Patienten mit LQTS.

In der vorliegenden Arbeit wurde in vitro der Effekt von Droperidol auf das ventrikuläre Aktionspotential nativer Kardiomyozyten sowie auf die pharmakologisch induzierten LQTS-Modelle -1,-2 und -3 untersucht. Desweiteren wurden potentielle Ionenkanalinteraktionen von Droperidol durch computergestützte Simulationen nach dem Luo-Rudy-Modell in silico näher analysiert. In dem in vitro Zellmodell bewirkte Droperidol in nativen Myozyten einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Aktionspotentialdauer. In niedrigen Konzentrationen (0.1 μM – 0.6 μM) kam es zu einer Aktionspotentialverlängerung, in höheren Konzentrationen (1 μM) zu einer Verkürzung. Dabei wurde in einer Konzentration von 0.6 μM die bedeutendste Verlängerung der Aktionspotentialdauer gemessen (28 %). In dieser Konzentration bewirkte Droperidol unterschiedliche Effekte auf die Aktionspotentialdauer im LQTS1-, LQTS2- und LQTS3-Modell. Im LQTS1-Modell kam es zu einer signifikanten Verlängerung der Aktionspotentialdauer um 32 %, im LQTS3-Modell zu einer signifikanten Verlängerung um 13 % und im Gegensatz dazu im LQTS2-Modell zu einer signifikanten Verkürzung um 12 %. Die Ergebnisse der Computersimulation unterstützen die bisher veröffentliche Theorie, dass Droperidol neben einer potenten IKr Blockade auch Einfluss auf depolarisierende Ionentransportsysteme, wie z.B. I_{Ca-L}, I_{NaCa} und I_{NaK} ausübt.

Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte Droperidol hinsichtlich Aktionspotentialdauer eine subtypspezifische Wirkung in den LQTS-Typen 1-3. Die bedeutendste Verlängerung der Aktionspotentialdauer wurde im LQTS1-Modell gemessen. Demnach scheint die durch Droperidol bewirkte I_{Kr} Blockade unter I_{Ks} Defizit (LQTS1) ein besonders hohes Risiko eine Aktionspotentialverlängerung darzustellen. Der Einfluss auf depolarisierende Ionentransportsysteme scheint in dem Moment eine untergeordnete Rolle zu spielen. Da die Aktionspotentialverlängerung in der Arrhythmogenese von TdP einen entscheidenden Faktor einnimmt, scheint demnach die kardiotoxische Nebenwirkung von Droperidol bei LQTS-Patienten vom Subtyp abhängig zu sein. Demzufolge sollte im Kontext des präoperativen Managements ein größerer Schwerpunkt auf die genetische Subtypbestimmung von LQTS-Patienten gelegt werden.

5.2. Literaturverzeichnis

- Ackermann M (1998) The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clinic Proceedings*. 73: 250-69.
- Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF, Dupuis BA (1993) Droperidol exerts dual effects on repolarization and induces early afterdepolarizations and triggered activity in rabbit Purkinje fibers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 266: 884-93.
- Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Noda T, Miyoshi S, Ding WG, Zankov DP, Toyoda F, Matsuura H, Horie M, Sunagawa K (2005) Cellular and ionic mechanism for drug-induced long QT syndrome and effectiveness of verapamil. *Journal of the American College of Cardiology*. 45: 300-7.
- Anton D, Friederich P (2010) automated perioperative QT monitoring in a patient with long QT syndrome 2. *British Journal of Anaesthesia*. 105: 701-2.
- Antzelevitch C (2001) Molecular basis for the transmural distribution of the transient outward current. *The Journal of Physiology*. 533: 1.
- Antzelevitch C (2007) Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 293: H2024-H38.
- Antzelevitch C, Olivia A (2006) Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes. *Journal of Internal Medicine*. 259: 48–58.
- Arizona Center of Education and Research on Therapeutics. QT-Drug lists. [Online im Internet.] URL: http://www.azcert.org/medical-pros/drug-lists/drug-lists.cfm [Stand: 24.02.2013, 17:17).
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1995) K(V) LQT1 and lsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature*. 384:78-80.
- Baum VC (1993) Distinctive effects of three intravenous anesthetics on the inward rectifier (I_{K1}) and the delayed rectifier (I_{K}) potassium currents in myocardium: implications for the mechanism of action. *Anesthesia & Analgesia*. 76: 18-23.
- Booker PD, Whyte SD, Ladusans EJ (2003) Long QT syndrome and anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*. 90: 349-66.
- Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S (1998) Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*. 38: 441–50.

- Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G (1997) Regional differences in electrical and mechanical properties of myocytes from guinea-pig hearts with mild left ventricular hypertrophy. *Cardiovascular Research*. *35*: 315–23.
- Buljubasic N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ (1996) Differential effects of etomidate, propofol, and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. *Anesthesiology*. 85: 1092-9.
- Carmeliet E, Xhonneux R, Van Glabbeek A, Reneman R (1976) Electrophysiological effects of droperidol in different cardiac tissues. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 293: 57-66.
- Cha A, Ruben PC, George AL Jr, Fujimoto E, Bezanilla F (1999). Voltage sensors in domains III an IV, but I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation.
- Clancy C, Kurokawa J, Tateyama M, Wehrens X, Kass R (2003) K⁺ channel structure-activity relationships and mechanisms of drug-induced QT prolongation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43: 441-61.
- Crotti L, Celano G, Dagradi F, Schwartz PJ (2008) Congenital long QT syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 3: 18.
- 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. *Journal of Cardiovascular Elektrophysiology*. 15: 1302–9.
- Doerr T, Denger 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. *Pflügers Archiv: European Journal of physiology.* 416: 230–7.
- Drolet B, Zhang S, Deschênes D, Rail J, Nadeau S, Zhou Z, January CT, Turgeon J (1999) Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 10: 1597-604.
- Fischler M, Bonnet F, Trang H, Jacob L, Levron JC, Flaisler B, Vourc'h G (1986) The pharmacokinetics of droperidol in anesthetized patients. *Anasthesiology*. 64: 486-9.
- Gan TJ, Meyer T, Apfel CC, Chung F, Davis PJ, Eubanks S, Kovac A, Philip BK, Sessler DI, Temo J, Tramer MR, Watcha M (2003) Consensus guidelines for managing postoperative nausea and vomiting. *Anesthesia and analgesia*. 97: 62-71.
- Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin- insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 89: 554-8.
- Gerhardy A, Scholtysik G, Schaad A, Haltiner R, Hess T (1998) Generating and influencing Torsades de Pointes like polymorphic ventricular tachycardia in isolated guinea pig hearts. *Basic Research in Cardiology*. 93: 285-94.

- Goldenberg I, Moss AJ (2008) Long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 51: 2291-300.
- Guy JM, André-Fouet X, Porte J, Bertrand M, Lamaud M, Verneyre H (1991) Torsades des pointes and prolongation of the duration of QT- Intervall after injektion of droperdidol. *Annales de cardiologie et dangeiologie.* 40: 541-5.
- Habib AS, Gan TJ (2003) Food and drug administration black box warning on the perioperative use of droperidol: a review of the cases. *Anesthesia & Analgesia*. 96: 1377–9.
- Habib AS, Gan TJ (2008) Pro: The Food and Drug Administration Black box warning on droperidol is not justified. *Anesthesia & Analgesia*. 106: 1414-7.
- Hamil O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Archiv.* 391: 85-100.
- Hauswirth O (1968) Effects of Droperidol on sheep Purkinje fibers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 261: 133-42.
- Hiraoka M, Sunami A, Fan Z, Sawanobori T (1992) Multiple Ionic Mechanisms of Early Afterdepolarizations in Isolated Ventricular Myocytes from Guinea-pig Hearts. *Annals of the New York Academy of Science*. 644: 33-47.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP (2005) The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology*. 20: 408-16.
- Kääb S, Näbauer M (2001) Diversity of ionchannel expression in health and disease. European Heart Journal Supplements. 3: K31-K40.
- Kanters J, Fanoe S, Larsen L, Bloch Thomsen P, Toft E, Christiansen M (2004) T wave morphology analysis distinguishes between KvLQT1 and HERG mutations in long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 1: 293-4.
- Karle CA, Zitron E, Zhang W, Kathöfer S, Schoels W, Kiehn J (2001) 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. Cardiovascular Research. 53: 355-62.
- Katz RI (2005) Some points regarding anesthesia for patients with congenital long QT syndrome. *Anesthesiology. 103*: 1315-16.
- Kern R, Einwächter HM, Haas HG, Lack EG (1971) Cardiac membrane currents as affected by an neuroleptic agent: droperidol. *Pflugers Archiv.* 325: 262-78.
- Kies SJ, Pabelick CM, Hurley HA, White RD, Ackerman MJ (2005) Anesthesia for patients with congenital long QT Syndrome. Anesthesiology. 102: 204-10.
- Keating MT, Sanguinetti MC (2001). Mollecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell.* 104: 569-80.

