

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Schrader

Regionale Unterschiede der Kaliumkanal-Expression und
Aktionspotentialdauer am Herzen sind assoziiert mit der
räumlichen Heterogenität des myokardialen Flusses

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Quentin

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Decking

Korreferent: Prof. Dr. Pannen

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Marion Stoll, Michael Quentin, Andrej Molojavyi, Volker Thämer, and Ulrich K.M. Decking.

Spatial heterogeneity of myocardial perfusion predicts local potassium channel expression and action potential duration.

Cardiovasc Res 2008 Feb 15;77: 489-496. Epub 2007 Nov 9.

Meinen Eltern

Abkürzungen

APD	Aktionspotentialdauer
APD ₉₀	Dauer des Aktionspotentials bis zur 90 %igen Repolarisation
ARI	activation recovery interval
AR _{Ic}	ARI, frequenzkorrigiert nach Van de Water
BGA	Blutgasanalyse
cpm	counts per minute
ccpm	corrected counts per minute
cDNA	komplementäre DNA
CV	Variationskoeffizient
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERG	Kaliumkanal-bildendes Protein des Auswärtsgleichrichters I_{Kr}
HF	Herzfrequenz
i.v.	intravenös
MAP	Monophasisches Aktionspotential
MBq	Mega-Becquerel
mid	midmyokardial
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mV	Millivolt
NO	Stickstoffmonoxid
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
QT	QT-Intervall
QT _c	QT-Intervall, frequenzkorrigiert nach Van de Water
RNA	Ribonukleinsäure
subendo	subendokardial
subepi	subepikardial

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Koronare Durchblutung.....	1
1.1.1. Herzzyklus.....	1
1.1.2. Blutversorgung des Herzens.....	2
1.1.3. Messung der lokalen Durchblutung.....	3
1.1.4. Durchblutung in Herzkammern und Vorhöfen.....	3
1.1.5. Transmurale Unterschiede der Durchblutung.....	3
1.2. Elektrophysiologie des Herzens	4
1.2.1. Aktionspotential der Herzmuskelzelle.....	4
1.2.2. Ionenströme und Kanäle.....	6
1.2.3. Erregungsbildung und Erregungsleitung.....	8
1.2.4. Elektrokardiogramm.....	8
1.2.5. Messung der Aktionspotentialdauer in vivo.....	9
1.2.5.1. Bestimmung der Aktionspotentialdauer mit MAP.....	9
1.2.5.2. Bestimmung der Aktionspotentialdauer mittels ARIs.....	10
1.2.5.3. Bestimmung der Aktionspotentialdauer als QT-Intervall.....	12
1.2.5.4. Frequenzkorrektur der Aktionspotentialdauer.....	13
1.2.6. Unterschiede der Aktionspotentialdauer am Herzen.....	14
1.3. Räumliche Unterschiede (Heterogenität) innerhalb des Herzens.....	14
1.3.1. Räumliche Heterogenität des Flusses.....	15
1.3.2. Räumliche Heterogenität des Stoffwechsels.....	17
1.3.3. Räumliche Heterogenität der Aktionspotentialdauer und Ionenströme.....	19
1.4. Zielsetzung	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1. Hundexperimente	23
2.1.1. Versuchstiere.....	23
2.1.2. Versuchsablauf.....	23
2.2. Flussmessung	26
2.2.1. Allgemeines.....	26
2.2.2. Radioaktive Mikrosphären.....	26
2.2.3. Flussmessung mit radioaktiven Mikrosphären.....	27
2.2.4. Fluoreszierende Mikrosphären.....	28
2.2.5. Extraktion der fluoreszierenden Mikrosphären.....	29
2.2.6. Flussmessung mit fluoreszierenden Mikrosphären.....	30
2.3. Epikardiale Elektrogramme zur Erfassung der Aktionspotentialdauer.....	30
2.3.1. Aufzeichnung der Signale.....	30
2.3.2. Auswertung der Signale.....	31
2.3.3. Bestimmung des QT-Intervalls.....	32
2.3.4. Bestimmung des ARI.....	32
2.3.5. Frequenzkorrektur.....	33
2.3.6. Stabilitätskontrolle.....	34

2.4. Probenaufbereitung	34
2.4.1. Biopsien.....	34
2.4.2. Freie Wand des linken Ventrikels.....	34
2.5. Biochemische Aufbereitung der Proben.....	35
2.5.1. RNA-Isolierung aus Herzmuskel.....	35
2.5.2. Gelelektrophorese der RNA	35
2.5.3. cDNA-Herstellung.....	35
2.5.4. Bestimmung der Genexpression	35
2.6. Computermodell.....	36
2.7. Verwendete Materialien.....	36
2.7.1. Mikrosphären.....	36
2.7.2. Chemikalien.....	36
2.7.2.1. Oligonukleotide.....	36
2.7.2.2. Reagenziensysteme	37
2.7.2.3. Sonstige Chemikalien.....	38
2.7.3. Medikamente	38
2.8. Statistische Methoden	38
3. ERGEBNISSE	40
3.1. Kreislaufsituation und Flussverteilung	40
3.1.1. Basisparameter.....	40
3.1.2. Transmurale Flussunterschiede	40
3.1.3. Regionale Flussheterogenität.....	40
3.2. Ionenkanal-Expression in Hoch- und Niedrigflussarealen.....	41
3.3. Modellanalyse der Expressionsunterschiede	44
3.4. Lokale Aktionspotentialdauer.....	46
3.4.1. Aktionspotentialdauer bestimmt mit dem QT-Intervall.....	46
3.4.2. Aktionspotentialdauer bestimmt mittels ARI	48
3.4.3. QT- und ARI-Werte im Vergleich.....	50
3.5. ERG-Kanalblockade durch Dofetilide	51
3.5.1. Auswirkungen auf die lokale Aktionspotentialdauer.....	51
3.5.2. Keine Homogenisierung der lokalen Aktionspotentialdauer durch Dofetilide.....	56
3.5.3. Auswirkungen auf den regionalen Blutfluss.....	58
3.6. Genexpression in Biopsien.....	59
4. DISKUSSION	61
4.1. Lokaler Fluss	62
4.1.1. Regionale Unterschiede.....	62
4.1.2. Probenvolumina.....	63
4.1.3. Anatomische Ursachen der Mikroheterogenität	64
4.2. Ionenkanalexpression.....	65

4.3.	Aktionspotentialdauer	67
4.3.1.	Heterogenität der Aktionspotentialdauer	67
4.3.2.	Bedeutung für Arrhythmien.....	68
4.3.3.	Wirkung von Gap-Junctions	69
4.3.4.	Einfluss von Dofetilide.....	69
4.4.	Zusammenhang zwischen APD, Fluss und Ionenkanalexpression	70
4.5.	Methodenkritik.....	71
4.5.1.	Flussmessung.....	71
4.5.2.	Messung der Aktionspotentialdauer	72
4.5.2.1.	Einzelne Bestimmungsverfahren.....	72
4.5.2.2.	Methodenvergleich.....	74
4.6.	Ausblick.....	74
5.	LITERATURVERZEICHNIS	77
6.	DANKSAGUNGEN	83
7.	LEBENS LAUF	84
8.	ZUSAMMENFASSUNG	85

1. Einleitung

Die Komplexität des Herzens ist heute immer noch nicht gänzlich erforscht. Neben der Betrachtung des Organs als Ganzes sind in letzter Zeit auch die vielen regionalen Unterschiede innerhalb des Herzens in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses gerückt. Schon länger bekannt sind funktionelle Unterschiede zwischen Vorhöfen und Ventrikeln und zwischen rechtem und linkem Herzen. Zunehmend deutlich wird jedoch, dass es auch regionale Unterschiede in der freien Wand des linken Ventrikels gibt. Diese lassen sich unter anderem auf der Ebene der Durchblutung, des Stoffwechsels und der Elektrophysiologie nachweisen (22). Beim Vergleich der einzelnen Regionen zeigen sich auf den verschiedenen Untersuchungsebenen interessante Parallelen. Unklar ist jedoch, ob es einen Zusammenhang zwischen diesen regionalen Verteilungsmustern gibt, und was die auslösenden Ursachen sind.

1.1. Koronare Durchblutung

1.1.1. Herzzyklus

Das muskuläre Hohlorgan Herz hält durch rhythmische, aufeinander abgestimmte Kontraktionen von Vorhöfen und Kammern den Blutkreislauf aufrecht. Aus dem Körperkreislauf gelangt das venöse sauerstoffarme Blut über die obere und untere Hohlvene (Vena cava superior und inferior) vom rechten Vorhof durch die Trikuspidalklappe in die rechte Kammer. Von dort wird das Blut über die Pulmonalklappe in den Lungenkreislauf gepumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Das oxygenierte Blut gelangt anschließend über die Lungenvenen in den linken Vorhof und durch die Mitralklappe in die linke Kammer. Diese pumpt das Blut über die Aortenklappe in die Aorta und damit in den Körperkreislauf.

Der Herzzyklus wird in Systole und Diastole unterteilt. Die Systole besteht aus einer Anspannungs- und einer Austreibungsphase. In der kürzeren Anspannungsphase sind alle vier Herzklappen geschlossen. In der darauf folgenden Austreibungsphase öffnen sich Aorten- und Pulmonalklappe und das Blut wird aus den Kammern ausgeworfen. Die Diastole beginnt mit der Entspannungsphase, in der wieder alle vier Herzklappen geschlossen sind. In der darauf folgenden Füllungsphase öffnen sich Mitralklappe und Trikuspidalklappe zur Füllung der Ventrikel.

1.1.2. Blutversorgung des Herzens

Das Herz wird von der linken und rechten Koronararterie (Arteria coronaria sinistra und dextra), die aus der Aortenwurzel entspringen, mit Blut versorgt. Die Arteria coronaria sinistra teilt sich an der Herzbasis in den Ramus circumflexus und den Ramus interventricularis anterior, der ventral zwischen rechter und linker Kammer zur Herzspitze zieht und so näherungsweise die Trennung des linken und rechten Herzens durch das Herzseptum markiert.

Obwohl hier eine große Variationsbreite herrscht, versorgt die linke Koronararterie in der Regel das Septum und die Vorderwand des linken Ventrikels mit Blut. Die Arteria coronaria dextra versorgt mit ihrem Hauptstamm, dem Ramus interventricularis posterior, das rechte Herz und die Hinterwand mit Blut. Die Herzkranzgefäße verzweigen sich zu einem dichten Kapillarnetz mit 3100 bis 3800 Kapillaren pro mm^2 (8).

Durch die unterschiedlichen rechts- und linksventrikulären Druckverhältnisse kommt es im Verlauf des Herzzyklus zu einer verschieden starken Beeinflussung des Blutflusses in den Koronararterien und Venen. Treibende Kraft ist der aortale Druck. Während der Systole ist der Blutfluss in der linken Koronararterie stark reduziert und steigt dann zu Beginn der Diastole schlagartig wieder an. Der Fluss in der rechten Koronararterie ist weniger herzyklusabhängig und damit kontinuierlicher. Im Gegensatz zum arteriellen Blutfluss hat der venöse Rückstrom vom Herzen in den Koronarsinus in der Systole sein Maximum und nimmt dann in der Diastole stetig ab (34).

Unter Ruhebedingungen macht die Koronardurchblutung etwa 5 % des Herzminutenvolumens aus. Die Sauerstoffausschöpfung im Herzen liegt, im Gegensatz zu den anderen Organen, bei Ruhe schon bei rund 70 %. Unter körperlicher Belastung kann diese Sauerstoffausschöpfung kaum mehr gesteigert werden, so dass ein Sauerstoffmehrbedarf durch eine Erhöhung des myokardialen Flusses gedeckt werden muss. Dieser kann auf das 4- bis 5-fache der Ruhedurchblutung gesteigert werden. Das Ausmaß der Durchblutungssteigerung unter Belastung bezeichnet man als Koronarreserve.

1.1.3. Messung der lokalen Durchblutung

Als Methode zur Messung der lokalen Gewebedurchblutung wurden von Rudolph und Heymann 1967 (64) erstmals Mikrosphären verwendet. Diese Messmethode ist inzwischen sehr etabliert und standardisiert (61). Mikrosphären sind radioaktiv, farblich oder fluoreszierend markierte Partikel in einer Trägerlösung. Fluoreszierende Mikrosphären sind heute im Vergleich zu radioaktiven als gleichwertig (37) und bei chronischen Versuchen sogar als überlegen zu betrachten (71). Die Mikrosphären werden möglichst homogen verteilt in den linken Vorhof appliziert. Mit dem Blutstrom werden sie in das periphere Gefäßsystem getragen und werden in präkapillären Arteriolen zurückgehalten. Gleichzeitig mit der Applikation der Mikrosphären wird eine arterielle Blutprobe mit einer definierten Volumenstromstärke abgenommen, die später als virtuelles arterielles Referenzorgan gilt. Durch Gewebeentnahme kann die lokale Mikrosphärendichte bestimmt und in Beziehung gesetzt werden zu dem virtuellen Referenzorgan und so ein lokaler Fluss berechnet werden.

1.1.4. Durchblutung in Herzkammern und Vorhöfen

Unter Ruhebedingungen liegt der myokardiale Fluss bei etwa rund 1 ml / g / min. Je nach Studie wird der Fluss im rechten Ventrikel mit 50 – 67 % des Flusses des linken Ventrikels angegeben (44). Im Verhältnis der Druck-Volumen-Arbeit beider Ventrikel ist der Fluss des rechten Ventrikels jedoch überproportional hoch. Eine mögliche Erklärung dafür ist die irreguläre Form des rechten Ventrikels, die über eine erhöhte Wandspannung zu einem relativ hohen Sauerstoffbedarf führt. Der Fluss der Vorhöfe liegt bei rund einem Drittel der linksventrikulären Durchblutung und ist im linken Vorhof etwas höher als im rechten (11).

1.1.5. Transmurale Unterschiede der Durchblutung

Zur Messung der transmuralen Durchblutungsunterschiede mit Mikrosphären muss das Herzgewebe zur späteren Auswertung in einzelne Bereiche geschnitten werden. Je nach Untersuchung wird die freie Wand des linken Ventrikels dabei parallel zum Epikard in eine unterschiedliche Anzahl möglichst gleich dicker Schichten aufgeteilt. Diese Schichten werden nach ihrer Lage als subendokardial (subendo), midmyokardial (mid) und subepikardial (subepi) bezeichnet. Bei der Schnittführung werden dabei weder die Gefäßarchitektur und Durchblutungsmuster noch eine unterschiedliche regionale Wandspannung berücksichtigt.

Betrachtet man die Durchblutung der einzelnen linksventrikulären Herzschichten im Verlauf des Herzzyklus, so zeigt sich, dass diese in subendokardialen Schichten in der Systole praktisch zum Erliegen kommt. Die Ursache liegt in den hier herrschenden Druckverhältnissen, die in der Systole fast dem Druck im linken Ventrikel während der Auswurfphase entsprechen. Die subendokardialen Gefäße werden in der Systole praktisch ausgepresst und es entsteht ein antegrader und retrograder Blutfluss. Das retrograd geflossene Blut versorgt dann zu einem Teil die subepikardialen Schichten während der Systole (44). Insgesamt liegt der maximale systolische Gewebsdruck in den subepikardialen Schichten wesentlich niedriger, so dass diese nahezu kontinuierlich durchblutet werden (40).

Die in der Systole zu beobachtende Abnahme der Durchblutung in subendokardialen Schichten wird jedoch in der Diastole überkompensiert, so dass die Durchblutung der subendokardialen Schichten insgesamt höher liegt. Über das Ausmaß dieses Gradienten gibt es allerdings unterschiedliche Angaben in der Literatur. Buckberg et al. (15) konnten so gut wie keinen transmuralen Flussgradienten finden (subendo zu subepi $1,01 \pm 0,07$), während Duncker et al. (33) das subendokardiale zu subepikardiale Flussverhältnis in ihren Hundexperimenten mit $1,49 \pm 0,09$ angeben. Dieser Gradient mag den höheren Sauerstoffbedarf und höheren systolischen Wandstress der subendokardialen Schichten widerspiegeln.

1.2. Elektrophysiologie des Herzens

1.2.1. Aktionspotential der Herzmuskelzelle

Herzmuskelzellen sind elektrisch erregbare Zellen, die über so genannte Gap Junctions miteinander in Verbindung stehen. Diese Verbindungen bestehen aus transmembranären Proteinkomplexen (Connexine), die eine hohe elektrische Leitfähigkeit aufweisen. In nicht erregtem Zustand haben Herzmuskelzellen ein Ruhepotential von zirka - 85 mV, gemessen von intrazellulär gegen extrazellulär. Bestimmt wird es vor allem von der hohen Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen in Ruhe durch so genannte Kalium-Einwärtsgleichrichter I_{K1} .

Werden nun Nachbarzellen elektrisch aktiviert, führt dies zu Ladungsverschiebungen an den Oberflächen der Zellen und auch im Zellinneren. Erreicht die Depolarisation den Schwellenwert von rund -70 mV, öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle I_{Na} , die für die rasche Depolarisation verantwortlich sind (Phase 0). Vor Erreichen des Natrium-Gleichgewichtspotentials von $+60$ mV schließen sich die Kanäle jedoch wieder, so dass dieser Wert tatsächlich nicht erreicht wird (vergleiche Abb. 1).

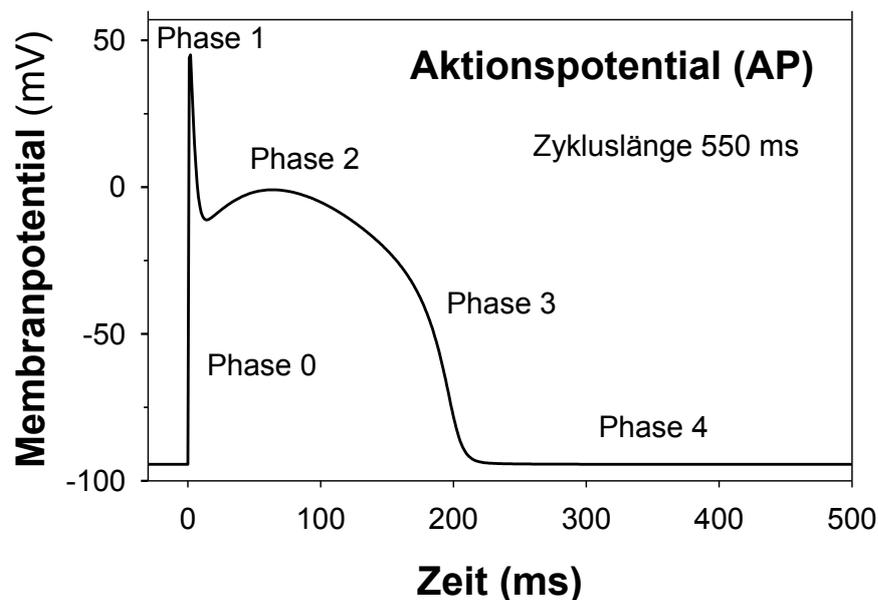


Abb. 1. Schema des Aktionspotentials einer Myokardzelle bei einer Zykluslänge von 550 ms mit Darstellung der einzelnen Phasen (Phase 0: schnelle Depolarisation (Aufstrich); Phase 1: Spitze mit initialer partieller Repolarisation; Phase 2: Plateauphase; Phase 3: endgültige Repolarisation; Phase 4: Ruhemembranpotential).

Für die frühe partielle Repolarisation (Phase 1) sind der transiente Kaliumausstrom I_{to} sowie ein Chlorideinstrom I_{Cl} verantwortlich. Für die Plateauphase (Phase 2) bei etwa 0 mV ist das Gleichgewicht zwischen den initial repolarisierenden Strömen und einem langsamen Calciumeinstrom I_{CaL} verantwortlich. Nach Inaktivierung der Calciumkanäle beginnt die endgültige Repolarisation (Phase 3), die vor allem durch verzögerte Kalium-Auswärtsgleichrichter I_K getragen wird. Gliedern lassen sich diese Ströme noch in eine langsame I_{Ks} und schnelle Komponente I_{Kr} mit jeweils unterschiedlichen Kanälen. Mit Erreichen des Ruhemembranpotentials gewinnt wieder I_{K1} an Bedeutung zur Aufrechterhaltung dieses Potentials. Abbildung 2 stellt die unterschiedlichen Ionenströme im Verlauf des Aktionspotentials dar.

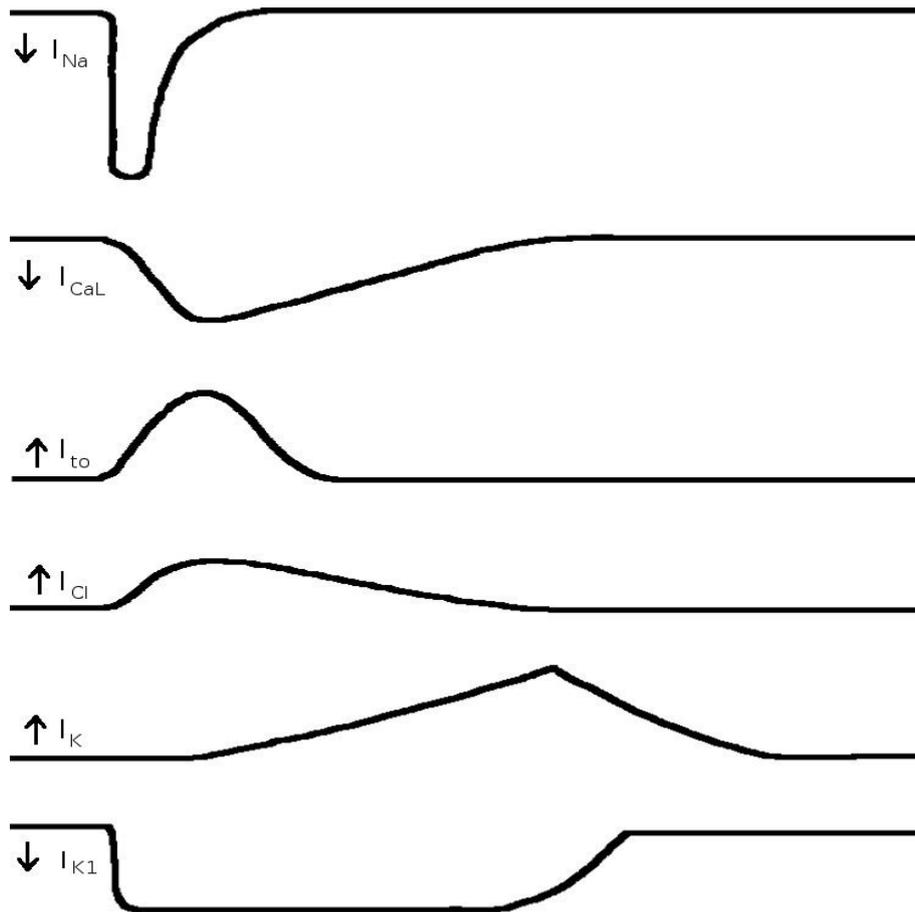


Abb. 2. Schema der Ionenströme im Verlauf des Aktionspotentials (I_{Na} Natriumstrom, I_{CaL} L-Typ Calciumstrom, I_{to} transienter Kaliumauswärtstrom, I_{Cl} Chloridstrom, I_K verzögerter Gleichrichter bestehend aus I_{Kr} und I_{Ks} , I_{K1} Einwärtsgleichrichter). Die Ströme werden als Abweichung von 0 mV angegeben und stellen einen Einwärtsstrom (Pfeil nach unten) oder Auswärtsstrom (Pfeil nach oben) bezogen auf die einzelne Zelle dar.

1.2.2. Ionenströme und Kanäle

Den zuvor beschriebenen Strömen lassen sich Gene und Proteine zuordnen, die die entsprechenden Ionenkanäle bilden bzw. diese beeinflussen. Im Text wird auf die übliche Angabe der Proteine Bezug genommen. Die dazugehörigen Gene finden sich in der tabellarischen Übersicht (siehe Tab. 1).

$Na_v1.5$ bildet die α -Einheit des spannungsabhängigen Natriumkanals und bestimmt im Wesentlichen den Natriumeinstrom I_{Na} . Im Gegensatz zu den zahlreichen weiteren homologen α -Untereinheiten des spannungsabhängigen Natriumkanals werden $Na_v1.5$ Kanäle nicht durch das Nervengift des Kugelfisches Tetrodotoxin blockiert.

Der Kaliumauswärtsstrom I_{to} wird durch die Kanal-formende α -Untereinheit des Membranproteins $K_v4.3$ und das Kv-Kanal-interagierende Protein $KChIP2$ bestimmt. $Ca_v1.2$ bildet mit der α_{1c} -Untereinheit den für den Calciumstrom I_{CaL} bestimmenden Kanal.

Aktionspotential	Ströme	Gene	Proteine
Phase 0	I_{Na}	<i>SCN5A</i>	<i>Na_v1.5</i>
Phase 1	I_{to}	<i>KCND3</i>	<i>K_v4.3</i>
	I_{to}	<i>KCNIP2</i>	<i>KChIP2</i>
Phase 2	I_{CaL}	<i>CACNAC1</i>	<i>Ca_v1.2</i>
Phase 3	$I_{Kr} (I_K)$	<i>KCNH2</i>	<i>HERG (DERG)</i>
	$I_{Ks} (I_K)$	<i>KCNQ1</i>	<i>K_vLQT1</i>
	$I_{Ks} (I_K)$	<i>KCNE1</i>	<i>minK</i>
Phase 4	I_{K1}	<i>KCNJ2</i>	<i>Kir2.1</i>

Tab. 1. Übersicht über die einzelnen Phasen des Aktionspotentials mit den jeweils wichtigsten Strömen, ihren beeinflussenden Genen und Proteinen (*ERG* wird beim Menschen als *HERG* und beim Hund als *DERG* bezeichnet).

Phase 3 des Aktionspotentials wird wie oben beschrieben von I_{Ks} und I_{Kr} bestimmt. *ERG*, das man beim Hund als *DERG* bezeichnet, bildet die α -Untereinheit für I_{Kr} . I_{Ks} wird durch die α -Untereinheit *K_vLQT1* und seine β -Untereinheit *minK* reguliert. Sowohl die Natrium- und Calcium-, als auch die Kv-Kalium-Kanal bildenden α -Untereinheiten gehören der „S4“ Superfamilie der spannungsgesteuerten Kanäle an. *Kir2.1* schließlich ist die Ionenkanal bildende α -Untereinheit für den Einwärtsgleichrichter I_{K1} (57).

Durch die Kenntnis der entsprechenden Kanäle und der dazugehörigen Ströme ist es möglich, medikamentös auf einzelne Kanäle Einfluss zu nehmen. Der in den Experimenten verwendete Kaliumkanal Blocker Dofetilide wirkt speziell auf *ERG* und damit auf I_{Kr} (56).

1.2.3. Erregungsbildung und Erregungsleitung

Um eine regelmäßige rhythmische Kontraktion zu gewährleisten, verfügt der Herzmuskel über spezielle Muskelzellen, die in der Lage sind, spontan zu depolarisieren, und damit eine Schrittmacherfunktion haben. Im Sinusknoten, einer Ansammlung dieser spontan depolarisierenden Muskelzellen im rechten Vorhof an der Einmündung der Vena cava superior, hat die elektrische Erregung ihren Ursprung. Die Erregung breitet sich über die Arbeitsmuskulatur der Vorhöfe über Gap Junctions aus. Wegen dieser Gap Junctions wird das Myokard auch als funktionelles Synzytium bezeichnet. Auf der rechten Seite des Septum interatriale, an der Grenze zwischen Vorhof und Kammer, erreicht die Erregung den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Der AV-Knoten führt im Vergleich zur Erregungsausbreitung über die Vorhöfe zu einer erheblichen Leitungsverzögerung.

Vorhöfe und Kammern sind durch die Ventilebene, die aus Bindegewebe besteht und so keine Aktionspotentiale bilden kann, elektrisch voneinander isoliert. Am AV-Knoten entspringt das His-Bündel, das als dünner Strang die Ventilebene durchdringt und so eine Erregung der Herzkammern ermöglicht.

