

Aus der
Medizinischen Klinik II
Schwerpunkte Kardiologie und Angiologie
Marienhospital Herne
Klinikum der Ruhr-Universität Bochum
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Trappe

Wirkung von Klasse III Antiarrhythmika
auf den muskarinergen einwärtsgerichtenden Kaliumkanal
atrialer Myozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Marc van Bracht
aus Marl 2006

Dekan: Prof. Dr. med. G. Muhr
Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Trappe
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. L. Pott

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.06.2006

Diese Dissertation ist Herrn Wilhelm Korte gewidmet
1897 – 1993

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Vorbemerkungen	6
1.2. Grundlagen der myokardialen Erregungsausbreitung	7
1.2.1. Das Myokard	7
1.2.2. Das spezifische Erregungsleitungssystem.....	7
1.3. Ionenkanäle und Aktionspotential	9
1.3.1. Grundlagen	9
1.3.2. Das Aktionspotential des Myokards	9
1.3.3. Bedeutung der Ionenkanäle	10
1.3.4. Kaliumkanäle des Herzens	10
1.3.4.1. Einwärtsgleichrichtende Kaliumionenkanäle	11
1.3.4.2. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Herzens	12
1.4. Vorhofflimmern	14
1.4.1. Epidemiologie des Vorhofflimmerns	14
1.4.2. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns.....	15
1.4.3. Formen von Vorhofflimmern	16
1.4.4. Komplikationen des Vorhofflimmerns	17
1.4.5. Therapie des Vorhofflimmerns – Allgemeine Überlegungen..	18
1.5. Antiarrhythmika	19
1.5.1. Antiarrhythmika zur Behandlung von Vorhofflimmern	19
1.5.2. Klasse III Antiarrhythmika.....	19
1.5.2.1. Ibutilide	20
1.5.2.2. Dofetilide	20
1.5.2.3. RP58833.....	22
1.5.2.4. Unerwünschte Wirkungen der Klasse III Antiarrhythmika...	22
2. Methodik	24
2.1. Isolierung und Kultivierung von Vorhofmyozyten	24
2.2. Die „voltage-clamp“ Technik	25
2.3. Standardprotokoll	26
2.4. Irreversible Kanalaktivierung	28
2.5. Aufzeichnung	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide	34
3.1.1. Hemmung des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide 34	
3.1.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide ...	36
3.1.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem Dofetilide auf den $I_{K(ACh)}$ 39	
3.1.4. Hemmung des Agonisten unabhängigen $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide 41	

3.2. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide	41
3.2.1. Hemmung des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide	41
3.2.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide	45
3.2.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem Ibutilide auf den $I_{K(ACh)}$	45
3.3. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch RP58866	46
3.3.1. Hemmung des Agonisten induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP58866 ..	46
3.3.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP 58866 ...	49
3.3.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem RP58866 auf den $I_{K(ACh)}$	52
3.3.4. Hemmung des Adenosin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP58866 ...	52
3.4. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Chromanol 293B	54
4. Diskussion	56
4.1. Klasse III Antiarrhythmika in der Therapie des Vorhofflimmerns	56
4.2. Klasse III Antiarrhythmika und der $I_{K(ACh)}$	57
4.3. Messergebnisse allgemein	58
4.4. Vergleich der substanzspezifischen Ergebnisse	60
4.5. Wirkungsort und Wirkmechanismus	61
4.6. Schlussfolgerungen	63
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	66

1. Einleitung

1.1. Vorbemerkungen

Die erste Ableitung der elektrischen Erregung des Herzens gelang Carlo Mateucci 1843 an Taubenherzen. Mateucci führte die Experimente von Luigi Galvani weiter, der in „De Vibrius Electricitatis in Motu Musculari Commentarius“ die Kontraktion von Froschmuskeln nach elektrischer Erregung beschrieb (Piccolino 1998). Seit diesen Messungen wurden erhebliche Fortschritte bei der Erforschung der Grundlagen der Erregungsbildung und Leitung des Herzmuskels erzielt. Wesentlich zum Verständnis der molekularen Grundlagen hat die Messung von Ionenkanalströmen mit Hilfe der Spannungsklemmen - Technik beigetragen.

Die von Cole 1949 entwickelte Methode der „Spannungsklemme“ nutzten 1952 Hodgkin und Huxley um ein Aktionspotential darzustellen. Hierfür und für Ihre weiteren bahnbrechenden Experimente (Hodgkin et al., 1952) bekamen die beiden Wissenschaftler 1963 den Nobelpreis für Medizin (zur Übersicht Piccolino 1998).

Die in dieser Arbeit benutzte Methode zur Messung von Membranströmen ist die so genannte Ganzzelleableitung mit Hilfe der Spannungsklemmen -(„whole-cell voltage-clamp“) Technik. Die „voltage-clamp“ Methode wurde von Cole, Hodgkin, Huxley, Maemont und Katz weiterentwickelt (zur Übersicht Cahalan et al., 1992). In den

frühen 80er Jahren wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann eine Methode entwickelt, bei der ein über der Messpipette applizierter Unterdruck eine verbesserte Abdichtung zwischen Zellmembran und Pipette erzeugt („Gigaseal“) (Neher E, Sakmann B, Steinbach JH 1978). Durch diese Entwicklung wurde es möglich, die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Ionenkanalklassen zu untersuchen.

Die „whole-cell patch-clamp“ Methode wird in dieser Arbeit genutzt, um die Auswirkungen von Antiarrhythmika auf Ströme kardialer Kaliumionenkanäle zu untersuchen.

1.2. Grundlagen der myokardialen Erregungsausbreitung

1.2.1. Das Myokard

Das Myokard ist ein Synzytium. Dies bedeutet, dass alle Zellen über spezielle Strukturen, die *disci intercalares*, miteinander in Verbindung stehen. Diese Zellverbindungen sind die Voraussetzung für die Ausbreitung von elektrischer Erregung über das gesamte Synzytium hinweg. Innerhalb des Muskelgewebes gibt es Zellbündel die nicht an der Kontraktion des Herzens beteiligt sind, jedoch besondere Aufgaben für die Fortleitung innerhalb des Organs besitzen. Diese Zellen bilden zusammengenommen das spezifische Erregungsleitungssystem des Herzens.

1.2.2. Das spezifische Erregungsleitungssystem

Die primäre spontane Depolarisation beginnt im Sinusknoten. Dieser befindet sich vor der Mündung der oberen Hohlvene in den rechten

Vorhof. Von dort werden die Vorhöfe erregt. Vorhofmyokard und Ventrikelmyokard sind elektrisch voneinander isoliert, so dass die elektrische Erregung nur über den AV Knoten von den Vorhöfen zu den Kammern gelangen kann. Der AV Knoten liegt im rechten Vorhof in der Nähe der Mündung des *Sinus coronarius*. Die Erregung läuft über den Stamm des His - Bündels weiter und mündet dann in den beiden Tawaraschenkeln. Die letzten Ausläufer des Erregungsleitungssystems, die direkt das Arbeitsmyokard versorgen, werden als Purkinje Fasern bezeichnet. (zur Übersicht Abb. 1.1.)

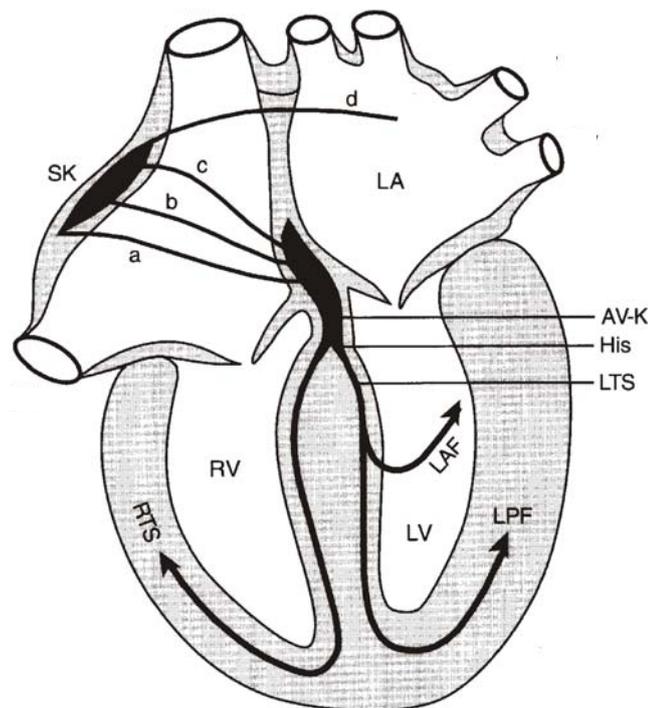


Abbildung 1.1.: Erregungsleitungssystem des Herzens. Sinusknoten (SK), internodale Leitungsbahnen (a,b,c), Bachmannsches Bündel (d), linker Vorhof (LA), linker und rechter Ventrikel (LV, RV), Atrioventrikularknoten (AV-K), Hissches Bündel (His), linker und rechter Tawaraschenkel (LTS, RTS), linksanteriorer und linksposteriorer Faszikel (LAF, LPF) (aus: Praxis der EKG Auswertung, R. und S. Klinge, Thieme)

1.3. Ionenkanäle und Aktionspotential

1.3.1. Grundlagen

Ein Aktionspotential entsteht, wenn die Membran einer Zelle über eine bestimmte Schwelle hinaus depolarisiert wird. Jedes Aktionspotential entsteht durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Ionenkanalströme. Durch dieses Zusammenspiel entstehen die typischen physiologischen Eigenschaften des Aktionspotentials.

1.3.2. Das Aktionspotential des Myokards

Das Ruhemembranpotential einer Arbeitsmyokardzelle liegt bei zirka -90 mV. Es wird durch ein Gleichgewicht von Ionenströmen über der Membran aufrechterhalten. Wird die Membran, zum Beispiel durch eine ankommende Erregung über die Reizschwelle hinaus depolarisiert, wird ein Aktionspotential ausgelöst. Es öffnen sich spannungsabhängige Natriumionenkanäle: Durch den Natriumioneneinstrom kommt es zu einer schnellen Depolarisation der Zellmembran bis auf +30 mV. Dabei kommt es zu einem Kalziumeinstrom, der die Zelle für 200-400 ms bei positiven Potentialen hält (Plateauphase). Ein dann einsetzender Kaliumionenausstrom bedingt die Repolarisation der Zelle.

Solange das Membranpotential der Zelle noch über -40 mV beträgt, ist die Zelle refraktär, also nicht wieder erregbar. Danach befindet sie sich in der relativen Refraktärzeit, das heißt sie kann nur durch überdurchschnittlich starke Reize angeregt werden, ein Aktionspotential auszulösen. Das in der relativen Refraktärzeit ausgelöste Aktionspotential unterscheidet sich von einem außerhalb der

Refraktärperiode ausgelösten Aktionspotential meist durch eine kürzere Dauer und eine kleinere Amplitude.

1.3.3. Bedeutung der Ionenkanäle

Ionenkanäle spielen eine wichtige Rolle bei vielen verschiedenen Funktionen der Zelle. Sie sind entscheidend beteiligt am Ruhemembranpotential und an der Depolarisation und Repolarisation während des Aktionspotentials. Es gibt die unterschiedlichsten Formen von Ionenkanälen. In dieser Arbeit stehen die *Kaliumkanäle* des Herzens im Mittelpunkt und werden im Folgenden näher besprochen.

1.3.4. Kaliumkanäle des Herzens

Mittlerweile sind zirka 60 verschiedene Kaliumkanaleinheiten entdeckt worden (Snyders 1999). Kaliumkanäle spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials ($I_{K(Ach)}$; I_{KATP} ; I_{K1}) (Wickman et al., 1999, Sakmann et al., 1984, Deal et al., 1996). Sie sind wichtig für die Repolarisation am Ende des Aktionspotentials (I_{Kr} ; I_{Kur} , I_{Ks} ; Deal et al., 1996, Cheng et al., 2004) und entscheidend an der Schrittmacherfunktion einiger Zellen beteiligt (Ono et al., 2003).

Man kann die Kaliumkanäle nach ihren Eigenschaften und Strukturen unterteilen. Es werden zurzeit drei große Kaliumkanalklassen am Herzen unterschieden: Die einwärtsgleichrichtenden Kaliumionenkanäle, die spannungsabhängigen Kaliumionenkanäle und die 2-Poren Kaliumionenkanäle (Coetzee et al., 1999, Snyders 1999).

1.3.4.1. Einwärtsgleichrichtende Kaliumionenkanäle

Charakteristisch für diese Kanäle ist die Einwärtsgleichrichtung. Bei diesen Ionenströmen ist ein Einwärtsstrom proportional zu der nach einwärts treibenden Kraft. Im Gegensatz dazu wird die Zunahme der Leitfähigkeit der Ionenkanäle geringer, je größer die nach auswärts treibenden Kräfte werden. Durch diese Einwärtsgleichrichtung ist es den Herzmuskelzellen möglich, ein Aktionspotential mit einer Plateauphase von zirka 200-400 ms zu generieren, da die Reduktion der Leitfähigkeit der repolarisierenden einwärtsgleichrichtenden Kaliumionenkanäle eine Zunahme dieser Ströme während der Depolarisation verhindert. Am Herzen sind vor allem drei verschiedene einwärtsgleichrichtende Kaliumionenströme zu finden: Der muskarinerge Kaliumionenstrom ($I_{K(ACh)}$), der ATP abhängige Ionenstrom ($I_{K(ATP)}$) und der I_{K1} . Eine Übersicht über die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle geben Doupnik et al. (1995), Nichols et al. (1997) sowie Sansom et al. (2002).

In Myozyten setzt sich der $I_{K(ACh)}$ - Kanal aus vier identischen Untereinheiten und einem G-Protein aktivierenden Rezeptor unterschiedlichen Typs zusammen (Kurachi et al., 1992). Die funktionelle Einheit der Ionenkanalpore ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei GIRK1- und zwei GIRK4- Untereinheiten (GIRK = G protein activated inward rectifying channel) (Hosoya et al., 1996, Krapivinsky et al., 1995, Corey et al., 1998). Jede GIRK Untereinheit besteht aus zwei transmembranösen Helices sowie einer diese verbindenden Schleife (loop).

Der G-Proteinkomplex des $I_{K(ACh)}$ - Kanals besteht aus einer α - und einer $\beta\gamma$ - Untereinheit (Yamada et al., 1998). Erst 1995 wurde nachgewiesen, dass die aktivierende Untereinheit des G-Proteinkomplexes die $\beta\gamma$ -

Untereinheit und nicht wie bisher angenommen die α -Untereinheit ist (Kurachi 1995). Der $I_{K(ACh)}$ kann in Vorhofmyozyten über einen Azetylcholinrezeptor (M_2 Rezeptor), einen Adenosinrezeptor (A_1 Rezeptor) und einen Sphingolipidrezeptor aktiviert werden (Bünemann et al., 1995). Der Rezeptor liegt jeweils an der extrazellulären Seite der Membran.

Der $I_{K(ACh)}$ gilt als einer der Vermittler der vagalen Wirkungen am Herzen und damit als Auslöser der vagalen negativen Chronotropie. Die Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ am Vorhofmyokard führt zu einer erheblichen Verkürzung der Aktionspotentialdauer und der Refraktärzeiten (Belardinelli et al., 1995, Koumi et al., 1995). Gut belegt ist die Bedeutung einer Aktivierung dieses Ionenstromes für die Entstehung atrialer Herzrhythmusstörungen, insbesondere auf der Grundlage eines Wiedereintritts der Erregung („reentry“) (Waldo et al., 2002).

Außerdem wurde nachgewiesen, daß eine Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ an Ventrikelzellen zu einer Verkürzung des Aktionspotentials führt (Koumi et al., 1994). Die Wirkungen des $I_{K(ACh)}$ auf Ventrikelebene sind allerdings wesentlich geringer ausgeprägt (Koumi et al., 1995). Dies ist wahrscheinlich auf eine geringere Expression der Ionenkanalproteine im Ventrikelmyokard zurückzuführen.

1.3.4.2. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Herzens

Für die folgenden Ausführungen in dieser Arbeit haben vor allem die spannungsabhängigen Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} Relevanz, diese werden auch unter dem Begriff „verzögerte Gleichrichterströme“ zusammengefasst. 1990 konnten Sanguinetti et al. zeigen, dass der

verzögerte Gleichrichterstrom aus zwei verschiedenen Komponenten besteht, dem langsamen verzögerten Gleichrichterstrom (I_{Ks}) und dem schnellen verzögerten Gleichrichterstrom (I_{Kr}) (Sanguinetti et al., 1990). Im Folgenden werden die beiden Kanäle näher beschrieben.

Charakteristisch für den I_{Ks} ist eine langsamere Aktivierung. Die Aktivierung erfolgt spannungsabhängig. Durch sein Aktivierungsverhalten erhält der Strom ein auswärtsgleichrichtendes Verhalten.

Der I_{Ks} – Kanal ist eine Homotetramer bestehend aus vier identischen Einheiten die zur eigentlichen Kanalpore zusammengefasst werden. Jede dieser Einheiten besteht aus sechs transmembranösen Helices sowie einer Schleife. Die identischen Untereinheiten werden als KvLQT1 bezeichnet. Klinische Relevanz erhielt der Kanal durch den Nachweis der Beteiligung an Unterformen des „Long-QT-Syndromes“, daher auch die Bezeichnung. Das Homotetramer ist beim Menschen mit β Untereinheiten, den so genannten MinK, zum vollständigen Kanalkomplex kombiniert (Coetzee et al., 1999).

Der I_{Ks} ist mitverantwortlich für die späte Repolarisation des Aktionspotentials. Bei vollständiger Hemmung dieses Kanals oder nicht funktionsfähigen Mutationen („Long-QT-Syndrome“) kann es zu „Torsades de pointes“ Tachykardien kommen, die in anhaltendes Kammerflimmern übergehen können (Towbin et al., 2001, Sanguinetti 2000). Durch diesen Mechanismus wird der plötzliche Herztod in Familien mit „Long-QT-Syndrome“ sowie auch die gefährliche Nebenwirkung einiger Antiarrhythmika (Klasse III) und einiger Medikamente ohne gezielte Herz – Kreislaufwirkung erklärt (Cheng et al., 2004).

Der schnelle verzögerte Gleichrichterstrom I_{Kr} wird ebenfalls spannungsabhängig aktiviert. Er zeigt auf die Depolarisation eine schnellere Aktivierung als der I_{Ks} . Sein Aktivierungsverhalten zeigt einwärtsgleichrichtende Eigenschaften. Der I_{Kr} – Kanal repräsentiert ebenfalls ein Homotetramer aus identischen Untereinheiten mit sechs tranmembranösen Helices sowie einer Schleife. Das codierende Gen dieser Untereinheiten wird meist als HERG („Human ether-a-gogo related gen“) bezeichnet. Das Homotetramer ist beim Menschen mit β Untereinheiten (Mirp 1: „MinK related peptide“) zum funktionell kompletten Ionenkanal verbunden (Pourrier et al., 2003).

