Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Leiter : Prof. Dr. K. Schrör)

Elektrophysiologische Untersuchungen zur kalziumantagonistischen Wirkung des T-Kanal-Blockers Mibefradil am Ventrikelmyokard des Meerschweinchens

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Olaf Brauser

2002

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.
Dekan

Referent : Prof. Dr. Dr. Borchard

Korreferent : Univ.-Prof. Dr. Thämer

Meinen lieben Eltern gewidmet

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Juli 1999 am Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. Dr. U. Borchard angefertigt. Für die Vergabe des Themas und die Betreuung möchte ich ihm danken.
Die Einführung und Arbeit am Meßplatz wurde durch die technischen Assistentinnen Frau Renate Gelhaar und insbesondere durch Frau Karin Stöcker ermöglicht. Herr Ing. grad. J. Springer sorgte regelmäßig für die Instandhaltung der Oszillographen und die speziellen Meßschaltungen.
Besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. D. Hafner, der mich vor allem bei der Interpretation der Ergebnisse und Diskussion half.

Inhalt

1. Einleitung 3

2. Material und Methoden 7

2.1 Präparation und Versuchsvorbereitung 7
2.2 Versuchsablauf 11
2.3 Verwendete Substanzen 13

2.4 Datenerfassung und Auswertung 15
2.4.1 „slow-response“ Kontroll-Versuche 15
2.4.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen 16
2.4.3 Frequenzabhängigkeit 16
2.4.4 Doppelreiz-Versuche 17
2.4.5 Post-Pause-Versuche 18

3. Ergebnisse 19

3.1 „slow-response“ Kontroll-Versuche 19

3.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen 21
3.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Muskel von Verapamil 21
3.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Muskel von Mibefradil 26

3.3 Frequenzabhängigkeit 31
3.3.1 Frequenzabhängigkeit der Aktionspotentialparameter unter Verapamil . . 31
3.3.2 Frequenzabhängigkeit der Aktionspotentialparameter unter Mibefradil . . 35

3.4 Doppelreiz-Versuche unter Verapamil und Mibefradil 38

3.5 Post-Pause-Versuche 44
3.5.1 Post-Pause-Versuche unter Verapamil 45
3.5.2 Post-Pause-Versuche unter Mibefradil 47

4. Diskussion 49

5. Abkürzungsverzeichnis 58

6. Literatur 59

Anhang

1. Einleitung

Seit Jahren stehen in der Bundesrepublik Deutschland und in anderen Industrieländern kardiovaskuläre Erkrankungen als häufigste Todesursache vor den bösartigen Erkrankungen an erster Stelle (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Zahlen für 1998) . Für die Therapie der koronaren Herzkrankheit mit ihrem Leitsymptom Angina pectoris, der Hypertonie und der supraventrikulären bzw. ventrikulären Herzrhythmusstörungen wurden verschiedene pharmakologische Wege beschritten.
In der Pharmakotherapie dieser Erkrankungen nimmt die durch Albert Fleckenstein 1967 eingeführte Gruppe der Kalziumantagonisten (synonym Ca^{2+}-Kanal-Blocker, slow-channel-Inhibitoren) ihren festen Platz ein. Diese Substanzen entfalten ihre Wirkung durch die Hemmung des langsamen transmembranären Ca^{2+}-Einstroms, indem sie an dem L-Typ-Ca^{2+}-Kanal der Membran von Herzmuskelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen binden. Insgesamt unterscheidet man vier spannungsabhängige Calciumkanäle (VOCC –Typen = voltage operated calcium channel) : den L-, T-, P- und N-Ca^{2+}-Kanal. Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ vermitteln am Arbeitsmyokard des Herzmuskels die elektromechanische Kopplung und am Erregungsleitungssystem die Erregungsbildung und -weiterleitung. Darüber hinaus findet man L-Ca^{2+}-Kanäle in nahezu allen erregbaren Geweben (Borchard U, 1993).
Nach der alten WHO-Klassifikation (Opie LH et al., 1987) lassen sich Kalzium-antagonisten in die Gruppe A der starken, spezifischen, in Gruppe B, der schwachen, unspezifischen, sowie Gruppe C der nichtspezifischen Kalziumantagonisten unterteilen. Zur klinisch bedeutsamen Gruppe A gehören die Phenylalkylaminderivate (Verapamil-Typ), die Benzothiazepine (Diltiazem-Typ) und Dihydropyridine (Nifedipin-Typ). Aufgrund der Tatsache, daß Kalziumantagonisten in deutlich geringeren Konzentrationen an Zellen des kardialen Erregungsleitungssystems und der glatten Muskulatur wirksam sind als am Arbeitsmyokard, finden sie in erster Linie Anwendung als Antiarrhythmika und/oder Vasodilatatoren (Bernink PJ et al., 1996), wobei sich die Substanztypen hinsichtlich ihres Wirkortes unterscheiden : Verapamil z.B., wirkt bevorzugt auf den AV-Knoten und wird deshalb zur Therapie der supraventrikulären Arrhythmien eingesetzt, während z.B. Nifedipin an glatten Gefäßmuskelzellen eine periphere Vasodilatation hervorruft.