Im Kammerseptum breitet sich die Erregung entlang des His-Bündels aus. Dieses teilt sich in insgesamt zwei Kammerschenkel, auch Tawara-Schenkel genannt, für die rechte und die linke Kammer. Der linke Tawara-Schenkel teilt sich weiter in ein linkes vorderes und ein linkes hinteres Hauptbündel. Die feinen Ausläufer dieser Verzweigungen, die in der Arbeitsmuskulatur enden, bezeichnet man als Purkinje-Fasern. Die Erregung breitet sich dann in der Arbeitsmuskulatur selbst von innen nach außen aus (65).

1.2.4. Elektrokardiogramm

Über die oben beschriebenen Strukturen breitet sich die Erregung des Herzens in Form einer geordneten Welle aus. Die Spannungs- bzw. Potentialdifferenz zwischen erregten und nicht erregten Zellen kann man mit einem Vektor darstellen. Betrachtet man nun die gesamte Erregungsfront, ergibt sich ein Summationsvektor, dessen Richtung je nach Ausbreitungsrichtung der Erregungsfront variiert. Mit Hilfe des Elektrokardiogramms (EKG) ist es möglich, die Summation der elektrischen Potentialänderungen am Herzen mittels Elektroden an der Körperoberfläche abzuleiten.

Zuerst wird mit der P-Welle die Ausbreitung der Erregung über die Vorhöfe sichtbar. Da mit Hilfe des EKG nur Erregungsausbreitung oder -rückbildung, also lediglich Änderungen der Erregung registriert werden, schließt sich bei vollständiger Erregung der Vorhöfe die PQ-Strecke als isoelektrische Linie an. Es folgt der QRS-Komplex, in dem sich die Erregungsausbreitung über die Herzkammer ausdrückt. Zunächst werden Teile des Septums in Richtung Herzbasis erregt (Q-Zacke). Anschließend wird der Ventrikel von innen nach außen, in Richtung Herzspitze erregt (R-Zacke). Gegen Ende der Kammererregung schwenkt der Summationsvektor in Richtung Herzbasis (S-Zacke). Ist der gesamte Ventrikel erregt, schließt sich die isoelektrische ST-Strecke an.

Der nächste Ausschlag im EKG ist die Rückbildung der Kammererregung. Diese Repolarisation erfolgt entgegengesetzt zur Depolarisation von außen nach innen und stellt sich in Form der T-Welle dar.

1.2.5. Messung der Aktionspotentialdauer in vivo

Einige Methoden zur Messung der Aktionspotentialdauer (APD) setzen die vorherige Isolierung von Gewebe oder einzelnen Zellen voraus, wie auch Messungen mit intrazellulären Mikroelektroden, und sind damit für Experimente in vivo ungeeignet. Für die Messung der APD in vivo sind inzwischen zahlreiche Methoden entwickelt worden. Auch wenn die meisten schon lange benutzt werden, besteht zum Teil immer noch keine Einigkeit über die beste Methode.

Im Prinzip kommen dabei drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung: Messung von monophasischen Aktionspotentialen (MAP's), Bestimmung des activation recovery intervals (ARI) und Bestimmung der QT-Zeit im Oberflächen-EKG (16).

1.2.5.1. Bestimmung der Aktionspotentialdauer mit MAP

Monophasische Aktionspotentiale (MAP's) können mit Hilfe einer oberflächlichen Kontaktelektrode oder als intramurale MAP's gemessen werden. Die klassische Franz Elektrode besteht aus zwei Silber/Silberchlorid Elektroden. Die eigentliche Kontaktelektrode befindet sich distal in der Katheterspitze und die andere, von Franz als indifferent bezeichnete Elektrode, weiter proximal in der Katheterwand. Zur Messung der MAP's müssen nun beide Elektroden Kontakt zum Myokard haben.

Nach Franz et al. (36) wird das Gebiet direkt unterhalb der Elektrodenspitze durch den Kontaktdruck inaktiviert. Die Entstehung von MAP's wird von ihnen erklärt als extrazelluläre Ströme, ausgelöst durch elektrische Gradienten zwischen den die Elektrodenspitze umgebenden depolarisierenden und repolarisierenden Zellen und den inaktivierten Zellen unter der Kontaktelektrode. Demzufolge ist zur Messung von MAP's ein gewisser Anpressdruck nötig. Versuche, diese Elektroden mit Sog anzubringen, sind zeitlich stark begrenzt, um Gewebeerstörung zu vermeiden. Franz et al. wiesen schon darauf hin, dass die Methode immer die elektrische Aktivität vieler Zellen gleichzeitig misst, abhängig von dem Durchmesser der Elektrodenspitze.

Die Elektrodenspitze als Ort der Entstehung der MAP's wird in letzter Zeit immer mehr in Zweifel gezogen. So konnten Kondo et al. (49) mit lokaler Kühlung und lokaler ATX-III Applikation, welche die Aktionspotentialdauer durch Beeinflussung des Natriumeinstroms verlängert zeigen, dass sich die Aktionspotentialdauer im Bereich der Elektrodenspitze durch dortige lokale Intervention nicht ändert, während sie im Bereich der von Franz als indifferent bezeichneten Elektrode verändert wurde. Kondo et al. interpretierten diese Beobachtung so, dass die eigentliche Messelektrode die indifferente Elektrode ist und die Kontaktelektrode als stabile Referenzelektrode fungiert. Intramurale MAP's zeichneten sie mit Hilfe einer Silberelektrode auf, die außer an der Spitze der Elektrode überall isoliert war. Kondo et al. zu Folge hat die intramurale MAP Elektrode ein wesentlich kleineres „field of view“ als die klassische Kontaktelektrode.

Die Aktionspotentialdauer wird mit Hilfe von MAP's immer von der initialen Depolarisation bis meistens zur 90 %igen Repolarisation gemessen. Durch die Voraussetzungen zur Messung von MAP's, insbesondere dem konstanten lokalen Anpressdruck, ist die Methode immer auf wenige Punkte bzw. Regionen limitiert und ungeeignet für Versuche, bei denen gleichzeitig die Aktionspotentialdauer vieler Regionen aufgezeichnet werden soll.

1.2.5.2. Bestimmung der Aktionspotentialdauer mittels ARIs

Zur Messung von activation recovery intervals (ARIs) haben Millar et al. (55) einen Nylonstrumpf mit regelmäßig angeordneten isolierten Silberelektroden, die nur an der Spitze abisoliert waren, verwendet, der über das schlagende Herz gezogen wurde. Die Messung der unipolaren Elektrogramme erfolgte gegen eine neutrale Referenzelektrode.

Millar et al. definierten ARIs als Zeit von der maximalen negativen Steigung im QRS-Komplex $(dV/dt)_{\min}$ bis zur maximalen positiven Steigung der T-Welle $(dV/dt)_{\max}$. Diese Methode wurde sowohl bei negativen als auch bei positiven und biphasischen T-Wellen angewendet. So liegt bei positiven T-Wellen das lokale Maximum der T-Welle zeitlich hinter dem Ende des ARI (siehe Abb. 3) und bei negativen T-Wellen liegt das lokale Minimum entsprechend davor. Millar et al. konnten eine gute Korrelation der ARIs mit der absoluten Refraktärzeit zeigen.

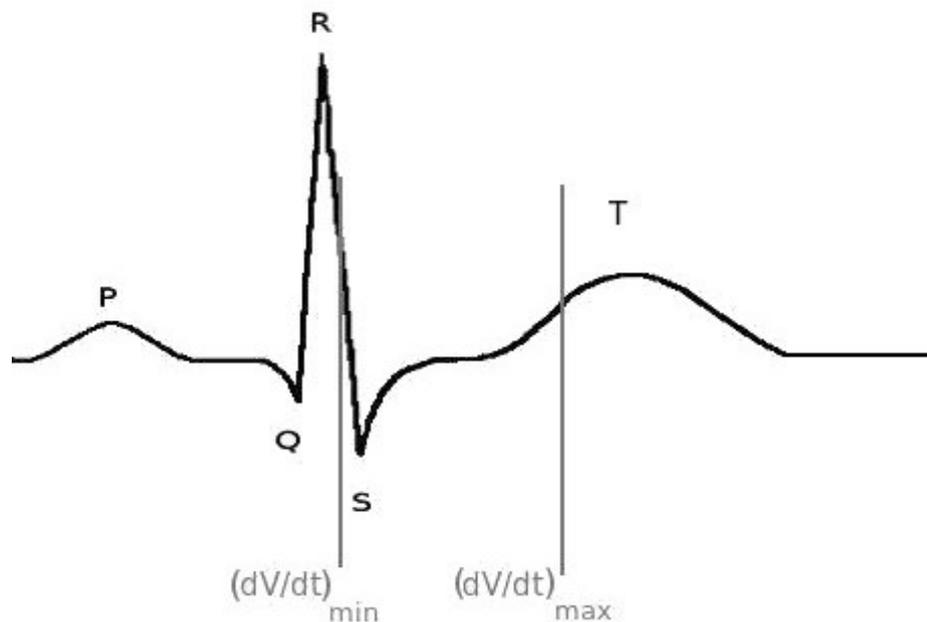


Abb. 3. Schematische Darstellung der Bestimmung der Aktionspotentialdauer mit ARIs bei positiver P-Welle - $(dV/dt)_{\max}$ liegt zeitlich entsprechend vor dem lokalen Maximum der T-Welle.

Haws et al. (41) verglichen ARIs mit der Aktionspotentialdauer, gemessen mit Hilfe von transmembranösen monophasischen Aktionspotentialen unter basalen Bedingungen, lokaler Erwärmung, sympathischer Nervenstimulation und stufenweise einsetzender Ischämie. Hier zeigte sich eine sehr enge Korrelation der bestimmten Zeiten, auch wenn die Werte im Einzelfall bis zu 24 Millisekunden variierten. Unter Ischämiebedingungen wurde die Bestimmung der ARIs bedingt durch ST-Hebungen und Veränderung der T-Wellen Form erschwert, so dass hier die Korrelation zur APD weniger eng war. Die Aktionspotentialdauer wurde von Haws et al. allerdings nicht bis zur 90 %igen Repolarisation (APD_{90}) definiert, weil eine Bestimmung der isoelektrischen Linie in Ihren Experimenten nicht möglich war, sondern bis $(dV/dt)_{\min}$, also der maximal negativen Steigung der Repolarisation der transmembranösen MAP's.

Die von Millar et al. getroffene Festlegung des ARI bis $(dV/dt)_{\max}$ der T-Welle ist nicht unumstritten. So konnten Yue et al. (80) in Experimenten mit 9 Patienten zeigen, dass bei positiver T-Welle eine stärkere Korrelation zur APD_{90} , bestimmt als MAP bis zur 90 %igen Repolarisation, besteht, wenn das ARI bis zur $(dV/dt)_{\min}$ der T-Welle definiert wird. Allerdings räumen die Autoren ein, dass aus technischen Gründen MAP's und ARIs in recht großem Abstand (41 mm) zueinander gemessen wurden und somit hier eine potentielle Fehlerquelle liegen mag.

1.2.5.3. Bestimmung der Aktionspotentialdauer als QT-Intervall

Day et al. (20) schlugen in Ihrer Studie an Patienten mit langem QT-Intervall vor, dieses Intervall als einfache und nicht invasive Messmethode zu verwenden, um die Heterogenität der Repolarisationszeit zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf das Risiko für Arrhythmien zu ziehen. Das QT-Intervall wurde mit Hilfe eines Standard 12-Kanal-EKG vom Beginn des QRS-Komplexes bis zur Rückkehr zur isoelektrischen Linie am Ende der T-Welle bestimmt. Sie konnten zeigen, dass die Verteilungsbreite der QT-Heterogenität bei Patienten mit Krankheiten mit „long QT-Syndrom“ wesentlich ausgeprägter war als bei Patienten mit medikamentös verlängertem QT-Intervall. Day et al. schlossen daraus, dass die Dauer des QT-Intervalls somit keine zufällige Größe sein kann. Allerdings wiesen sie darauf hin, dass sich bei der Bestimmung des QT-Intervalls, insbesondere bei der Bestimmung des Endes der T-Welle, technische Schwierigkeiten ergeben können durch Störsignale, P auf T-Phänomene und das Vorhandensein von U-Wellen.

Mit einem isolierten Hundeherz verglichen Lux et al. (54) in ihrem Versuch die mit einem elektrischen Strumpf mit Silberelektroden gemessenen epikardialen ARIs und QT-Intervalle und die QT-Intervalle auf der Oberfläche einer elektrischen Hunde-Torso-Nachbildung miteinander. Lux et al. fanden dabei eine schlechte Korrelation der epikardialen ARIs mit den QT-Intervallen. Auch wenn bei steigender Temperatur beide Zeiten parallele Verkürzung zeigten, war die Variationsbreite der ARIs rund zwei- bis dreimal größer als die der QT-Intervalle und wurde mit steigender Temperatur wesentlich kleiner, während die QT-Variationsbreite relativ konstant bei 5 bis 6 Millisekunden blieb. Auch der Vergleich epikardialer ARIs mit den an der Oberfläche der elektrischen Torsonachbildung gemessenen QT-Intervallen zeigte ähnliche Ergebnisse.

Lux et al. folgerten daraus, dass das QT-Intervall ein ungeeignetes Maß für die Repolarisationszeit und ihre Variationsbreite sei, egal, ob es epikardial oder auf der Körperoberfläche gemessen wird.

1.2.5.4. Frequenzkorrektur der Aktionspotentialdauer

Einer der wichtigsten, die Aktionspotentialdauer beeinflussenden Faktoren, ist die Herzfrequenz. Für alle Messungen der Aktionspotentialdauer ist es - unabhängig von der Messmethode – erforderlich, die gemessenen Zeiten herzfrequenzkorrigiert angeben zu können, um eine Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten. So kommt es mit Zunahme der Herzfrequenz zu einer Verkürzung des QT-Intervalls und mit Abnahme der Herzfrequenz entsprechend zu einer Verlängerung. Da dieser Zusammenhang nicht streng umgekehrt proportional ist, werden mathematische Korrekturformeln benutzt, um eine möglichst frequenzunabhängige Angabe der Länge des QT-Intervalls zu ermöglichen.

Die älteste Korrekturformel wurde 1920 von Bazett (12) publiziert. Bazett schlug erstmals vor, die Quadratwurzel der Zykluslänge bei der Herzfrequenzkorrektur zu verwenden. Davon abgeleitet wird heute meist zur Frequenzkorrektur des QT-Intervalls die Zeit des QT-Intervalls in Sekunden durch die Quadratwurzel des RR-Abstandes in Sekunden geteilt. Theoretisch führt diese mathematische Korrektur zu einer Normierung der Länge des QT-Intervalls auf eine Herzfrequenz von 60 Schlägen pro Minute. Bei hohen Herzfrequenzen kommt es demzufolge zu einer Überkorrektur und bei niedrigen zu einer Unterkorrektur der Länge des QT-Intervalls.

In den letzten Jahrzehnten gab es zahlreiche Studien mit neuen Vorschlägen zur Frequenzkorrektur, von denen sich aber noch keine wirklich als Standard etablieren konnte. Hodges (43) schlägt wie auch andere Autoren vor, je nach Ruhfrequenz eine unterschiedliche Korrekturformel zu verwenden, um keine zu großen mathematischen Verzerrungen zu verursachen. Aus diesem Grunde wurde wegen der in Ruhe deutlich von 60 Schlägen pro Minute abweichenden Herzfrequenz bei den in der vorliegenden Studie genutzten Versuchstieren die lineare Frequenzkorrektur von Van de Water (70) angewendet (Details siehe Material und Methoden).

1.2.6. Unterschiede der Aktionspotentialdauer am Herzen

Regionale Unterschiede der Aktionspotentialdauer sind bereits an zahlreichen Spezies beobachtet worden. So war es Dean et al. (21) möglich, einen Gradienten der Aktionspotentialdauer von der Herzspitze (kürzer) zur Herzbasis (länger) beim Schwein, Gómez und Watanabe et al. (38;75) bei Ratten zu messen. Dieser Gradient wurde auch von Kanai et al. (46) beschrieben und überstieg bei ihren Experimenten an Meerschweinchen den ebenso gemessenen transmuralen Gradienten. Einen umgekehrten Gradienten mit kürzerer Aktionspotentialdauer an der Herzbasis und längerer an der Herzspitze konnten Iwata et al. (45) bei Kaninchen und Bauer et al. (9) bei Hunden messen.

Ergänzend dazu gibt es auch einen Gradienten der Aktionspotentialdauer zwischen linkem (länger) und rechtem (kürzer) Herz, den Volders et al. (74) an Hunden beschrieben haben, und der auch von Watanabe et al. (75) bei Ratten beobachtet wurde.

Mittels electrocardiographic imaging (ECGI) konnten Ramanathan et al. (62) die Aktionspotentialdauer unter komplett physiologischen Bedingungen beim Menschen messen. Die Technik benutzt Oberflächenpotentiale (ARIs), die an mittels Computertomographie geometrisch berechneten Punkten aufgezeichnet werden. Unter diesen physiologischen Bedingungen betrug die durchschnittliche APD 235 ms, der APD Gradient zwischen Herzspitze und Herzbasis des linken Ventrikels 42 ms, und die APD war linksventrikulär rund 32 ms länger als rechtsventrikulär.

1.3. Räumliche Unterschiede (Heterogenität) innerhalb des Herzens

Neben den oben erwähnten Unterschieden zwischen Kammern und Vorhöfen und zwischen rechtem und linkem Herzen existieren auch in der freien Wand des linken Ventrikels regionale Unterschiede. Auf der Ebene der Durchblutung gibt es nicht nur die schon beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Herzschichten, sondern auch davon unabhängige regionale Flussunterschiede.

1.3.1. Räumliche Heterogenität des Flusses

Die regionalen Unterschiede des Flusses in einzelnen Arealen werden als Mikroheterogenität bezeichnet und wurden zuerst von Yipintsoi et al. (79) beschrieben. Inzwischen ist diese Mikroheterogenität durch zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Methoden und an verschiedenen Spezies bestätigt worden (28).

Deussen fasst die verschiedenen Eigenschaften dieser Mikroheterogenität folgendermaßen zusammen: 1.) existent in histologisch homogenen Myokardabschnitten, 2.) zeitlich stabil, 3.) abhängig von der Probengröße, 4.) unabhängig von der transmuralen Schicht, 5.) korreliert mit dem lokalen Energieumsatz.

Laussmann et al. (52) beobachteten, dass rund 1 / 10 der Areale weniger als 50 % (Niedrigflussareale) und weitere 1 / 10 mehr als 150 % (Hochflussareale) des Mittelflusses erhalten, wenn man die lokale Durchblutung bei einer Auflösung von 300 µl mit Mikrosphären betrachtet. Dabei kann sich die Durchblutung einzelner Areale um den Faktor 10 unterscheiden. Diese Heterogenität ist also bedeutend größer als der methodische Fehler der Mikrosphären, den Prinzen et al. (61) mit 5 % angeben, oder als die transmuralen Unterschiede. Durch Experimente mit chronisch instrumentierten Hunden war es Laussmann et al. möglich, die Stabilität der Mikroheterogenität für Wochen zu beobachten.

Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie wiesen Sonntag et al. (67) nach, dass sich Hoch- und Niedrigflussareale weder in Form und Größe, noch in Struktur der Mitochondrien oder Myofibrillen unterscheiden. Die Sarkomerlänge war ebenfalls identisch. Auch konnten sie keinen Unterschied in der Dichte des Gefäßnetzes feststellen. Darüber hinaus konnten Sonntag et al. nachweisen, dass Niedrigflussareale nicht unterversorgte Areale sind und sich somit auch in ihrem Fluss und Sauerstoffbedarf von Hochflussarealen unterscheiden müssen.

Loncar et al. (53) verglichen die Konzentration von Laktat und freiem Adenosin, beides Marker für Hypoxie, bei basalem und bei reduziertem Fluss in Hoch- und Niedrigflussarealen miteinander. Sie konnten zeigen, dass Niedrigflussareale in Ruhe nicht hypoxisch sind und dass der Anstieg beider Marker mit der relativen Flussreduktion korreliert. Sie folgern daraus, dass Hochflussareale keine Luxusperfusion haben, sondern der lokale Fluss wirklich den tatsächlichen Bedarf widerspiegelt.

Neben dem Vorhandensein der Mikroheterogenität beobachteten Austin et al. (4), dass auch die Koronarreserve einzelner Areale heterogen verteilt ist. Ausgedrückt als Verhältnis von Fluss in Ruhe und maximalem Fluss unter Adenosin oder Asphyxie, variierte die Koronarreserve in ihren Versuchen von 1,75 bis 21,9. Die Flussmuster korrelierten unter diesen verschiedenen Bedingungen allerdings nicht miteinander. In allen Versuchen konnten sie eine Korrelation der Durchblutung von Nachbarregionen in einzelnen Schichten zeigen, die sie mittels half-correlation-distance beschreiben. Diese gibt den Abstand zweier Regionen an, bei der der Korrelationskoeffizient auf 0,5 gefallen ist. Auch die Koronarreserve korrelierte in Nachbarregionen, wobei es hier schichtabhängige Unterschiede gab. Subepikardial war die half-correlation-distance der Koronarreserve größer als subendokardial und damit letztlich homogener verteilt. Nach Austin et al. wird der Fluss in Ruhe eher von metabolischen Faktoren bestimmt, während der maximale Fluss eher von Faktoren wie Koronardruck, Diastolenlänge und extraluminalem Gewebedruck bestimmt wird. Für Regionen mit geringer Koronarreserve postulieren sie eine erhöhte Vulnerabilität bei Ischämie.

In der Praxis wird das Herz zur Messung der Flussheterogenität in unterschiedlich große Areale geschnitten. Bassingthwaighe et al. (8) konnten in ihrer anatomischen Studie durch Füllung der Herzgefäße mit aushärtenden Kunststoffen die Entfernung der einzelnen Arteriolen zueinander mit rund 1 mm angeben. King et al. (48) machten aus diesem Grund darauf aufmerksam, dass jede Messung mit Proben größer als 1 mm^3 die wahre Heterogenität eher unterschätzt, weil es zu einer Mittelung des Flusses über die Probengröße kommt. Unklar ist allerdings, ob es sich bei diesen kleinen Gefäßeinheiten um regulierbare Einheiten handelt und damit der Fluss dieser Arteriolen wirklich unabhängig voneinander ist. Wäre die Heterogenität des Flusses allerdings absolut zufällig verteilt, würde die Probengröße keinen Einfluss auf die gemessene Flussverteilung haben.

Bassingthwaighe et al. (6) und Van Beek et al. (69) entwickelten ein fraktales Modell zur Beschreibung der Flussheterogenität. Demzufolge ist die Heterogenität des Flusses eher clusterförmig verteilt, es besteht also eine mehr als zufällige Beziehung der Durchblutung einzelner Arealen mit ihren Nachbararealen. Auch Bassingthwaighe et al. zeigten mit ihrem Modell den Einfluss der Probengröße auf die Heterogenität der Durchblutung, die mit steigender Probengröße abnimmt.

1.3.2. Räumliche Heterogenität des Stoffwechsels

Unterschiede im Stoffwechsel bestehen zum einen zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen und zum anderen zwischen den einzelnen transmuralen Schichten.

Weil es schwierig ist, den lokalen Energieumsatz und Sauerstoffverbrauch in der erforderlichen Auflösung direkt zu messen, konzentrierten sich die ersten Studien über die Stoffwechselunterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen auf die Aufnahme von Fettsäuren und Glukose (22). Zunächst zeigten Groeneveld et al. (39), dass zwischen der Aufnahme von Fettsäuren und dem lokalen Fluss eine Korrelation besteht. Sonntag et al. (67) beobachteten, dass die Glukose-Aufnahme in Hochflussarealen gegenüber Niedrigflussarealen erhöht ist. Die Konzentration wichtiger Schlüsselenzyme des lokalen Energieumsatzes war in ihren Versuchen jedoch homogen verteilt.

Mit markiertem Pyruvat (^{13}C) konnten Decking et al. (26) den lokalen Umsatz des Citratzyklus direkt messen und fanden heraus, dass dieser eng mit dem Fluss korreliert ist. Der Umsatz des Citratzyklus variierte dabei um mehr als das 2,3-fache zwischen Niedrig- und Hochflussarealen. Die gemessene Heterogenität des lokalen Stoffwechsels übersteigt damit auch eine mögliche transmurale Heterogenität des Stoffwechsels, entsprechend den transmuralen Flussgradienten. Mittels eines Stoffwechselmodells berechneten Decking et al., dass - den gemessenen Umsatzraten im Citratzyklus zu Folge - Hochflussareale sich durch höheren Sauerstoffverbrauch auszeichnen als Niedrigflussareale. Mit einem Sauerstoffisotop ($^{18}\text{O}_2$) war es Schwanke et al. (66) schließlich möglich, den höheren Sauerstoffverbrauch von Hochflussarealen direkt zu messen.

Laussmann et al. (52) beobachteten Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen auf drei verschiedenen Ebenen: NO (Stickstoffmonoxid) -Metabolismus, Fettsäurestoffwechsel und Glykolyse. In Niedrigflussarealen ist das Enzym Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH₁) auf Protein und mRNA Ebene deutlich (+ 377 %) erhöht, was zu einer Reduktion (- 75 %) ihres Substrates, des asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) führt. ADMA ist ein Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS).

Da die eNOS Expression in den Hoch- und Niedrigflussarealen ähnlich ist, führt die niedrigere ADMA Konzentration in Niedrigflussarealen vermutlich zu einer geringeren Hemmung der eNOS und damit zu einer höheren NO Bildung in Niedrigflussarealen. NO würde demzufolge in Niedrigflussarealen zu einer verstärkten Gefäßdilatation führen und damit den myokardialen Sauerstoffverbrauch senken.

Die für die Glykolyse wichtigen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, + 89 %) und Phosphoglycerat-Kinase (PGK, + 100 %) waren in den Experimenten von Laussmann et al. in Niedrigflussarealen deutlich erhöht, während die für Fettsäureoxidation wichtigen Enzyme und Stoffe wie Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) und das elektronenübertragende Flavoprotein (EFT) im Vergleich zu Hochflussarealen geringer waren. Zur Energiegewinnung scheint Glykolyse also in Niedrigflussarealen tendenziell wichtiger zu sein und Fettsäureoxidation entsprechend in Hochflussarealen. Da Glykolyse weniger Sauerstoff zur Energiegewinnung verbraucht als Fettsäureoxidation, erscheint die Präferenz für Areale mit niedrigerem Angebot (Niedrigflussareale) sinnvoll.

Entsprechend dem höheren Fluss in subendokardialen Schichten im Vergleich zu subepikardialen Schichten besteht subendokardial ein höherer Sauerstoffverbrauch (76). Damit sind subendokardiale Schichten auch vulnerabler bei Ischämie als subepikardiale Schichten (24). Obwohl andere Studien eine unterschiedliche Substrataufnahme von Desoxyglukose und Fettsäuren belegten, beobachteten Van der Vusse et al. (72) keinen transmuralen Gradienten wichtiger Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels. Eine mögliche Erklärung ist, dass es keinen fixen transmuralen Gradienten des Energiestoffwechsels gibt, sondern eher eine temporäre Fluktuation des Stoffwechsels (24).

In ihrer Übersichtsarbeit machen Deussen et al. (30) darauf aufmerksam, dass bei dem Vergleich von lokalem Stoffwechsel und Flussunterschieden oft unterschiedlich große Gewebeareale untersucht werden und darin potentielle Fehlerquellen liegen können.

1.3.3. Räumliche Heterogenität der Aktionspotentialdauer und Ionenströme

Neben den oben beschriebenen Unterschieden der Aktionspotentialdauer zwischen Herzbasis und Spitze und zwischen rechtem und linkem Ventrikel gibt es auch transmurale Unterschiede der Aktionspotentialdauer. Diese werden von Schram et al. (65) folgendermaßen zusammengefasst: Epikardiale Aktionspotentiale zeigen einen schmaleren Overshoot, eine prominentere Phase 1 Depolarisation und eine kürzere Dauer als endokardiale Aktionspotentiale.