Der Strom dient ebenfalls der späten Repolarisation des Aktionspotentials. Blockierung beziehungsweise Inaktivierung des I_{Kr} kann ebenfalls zu „torsade de pointes“ Tachykardien führen. Auch für das codierende Gen dieses Kanals sind Mutationen beschrieben, die zu Unterarten des Long QT Syndoms führen können (Cheng et al., 2004, Lehmann – Horn et al., 1999).

1.4. Vorhofflimmern

1.4.1. Epidemiologie des Vorhofflimmerns

Es gibt bisher keine Studien, die sich ausschließlich auf die Inzidenz und Prävalenz von Vorhofflimmern beziehen. Untersuchungen der Framingham Studie zeigen aber, daß in einer Gruppe von 5209 Individuen bei einem Beobachtungszeitraum von 22 Jahren die Prävalenz von chronischem Vorhofflimmern bei 1,8 % lag (Kannel et al., 1982). Außerdem hatten mehrere Patienten Episoden von einmalig aufgetretenem Vorhofflimmern. Die Gesamtinzidenz betrug geschlechtsunabhängig 2 % innerhalb von zwei Jahren. Die Inzidenz

stieg signifikant mit dem Alter an und zwar von 0,22 beziehungsweise 0,26 % bei den 25-34 jährigen auf 8,8 % bei den über 80 jährigen (Kannel et al., 1982).

Die SPRINT Studie (Behar et al., 1992) und die V-HeFT I und II Studien (Carson et al., 1993) konnten zeigen, daß Vorhofflimmern alleine keine Zunahme der Mortalität bewirkt. Vielmehr könnte man Vorhofflimmern als einen prognostischen Faktor hinsichtlich einer fortgeschrittenen Herzerkrankung bezeichnen. Bei zunehmender Reduktion der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels spielt das Vorhofflimmern allerdings eine wesentlich größere Rolle. Bei einer Ejektionsfraktion von < 30 % beträgt die Einjahresüberlebensrate bei Sinusrhythmus 71 %, und bei Vorhofflimmern nur 52 % (Middlekauf et al., 1991).

1.4.2. Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Die Pathophysiologie von Vorhofflimmern ist nicht vollständig geklärt. 1962 stellten Moe et al. die Theorie der multiplen Erregungsfronten vor („multiple wavelet“ Hypothese; eine Übersicht geben Abildskov et al., 1994). Diese Theorie wurde von Allesie et al. aufgegriffen, experimentell bestätigt und weitergeführt (Allesie et al., 1996, Allesie et al., 2001). Nach seiner Theorie der multiplen Erregungsfronten existieren in beiden Vorhöfen mehrere individuelle Erregungsfronten (Lammers et al., 1993). Sicher ist, dass dem Vorhofflimmern ein Wiedereintritt der elektrischen Erregung zu Grunde liegt. Diese kreisende Erregung findet bei Vorhofflimmern an verschiedenen Orten gleichzeitig statt. Zur Beendigung des Vorhofflimmerns ist es erforderlich, die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards so zu verändern, dass ein Wiedereintritt der Erregung unmöglich wird. Dies

kann entweder durch Beschleunigung der Erregungsleitung, durch Verkürzung des Wiedereintrittkreises oder durch Verlängerung der effektiven Refraktärzeit erreicht werden. Vor allem letztgenannter Effekt ist durch Ionenkanalinhibitoren vom Klasse III Typ erzielbar und erklärt die besondere antifibrillatorische Potenz dieser Substanzen. Einmal begonnenes Vorhofflimmern unterhält sich danach selbst und ist daher nach längerem Bestehen einer konservativen Therapie nur eingeschränkt zugänglich. („atrial fibrillation begets atrial fibrillation“) (Wijffels et al., 1995)

1.4.3. Formen von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen. Legt man die Aktivierungsfrequenz der Vorhöfe zugrunde, wird das Vorhofflimmern zu den tachykarden Herzrhythmusstörungen gezählt. Beim Vorhofflimmern wird der Vorhof mit einer Frequenz von 350-600 min^{-1} erregt. Die Kammerfrequenz richtet sich dann nach der Geschwindigkeit der atrioventrikulären Überleitung im AV-Knoten, so dass im klinischen Alltag bradykardes, normofrequentes und tachykardes Vorhofflimmern unterschieden wird.

Darüberhinaus wird zwischen paroxysmalem, persistierendem und permanentem Vorhofflimmern unterschieden. Paroxysmales Vorhofflimmern bezeichnet relativ kurz anhaltendes Vorhofflimmern. Persistierendes Vorhofflimmern ist länger anhaltendes Vorhofflimmern, welches zumeist mittels Kardioversion (elektrisch oder pharmakologisch) beendet werden kann. Permaentes Vorhofflimmern bezeichnet therapierefraktäres Vorhofflimmern (Levy S 1998).

Das Vorhofflimmern kann durch vorbestehende Grunderkrankungen, zum Beispiel thyreotoxische Krisen, koronare Herzkrankheit (KHK), Alkoholintoxikation, Herzklappenschäden etc. ausgelöst werden. Häufig ist keine kardiale Grunderkrankung nachweisbar, man spricht hier vom idiopathischen Vorhofflimmern. Offenbar spielt bei der Entstehung des idiopathischen Vorhofflimmerns oft die Erhöhung des vagalen Tonus eine besondere Rolle, da hier die Flimmerepisoden insbesondere nachts auftreten (Coumel et al., 1978). Diese Erkenntnis bildet die Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von Antiarrhythmika am vagal kontrollierten muskarinergen Kaliumionenstrom atrialer Herzmuskelzellen (siehe unten).

1.4.4. Komplikationen des Vorhofflimmerns

Veränderungen der Strömungsverhältnisse innerhalb des Herzens beim Vorhofflimmern begünstigen vor allem im Bereich des linken Herzohres die Entstehung von Thromben und ermöglichen arterielle Embolien. Die durch Vorhofflimmern ausgelösten arteriellen Embolien betreffen überwiegend (Häufigkeit: 79 – 85 %) die Hirnarterien (Corbalan et al., 1992, Cabin et al., 1990). Bei Schlaganfallpatienten konnte in 18 % der Fälle elektrokardiographisch ein Vorhofflimmern nachgewiesen werden (Jorgensen et al., 1996). Bei chronischem Vorhofflimmern erhöht sich das Schlaganfallrisiko um das vier bis fünffache. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein Hirnarterienverschluss durch Vorhofflimmern häufiger schwerwiegend ist, mehr zu Rezidiven neigt und eine schlechtere Prognose hat, als ein zerebraler Insult anderer Genese (Corbalan et al., 1992, Jorgensen et al., 1996, Kannel et al., 1982).

1.4.5. Therapie des Vorhofflimmerns – Allgemeine Überlegungen
Generell sind die Therapiestrategien der Rhythmuskontrolle oder der Frequenzkontrolle gegeneinander abzuwägen. Für die Frequenzkontrolle spricht die niedrigere Nebenwirkungsrate der eingesetzten Pharmaka (Kalziumkanalantagonisten, β -Blocker, Glykoside (Weerasooriya et al., 2003)). Für die Rhythmuskontrolle sprechen die geringere Embolierate, das Vermeiden von Tachykardie – bedingten Kardiomyopathien und eine bessere Lebensqualität des Patienten durch eine Symptomreduktion. Bisher ist in keiner Untersuchung eine Verbesserung der Überlebensrate der Patienten im Sinusrhythmus im Vergleich zu Vorhofflimmerpatienten nachgewiesen worden (Hagens et al., 2004, Corley et al., 2004). Dennoch ist die Erhaltung des Sinusrhythmus von besonderer Bedeutung, da das Vorhofflimmern von den Patienten oft als leistungslimitierend und belastend (Herzrasen und Stolpern) empfunden wird.

Zum Zweck des Sinusrhythmuserhaltes stehen verschiedene Antiarrhythmika zur Verfügung. „Gängige“ Antiarrhythmika sind Klasse Ic Antiarrhythmika wie zum Beispiel Flecainid oder Propafenon sowie die Klasse III Antiarrhythmika Amiodaron und Sotalol (Brachmann 2000). Insbesondere bei Patienten mit bekannter koronarer Herzerkrankung sind Klasse I Antiarrhythmika als Dauertherapie nach der Cast - Studie kontraindiziert (Ruskin 1989).

Zu den wirksamsten rhythmusstabilisierenden Antiarrhythmika gehören zur Zeit die der Klasse III (Rees et al., 1993, Todd DW 2003, Tsikouris et al., 2001). Hier seien vor allem Amiodaron, Sotalol und Dofetilide genannt. Diese wirken vor allem über eine Inhibition repolarisierender Kaliumionenströme und verlängern so das Aktionspotential (Auer et al.,

2002). Prystowsky et al. konnten zeigen, dass mittels Dofetilide eine Rhythmusstabilisierung über ein Jahr bei 33 % der Patienten zu erzielen ist (Prystowsky et al., 2003). Die Molekularstruktur von Klasse III Antiarrhythmika dient daher weltweit als Ausgangsbasis für die Entwicklung antifibrillatorischer Pharmaka, eine aktuelle Übersicht zur Therapie des Vorhofflimmerns geben Fumeaux et al., 2004, Mc Namara et al., 2004 und Fuster et al., 2001.

1.5. Antiarrhythmika

1.5.1. Antiarrhythmika zur Behandlung von Vorhofflimmern

Wie bereits beschrieben, werden verschiedene Antiarrhythmika zur Behandlung des Vorhofflimmerns eingesetzt. Man kann aufgrund ihrer Pharmakodynamik nach der Klassifikation von Vaughan Williams verschiedene Gruppen differenzieren (Vaughan Williams 1984):

In der Klasse I befinden sich die Natriumkanalblocker, in der Klasse II die β - Rezeptorenblocker, in der Klasse III die Kaliumkanalblocker und in der Klasse IV die Kalziumkanalblocker. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Antiarrhythmika der Klasse III, also den Kaliumkanalblockern (zur Übersicht Woosley 1991).

1.5.2. Klasse III Antiarrhythmika

Typische und in der klinischen Praxis verbreitet eingesetzte Vertreter dieser Klasse sind Sotalol und Amiodaron. Beide sind keine spezifischen Kaliumkanalblocker. Sotalol hat zusätzlich Klasse II- also β -blockierende Wirkungen, Amiodaron besitzt grundsätzlich

Eigenschaften aller vier Klassen. Neuere Substanzen sind die hier untersuchten Pharmaka Ibutilide und Dofetilide.

1.5.2.1. Ibutilide

Ibutilide ist ein potenter Inhibitor des verzögert gleichrichtenden Kaliumionenstroms I_{Kr} (Yang et al., 2001). Vor allem dieser Wirkung wurde bisher der besonders gute Effekt von Ibutilide bei intravenöser Gabe zur Konversion von Vorhofflimmern in den Sinusrhythmus zugeschrieben (Stambler et al., 1996). Außerdem zeigten Oral et al., daß die Vorgabe von Ibutilide die Erfolgsrate einer elektrischen Kardioversion erheblich verbessern kann (Oral et al., 1999).

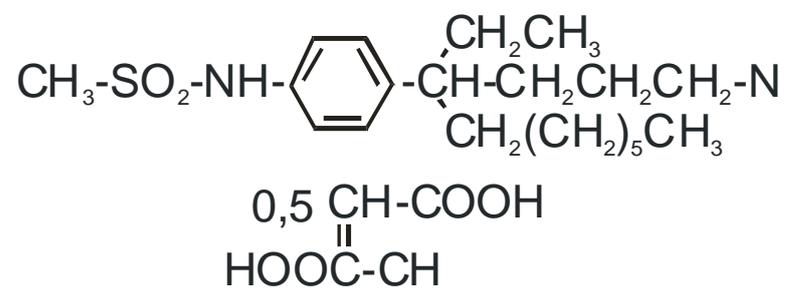
Hingewiesen wurde jedoch auch auf das Risiko der Entwicklung von „Torsades de pointes“ Tachykardien (Yang et al., 2001, Buchanan et al., 1993).

1.5.2.2. Dofetilide

Dofetilide ist ebenso wie Ibutilide ein neueres Klasse III Antiarrhythmikum, es ist ebenso ein Blocker des I_{Kr} (Carmeliet 1992) und verlängert das myokardiale Aktionspotential (Jurkiewicz et al., 1993). Die klinischen Indikationen reichen von der intravenösen Gabe bei Kardioversion (Sedgwick et al., 1995) bis hin zur Therapie von ventrikulären Herzrhythmusstörungen (Echt et al., 1995).

Dofetilide führt zu dosisabhängigen QT – Zeit - Verlängerungen (Tham et al., 1993), und es gibt Hinweise für die Induktion von „Torsades de pointes“ Tachykardien durch die Substanz (Yang et al., 2001, Buchanan et al., 1993).

A)



B)

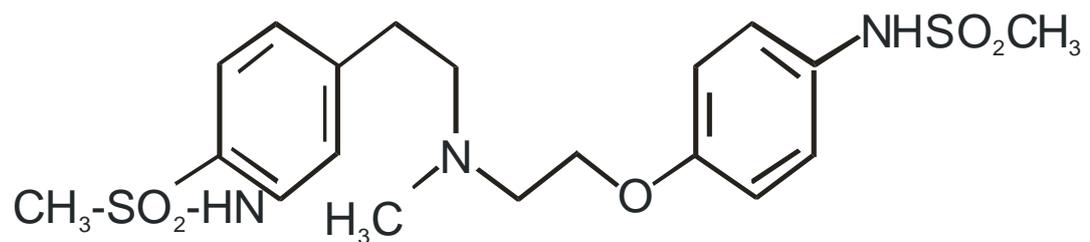


Abbildung 1.2.: Strukturformeln von Ibutilide-Fumarat (A) und Dofetilide (B)

1.5.2.3. RP58833

RP58833 ist ein Klasse III Antiarrhythmikum, das noch nicht für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Das wirksame Enantiomer von RP58833 wird Terikalant genannt. Bekannt ist die Blockade des Einwärtsgleichrichters I_{K1} durch RP58833 (Escande et al., 1992). Der Einsatz bei ventrikulären Herzrhythmusstörungen wurde bereits 1993 von Rees et al. beschrieben (Rees et al., 1993).

Auch RP58833 ist ein selektiver Blocker des schnellen Anteils des verzögerten Gleichrichterstroms I_{Kr} , hierdurch führt auch RP58833 zu einer Verlängerung des Aktionspotentials (Jurkiewicz et al., 1996).

1.5.2.4. Unerwünschte Wirkungen der Klasse III Antiarrhythmika

Klasse III Antiarrhythmika besitzen eine „reverse-use-dependence“, sie wirken verstärkt bei niedrigen Frequenzen und eher schwach bei hohen Frequenzen. Durch die stark verlängerte Aktionspotentialdauer bei niedrigen Frequenzen werden Nachdepolarisationen unterhalten und es kann zu gefährlichen „Torsades des pointes“ Tachykardien kommen (Gowda et al., 2002). Das Risiko von „Torsades de pointes“ Tachykardien kann im Oberflächen EKG anhand der QT – Zeit - Verlängerung unter Antiarrhythmikagabe abgeschätzt werden. Bei einer deutlichen Verlängerung der QT - Zeit (> 500 ms) sollte die Gabe der Klasse III Antiarrhythmika beendet werden (Gowda et al., 2004).

Weiterhin haben die unterschiedlichen Substanzen dieser Klasse spezifische Nebenwirkungen: Sotalol hat wegen seiner β -Rezeptoren blockierenden Eigenschaften auch die Nebenwirkungen der β -Blockade wie Hypotonie, Bradykardie oder Bronchokonstriktion. Unter Amiodaron kann es zu Korneaablagerungen, Lungenfibrose, Photodermatitiden und Schilddrüsenfunktionsstörungen (Hyperthyreose bzw. Hypothyreose) kommen (Yamreudeewong et al., 2003). Eine Amiodaron – Behandlung macht deshalb engmaschige klinische und laborchemische Kontrollen (etwa im Abstand von 6 Monaten erforderlich).

Spezifische Nebenwirkungen der neueren Klasse III Antiarrhythmika wie zum Beispiel Dofetilide und Ibutilide neben den oben erwähnten ventrikulären Rhythmusstörungen sind noch nicht bekannt.

Zur Übersicht der Nebenwirkungen von Klasse III Antiarrhythmika sei auf eine Arbeit von Yamreudeewong et al. (2003) hingewiesen.

2. Methodik

2.1. Isolierung und Kultivierung von Vorhofmyozyten

Wie bereits erwähnt, wurde bei dieser Arbeit die „whole-cell patch-clamp“ Technik verwendet. Untersucht wurden atriale Myozyten von Ratten. Wie bereits 1983 gezeigt, können diese Zellen über mehrere Tage kultiviert werden (Bechem et al., 1983). Die gesamte Präparation, Organentnahme und Zellgewinnung wurde unter einer sterilen Werkbank mit dampfsterilisierten Instrumenten durchgeführt.

30 Minuten vor der Betäubung und Organentnahme wurde den Tieren zur Blutverdünnung 5 ml Heparinlösung intraperitoneal injiziert. Die Ratten (Gewicht : 200 – 300g) wurden nach Betäubung mit Propofol (Fresenius, Friedberg Deutschland) durch Genickbruch getötet. Das Herz wurde innerhalb der nächsten 5 Minuten entnommen, um die Ischämiezeit möglichst gering zu halten. Über eine Umwälzpumpe wurde das entnommene Herz mit Carbogengas (95 % O₂ / 5 % CO₂) angereicherter Tyrode retrograd perfundiert. Die retrograde Perfusion erfolgte über eine während der Präparation in die Aorta eingelegte Pipettenspitze. Während der retrograden Perfusion wurde das Herz in einer Langendorffapparatur aufgehängt und in ein Organbad getaucht.

Zur Dissoziation der Myozyten wurde die Perfusionslösung im Folgenden nach und nach mit Enzymen angereichert. Die Konzentration der Enzymlösung wurde langsam gesteigert. Nach einiger Zeit konnte ein Aufquellen des Herzens im Organbad, zustande kommend durch die beginnende Dissoziation von Myokardzellen, gesehen werden. Nach Eintreten dieses Zustandes wurde das Herz aus dem Organbad entfernt, von der Perfusion abgetrennt und die Vorhöfe wurden von den Ventrikeln abgeschnitten.