Kalziumantagonisten sollten bei Patienten mit Herzinsuffizienz und instabiler Angina pectoris nicht angewendet werden, da sie mehr oder weniger stark negativ inotrop sind und bei rasch eintretender Gefäßerweiterung eine Reflexaktivierung des Sympathikus auslösen können. Ausnahmen bilden neuere Kalziumantagonisten wie z.B. Amlodipin (Norvasc®), welches bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie nicht von Nachteil ist. Die Kombination mit z.B. Nitraten (Vorlastsenkung) kann durch die periphere Vasodilatation (Nachlastsenkung) zu überschießenden Blutdruckabfällen führen und ist ebenfalls kontraindiziert. Kalziumantagonisten vom Verapamil-Typ können aufgrund ihres negativ dromotropen Effektes zu AV-Block zweiten oder sogar dritten Grades führen. Darüber hinaus wurden proischämische Effekte, prohämorrhagische und proarrhythmische Wirkungen beschrieben (Cremers B und Böhm M, 1997).

Die Entwicklung von Kalziumantagonisten mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil und einer höheren Bioverfügbarkeit führte zur Synthese von Mibefradil (Ro 40-5967, synthetisiert von Dr. F. Marti, Hoffmann - la Roche Ltd., Basel), eine Substanz, welche als selektiver T-Ca^{2+}-Kanal-Blocker beschrieben wird (Mishra SK und Hermsmeyer K, 1994; Sarsero D et al., 1998). Die Rolle der T-Ca^{2+}-Kanäle ist noch nicht ausreichend geklärt. T-Ca^{2+}-Kanäle wurden 1984 von Carbone E. und Lux H. D. entdeckt und wurden in den Schrittmacher-Zellen des Sinusknotens und der Purkinje-Fasern (Bean BP, 1989), sowie in spontan aktiven glatten Gefäßmuskelzellen gefunden (Hermsmeyer K, 1991). Ebenso könnten sie eine Schlüsselrolle bei der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen einnehmen (Richard S et al., 1992).
Das Fehlen von T-Ca^{2+}-Kanal-vermittelten Strömen im Arbeitsmyokard deutet auf eine untergeordnete Rolle für die Ventrikelkontraktion bzw. die Herzarbeit hin. Der T-Ca^{2+}-Kanal wird bei negativeren Membranpotentialen aktiviert („low voltage activation“) als der L-Ca^{2+}-Kanal und inaktiviert schneller („transient-opening“).
Nach der alten WHO-Klassifikation für Kalziumantagonisten (Opie LH et al., 1987) konnte Mibefradil keinem der 3 Typen von Kalziumantagonisten zugeordnet werden,