Die Unterschiede der Aktionspotentialdauer werden durch die Ausprägung der Ionenströme verursacht, die wieder durch die Ionenkanalexpression auf RNA und Proteinebene beeinflusst werden. Einschränkend werden hier nur die (Aktionspotentialdauer beeinflussenden) Unterschiede bei den Kaliumströmen I_{t_0} und I_K und die zugehörigen Proteine betrachtet.

Bei dem transienten Kaliumauswärtstrom I_{t_0} beobachteten Wettwer et al. (77) beim Menschen eine subepikardial betonte Ausprägung gegenüber subendokardial, was die im Vergleich kürzere Aktionspotentialdauer erklären würde. Diese Beobachtung konnte auch an anderen Spezies gezeigt werden (65). Der transiente Kaliumauswärtsstrom I_{t_0} wird durch die Expression von *KChIP2* und *Kv4.3* bestimmt. In Übereinstimmung mit dem I_{t_0} Gradienten fanden Rosati et al. (63) beim Hund und beim menschlichen Herz einen deutlichen Unterschied der Expression von *KChIP2* mRNA von epikardial nach endokardial. Die Expression der *Kv4.3* mRNA, die für die eigentliche α -Untereinheit kodiert, war allerdings in allen Schichten gleich. Dies lässt vermuten, dass die Expression von *KChIP2* für die transmuralen Unterschiede von I_{t_0} verantwortlich ist. Rosati et al. wiesen auch auf die Unterschiede zu anderen Spezies wie Ratten hin, bei denen wahrscheinlich ein anderer *Kv4* Kanal (*Kv4.2*) die eigentliche regulatorische Funktion hat, während *KChIP2* hier homogen verteilt ist.

Betrachtet man jedoch die Expression von *KChIP2* und *Kv4.3* auf Proteinebene, zeigen sich gravierende Unterschiede bei den einzelnen Untersuchungen. So konnten Deschenes et al. (27) weder beim Hund noch in menschlichen Herzzellen einen transmuralen Gradienten der *KChIP2* Expression auf Proteinebene zeigen, jedoch in Übereinstimmung mit Rosati et al. auf der mRNA Ebene. Sie folgern daraus, dass es noch andere Faktoren geben muss, die die unterschiedliche transmurale Ausprägung von I_{t_0} erklären.

Zicha et al. (82) wiesen dagegen sowohl bei isolierten Hundezellen wie bei menschlichen Herzzellen einen epikardial betonten Gradienten von *KChIP2* und *Kv4.3* auf der Ebene der mRNA Expression und auf Proteinebene nach. Die unterschiedlichen Ergebnisse der transmuralen Proteinexpression von *KChIP2* in den verschiedenen Studien führen sie auf unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper zurück.

Ebenfalls Einfluss auf die Aktionspotentialdauer hat der verzögerte Kalium-Auswärtsgleichrichter I_K , der sich wie oben beschrieben in eine langsame I_{Ks} und eine schnelle I_{Kr} Komponente gliedern lässt. Neben einer epikardial kürzeren APD konnten Obreztkhikova et al. (58) bei Hunden einen doppelt so stark ausgeprägten I_{Kr} epikardial zu endokardial beobachten. Auf der den Ionenstrom bestimmenden mRNA und Proteinebene ließ sich dieser Unterschied für *ERG* zeigen. Auch Brahmajothi et al. (14) fanden beim Frettchen eine epikardial betonte Ausprägung von *ERG*. In allen drei untersuchten Herzen beobachteten sie außerdem eine schichtunabhängige heterogene *ERG*-Verteilung und folgerten daraus, dass es noch weitere Muster für die *ERG*-Verteilung geben muss als die reine Schichtzugehörigkeit.

Für I_{Ks} fanden Obreztkhikova et al. keinen signifikanten transmuralen Gradienten. Allerdings zeigte sich epikardial eine stärkere Ausprägung der I_{Ks} bestimmenden mRNA von *KCNQ1* (kodiert für *KvLQT1*) und eine schwächere Ausprägung der *KCNE1* mRNA (kodiert für *minK*) gegenüber endokardial. Diese Unterschiede in der mRNA ließen sich allerdings auf Proteinebene nicht nachweisen. Pereon et al. (59) zeigten beim Menschen ähnliche Expressionen von *KvLQT1* (Isoform 1 und 2) und *minK* in allen Schichten.

Einige Untersuchungen befassen sich auch mit den so genannten M(midmyokardiale)-Zellen (3). Diese unterscheiden sich von epikardialen und endokardialen Zellen durch einen schwächer ausgeprägten langsamen Einwärtsgleichrichter I_{Ks} , was zu einer APD Verlängerung führt und einen ausgeprägteren I_{Na} (59). Dennoch ist das Vorhandensein der M-Zellen nicht der Grund für die generelle transmurale Heterogenität (16).

1.4. Zielsetzung

Wie oben erläutert, ist die lokale, zeitlich stabile Flussheterogenität und das Vorhandensein von Hoch- und Niedrigflussarealen ein intensiv untersuchtes Phänomen. Elektronenmikroskopisch gibt es jedoch keine nachweisbaren Unterschiede zwischen diesen Arealen.

Zur Erklärung dieser Flussunterschiede haben bisherige Untersuchungen zumeist den Zusammenhang zwischen regionalem Fluss und dem lokalen Stoffwechsel untersucht. Dabei wurden erhebliche regionale Stoffwechselunterschiede gefunden, die nahe legen, dass die regionalen Flussunterschiede den tatsächlichen Bedarf widerspiegeln. Jedoch ist weiterhin unklar, was letztlich der auslösende Faktor der Heterogenität ist.

Auch die unterschiedliche Verteilung der Aktionspotentialdauer ist schon länger bekannt. Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die Unterschiede zwischen rechtem und linkem Herzen, zwischen Herzbasis und Herzspitze und schließlich auf transmurale Unterschiede. Bei den transmuralen Unterschieden zeigen sich erstaunliche Parallelen zwischen der Aktionspotentialdauer und dem Fluss. So haben subendokardiale Areale ein längeres Aktionspotential und einen tendenziell höheren Fluss als subepikardiale Areale.

Kaum untersucht ist dagegen die Frage der intramuralen Heterogenität der Aktionspotentialdauer, der diese Arbeit weiter nachgeht.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet: Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem lokalen Fluss, der Aktionspotentialdauer und der, die Aktionspotentialdauer wesentlich beeinflussenden, Kaliumkanal-Expression?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

1. Zunächst wurde untersucht, ob es bei Hoch- und Niedrigflussarealen Unterschiede in der lokalen Ionenkanalexpression gibt. Der Schwerpunkt der Betrachtungen lag dabei auf Kaliumkanälen und diese Kanäle regulierenden Proteinen.

2. Anschließend wurde in einem Computermodell, das eine isolierte elektrophysiologische Betrachtung der Kardiomyozten des Hundes möglich macht, simuliert, ob die gefundenen Expressionsunterschiede in Hoch- und Niedrigflussarealen zu einer unterschiedlichen Aktionspotentialdauer führen. Mit diesem Computermodell wurde dann die Auswirkung des selektiven *ERG* und damit I_{Kr} -Blockers Dofetilide auf die Aktionspotentialdauer abgeschätzt.
3. Mit einem dehnbaren elektrischen Strumpf mit 128 Silberelektroden wurden epikardiale Potentiale aufgezeichnet. Diese dienten zur Bestimmung der intramuralen Heterogenität der Aktionspotentialdauer mit Hilfe von QT-Intervallen und ARIs.
4. Als nächstes wurde die Frage beantwortet, ob Dofetilide in vivo zu einer unterschiedlichen Veränderung der Aktionspotentialdauer bei Arealen mit kurzer und mit langer Aktionspotentialdauer führen, entsprechend den Vorhersagen des Computermodells. Weiterhin wurde dabei untersucht, ob die Veränderung der Aktionspotentialdauer auch Auswirkungen auf den lokalen Fluss hat.
5. Schließlich wurden die durch das Computermodell postulierten Expressionsunterschiede bei Arealen mit kurzer bzw. langer Aktionspotentialdauer direkt mittels Biopsien aus diesen Arealen gezeigt. Dabei wurde auch untersucht, wie sich die Areale hinsichtlich ihres Flusses unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1. Hundexperimente

2.1.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden Beagle – Hunde der hauseigenen Tierversuchsanlage (TVA Düsseldorf – Eigenzucht bzw. Zukauf von der Firma Hoechst) verwendet. Es handelte sich um Tiere mit einem Körpergewicht von 11 bis 20 kg. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 13 kg. Von den insgesamt 11 Versuchstieren waren 4 männlich und 7 weiblich (siehe Übersicht).

Experiment Nr.	Datum	Geschlecht	Gewicht (kg)
#1	08.09.2004	♂	12
#2	18.11.2004	♀	12
#3	16.12.2004	♀	13
#4	17.01.2005	♀	12
#5	09.02.2005	♂	11
#6	01.03.2005	♂	12
#7	15.04.2005	♀	13
#8	07.06.2005	♀	13
#9	21.06.2005	♀	12,5
#10	11.07.2005	♀	12
#11	20.07.2005	♂	20

Tab. 2. Experimente mit Datum der Durchführung und Angabe von Geschlecht und Gewicht der einzelnen Versuchstiere.

2.1.2. Versuchsablauf

Über einen peripheren intravenösen Zugang wurde die Narkose mit 0,5 g Thiopenthal-Natrium eingeleitet. Als Schmerzmittel wurden 15 mg Piritramid über den gleichen Zugang als Bolus verabreicht.

Nach Intubation erfolgte die Beatmung mit Sauerstoff-angereicherter Luft mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) von 2 cm Wassersäule mittels einer Starlingpumpe (Modell 874 052, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Unter Messung des expiratorischen CO₂ wurde die regelgerechte Beatmung überwacht (AGM-103 Capnomac, Datex, Helsinki, Finnland). Arterielle Blutgasanalysen (BGA) wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt (Acid-Base Laboratory 30, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) und durch Anpassung der Beatmung wurden die Werte für pO₂, pCO₂ und pH innerhalb physiologischer Grenzen gehalten.

Für den operativen Zugang wurden die Hunde im Thoraxbereich und im Leistenbereich rasiert. Der Rückenbereich wurde für den Kontakt zur Kauterelektrode ebenfalls rasiert. Arteria und Vena femoralis wurden präpariert und katheterisiert. Über den Zugang zur Vena femoralis wurde die Narkose mittels Perfusor mit Midazolam (i.v. Perfusor 0,5 mg / kg / h) und Piritramid (i.v. Perfusor 0,75 mg / kg / h) aufrechterhalten (siehe Tab. 3). Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Flüssigkeitssubstitution mit Tyrode-Lösung (pH 7,4) über den venösen Zugang. Der Zugang zur Arteria femoralis diente zur Überwachung der Herzfrequenz und des Blutdrucks, als arterielles Referenzorgan und zur BGA. Zur Aufzeichnung der Herzfrequenz und des Blutdrucks wurde der Katheter in der Arterie mit einem geeichten Druckaufnehmer (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden. Über einen analog/digital- (A/D) Wandler (Powerlab 16/SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australien) wurden die Daten kontinuierlich mittels Notebook und dem Programm Chart (Version 4, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australien) aufgezeichnet.

Die Körperkerntemperatur wurde mit einer rektalen Messsonde (Modell BAT 8, Bailey Instruments, Saddle Brook, New York, USA) während des Experiments überwacht und durch eine Wärmematte und eine Infrarotlampe bei 37 °C aufrechterhalten. Um eine Auskühlung des Hundes während der Messungen zu vermeiden, wurde der Thoraxbereich mit OP-Tüchern abgedeckt.

Narkose	Wirkstoff	Handelsname	Stoffgruppe	Dosierung
Einleitung	Thiopenthal-Natrium	Trapanal [®]	Barbiturat	0,5 g i.v.
	Piritramid	Dipidolor [®]	Opioid	15 mg i.v.

Narkose	Wirkstoff	Handelsname	Stoffgruppe	Dosierung
Erhaltung	Piritramid	Dipidolor [®]	Opioid	0,75 mg / kg / h i.v.
	Midazolam	Dormicum [®]	Benzodiazepin	0,50 mg / kg / h i.v.

Tab. 3. Verwendete Narkosemittel mit Wirkstoff und Handelsname, ihre Zuordnung zu der jeweiligen Stoffgruppe und ihre Dosierung und Darreichungsform im Experiment.

Vor der Thorakotomie wurden dem Hund 4 mg Vecuronium-Bromid i.v. zur Muskelrelaxation verabreicht. Der operative Zugang erfolgte im vierten Interkostalraum links mittels Elektrokauter (Erbtom T1, Erbe Elektromedizin, Tübingen, Deutschland). Die vierte Rippe wurde nach Präparation reseziert. Nach sorgfältiger Blutstillung wurde das Perikard im Bereich des linken Herzohres eröffnet. Der linke Vorhof wurde mit einem Butterfly-Katheter kanüliert. Der Zugang zum Vorhof diente der mehrfachen Mikrosphärengabe (Details siehe Flussmessung, 2.2.). Der Vorhofeingang wurde für den Zugang des Mikro-Tip[®]-Katheters (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) präpariert. Dieser diente der Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks, von dem dann auch die Herzfrequenz abgeleitet wurde. Nach der vollständigen Perikarderöffnung wurde der elektrische Ableitungsstrumpf (J. Davis, Utah, USA) mit 128 Elektroden zur Aufzeichnung der lokalen epikardialen Elektrogramme angelegt (Details siehe Epikardiale Elektrogramme zur Erfassung der Aktionspotentialdauer, 2.3.).

In einem Teil der Experimente (#7 bis #11) wurden die Hunde mit einer Herzzykluslänge von 440 ms bis 550 ms, was einer Herzfrequenz von 109 bis 133 Schlägen pro Minuten entspricht, elektrisch stimuliert (Stimulator, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland), um die Ermittlung der Aktionspotentialdauer bei definierten Herzfrequenzen durchführen zu können. Die Stimulationselektrode wurde am rechten Vorhofrohr mit einer Klemme befestigt. Stimuliert wurde abhängig vom Effekt mit 1 bis 2 Volt und einer Pulsbreite von 5 ms.

In den Experimenten #1 bis #4 und #7 bis #11 wurde - angepasst an das Körpergewicht des Versuchstieres - der ERG-Blocker Dofetilide (0,1 mg / kg Körpergewicht) gegeben und der Effekt auf die lokale Aktionspotentialdauer und den Fluss dokumentiert.

Nach erfolgter Messung und Auswertung wurden die relevanten Areale mit Trypan-Blau (25 µl intramyokardial) markiert und dort nach Entfernung des Strumpfes Biopsien entnommen. Anschließend an die Bolusgabe der verbliebenen Piritramid und Midazolam-Dosis wurde die freie Wand des linken Ventrikels mit einer Schere entnommen und wie unten beschrieben behandelt (siehe Probenaufbereitung, 2.4.).

2.2. Flussmessung

2.2.1. Allgemeines

Die Flussbestimmung wurde mit radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphären durchgeführt. Zunächst wurden die Mikrosphären 5 Minuten einem Ultraschallbad ausgesetzt und anschließend für 30 Sekunden aufgeschüttelt. Dies diente der möglichst homogenen Verteilung der Mikrosphären in der Suspensionslösung.

Die Mikrosphären wurden gleichmäßig über zirka eine Minute über den Butterfly-Katheter in den linken Vorhof appliziert. Direkt nach der Applikation der Mikrosphären wurde der Dreiwegehahn und der Butterfly-Katheter im linken Vorhof mittels physiologischer NaCl-Lösung gespült. Vor, während und für 2 Minuten nach der Mikrosphären-Gabe wurde über den Katheter in der Arteria femoralis Blut mittels Perfusor (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) abgenommen, das mit einem definierten Fluss von 10 ml / min für 5 Minuten als virtuelles arterielles Referenzorgan diente. Die Flussmessung wurde unter konstanten Blutdruck- und Herzfrequenzverhältnissen durchgeführt.

Der Perfusorschlauch und die Perfusorspritze des arteriellen Referenzorgans wurden mit 2 % Tween 80[®] nach Umfüllen der Referenzprobe nachgespült.

2.2.2. Radioaktive Mikrosphären

Die radioaktiven Mikrosphären (PerkinElmer) hatten einen Durchmesser von $15,5 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$ und lagen in einer 10 % Dextran-Lösung mit 0,02 % Tween-80[®] vor. Sie hatten eine Dichte von 1,3 g / ml und waren mit den γ -Strahlern Cobalt (^{57}Co), Scandium (^{46}Sc) oder Gadolinium (^{153}Gd) markiert (physikalische Eigenschaften siehe Tab. 4).

Ein Milligramm entsprach $3,66 \times 10^5$ Mikrosphären und 1 ml Stamm-Lösung enthielt etwa 2,3 Millionen Mikrosphären mit einer Aktivität von 1,85 MBq.

Mikrosphären	Halbwertszeit (Tagen)	Messfenster (keV)
Cobalt (^{57}Co)	270,9	108 – 137
Gadolinium (^{153}Gd)	242,0	30 – 108
Scandium (^{46}Sc)	83,8	800 – 1200

Tab. 4. Physikalische Eigenschaften der verwendeten radioaktiven Mikrosphären mit Angabe der Halbwertszeit in Tagen und des Messfensters in keV.

2.2.3. Flussmessung mit radioaktiven Mikrosphären

Die Aktivität der Gewebeproben und auch des arteriellen Referenzorgans wurde mit einem γ -Counter (Wizard™ 3“ 1480, Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Gemittelt über einen Messzeitraum von 5 Minuten wurden die Impulse pro Minute (cpm) bestimmt. Um die Impulse der verwendeten Mikrosphären sauber voneinander trennen zu können, wurden verschiedene Messfenster (Energiebereiche) definiert. Die verwendeten Messfenster waren 108 – 137 keV bei Cobalt (^{57}Co), 800 – 1200 keV bei Scandium (^{46}Sc) und 30 – 108 keV bei Gadolinium (^{153}Gd). Außerdem wurde die zum γ -Counter gehörende Software (Multicalc Software Wallac 184) verwendet, um die Mikrosphären nach ihren spezifischen Energieprofilen zu trennen. Die so erhaltenen korrigierten Impulse wurden als ccpm bezeichnet.

Um den lokalen Blutfluss der einzelnen Gewebeprobe berechnen zu können, wurden die Aktivitäten der Gewebeproben (ccpmProbe) und die Aktivität des arteriellen Referenzorgans (ccpmReferenz) getrennt nach den verwendeten Mikrosphären (^{57}Co , ^{46}Sc , ^{153}Gd) bestimmt. Mit Bezug zum definierten Fluss des Referenzorgans ließ sich dann der lokale Fluss der jeweiligen Gewebeprobe berechnen.

$$\text{lokaler Fluss (ml / min)} = \frac{\text{ccpmProbe}}{\text{ccpmReferenz}} \times 10 \text{ ml / min}$$

Um diesen Fluss auf die Größe, d.h. auf das Gewicht der jeweiligen Probe zu beziehen, wurde der Wert des lokalen Flusses noch durch das jeweilige Probengewicht in g dividiert.

$$\text{lokaler Fluss (ml / min / g)} = \frac{ccpmProbe}{ccpmReferenz \times Probengewicht} \times 10 \text{ ml / min}$$

2.2.4. Fluoreszierende Mikrosphären

Die fluoreszierenden Mikrosphären (FluoSpheres[®] Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #2, MoBiTec, Deutschland) hatten einen Durchmesser $15 \pm 0,75 \mu\text{m}$ und eine Dichte von $1,05 \text{ g / ml}$. Sie lagen als 0,2 % Suspension in 10 ml NaCl-Lösung mit Tween - 80[®] und 0,02 % Thimerosal vor. Es wurden alle im Kit enthaltenen Farben (blue, blue-green, yellow-green, orange, red, crimson, scarlet) verwendet (physikalische Eigenschaften siehe Tab. 5). In einem Milliliter Lösung waren 10^6 Mikrosphären enthalten und es wurden jeweils 5 ml Mikrosphären appliziert. Die Mikrosphären selbst bestanden aus einem fluoreszierenden Farbstoff und einer Polyesterhülle, die sich durch geeignete Lösungsmittel wie 2-Ethoxyethylacetat auflösen ließ.

Um die Fluoreszenz messen zu können, mussten die Farbstoffe mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt werden. Die Exzitationsmaxima der jeweiligen Farbe beschreiben die Wellenlänge, bei der der fluoreszierende Farbstoff am besten angeregt wird und die Emissionsmaxima die Wellenlänge, bei der das meiste Licht emittiert wird. Die Quanteneffizienz gibt den prozentualen Anteil der erregten Elektronen an, die durch Rückkehr zum Ausgangszustand ein Lichtphoton emittieren.

Die einzelnen Farben unterschieden sich in ihren Exzitations- und Emissionsmaxima sowie in ihrer Quanteneffizienz, so dass eine parallele Auswertung verschiedenfarbiger Mikrosphären möglich war.

Farbe	Exzitationsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)	Quanteneffizienz
blue	356	424	0,7
blue–green	427	468	0,7
yellow-green	495	506	0,9
orange	534	554	0,9
red	570	598	0,9
crimson	612	638	0,4
scarlet	651	680	0,1

Tab. 5. Physikalische Eigenschaften der eingesetzten fluoreszierenden Mikrosphären mit Angabe der Exzitationsmaxima (Wellenlänge, bei der die maximale Anregung möglich ist), Emissionsmaxima (Wellenlänge, bei der das meiste Licht emittiert wird) und der Quanteneffizienz (Anteil der Elektronen, die ein Photon emittieren).

2.2.5. Extraktion der fluoreszierenden Mikrosphären

Die Extraktion der fluoreszierenden Mikrosphären erfolgte analog einem von Kowallik et al. (50) entwickelten Filterverfahren. Die Herzproben mit je zirka 62 mg Trockengewicht wurden in je 5 ml 4-molare KOH-Lösung und die Referenzproben mit je zirka 50 ml Blut in 50 ml 8-molare KOH-Lösung, bei maximal 50 °C für mindestens 4 Stunden, gelöst. Die Proben wurden gemischt und homogenisiert und mittels Unterdruck durch einen 8 µm Polyethylen-Filter (PE MB 25 mm, LOT #9078) gezogen. Um alle Mikrosphären zu erfassen, wurden Reagenzglas und Filtervorrichtung mit 2 % Tween 80[®] nachgespült.

Der Filter wurde vorsichtig in ein Eppendorf[®]-Gefäß überführt und mit 2 ml 2-Ethoxyethylacetat versetzt und gemischt. Dieses Lösungsmittel löste die Polyesterhülle der Mikrosphären auf. Nach 2 Stunden waren die Mikrosphären gelöst und der fluoreszierende Farbstoff homogen verteilt. Von der fluoreszierenden Farblösung wurde 1 ml für die weitere Messung in Quarzküvetten überführt.

2.2.6. Flussmessung mit fluoreszierenden Mikrosphären

Mit einem Fluorometer (Jobin Yvon Spex Fluoromax-3, Edison, New Jersey, USA) wurde die Fluoreszenz der Proben gemessen. Die Xenon-Lichtquelle des Fluorometers konnte den Wellenlängenbereich von 290 – 850 nm anregen. Jede Probe wurde mit dem Exzitationsmaximum jeder Farbe angeregt und die jeweiligen Emissionsmaxima aufgezeichnet. Nach Abzug der Intensität der Leerprobe (2-Ethoxyethylacetat) erhielt man den Intensitätswert für die jeweilige Probe.

Der lokale Blutfluss wurde analog der Berechnung bei radioaktiven Mikrosphären durch das Verhältnis zur Intensität der Referenzprobe berechnet.

$$\text{lokaler Fluss (ml / min)} = \frac{\text{Intensität Probe}}{\text{Intensität Referenz}} \times 10 \text{ ml / min}$$

Um den lokalen Fluss auf das Gewicht der jeweiligen Probe beziehen zu können, wurde wie bei den radioaktiven Mikrosphären verfahren.

$$\text{lokaler Fluss (ml / min / g)} = \frac{\text{Intensität Probe}}{\text{Intensität Referenz} \times \text{Probengewicht}} \times 10 \text{ ml / min}$$

2.3. Epikardiale Elektrogramme zur Erfassung der Aktionspotentialdauer

2.3.1. Aufzeichnung der Signale

Zur Erfassung der lokalen Aktionspotentialdauer wurde ein dehnbarer Nylonstrumpf (J. Davis, Utah, USA) verwendet, der mit 128 durchnummerierten Kupferkontakten ausgestattet war. Die einzelnen Kontakte hatten einen Abstand von 6 - 8 mm zueinander.

Nach der Perikardiotomie wurde der Strumpf vorsichtig, von der Herzspitze ausgehend bis zur Herzbasis, über das Herz gezogen, bis die komplette Herzoberfläche bedeckt war. Der Strumpf wurde dabei so gleichmäßig wie möglich über das Herz gespannt, um den Abstand zwischen den Elektroden nicht unterschiedlich groß werden zu lassen. Die Herzkranzgefäße dienten zur anatomischen Orientierung und damit zur immer gleichen Platzierung des Strumpfes. So wurde eine angebrachte Markierung am Strumpf immer mit dem Ramus interventricularis anterior (RIVA) zur Deckung gebracht. Weiterhin befand sich immer die gleiche Elektrode an der Aufteilung der Arteria coronaria sinistra in den Ramus interventricularis anterior und den Ramus circumflexus. Zur Normalisierung der Herzaktion nach der Strumpfanlage wurden 15 Minuten bis zur ersten Aufzeichnung abgewartet.

Die unipolaren Elektrogramme wurden mit einer Aufzeichnungsrate von 1 kHz gegen eine Referenzelektrode am Brustkorb des Hundes erfasst. Die 128 Elektroden wurden sequentiell in 8 Blöcken à 16 Elektroden gemessen, weil über den 16-Kanal-A/D-Wandler (PowerLab 16/SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australien) nur eine gleichzeitige Aufzeichnung von 16 Elektroden (Spuren) möglich war. Die nunmehr digitalisierten Signale wurden von einem Notebook mit der Chart Software (Version 4, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australien) aufgezeichnet. Während der Aufzeichnung wurde die Qualität der Signale fortwährend überwacht. Die gesamte Aufzeichnung von 128 Elektroden dauerte maximal 3 Minuten und es wurde währenddessen auf stabile Herzfrequenz und Blutdruckwerte geachtet. Die weitere Auswertung der aufgezeichneten Signale erfolgte manuell.

2.3.2. Auswertung der Signale

Zur Bestimmung der Aktionspotentialdauer (APD) aus den aufgezeichneten epikardialen Elektrogrammen wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Während des Versuchs wurde die APD mit Hilfe von lokalen QT - Intervallen bestimmt. Auf dieser Auswertung beruhte auch die Auswahl der Areale mit kurzen, langen bzw. mittleren Aktionspotentialdauern. In weiteren Analysen nach dem Versuch wurde die APD mit Hilfe von ARIs (activation recovery intervals) bestimmt. Diese beiden Methoden wurden miteinander und mit den anderen Messwerten in Beziehung gesetzt.

2.3.3. Bestimmung des QT-Intervalls

Das QT-Intervall wurde als Zeitraum von Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle definiert (siehe Abb. 4). Unberücksichtigt blieb bei der Auswertung die Orientierung der T-Welle.

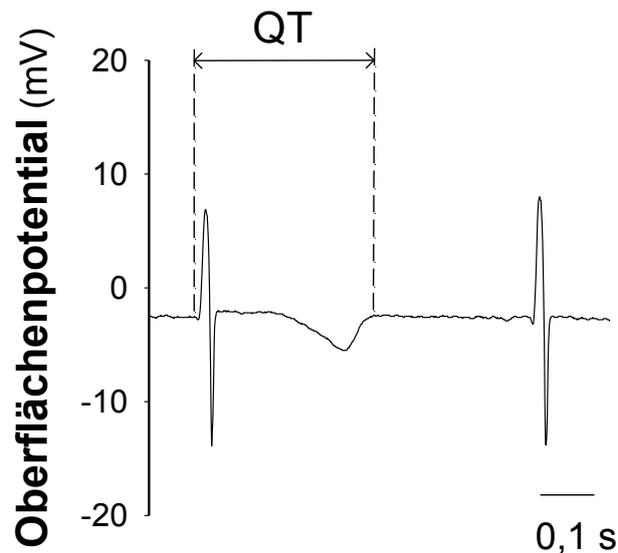


Abb. 4. Systematische Darstellung der Messung der Aktionspotentialdauer mit Hilfe des QT-Intervalls vom Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle.