Die Vorhöfe wurden nun in einer Petrischale einer noch höher konzentrierten Enzymlösung ausgesetzt. Hier erfolgte dann durch enzymatische Dissoziation der atrialen Myozyten die Zellgewinnung. Mithilfe einer sterilen Pinzette wurde in der Enzymlösung leicht an den Bruchstücken der Vorhöfe gezupft und gezogen um die Zellablösung zu beschleunigen.

Die gesamte Dissoziation durch die Enzymlösung geschah in einer kalziumfreien also kardioplegischen Lösung, um Kontraktionen der Myozyten zu vermeiden. Nach der Zellgewinnung wurde schonend eine langsame Kalziumanpassung durchgeführt. Hierzu wurde die kalziumfreie Lösung in vielen kleinen Schritten durch eine kalziumenthaltende Lösung ersetzt. Unter dem Mikroskop wurde das Kontraktionsverhalten der Zellen kontrolliert und die Erhöhung der Kalziumkonzentration angepasst. Angestrebt wurden bei der Kalziumanpassung 10% kontrahierende Zellen. Eine zu schnelle Kalziumkonzentrationsanpassung führt zur vermehrten Kontraktion und damit zum Tod der gewonnen Zellen.

Nach der erfolgten Kalziumanpassung wurden die Vorhofmyozyten mit 2 ml HEPES gepuffertem Kulturmedium (M199 von Gibco) in 35 mm Kulturschalen ausplattiert. Die isolierten Vorhofmyozyten konnten für bis zu 9 Tage erfolgreich kultiviert werden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. In einer Schale befanden sich mehrere hundert Zellen. Das Kulturmedium wurde mit Gentamycin und Kanamycin (jeweils Gibco, Dreieich, Deutschland) zur Senkung des Infektionsrisikos versetzt. Bei erfolgreicher Präparation waren die Zellen bis zu 9 Tagen lebensfähig, die hier besprochenen Untersuchungen wurden mit 2-4 Tage alten Zellen durchgeführt.

2.2. Die „voltage-clamp“ Technik

Der Membranstrom der isolierten Vorhofmyozyten wurde mit der „whole-cell voltage-clamp“ Methode registriert (Hamill et al., 1981). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20 – 25°C) durchgeführt. Für die Messungen wurde das Kulturmedium durch Lösung 1: 122 mM NaCl; 20 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂; 10 mM HEPES (alle Substanzen von Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) ersetzt. Alle Zellen in der Kulturschale sind kontinuierlich bei einer Flussgeschwindigkeit von zirka 1 ml/min mit Lösung 1 perfundiert worden. Eine aus Borosilikatglas gezogene Pipette (Pipettenwiderstand 3-7 MΩ), gefüllt mit Lösung 2: 100 mM Kaliumaspartat; 40 mM KCl; 5 mM NaCl; 7 mM MgCl₂; 2 mM EGTA; 20 mM HEPES/KOH; 20 μM GTP; 5 mM Na-ATP (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), der so genannten Pipettenlösung, wurde unter Sicht (Zeiss-Mikroskop, Jena, Deutschland) direkt über der Zellmembran platziert. Durch langsames Erzeugen eines Unterdrucks wurde ein Abdichtwiderstand von mindestens 1 GΩ erreicht. Jetzt konnte die direkt unter der Pipettenspitze gelegene Zellmembran durch plötzliche Erhöhung des Unterdrucks zerstört werden. Die Erzeugung des Unterdrucks erfolgte wahlweise über ein angebrachtes Mundstück oder eine 10 ml Spritze. Die in der Pipette befindliche Elektrode hatte nun direkte Verbindung nach intrazellulär. Eine in der Kulturschale befindliche Elektrode („Badelektrode“) wurde als extrazelluläre Elektrode genutzt. Zwischen diesen beiden Elektroden konnte die „Spannungsklemme“ angelegt werden und der Membranstrom der Zelle gemessen werden.

2.3. Standardprotokoll

Wenn nicht anders beschrieben, wurde zur Messung des Membranstroms folgendes Standardprotokoll verwandt: Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (20-25 °C). Die zu messende Zelle wurde über eine zirka 0,5-1,0 mm vor der Zelle liegende Perfusionspipette mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 0,25 ml/min kontinuierlich umspült. Über elektrisch gesteuerte Magnetventile konnte zwischen bis zu sechs verschiedenen Lösungen gewechselt werden.

Die Spannung über der Zellmembran, also das Haltepotential wurde auf -90 mV „geklemmt“. Durch die gewählten Kaliumkonzentrationen in Lösung 1 und Lösung 2 lag das Kaliumgleichgewichtspotential nach der Nernst'schen Gleichung bei -50 mV. Somit resultierte bei einer angelegten Spannung von -90 mV ein Kaliumioneneinstrom.

Im Standardprotokoll wurde alle 10 s eine Spannungsrampe erzeugt. Zu Beginn der Spannungsrampen wurde die Zellmembran auf -120 mV geklemmt. Innerhalb von 500 ms wurde die Spannung bis auf 60 mV erhöht. Die Steigung der Spannungsrampe war hierbei konstant. Zwischen den Rampen wurde die Membranspannung von -90 mV gehalten.

Abhängig vom Kaliumgleichgewichtspotential, welches in unserem Fall bei -50 mV liegt kommt es bei „geklemmten“ Membranspannungen von < -50 mV zu einem Kaliumioneneinstrom und bei Membranspannungen von > -50 mV zu einem Kaliumionenausstrom.

Anhand der gewonnenen Daten während der Spannungsrampen konnten Strom – Spannungskurven aufgezeichnet werden. Wie bereits beschrieben können bestimmte Kanäle anhand der typischen Strom – Spannungsbeziehung des bei geöffnetem Kanal fließenden Stromes identifiziert werden (z.B. einwärtsgerichtete Kaliumkanäle).

2.4. Irreversible Kanalaktivierung

Um den Wirkungsort der Antiarrhythmika zu untersuchen, wurde der muskarinerge einwärtsgerichtende Kaliumkanal irreversibel aktiviert. Dazu wurden der Pipettenlösung, Lösung 2, 500 μM GTP- γ -S zugefügt. Diese Substanz aktiviert das G-Protein des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals irreversibel.

GTP- γ -S bindet an die α - Untereinheit des heterotrimeren G Proteins, somit kann die aktivierende $\beta\gamma$ -Einheit den Kanal öffnen. Im Unterschied zur physiologischen Aktivierung kann GTP- γ -S nicht hydrolysiert werden. Aus diesem Grund kommt es zu keiner erneuten Verbindung zum heterotrimeren G Protein, die $\beta\gamma$ -Einheit bleibt ungebunden und somit ist der Kanal irreversibel über die G Protein Kaskade aktiviert.

Eine Substanz, die den Strom jetzt noch beeinflussen kann, wirkt unabhängig von der Aktivierung des G-Proteinsystems.

2.5. Aufzeichnung

Der Membranstrom wurde mittels eines EPC-7 Verstärkers und eines IBM kompatiblen PC aufgezeichnet. Die Signale wurden analog gefiltert und digital umgewandelt (5 KHz). Das Software und Hardwaresystem ISO2 (MFK Friedrich, Frankfurt, Deutschland) wurde genutzt, um die Spannung zu kontrollieren, die Daten aufzunehmen und diese zu analysieren.

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Strom Spannungskurven erfolgte mit Hilfe der Tabellen Kalkulationssoftware Origin 4.0 sowie mit der Grafikverarbeitungssoftware Corel Draw 8.

Die logarhythmischen Konzentrations – Wirkungskurven wurden ebenfalls mit der Grafikverarbeitungssoftware Corel Draw 8 und der Tabellen Kalkulationssoftware Origin 4.0 erstellt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss von Klasse III Antiarrhythmika auf den muskarinergen einwärtsgerichtenden Kaliumionenstrom untersucht. Die Blocker des schnellen verzögerten Gleichrichterstroms Ibutilide, Dofetilide und RP 58866 wurden ebenso verwendet wie der Blocker des langsam verzögerten Gleichrichterstroms, Chromanol 293B.

Alle hier beschriebenen Pharmakonwirkungen waren unabhängig von der Dauer der Zellkultivierung vor Durchführung der Experimente.

Der muskarinerge einwärtsgerichtende Kaliumstrom $I_{K(ACh)}$ wurde durch die Perfusion von 10 μ M Azetylcholin induziert. Diese Konzentration ist sättigend hinsichtlich der aktivierbaren Stromamplitude. 10 μ M Azetylcholin induzierte den $I_{K(ACh)}$ mit einer mittleren Stromdichte von 75 ± 9 pA/pF. Eine typische Stromantwort nach Superfusion der Zelle mit dem Agonisten ist in Abbildung 3.1. dargestellt. Etwa 50 ms nach Beginn der Superfusion der Zelle mit Azetylcholin zeigt sich eine schnelle Aktivierung des $I_{K(ACh)}$, die nach einigen Sekunden von einem Spitzenstrom zurück auf einen stabilen Plateaustrom desensitisiert. Diese Desensitisierung wurde auch von anderen Untersuchern gefunden (Bünemann et al., 1996), war jedoch im Rahmen unserer Experimente nicht immer nachweisbar. Wurde die Azetylcholin-haltige Superfusionstyrode wieder durch Agonisten freie Tyrode ersetzt, zeigte sich eine rasche Remission des induzierten Kaliumionenstroms zurück zum Ausgangsniveau. Diese vollständige Reversibilität des Azetylcholineffektes blieb auch nach mehrmaliger Applikation der Substanz erhalten.

In Abbildung 3.1. ist eine typische Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ mit der dazugehörigen Strom – Spannungskurve gezeigt. In der Abbildung sind der Strom während der Spannungsrampe vor Aktivierung des Kanals (a) sowie nach Aktivierung des Kanals (b) beschriftet. In diesem Fall repräsentiert a die Ströme der Spannungsrampe des Hintergrundstromes, also aller geöffneten Kanäle. Wohingegen b die Ströme während der Spannungsrampe des $I_{K(ACh)}$ addiert mit dem Hintergrundstrom repräsentiert. Subtrahiert man die Strom-Spannungsbeziehung von a von b erhält man somit die ebenfalls abgebildete Strom-Spannungskurve des geöffneten Kanals, in diesem Fall die typische einwärtsgerichtete Strom-Spannungskurve des $I_{K(ACh)}$.

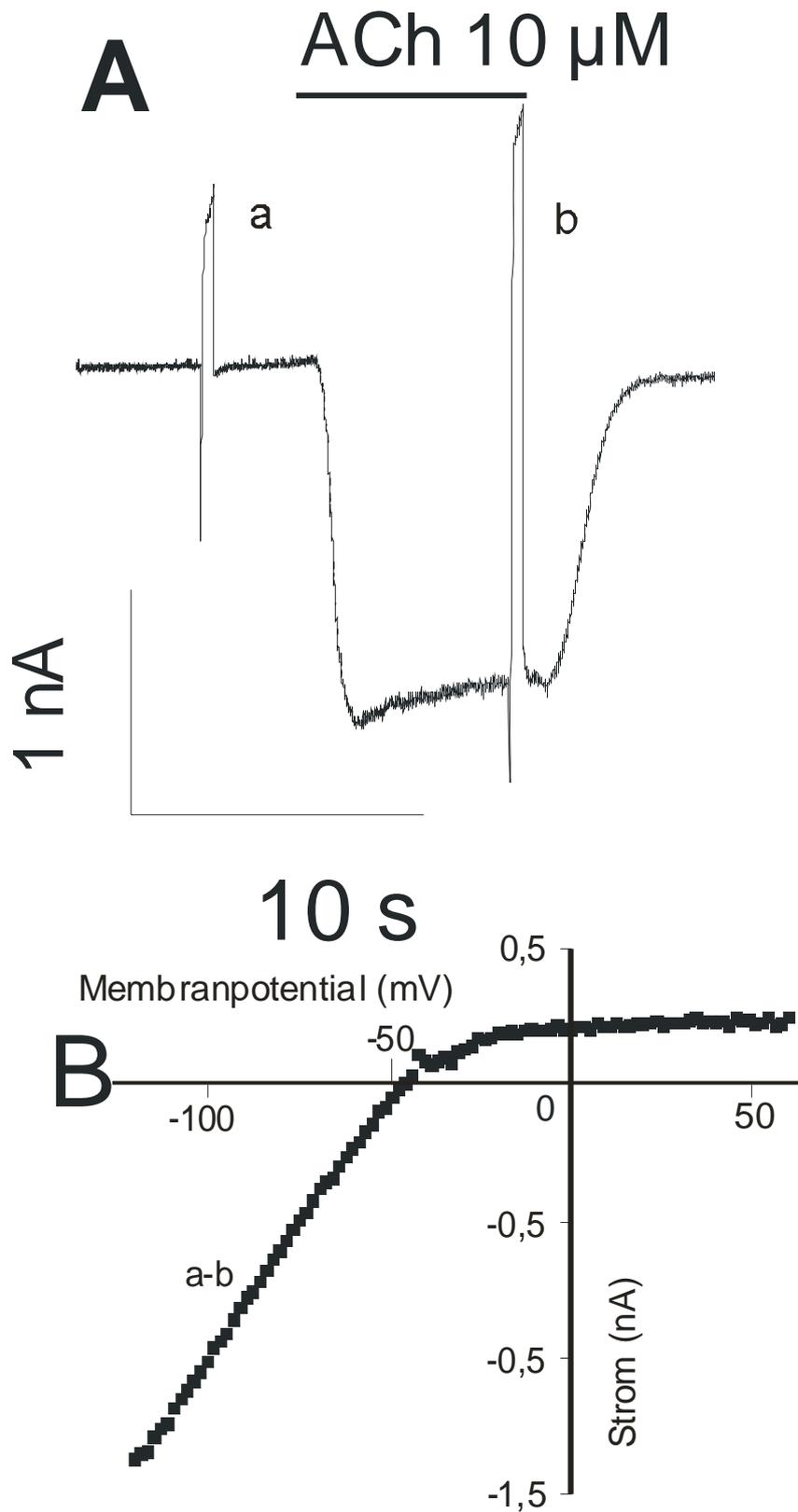


Abbildung 3.1.: Typische Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ (A) mit dazugehöriger Strom-Spannungskurve (B)

Dieses experimentelle Protokoll diente als Grundlage für die Erfassung der inhibitorischen Potenz der getesteten Antiarrhythmika. Bei den folgenden Experimenten wurde nach Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ durch Wechsel auf eine Azetylcholin und Pharmakon-haltige Tyrode die Wirkung des Pharmakons auf den vollständig aktivierten Ionenstrom bestimmt. Durch erneutes Wechseln der Superfusionslösung auf eine nur das Azetylcholin enthaltende Tyrode konnte die Reversibilität der Ionenkanalhemmung durch die Substanz überprüft werden.

Die Subtraktion der Strom-Spannungsbeziehung des gehemmten $I_{K(ACh)}$ von der des ungehemmten Plateaustroms diente dann der Identifizierung des $I_{K(ACh)}$ als inhibierten Ionenstrom.

Um eine Konzentrations-Wirkungskurve zu erstellen, wurden verschiedene Konzentrationen der Substanz untersucht. Mit den Ergebnissen wurde die mittlere Hemmkonzentration, der IC_{50} berechnet. Die Konzentrations – Wirkungskurven wurden mit der Tabellenkalkulation Origin 4.0 erstellt und mit dem Grafikprogramm Corel Draw bearbeitet. Der IC_{50} ist die Konzentration der jeweiligen Substanz bei der 50 % des aktivierten Ionenstroms gehemmt wird.

Um einen Hinweis auf den Wirkungsort der Antiarrhythmika zu erhalten wurden zwei weitere Versuchsanordnungen genutzt. Der muskarinerge einwärtsgerichtete Kaliumstrom $I_{K(ACh)}$ wurde durch die Zugabe von GTP- γ -S irreversibel aktiviert. Der Mechanismus besteht in einer Aktivierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteinsystems des $I_{K(ACh)}$. Dadurch wird der Kanal geöffnet und somit der Strom induziert. Die Aktivierung der G-Proteinuntereinheit ist irreversibel. Nachdem der

irreversible Strom erzeugt wurde, wurde das jeweilige Pharmakon der extrazellulären Lösung hinzugefügt.

Im dritten Versuchsansatz wurde die jeweilige Substanz intrazellulär über die Pipettenlösung zugeführt. Sofort und nach zwanzigminütiger Wartezeit wurde versucht, den $I_{K(ACh)}$ durch Zugabe von Azetylcholin zu aktivieren.

Im Folgenden werden die beschriebenen Versuche nach der jeweiligen applizierten Substanz behandelt.

3.1. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide

3.1.1. Hemmung des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide

In dieser Versuchsserie wurde die Wirkung des Klasse III Antiarrhythmikum Dofetilide auf den muskarinergen, einwärtsgerichteten Kaliumstrom untersucht. Abbildung 3.2. zeigt das typische Bild der Wirkung von Dofetilide auf den $I_{K(ACh)}$. Das Experiment ist repräsentativ für Untersuchungen an 11 verschiedenen atrialen Myozyten von 7 verschiedenen Ratten. Die gestrichelte horizontale Linie zeigt die Nulllinie an. Nachdem der $I_{K(ACh)}$ durch ACh 10 μ M aktiviert wurde, zeigt sich unter Hinzugabe von Dofetilide 10 μ M eine fast vollständige Hemmung des $I_{K(ACh)}$. Diese Hemmung ist fast vollständig reversibel, da nach Auswaschen des Pharmakons annähernd wieder das Ausgangsstromniveau erreicht wird.