- Kim H, Lee J, Park I, Lee M (2010) Long QT syndrome provoked by induction of general anesthesia A case report -. *Korean J Anesthesiology*, 59: 114-18.
- Kuenszberg E, Loeckinger A, Kleinsasser A, Lindner KH, Puehringer F, Hoermann C (2000) Sevoflurane progressively prolongs the QT interval in unpremedicated female adults. *European Journal of Anaesthesiology.* 17: 662–4.
- Lehmann KA, Van Peer A, Ikonomakis M, Gasparin R, Heykants J (1988) Pharmacokinetics of droperidol in surgical patients under different conditions of anesthesia. *Br J Anaesth*. 61: 297-301.
- Ludwin DB, Shafer SL (2008) Con: The black box warning on droperidol should not be removed (but should be clarified!). *Anesthesia & Analgesia*. *106*: 1418-20.
- Luo CH, Rudy Y (1991) A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circulation Research*. 68: 1501-26.
- Luo T, Luo A, Liu M, Liu X (2008) Inhibition of the HERG channel by droperidol depends on channel gating and involves the S6 residue F656. *Anesthesia & Analgesia*. 106: 1161-70.
- Main M, Bryant S, Hart G (1998) Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes *Experimental Physiology*. 83: 747-61.
- Mandal B, Kaur G, Batra YK, Mahajan S (2011) Manifestation of Long QT syndrome with normal QTc interval under anesthesia: a case report. *Paediatric Anaesthesia*. 21: 1265-7.
- Marban E (2002) Cardiac channelopathies. *Nature*. 415: 213-8.
- Marban E, Robinson S, Wier W (1986). Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *Journal of Clinical Investigation*. 78: 1185-92.
- McKeage K, Simpson D, Wagstaff AJ (2006) Intravenous droperidol: a review of its use in the management of postoperative nausea and vomiting. *Drugs*. 66: 2123-47.
- Meissner F (1856). Taubstummheit und Taubstummenbildung. Leipzig, Heidelberg. Winter, 119-120.
- Milberg P, Reinsch N, Wasmer K, Mönning G, Stypmann J, Osada N, Breithardt G, Haverkamp W, Eckardt L (2005) Transmural dispersion of repolarization as a key factor of arrhythmogenicity in a novel intact heart model of LQT3. *Cardiovascular Research*. 65: 397-404.
- Mironneau C, Mironneau J, Grosset A (1975) [Action of droperidol on the ionic currents and the contraction of the sino-auricular fiber of frogs. Study of its anti-arrhythmic properties]. *Journal of Physiology (Paris)*. 70: 27-39.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC (1999). Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem.* 9: 201-16.