2.3.4. Bestimmung des ARI

Das activation recovery interval (ARI) wurde definiert als Intervall zwischen der maximalen negativen Steigung des QRS-Komplexes $(dV/dt)_{\min}$ und der maximal positiven Steigung der T-Welle $(dV/dt)_{\max}$. Diese Methode wurde bei negativen T-Wellen ebenso angewendet wie bei positiven T-Wellen. Demzufolge endete das ARI bei negativen T-Wellen zeitlich hinter dem lokalen Minimum der T-Welle (siehe Abb. 5 mit negativer T-Welle) und bei positiven T-Wellen entsprechend vor dem lokalen Maximum.

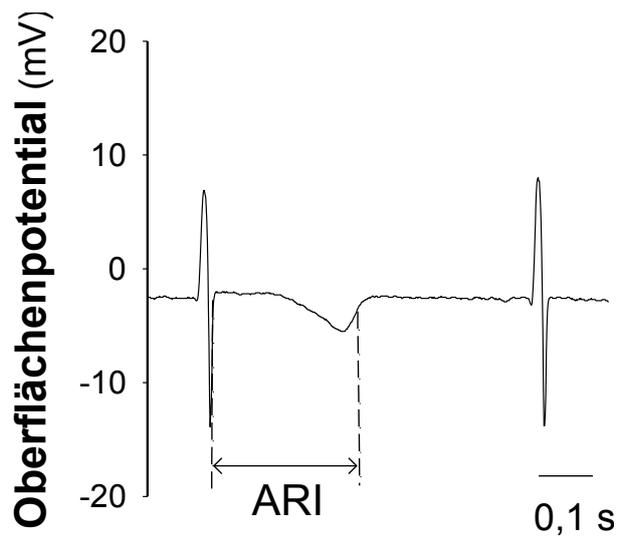


Abb. 5. Systematische Darstellung der Messung der Aktionspotentialdauer mit Hilfe des ARI von $(dV/dt)_{\min}$ des QRS-Komplex bis $(dV/dt)_{\max}$ der T-Welle. $(dV/dt)_{\max}$ liegt zeitlich entsprechend hinter dem lokalen Minimum der (negativen) T-Welle.

2.3.5. Frequenzkorrektur

Um die Aktionspotentialdauer (APD) unabhängig von der Herzfrequenz bestimmen zu können und damit eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander zu gewährleisten, wurde die APD bei elektrisch nicht stimulierten Hunden frequenzkorrigiert. Zur Frequenzkorrektur wurde die Formel nach Van de Water benutzt (70). RR gibt dabei den Abstand der R-Zacken zueinander in Millisekunden (RR-Intervall) an, der für jeden Aufzeichnungsblock à 16 Spuren neu bestimmt wurde.

Das korrigierte QT Intervall wurde als QTc bezeichnet:

$$QTc = QT - 0,0087 \times (RR - 1000)$$

Analog dazu wurden auch die ARIs mit der gleichen Formel frequenzkorrigiert:

$$ARIc = ARI - 0,0087 \times (RR - 1000)$$

2.3.6. Stabilitätskontrolle

Um Areale mit kurzer oder langer Aktionspotentialdauer zu identifizieren, wurden unter basalen Bedingungen, vor Dofetilide Gabe oder vor elektrischer Stimulation, die Messungen der epikardialen Elektrogramme fünfmal hintereinander in 15-minütigem Abstand durchgeführt. Die hieraus ermittelten QT-Werte und entsprechend frequenzkorrigierten QTc-Werte wurden über die Zeit gemittelt. Es wurden ausschließlich Areale zur Markierung ausgewählt, bei denen sich eine geringe Variationsbreite gezeigt hatte.

2.4. Probenaufbereitung

2.4.1. Biopsien

Die in den Experimenten #2 bis #11 über die Ermittlung der QT-Dauer ausgewählten Areale wurden mit einer intramyokardialen Injektion von 25 µl Trypan blau markiert. An den markierten Stellen wurden gegen Ende des Experiments mit einer 16 G Biopsienadel (Temno Evolution, Allegiance) mit 4 mm Länge Proben entnommen. Diese Biopsien stellten subepikardiale Proben mit zirka 3 mg Gewicht dar. Das Probengewebe wurde sofort in 0,5 ml RNAlater® (Qiagen) überführt. Aufbewahrt wurden die Biopsien über Nacht bei 4 °C.

2.4.2. Freie Wand des linken Ventrikels

Am Ende des jeweiligen Experiments wurde die freie Wand des linken Ventrikels als Ganzes mit einer Schere entnommen. Das Gewebe wurde kurz in eisgekühlter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend zwischen zwei Messing-Platten, die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt waren, schockgefroren. Danach wurde es über 48 Stunden lyophilisiert.

Unter Beachtung der markierten Areale wurde das Gewebe in Zeilen, Spalten und je nach Dicke in 3 bis 4 transmurale Schichten parallel zum Epikard geschnitten und gewogen. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Proben etwa gleich groß waren. Für jede Probe wurde der regionale Blutfluss durch die Analyse der Dichte der radioaktiven oder der fluoreszierenden Mikrosphären bestimmt. Die weitere Lagerung der Herzproben erfolgte bei – 20 °C.

2.5. Biochemische Aufbereitung der Proben

2.5.1. RNA-Isolierung aus Herzmuskel

Die RNA-Extraktion aus den Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit und dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.5.2. Gelelektrophorese der RNA

Die Qualität und Quantität der extrahierten RNA wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein 0,8 %iges Agarose-TAE Gel verwendet.

2.5.3. cDNA-Herstellung

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels SuperskriptTM II RT (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Es wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.5.4. Bestimmung der Genexpression

Die Genexpression von β -Aktin, $K_v4.3$, $KChIP2$, K_vLQT1 , $minK$, ERG , $Kir2.1$, $Na_v1.5$ und $Ca_v1.2$ wurde mittels real-time PCR (GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt. Hierfür wurden SYBR[®] Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) und von MWG Biotech synthetisierte Oligonukleotide verwendet.

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die Delta-CT Methode benutzt. Der CT-Wert gab die Anzahl der PCR-Zyklen an, die benötigt wurden, um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Zur relativen Quantifizierung wurde β -Aktin als ubiquitär verfügbares Referenzgen (housekeeping gene) verwendet. Zur Berechnung des Δ CT wurde die Differenz zwischen dem Wert der durchlaufenen Zyklen des zu untersuchenden Gens und von β -Aktin bei CT 0,5 gebildet. Diese Methode setzt die gleiche Zykluseffizienz des Referenzgens und des zu untersuchenden Gens, die mit 100 % gegeben war, voraus. Die relativen Unterschiede in der mRNA-Expression ließen sich über die Formel $2^{-\Delta CT}$ berechnen.

2.6. Computermodell

Die Bedeutung und Auswirkung der Ionenkanal-Expression auf die lokale Aktionspotentialdauer wurde durch ein Modell abgeschätzt. Unter der Cellular Open Resource (COR)-Umgebung simulierte es die Eigenschaften von ventrikulären Kardiomyozyten des Hundes. Nur Ergebnisse, die sich stabil reproduzieren ließen, wurden berücksichtigt. Es wurde ein RR-Abstand von 550 ms, der einer physiologischen Herzfrequenz von rund 109 Schlägen pro Minute entspricht, gewählt. Für Mittelfluss-Areale wurden die Standardeinstellungen des Modells verwendet. Zur Simulation von Hoch- und Niedrigfluss-Arealen wurden die Leitfähigkeiten für I_{to} , I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} , I_{Na} und I_{CaL} verändert. Diese Änderungen erfolgten proportional zu den ermittelten Expressionsergebnissen der korrespondierenden Gene *K_v4.3*, *KChIP2*, *K_vLQT1*, *minK*, *ERG*, *Kir2.1*, *Na_v1.5* und *Ca_v1.2*. Die darauf folgende Veränderung der Aktionspotentialdauer (APD) wurde als Zeitraum bis zur 90 %igen Repolarisation (APD₉₀) erfasst. Da die Leitfähigkeit für I_{to} von der Expression der Gene *KChIP2* und *K_v4.3* und die Leitfähigkeit für I_{Ks} von der *K_vLQT1*- und *minK*-Expression abhängt, wurde jeweils der Mittelwert der Expression der beiden Gene für die Leitfähigkeitseinstellung verwendet. Der Effekt von Dofetilide wurde durch eine 90 %ige Reduktion der *ERG*-Leitfähigkeit simuliert.

2.7. Verwendete Materialien

2.7.1. Mikrosphären

Radioaktive Mikrosphären (⁵⁷Co, ¹⁵³Gd, ⁴⁶Sc) (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)

Fluoreszierende Mikrosphären (FluoSpheres[®]) Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #2 (MoBiTec, Göttingen, Deutschland)

2.7.2. Chemikalien

2.7.2.1. Oligonukleotide

Alle gelisteten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

°C	Gen	Accession number	Sequenz (5' → 3')
53/ 55	<i>β-Actin</i>	AF021873	AATCATGCGGTATCCACGAGA ATACAGGTCCTTACGGATGTCCA
57	<i>β-Actin</i>	AF021873	GCCCAAAGCACTCTTCCAACC TCTGCATCCTGTCAGCAATGCC
55	<i>K_v4.3</i>	AF049887	ACCACACACCTGCCCAAC CTGCTCACTGCCCTGGATG
55	<i>KChIP2</i>	AF458386	GGGGAACCATAGATGACAGAC TCTGGAAGAAGCTCTCCAC
53	<i>K_vLQT1</i>	AF000571, U70068, NM032073	CAAGAAGAAATTCAGCAAG TCYTTGCTCTTTTCTGAGAY
57	<i>MinK</i>	NM008424, NM012973, NM000219	TTCTTCGGCTTCTTCACCCTGG GGCRTCBGACTCGATGTASACG
55	<i>ERG</i>	NM001003145	TACTGTGACCTACACAAGATCC TTGGTATCCCGAAGGTTGAAG
55	<i>Kir2.1</i>	NM001003120	AGCCAAAGAAGAGGAACGAGAC ACCCGCCACATCAAACACAG
55	<i>Na_v1.5</i>	NM001002994	CATCATCATCTCCTTCCTCATC AGAACATGTCGAAGTCGTCC
57	<i>Ca_v1.2</i>	AF394940, U17869, AF465484	TTGATTTMGAAGGACTGGGGRC TCTCCYCTATGGTCAKRTCAG

Tab. 6. Verwendete Oligonukleotide mit Annealing-Temperatur, Accession number und Oligo-Sequenz.

2.7.2.2. Reagenziensysteme

Reagenziensysteme

RNAlater[®]
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit
RNeasy Micro Kit
Superskript[™] II RT
SYBR[®] Green PCR Core Reagents

Hersteller

Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen, Hilden, Deutschland
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

2.7.2.3. Sonstige Chemikalien

Tyrode-Lösung:	NaCl (Natriumchlorid)	8,00 g / l
	KCl (Kaliumchlorid)	0,20 g / l
	CaCl ₂ (Calciumchlorid)	0,20 g / l
	NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	0,10 g / l
	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) x 6 H ₂ O (Wasser)	0,10 g / l

Die verwendeten allgemeinen Labor-Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, in „p.a.“ (pro analysi) bzw. „reinst“ - Qualität von folgenden Firmen bezogen:

MERCK, Darmstadt, Deutschland

SERVA, Heidelberg, Deutschland

SIGMA, München, Deutschland

2.7.3. Medikamente

Medikament	Hersteller
Thiopental-Natrium (Trapanal [®])	ALTANA Pharma, Konstanz, Deutschland
Midazolam (Dormicum [®])	HEXAL, Holzkirchen, Deutschland
Vecuronium-Bromid (Norcuron [®])	Organon, Oberschleißheim, Deutschland
Piritramid (Dipidolor [®])	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Dofetilide	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

2.8. Statistische Methoden

Alle Messdaten wurden soweit möglich und sinnvoll mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben (MW ± STABW). Die Variable n beschreibt die Anzahl der Experimente. Die regionalen Flussdaten wurden normiert auf den durchschnittlichen Fluss aller gemessenen Areale des jeweiligen Experiments und dann in Prozent angegeben. Die Gen-Expressionsunterschiede bei Hoch- und Niedrigflussarealen sind als Vielfaches der Expression von Mittelflussarealen angegeben.

Das QT-Intervall und das ARI wurden nach Van de Waters Formel entsprechend der Herzfrequenz korrigiert und als QTc bzw. ARIC angegeben (Details siehe Auswertung der Signale, 2.3.2.). Zur Erfassung signifikanter Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrig-Flussarealen wurde der gepaarte t-test nach Student verwendet. Als signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet. Um die Stärke des Zusammenhangs zweier Variablen zu beschreiben, wurde der lineare Korrelationskoeffizient nach Spearman r^2 verwendet. Die Art und Ausprägung der Korrelation wurde mit der Steigung der Korrelationsgeraden beschrieben. Statistische Berechnungen wurden mit SPSS (Version 12, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) und SigmaPlot (Version 10.0, Systat, San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Kreislaufsituation und Flussverteilung

3.1.1. Basisparameter

In den durchgeführten 11 Experimenten lag die Herzfrequenz vor Anlage des Ableitungsstrumpfes bei 87 ± 27 Schlägen / Minute, der aortale Mitteldruck bei 80 ± 11 mmHg, der myokardiale Blutfluss bei $0,74 \pm 0,33$ ml \times min⁻¹ \times g⁻¹, der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck bei 104 ± 19 bzw. 36 ± 3 mmHg.

Durch die Aufbereitung der freien Wand des linken Ventrikels entstanden pro Experiment zirka 165 Proben mit einem Trockengewicht von 62 ± 23 mg; dies entsprach einer Auflösung von etwa 300 μ l. Die Proben wurden entsprechend ihrer Lage den subepikardialen, midmyokardialen oder subendokardialen Wandschichten zugeordnet.

3.1.2. Transmurale Flussunterschiede

Bezogen auf den durchschnittlichen Fluss des jeweiligen Hundes betrug der regionale Blutfluss über alle Experimente gemittelt subepikardial 88,8 %, midmyokardial 103,6 % und subendokardial 107,4 %. Der Variationskoeffizient reichte dabei von 0,29 bis 0,36 und betrug im Durchschnitt $0,32 \pm 0,08$. Das Verhältnis von subendokardialer zu subepikardialer Perfusion betrug $1,21 \pm 0,12$. Durch die Verwendung von verschiedenen radioaktiven Mikrosphären war es möglich, den regionalen Fluss vor und nach Anlage des Ableitungsstrumpfes zu messen. Hier ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied. Die fluoreszierenden Mikrosphären wurden wegen des technisch größeren Aufwandes nur als Kontrollmessung verwendet.

3.1.3. Regionale Flussheterogenität

Die Flussunterschiede zwischen den einzelnen Proben überstiegen die Flussunterschiede zwischen den transmuralen Schichten deutlich. Die lokalen Flussdaten wurden dabei immer auf den durchschnittlichen Blutfluss aller Proben des jeweiligen Hundes bezogen. Nach den so ermittelten Prozentwerten wurden die Areale als Niedrig-, Mittel- und Hochflussareale gruppiert.

Als Mittelflussflussareale wurden Areale mit einem Fluss von 100 ± 5 % des durchschnittlichen Flusses angesehen. Hochflussareale wiesen mindestens 140 % und Niedrigflussareale höchstens 60 % des durchschnittlichen Flusses auf. In jedem Experiment erhielten insgesamt rund 1 / 10 aller Proben weniger als 60 % bzw. mehr als 140 % des durchschnittlichen Blutflusses.

3.2. Ionenkanal-Expression in Hoch- und Niedrigflussarealen

In den so zugeordneten Hochfluss-, Mittelfluss- und Niedrigflussarealen ließ sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem lokalen Fluss und mRNA-Expression von *ERG* und *KChIP2* zeigen. In Niedrigflussarealen war die Expression von *ERG*, das I_{Kr} vermittelt, signifikant höher als in Hochflussarealen. Auch die Expression von *KChIP2*, das Kv-Kanal-interagierende Protein, welches mit $K_v4.3$ zusammen den Kaliumauswärtsstrom I_{to} beeinflusst, war in Niedrigflussarealen signifikant höher als in Hochflussarealen. Durch die Berechnung nach der ΔCT -Methode, relativ zum verwendeten Housekeeping-Gen β -Aktin, führt eine stärkere Expression stets zu einem kleineren (siehe Abb. 6) ΔCT -Wert (Details siehe Bestimmung der Genexpression, 2.5.4.).

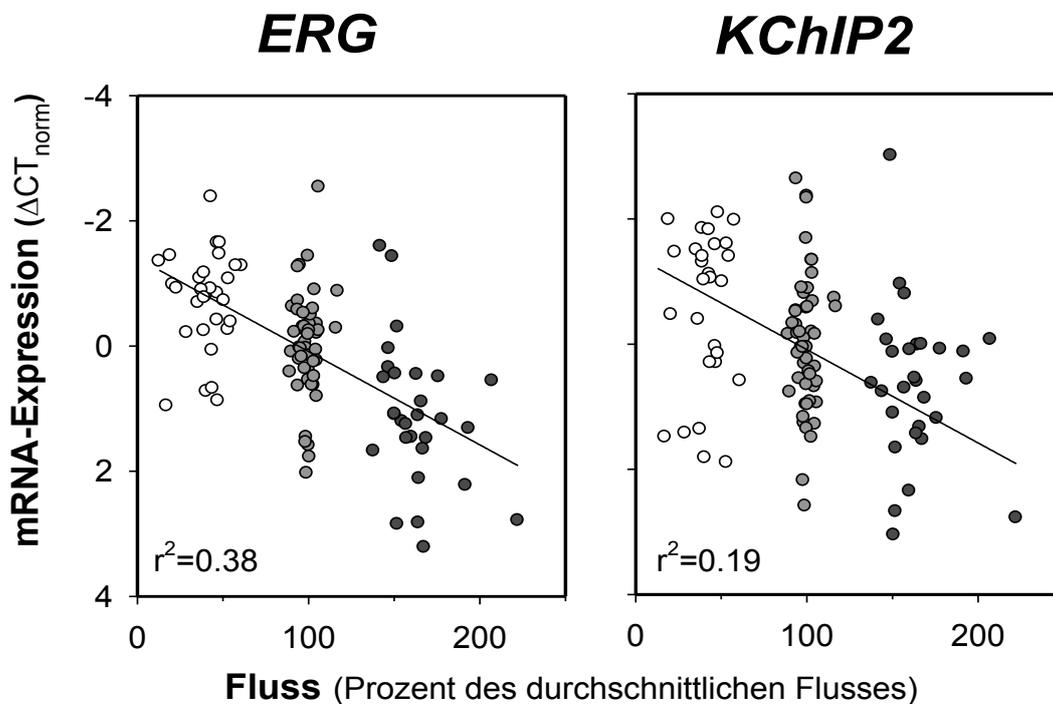


Abb. 6. Korrelation zwischen der *ERG* bzw. *KChIP2* mRNA-Expression und dem lokalem Fluss. Expressionsdaten sind nach $2^{-\Delta CT}$ relativ zum housekeeping Gen β -Aktin dargestellt. Sowohl die Expressionsdaten als auch die Flussdaten sind auf Mittelflussareale bezogen (n = 6).

Der Zusammenhang von Hochfluss-, Mittelfluss- und Niedrigflussarealen zur mRNA-Expression von *ERG* und *KChIP2* ließ sich auch unabhängig von der jeweiligen transmuralen Schicht subepikardial (Subepi), midmyokardial (Mid) und subendokardial (Subendo) zeigen (siehe Abb. 7).

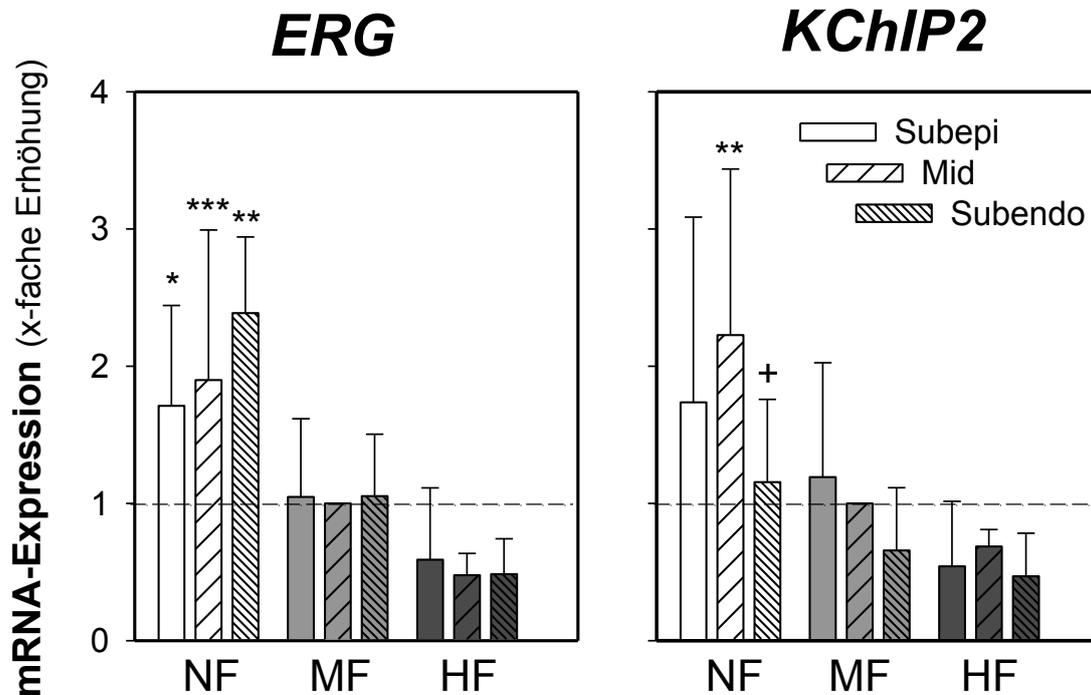


Abb. 7. *ERG* und *KChIP2* mRNA-Expression in Hochfluss- (HF), Mittelfluss- (MF) und Niedrigflussarealen (NF), dargestellt für die jeweiligen transmuralen Schichten: subepikardial (Subepi), midmyokardial (Mid) und subendokardial (Subendo). Die Expressionsdaten sind auf die Expression in midmyokardialen Mittelflussarealen bezogen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gegen HF, + $p < 0,05$ LF gegen HF, $n = 6$).

Die mRNA-Expression von *ERG* war in Niedrigflussarealen 3,3-fach erhöht im Vergleich zu Hochflussarealen. Bei *KChIP2* zeigte sich eine 2,5-fache Erhöhung auf mRNA-Ebene. Innerhalb der Zuordnung zu Hoch-, Mittel- und Niedrigflussarealen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen transmuralen Schichten.

Bei den I_{Ks} modulierenden Genen *KvLQT1* und *minK*, dem K^+ -Gleichrichter *Kir2.1*, dem spannungsgesteuerten Na^+ -Kanal *Nav1.5* und bei der α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals *Ca_v1.2* ließ sich auf mRNA-Ebene keine Flussabhängigkeit nachweisen.

Die Expression von *Kv4.3*, die zusammen mit *KChIP2* den Kaliumauswärtsstrom I_{to} beeinflusst, zeigte eine hier nicht signifikante Tendenz zur Überexpression in Niedrigflussarealen (detaillierte Angaben in Prozent siehe Tab. 7).

Gen	Ionenkanal	mRNA-Expression (Prozent zu Mittelflussarealen)	
		Niedrigflussareale	Hochflussareale
<i>Kv4.3</i>	I_{to}	126 ± 53	84 ± 17
<i>KChIP2</i>	I_{to}	161 ± 80 *	65 ± 11 *
<i>KvLQT1</i>	I_{Ks}	67 ± 50	123 ± 42
<i>minK</i>	I_{Ks}	91 ± 25	99 ± 24
<i>ERG</i>	I_{Kr}	192 ± 54 **	58 ± 13 **
<i>Kir2.1</i>	I_{K1}	106 ± 50	107 ± 19
<i>Nav1.5</i>	I_{Na}	137 ± 57	153 ± 42
<i>Ca_v1.2</i>	I_{CaL}	149 ± 41	92 ± 42

Tab. 7. Prozentuale Angabe der mRNA-Expression der einzelnen Gene in Niedrig- und Hochflussarealen normiert auf Mittelflussareale (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ für Niedrigfluss- und Hochfluss- gegen Mittelflussareale, $n = 5 - 6, 15 - 30$ Proben pro Gen).

Bei dem Vergleich von subepikardialen zu subendokardialen Proben wurde kein Expressionsunterschied bei *Kv4.3*, *KvLQT1*, *minK*, *ERG* und *Ca_v1.2* gefunden. Wenngleich *KChIP2* subepikardial 2,86-fach stärker exprimiert war als subendokardial, erreichte der Wert keine statistische Signifikanz.

Da in Niedrigflussarealen sowohl *KChIP2*, das Kv-Kanal-interagierende Protein, welches I_{to} beeinflusst, als auch *ERG*, das zu einer verstärkten I_{Kr} Ausprägung führt, gegenüber Hochflussarealen überexprimiert sind, ist dort mit einer Verkürzung des Aktionspotentials zu rechnen (siehe unten).

3.3. Modellanalyse der Expressionsunterschiede

Um den Einfluss der Expressionsunterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen besser abschätzen zu können, wurde ein Computermodell verwendet. Unter der Cellular Open Resource (COR)-Umgebung ließen sich die Eigenschaften von ventrikulären Kardiomyozyten des Hundes simulieren. Für die Simulation des Aktionspotentials der Mittelflussareale wurden die Standardeinstellungen des Modells verwendet (siehe Abb. 8). In Übereinstimmung mit den Experimenten wurde eine Zykluslänge von 550 ms (entspricht einer Herzfrequenz von 109 Schlägen / Minute) gewählt. Die Aktionspotentialdauer wurde im Modell bis zur 90 %igen Repolarisation (APD_{90}) gemessen.

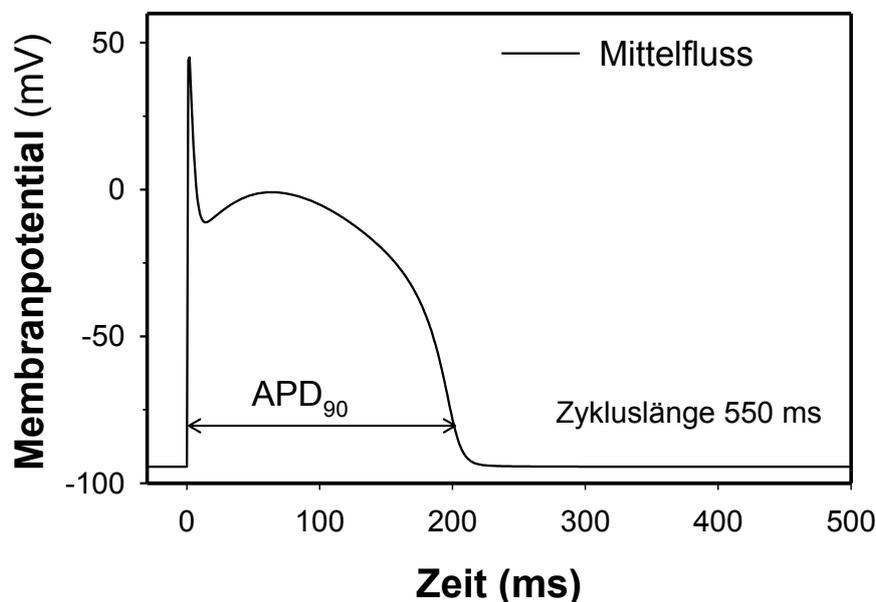


Abb. 8. Simulation des Aktionspotentials bei Mittelflussarealen mit einem Computermodell und Messung der Aktionspotentialdauer bis zur 90 %igen Repolarisation (APD_{90}) bei einer Zykluslänge von 550 ms.