Ach 10 μ M

Dofetilide 10 μ M

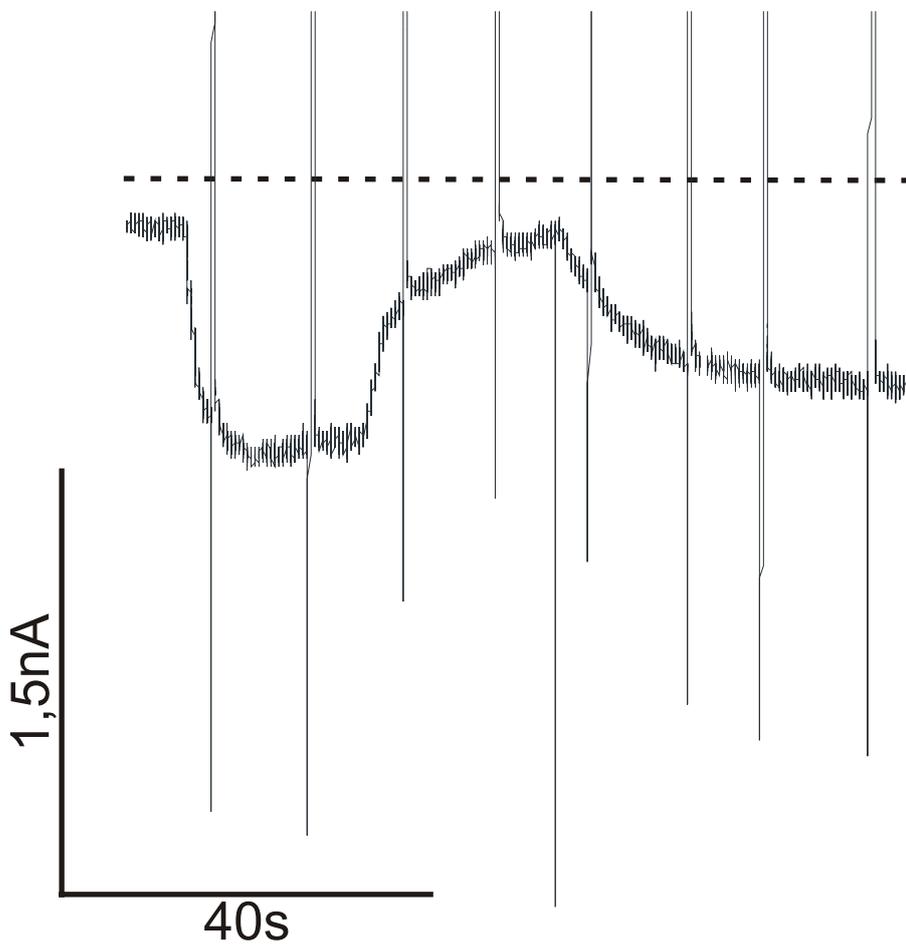


Abbildung 3.2.: Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch 10 μ M Dofetilide.

Um eine Konzentrationswirkungskurve zu erstellen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dofetilide perfundiert. Die Konzentrationen waren 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Der berechnete IC_{50} beträgt 1,2 μ M (Abbildung 3.3.).

Qualitativ konnten die oben beschriebenen Wirkungen von Dofetilide hinsichtlich Dynamik der Inhibition und des Auswaschens der Substanz mit allen getesteten Konzentrationen nachvollzogen werden, auch wenn bei höheren Pharmakonkonzentrationen ein tendenziell schnellerer Wirkungseintritt und ein tendenziell schnelleres Auswaschen zu erkennen waren.

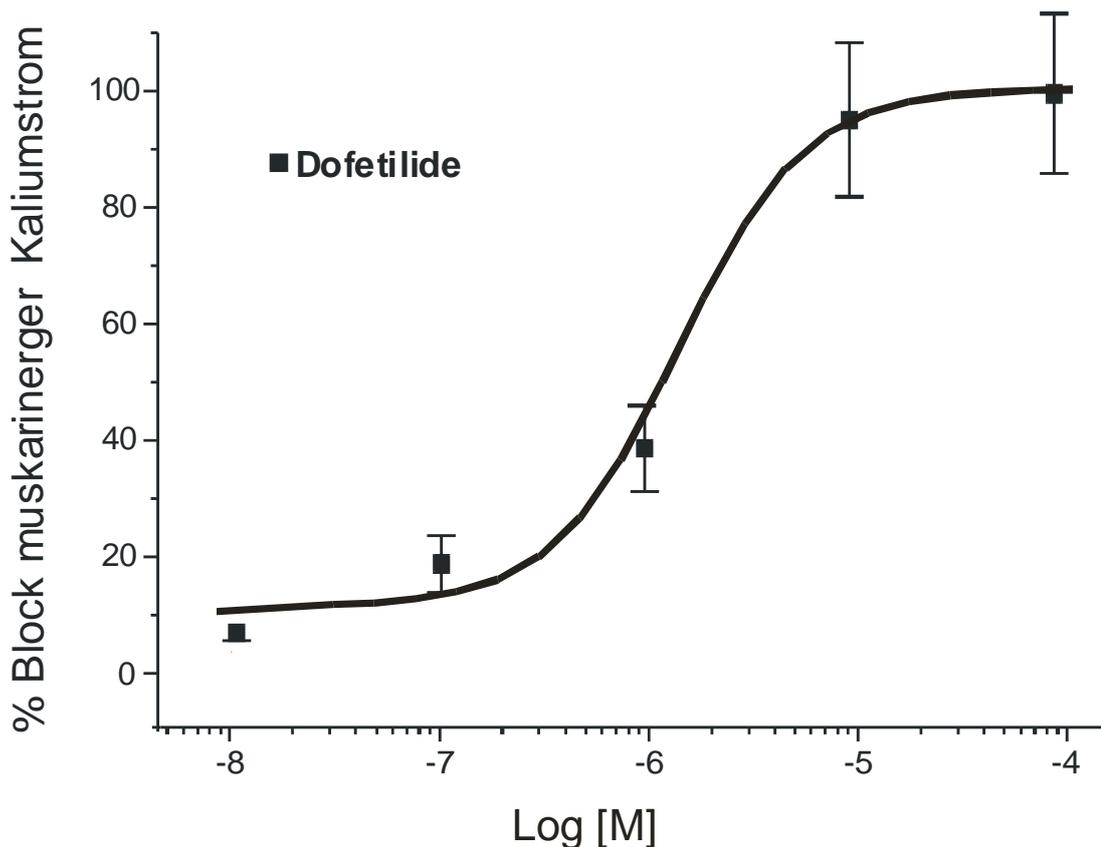


Abbildung 3.3.: Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide

3.1.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide

Abbildung 3.4. zeigt ein Experiment mit GTP- γ -S, welches beispielhaft ist für weitere 5 Experimente an 4 verschiedenen Ratten. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den bereits durch wiederholte Azetylcholinapplikationen irreversibel voraktivierten muskarinergen Kaliumionenstrom (Ionenstromamplitude zirka 1,2 nA). Wie schon unter reversibler Aktivierung allein unter Azetylcholin hemmte Dofetilide (in diesem Beispiel 50 μ M) auch den GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$. Die Hemmung war hier vollständig bis zurück auf das Ausgangsniveau des Hintergrundstromes (gestrichelte Linie I, mit II ist die Nulllinie beschriftet). Auch diese Hemmung zeigte sich als vollständig reversibel. Die Kinetik der Inhibition und des Auswaschens unterschied sich nicht offensichtlich von der Inhibitionskinetik des Agonisten induzierten $I_{K(ACh)}$.

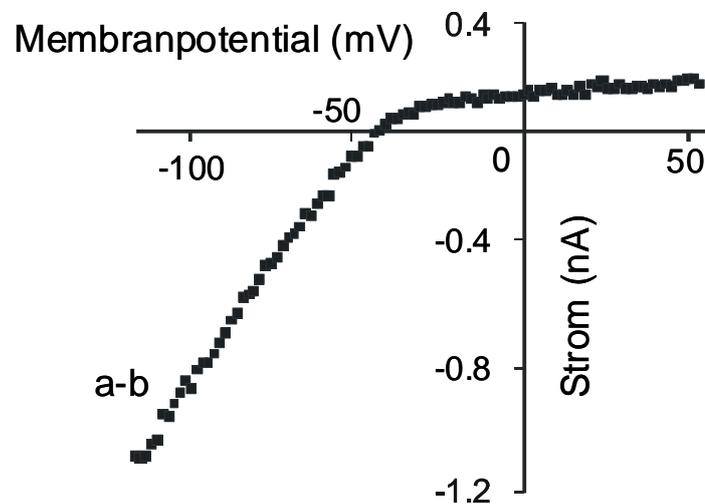
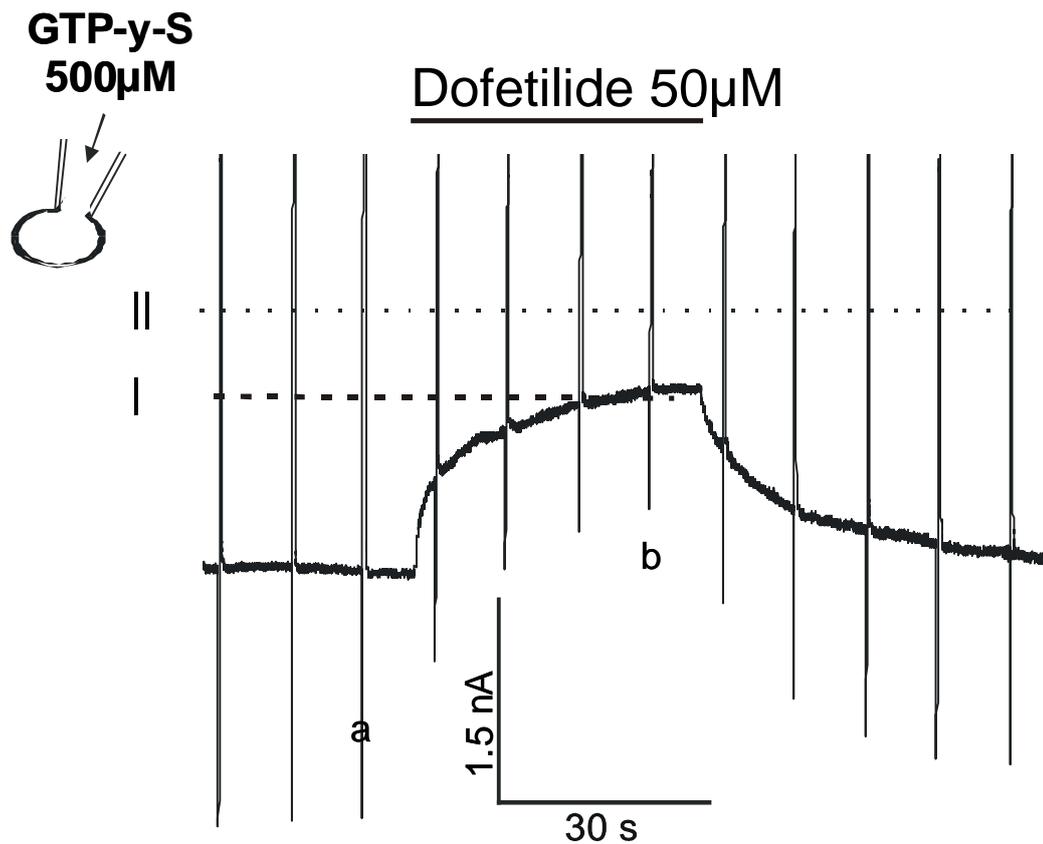


Abbildung 3.4.: Nach irreversibler Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ durch intrazelluläre Gabe von GTP- γ -S hemmt Dofetilide den Strom immer noch zuverlässig. Der gehemmte Strom (a-b) zeigt die typische Strom-Spannungskurve.

3.1.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem Dofetilide auf den $I_{K(ACh)}$

Dofetilide ist eine lipophile Substanz und sollte daher die Zellmembran passieren können. Grundsätzlich ist aufgrund der beschriebenen Experimente ein intrazellulärer Angriffspunkt des Pharmakons an der Signaltransduktionskaskade des $I_{K(ACh)}$ nicht auszuschließen. Um eine Differenzierung zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Wirkung der Substanz vorzunehmen, wurde Dofetilide in sättigender Konzentration (50 μ M) der Pipettenlösung im Rahmen von „whole-cell voltage-clamp“ Experimenten zugefügt.

Entsprechend der Erfahrungen mit der intrazellulären Ausbreitung von GTP- γ -S bei Applikation über die Pipette wäre eine vollständige Equilibration des Zytosols der Vorhofmuskelzelle innerhalb von wenigen Minuten zu erwarten. Man ließ nach der Ruptur der Zellmembran in den hier durchgeführten Untersuchungen einen Zeitraum von 20 Minuten verstreichen in der Annahme, dass diese Zeit ausreicht, um eine Equilibrium erzeugende Diffusion des Pharmakons in die Zelle zu ermöglichen. In der Literatur gibt es Hinweise für die ausreichende Verteilung von Substanzen im Zytosol innerhalb von 20 Minuten (Dukes et al., 1990, Castle 1991).

Wie in Abbildung 3.5. repräsentativ für 6 atriale Myozyten von 3 verschiedenen Ratten gezeigt, konnte auch nach einer Wartezeit von 20 Minuten eine unveränderte Stromantwort auf Azetylcholin hervorgerufen werden. Dies zeigt, dass keinerlei inhibitorische Wirkung durch die intrazelluläre Applikation von Dofetilide entfaltet wurde. Hingegen ließ sich zeigen, dass extrazelluläres Dofetilide weiterhin potent und reversibel den $I_{K(ACh)}$ hemmen konnte.

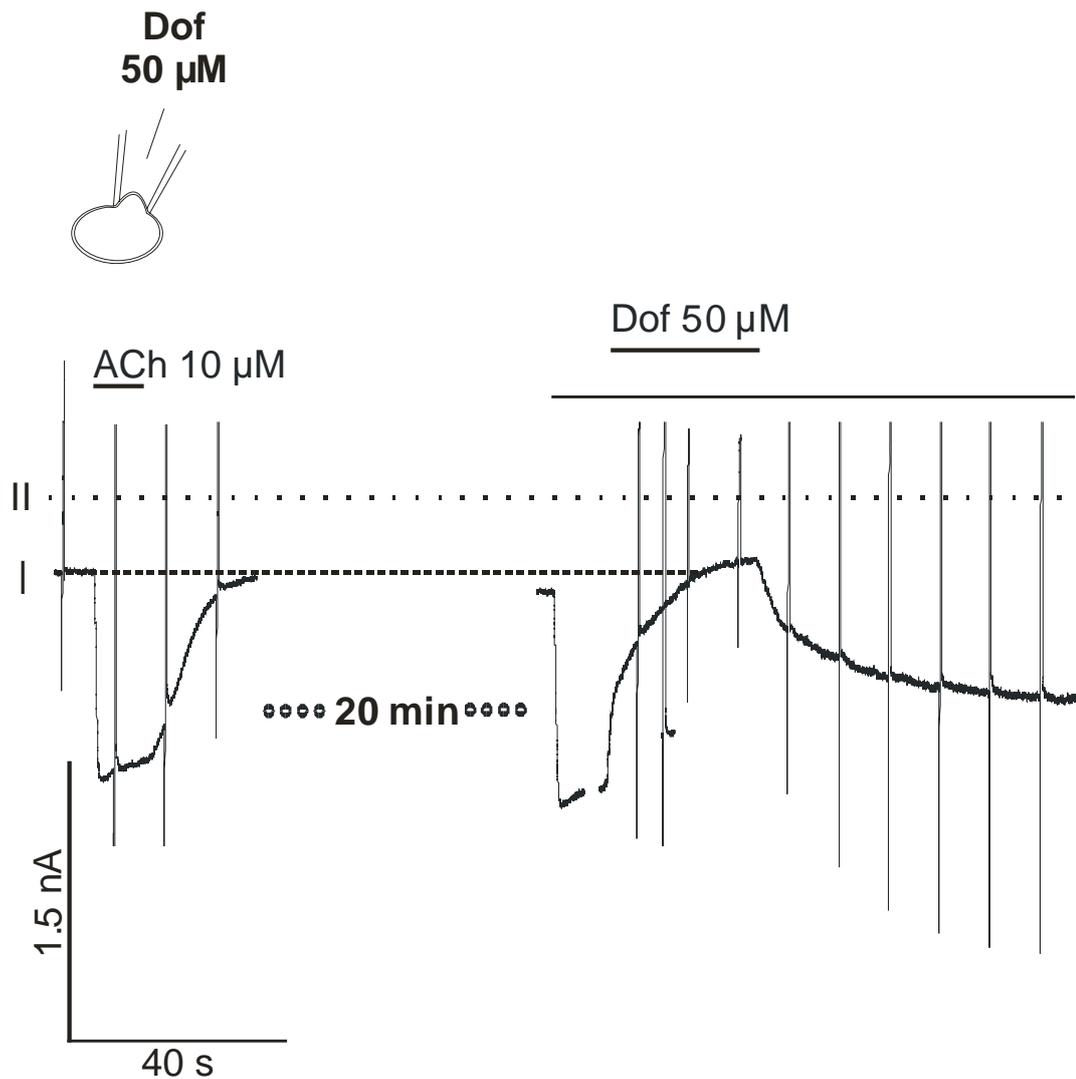


Abbildung 3.5.: Nach intrazellulärer Gabe von Dofetilide ist sofort und nach zwanzigminütiger Wartezeit, noch ein Kaliumionenstrom durch Azetylcholin auszulösen. Dieser Strom ist zuverlässig durch extrazelluläres Dofetilide zu hemmen.

3.1.4. Hemmung des Agonisten unabhängigen $I_{K(ACh)}$ durch Dofetilide

In atrialen Vorhofmuskelzellen wird der einwärts gleichrichtende Hintergrundstrom vor allem durch einen Anteil des muskarinergen Kaliumionenstroms gestellt, der unabhängig von der Besetzung von M_2 -Rezeptoren durch einen Agonisten aktiv ist. Wie aus der Abbildung 3.5. zu ersehen ist, hemmt 50 μM Dofetilide den $I_{K(ACh)}$ über das ursprüngliche Hintergrundstromniveau hinaus (Differenz zwischen den zwei gestrichelten Linien wobei die obere Linie das Nullstromniveau repräsentiert und die untere Linie das Niveau des Agonisten unabhängigen Hintergrundstromes anzeigt).

Die soweit durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass Dofetilide nicht durch eine Interaktion mit der Rezeptor-G-Protein-Kaskade seine inhibitorischen Effekte entfaltet, sondern von extrazellulär direkt mit dem Ionenkanalprotein interagiert.

3.2. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide

3.2.1. Hemmung des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide

Bei den nächsten Experimenten wurde die Wirkung des Klasse III Antiarrhythmikums Ibutilide auf den muskarinergen einwärtsgleichrichtenden Kaliumionenstrom untersucht. Der $I_{K(ACh)}$ wurde auch in diesen Experimenten durch Gabe von 10 μM Azetylcholin, also einer sättigenden Konzentration, induziert. Es zeigt sich eine deutliche Hemmung des Stroms innerhalb von wenigen Sekunden durch Zugabe von Ibutilide in die Kulturschale (Abbildung 3.6.). Bei jeder der untersuchten Zellen ($n=10$) konnte die typische

Strom-Spannungskurve des muskarinergen einwärtsgerichteten Kaliumionenstroms durch Subtraktion der Strom-Spannungsbeziehung unter Inhibition von der Strom-Spannungsbeziehung ohne Inhibition nachgewiesen werden. Nachdem die Gabe von Ibutilide beendet wurde, konnte ein schnelles Auswaschen beobachtet werden (Abbildung 3.6.). Wie die Hemmung durch Dofetilide, war auch die Hemmung durch Ibutilide fast vollständig reversibel.