wird als „non-dihydropyridine“ bezeichnet und entspricht seiner chemischen Abstammung nach einem substituierten Tetralin-Derivat (Bühler FR et al., 1996).
Dies findet bei der neuen ATC-Klassifizierung der WHO für Kalziumantagonisten seine Berücksichtigung (Skrbo A et al., 1999). In klinischen Studien konnten die gute Verträglichkeit und klinische Wirksamkeit gezeigt werden. Beim Vergleich mit anderen Kalziumantagonisten (Amlodipin, Nifedipin) verlängerte Mibefradil bei KHK-Patienten unter körperlicher Belastung die Zeit bis zum Auftreten pectanginöser Beschwerden und Ischämien und führte zu einer dosisabhängigen Senkung des Blutdrucks in gleichem oder sogar günstigerem Ausmaß (Bakx AL et al., 1995). Mibefradil zeigte im therapeutischen Dosisbereich nahezu keine negativ inotropen Effekte (Brogden RN und Markham A, 1997).
Die Elimination von Mibefradil geschieht hauptsächlich hepatisch und nur zu geringen Anteilen auf renalem Wege.
Mibefradil wurde in der antihypertensiven und antipectanginösen Therapie eingesetzt und in der Bundesrepublik Deutschland im Herbst 1997 erstmals unter den Handelsnamen Posicor® und Cerate® auf dem Markt zugelassen.
Im Juni 1998 wurde Mibefradil wegen Interaktionen mit dem Cytochrom-P_{450}-System der Leber wieder vom Markt genommen. Beispielsweise kam es bei nierentransplantierten Patienten zu einer 2 – 3 fachen Erhöhung des Plasmaspiegels der immunsupprimierend wirkenden Substanz Ciclosporin.
Trotz zahlreicher präklinischer Studien ist nach wie vor noch nicht ausreichend geklärt, ob es sich bei Mibefradil tatsächlich um eine vollkommen neuartige Substanz mit spezifischer T-Ca^{2+}-Kanal-Blockade handelt oder ob die beobachteten pharmakodynamischen Wirkungen zumindest zum Teil auf die Blockierung von Ca^{2+}-Kanälen des L-Typs zurückzuführen sind (Bernink PJ et al., 1996), zumal die Substanz ausgehend von der Verapamil-Struktur entwickelt wurde.
Untersuchungen der Molekül-Struktur (Molecular-Modeling-Verfahren) weisen hinsichtlich der räumlichen Ausdehnung, Elektronenverteilung und Van-der-Waals-Wechselwirkung auf potentiell gleichartige Wirkmechanismen hin wie z.B. beim bereits lange bekannten L-Ca^{2+}-Kanal-Blocker Verapamil (Höltje HD und Jessen G, 1998) .

Daher stellt sich die Frage, ob sich Mibefradil und Kalziumantagonisten vom Verapamil-Typ in ihren pharmakodynamischen Eigenschaften grundlegend unterscheiden.
Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit mittels elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden der Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf die Aktionspotentialparameter von Präparaten rechtsventrikulärer Meerschweinchen-Papillarmuskeln untersucht. Hierzu dienten folgende Versuchsansätze :

1. Änderung der Aktionspotentialparameter V_{max} (maximale Aufstrichgeschwindigkeit), APD (Aktionspotentialdauer) und Amplitude bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen und Dosierungen unter den Bedingungen der „slow response“.
2. Einfluß von vorzeitig einfallenden Testreizen während einer periodischen elektrischen Stimulation auf den Parameter V_{max} unter Bedingungen der „slow response“ („Doppelreiz-Versuche“).
3. Das Verhalten der unter 1. genannten Parameter der „slow response“ nach Einwirken der Substanz im Ruhezustand der Membran und anschließender Wiederaufnahme der Reizung („Post-Pause-Versuche“)

Die Änderung der Reizfrequenz unter Punkt 1 ermöglicht Aussagen über eine frequenzabhängige Wirkung der Substanzen („use-dependence“) auf die Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ.
Mit den unter Punkt 2 aufgeführten Doppelreiz-Versuchen kann der Einfluß der Substanz auf das transiente refraktäre Verhalten der Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ im Anschluss an eine reizbedingte Inaktivierung untersucht werden. Die Versuche geben somit Auskunft über die zeitabhängige Wiedererholung der Kanäle („recovery from inactivation“) zwischen 2 Reizen.
Die unter Punkt 3 aufgeführten „Post-Pause-Versuche“ sollen die Frage beantworten helfen, ob die Substanzen hinsichtlich ihrer Bindung verschiedene Zustände des Kanals (z.B. „rested state“ oder „inactivated state“) bevorzugen.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation und Versuchsvorbereitung

Die Experimente wurden an rechtsventrikulären Papillarmuskeln des Meerschweinchens durchgeführt. Insgesamt wurden 58 Herzen für die Experimente benötigt, von denen 52 auswertbare Ergebnisse lieferten.