- Mitcheson J, Hancox J (1999) An investigation of the role played by the E-4031-sensitive (rapid delayed rectifier) potassium current in isolated rabbit atrioventricular nodal and ventricular myocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 438: 843-50.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC (2000a) A structural basis for druginduced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 12329-33.
- Mitcheson JS, Chen J, Sanguinetti MC (2000b). Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the hERG potassium channel activation gate. J Gen Physiol. 115: 229-40.
- Molecular Cardiology Laboratories of the IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Cardiovascular Genetics Program of the New York University School of Medicine (2010). The Gene connection for the heart. Genetic mutations and inherited arrhythmias. [Online im Internet.] URL: http://www.fsm.it/cardmoc/ [Stand: 24.02.2013, 14:14].
- Morita H, Wu J, Zipes DP (2008) The QT syndromes: long and short. Lancet. 372: 750-63.
- Moss AJ, Robinson JL, Gessman L, Gillespie R, Zareba W, Schwartz PJ, Vincent GM, Benhorin J, Heilbron EL, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Zhang L, Mediana A, Andrews ML, Timothy K (1999) Comparison of clinical and genetic variables of cardiac events associated with loud noise versus swimmingamong subjects with the long QT syndrome. *Am J Cardiol.* 84: 876–9.
- Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH (1995) ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation*. *92*: 2929-34.
- Moss, A., Zareba, W., Hall, W., Schwartz, P., Crampton, R., Benhorin, J., et al. (2000). Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 101, S. 616-23.
- Muramatsu H, Kiyosue T, Arita M, Ishikawa T, Hidaka H (1994) Modification of cardiac sodium current by intracellular application of cAMP. Pflügers Archiv: *European journal of physiology*. 426: 146-54
- Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 260: 799 802.
- Nutall GA, Eckermann KM, Jacob KA, Pawlaski EM, Wigersma SK, Marienau ME, Oliver WC, Narr BJ, Ackermann MJ (2007) Does low-dose droperidol administration increase the risk of drug-induced QT prolongation and torsade de pointes in the general surgical population? *Anesthesiology.* 107: 531-6.
- Odening KE, 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. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 295: H2264-72.
- Pfizenmayer H, Friederich P (2010) [Perioperative monitoring of the QT interval]. Anesthesist. 59:633-5.

- Priori SG, Napolitano C, Cantu F, Brown AM, Schwartz PJ 1996 Differential response to Na⁺ channel blockade, beta-adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the SCN5A and HERG defects present in the long-QT syndrome. *Circulation Research*. 78: 1009-15.
- Roden D (2004) Drug-induced prolongation of the QT-interval. *The New England Journal of Medicine*, 350: 1013-22.
- Roden D (2008) Cellular basis of drug-induced torsades de pointes. *British Journal of Pharmacology*. 154: 1502–07.
- Saenen J, Vrints C (2008). Molecular aspects of the congenital and acquired Long QT Syndrome: clinical implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 44(4): 633-46.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (isK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature*. 384: 80-3.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: hERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell.* 81: 299-307.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz N (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *The Journal of general Physiology*. 96: 195-215.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK, Scott A, Siegl PK (1991). Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circulation Research*. 68: 77-84.
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 440: 463-9.
- Schmeling WT, Warltier DC, McDonald DJ, Madsen KE, Atlee JL, Kampine JP (1991) Prolongation of the QT interval by enflurane, isoflurane, and halothane in humans. *Anesthesia & Analgesia*. 72: 137-44.
- Schwartz PJ, Moss A, Vincent G, Crampton R (1993) Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*. 88: 782-84.
- Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. (1975) The long QT syndrome. *American Heart Journal*. 89(3): 378-90.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R (2001) Genotype-phenotype correlation in the Long-QT syndrome: gene-specific triggers for lifethreatening arrhythmias. *Circulation*. 103: 89-95.