ACh 10 μ M

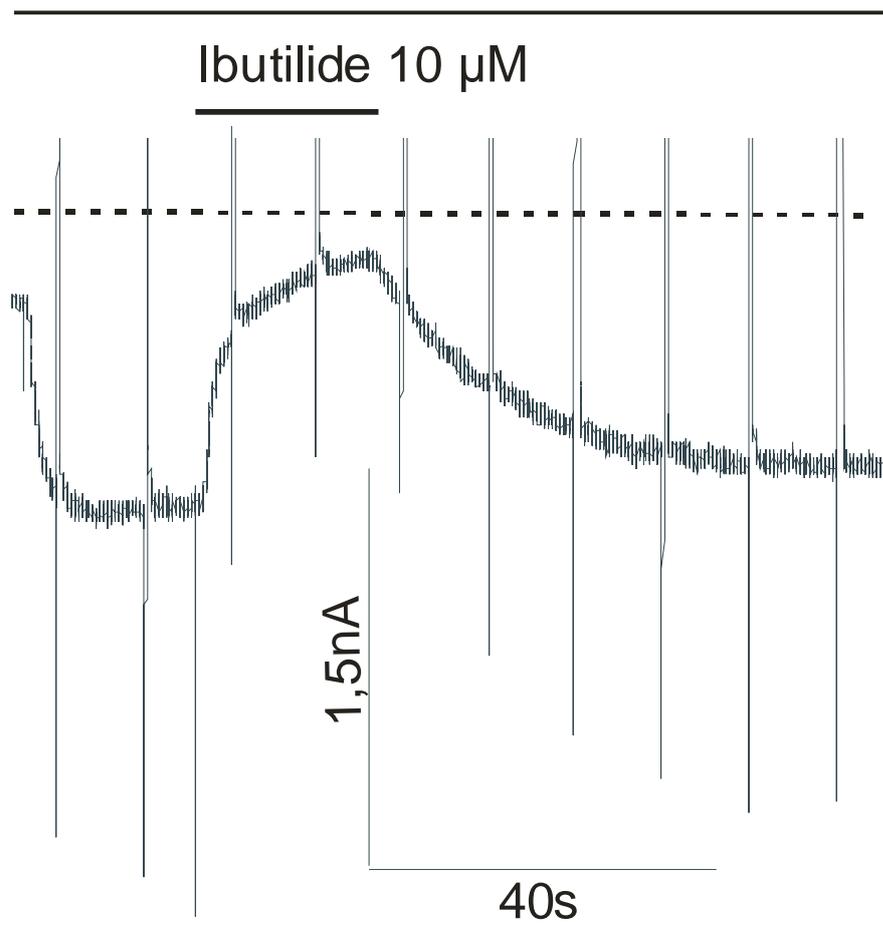


Abbildung 3.6.: Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch 10 μ M Ibutilide

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurve wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ibutilide superfundiert. Die genutzten Konzentrationen waren 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Bei jeder dieser Konzentrationen von Ibutilide konnte eine Hemmung des $I_{K(ACh)}$ nachgewiesen werden. Die Subtraktion der Strom-Spannungsbeziehung des gehemmten Stroms von der Strom-Spannungsbeziehung des Plateaustroms ergab bei jeder getesteten Konzentration jeweils die typische einwärtsgleichrichtende Strom-Spannungsbeziehung des $I_{K(ACh)}$. Der IC_{50} des $I_{K(ACh)}$ für Ibutilide betrug 1,7 μ M (Abbildung 3.7.).

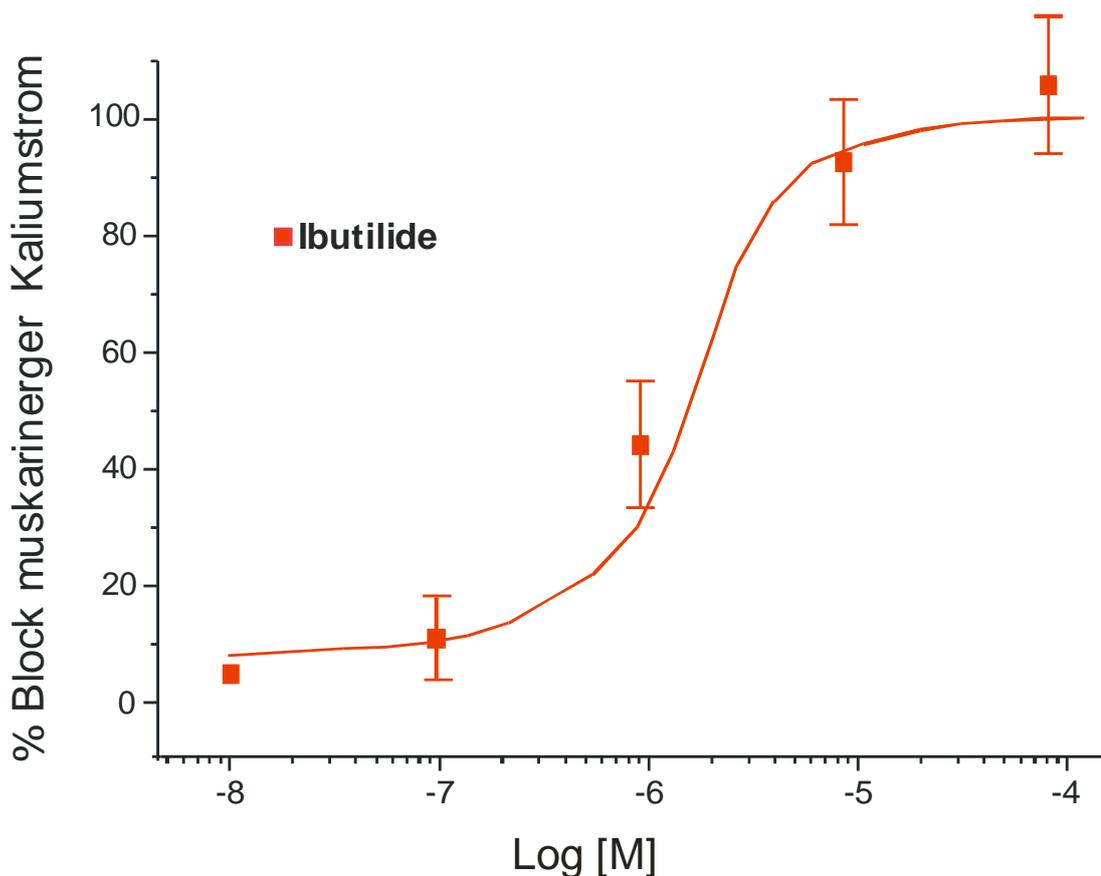


Abbildung 3.7.: Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide.

3.2.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide

Im nächsten Experiment wurde die Pipettenlösung wiederum mit GTP- γ -S versetzt. Nach mehrmaliger Superfusion von Azetylcholin in sättigender Konzentration zeigte sich auch ohne Zugabe von Azetylcholin ein Ionenstrom. Der aktivierte Ionenstrom ist der durch GTP- γ -S irreversibel induzierte $I_{K(ACh)}$. Nach Gabe von Ibutilide zeigte sich eine reproduzierbare Hemmung des irreversibel aktivierten $I_{K(ACh)}$. Diese Hemmung war wie schon bei Dofetilide durch Beendigung der Ibutilide Gabe auswaschbar. In allen gemessenen Zellen (n=4) waren die Ergebnisse qualitativ mit den Messungen des reversibel aktivierten $I_{K(ACh)}$ vergleichbar.

3.2.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem Ibutilide auf den $I_{K(ACh)}$

In weiteren Experimenten wurde der Pipettenlösung auch Ibutilide zugegeben. Ziel des Experiments war es, herauszufinden, ob Ibutilide von intrazellulär wirken kann. Auch nach zwanzigminütiger Wartezeit konnte keine Hemmung des durch 10 μ M Azetylcholin ausgelösten $I_{K(ACh)}$ nachgewiesen werden. Allerdings war es jederzeit möglich, bei Superfusion von Ibutilide von extrazellulär, den aktivierten $I_{K(ACh)}$ zu hemmen.

3.3. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch RP58866

3.3.1. Hemmung des Agonisten induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP58866

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die Wirkung des Klasse III Antiarrhythmikums RP58866 mit seinem wirksamen Enantiomer Terikalant auf den muskarinergen einwärtsgerichtenden Kaliumstrom untersucht. Nach Aktivierung des $I_{K(ACh)}$ durch 10 μ M Azetylcholin zeigte sich in allen untersuchten Zellen (n=11 von 6 unterschiedlichen Ratten) eine deutliche Hemmung des $I_{K(ACh)}$ (Abbildung 3.8.). Nach Subtraktion der Strom-Spannungsbeziehung des gehemmten Stroms von der Strom-Spannungsbeziehung des $I_{K(ACh)}$ Plateaustroms konnte, wie in Abbildung 3.8.B dargestellt, die typische einwärtsgerichtende Strom-Spannungsbeziehung des $I_{K(ACh)}$ gezeigt werden. Nach Wechsel der Superfusionslösung und alleiniger Gabe von Azetylcholin zeigte sich die Reversibilität der Ionenstromhemmung und es kam zu einer Erholung des Stroms.

In einer der 11 untersuchten Zellen wurde durch die interpolierten Spannungsrampen auch ein schnell aktivierender spannungsabhängiger Ionenstrom ausgelöst. Dies ist in Abbildung 3.8. erkennbar an der deutlichen Auswärtsstromkomponente der Spannungsrampen. Dieser Ionenstromanteil wurde unter Applikation von RP58833 ebenfalls gehemmt. Nach Auswaschen des RP58833 war auch die Morphologie der Spannungsrampen unter Azetylcholin sowie unter unbehandelter Tyrode wieder wie zuvor (Abbildung 3.8.). Nach Subtraktion des gehemmten Stroms vom Hintergrundstrom unter unbehandelter Tyrode konnte die Strom-Spannungsbeziehung eines Ionenstroms mit sowohl spannungsabhängigen als auch auswärtsgerichtenden Eigenschaften

dargestellt werden. Das Gleichgewichtspotential dieses Ionenstroms entsprach dem von Kalium unter unseren experimentellen Bedingungen. Es handelte sich also um einen Kaliumionenstrom (Abbildung 3.8.C). Diese Strom-Spannungsbeziehung zeigte die typischen Charakteristika des I_{Kr} . Diese Beobachtung entspricht qualitativ den Daten von Jurkiewicz et al (1996), die ebenfalls eine Hemmung des I_{Kr} durch RP58866 beschrieben haben.

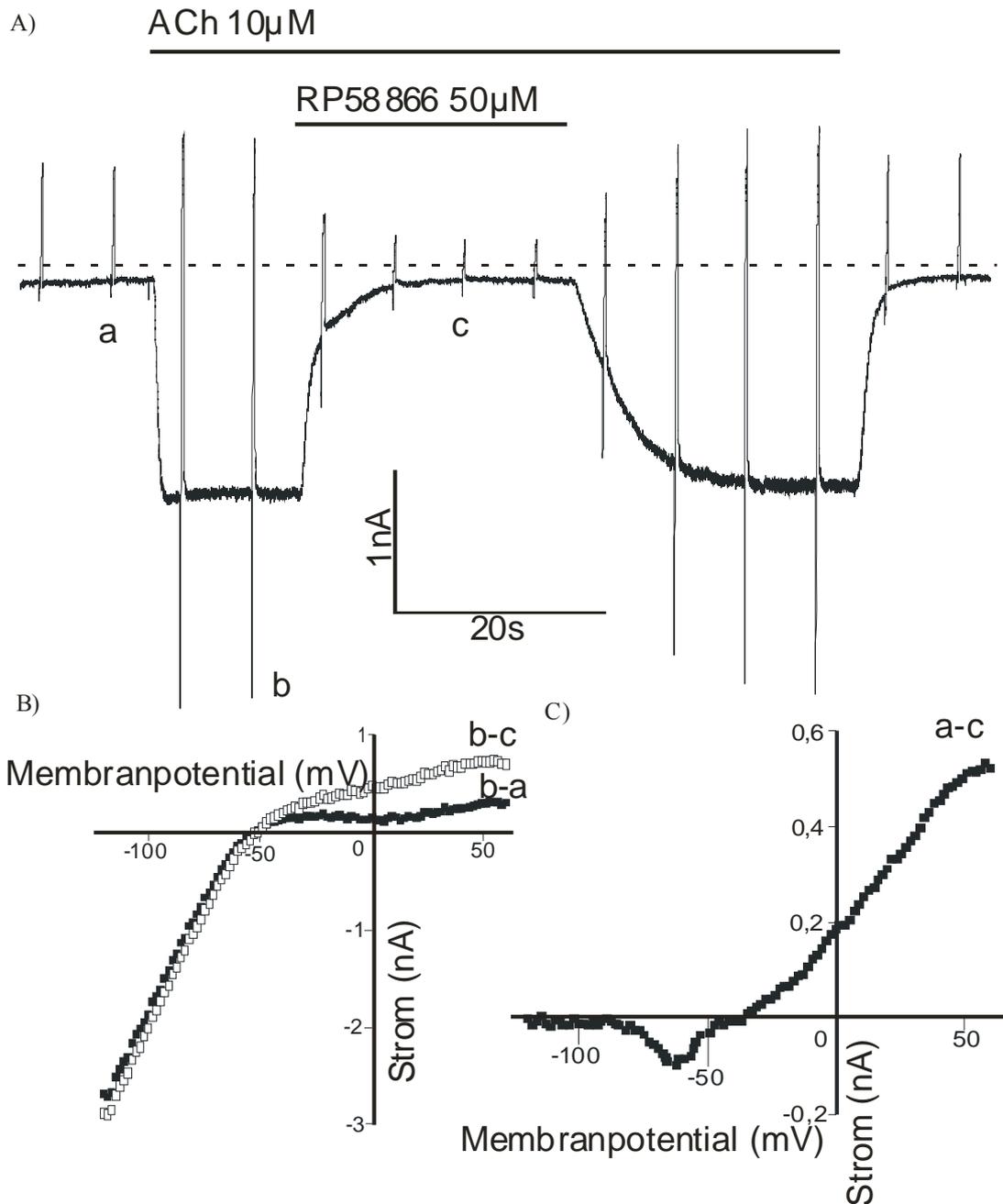


Abbildung 3.8.: Hemmung des $I_{K(ACh)}$ und des I_{Kr} in einer Messung durch RP58866 (A). In B) und C) erkennt man die Strom- Spannungskurven von $I_{K(ACh)}$ und I_{Kr} aus denen sich der gehemmte Strom zusammensetzt. Rampe b – Rampe c ist der reine $I_{K(ACh)}$, Rampe b – Rampe c der gesamte durch RP58866 gehemmte Strom und Rampe a – Rampe c ist der reine I_{Kr} .

Die inhibitorische Potenz von RP 58866 auf den $I_{K(ACh)}$ untersuchten wir wiederum durch systematische Applikation verschiedener Konzentration in Myozyten, deren $I_{K(ACh)}$ durch ACh $10\mu\text{M}$ voraktiviert war. Der IC_{50} für den $I_{K(ACh)}$ betrug $2,3\ \mu\text{M}$ (Abbildung 3.9.).

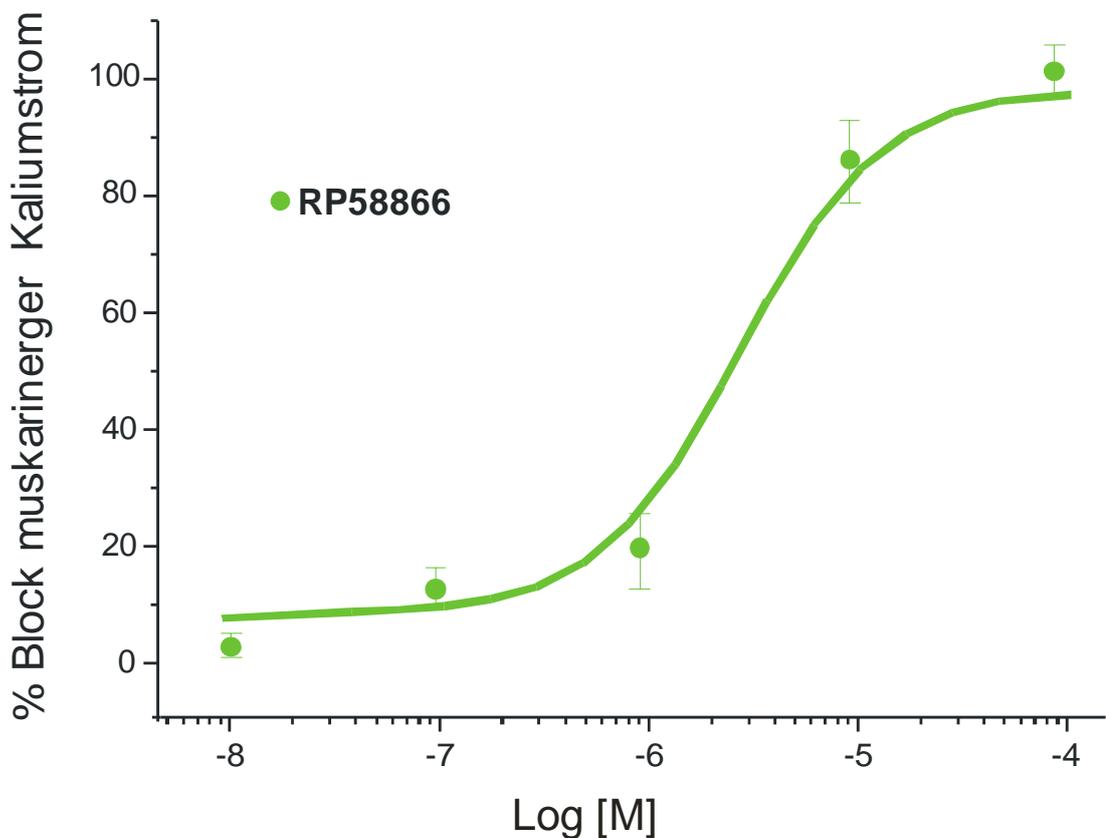


Abbildung 3.9.: Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch RP58866.

3.3.2. Hemmung des GTP- γ -S induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP 58866

Wie bei den vorhergegangenen Substanzen, wurde auch hier von RP 58866 der durch GTP- γ -S irreversibel induzierte muskarinerge einwärtsgerichtete Kaliumstrom gehemmt (Abbildung 3.10.). Auch diese Inhibition war reversibel; in diesem Experiment wurde das Ausgangsniveau der Stromaktivierung durch GTP- γ -S vollständig erreicht. Ein Unterschied hinsichtlich der Inhibitions-, beziehungsweise Auswaschkinetik im Vergleich zur Hemmung des Agonisten induzierten Stromes ließ sich nicht nachweisen.