Die Präparation erfolgte unter Raumtemperatur. Die Tiere waren zwischen 300 und 450 g schwer und wurden durch Genickschlag getötet. Die Arteria carotis communis wurde sofort beiderseits durchtrennt, anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz vorsichtig freigelegt. Um eine Thrombenbildung um die Papillarmuskeln herum zu vermeiden und die Orientierung bei der Präparation zu erleichtern, wurde der linke Ventrikel eingeschnitten. Die großen Gefäße wurden unmittelbar hinter der Austrittstelle des Herzens durchtrennt und das Herz dem Thorax entnommen. Das Herz wurde dann in einer Wanne, welche eine mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) kontinuierlich begaste modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung enthielt (Zusammensetzung s. Tabelle 1), von der septumnahen Basis der Mitralklappe in Richtung Herzspitze aufgeschnitten und einer der rechtsventrikulären Papillarmuskeln vorsichtig herauspräpariert. Die durchschnittliche Länge der Papillarmuskeln betrug etwa 2 – 5 mm, der Durchmesser ca. 1mm. An der Basis des Muskels wurde ein kleiner Teil des Ventrikelmyokards belassen, um als Widerlager in einer Öse im Perfusionsbad befestigt zu werden. Am anderen Ende wurden die Sehnenfäden genutzt, um das Muskelpräparat am Haken des Kraftmessers (s. Abb. 2) zu befestigen. Vor jedem Versuch wurde der Kraftaufnehmer mit Hilfe eines genau definierten Gewichtes (5 mN) neu geeicht. Die kontinuierliche Aufzeichnung der isometrischen Kraftentwicklung erfolgte auf einem Papierschreiber.

Die Perfusionskammer wurde mittels einer Rollenpumpe mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 10ml/min durchspült. Dem Badzufluß wurde ein Wärmeaustauscher, angeschlossen an einen Thermostaten, vorgeschaltet und die Temperatur mit einem elektronischen Thermometer kontinuierlich überwacht. Sie wurde während aller Versuche auf 31°C eingestellt.

Tabelle 1

Nährlösung, Zusammensetzung
(modifiziert nach KREBS & HENSELEIT 1932)
Ionenkonzentrationen angegeben in mmol/l :

NaCl	118.5	NaH_2PO_4	1.2
KCl	4.7	$NaHCO_3$	25.0
$MgSO_4$	1.2	Glucose	10.1
$CaCl_2$	1.8	Pyruvat	2.0

kontinuierliche Begasung mit Carbogen (Normoxie) : 95% O_2, 5% CO_2

pH-Wert der Lösung :	7.4
Temperatur :	31°C
gesamtes zirkulierendes Badvolumen :	100 ml
Perfusionsrate :	10 ml/min

Einstellung der K^+-Konzentration für „slow responses“ :
$[KCl]_o$ = 27 mmol/l

Tabelle 2

Verwendete Geräte und deren Hersteller

Perfusionsbad	Eigenbau der feinmechanischen Werkstatt : Pharmakologisches Institut, H.- H.-Universität Düsseldorf
Mikroskop	Wild M7A, Heerbrugg, Schweiz
Rollenpumpe	Modell VRX 200, Verder, Düsseldorf
Thermostat	Colora Meßtechnik GmbH, Lorch/Württ.
Thermometer	Yellow Springs Instrument Co. USA
Mikroglaselektrodenziehgerät	Model 819, Hugo Sachs, March/Württ.
Mikromanipulator	Ernst Leitz, Wetzlar
Reizgenerator	Eigenbau : Ing. grad. H. J. Springer Pharmakologisches Institut, H.- H.-U. Düsseldorf
Elektrodenhalter	Eigenbau der feinmechanischen Werkstatt des pharmakologischen Instituts der H.- H.-Universität Düsseldorf
Meßverstärker	Model KS 700, Dual Microprobe System, WP-Instruments Inc., New Haven, USA
Kraftmesser	Statham UC II, Gould Advance Inc., Cleveland, USA
Differentiationsmodul	Eigenbau : Ing. grad. H. J. Springer Pharmakologisches Institut, H.- H.-Universität Düsseldorf
Analoges Speicheroszilloskop	Modell 5A18N, Tektronix Inc., USA
Digitale Speicheroszilloskope	Nicolet 310, Nicolet Instrument Corp., USA Modell OS 4000, Gould Advance Inc., Cleveland, USA
Papierschreiber	Recomed, Hellige, Freiburg i. Br., BRD
Auswertungscomputer	Compaq 386/25 Deskpro AMD K6-2 350 MHz, Comtech