- Schwartz PJ, 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, Rosatio E, Salice P, Spazzolini C (2009) Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 120: 1761-7.
- Schwoerer AP, Blütner C, Brandt S, Binder S, Siebrands CC, Ehmke H (2007) Molecular interaction of droperidol with human ether-a-go-go-related gene channels: prolongation of action potential duration without inducing early afterdepolarization. *Anesthesiology* 105: 967-76.
- Scuderi PE (2003) Droperidol: many questions a few answers. *Anesthesiology*. 98: 289-90.
- Shiga T, Yong S, Carino J, Murray PA, Damron DS (2005) Droperidol inhibits intracellular Ca²⁺, myofilament Ca²⁺ sensitivity, and contraction in rat ventricular myocytes. *Anesthesiology*. 102: 1165-73.
- Shimizu W, Antzelevitch C (1997) Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade des pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation.* 96: 2038-47.
- Shimizu W, Antzelevitch C (1998) Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome: effects of beta-adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation*. 98: 2314-22.
- Shimizu W, Antzelevitch C (2000) Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 35: 778-86.
- Shimizu W, Antzelevitch C (2000) Effects of a K(+) channel opener to reduce transmural dispersion of repolarization and prevent torsade de pointes in LQT1, LQT2, and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation.* 102: 706-12.
- Shimizu W, Aiba T, Antzelevitch C (2005) Specific therapy based on the genotype and cellular mechanism in inherited cardiac arrhythmias. Long QT syndrome and burgada syndrome. *Current Paharmaceutical Design.* 11; 1561-72.
- Siebrands CC, Binder S, Eckhoff U, Schmitt N, Friederich P (2006) Long QT 1 mutation KCNQ1A344V increases local anesthetic sensitivity of the slowly activating delayed rectifier potassium current. *Anesthesiology*. 105: 511-20.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 102: 1178-85.
- Studenik CR, Zhou Z, January CT (2001) Differences in action potential and early afterdepolarization properties in LQT2 and LQT3 models of long QT syndrome. *British Journal of Pharmacology*. 132: 85–92.

- Sun, Z., Thomas, G., & Antzelevitch, C. (2001). Chromanol 293B inhibits slowly activating delayed rectifier and transient outward currents in canine left ventricular myocytes. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12, S. 472-8.
- Sunami A, Sasano T, Matsunaga A, Fan Z, Swanobori T, Hiraoka M (1993) Properties of veratridine-modified single Na+ channels in guinea pig ventricular myocytes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 264: H454-H63.
- Suzuki A, Bosnjak Z, Kwok W (2003) The effects of isoflurane on the cardiac slowly activating delayed-rectifier potassium channel in Guinea pig ventricular myocytes. *Anesthesia & Analgesia*. 96: 1308-15.
- Tytgat J (1994) How to isolate cardiac myocytes. Cardiovascular Research. 28: 280-3.
- Ulbricht W (1998) Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology.* 133: 1-54.
- von Olshausen, K. (2005). EKG- Informationen. Steinkopff Darmstadt.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, Long QT syndrome. *Cell.* 80: 805-11.
- Weissenburger J, Funck-Brentano C, Jaillon P, Charbit B (2009) Droperidol and ondansetron in vitro electrophysiological drug interaction study. *Fundam Clin Pharmacol*. 12: 290-304.
- White PF, Song D, Abrao J, Klein KW, Navarette B (2005) Effect of low-dose droperidol on the QT interval during and after general anesthesia: a placebo-controlled study. *Anesthesiology*. 102: 1101–5.
- Wu L, Shryock J, Song Y, Li Y, Antzelevitch C, Belardinelli L (2004) Antiarrhythmic Effects of Ranolazine in a Guinea Pig in Vitro Model of Long-QT Syndrome. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 355: 599-605.
- Yamauchi S, Yamaki M, Watanabe T, Yuuki K, Kubota I, Tomoike H (2002) Restitution properties and occurrence of ventricular arrhythmia in LQT2 type of long QT syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 13: 910-4.
- Yan GX, Wu Y, Liu T, Wang J, Marinchak RA, Kowey PR (2001) Phase 2 early afterdepolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long-QT syndrome: direct evidence from intracellular recordings in the intact left ventricular wall. *Circulation*. 103: 2851-6.
- Yang Z, Shi G, Li C, Wang H, Liu K, Liu Y (2004) Electrophysiologic effects of nicorandil on the guinea pig long QT1 syndrome model. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 15: 815-20.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science*. 251: 939-42.

- Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 419: 35-42.
- Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC, Shen J, Splawski I, Priori SG, Compton SJ, Yanowitz F, Benhorin J, Moss AJ, Schwartz PJ, Robinson JL, Wang Q, Zarebra W, Keating MT, Twobin JA, Napolitano C, Mediana A (2000) Spectrum of ST-Twave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation*. 102: 2849-55.
- Zipes D (1991) The long QT interval syndrome. A Rosetta stone for sympathetic related ventricular tachyarrhythmias. *Circulation*. 84(3): 1414-19.