Um selektiv die Auswirkungen der Expressionsunterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen beurteilen zu können, wurden im Folgenden die Leitfähigkeiten der einzelnen Ionenkanäle entsprechend den experimentell ermittelten Daten verändert. Abbildung 9 zeigt die Veränderung der Aktionspotentialdauer bei der Veränderung der Leitfähigkeit von I_{Kr} und I_{Ks} einzeln und bei gleichzeitiger Veränderung von I_{Kr} , I_{Ks} und I_{to} zusammen.

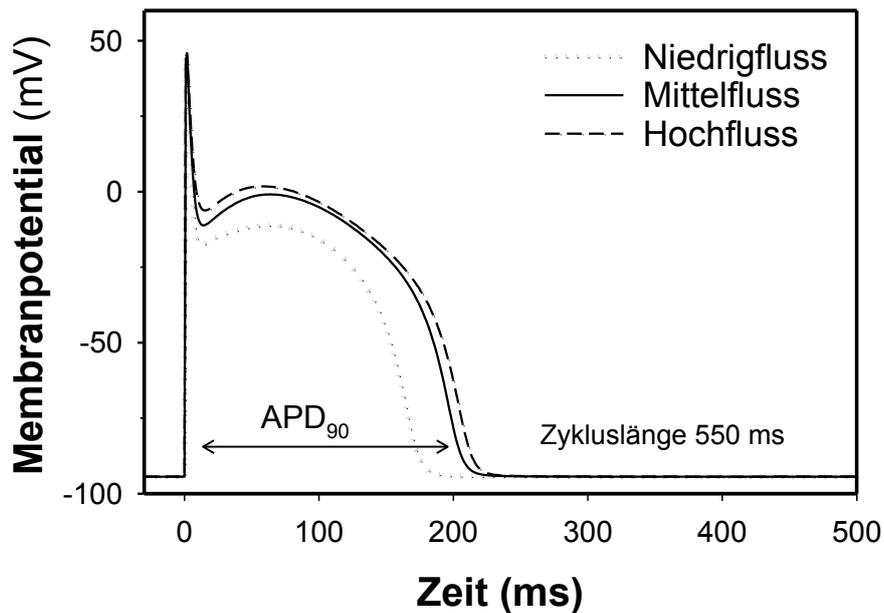
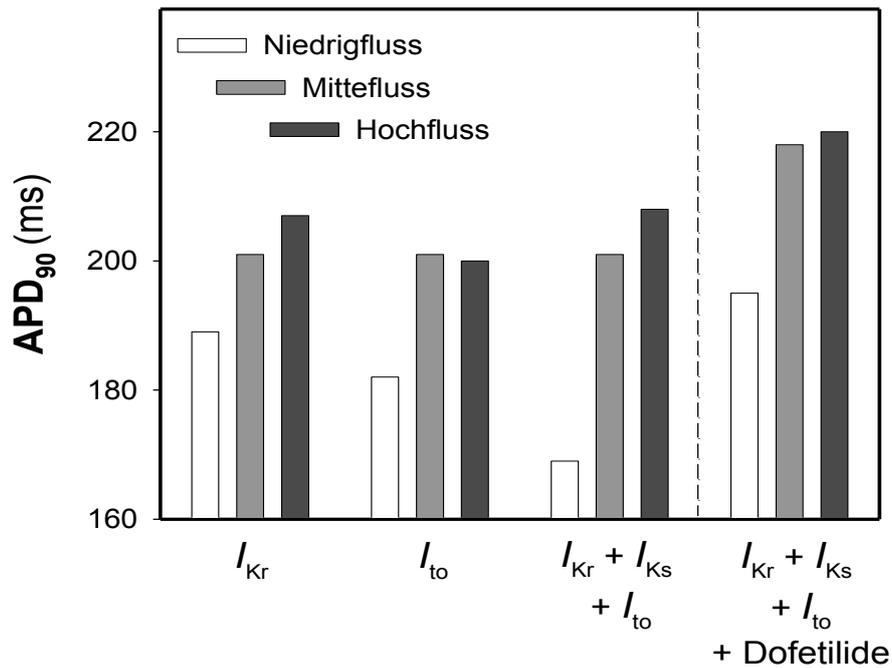


Abb. 9. Obere Abbildung: Modellsimulation der Leitfähigkeitsänderung einzelner Kanäle in Übereinstimmung mit der zugehörigen Genexpression in Mittel-, Hoch- und Niedrigflussarealen und ihre Auswirkung auf die Aktionspotentialdauer (APD₉₀).

Untere Abbildung: Simulation des Aktionspotentials bei einer Zykluslänge von 550 ms in Hoch-, Mittel-, Niedrigflussarealen mit einem Computermodell und Bestimmung der Aktionspotentialdauer bis zur 90 %igen Repolarisation (APD₉₀).

Die selektive Leitfähigkeitserhöhung von I_{Kr} , in Übereinstimmung mit der höheren *ERG*-Expression in Niedrigflussarealen, führte zu einer Verkürzung der APD_{90} von > 10 ms. Die Leitfähigkeitsreduktion von I_{Kr} , entsprechend der niedrigeren *ERG*-Expression in Hochflussarealen, zeigte allerdings geringere Auswirkung auf die APD_{90} . Der gleiche Effekt war bei einer selektiven Veränderung der Leitfähigkeit von I_{to} zu beobachten. Hier führte eine Erhöhung der Leitfähigkeit, unter Berücksichtigung der Expression von *Kv4.3* und *KChIP2* in Niedrigflussarealen, zu einer deutlichen Verkürzung des APD_{90} , während eine Reduktion der Leitfähigkeit, entsprechend der Expression in Hochflussarealen, kaum einen Effekt zeigte. Eine selektive Änderung der Leitfähigkeit von I_{Ks} zeigte insgesamt kaum Auswirkung auf die APD_{90} .

Modulierte man nun gleichzeitig die Leitfähigkeiten für I_{Kr} , I_{Ks} und I_{to} in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten, so zeigte sich erwartungsgemäß eine sehr viel deutlichere Veränderung der APD_{90} als bei der Modulation nur eines Ionenkanals.

Durch das Modell ließ sich auch eine Veränderung der APD_{90} bei 90 %iger *ERG*-Blockade durch Dofetilide vorhersagen. Entsprechend den Erwartungen wurde die APD_{90} insgesamt verlängert. Der Effekt war allerdings in Niedrigflussarealen, also Arealen mit höherer *ERG*-Expression, deutlich ausgeprägter (siehe Abb. 9).

3.4. Lokale Aktionspotentialdauer

3.4.1. Aktionspotentialdauer bestimmt mit dem QT-Intervall

Mit dem während der Experimente über das schlagende Herz gezogenen Ableitungsstrumpf (J. Davis) war es möglich, 128 lokale Elektrogramme aufzuzeichnen. Die Ermittlung der Aktionspotentialdauer aus den Elektrogrammen erfolgte dann manuell während der Experimente mit Hilfe des QT-Intervalls und nach Abschluss der Experimente mit Hilfe von ARIs. Hierbei zeigte sich ein für jedes Versuchstier individuelles heterogenes Verteilungsmuster, das für über 60 Minuten stabil reproduzierbar war. Abb. 10 zeigt eine solche heterogene Verteilung der Aktionspotentialdauer in einem repräsentativen Experiment.

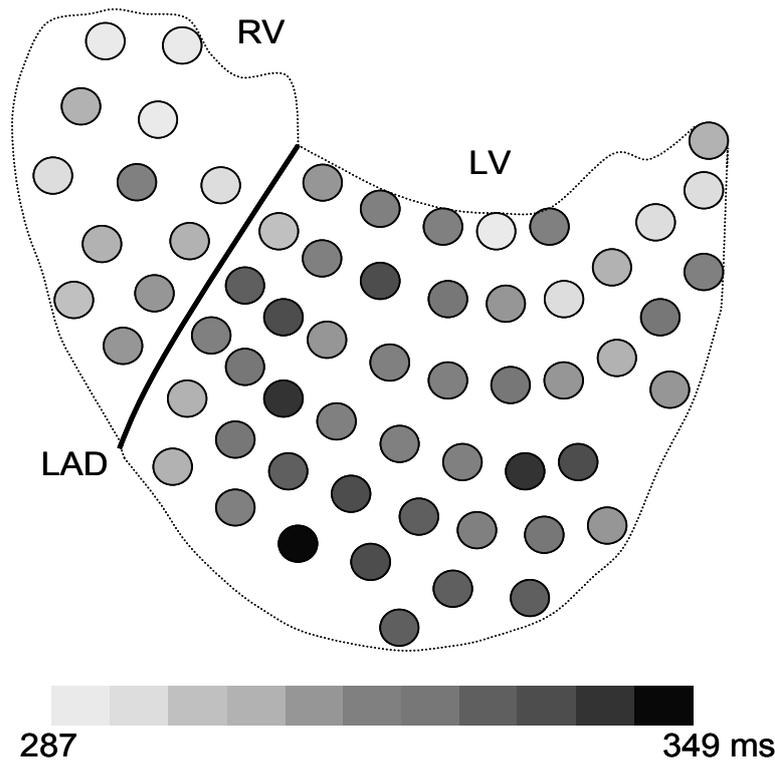


Abb. 10. Stabile heterogene Verteilung der QT-Intervalle in einem repräsentativen Experiment (RV rechter Ventrikel, LV linker Ventrikel, LAD Ramus interventricularis anterior).

Um die Aktionspotentialdauer in den Experimenten vergleichbar angeben zu können, wurde die Frequenzkorrekturformel nach Van de Water (siehe Frequenzkorrektur, 2.3.5.) benutzt. Die frequenzkorrigierten QT-Intervalle wurden als QTc bezeichnet. Insgesamt wurden in allen 11 Experimenten 1316 Elektrogramme mit einem QTc-Mittelwert von 320 ± 48 ms aufgezeichnet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug innerhalb eines Experiments 3,7 %. Die QTc-Werte waren normalverteilt (siehe Abb. 11). Der maximale Abstand zwischen kurzen und langen Arealen in einem Herzen betrug im Bereich des linken Ventrikels 51 ± 15 ms ($n = 11$).

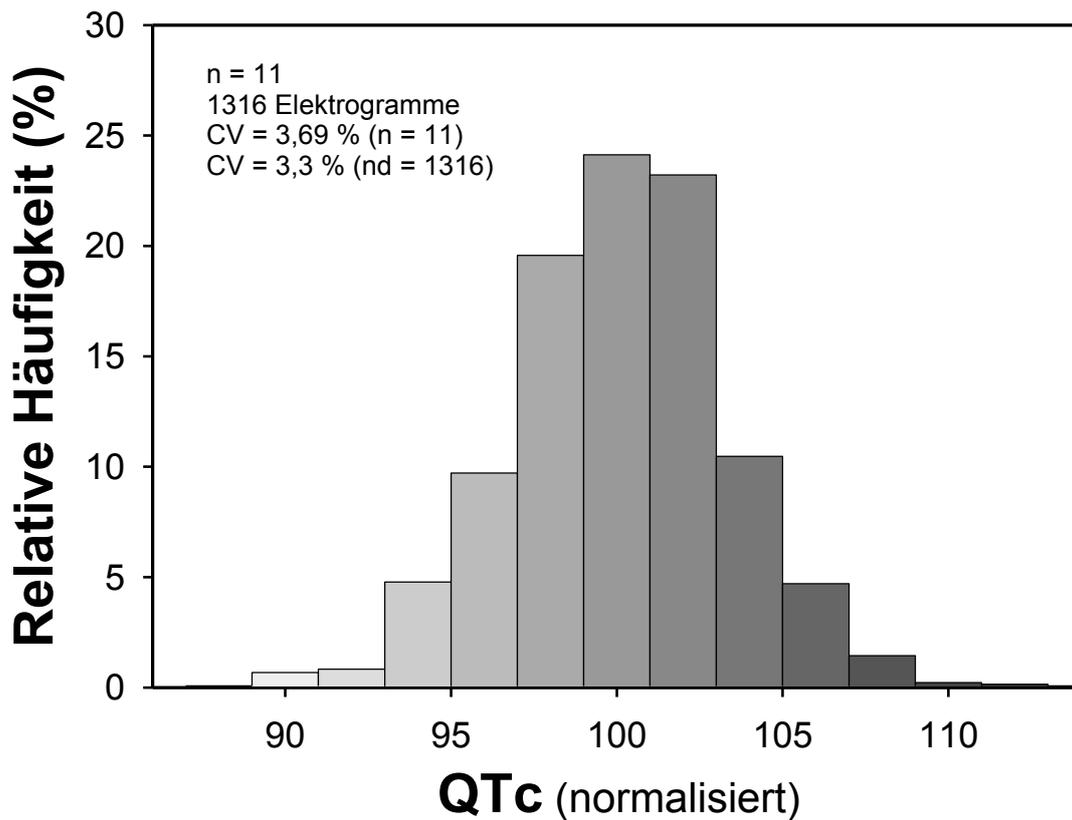


Abb. 11. Darstellung der relativen Häufigkeiten der QTc-Prozentklassen jeweils normiert auf den Mittelwert des einzelnen Experiments (n = 11, 1316 Elektrogramme).

Bei dem Vergleich zwischen rechtem und linkem Ventrikel in der QTc-Verteilung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der QTc-Mittelwert betrug im rechten Ventrikel 320 ± 48 ms und im linken Ventrikel 317 ± 48 ms. Die Streuungsbreite der QTc-Werte der beiden Ventrikel war mit Variationskoeffizienten von rechts 3,5 % und links 3,3 % fast identisch. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Herzbasis mit einem durchschnittlichen QTc von 318 ms und der Herzspitze mit 325 ms ($p < 0,05$).

3.4.2. Aktionspotentialdauer bestimmt mittels ARI

Die Ermittlung der Aktionspotentialdauer aus den Elektrogrammen erfolgte nach Abschluss der Experimente mit Hilfe von ARIs. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch hier dieselbe Formel zur Frequenzkorrektur verwendet. Die ARIs zeigten ein ebenso heterogenes und für mindestens 60 Minuten stabiles Muster.

Gemittelt über alle 11 Experimente betrug das durchschnittliche ARIc 247 ± 32 ms in insgesamt 1146 auswertbaren Elektrogrammen. Der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug innerhalb eines Experiments 5,6 %.

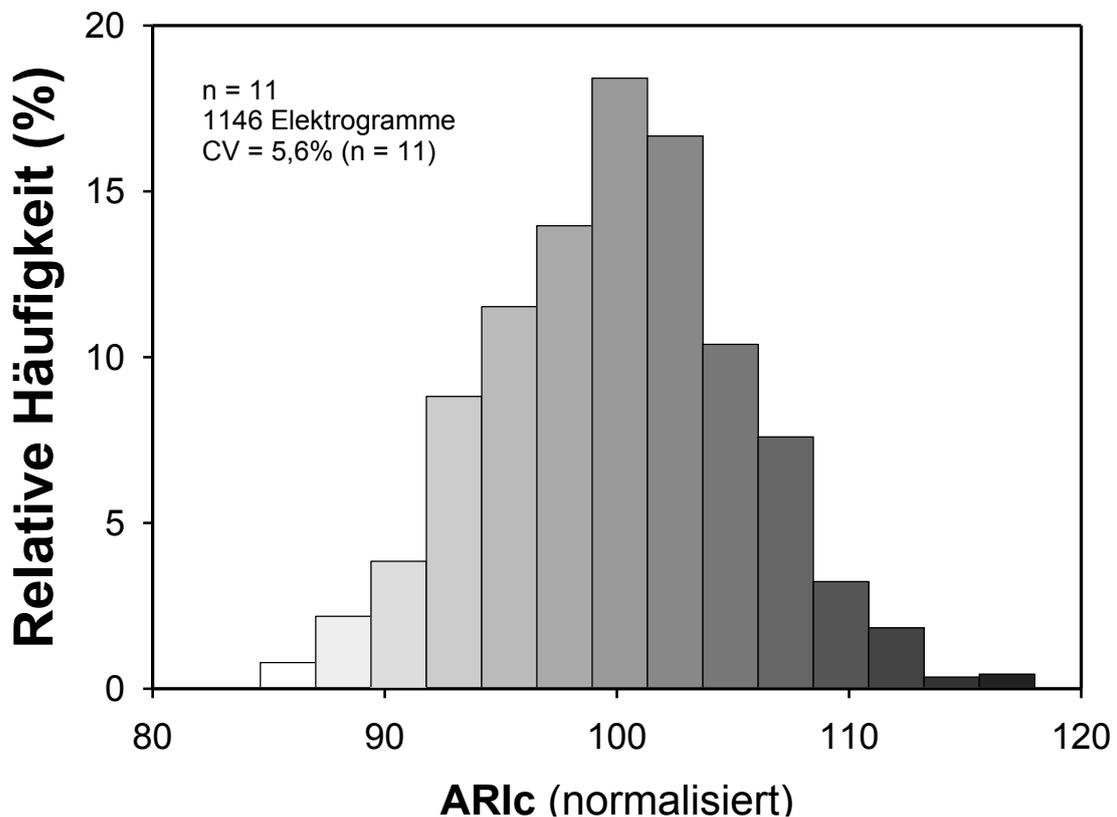


Abb. 12. Darstellung der relativen Häufigkeiten der ARIc-Prozentklassen, jeweils normiert auf den Mittelwert des einzelnen Experiments ($n = 11$, 1146 Elektrogramme).

Die ARIc-Werte waren ebenso normalverteilt. Beim Vergleich der Darstellungen der jeweiligen Prozentklassen für QTc (Abb. 11) und ARIc (Abb. 12) zeigt sich eine größere Streuung der ARIc-Klassen (durch die größere Streuung der Werte ist hier eine andere Skalierung der x-Achse verwendet worden). Der maximale Abstand zwischen kurzen und langen Arealen in einem Herzen betrug im Bereich des linken Ventrikels 55 ± 17 ms ($n = 11$). Im Vergleich zwischen rechtem und linkem Ventrikel zeigte sich links ein durchschnittliches ARIc von 249 ± 33 ms und rechts 237 ± 28 ms mit einem Variationskoeffizienten von 5,1 % links und 4,1 % rechts.

Der bei der QTc-Auswertung ermittelte signifikante Unterschied zwischen Herzbasis und Herzspitze ergab sich auch bei dieser Auswertung mit einem durchschnittlichen ARIC von 248 an der Herzbasis und 262 ms an der Herzspitze ($p < 0,05$).

3.4.3. QT- und ARI-Werte im Vergleich

Da QT- und ARI-Werte bezüglich der regionalen Unterschiede und der Stabilität durchaus vergleichbare Eigenschaften aufwiesen, stellte sich die Frage nach dem unmittelbaren Vergleich der bestimmten Werte. Hierzu wurden die in jedem Experiment bestimmten basalen QT- und ARI-Werte auf Ihren Mittelwert normiert und gegeneinander dargestellt (siehe Abb. 13). Stellt man die basalen QT- und ARIC-Werte für alle Experimente ($n = 11$) mit einer Regressionsgeraden gegeneinander dar, ergibt sich eine Steigung von 0,42 ($r^2 = 0,066$).

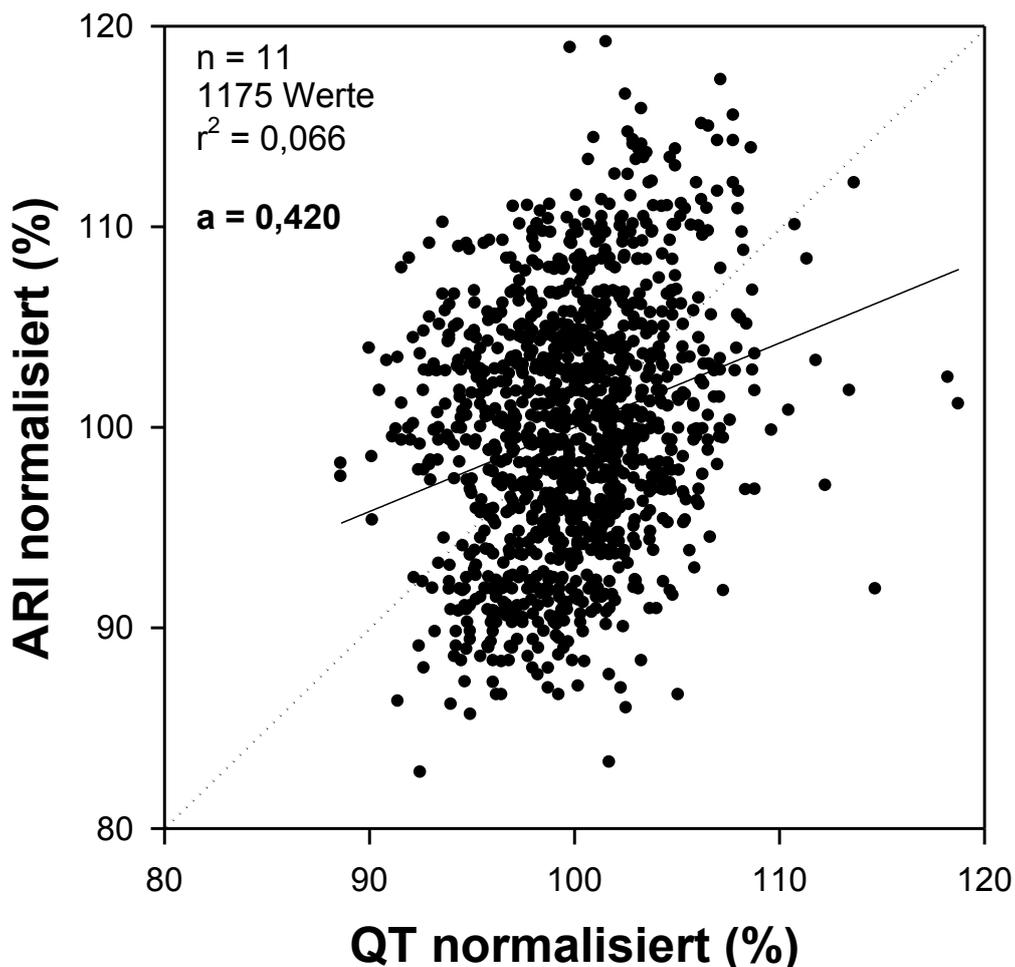


Abb. 13. Darstellung der basalen QT-Werte gegen ARIs in Prozent. Werte sind normalisiert auf den jeweiligen Mittelwert des einzelnen Experiments ($n = 11$, 1175 Werte).

Betrachtet man die einzelnen Experimente unabhängig voneinander, so ergibt sich ein recht unterschiedlicher Zusammenhang zwischen QT und ARI, wie in Tab. 8 dargestellt. Nur in einem Experiment (#6) hatten die QT- und ARI-Werte einen so starken Zusammenhang, dass die Steigung der Regressionsgeraden den Wert eins erreichte.

Experiment Nr.	Datum	Steigung (a) Regressionsgrade	R ²
#1	08.09.2004	0,110	0,009
#2	18.11.2004	1,559	0,477
#3	16.12.2004	0,006	0,000
#4	17.01.2005	0,057	0,003
#5	09.02.2005	-0,276	0,031
#6	01.03.2005	1,007	0,247
#7	15.04.2005	0,439	0,043
#8	07.06.2005	0,621	0,136
#9	21.06.2005	0,045	0,001
#10	11.07.2005	0,346	0,050
#11	20.07.2005	0,495	0,097
alle	-	0,420	0,066

Tab. 8. Korrelation von basalen QTs mit ARIs mit Angabe der Steigung der Regressionsgeraden und des R² (insgesamt 1175 Werte in 11 Experimenten).

3.5. ERG-Kanalblockade durch Dofetilide

3.5.1. Auswirkungen auf die lokale Aktionspotentialdauer

Um die im Computermodell vorhergesagte Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch den ERG-Blocker Dofetilide in vivo zeigen zu können, wurde in insgesamt 9 Experimenten Dofetilide gegeben und die Auswirkung auf die lokale Aktionspotentialdauer durch Messungen vor und nach der Dofetilidegabe dokumentiert.

In Übereinstimmung mit dem durch das Modell prognostizierten Effekt führte Dofetilide zu einer Verlängerung des durchschnittlichen QTc (311 ms) um 34 ms (+ 10 ± 6 %). Eine ebensolche Verlängerung zeigte sich auch bei der Auswertung des durchschnittlichen ARic (243 ms) um 31 ms (+ 12 ± 7 %).

Wie in Abb. 14 repräsentativ (Experiment #3) dargestellt, wurde die Aktionspotentialdauer durch die Dofetilidegabe nicht in jedem Areal um den gleichen Betrag verlängert. So führte die Änderung der Aktionspotentialdauer unter Dofetilide zu einer größeren Verlängerung kurzer QTc-Areale gegenüber langen QTc-Arealen. Trägt man die basalen Qtc-Werte gegen die Differenz (Delta) der Änderung durch Dofetilidegabe gegeneinander auf, ergibt sich eine negative Steigung der Regressionsgeraden (siehe Abb. 14). Für alle n = 9 Experimenten zusammen ergab sich eine negative Steigung der Regressionsgeraden von $-0,68 \pm 0,17$ ($r^2 = 0,32$). Wie im Computermodell vorhergesagt, sollte es sich bei den basal kürzeren Arealen um Areale mit einer stärkeren *ERG*-Expression handeln.

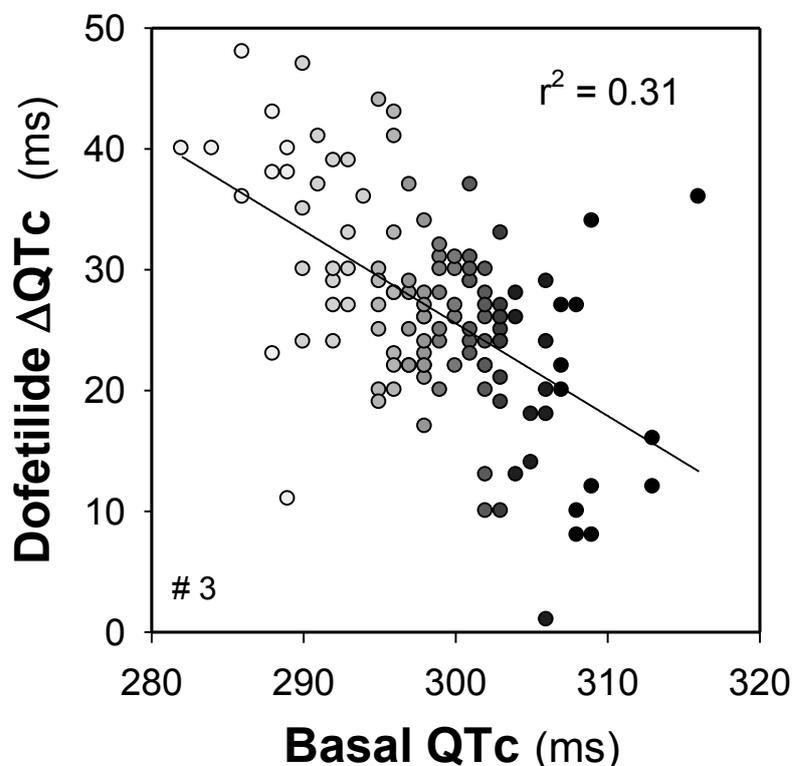


Abb. 14. QTc-Veränderung durch Dofetilide im Vergleich zu den basalen QTc-Werten in einem repräsentativen Experiment ($r^2 = 0,31$, Angabe in ms).

Nach Anlage des Ableitungsstrumpfes änderte sich die durchschnittliche Herzfrequenz durch Dofetilidegabe nur leicht von 108 ± 16 auf 113 ± 15 Schlägen pro Minute.