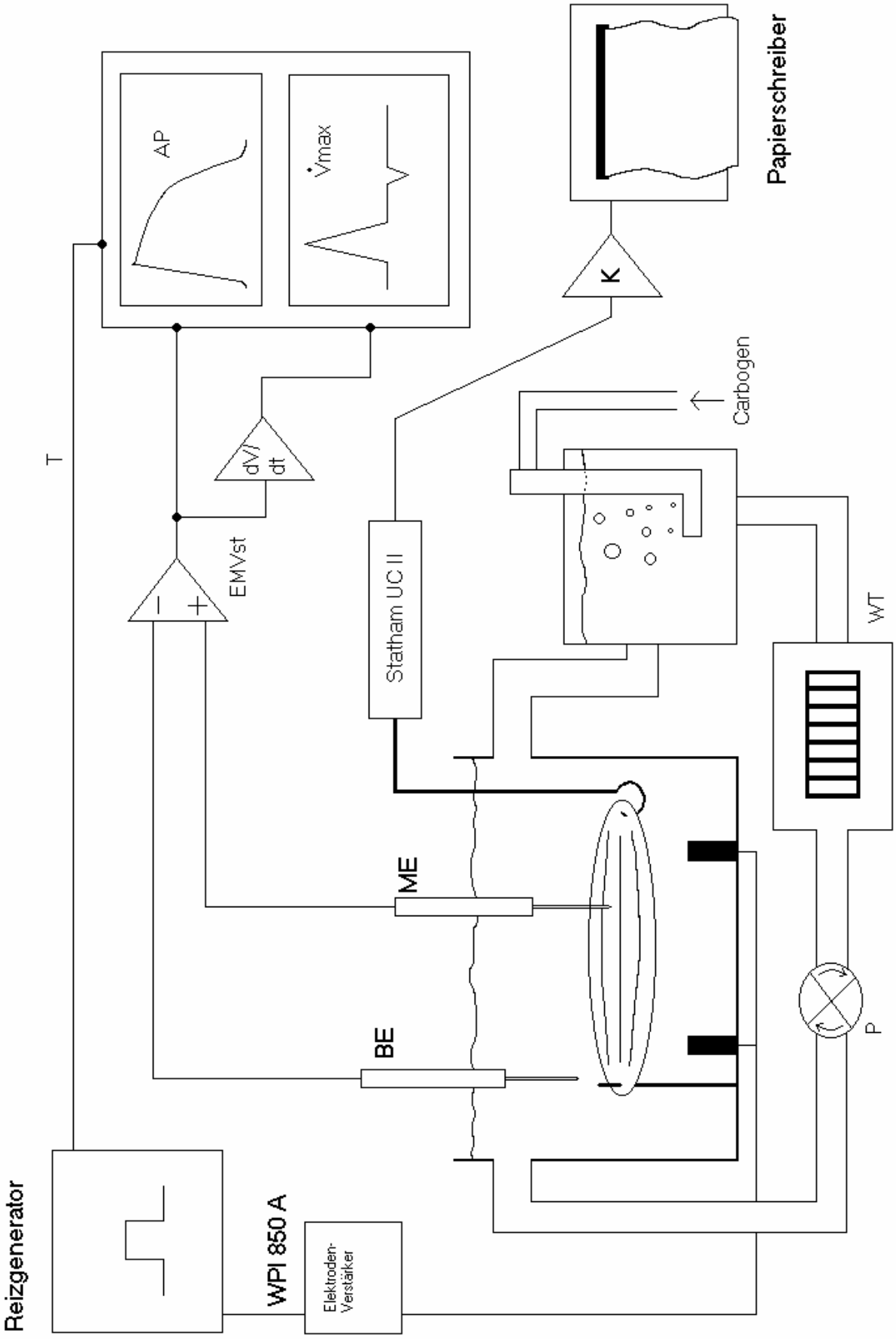

Reizgenerator
WPI 850 A
Elektroden-Verstärker
T
AP
Vmax
Papierschreiber
K
dV/dt
EMVst
Statham UC II
Carbogen
ME
BE
WT
P

Abb. 1

Legende zu ***Abb. 1***
Skizze der Versuchsanordnung: Das Herzmuskelpräparat wird in einem Plexiglas-Bad in temperierter und oxigenierter modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung so gegen einen Kraftaufnehmer eingespannt, daß es sich bei elektrischer Reizung isometrisch kontrahiert. Die Registrierung der Aktionspotentiale erfolgt über eine Glasmikroelektrode aus einer einzelnen Herzmuskelzelle gegen eine Referenzelektrode (Badelektrode) im Außenmedium (Einzelheiten siehe Methode)

AP = Aktionspotential
BE = Badelektrode
EMVst = Elektrometerverstärker
K = Kraftverstärker
ME = Meßelektrode
P = Rollenpumpe
T = Trigger
V_{max} = maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (dV/dt_{max})
WT = Wärmetauscher
WPI 850 A = Elektrodenverstärker

Die verwendeten Geräte und deren Hersteller sind in Tab. 2 beschrieben.