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Aktionspotential ist die zelluläre Basis des EKGs	
Abbildung 2: Das ventrikuläre Aktionspotential	3
Abbildung 3: Spitzenumkehrtachykardie ("Torsade de Pointes") im EKG	
Abbildung 4: Schematisches Modell des KvLQT1-Kanals	6
Abbildung 5: Schematisches Modell des hERG-Kanals	7
Abbildung 6: Schematisches Modell des Nav1.5-Kanals	
Abbildung 7: Entstehung von TdP-Arrhythmien	
Abbildung 8: Triggerfaktoren für Arrhythmien	
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Wirkung von Droperidol	
Abbildung 10: Abbildung einer kanülierten Aorta mit Herz	23
Abbildung 11: Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration	24
Abbildung 12: Darstellung des Setups	
Abbildung 13: Darstellung der Versuchskammer	
Abbildung 14: Darstellung einer Kardiomyozyte	
Abbildung 15: Auslösung von Aktionspotentialen	
Abbildung 16: Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer von der Temperatur	33
Abbildung 17: Versuchsreihe 1: Droperidol in verschiedenen Konzentrationen	34
Abbildung 18: Aktionspotential mit ausgewählten Analyseparameter	
Abbildung 19: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer	39
Abbildung 20: Effekt von Chromanol 293B auf die Aktionspotentialdauer	
Abbildung 21: Effekt von E4031 auf die Aktionspotentialdauer	
Abbildung 22: Effekt von Veratridin auf die Aktionspotentialdauer	43
Abbildung 23: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS1-Modell	44
Abbildung 24: Effekt von E4031 auf die Aktionspotentialdauer im LQTS1-Modell	45
Abbildung 25: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS2-Modell	46
Abbildung 26: Effekt von Droperidol auf die Aktionspotentialdauer im LQTS3-Modell	47
Abbildung 27: Ventrikuläres Aktionspotential mit beteiligten Ionenströmen	49
Abbildung 28: Modellierung von LQTS1- und LQTS2-Myozyten	50
Abbildung 29: Simulierte Ionenkanalkombinationen in LQTS1-Myozyten	52
Abbildung 30: Effekte der Ionenkanalkombinationen auf die APD90 in LQTS1-Myozyten	52
Abbildung 31: Simulierte Ionenkanalkombinationen in LQTS2-Myozyten	53
Abbildung 32: Effekte der Ionenkanalkombinationen auf die APD90 in LQTS2-Myozyten	54
Abbildung 33: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol in niedrigen Konzentrationen	58
Abbildung 34: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol in höheren Konzentrationen	59
Abbildung 35: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS1-Modell	62
Abbildung 36: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS2-Modell	63
Abbildung 37: Möglicher zellulärer Effekt von Droperidol im LQTS3-Modell	64
Abbildung 38: Aktionspotentialkonfiguration von Mensch und Meerschweinchen	66

5.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kongenitale Subtypen des LQTS	5
Tabelle 2: Perioperatives Management von LQTS-Patienten	17
Tabelle 3: Lösungen / Zellisolation	37
Tabelle 4: Lösungen / Patch-Clamp-Versuche	37
Tabelle 5: Herkunft verwendeter Chemikalien	38
Tabelle 6: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential	40
Tabelle 7: Effekte von Chromanol 293B auf das Aktionspotential	41
Tabelle 8:Effekt von E4031 auf das Aktionspotential	42
Tabelle 9: Effekt von Veratridin auf das Aktionspotential	43
Tabelle 10: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell	44
Tabelle 11: Effekte von E4031 auf das Aktionspotential im LQTS1-Modell	45
Tabelle 12: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS2-Modell	46
Tabelle 13: Effekt von Droperidol auf das Aktionspotential im LQTS3-Modell	47
Tabelle 14: Droperidol in LQTS1- und LQTS2-Myozyten	54
Tabelle 15: Literaturvergleich: Der Effekt von Droperidol auf die APD	57