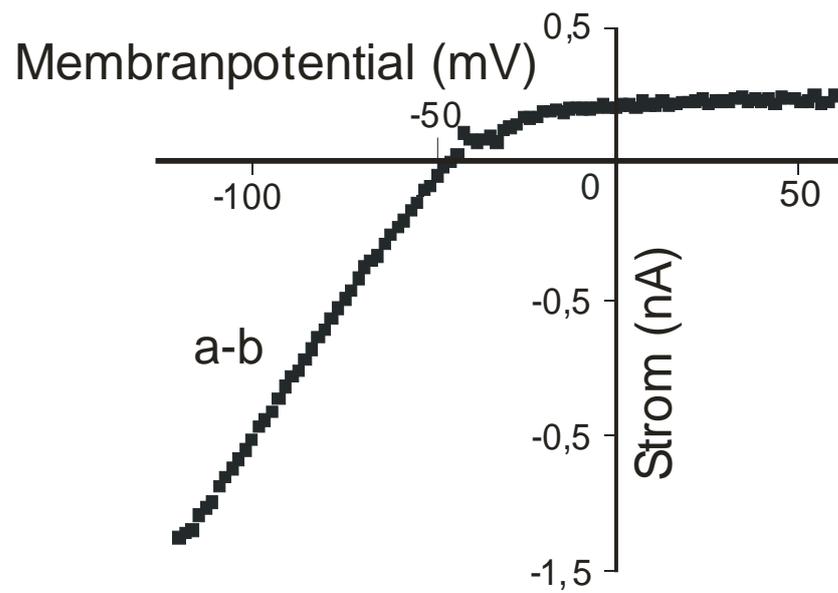
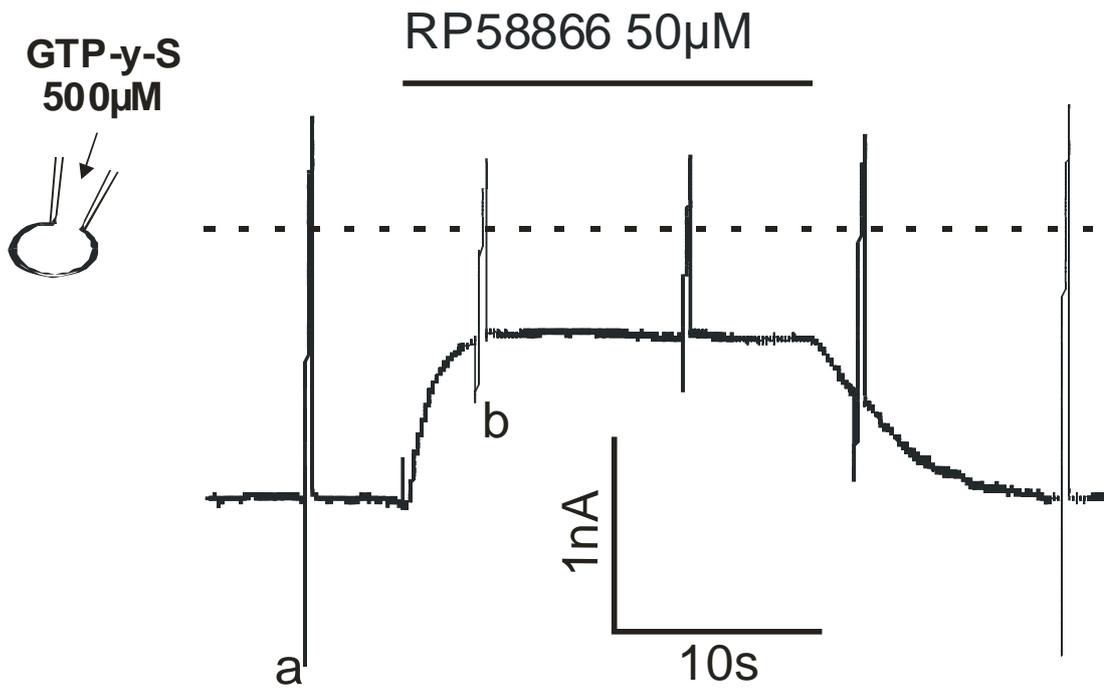


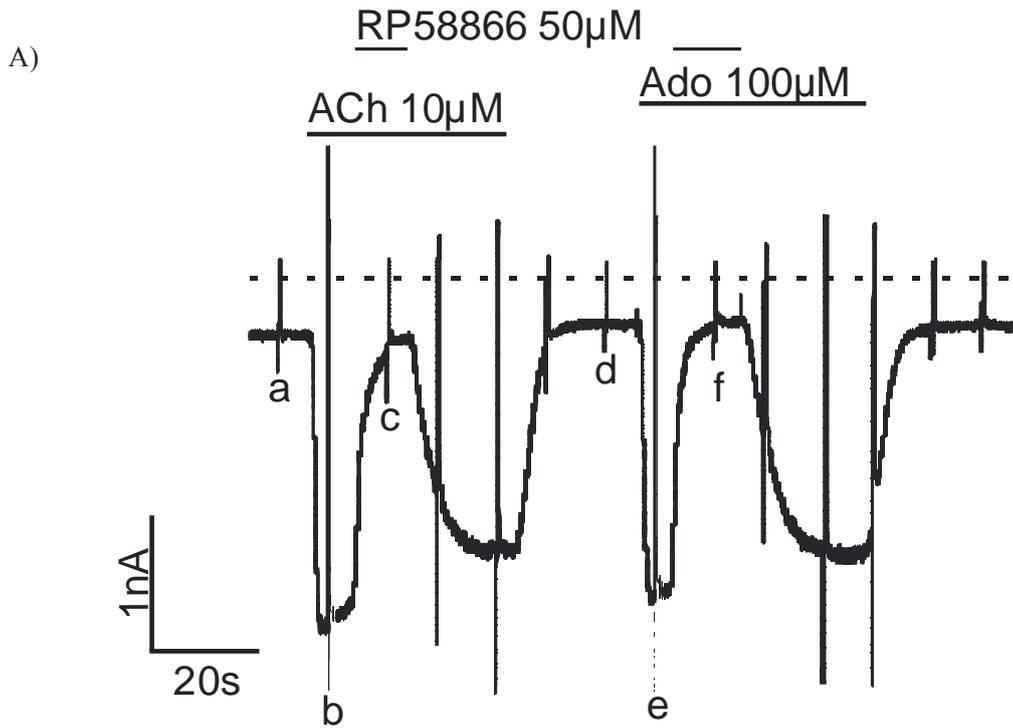
Abbildung 3.10.: Hemmung des durch GTP- γ -S irreversibel aktivierten $I_{K(ACh)}$ durch RP58866.

3.3.3. Wirkung von intrazellulär appliziertem RP58866 auf den $I_{K(ACh)}$

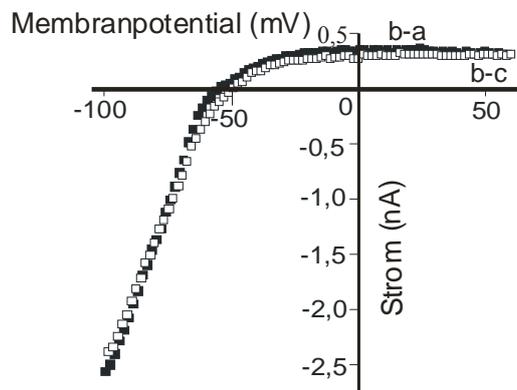
Auch RP58866 ist lipophil und man muß von einer guten Membrangängigkeit ausgehen. Dennoch war keinerlei Inhibition des $I_{K(ACh)}$ nach intrazellulärer Perfusion zu erkennen. Eine intrazelluläre Gabe von RP58866 erzielte auch nach zwanzigminütiger Wartezeit keinerlei Wirkung.

3.3.4. Hemmung des Adenosin induzierten $I_{K(ACh)}$ durch RP58866
Der muskarinerge Kaliumionenstrom wird, wie oben bereits beschrieben, nicht nur durch muskarinerge M_2 Rezeptoren aktiviert, sondern auch durch purinerge A_1 Rezeptoren. Adenosin zeigte in der hier vorgestellten Arbeit eine sättigende Stromantwort bei 100 μM . Die maximal erreichbare Amplitude war geringer als die des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$. Wie von anderen Untersuchern bereits beschrieben, zeigte der Adenosin induzierte $I_{K(ACh)}$ keinerlei schnelle Desensitisierung innerhalb der ersten Sekunden nach Agonistenapplikation.

Auch der Adenosin abhängige $I_{K(ACh)}$ war RP58866 sensibel. Eine vollständige Hemmung war bei 50 μM nachweisbar wie Abbildung 3.11. zeigt. Zum Vergleich ist zu Beginn des Experimentes noch einmal die Inhibition des Azetylcholin abhängigen $I_{K(ACh)}$ gezeigt. Es wird deutlich, dass der Ionenstrom unabhängig von der Aktivierungsart annähernd gleich potent inhibiert wird.



B)



C)

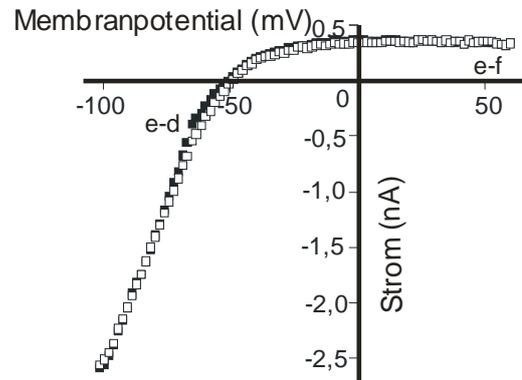


Abbildung 3.11.: Hemmung des Azetylochininduzierten sowie des Adenosininduzierten I_{KACh} durch RP58866 (A). B) und C) zeigen die typischen Strom-Spannungskurven der gehemmten Ströme.

3.4. Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Chromanol 293B

Zur Komplettierung des Spektrums der getesteten Substanzen wählten wir den spezifischen I_{Ks} Inhibitor Chromanol 293B aus. Bei keiner der untersuchten 8 Zellen konnte eine Hemmung des $I_{K(ACh)}$ nachgewiesen werden. Getestet wurden Konzentrationen bis hin zu 100 μM . Ein repräsentatives Beispiel zeigt Abbildung 3.12.

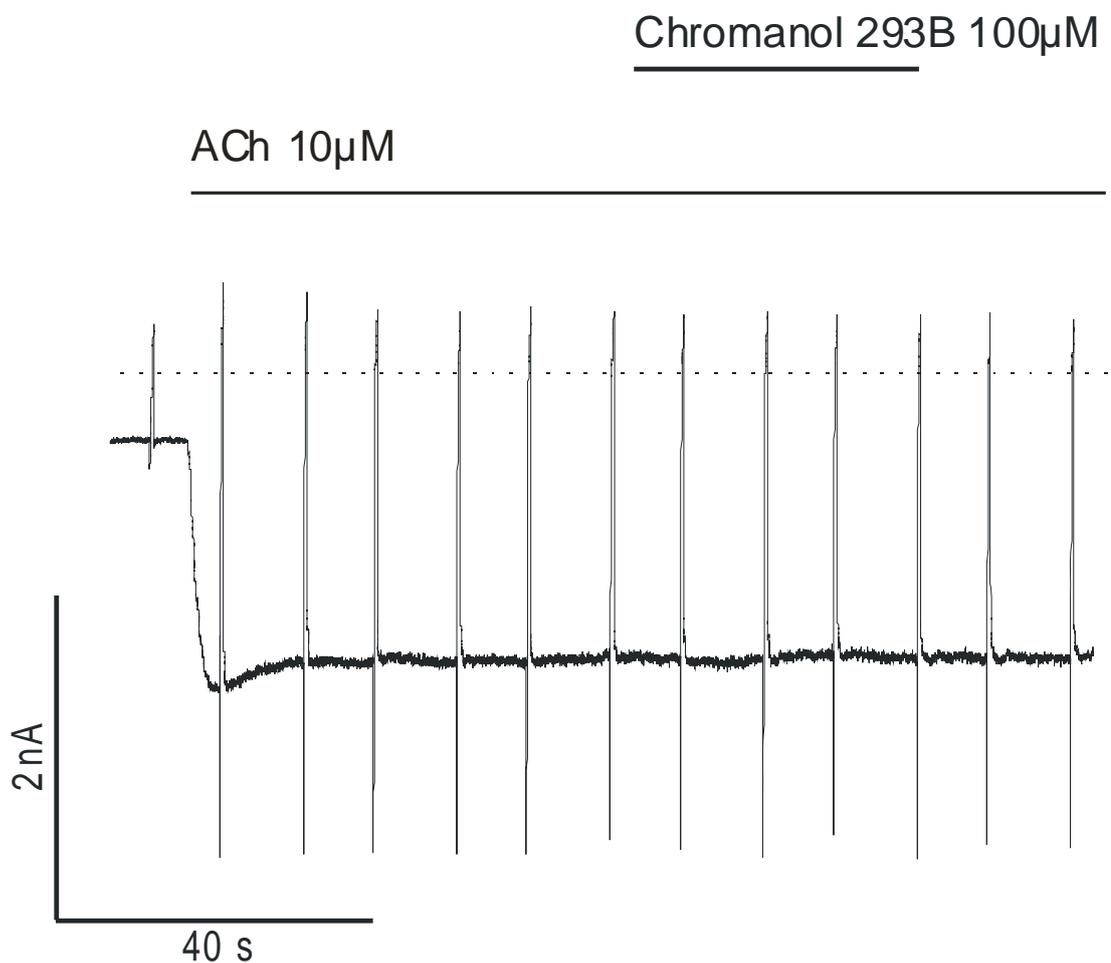


Abbildung 3.12.: Fehlende Wirkung von Chromanol 293B auf den $I_{K(ACh)}$

Wenn man die Ergebnisse aller durchgeführten Messungen vergleicht, zeigt sich eine Korrelation zwischen der Potenz der Inhibition von $I_{K(ACh)}$ und I_{Kr} . Abbildung 3.13. zeigt den IC_{50} für die Inhibition des $I_{K(ACh)}$ im Vergleich zwischen den Substanzen.

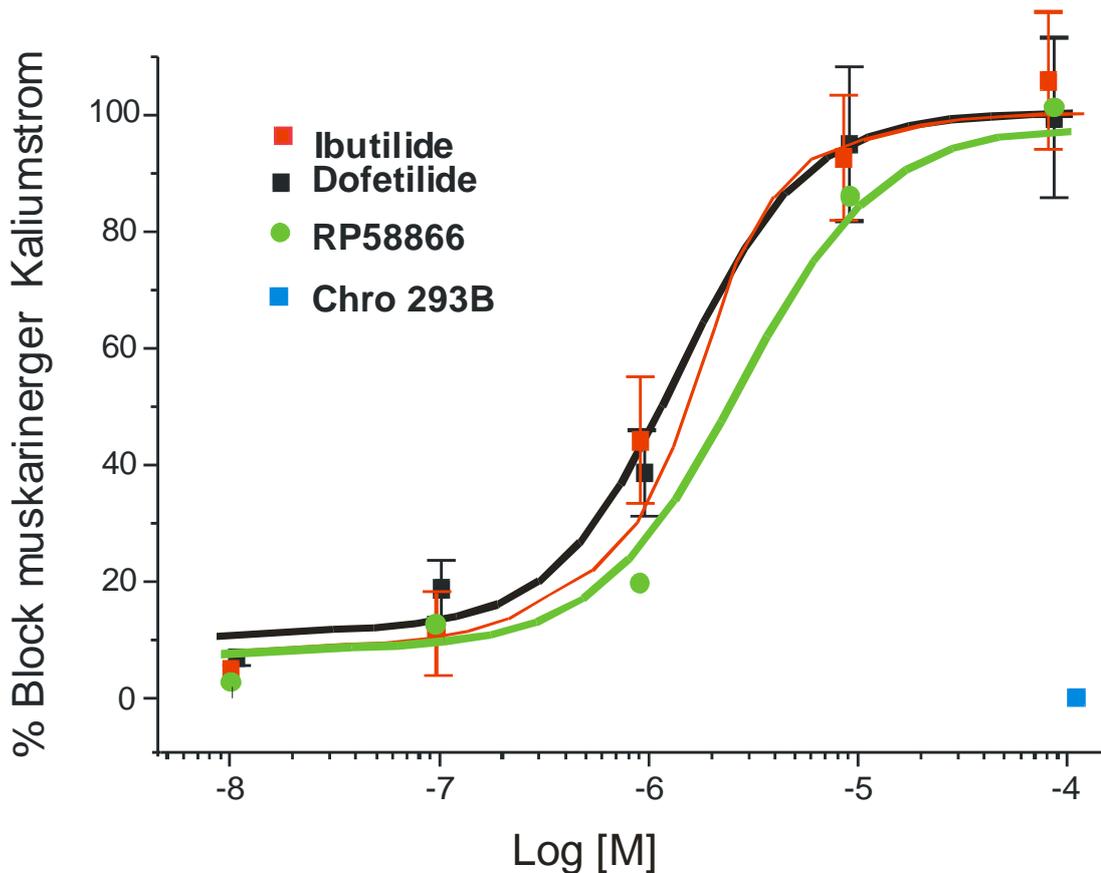


Abbildung 3.13. zeigt die verschiedenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Hemmung des $I_{K(ACh)}$ durch Ibutilide, Dofetilide und RP58833. Die IC_{50} betragen für Ibutilide $1,7 \mu M$, Dofetilide $1,2 \mu M$ und RP58833 $2,3 \mu M$. Chromanol 293B hemmt den muskarinergen einwärtsgerichtenden Kaliumstrom nicht.

4. Diskussion

4.1. Klasse III Antiarrhythmika in der Therapie des Vorhofflimmerns

Klasse III Antiarrhythmika nach Vaughan Williams werden zur Therapie von ventrikulären Herzrhythmusstörungen und zur Therapie von Vorhofflimmern genutzt (Rees et al., 1993). Sie hemmen repolarisierende Kaliumionenströme. Klassische Vertreter sind das Sotalol und das Amiodaron, neuere Substanzen sind Ibutilide, Dofetilide, RP 58833 und Chromanol 293B.

Insbesondere die neueren Klasse III Antiarrhythmika wie zum Beispiel Ibutilide, Dofetilide und RP58833 zeigen in Bezug auf eine Rhythmisierung von Vorhofflimmern verbesserte Ergebnisse. Es wurde erfolgreich Vorhofflimmern mittels intravenöser Gabe von Ibutilide terminiert (Ellenbogen et al., 1996, Stambler et al., 1996, van der Lugt et al., 1999). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nach Vorgabe von Ibutilide intravenös die Erfolgswahrscheinlichkeit von elektrischen Kardioversionen signifikant gesteigert werden konnte (Oral et al., 1999).