Bei der Betrachtung der ARIC zeigte sich das gleiche Bild wie schon bei der QTc-Auswertung. Dofetilide führte auch hier zu einer signifikant größeren Verlängerung in Arealen mit kurzem ARIC.

Um diese Beobachtung für alle Experimente darstellen zu können, wurden alle basalen QTc- und ARIC-Werte jeweils neun Klassen zugeordnet. Für jede Klasse wurde nun das Delta der Veränderung unter Dofetilide aufgetragen (siehe Abb. 15). Die gestrichelte Linie zeigt die durchschnittliche Veränderung der Werte durch Dofetilide.

Hierbei zeigt sich - verglichen mit dem Mittelwert (+ 34 ms) - eine signifikant größere Verlängerung der beiden Klassen mit kürzesten QTc und eine signifikant geringere Verlängerung der beiden Klassen mit den längsten QTc-Werten ($p < 0,01$). Betrachtet man die Experimente einzeln, so zeigt sich sogar in insgesamt drei Experimenten kaum eine Veränderung der Klasse mit den längsten QTc-Werten (+ 3 %).

Auch bei den ARIC-Klassen zeigte Dofetilide eine stärkere Veränderung der Klassen mit den kürzeren ARIC-Werten. Wirklich signifikant verschieden war jedoch nur die Veränderung der Werte in der Klasse mit den kürzesten ARIC-Werten im Vergleich zu drei der insgesamt vier Klassen mit langen ARIC-Werten. Durch ihre breite Streuung (siehe Abb. 15 B) erreichten die Veränderungen der ARI-Klassen sonst keine statistische Signifikanz.

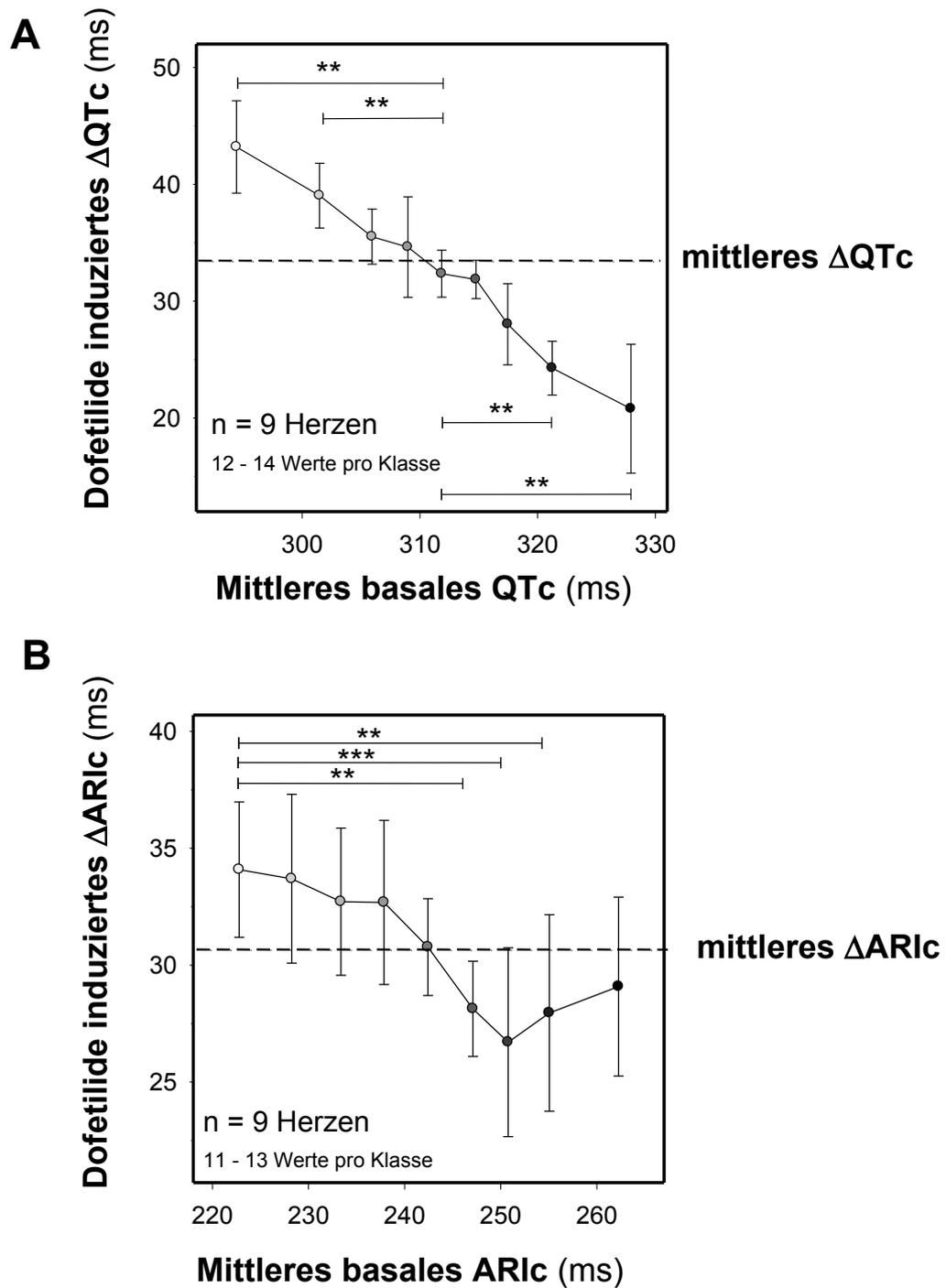


Abb. 15. Stärkere Verlängerung der lokalen Aktionspotentialdauer (APD) gemessen als QTc bzw. auch als AR1c unter Dofetilide in Arealen mit kurzer basaler APD in allen (n = 9) Experimenten. Darstellung der basalen APD in 9 Klassen.

A (** p < 0,01 gegen das durchschnittliche Delta QTc von 34 ms)

B (** p < 0,01 und *** p < 0,001 gegenüber allen Klassen)

In den Experimenten #7 bis #11 wurden die Hunde mit einer Herzzykluslänge im Bereich von 400 ms bis 550 ms elektrisch stimuliert. Begonnen wurde bei einer Zykluslänge von 550 ms und diese wurde schrittweise um 50 ms reduziert. Wie erwartet nahm die Herzfrequenz umgekehrt proportional zur Zykluslänge zu. Die lokale Aktionspotentialdauer wurde bei jeweils gleicher Zykluslänge vor und nach Dofetilide-Gabe bestimmt. Dementsprechend konnte für diese Vergleiche auf einer Frequenzkorrektur verzichtet werden.

Aufgrund der basal unterschiedlichen Herzfrequenz der einzelnen Versuchstiere und der evtl. Änderung innerhalb des Experiments war es nicht möglich, alle Versuchstiere mit allen unterschiedlichen Zykluslängen zu stimulieren. Eine Stimulation war in der Regel nur möglich, wenn die gewählte Zykluslänge kürzer war als die basale des jeweiligen Hundes. Abb. 16 zeigt die Auswirkungen von Dofetilide in einem repräsentativen Experiment (# 7) unter Stimulationsbedingungen.

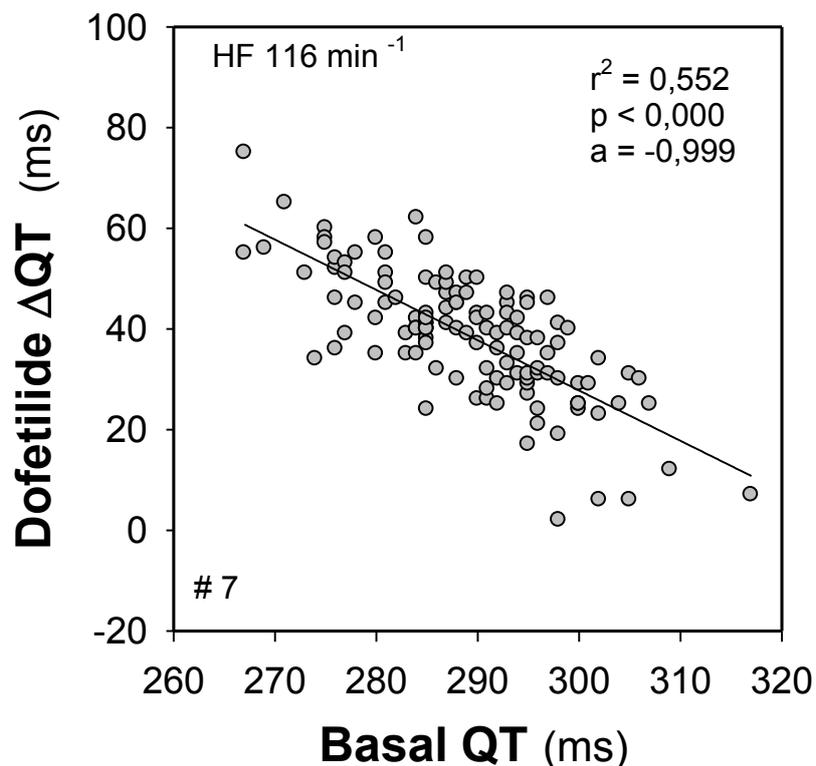


Abb. 16. QT-Veränderung durch Dofetilide in einem repräsentativen Experiment unter Stimulation (Herzfrequenz von 116 Schlägen pro Minute entspricht einer Zykluslänge von 500 ms).

Trägt man die Änderung des QT durch die Dofetilidegabe gegen das basale QT in dem repräsentativen Experiment (Abb. 16) gegeneinander auf, so zeigt sich, dass auch bei identischer Herzfrequenz Dofetilide zu einer größeren Verlängerung von basal kurzen QT-Arealen gegenüber basal längeren führt. Um die Auswirkungen von Dofetilide für alle Experimente unter Stimulation darstellen zu können, wurde die durchschnittliche Steigung der Regressionsgeraden über alle Herzzykluslängen berechnet. Diese betrug $-0,85 \pm 0,14$ ($n = 5$).

3.5.2. Keine Homogenisierung der lokalen Aktionspotentialdauer durch Dofetilide

Wie oben gezeigt, hatte Dofetilide größeren Einfluss auf Areale mit kurzer Aktionspotentialdauer und führte hier zu einer signifikant größeren Verlängerung als in Arealen mit eher langer Aktionspotentialdauer. Dies führte zu der Frage, ob Dofetilide nun auch die Variationsbreite, also die Streuung der lokalen Aktionspotentialdauer, vermindert. Als Maß für die Streuung der Einzelwerte wurde der Variationskoeffizient verwendet.

Bildet man über alle Variationskoeffizienten der QTc-Werte in den einzelnen Experimente ($n = 9$) vor und nach Dofetilidegabe den Mittelwert, so bleibt dieser fast konstant (Basal $3,086 \pm 0,734$; nach Dofetilide $2,988 \pm 0,589$). Abb. 17 stellt die Veränderung der QTc-Variationskoeffizienten für alle Versuche dar ($n = 9$). Eine generelle Homogenisierung der Aktionspotentialdauer durch die Dofetilidegabe ließ sich damit also nicht zeigen. Dies lässt sich auch für die ARIC-Werte beobachten. Hier ändert sich der Mittelwert der Variationskoeffizienten ebenfalls kaum von $4,899 \pm 1,406$ auf $4,586 \pm 0,862$ (vergleiche Abb. 18).

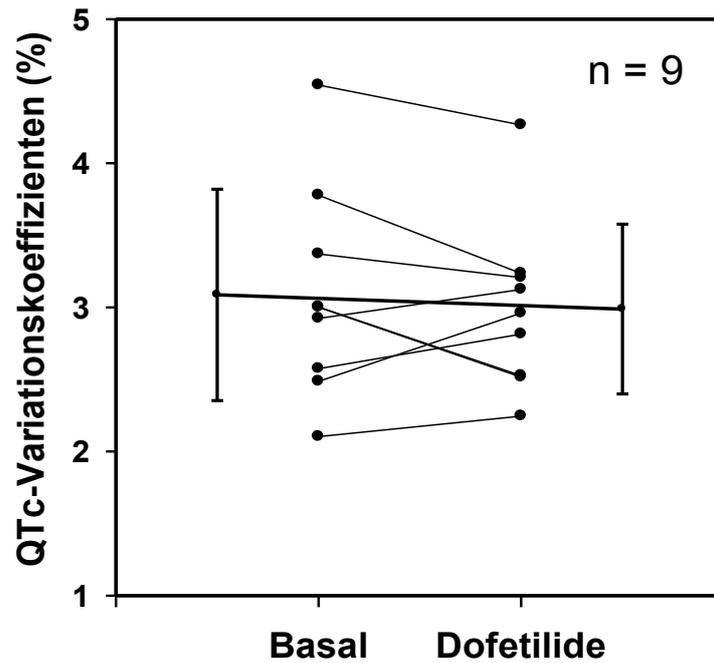


Abb. 17. Auswirkung von Dofetilide auf die Streuung der QTc-Messwerte (CV) in allen Versuchen ($n = 9$) und Angabe des Mittelwerts über alle Versuche ($3,086 \pm 0,734$ vor und $2,988 \pm 0,589$ nach Dofetilidegabe). In zwei Versuchen sind die Werte so ähnlich, dass sie wie eine Linie erscheinen.

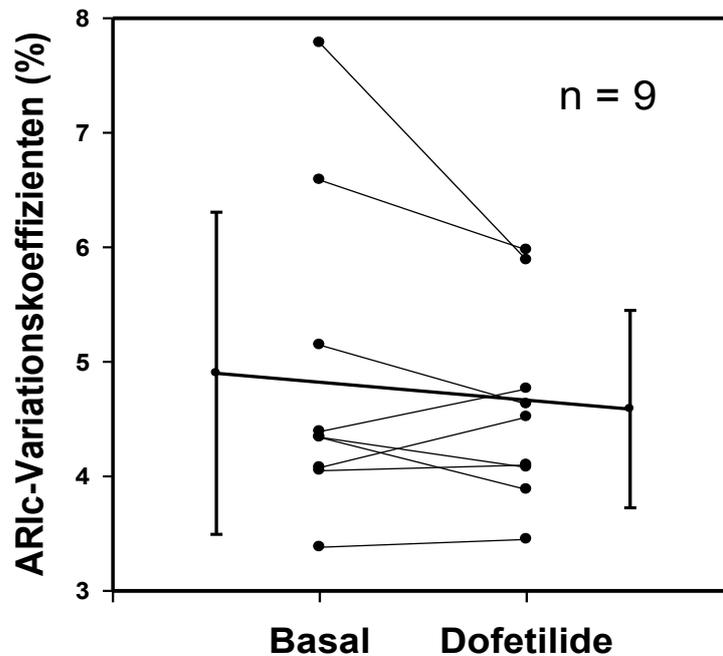


Abb. 18. Auswirkung von Dofetilide auf die Streuung der AR1c-Messwerte (CV) in allen Versuchen ($n = 9$) und Angabe des Mittelwerts über alle Versuche ($4,899 \pm 1,406$ vor und $4,586 \pm 0,862$ nach Dofetilidegabe).

3.5.3. Auswirkungen auf den regionalen Blutfluss

Nach der Simulation der Expressionsdaten in Niedrigflussarealen mit Hilfe des Computermodells handelt es sich bei diesen eher um Areale mit einer kürzeren Aktionspotentialdauer. Da nun Dofetilide auf Areale mit kurzer Aktionspotentialdauer (unabhängig von der Bestimmungsmethode: ARIC oder QTc) den größten Einfluss hatte, stellte sich die Frage nach dem Einfluss von Dofetilide auf den regionalen Fluss. Abb. 19 stellt den Fluss vor und nach Dofetilide-Gabe in allen Experimenten, in denen Dofetilide gegeben wurde ($n = 7$), gegeneinander dar. Werden die Flussdaten zu den beiden Zeitpunkten in Form einer Geraden dargestellt, beträgt die Steigung 0,89. Somit führte Dofetilide tendenziell in Niedrigflussarealen zu einem leichten Flussanstieg und in Hochflussarealen eher zu einer Flussabnahme. Insgesamt blieb jedoch die Mikroheterogenität des Flusses weitestgehend unbeeinflusst durch Dofetilide.

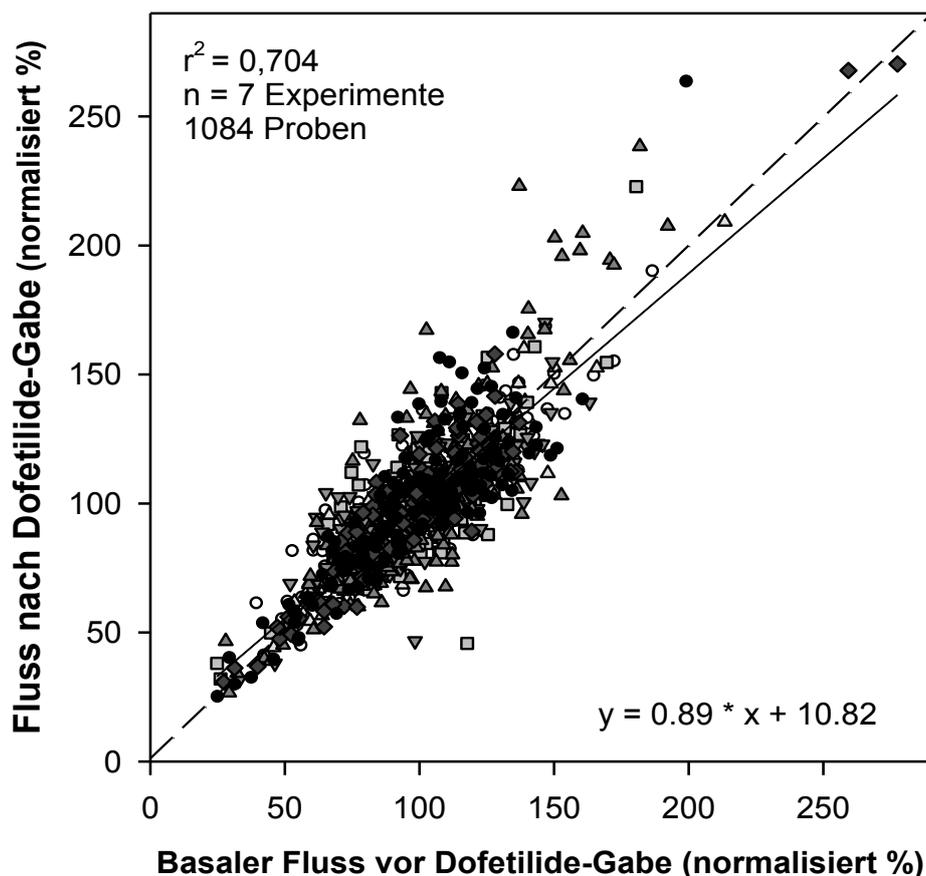


Abb. 19. Auswirkung von Dofetilide auf den lokalen Fluss. Die Flussdaten sind normalisiert auf den durchschnittlichen Fluss des jeweiligen Experiments. Angabe in Prozent ($n = 7$, 1084 Proben, $r^2 = 0,704$, $p < 0,001$).

3.6. Genexpression in Biopsien

Experimentell konnten wir zeigen, dass Niedrigflussareale sich in ihrer lokalen Expression - insbesondere in Bezug auf *ERG* und *KChIP2* - von Hochflussarealen unterscheiden. Diese Expressionsunterschiede führten im Computermodell zu einer kürzeren Aktionspotentialdauer in Niedrigflussarealen – verglichen mit Hochflussarealen. Im letzten Schritt sollten nun in 4 Experimenten aus ausgewählten kurzen und langen QTc-Arealen Biopsien entnommen und diese auf die lokale *ERG* und *KChIP2*-Expression untersucht werden.

Für die Bestimmung der Aktionspotentialdauer diente im Experiment eine 5-fache QTc-Messung im Abstand von je 15 Minuten. Durch dieses Vorgehen konnte der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) auf 1,3 % gesenkt werden. Es wurden dabei 9 bis 11 Proben je Experiment aus kurzen QTc-Arealen (< 97 % des mittleren QTc) und langen QTc-Arealen (> 103 % des mittleren QTc) ausgewählt. In den kurzen QTc-Arealen zeigte sich auf mRNA-Ebene eine signifikante ($p < 0,05$) rund 3-fach erhöhte Expression von *ERG*. Weiterhin war in den kurzen QTc-Arealen ein Trend zu einer stärkeren Expression von *KChIP2* zu beobachten (Abb. 20).

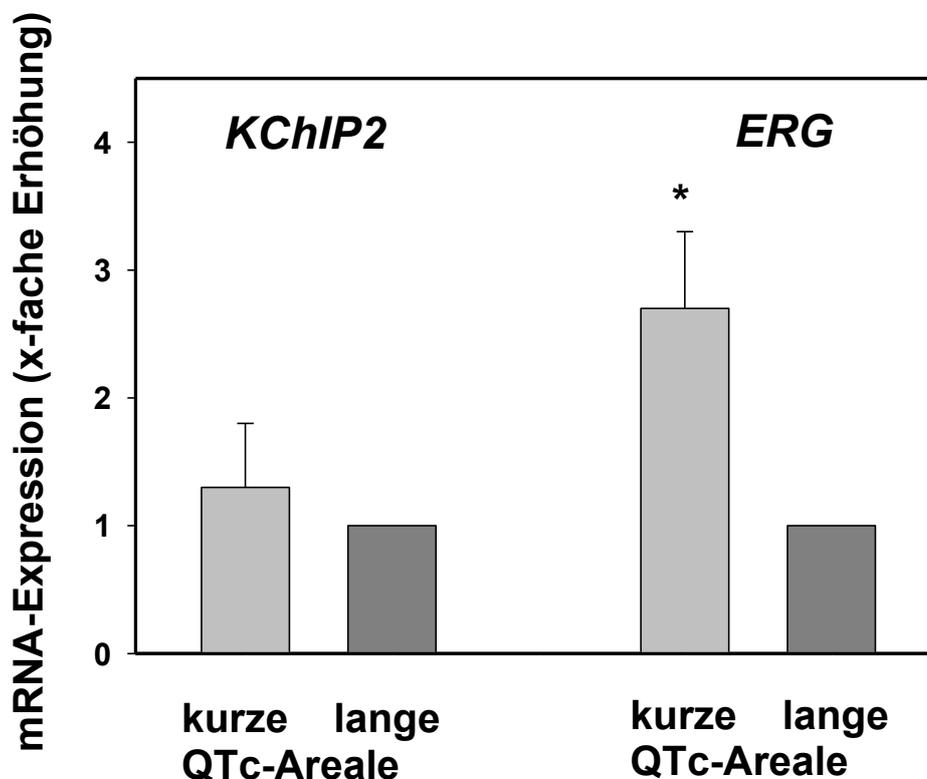


Abb. 20. *KChIP2*- und *ERG*-Expression in kurzen (< 97 % des mittleren QTc) und langen (> 103 % des mittleren QTc) QTc-Arealen. Normiert auf die Expression in langen Arealen (* $p < 0,05$ kurze gegen lange QTc-Areale; $n = 4$; 9 - 11 Proben pro Experiment).

Auch wenn die Selektion der Areale initial auf der QTc-Auswertung beruhte, zeigte auch die nachträgliche Korrelation von ARlc dieser Areale mit der lokalen *ERG*-Expression eine signifikante negative Korrelation mit einer Steigung der Regressionsgeraden von -9,8 (siehe Abb. 21). Dementsprechend führte eine Verdopplung der *ERG*-Expression zu einer rund 10 %igen Verkürzung der ARlc.

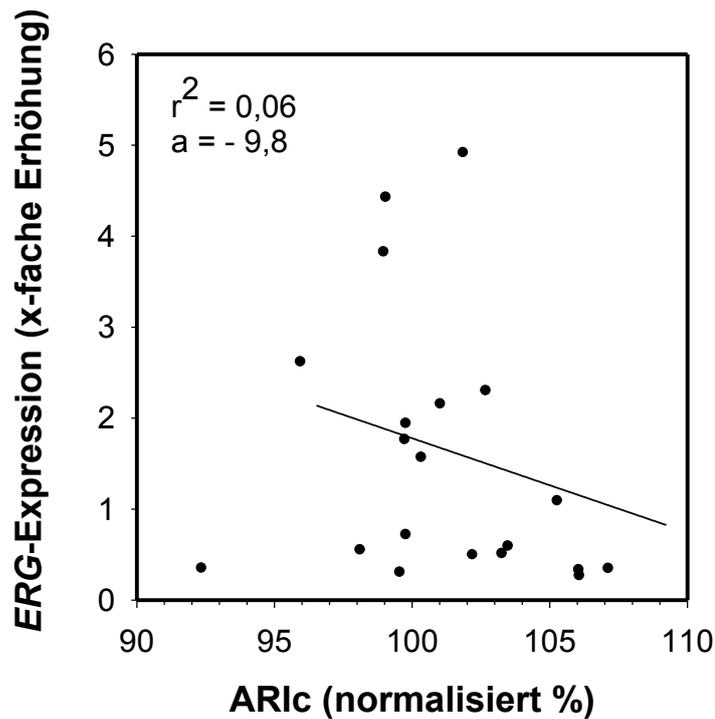


Abb. 21. Korrelation der *ERG*-Expression mit ARlc (normalisiert in %) in Arealen, in denen Biopsien entnommen worden sind. Die Entscheidung zur Biopsie beruhte auf der QTc-Auswertung ($r^2 = 0,06$; $a = -9,8$; $n = 4$).

In den kurzen epikardialen QTc-Arealen war der lokale Fluss signifikant niedriger als in den langen QTc-Arealen ($0,86 \pm 0,07$ in Vergleich zu $1,21 \pm 0,20$; $n = 4$; $p < 0,05$). Der schon durch das Computermodell prognostizierte Zusammenhang zwischen lokalem Fluss, Kaliumkanal-Expression und Aktionspotentialdauer ließ sich damit auch experimentell zeigen.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Erkenntnis, dass die homogen erscheinende Wand des linken Ventrikels erhebliche regionale Unterschiede in Bezug auf den lokalen Fluss, die Aktionspotentialdauer und die Ionenkanalexpression aufweist und dass diese Unterschiede signifikant zusammenhängen.

Mit Hilfe von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären ließ sich bei einer Auflösung von etwa 300 μl der regionale Fluss in der freien Wand des linken Ventrikels bestimmen. In jedem Experiment erhielten rund 1 / 10 aller Areale weniger als 60 % (Niedrigflussareale) bzw. mehr als 140 % (Hochflussareale) des durchschnittlichen Blutflusses. In Niedrigflussarealen konnten wir eine 3,3-fach erhöhte *ERG*-Expression und eine 2,5-fach erhöhte *KCHIP2*-Expression im Vergleich zu Hochflussarealen nachweisen. Mit einem Computermodell unter der Cellular Open Resource (COR)-Umgebung war es möglich, das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle zu simulieren und die Aktionspotentialdauer zu bestimmen. Die Modulation der Leitfähigkeit der Ionenkanäle im Computermodell - in Übereinstimmung mit den gemessenen Expressionsergebnissen - führte zu einer kürzeren Aktionspotentialdauer der Niedrigflussareale. Hochflussareale zeigten eine entsprechend längere Aktionspotentialdauer.

Mit einem bei geöffnetem Thorax über das schlagende Herz gezogenen Ableitungsstrumpf konnten wir eine sehr heterogene Verteilung der Aktionspotentialdauer am Herzen direkt erfassen. Unabhängig von der Bestimmungsmethode (ARI oder QT) war die lokale Aktionspotentialdauer zeitlich stabil. Wie durch das Computermodell vorhergesagt, führte die Gabe des *ERG*-Blockers Dofetilide zu einer signifikant größeren Verlängerung der Aktionspotentialdauer basal kurzer Areale im Vergleich mit basal langen Arealen. Zu einer generellen Homogenisierung der Aktionspotentialdauer durch die Dofetilidegabe kam es jedoch nicht. Über alle Versuche gemittelt führte die Dofetilidegabe vor allem in basalen Niedrigflussarealen zu einem moderaten relativen Flussanstieg.