5.5. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
A	Ampere
AP	Aktionspotential
APA	Aktionspotentialamplitude
APD	Aktionspotentialdauer
APD ₅₀	Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation
APD ₉₀	Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
ca.	circa
C _m	Zellkapazität
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	early after depolarisation; frühe Nachdepolarisation
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FDA	Food and Drug Administration; Amt für Nahrung und Medikamente
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
hERG	Human ether a go go related gene
I	Strom
I _{Ca,L}	L-Typ Calciumeinwärtsstrom
ICH	International Conference on Harmonisation
I _K	verzögerter Kaliumauswärtsgleichrichter
I _{K1}	Kaliumeinwärtsgleichrichter
I _{Kr}	verzögerter Kaliumauswärtsgleichrichter, schnell aktivierende Komponente
Iks	verzögerter Kaliumauswärtsgleichrichter, langsam aktivierende Komponente
I _{Na}	schneller Natriumstrom
I _{to}	transienter Kalium-Auswärtsstrom
I _{to} Kv-Kanäle	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
I _{to} Kv-Kanäle LQTS	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom
I _{to} Kv-Kanäle LQTS mA	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere
I _{to} Kv-Kanäle LQTS mA mg	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm
I _{to} Kv-Kanäle LQTS mA mg mink	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml µmol/I	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml µmol/l ms	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml µmol/l ms mV	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s.	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QTc	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QTc R	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QTc R Rm	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _C R R R _{pip}	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QTc R R R R pip Rs	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _c R R _m R _{pip} R _s SEM	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _C R R _{pip} R _s SEM TdP	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes Torsade de Pointes; Spitzenumkehrtachykardie
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _c R R _m R _{pip} R _s SEM TdP u.a.	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes Torsade de Pointes; Spitzenumkehrtachykardie unter anderem
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _c R R R R pip R S SEM TdP u.a. V	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes Torsade de Pointes; Spitzenumkehrtachykardie unter anderem Spannung
Ito Kv-Kanäle LQTS mA mg mink miRP1 ml μmol/I ms mV MΩ n.s. pA P-Loop PONV QT _c R R _m R _{pip} R _s SEM TdP u.a.	transienter Kalium-Auswärtsstrom spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Long QT-Syndrom Milliampere Milligramm minimal Kaliumchannel; minimaler Kaliumkanal mink related peptide 1; mink ähnliches Peptid 1 Milliliter Micromol pro Liter Millisekunde Millivolt Megaohm nicht signifikant Pikoampere Phosphate- binding loop postoperative nausea and vomiting; postoperative Übelkeit und Erbrechen frequenzkorrigierte QT-Zeit Widerstand Membranwiderstand Pipettenwiderstand Serienwiderstand Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwertes Torsade de Pointes; Spitzenumkehrtachykardie unter anderem

5.6. Danksagung

Ich möchte allen Dank sagen, die mir auf dem Weg, diese Arbeit voranzubringen und abzuschließen zur Seite gestanden haben.

Prof. Dr. Patrick Friederich und Dr. Alexander Schwoerer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas. Dr. Alexander Schwoerer danke ich besonders für die stets zur Verfügung stehende freundliche Betreuung, für die geduldige Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik und die Hilfe bei der Auswertung der Daten. Seine fachliche Unterstützung hat zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Bei Problemen konnte ich mich immer an ihn wenden.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken. Die angenehme Atmosphäre im Institut hat dazu beigetragen, dass mir die Arbeit viel Freude bereitet hat.

Hildegard Steil-Ströhmann und Sigrid Vogel danke ich für die Korrektur der Rechtschreibung.

Von ganzem Herzen danke ich Katrin Mansfeld für die geduldige, liebevolle und konsequente Unterstützung in meinem Leben, die mir auch zur nötigen Ausdauer bei der Erstellung dieser Arbeit verholfen hat.

5.7. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

5.8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 entnommen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

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

Julia Kebernik

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Schwoerer AP, 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. *Anesthesia & Analgesia*. 111: 638-46.