Dofetilide wird auch zur chemischen Kardioversion in den Sinusrhythmus sowie zur Rhythmusstabilisierung genutzt. Prystowsky et al. beschreiben eine erfolgreiche Rhythmusstabilisierung bei 33 % der Patienten über 1 Jahr (Prystowsky et al., 2003). Auch in den ersten Veröffentlichungen der SAFIRE-D („symptomatic atrial fibrillation investigate research on dofetilide“) Studie erscheinen die Wirkung von Dofetilide auf das Vorhofflimmern sowie die Verträglichkeit vielversprechend (Singh 2003).

Im Vergleich zu Amiodaron, scheinen Dofetilide und Ibutilide eine bessere Wirksamkeit bei Kardioversionen zu erzielen. Zur Kardioversion von Vorhofflimmern wirkt Dofetilide bei intravenöser Gabe besser als Amiodaron (Bianconi et al., 2000). Mit Amiodaron vorbehandelte Patienten werden mittels Ibutilide intravenös mit guten Ergebnissen chemisch kardiovertiert (Glatter et al., 2001).

Die Therapie mit allen zur Zeit zur Verfügung stehenden Klasse III Antiarrhythmika birgt das Risiko von lebensgefährlichen Rhythmusstörungen. Für die bekannten Klasse III Antiarrhythmika ist die Entstehung von „torsades de pointes“ Tachykardien beschrieben. Diese Tachykardien entstehen durch Frühdepolarisationen bei Inhibition von repolarisierenden Kaliumionenströmen (Sugiyama et al., 2002). Ein Prädiktor für das Auftreten dieser Tachykardien ist die Verlängerung der QT-Zeit im Oberflächen EKG. Trotz Titration der Dosierung von Klasse III Antiarrhythmika nach der QT-Dauer zur Vermeidung von QT-Verlängerungen von über 130-135 % konnten ventrikuläre lebensgefährdende Rhythmusstörungen nicht ausgeschlossen werden. Die Therapie von Vorhofflimmern mittels Klasse III Antiarrhythmika scheint somit zwar erfolgversprechend, ist jedoch auch mit relevanten Nebenwirkungen behaftet.

4.2. Klasse III Antiarrhythmika und der $I_{K(ACh)}$

Es ist bekannt, dass einige Klasse III Antiarrhythmika den muskarinergen einwärtsgerichteten Kaliumionenstrom hemmen. Mori et al. wiesen bereits 1995 eine Inhibition des $I_{K(ACh)}$ durch d,l-Sotalol nach. Der IC₅₀-Wert betrug 36 μ M. In dieser Studie wurde ebenfalls die Inhibition des $I_{K(ACh)}$ durch E-4031 und MS-551, ebenfalls

Klasse III Antiarrhythmika, gezeigt (Mori et al., 1995). Auch die Inhibition durch Amiodaron ist bereits beschrieben (Watanabe et al., 1996). Weitere Studien zeigten eine Inhibition des $I_{K(ACh)}$ durch Aprinidine (Ohmoto-Sekine et al., 1999), SUN1165, Flecainid und Disopyramid (Inomata et al., 1991). Pathophysiologisch spielt der $I_{K(ACh)}$ bei dem häufigen vagal induzierten Vorhofflimmern eine Rolle (Dobrev et al., 2001, Kovoov et al., 2001). Über die Wirkung der neueren Klasse III Antiarrhythmika auf den muskarinergen einwärtsgerichteten Kaliumionenstrom $I_{K(ACh)}$ ist noch nichts bekannt. In dieser Studie sollten die Substanzen hinsichtlich ihrer möglichen Wirkung auf den $I_{K(ACh)}$ untersucht werden. Hierzu wurden zunächst die Klasse III Antiarrhythmika Dofetilide, Ibutilide, RP 58833 und Chromanol 293B untersucht. RP 58833 wird häufig auch unter dem Namen seines wirksamen Enantiomers Terikalant geführt.

4.3. Messergebnisse allgemein

Die Kaliumionenströme wurden mit der „whole-cell voltage-clamp“ Technik an isolierten Vorhofmuskelzellen von Ratten gemessen. Die nach der Präparation gewonnenen atrialen Myozyten konnten über zirka 9 Tage kultiviert werden. Bei dieser Studie kamen nur 2-4 Tage alte Zellen zum Einsatz. Vorarbeiten haben gezeigt, dass unter den gewählten Bedingungen während einer solchen Zellkultivierung keine wesentlichen qualitativen Änderungen der elektrophysiologischen Parameter des muskarinergen Kaliumionenstromes stattfinden. Diese Vorberichte entsprechen den hier gefundenen Ergebnissen. Bünemann et al. konnten 1996 nachweisen, dass unter Inkubation mit fetalem Kälberserum eine sukzessive Herabregulation des Adenosin abhängigen muskarinergen Kaliumionenstromes nachweisbar ist. Nicht nachweisbar war diese

Herabregulation bei Kultivierung der Herzmuskelzellen in Kälberserum freiem Medium. Wir verzichteten daher für unsere Untersuchungen auf die Addition von Kälberserum und konnten daher auch keine Herabregulation im Verlauf der Inkubationen feststellen. Für den Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Sensitisierung bei Inkubation über Tage stattfindet. Diese Sensitisierung betrifft vor allem die frühe Aktivierungskomponente, die sich nach längerer Inkubation deutlich betont zeigt. Dieses Phänomen wurde auf eine Heraufregulation der M_2 -Rezeptoren zurückgeführt (Bünemann et al., 1997). Im Rahmen dieser Studie wurde dieses Phänomen nicht systematisch untersucht, auch wenn wir grundsätzlich die beschriebenen Veränderungen im Rahmen unserer Experimente qualitativ nachvollziehen konnten.

Der $I_{K(ACh)}$ wurde durch Superfusion von 10 μ M Azetylcholin induziert. Die mittlere Ionenstromamplitude / Ionenstromdichte dieser Untersuchung deckt sich in ihrer Größenordnung mit der von Voruntersuchern am gleichen System. In der vorliegenden Arbeit betrug die mittlere Ionenstromdichte des Azetylcholin induzierten $I_{K(ACh)}$ 75 ± 9 pA/pF und die des Adenosin induzierten $I_{K(ACh)}$ 23 ± 17 pA/pF. Andere Arbeitsgruppen berichten über Ionenstromdichten im Bereich von 45-70 pA/pF (Koumi et al., 1995, Zang et al., 1995, Bünemann et al., 1996). Die gefunden Unterschiede mögen auch in Unterschieden der Spezies begründet sein.

Nach Aktivierung des Stroms wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz superfundiert. Zu jedem aktivierten bzw. inhibierten Strom wurde eine Strom- Spannungs- Beziehung erstellt so dass die Ströme eindeutig identifiziert werden konnte. Um eine

Konzentrations- Wirkungskurve erstellen zu können, wurden die Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M). Zu jeder untersuchten Substanz die eine Inhibition zeigte wurde dann die mittlere Hemmkonzentration IC_{50} berechnet. Der IC_{50} ist die Konzentration der Substanz bei der 50 % des aktivierten Stroms inhibiert ist. Er stellt somit ein einfaches Maß für die Potenz einer Substanz zur Ionenstrominhibition dar. Je niedriger der IC_{50} Wert desto höher die inhibitorische Potenz.

4.4. Vergleich der substanzspezifischen Ergebnisse

Drei untersuchte Substanzen, Dofetilide, Ibutilide und RP58833, hemmten den $I_{K(ACh)}$. Die Inhibition war in allen Zellen zu reproduzieren und es konnte jeweils die typische Strom- Spannungs-Beziehung eines einwärtsgerichtenden Kaliumstroms für den gehemmten Strom nachgewiesen werden.

Die Potenz der Inhibition war unterschiedlich ausgeprägt. Die IC_{50} von Dofetilide betrug 1,2 μ M, die von Ibutilide 1,7 μ M und die von RP 58833 2,3 μ M. Im Gegensatz zu diesen als I_{Kr} Ionenstromblocker bekannten Pharmaka zeigt sich unter Gabe von Chromanol 293B keinerlei Hemmung des $I_{K(ACh)}$ (n=8). Chromanol 293B ist ein selektiver Blocker des $I_{K(s)}$ und besitzt keinerlei Wirkung auf den I_{Kr} (Bosch et al., 1998).

Auffällig ist die Zwischenstellung von Sotalol. Es hemmt den $I_{K(ACh)}$ nicht so ausgeprägt wie die anderen (Mori et al., 1995) I_{Kr} Hemmer, ist aber auch potenter als das Chromanol 293 B. Diese Eigenschaft ist begleitet durch eine ebenfalls bekannte geringere Effektivität der I_{Kr}

Hemmung. Außer Chromanol 293B waren alle hier benutzten Substanzen als Blocker des I_{Kr} beschrieben (Jurkiewicz et al., 1996, Carmeliet 1992, Yang et al., 2001). Die IC_{50} Werte für den I_{Kr} betragen für Dofetilide 16 nM, Ibutilide 23 nM und RP58833 28 nM. Bei Gegenüberstellung der IC_{50} -Werte für den I_{Kr} und $I_{K(ACh)}$ fällt eine Korrelation hinsichtlich der Potenz der Inhibition durch die verschiedenen Antiarrhythmika auf. Veranschaulicht wird dies durch die gemeinsame Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurven in Abbildung 3.13. Diese klare Korrelation zwischen Ausprägung der $I_{K(ACh)}$ Hemmung und der I_{Kr} Hemmung lässt eine Verwandtschaft des Inhibitionsmechanismus zwischen $I_{K(ACh)}$ und I_{Kr} Hemmung vermuten. Es wurden daher weitere Experimente durchgeführt um die molekulare Grundlage der Ionenstrominhibition durch die einzelnen Substanzen zu untersuchen.

4.5. Wirkungsort und Wirkmechanismus

Der $I_{K(ACh)}$ ist ein G-Protein abhängiger Kaliumionenkanal (Kurachi et al., 1986). Die aktivierende Einheit ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteinsystems (Kurachi et al., 1995). GTP- γ -S bindet irreversibel an die α -Untereinheit des G-Proteinsystems, so dass einmal aktivierte Kanäle geöffnet bleiben. In den Messungen wurde GTP- γ -S über die Pipettenspitze intrazellulär zugeführt. Nach Wartezeit von 20 Minuten wurde der $I_{K(ACh)}$ durch 10 μ M Azetylcholin aktiviert. Es entwickelte sich ein irreversibler maximal aktivierter $I_{K(ACh)}$. Nach Zustandekommen des „steady states“ wurde die Zelle mit der Substanz superfundiert. Qualitativ entsprechen diese Effekte von GTP- γ -S denen anderer Arbeitsgruppen an vergleichbaren Modellen.

Alle drei Substanzen inhibierten den durch GTP- γ -S irreversibel induzierten $I_{K(ACh)}$ zuverlässig in jeder gemessenen Zelle. Diese Ergebnisse zeigen, dass Dofetilide, Ibutilide und RP58833 den $I_{K(ACh)}$ weder über das G-Proteinsystem hemmen können, denn dieses ist ja irreversibel aktiviert, noch inhibieren sie den $I_{K(ACh)}$ über eine Wirkung am Rezeptor, da der GTP- γ -S aktivierte Strom Rezeptor unabhängig ist. Die gemessenen Ergebnisse deuten also auf eine direkte Wirkung am Kanal hin.

Für eine direkte Wirkung der Substanzen am Ionenkanalprotein sprechen auch die Befunde der intrazellulären Applikation der Antiarrhythmika. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass auf diesem Wege Pharmaka in die Zelle diffundieren können. Dukes et. al. beschrieben 1990 die intrazelluläre Wirkung von Tedisamil auf diesem Weg. 1991 beschrieb Castle durch dieses Set up die Wirkung von Clofilium (Dukes et al., 1990, Castle 1991). In diesen Studien wurde eine Zeit von 20 Minuten als in jedem Fall ausreichend für eine effektive Diffusion bezeichnet. Von einer guten Verteilung der Pharmaka durch Diffusion in die Zelle ist auch auszugehen, da die Ergebnisse mit GTP- γ -S eine erfolgreiche Diffusion beweisen. Wir warteten ebenfalls 20 Minuten bis zur endgültigen Auswertung des Ergebnisses.

Auch nach zwanzigminütiger Wartezeit konnten wir keine inhibitorische Wirkung auf den $I_{K(ACh)}$ nachweisen. Somit konnte keine intrazelluläre Wirkung von Dofetilide, Ibutilide und RP58833 erzielt werden. Eine Verminderung der Wirksamkeit der Substanzen durch das verlängerte „whole cell“ Experiment konnte ausgeschlossen werden, da bei extrazellulärer Gabe der Pharmaka auch nach der eingehaltenen Wartezeit eine Inhibition des Kaliumionenstroms zu beobachten war.

Die qualitativen Ergebnisse dieser Inhibition entsprachen den Ergebnissen der vorhergegangenen Experimente ohne Wartezeit. Eine Ionenkanalhemmung von intrazellulär scheint somit nicht gegeben.

4.6. Schlussfolgerungen

Insgesamt lassen die Resultate den Schluss zu, dass die getesteten Inhibitoren des muskarinergen Kaliumionenstroms durch direkte Interaktion mit den Porenproteinen von der externen Seite der Zellmembran aus wirken. Die enge Korrelation zwischen Potenz der Inhibition des $I_{K(ACh)}$ und Inhibition des I_{Kr} machen hier einen gemeinsamen Wirkmechanismus wahrscheinlich, dessen Grundlage wahrscheinlich auf molekularen Homologien der Ionenkanäle im Porenbereich zurückzuführen ist. Weitere Studien sind erforderlich um hier Klarheit zu verschaffen. Diese könnten dann die Grundlage bilden um möglicherweise eine Trennung zwischen Inhibition von $I_{K(ACh)}$ und I_{Kr} zu erzielen. Dies wäre wünschenswert, da eine Hemmung des $I_{K(ACh)}$ ohne Einfluß auf den I_{Kr} eine antiarrhythmische Wirkung auf das Vorhofflimmern erwarten ließe, ohne jedoch das Risiko gefährlicher Proarrhythmien tragen zu müssen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Klasse III Antiarrhythmika auf den muskarinergen einwärtsgerichtenden Kaliumkanal des Herzens untersucht. Es wurden Experimente mit der „whole-cell patch-clamp“ Technik durchgeführt. Untersucht wurden isolierte Vorhofmyozyten von Ratten. Die untersuchten Klasse III Antiarrhythmika waren Dofetilide, Ibutilide, RP58866 und Chromanol 293B.

Es konnte gezeigt werden, dass Dofetilide, Ibutilide und RP58866 den muskarinergen Kaliumkanal äusserst potent inhibieren. Im Gegensatz dazu zeigte Chromanol 293B auch in höheren Konzentrationen keinerlei Wirkung auf den $I_{K_{ACh}}$.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der wahrscheinliche Wirkungsort der Inhibition direkt am Kanal von der extrazellulären Seite der Zelle liegt.

Zwischen der hier gezeigten Hemmung des $I_{K_{ACh}}$ sowie der bereits in der Literatur bekannten Inhibition repolarisierender Kaliumkanäle durch die untersuchten Substanzen scheint es einen Zusammenhang zu geben. Die relativ I_{Kr} spezifischen Substanzen Dofetilide, Ibutilide und RP58866 inhibierten den $I_{K_{ACh}}$ ebenfalls stark wohingegen die relativ I_{Ks}

spezifische Substanz Chromanol 293B den $I_{K_{ACH}}$ nicht inhibierte. Dieses lässt auf einen ähnlichen Wirkmechanismus schliessen.

Von Klasse III Antiarrhythmika ist die gute Wirkung bei der Therapie von Vorhofflimmern beschrieben. Eine der Hauptnebenwirkungen dieser Substanzen ist die Entstehung von „Torsades de pointes“ Tachykardien. Diese Tachykardien entstehen durch die Hemmung von repolarisierenden Kaliumkanälen. Ziel weiterer Studien sollte es sein, einen $I_{K_{ACH}}$ spezifischen Inhibitor zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

Abildskov JA.

Additions to the wavelet hypothesis of cardiac fibrillation.

J Cardiovasc Electrophysiol. 1994;5(6):553-9.

Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL.

Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation.

Circulation. 2001;103(5):769-77.

Allessie MA, Kirchhof CJ, Konings KT.

Unravelling the electrical mysteries of atrial fibrillation.

Eur Heart J. 1996;17 Suppl C:2-9

Auer J, Berent R, Eber B

Amiodarone in the prevention and treatment of arrhythmia

Curr Opin Investig drugs. 2002;3(7):1037-1044

Bechem M, Pott L, Rennebaum H

Atrial muscle cells from hearts of adult guinea pigs in culture, a new preparation for cardiac cellular electrophysiology

Eur J Cell Biol 1983;31:366–369

Behar S, Reicher-Reiss H, Abinader E, Agmon J, Barzilai J, Friedman Y, Kaplinsky E, Kauli N, Kishon Y, Palant A, et al.

Long-term prognosis after acute myocardial infarction in patients with left ventricular hypertrophy on the electrocardiogram. SPRINT Study Group.

Am J Cardiol. 1992 ;69(12):985-90.

Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M

Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes

FASEB J. 1995,9(5):359-365

Bianconi L, Castro A, Dinelli M, Alboni P, Pappalardo A, Richiardi S, Santini M

Comparison of intravenously administered dofetilide versus amiodarone in the acute termination of atrial fibrillation and flutter. A multicenter, randomized, double – blind, placebo-controlled study

Eur Heart J. 2000;21(15):1265-1273

Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S

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

Cardiovasc Research 1998;38(2):441-450

Brachmann J.

The role of class III antiarrhythmic agents in maintaining sinus rhythm.

Europace. 2000;1 Suppl C:C10-5.

Buchanan LV, Kabell G, Brunden MN, Gibson JK

Comparative assessment of ibutilide, D-sotalol, clofilium, E-4031 and UK-68,798 in a rabbit model of proarrhythmia

J Cardiovasc Pharmacol. 1993;22(4):540-549

Bünemann M, Brandts B, Pott L

In vivo downregulation of M2 receptors revealed by measurement of muscarinic K⁺ current in cultured guinea pig atrial myocytes

J. Physiol. 1997, 501 pt.3: 549 – 554

Bünemann M, Brandts B, zu Heringdorf DM, van Koppen CJ, Jakobs KH, Pott L

Activation of muscarinic K⁺ current in guinea pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate

J Physiol 1995; 489(Pt. 3):701-777

Bünemann, M., Brandts, B., Pott, L.