Um die vermuteten Expressionsunterschiede in Arealen mit basal kurzer und langer Aktionspotentialdauer direkt nachweisen zu können, wurden Biopsien aus Arealen entnommen, die sich in einer 5-fachen Messung als Areale mit einer stabilen kurzen bzw. langen Aktionspotentialdauer erwiesen. Areale mit einer basal kurzen APD wiesen eine 3-fach höhere Expression von *ERG* auf als Areale mit einer basal langen APD.

Weiterhin war in Arealen mit basal kurzer Aktionspotentialdauer ein Trend zu einer stärkeren Expression von *KChIP2* zu beobachten.

Zusammengefasst konnten wir bei Niedrigflussarealen eine höhere Kalium-Kanal-Expression (*ERG*- / *KChIP2*-Expression) als bei Hochflussarealen nachweisen. Diese erhöhte Kalium-Kanal-Expression führte im ComputermodeLL zu einer kürzeren Aktionspotentialdauer. In den Biopsien wiesen Areale mit einer kürzeren Aktionspotentialdauer eine höhere Expression von *ERG* und einen Trend zu einer stärkeren Expression von *KChIP2* auf. Somit ist es nahe liegend, dass es sich bei Arealen mit einer kurzen basalen Aktionspotentialdauer tatsächlich auch um Niedrigflussareale handelt.

Im Folgenden werden die einzelnen Aspekte anhand der Literatur erläutert.

4.1. Lokaler Fluss

4.1.1. Regionale Unterschiede

Analog dem Ansatz von Buckberg et al. (15) wurde die freie Wand des linken Ventrikels nach Entnahme in drei Schichten - subendokardial (subendo), midmyokardial (mid) und subepikardial (subepi) - geschnitten und in Proben mit einem durchschnittlichen Trockengewicht von 62 ± 23 mg aufgeteilt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Flussunterschied zwischen dem Subendokard und dem Subepikard mit erhöhter subendokardialer Durchblutung (Subendo-Subepi-Verhältnis $1,21 \pm 0,12$). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Daten von Feigl (34) (1,1 - 1,2) oder auch Zhang et al. (81) ($1,13 \pm 0,06$ bzw. $1,12 \pm 0,011$ in zwei Studiengruppen). Andere Autoren geben das Verhältnis von subendokardialem zu subepikardialem Fluss noch höher an: Hittinger et al. (42) ($1,41 \pm 0,16$), Bishop et al. (13) ($1,46 \pm 0,12$) oder Duncker et al. (33) ($1,49 \pm 0,09$). Allerdings gibt es auch Autoren wie Buckberg et al. (15), die so gut wie keinen transmuralen Flussgradienten finden (subendo zu subepi $1,01 \pm 0,07$). Insgesamt kann aber die Mehrzahl der Autoren einen transmuralen Flussgradienten - wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung - mit höherer subendokardialer Durchblutung nachweisen. Die subendokardial höhere Durchblutung mag durch den höheren systolischen Wandstress der subendokardialen Schichten und demzufolge auch höheren Sauerstoffbedarf bedingt sein.

Neben den transmuralen Flussunterschieden ließen sich auch noch regionale Flussunterschiede nachweisen, die von den transmuralen Schichten unabhängig waren. So erhielt rund 1 / 10 aller Proben weniger als 60 % (Niedrigflussareale) bzw. mehr als 140 % (Hochflussareale) des durchschnittlichen Blutflusses, bei einer Auflösung von etwa 300 µl. Diese Mikroheterogenität übersteigt die transmuralen Flussunterschiede damit erheblich.

Beschrieben wurde die Mikroheterogenität des Flusses zuerst durch Yipintsoi et al. (79) und ist durch zahlreiche Arbeiten an unterschiedlichen Spezies bestätigt worden (28). Laussmann et al. (52) beobachteten an chronisch instrumentierten Hunden eine Stabilität der Mikroheterogenität über Wochen. Morphologische Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen ließen sich elektronenmikroskopisch nicht nachweisen (67). Loncar et al. (53) konnten durch die lokale Messung von Hypoxiemarkern wie Laktat und freiem Adenosin zeigen, dass Niedrigflussareale keine unterversorgten Areale sind. Weiterhin schlossen sie, dass Hochflussareale keine Luxusperfusion erhalten, sondern der lokale Fluss wirklich den tatsächlichen Bedarf widerspiegelt.

Ein übergeordnetes konstantes Flussmuster ließ sich beim Vergleich der einzelnen Experimente untereinander nicht erkennen. In ähnlicher Weise hatten auch King et al. (48) kein bei allen Versuchstieren gleiches Flussmuster bei Affen beobachten können.

4.1.2. Probenvolumina

Ein wesentlicher Faktor, der das gemessene Ausmaß der Mikroheterogenität des Flusses beeinflusst, ist die Probengröße. In ihrer Studie zur Beschreibung der Mikroheterogenität am Herzen mit fraktalen Modellen zeigen Bassingthwaighe et al. (6), wie das Ausmaß der Mikroheterogenität mit steigender Probengröße abnimmt und mit geringer werdender Probengröße entsprechend zunimmt.

Bei zu groß gewählter Probengröße wird die vorhandene Mikroheterogenität unterschätzt, weil sich der durchschnittliche Fluss der Probe aus den einzelnen, regional unterschiedlichen Flüssen innerhalb der Probe ergibt. Aber auch eine immer höhere räumliche Auflösung - und damit kleinere Probengröße - hat ihre Grenze, und zwar dort, wo innerhalb einer mikrovaskulären Einheit eine räumlich homogene Durchblutung postuliert werden kann.

Da bei der Aufteilung des Gewebes in Proben zur Flussmessung die Grenzen der unterschiedlichen mikrovaskulären Einheiten unberücksichtigt bleiben, kann jede Flussmessung in einer Probe auch immer durch mehrere mikrovaskuläre Einheiten beeinflusst werden. Es stellt sich also die Frage, welche räumliche Auflösung der Flussmessung notwendig ist, um eine mikrovaskuläre Einheit zu erfassen.

Mit Kunststoffen konnten Kassab et al. (47) das Gefäßsystem des Schweineherzens darstellen. Aus ihren Untersuchungen lassen sich vom Durchmesser eines Gefäßes Rückschlüsse auf die Anzahl der versorgten Kapillaren ziehen. Wenn man, wie Balaban et al. (5), Gefäßgrößen um 150 μm betrachtet, unterhalb deren Durchmesser laut Chilian et al. (17) der größte Anteil des Gefäßwiderstandes zu finden ist, dann versorgen diese ein Gewebe von 130 μg oder 0,125 mm^3 Größe.

In unseren Experimenten wurde eine Probengröße von 300 μl (300 mg bzw. 62 mg Trockengewicht) verwendet. Nach Decking et al. (25) ist bei der Flussbestimmung mit Mikrosphären eine weitere Reduzierung der Probengröße bis auf vielleicht 50 μl (50 mg) möglich. Diese liegt jedoch noch immer weit oberhalb der oben erwähnten Größe der regulatorischen Einheiten. Decking et al. (23) konnten zeigen, dass bei sehr hohen Auflösungen von $< 2 \mu\text{l}$ die Verteilung der Mikrosphären einer stabilen, clusterförmigen, nicht zufälligen Verteilung unterliegt, die mehr von strukturellen anatomischen Aspekten beeinflusst wird als vom lokalen Fluss. Daraus folgern sie, dass Mikrosphären bei diesen hohen Auflösungen keine geeignete Messmethode für die lokale Flussmessung sind. Die Verwendung von Mikrosphären bei Auflösungen zwischen 50 μl und 2 μl ist nach Decking et al. noch nicht ausreichend untersucht, um hier eine Aussage treffen zu können.

4.1.3. Anatomische Ursachen der Mikroheterogenität

Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) konnten Bauer et al. (10) bei einer Auflösung von 140 x 140 x 1500 μm , also 0,0294 mm^3 , Mikroheterogenität in mikroskopischen Dimensionen nachweisen. Diese Auflösung liegt bei etwa $\frac{1}{4}$ des von einer 150 μm Arteriole versorgten Bereichs.

Die Flussverteilung ließ sich, wie von Bassingthwaite et al. (6) und Van Beek et al. (69) beschrieben, durch eine fraktale Dimension abschätzen. Da das fraktale Durchblutungsmuster durch Nitroglycerin-Infusion homogener wurde, aber bei Reduktion des Perfusionsdruckes keine Änderung zeigte, schlussfolgern die Autoren, dass die Mikroheterogenität mehr eine Folge des Gefäßtonus als der anatomischen Gefäßarchitektur ist. Deussen et al. zeigten, dass die Mikroheterogenität einerseits auch unter adrenerger Stimulation bestehen bleibt (29) und andererseits nicht allein auf regional unterschiedlicher NO-Synthese beruht (31) und auch nach NO-Inhibition bzw. Beendigung der adrenergen Stimulation noch zu finden ist.

Tanaka et al. (68) konnten zeigen, dass epikardiale und intramurale Gefäße ein kontinuierliches homogenes Verzweigungsmuster aufweisen, das identisch ist mit dem intestinaler Gefäße. In diesem kontinuierlichen Muster der Kaliberreduktion gibt es jedoch einen Bruch an der Verbindungsstelle zwischen epikardialen und intramuralen Gefäßen. Tanaka et al. folgern daraus, dass sich die Gefäßarchitektur intramural und epikardial primär unabhängig voneinander entwickelt und erst im weiteren Verlauf der Entwicklung Anschluss aneinander findet. Wenn man die vorhandene Mikroheterogenität jedoch allein auf anatomische Gegebenheiten zurückführen möchte, ist ihre heterogene Verteilung kaum mit einem kontinuierlichen Muster der Gefäßkaliberreduktion - wie es von Tanaka et al. beobachtet wurde - zu vereinbaren.

4.2. Ionenkanalexpression

Zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen ließen sich statistisch signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von *KChIP2* und *ERG* nachweisen. Die *ERG*-Expression war in Niedrigflussarealen 3,3-fach stärker als in Hochflussarealen. Die Expression von *KChIP2* zeigte eine 2,5-fache Erhöhung. Diese Expressionsunterschiede ließen sich völlig unabhängig von der transmuralen Schicht zeigen. *ERG* vermittelt den Auswärtsgleichrichter I_{Kr} . *KChIP2* beeinflusst zusammen mit *Kv4.3* den Kaliumauswärtsstrom I_{to} . Beide Expressionsunterschiede sollten Einfluss auf die lokale Aktionspotentialdauer im Sinne einer Verkürzung bei höherer lokaler Expression haben. Die Überexpression von *Kv4.3* in Niedrigflussarealen erreichte keine statistische Signifikanz. Bei den anderen untersuchten Genen *KvLQT1* und *minK* (modulieren I_{Ks}), dem K^+ -Gleichrichter *Kir2.1*, dem spannungsgesteuerten Na^+ -Kanal *Nav1.5* und bei der α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals *Ca_v1.2* ließen sich auf mRNA-Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen nachweisen.

Ergänzend dazu wurden auch die transmuralen Unterschiede untersucht. Der Vergleich von subepikardialen zu subendokardialen Proben in unseren Experimenten ergab keinen Expressionsunterschied der mRNA von *Kv4.3*, *KvLQT1*, *minK*, *ERG* und *Ca_v1.2*. *KChIP2* war jedoch subepikardial 2,86-fach stärker exprimiert als subendokardial. Dieser Wert erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Ein solcher transmuraler Gradient von *KChIP2* wurde beim Hund und beim Menschen auf der Ebene der mRNA auch von Deschenes et al. (27), Rosati et al. (63) und Zicha et al. (82) gefunden. Diese Unterschiede in der mRNA-Expression sollten sich ebenfalls auf Proteinebene nachweisen lassen.

In der Literatur gibt es jedoch recht unterschiedliche Ergebnisse bei Untersuchungen auf Proteinebene. Zicha et al. (82) führen diese Unterschiede auf die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper zurück. Da *KChIP2* zusammen mit *Kv4.3* den Kaliumauswärtsstrom I_{to} beeinflusst, wäre zu erwarten, dass ein *KChIP2*-Gradient mit einem I_{to} -Gradienten übereinstimmt. Entsprechend dem *KChIP2*-Expressionmuster konnten Wettwer et al. (77) und Zicha et al. (82) einen I_{to} -Gradienten nachweisen.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten andere Untersuchungen auch transmurale Gradienten für *ERG* und *KChIP2*. So wiesen Zicha et al. (82) einen transmuralen Gradienten für *Kv4.3* bei Hunden und Menschen nach. Obreztschikova et al. (58) fanden bei Hunden ebenfalls einen *ERG*-Gradienten. Brahmajothi et al. (14) zeigten beim Frettchen eine epikardial betonte Ausprägung von *ERG*, aber auch eine schichtunabhängige heterogene *ERG*-Verteilung, wie sie auch bei unseren Experimenten gegeben war. Wie schon bei der Flussanalyse liegt bei der Untersuchung der transmuralen Unterschiede eine bedeutende Fehlermöglichkeit in der Auswahl der Proben, die in der Vergangenheit eventuell zu wenig beachtet worden ist. Beschränkt sich die Analyse transmuraler Unterschiede auf wenige Areale, können durch die in unseren Experimenten gefundene sehr heterogene intramurale Verteilung der mRNA von *Kv4.3*, *KChIP2*, *KvLQT1*, *ERG* und *Ca_v1.2* in Hoch- und Niedrigflussarealen unterschiedliche Ergebnisse bei den verschiedenen Studien entstehen.

Schram et al. (65) weisen darüber hinaus auf gravierende Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies hin, die bis heute kaum verstanden sind und so ebenfalls eine Vergleichbarkeit erschweren.

4.3. Aktionspotentialdauer

4.3.1. Heterogenität der Aktionspotentialdauer

Beschränkten sich bisherige Untersuchungen zumeist auf Unterschiede der Aktionspotentialdauer zwischen Herzbasis und Herzspitze und auf Unterschiede zwischen den Ventrikeln, war es uns mit einem über das schlagende Herz gezogenen Ableitungsstrumpf möglich, eine heterogene epikardiale Verteilung der Aktionspotentialdauer (APD) zu messen. Nachweisen konnten wir dieses für mindestens 60 Minuten stabile Phänomen mit zwei verschiedenen Bestimmungsmethoden. So wurde die Aktionspotentialdauer sowohl mit Hilfe des QT-Intervalls wie auch als ARI (activation recovery interval) bestimmt. Die APD aller aufgezeichneten Punkte war bei beiden Methoden normalverteilt. Aus der Verteilung der APD über das Herz ließen sich keine Regelmäßigkeiten erkennen, weder in Bezug auf die Nachbarareale noch im Vergleich mit den jeweils anderen Experimenten. Um die APD bei unterschiedlichen Herzfrequenzen vergleichen zu können, wurde diese nach Van de Water frequenzkorrigiert und dann als QTc bzw. ARIC bezeichnet. Die durchschnittliche APD betrug als QTc 320 ± 48 ms und als ARIC 247 ± 32 ms. Die bestimmten QT- und ARI-Werte korrelieren allerdings nur sehr eingeschränkt miteinander. So erreichte die Steigung der Regressionsgeraden aller QT-Werte gegen alle ARI-Werte einen Wert von 0,420 ($r^2 = 0,066$). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass beide Bestimmungsmethoden von unterschiedlich großen Bereichen beeinflusst werden (siehe Methodenkritik, 4.5.).

Unabhängig von dem Bestimmungsverfahren ließ sich ein Gradient der Aktionspotentialdauer zwischen Herzbasis und Herzspitze bei allen unseren Experimenten zeigen (Herzbasis zu Herzspitze: ARIC 248 ms zu 262 ms und QTc 318 ms zu 325 ms; jeweils $p < 0,05$). Zwischen dem linken und rechten Ventrikel gab es keinen signifikanten Unterschied in der APD (rechter Ventrikel zu linkem: ARIC 249 ± 33 ms zu 237 ± 28 ms und QTc 320 ± 48 ms zu 317 ± 48 ms).

Während die räumlich heterogene Verteilung epikardialer Aktionspotentialdauer ein hier erstmalig beschriebenes Phänomen ist, wurden Gradienten der APD am Herzen schon bei anderen Untersuchungen beobachtet. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Bauer et al. (9) einen Gradienten der Aktionspotentialdauer zwischen der Herzbasis (kürzer) und der Herzspitze (länger) bei Hunden und Iwata et al. (45) bei Kaninchen messen.

Im Gegensatz dazu zeigten Dean et al. (21) einen umgekehrten Gradienten der Aktionspotentialdauer von der Herzbasis (länger) zur Herzspitze (kürzer) bei Schweinen und Kanai et al. (46) bei Meerschweinchen. Ramanathan et al. (62) konnten beim Menschen sowohl einen Gradienten zwischen Herzbasis (länger) und Herzspitze (kürzer), als auch einen zwischen dem linken (länger) und rechtem (kürzer) Ventrikel messen. Diese divergenten Ergebnisse des Gradienten zwischen Herzbasis und Herzspitze führen Colli et al. (18) auf erhebliche Unterschiede zwischen den Spezies und auf unterschiedliche Messmethoden zurück.

Laut Franz et al. (35) sind transmurale Unterschiede der APD ein physiologisches Phänomen, das eine homogene Erregungsrückbildung erst möglich macht. So haben Regionen, die früher erregt werden, eine tendenziell längere Aktionspotentialdauer und später erregte Regionen eine tendenziell kürzere.

Vergleicht man jedoch das Ausmaß dieser regionalen Unterschiede, wird schnell deutlich, dass die räumlich unterschiedliche APD epikardialer Potentiale, d.h. die räumliche Heterogenität der APD die Gradienten zwischen Herzbasis und Herzspitze erheblich übersteigt. Bei ausschließlicher Betrachtung des linken Ventrikels lag die Differenz zwischen den jeweils längsten und kürzesten Arealen bei 55 ± 17 ms für ARIC und bei 51 ± 15 ms für QTc. Der Gradient zwischen Herzbasis zu Herzspitze betrug wie oben beschrieben: ARIC 248 ms zu 262 ms und QTc 318 ms zu 325 ms. Da zur Messung solcher Gradienten oft selektiv Areale ausgewählt und miteinander verglichen werden, kann hier eine ganz bedeutende Fehlerquelle liegen, wenn die heterogene Verteilung der APD unberücksichtigt bleibt.

4.3.2. Bedeutung für Arrhythmien

Nahe liegend ist die Frage, ob die Heterogenität der Aktionspotentialdauer Auslöser für Arrhythmien sein kann. Kuo et al. (51) konnten durch Hypothermie und regionale Perfusion mit warmem Blut die regionalen APD-Unterschiede gut verzehnfachen, aber dies alleine reichte ohne externen Stimulus nicht zur Induktion von Arrhythmien aus. Andererseits konnten Akar et al. (1) in ihren Versuchen eine Zunahme der transmuralen Heterogenität der APD bei Hunden mit zunehmendem Herzversagen beobachten. Besonders in midmyokardialen Schichten nahm dabei die APD gegenüber epikardial zu.

Auch wenn lokale Heterogenität der Refraktärzeit - und damit auch der APD - ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Reentry-Tachykardien ist, machen Allesie et al. (2) darauf aufmerksam, dass dies nur einer von mehreren Faktoren ist. In ihren Versuchen war es schwierig bis unmöglich, Tachykardien in Arealen mit homogener Rückbildung der Erregbarkeit zu induzieren. Heterogenität in der APD ist also zweifellos begünstigend für Arrhythmien - auch wenn sie als alleiniger Auslöser nicht ausreicht.

4.3.3. Wirkung von Gap-Junctions

Dhein et al. (32) konnten mit Palmitoleinsäure, die pharmakologisch die Verbindung der Gap-Junctions unterbricht, an isolierten Kaninchenherzen zeigen, dass die durchschnittliche APD (gemessen als ARI) fast unverändert blieb, während die Heterogenität der APD deutlich zunahm. Dies lässt nach Dhein et al. darauf schließen, dass Gap-Junctions die vorhandene Heterogenität der APD eher unterdrücken und zu einer Homogenisierung im intakten Gewebeverband führen. Auch Viswanathan et al. (73) konnten in einem Zellmodell zeigen, dass die Heterogenität der Aktionspotentialdauer mit abnehmender Kopplung durch Gap-Junctions zunimmt.

Interessant wird dieser Zusammenhang bei Zuständen, in denen die Koppelung der Zellen untereinander gestört ist, etwa durch Ischämie. Die schon bestehende Heterogenität würde unter diesen Umständen weiter zunehmen.

Darüber hinaus wird durch die Entdeckung der „homogenisierenden“ Wirkung der Gap-Junctions auch die Vergleichbarkeit von Studien an isolierten Zellen mit Studien an intakten Zellverbänden eingeschränkt, zumindest bei dem Aspekt der regionalen Heterogenität der APD.

4.3.4. Einfluss von Dofetilide

Die durch das Computermodell vorhergesagte stärkere Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch Gabe von Dofetilide in Arealen mit basal kürzerer APD ließ sich auch experimentell mit beiden Messmethoden bestätigen. Durchschnittlich verlängerten sich die QTc-Werte (311 ms) um 34 ms (+ 10 ± 6 %) und die ARIc-Werte (243 ms) um 31 ms (+ 12 ± 7 %). Trotz der stärkeren Verlängerung von Arealen mit initial kurzer APD kam es jedoch nicht zu einer Homogenisierung der APD.

Der Variationskoeffizient der APD betrug für QTc-Werte basal $3,09 \pm 0,73$ und nach Dofetilide $2,99 \pm 0,59$. Auch für ARIC-Werte änderte sich dieser kaum von basal $4,90 \pm 1,41$ auf $4,59 \pm 0,87$ nach Dofetilide.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben Areale mit stärkerer *ERG*-Expression eine eher kürzere APD. Da laut Mounsey et al. (56) der Kaliumkanal-Blocker Dofetilide selektiv auf *ERG* und damit auf I_{Kr} wirkt, sollte er auf Areale mit einer stärkeren *ERG*-Expression den größeren Einfluss haben. Insgesamt ist der Einfluss von Dofetilide allerdings begrenzt. Trotz des unterschiedlichen Einflusses wird aus einem Areal mit initial kurzer APD kein Areal mit eher langer APD und umgekehrt.

4.4. Zusammenhang zwischen APD, Fluss und Ionenkanalexpression

Wie oben erläutert, ließ sich mittels Mikrosphären eine stabile räumliche Mikroheterogenität des Flusses nachweisen, die auch die vorhandenen transmuralen Unterschiede erheblich überstieg. In Niedrigflussarealen konnten wir eine schichtunabhängige erhöhte Expression von *ERG* (3,3-fach) und *KChIP2* (2,5-fach) im Vergleich zu Hochflussarealen zeigen. Auch wenn sie es nicht sicher experimentell zeigen konnten, war schon von Brahmajothi et al. (14) über schichtunabhängige Verteilungsmuster von *ERG* spekuliert worden.

Die Ergebnisse des Computermodells ließen darauf schließen, dass Niedrigflussareale eine kürzere Aktionspotentialdauer (APD) aufweisen als Hochflussareale. Bei Dofetilidegabe erfuhren diese Niedrigflussareale eine relativ größere Verlängerung. Dies scheint nur logisch, da Dofetilide selektiv auf *ERG* wirkt und somit den größten Einfluss in Arealen mit der höchsten *ERG*-Expression haben sollte. Insgesamt führte die Dofetilidegabe vor allem in basalen Niedrigflussarealen zu einem moderaten relativen Flussanstieg. Durch diesen Effekt blieb jedoch die Mikroheterogenität des Flusses weitgehend unbeeinflusst. Mit Biopsien konnten wir dann auch direkt experimentell zeigen, dass in Arealen mit kurzer APD die *ERG*- und *KChIP2*-Expression höher ist als in Arealen mit basal langer APD, wobei nur die rund 3-fach erhöhte Expression von *ERG* signifikant verschieden war. In den Arealen mit kurzer APD war der lokale Fluss signifikant niedriger als in den Arealen mit langer APD. Somit gibt es einen Zusammenhang zwischen dem lokalen Fluss, der Aktionspotentialdauer und der Kaliumkanal-Expression.

Die Aktionspotentialdauer ist aber letztlich nicht die Ursache, zumindest nicht die alleinige, für den Flussunterschied. Auch wenn in Arealen mit kurzer Aktionspotentialdauer der Energiebedarf und demzufolge der Fluss niedriger sein mag, so hatte die Dofetilidegabe zwar Auswirkungen im Sinne eines moderaten relativen Anstieg des Flusses in basalen Niedrigflussarealen (Arealen mit niedriger APD), aber nicht so stark, dass diese hierdurch etwa zu Hochflussarealen werden können.

4.5. Methodenkritik

4.5.1. Flussmessung

Mikrosphären wurden zur Messung der lokalen Gewebedurchblutung erstmals von Rudolph und Heymann (64) im Jahre 1967 verwendet. Die Messmethode ist inzwischen sehr etabliert und standardisiert (61).

Anfängliche Zweifel bezogen sich darauf, dass die gemessene unterschiedliche Verteilung der Mikrosphären mehr ein Artefakt der Methode als eine wirklich unterschiedliche Durchblutung sein könnte. Bassingthwaighte et al. (7) konnten jedoch einen sehr engen Zusammenhang zwischen dem Plasmafluss, gemessen mittels Iododesmethylimipramine (IDMI) und Mikrosphären zeigen. Der lösliche Stoff IDMI zeigt eine fast vollständige Extraktion bei der Kapillarpassage und kann deshalb sehr gut als Flussmarker verwendet werden.

Allerdings konnten Bassingthwaighte et al. auch eine überproportional hohe Ablagerung von Mikrosphären in Gebieten mit hohem Plasmafluss zeigen. In Bezug auf den Plasmafluss stellt dies eine leichte systematische Verzerrung bedingt durch die Messmethode dar. Dabei könnten die Mikrosphären eventuell die tatsächliche Strömungsverteilung der Erythrozyten abbilden. Weil die Verzerrung insgesamt klein ist bzw. hauptsächlich in Arealen mit sehr hohem Fluss besteht und die Reproduzierbarkeit der Flussmessung extrem gut ist, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass Mikrosphären trotzdem eine gute Methode zur Flussmessung in Geweben sind. Wilke et al. (78) gelang es, eine sehr enge Korrelation zwischen dem mit Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) gemessenen lokalen Fluss und dem mittels radioaktiver Mikrosphären bestimmten Fluss zu zeigen.

4.5.2. Messung der Aktionspotentialdauer

4.5.2.1. Einzelne Bestimmungsverfahren

Wie einleitend beschrieben, kommen zur Bestimmung der lokalen Aktionspotentialdauer (APD) *in vivo* drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung: Messung von monophasischen Aktionspotentialen (MAP's), Bestimmung des activation recovery intervals (ARIs) und Bestimmung der QT-Zeit im Oberflächen-EKG (16).

Die Messung der APD mit Hilfe von MAP's ist die am längsten verwendete und kann als Standard angesehen werden (49). MAP's werden entweder mit der nach ihrem Erfinder benannten Franz-Kontakt-Elektrode (36) oder als intramurale MAP's mit Elektroden aufgezeichnet, die - außer an der Spitze - überall isoliert sind. Die Voraussetzungen für diese Methode sind allerdings ein konstanter Anpressdruck bzw. eine stabile Verbindung zum Gewebe. Demzufolge sind Versuche mit MAP's immer auf wenige Areale begrenzt und waren für unsere Versuche bei gleichzeitiger Aufzeichnung von 128 Signalen ungeeignet.

Bei der Betrachtung der beiden anderen Bestimmungsverfahren fällt auf, dass die Bestimmung der Aktionspotentialdauer mittels epikardialer Signale in Form von ARIs (activation recovery intervals) weitgehend akzeptiert ist, während die Bestimmung mittels QT-Intervallen wesentlich umstrittener ist (16).