Down-regulation of muscarinic M₂-receptors linked to I_{K(ACh)} in cultured guinea pig atrial myocytes.

J. Physiol. 1996; 492 (Pt. 2):351-362

Cabin HS, Clubb KS, Hall C, Perlmutter RA, Feinstein AR.

Risk for systemic embolization of atrial fibrillation without mitral stenosis.

Am J Cardiol. 1990;65(16):1112-6.

Cahalan M, Neher E

Patch clamp techniques: an overview

Methods Enzymol. 1992;207:3-14

Carmeliet E

Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide

J Pharmacol Exp Ther. 1992;262(2):809-817

Carson PE, Johnson GR, Dunkman WB, Fletcher RD, Farrell L, Cohn JN.

The influence of atrial fibrillation on prognosis in mild to moderate heart failure. The V-HeFT Studies. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group.

Circulation. 1993;87(6 Suppl):VI102-10.

Castle NA

Selective inhibition of potassium currents in rat ventricle by clofilium and its tertiary homolog

J Pharmacol Exp Ther 1991;257(1):342-350

Cheng JH, Kodama I

Two components of delayed rectifier K⁺ current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization

Acta Pharmacol Sin. 2004;25(2):137-145

Coetzee WA, Amarillo Yimy, Chiu J, Chow A, Lau, D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich

M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B

Molecular diversity of K⁺ channels

Ann NY Acad Sci 1999;868:233-285

Corbalan R, Arriagada D, Braun S, Tapia J, Huete I, Kramer A, Chavez A.

Risk factors for systemic embolism in patients with paroxysmal atrial fibrillation.

Am Heart J. 1992;124(1):149-53.

Corey S, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE

Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K⁺ channel, I_{K(Ach)}

J Biol Chem. 1998;273(9):5271-5278

Corley SD, Epstein AE, Di Marco JP, Domanski MJ, Geller N, Greene HL, Josephson RA, Kellen JC, Klein RC, Krahn AD, Mickel M, Mitchell LB, Nelson JD, Rosenberg Y, Schron E, Schemanski L, Waldo AL, Wyse DG, AFFIRM investigators

Relationship between sinus rhythm, treatment, and survival in the Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) STUDY.

Circulation 2004;109(12):1509-1513

Coumel, P., Attuel, P., Lavallee, J., Flammang, D., Leclercq, J.F., Slama, R.

The atrial arrhythmia syndrome of vagal origin

Arch. Mal. Coeur. 1978;71:645–656.

Deal KK, England SK, Tamkum MM
Molecular physiology of cardiac potassium channels
Physiol Rev. 1996;76(1):49-67

Dobrev, D., Graf. E., Wettwer, E., Himmel, H.M., Hala, O.,
Doerfel, C., Christ, T., Schuler, D., Ravens, U.
Molecular basis of the down regulation of G-protein coupled
inward rectifying K^+ current $I_{K(ACh)}$ in chronic human atrial
fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced
 $I_{K(ACh)}$ and muscarinic receptor mediated shortening of action
potentials.
Circulation 2001 ;104:2551-2557.

Douppnik CA, Davidson N, Lester HA
The inward rectifier potassium channel family
Curr Opin Neurobiol 1995;5:268-277

Dukes ID, Cleemann L, Morad M
Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K^+ currents in
mammalian cardiac and glial cells
J Pharmacol Exp Ther 1990;254(2):560-579

Echt DS, Lee JT, Murray KT, Vorperian V, Borganelli SM,
Crawford DM, Friedrich T, Roden DM
A randomized, double – blind, placebo – controlled, dose – ranging
study of dofetilide in patients with inducible sustained ventricular
tachyarrhythmias
J. Cardiovasc Electrophysiol 1995;6(9):687 – 699

Ellenbogen KA, for the ibutilide investigators
Efficacy of intravenous ibutilide for rapid termination of atrial
fibrillation and atrial flutter: a dose-response study
J Am Coll Cardiol. 1996;28:130-136

Escande D, Mestre M, Cavero I, Brugada J, Kirchhof C.
RP 58866 and its active enantiomer RP 62719 (Terikalant):
blockers of the inward rectifier K⁺ current acting as pure class III
antiarrhythmic agents
J Cardiovasc Pharmacol 1992;20 Suppl 2:106 – 113

Fumeaux T, Cornuz J, Polikar R, Blanc E, Junod A, Kappenberger
L, Nicod P, Schlapfer J.
Guidelines for the clinical management of atrial fibrillation: a
practical perspective.
Swiss Med Wkly. 2004;134(17-18):235-47.

Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye
RL, Halperin JL, Kay GN, Klein WW, Levy S, McNamara RL,
Prystowsky EN, Wann LS, Wyse DG, Gibbons RJ, Antman EM,
Alpert JS, Faxon DP, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK,
Russell RO, Smith SC Jr., Klein WW, Alonson-Garcia A,
Blomstrom-Lundqvist C, de Backer G, Flather M, Hradec J, Oto A,
Parkhomenko A, Silber S., Torbicki A
ACC/AHA/ESC Guidelines for the management of patients with
atrial fibrillation; Executive summary a report of the American
College of cardiology / American Heart Association Task Force on
practice guidelines and the European society of cardiology
committed for practice guidelines and policy conferences

(Committee to develop guidelines for the management of patients with atrial fibrillation) developed in collaboration with the north American society of pacing and electrophysiology
Circulation 2001;104(17):2118-2150

Glatter K, Yang Y, Chatterjee K, Modin G, Cheng J, Kayser S, Scheinmann MM
Chemical cardioversion of atrial fibrillation or flutter with ibutilide in patients receiving amiodarone therapy
Circulation 2001; 103:253-257

Gowda RM, Khan IA, Wilbur SL, Vasavada BC, Sacchi TJ
Torsade de pointes: the clinical considerations
Int J Cardiol. 2004;96(1):1-6

Gowda RM, Pudukollu G, Khan IA, Patlola RR, Tajani FH, Cosme A, Thormann BF, Vasavada BC, Sacchi TJ
Ibutilide-induced long QT syndrome and torsade de pointes.
Am J Ther. 2002;9(6):527-529

Hagens VE, Ranchor AV, Van Sonderen E, Bosker HA, Kamp O, Tijssen JG, Kingma JH, Crijns HJ, Van Gelder IC, RACE Study Group
Effect of rate or rhythm control on quality of life in persistent atrial fibrillation. Results from the Rate Control Versus Electrical Cardioversion (RACE) Study
J Am Coll Cardiol 2004;43(2):241-247

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ

Improved patch – clamp techniques for high – resolution current recording from cells and cell – free membrane patches.

Pflügers Arch. 1981; 391(2):85–100

Hodgkin AL, Huxley AF

Quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve

J. Physiol 1952:117:500-505

Hongo RH, Themistoclakis S, Raviele A, Bonso A, Rossillo A, Glatter KA, Yang Y, Scheinmann MM

Use of ibutilide in cardioversion of patients with atrial fibrillation or atrial flutter treated with class IC agents

J Am Coll Cardiol 2004;44(4):864-868

Hosoya Y, Yamada M, Ito H, Kurachi Y

A functional model for G protein activation of the muscarinic K⁺ channel in guinea pig atrial myocytes. Spectral analysis of the effect of GTP on single-channel kinetics

J Gen Physiol 1996;108(6):485-495

Inomata N, Ishihara T, Akaike N

Mechanisms of the anticholinergic effect of SUN1165 in comparison with flecainide, disopyramide and quinidine in single atrial myocytes isolated from guinea pigs

Br J Pharmacol 1991;104(4):1007-1011

Jorgensen HS, Nakayama H, Reith J, Raaschou HO, Olsen TS.

Acute stroke with atrial fibrillation. The Copenhagen Stroke Study. Stroke. 1996;27(10):1765-9.

Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC

Rate dependent prolongation of cardiac action potentials by methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K^+ current by dofetilide

Circ Res. 1993;72(1):75-83

Jurkiewicz NK, Wang J, Fermini B, Sanguinetti MC, Salata JJ

Mechanism of action potential prolongation by RP 58866 and its active enantiomer, terikalant. Block of the rapidly activating delayed rectifier K^+ current, I_{Kr} .

Circulation 1996; 94(11) : 2938 – 2946

Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, Mc Namara PM

Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: The Framingham Study

N Engl J Med 1982;306(17):1018-1022

Koumi S, Sato R, Hayakawa H

Characterization of the acetylcholine-sensitive muscarinic K^+ channel in isolated feline atrial and ventricular myocytes

J Membr Biol. 1995;145(2): 143-150

Koumi S, Wasserstrom JA

Acetylcholine-sensitive muscarinic K^+ channels in mammalian ventricular myocytes

Am J Physiol 1994;266(5Pt2):H1812-H1821

Kovoor P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Gerhmann J, Berul CI,

Clapham DE,

Evaluation of the role of $I_{K(ACh)}$ in atrial fibrillation using a mouse knock out model

J Am Coll Cardiol 2001;37:2136-2143

Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE

The G - Protein - gated atrial K^+ channel $I_{K(ACh)}$ is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ channel proteins

Nature 1995;374:135–141

Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T

On the mechanism of activation of muscarinic K^+ channels by adenosine in isolated atrial cells : involvement of GTP – binding proteins.

Pflügers Arch 1986;407:264–274

Kurachi Y, Tung RT, Ito H, Nakajima T.

G protein activation of cardiac muscarinic K^+ channels.

Prog Neurobiol 1992;39(3):229–246

Kurachi Y.

G Protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel

American Journal of Physiology 1995(269),C821–830

Lammers WJ, Allessie MA

Pathophysiology of atrial fibrillation: current aspects

Herz. 1993;18(1):1-8

Lehmann – Horn F, Jurkat – Rott K

Voltage - gated ion channels and and hereditary disease

Physiol Rev. 1999; 79, 1317 – 1372

Levy S

Epidemiology and classification of atrial fibrillation

J Cardiovasc Electrophysiol. 1998;9(8 Suppl):S78-82

McNamara RL, Brass LM, Drozda JP Jr, Go AS, Halperin JL, Kerr CR, Levy S, Malenka DJ, Mittal S, Pelosi F Jr, Rosenberg Y, Stryer D, Wyse DG, Radford MJ, Goff DC Jr, Grover FL, Heidenreich PA, Malenka DJ, Peterson ED, Redberg RF; American College of Cardiology; American Heart Association.

ACC/AHA key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (Writing Committee to Develop Data Standards on Atrial Fibrillation).

J Am Coll Cardiol. 2004;44(2):475-95.

Middlekauff HR, Stevenson WG, Stevenson LW.

Prognostic significance of atrial fibrillation in advanced heart failure. A study of 390 patients.

Circulation. 1991;84(1):40-8.

Mori K, Hara Y, Saito T, Masuda Y, Nakaya H

Anticholinergic effects of class III antiarrhythmic drugs in guinea pig atrial cells. Different molecular mechanisms

Circulation 1995;91(11):2835-2843

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH

The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes

Pflügers Arch 1978;375:219–228

Nichols CG, Lopatin AN

The inward rectifier potassium channels

Annu Rev Physiol 1997;59:171-191

Ohmoto-Sekine Y, Uemura H, Tamagawa M, Nakaya H

Inhibitory effects of aprinidine on the delayed rectifier K⁺ current and the muscarinic acetylcholine receptor-operated K⁺ current in guinea-pig atrial cells

Br J Pharmacol 1999;126(3):751-761

Ono K, Shibata S, Iijima T.

Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells.

J Smooth Muscle Res. 2003;39(5):195-204.

Oral H, Souza JJ, Michaud GF, Knight BP, Goyal R, Strickberger SA, Morady F

Facilitating transthoracic cardioversion of atrial fibrillation with ibutilide pretreatment

N Engl J Med 1999;340:1849-1854

Piccolino M

Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of

Luigi Galvani

Brain Res Bull. 1998; 46(5):381-407

Pourrier M, Schram G, Nattel S

Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRP's, KCHIP, and KchAP

J Membr Biol. 2003;194(3):141-152

Prystowsky EN, Freeland S, Branyas NA, Rardon DP, Fogel Ri, Padanilam BJ, Rippey JS

Clinical experience with dofetilide in the treatment of patients with atrial fibrillation

J cardiovasc Electrophysiol. 2003;14(12 Suppl):S287-292

Rees, SA, Curtis, MJ

Specific I_{K1} blockade: a new antiarrhythmic mechanism? Effect of RP 58866 on ventricular arrhythmias in rat, rabbit, and primate

Circulation 1993;87(6):1979-1989

Ruskin JN

The cardiac arrhythmia suppression trial (CAST)

N Engl J Med 1989;321(6):386-388

Sakmann B, Trube G

Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea pig heart.

J Physiol. 1984;347:641-657

Sanguinetti MC

Long QT syndrome: ionic basis and arrhythmic mechanism in long QT syndrome type 1

J Cardiovasc Electrophysiol 2000;11(6): 710-712

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK

Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current: differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents

J Gen Physiol. 1990; 72: 890 – 900

Sansom MS, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE, Biggin PC

Potassium channels: structures, models, simulations

Biochim Biophys Acta. 2002; 1565(2):294-307

Sato H

Comparative actions of celenzoline and disopyramide on I_{Kr} and I_{Ks} currents in rat sino-atrial nodal cells

Eur J Pharmacol 2000;407(1-2):123-129

Sedgwick, ML et al.

Chemical cardioversion of atrial fibrillation with intravenous dofetilide

Int J Cardiol 1995; 49(2): 159 – 166

Singh SN

Role of dofetilide in patients with atrial fibrillation. Insights from the Symptomatic Atrial Fibrillation Investigate Research on Dofetilide (SAFIRE-D) study

Card Electrophysiol Rev. 2003;7(3):225-228

Snyders, Dirk J.

Structure and function of cardiac potassium channels

Cardiovascular Research 42 (1999), 377 – 390

Stambler BS, Wood MA, Ellenbogen KA, Perry KT, Wakefield LK, Van der Lugt JT

Efficacy and safety of repeated intravenous doses of ibutilide for rapid conversion of atrial flutter or fibrillation

Circulation 1996;94:1613-1621

Sugiyama A, Hashimoto K

Effects of a typical I_{Kr} channel blocker sotalolol on the relationship between ventricular repolarization, refractoriness and onset of torsade de pointes.

Jpn J Pharmacol. 2002; 88(4):414-421

Tham TC, Mac Lennan BA, Burke MT, Harron DW

Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the class III antiarrhythmic agent dofetilide (UK-68,798) in humans.

J Cardiovasc Pharmacol. 1993;21(3):507-512

Todd DW

A review of the class III antiarrhythmic agents and their uses and implications for patient management.

J Oral Maxillofac Surg. 2003;61(8):928-31.

Towbin JA, Wang Z, Li H

Genotype and severity of long QT syndrome

Drug Metab Dispos. 2001, 29(4 pt 2):574-579

Tsikouris JP, Cox CD

A review of class III antiarrhythmic agents for atrial fibrillation: maintenance of normal sinus rhythm.

Pharmacotherapy 2001;21: 1314 – 1329

Van der Lugt JT, for the ibutilide investigators

Efficacy and safety of ibutilide fumarate for the conversion of atrial arrhythmias after cardiac surgery

Circulation 1999;100:369-375

Vaughan Williams EM

A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs

J Clin Pharmacol 1984;24(4):129-147

Waldo, A.

Mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation: distinct entities or two sides of a coin?

Cardiovasc. Res.2002;54; 217-229

Watanabe Y, Hara Y, Tamagawa M, Nakaya H

Inhibitory effect of amiodarone on the muscarinic acetylcholine receptor operated potassium current in guinea pig atrial cells

J Pharmacol Exp Ther 1996;279(2):617-624

Weerasooriya R, Davis M, Powell A, Szili-Torok T, Shah C, Whalley D, Kanagaratnam L, Heddle W, Leitch J, Perks A,

Ferguson L, Bulsara M.

The Australian Intervention Randomized Control of Rate in Atrial Fibrillation Trial (AIRCRAFT).

J Am Coll Cardiol. 2003;41(10):1697-702.

Wickman K, Krapivinsky G, Corey S, Kennedy M, Nemec J, Medina I, Clapham DE

Structure, G protein activation, and functional relevance of the cardiac G protein-gated K^+ channel, $I_{K(ACh)}$

Ann N Y Acad Sci. 1999;868:386-398

Wijffels, M.C., Kirchhof, C.J., Dorland, R., Allessie, M.A.

Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats

Circulation 1995;92(7):1954-68.

Woosley RL

Antiarrhythmic drugs

Ann Rev Pharmacol Toxicol 1991;31:427-455

Yamada M, Inanobe A, Kjurachi Y

G protein regulation of potassium ion channels

Pharmacol Rev. 1998;50(4):723-760

Yamreudeewong W, DeBisschop M, Martin LG, Lower DL.

Potentially significant drug interactions of class III antiarrhythmic drugs.

Drug Saf. 2003;26(6):421-38.

Yang T, Snyders D, Roden DM

Drug block of I_{Kr} : model systems and relevance to human arrhythmias

J Cardiovasc Pharmacol. 2001;38(5):737-744

Zang WJ, Yu XJ, Boyett MR

Barium block of the muscarinic potassium current in guinea pig atrial cells

Pflugers Arch. 1995;430(3):348-357

Danksagung

Ich danke meinen Eltern für ihre Geduld.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. med. Bodo Brandts für die Beratung.

Auch bedanke ich mich bei Herrn Rolf Borchard und Herrn Ingo Wickenbrock für die Unterstützung innerhalb unserer Arbeitsgruppe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Trappe für die Unterstützung, Beratung und Betreuung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Marc van Bracht
Geb. am:	09.10.1972
In:	Marl in Westfalen

Adresse: Hoehneweg 7
44791 Bochum

Tel. Nr.: 0234/9580362
E-Mail: Marc.vanbracht@marienhospital-herne.de

Schulische Laufbahn

1979 - 1983 Grundschohle Goetheschule in Marl
1983 – 1992 Geschwister Scholl Gymnasium in Marl

Zivildienst

1.10.1992 – 31.12.1993 Marienhospital Marl (als Krankenpflegehelfer)

Studium

1994 – 1996 Vorklinik Medizinische Fakultät der Ruhr-
Universität Bochum
1996 – 2000 Klinik Medizinische Fakultät der Ruhr-
Universität Bochum
1.10.2000 – 30.09.2001 PJ im Marienhospital in Herne

Beruflicher Werdegang

1.01.1994 – 31.12.1999 Krankenpflegehelfer im Marienhospital in
Marl
1.01.2002 – 30.06.2003 Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik
II des Marienhospitals in Herne
seit dem 1.07.2003 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II
des Marienhospitals in Herne