Hinsichtlich der ARIs existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben darüber, bis zu welchem zeitlichen Punkt das Ende der ARIs bestimmt werden soll. Von den meisten Autoren werden ARIs, wie von Millar et al. (55) vorgeschlagen, bis $(dV/dt)_{\max}$ der T-Welle definiert - unabhängig von der Polarität der T-Welle. In unseren Experimenten wurde ebenfalls die klassische, von Millar et al. vorgeschlagene Methode verwendet. Allerdings bestimmen einzelne Autoren wie Yue et al. (80) ARIs bei positiven T-Wellen bis $(dV/dt)_{\min}$ der T-Welle und erreichen so eine höhere Korrelation zu den parallel gemessenen MAP's. Coronel et al. (19) weisen darauf hin, dass jede ARI-Bestimmung - bis zu welchem beliebigen Punkt auf der T-Welle auch immer - (unterschiedlich stark) mit der MAP-Messung korreliert. Ein besonderes Problem besteht darin, dass die vergleichenden Messungen der APD mit unterschiedlichen Methoden aus technischen Gründen fast nie an derselben Stelle durchgeführt werden - im Fall von Yue et al. sogar bis 4 cm voneinander entfernt.

Die in unseren Versuchen beobachtete heterogene Verteilung der APD würde die Vergleichbarkeit beider Messungen daher deutlich einschränken. Dennoch wäre es technisch denkbar, beide Messungen zumindest in geringerem Abstand zueinander als bei Yue et al. durchzuführen.

Bei der Verwendung des QT-Intervalls zur Bestimmung der APD gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. So lehnen Lux et al. (54) das QT-Intervall als ungeeignetes Maß für die Repolarisationszeit ab, weil in ihrem Versuch mit einem perfundierten Hundeherz an der gleichen Stelle aufgezeichnete QT-Werte schlecht mit den ARI-Werten korrelierten. Weiterhin konnten sie eine geringe QT-Variationsbreite von 5 bis 6 Millisekunden zeigen, während die ARI-Variationsbreite rund zwei- bis dreimal größer war. Mit steigender Temperatur nahm die ARI-Variationsbreite im Gegensatz zu der Variationsbreite der QT's, die fast unverändert blieb, immer mehr ab. Aus diesem Grund lehnen sie das QT-Intervall als einfache Methode zur Bestimmung der Heterogenität der Repolarisationszeit ab.

Kritisch anzumerken ist, dass es sich bei dem Versuch von Lux et al. nicht um ein Experiment in vivo handelte, was die Vergleichbarkeit einschränken mag. Bei dem Vergleich der Variationsbreite der gemessenen QT- und ARIC-Werte in unseren Experimenten ließen sich keine so großen Unterschiede zwischen beiden Bestimmungsmethoden zeigen. Das durchschnittliche ARIC betrug über alle gemessenen Werte 247 ± 32 ms und das durchschnittliche QTc 320 ± 48 ms. Die Variationskoeffizienten betragen bei QTc 3,7 % und bei ARIC 5,6 %. Damit ist die Verteilungsbreite der QTc-Werte über alle Experimente zwar enger, aber dennoch nicht so gering, wie von Lux et al. beschrieben.

Allerdings birgt die Bestimmung mittels QT-Intervallen auch noch technische Schwierigkeiten. So ist es zum Teil problematisch, wie von Day et al. (20) dargelegt, das genaue Ende der T-Welle exakt festzulegen. Die Bestimmungsmethode ist damit unter Umständen fehleranfälliger als andere Methoden.

4.5.2.2. Methodenvergleich

In unseren Versuchen haben wir beide Bestimmungsverfahren parallel verwendet. Für jedes Experiment wurden die normierten Messwerte für QT und ARI gegeneinander dargestellt. Betrachtet man diese Darstellung für alle Experimente zusammen, ergibt sich eine Steigung der Regressionsgeraden QT gegen ARI von 0,42. Nur in einem Experiment war die Steigung annähernd eins, wie es bei einer perfekten Übereinstimmung der Bestimmungsmethoden zu erwarten gewesen wäre. Zu erklären wäre dieser Befund zum einen damit, dass die Methoden wirklich unterschiedliche biologische Größen messen. Zum anderen wäre auch denkbar, dass zwar die gleiche biologische Größe erfasst wird, aber die räumlichen Bereiche, die Einfluss auf die Messung haben, bei beiden Methoden unterschiedlich groß sind. Da jedoch beide Bestimmungsmethoden in unseren Versuchen auffallend parallele Ergebnisse zeigten, ist es eher nahe liegend, dass sie die gleiche biologische Größe in unterschiedlichen Volumina erfassen.

Franz et al. (36) und Kondo et al. (49) haben bei der Verwendung von MAPs zur Messung der Aktionspotentialdauer darauf hingewiesen, dass mit den Elektroden immer das Potential vieler Zellen gleichzeitig und niemals nur von einer einzelnen gemessen wird. Auch wenn bei Verwendung von ARIs und QT-Intervallen das „field of view“ etwas kleiner ist als bei der klassischen Franz-Elektrode, bleibt es doch immer ein Summenpotential. ARIs und QT-Intervalle wurden zwar mit den gleichen Elektroden gemessen, jedoch ist vorstellbar, dass das Ende der T-Welle von der Repolarisation weiter entfernter Areale beeinflusst wird.

4.6. Ausblick

Durch unsere Experimente war es möglich, interessante Parallelen zwischen dem lokalen Fluss, der Aktionspotentialdauer und der Ionenkanalexpression aufzudecken. Die eigentliche Ursache für die Mikroheterogenität des Flusses ist hierdurch allerdings noch nicht identifiziert. Stellt man die Mikroheterogenität ins Zentrum der Betrachtung, gibt es im Prinzip zwei grundsätzlich verschiedene Erklärungsansätze: Entweder ist die Flussheterogenität als Ursache oder als Folge anderer lokaler Unterschiede anzusehen.

Betrachtet man die Flussheterogenität als Ursache, könnte sich der lokale Stoffwechsel, die Aktionspotentialdauer und die mechanische Funktion dem unterschiedlichen Fluss und damit auch dem Sauerstoffangebot angepasst haben. Bestimmt würde die Flussheterogenität dann durch anatomische Ursachen wie zum Beispiel dem Verzweigungsmuster des Gefäßbaumes. Dieser Erklärungsansatz wird von Pries et al. (60) in Ihrer kürzlich veröffentlichten Studie favorisiert, in der sie argumentieren, dass die vorhandene Gefäßheterogenität nicht vollständig durch lokale Anpassungsvorgänge des Gefäßtonus kompensiert werden kann. Einschränkend muss man sagen, dass sie ihre Modellberechnungen an Mesenterialgefäßen und Muskelgefäßen durchgeführt haben und somit evtl. eine nur eingeschränkte Vergleichbarkeit zu Herzmuskelgewebe besteht.

Die Flussheterogenität könnte jedoch auch die Folge einer Anpassung der Durchblutung an den jeweils unterschiedlichen Bedarf sein. Ursachen für den unterschiedlichen Bedarf könnten regionale Stoffwechselunterschiede oder allgemein die mechanische Funktion sein (6). Die Flussanpassung könnte dabei sowohl auf der Ebene des Gefäßtonus erfolgen, als auch vorher auf der Ebene der Angiogenese. Balaban et al. (5) machen aufgrund der diversen Heterogenitäten darauf aufmerksam, dass eine monokausale Erklärung der Heterogenität aber eher unwahrscheinlich ist.

In naher Zukunft wird sicherlich eine weitere Steigerung der Auflösung zur lokalen Flussmessung - beispielsweise mittels MRT - möglich sein. Interessant bleibt die Frage, bis zu welcher räumlichen Auflösung regional unterschiedliche Durchblutung nachzuweisen ist.

Neben den schon länger bekannten transmuralen Gradienten der Aktionspotentialdauer und Ionenkanalexpression ist unsere Beobachtung der intramuralen heterogenen Verteilung dieser Werte eine völlig neue Erkenntnis. Da die Mikroheterogenität des Flusses ein zumindest über Wochen stabiles Phänomen ist, wäre es interessant zu wissen, ob die regional unterschiedliche Verteilung der Aktionspotentialdauer ähnlich beständig ist. Wir konnten bisher nur eine Stabilität des Verteilungsmusters für rund 60 Minuten zeigen. Ein weiterer Aspekt wäre, ob sich die regionale Verteilung der Aktionspotentialdauer durch besondere Umstände, wie Blockierung der Erregungsleitung beeinflussen lässt.

Eng verknüpft mit dieser Frage ist die Überlegung, inwieweit regionale Unterschiede der Ionenkanalexpression und Aktionspotentialdauer die Empfindlichkeit des Herzens für Arrhythmien erhöhen. Wichtig wird es sein, diese Experimente an intakten Zellverbänden durchzuführen, um die Interaktion der Zellen nicht z.B. durch eine experimentelle Beeinträchtigung der Gap Junctions zu behindern.

Auch wenn die unterschiedliche regionale Verteilung nicht die alleinige Ursache von Arrhythmien ist, könnte sie einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Erregungsausbreitung haben. Somit könnte das Ausmaß der Heterogenität auch ein prognostischer Faktor für Arrhythmien sein.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res* 2003; 93(7):638-645.
- (2) Allessie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res* 1976; 39(2):168-177.
- (3) Antzelevitch C. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4):H2024-H2038.
- (4) Austin RE, Aldea GS, Coggins DL, Flynn AE, Hoffman JIE. Profound Spatial Heterogeneity of Coronary Reserve - Discordance Between Patterns of Resting and Maximal Myocardial Blood-Flow. *Circ Res* 1990; 67(2):319-331.
- (5) Balaban RS, Arai A. Function, metabolic, and flow heterogeneity of the heart - The view is getting better. *Circ Res* 2001; 88(3):265-267.
- (6) Bassingthwaite JB, King RB, Roger SA. Fractal nature of regional myocardial blood flow heterogeneity. *Circ Res* 1989; 65(3):578-590.
- (7) Bassingthwaite JB, Malone MA, Moffett TC, King RB, Chan IS, Link JM et al. Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. *Circ Res* 1990; 66(5):1328-1344.
- (8) Bassingthwaite JB, Yipintsoi T, Harvey RB. Microvasculature of the dog left ventricular myocardium. *Microvasc Res* 1974; 7(2):229-249.
- (9) Bauer A, Becker R, Karle C, Schreiner KD, Senges JC, Voss F et al. Effects of the I(Kr)-blocking agent dofetilide and of the I(Ks)-blocking agent chromanol 293b on regional disparity of left ventricular repolarization in the intact canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39(3):460-467.
- (10) Bauer WR, Hiller KH, Galuppo P, Neubauer S, Kopke J, Haase A et al. Fast high-resolution magnetic resonance imaging demonstrates fractality of myocardial perfusion in microscopic dimensions. *Circ Res* 2001; 88(3):340-346.
- (11) Bauman RP, Rembert JC, Greenfield JC, Jr. Regional blood flow in canine atria during exercise. *Am J Physiol* 1993; 265(2 Pt 2):H629-H632.
- (12) Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7:353-370.
- (13) Bishop SP, Powell PC, Hasebe N, Shen YT, Patrick TA, Hittinger L et al. Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(1):141-154.

- (14) Brahmajothi MV, Morales MJ, Reimer KA, Strauss HC. Regional localization of ERG, the channel protein responsible for the rapid component of the delayed rectifier, K⁺ current in the ferret heart. *Circ Res* 1997; 81(1):128-135.
- (15) Buckberg GD, Fixler DE, Archie JP, Hoffman JI. Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries. *Circ Res* 1972; 30(1):67-81.
- (16) Burton FL, Cobbe SM. Dispersion of ventricular repolarization and refractory period. *Cardiovasc Res* 2001; 50(1):10-23.
- (17) Chilian WM, Eastham CL, Marcus ML. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol* 1986; 251(4 Pt 2):H779-H788.
- (18) Colli FP, Pavarino LF, Scacchi S, Taccardi B. Modeling ventricular repolarization: effects of transmural and apex-to-base heterogeneities in action potential durations. *Math Biosci* 2008; 214(1-2):140-152.
- (19) Coronel R, de Bakker JM, Wilms-Schopman FJ, Opthof T, Linnenbank AC, Belterman CN et al. Monophasic action potentials and activation recovery intervals as measures of ventricular action potential duration: experimental evidence to resolve some controversies. *Heart Rhythm* 2006; 3(9):1043-1050.
- (20) Day CP, McComb JM, Campbell RW. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J* 1990; 63(6):342-344.
- (21) Dean JW, Lab MJ. Regional changes in ventricular excitability during load manipulation of the in situ pig heart. *J Physiol* 1990; 429:387-400.
- (22) Decking UK. Spatial heterogeneity in the heart: recent insights and open questions. *News Physiol Sci* 2002; 17:246-250.
- (23) Decking UK, Pai VM, Bennett E, Taylor JL, Fingas CD, Zanger K et al. High-resolution imaging reveals a limit in spatial resolution of blood flow measurements by microspheres. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(3):H1132-H1140.
- (24) Decking UK, Schrader J. Spatial heterogeneity of myocardial perfusion and metabolism. *Basic Res Cardiol* 1998; 93(6):439-445.
- (25) Decking UK, Schrader J. [Spatial heterogeneity of myocardial circulation and energy metabolism]. *Z Kardiol* 2001; 90(12):970-977.
- (26) Decking UK, Skwirba S, Zimmermann MF, Preckel B, Thamer V, Deussen A et al. Spatial heterogeneity of energy turnover in the heart. *Pflugers Arch* 2001; 441(5):663-673.
- (27) Deschenes I, DiSilvestre D, Juang GJ, Wu RC, An WF, Tomaselli GF. Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I_(to)? *Circ* 2002; 106(4):423-429.
- (28) Deussen A. Blood flow heterogeneity in the heart. *Basic Res Cardiol* 1998; 93(6):430-438.

- (29) Deussen A, Flesche CW, Lauer T, Sonntag M, Schrader J. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pflugers Arch* 1996; 432(3):451-461.
- (30) Deussen A, Lauer T, Loncar R, Kropp J. Heterogeneity of metabolic parameters in the left ventricular myocardium and its relation to local blood flow. *Basic Res Cardiol* 2001; 96(6):564-574.
- (31) Deussen A, Sonntag M, Flesche CW, Vogel RM. Minimal effects of nitric oxide on spatial blood flow heterogeneity of the dog heart. *Pflugers Arch* 1997; 433(6):727-734.
- (32) Dhein S, Krusemann K, Schaefer T. Effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid on the activation and repolarization wavefronts in isolated rabbit hearts. *Br J Pharmacol* 1999; 128(7):1375-1384.
- (33) Duncker DJ, Ishibashi Y, Bache RJ. Effect of treadmill exercise on transmural distribution of blood flow in hypertrophied left ventricle. *Am J Physiol* 1998; 275(4 Pt 2):H1274-H1282.
- (34) Feigl EO. Coronary physiology. *Physiol Rev* 1983; 63(1):1-205.
- (35) Franz MR, Bargheer K, Rafflenbeul W, Haverich A, Lichtlen PR. Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T wave. *Circ* 1987; 75(2):379-386.
- (36) Franz MR, Burkhoff D, Spurgeon H, Weisfeldt ML, Lakatta EG. In vitro validation of a new cardiac catheter technique for recording monophasic action potentials. *Eur Heart J* 1986; 7(1):34-41.
- (37) Glenn RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74(5):2585-2597.
- (38) Gomez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C. Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 2):H1078-H1086.
- (39) Groeneveld AB, Visser FC. Correlation of heterogeneous blood flow and fatty acid uptake in the normal dog heart. *Basic Res Cardiol* 1993; 88(3):223-232.
- (40) Hamlin RL, Levesque MJ, Kittleson MD. Intramyocardial pressure and distribution of coronary blood flow during systole and diastole in the horse. *Cardiovasc Res* 1982; 16(5):256-262.
- (41) Haws CW, Lux RL. Correlation between in vivo transmembrane action potential durations and activation-recovery intervals from electrograms. Effects of interventions that alter repolarization time. *Circ* 1990; 81(1):281-288.
- (42) Hittinger L, Mirsky I, Shen YT, Patrick TA, Bishop SP, Vatner SF. Hemodynamic mechanisms responsible for reduced subendocardial coronary reserve in dogs with severe left ventricular hypertrophy. *Circ* 1995; 92(4):978-986.
- (43) Hodges M. Rate Correction of the QT Intervall. *Card Electrophysiol Rev* 1997; 3:360-363.

- (44) Hoffman JI. Heterogeneity of myocardial blood flow. *Basic Res Cardiol* 1995; 90(2):103-111.
- (45) Iwata H, Kodama I, Suzuki R, Kamiya K, Toyama J. Effects of long-term oral administration of amiodarone on the ventricular repolarization of rabbit hearts. *Jpn Circ J* 1996; 60(9):662-672.
- (46) Kanai A, Salama G. Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. *Circ Res* 1995; 77(4):784-802.
- (47) Kassab GS, Rider CA, Tang NJ, Fung YC. Morphometry of pig coronary arterial trees. *Am J Physiol* 1993; 265(1 Pt 2):H350-H365.
- (48) King RB, Bassingthwaite JB, Hales JR, Rowell LB. Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons. *Circ Res* 1985; 57(2):285-295.
- (49) Kondo M, Nesterenko V, Antzelevitch C. Cellular basis for the monophasic action potential. Which electrode is the recording electrode? *Cardiovasc Res* 2004; 63(4):635-644.
- (50) Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R et al. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circ* 1991; 83(3):974-982.
- (51) Kuo CS, Munakata K, Reddy CP, Surawicz B. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circ* 1983; 67(6):1356-1367.
- (52) Laussmann T, Janosi RA, Fingas CD, Schlieper GR, Schlack W, Schrader J et al. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. *FASEB J* 2002; 16(6):628-630.
- (53) Loncar R, Flesche CW, Deussen A. Coronary reserve of high- and low-flow regions in the dog heart left ventricle. *Circ* 1998; 98(3):262-270.
- (54) Lux RL, Fuller MS, MacLeod RS, Ershler PR, Green LS, Taccardi B. QT interval dispersion: dispersion of ventricular repolarization or dispersion of QT interval? *J Electrocardiol* 1998; 30 Suppl:176-180.
- (55) Millar CK, Kralios FA, Lux RL. Correlation Between Refractory Periods and Activation-Recovery Intervals from Electrograms - Effects of Rate and Adrenergic Interventions. *Circ* 1985; 72(6):1372-1379.
- (56) Mounsey JP, DiMarco JP. Cardiovascular drugs. Dofetilide. *Circ* 2000; 102(21):2665-2670.
- (57) Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; 85(4):1205-1253.
- (58) Obreztkhikova MN, Patberg KW, Plotnikov AN, Ozgen N, Shlapakova IN, Rybin AV et al. I(Kr) contributes to the altered ventricular repolarization that determines long-term cardiac memory. *Cardiovasc Res* 2006; 71(1):88-96.

- (59) Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(6):H1908-H1915.
- (60) Pries AR, Secomb TW. Origins of heterogeneity in tissue perfusion and metabolism. *Cardiovasc Res* 2009; 81(2):328-335.
- (61) Prinzen FW, Bassingthwaight JB. Blood flow distributions by microsphere deposition methods. *Cardiovasc Res* 2000; 45(1):13-21.
- (62) Ramanathan C, Jia P, Ghanem R, Ryu K, Rudy Y. Activation and repolarization of the normal human heart under complete physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(16):6309-6314.
- (63) Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE et al. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001; 533(Pt 1):119-125.
- (64) Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res* 1967; 21(2):163-184.
- (65) Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; 90(9):939-950.
- (66) Schwanke U, Deussen A, Heusch G, Schipke JD. Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(3):H1029-H1035.
- (67) Sonntag M, Deussen A, Schultz J, Loncar R, Hort W, Schrader J. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity. *Pflugers Arch* 1996; 432(3):439-450.
- (68) Tanaka A, Mori H, Tanaka E, Mohammed MU, Tanaka Y, Sekka T et al. Branching patterns of intramural coronary vessels determined by microangiography using synchrotron radiation. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 2):H2262-H2267.
- (69) Van Beek JH, Roger SA, Bassingthwaight JB. Regional myocardial flow heterogeneity explained with fractal networks. *Am J Physiol* 1989; 257(5 Pt 2):H1670-H1680.
- (70) Van de Water A, Verheyen J, Xhonneux R, Reneman RS. An improved method to correct the QT interval of the electrocardiogram for changes in heart rate. *J Pharmacol Methods* 1989; 22(3):207-217.
- (71) van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S, Glenn RW, Hales JR. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 2):H110-H115.
- (72) Vandervusse GJ, Arts T, Glatz JFC, Reneman RS. Transmural Differences in Energy-Metabolism of the Left-Ventricular Myocardium - Fact Or Fiction. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22(1):23-37.

- (73) Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of IKr and IKs heterogeneity on action potential duration and its rate dependence: a simulation study. *Circ* 1999; 99(18):2466-2474.
- (74) Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RL, Wellens HJ, Vos MA. Repolarizing K⁺ currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circ* 1999; 99(2):206-210.
- (75) Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res* 1983; 52(3):280-290.
- (76) Weiss HR, Neubauer JA, Lipp JA, Sinha AK. Quantitative determination of regional oxygen consumption in the dog heart. *Circ Res* 1978; 42(3):394-401.
- (77) Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994; 75(3):473-482.
- (78) Wilke N, Jerosch-Herold M, Wang Y, Huang Y, Christensen BV, Stillman AE et al. Myocardial perfusion reserve: assessment with multisection, quantitative, first-pass MR imaging. *Radiology* 1997; 204(2):373-384.
- (79) Yipintsoi T, Dobbs WA, Jr., Scanlon PD, Knopp TJ, Bassingthwaite JB. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. *Circ Res* 1973; 33(5):573-587.
- (80) Yue AM, Paisey JR, Robinson S, Betts TR, Roberts PR, Morgan JM. Determination of human ventricular repolarization by noncontact mapping: validation with monophasic action potential recordings. *Circ* 2004; 110(11):1343-1350.
- (81) Zhang J, Shorr L, Yoshiyama M, Merkle H, Garwood M, Homans DC et al. Hyperperfusion and cardioplegia effects on myocardial high-energy phosphate distribution and energy expenditure. *Am J Physiol* 1994; 267(3 Pt 2):H894-H904.
- (82) Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A et al. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004; 561(Pt 3):735-748.

6. Danksagungen

Herrn Professor Dr. Jürgen Schrader möchte ich zunächst herzlich für die Möglichkeit danken, dass ich meine experimentelle Doktorarbeit in seinem Institut durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Ulrich Decking. In jeder Phase der Experimente und der Doktorarbeit wurde ich von ihm exzellent betreut. Besonders geschätzt habe ich die zahlreichen fachlichen Gespräche, die auch über das eigentliche Thema hinausgingen. Sein besonderes Engagement in Lehre und Forschung wird mir unvergessen bleiben und meinen weiteren Lebensweg prägen.

Herrn Professor em. Dr. Thämer möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei den operativen Schritten der Experimente danken und für seine Bereitschaft, hier immer noch mitzuwirken.

Frau Dr. Marion Stoll möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit, insbesondere bei den biochemischen Analysen und für die Unterstützung zu Beginn des Verfassens der Doktorarbeit herzlich danken.

Frau Daniela Haubs und Herren Andrej Molojavyi, Dr. Gerald Große und Dr. Artsiom Verner danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Quentin
Geburtsdatum und -ort: 15.05.1979 in Neuss

Schulbildung

08/1985 – 06/1998 St.-Peter-Grundschule Neuss-Rosellen und
Gymnasium Norf in Neuss; Abschluss Abitur

Zivildienst

07/1998 – 07/1999 Deutsches Rotes Kreuz in Neuss Krankentransport/ Rettungsdienst
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Berufsausbildung

08/1999 – 06/2001 Westdeutsche Landesbank (WestLB) in Düsseldorf;
Abschluss Bankkaufmann

Arbeitsverhältnis

07/2001 – 10/2001 Konzerninformationsmanagement (EDV Abteilung) bei
der Westdeutschen Landesbank

03/2009 – jetzt Institut für Radiologie, Universitätsklinik Düsseldorf

Auslandsaufenthalt

12/2001 – 07/2002 Südamerika

Studium

10/2002 – 12/2008 Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf;
erstes Staatsexamen 09/2004;
zweites Staatsexamen 11/2008

Neuss, den 08.12.2009

8. Zusammenfassung

Das makroskopisch homogen erscheinende Organ Herz zeichnet sich durch erhebliche regionale Unterschiede aus. Neben einem transmuralen Flussgradienten vom Subendo- zum Subepikard existiert eine sehr viel größere räumliche Heterogenität des Flusses - die so genannte Mikroheterogenität. Bei einer Auflösung von ca. 300 μ l erhalten rund 1 / 10 aller Areale weniger als 50 % (Niedrigflussareale) bzw. mehr als 150 % (Hochflussareale) der durchschnittlichen Durchblutung. Diese Mikroheterogenität ist über Wochen stabil. Die Flussunterschiede stellen keineswegs eine Minder- bzw. Luxusperfusion dar, sondern spiegeln den tatsächlichen Bedarf wieder. Auf der Ebene der Aktionspotentialdauer (APD) konnten bisher nur Unterschiede zwischen dem linken und rechten Herzen und zwischen der Herzbasis und Herzspitze beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf intramurale Unterschiede in der freien Wand des linken Ventrikels. Die zentrale Fragestellung lautet: Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem lokalen Fluss, der Aktionspotentialdauer und der, die APD wesentlich beeinflussenden, Kaliumkanal-Expression?

Mit Hilfe von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären beobachteten wir bei einer Auflösung von etwa 300 μ l eine zeitlich stabile Fluss-Mikroheterogenität. In Niedrigflussarealen konnten wir schichtunabhängig eine 3,3-fach erhöhte *ERG*-Expression und eine 2,5-fach erhöhte *KChIP2*-Expression im Vergleich zu Hochflussarealen zeigen. Mit einem Computermodell unter der Cellular Open Resource (COR)-Umgebung war es möglich, das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle zu simulieren und so die Aktionspotentialdauer vorherzusagen. Modulation der Leitfähigkeit der Ionenkanäle im Computermodell entsprechend der gemessenen Kaliumkanal-Expression führte zu einer kürzeren Aktionspotentialdauer in Niedrigflussarealen.

Mit einem über das schlagende Herz gezogenen Ableitungsstrumpf konnten wir erstmals mit hoher Auflösung eine räumlich sehr heterogene, zeitlich stabile Verteilung der APD am Herzen direkt messen. Wie durch das Computermodell vorhergesagt, führte die Gabe des *ERG*-Blockers Dofetilide zu einer signifikant größeren Verlängerung der APD in Arealen mit einer basal kurzen APD im Vergleich mit basal langen Arealen. Zu einer generellen Homogenisierung der APD durch die Dofetilidegabe kam es jedoch nicht. Über alle Versuche gemittelt, führte die Dofetilidegabe vor allem in Niedrigflussarealen nur zu einem moderaten Flussanstieg. Durch selektiv entnommene Biopsien konnten wir eine 3-fach erhöhte Expression von *ERG* in Arealen mit basal kurzer APD nachweisen. Weiterhin war im Vergleich zu Arealen mit basal langer APD ein Trend zu einer stärkeren Expression von *KChIP2* zu beobachten.

Damit besteht neben der schon länger bekannten Mikroheterogenität des Flusses auch eine zeitlich stabile heterogene Verteilung der APD. Niedrigflussareale weisen eine höhere Kalium-Kanal-Expression (*ERG* und *KChIP2*) auf und haben somit auch eine kürzere APD. Umgekehrt haben Areale mit basal kurzer APD eine höhere Kalium-Kanal-Expression als Areale mit basal langer APD. Es liegt daher nahe, dass es sich bei Arealen mit basal kurzer APD auch tatsächlich um Niedrigflussareale handelt.

Die hier gezeigte räumliche Heterogenität der Aktionspotentialdauer mag vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen (z.B. Ischämie) klinische Bedeutung erlangen und evtl. sogar ein prognostischer Faktor für Arrhythmien sein. Mit zunehmend besseren Messmethoden - beispielsweise mittels MRT - wird zudem die Frage interessant sein, bis zu welcher Auflösung die Mikroheterogenität des Flusses nachgewiesen werden kann.