Eine Übersicht über die Versuchsanordnung zeigt Abb. 1.

Mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes wurden unter Wahl der geeigneten Heizspannung (in der Regel 48 V) aus Borsilikatglasröhrchen mit einem Durchmesser von ca. 1,5 mm die Ableitelektroden hergestellt (Purves RD, 1980). Die ausgezogenen Glasmikroelektroden wurden durch Eintauchen in eine 3M KCl-Lösung vollständig gefüllt und anschließend vorsichtig auf den Elektrodenhalter gesteckt. Das Lumen der Elektroden war über einen chlorierten Silberdraht mit dem Signaleingang des Verstärkers verbunden. Mit Hilfe eines Teststromes wurde vor jedem Einstich der elektrische Widerstand der Glasmikroelektroden durch den Meßverstärker kontrolliert. Es wurden nur Elektroden mit einem Widerstand zwischen 10 – 20 MΩ verwendet.

2.2. Versuchsablauf

Nach der Fixierung des Präparates in der Versuchshalterung der Perfusionskammer wurde der Papillarmuskel über den Kraftmesser auf 5 mN vorgespannt. Die elektrische Stimulation erfolgte mittels Rechtecksimpulsen. Die Reizspannung lag zunächst zwischen 0,3 – 0,9 V, die Reizdauer betrug anfangs 1 ms.

Nach einer Adaptationszeit von mindestens 60 Minuten, bei kontinuierlicher Stimulation mit einer Reizfrequenz von 1Hz, wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators die Elektrode über dem Präparat plaziert. Der Einstich erfolgte unter Aufsuchen eines stabilen Aktionspotentials unter den Bedingungen der „fast response“, d.h. die K^+-Konzentration lag bei 4,7 mmol/l, so daß der schnelle Na^+-Kanal noch aktivierbar war. Die Messung der Membranspannung über einen Elektrometerverstärker wurde als Potentialdifferenz zwischen intrazellulär eingestochener Elektrode und Referenzelektrode im Außenmedium erfaßt. Das Signal wurde auf ein digitales Speicheroszilloskop (Nicolet, s Tab. 2) übertragen. Außerdem wurden das Aktionspotential und seine erste Ableitung über ein zusätzliches Speicheroszilloskop (OS 4000, s. Tab. 2) registriert und auf dem Papierschreiber (Hellige, s. Tab. 2) aufgezeichnet.

Die Versuche wurden unter den Bedingungen der „slow response“ durchgeführt, d.h. die K^+-Ionen-Konzentration wurde nach Erreichen der Standardbedingungen durch Zugabe einer definierten Menge KCl-Lösung von 4.7 mmol/l auf 27 mmol/l erhöht. Dadurch wurde das Ruhemembranpotential von ca. -90 mV auf im Mittel -50 bis -40 mV angehoben und der T-Ca^{2+}-Kanal und Na^+-Kanal inaktiviert. Die so entstandenen Reizantworten waren daher auf den langsamen L-Ca^{2+}-Einwärtstrom (I_{si} = slow inward current) zurückzuführen. Der Anstieg des Ruhemembranpotentials konnte über die Ableitelektroden direkt am Oszillographen verfolgt werden. Gelegentlich auftretende Elektrodendrifts durch Veränderung der Elektrolytkonzentrationen wurden durch symmetrische Abweichung der Ableit- und Referenzelektrode erkannt und korrigiert.

Um nach Erhöhung der KCl-Konzentration die Erregbarkeit und Kontraktionsfähigkeit des Präparates wiederherzustellen wurde der Lösung eine definierte Ba^{2+}-Menge zugefügt (0.5 mmol/l; s. Ehara T und Inazawa M, 1980).

Die Stabilität der Messungen unter den Bedingungen der „slow response“ wurde durch Kontrollversuche überprüft, um sicherzugehen, daß bei erhöhter extrazellulärer Kalium-Konzentration die Versuchsbedingungen über die Zeit konstant waren bzw. mögliche Veränderungen erfaßt und berücksichtigt werden konnten (s.u.).

Nach der K^+-Depolarisation wurde die Reizspannung am Reizgenerator so gewählt, daß eine einwandfreie Trennung des Reizartefaktes vom Signal des darauffolgenden Aktionspotentials vorlag und somit die Bestimmung der maximalen Anstiegssteilheit des Aktionspotentials ($V_{max} = dV/dt_{max}$) mittels eines analogen Differentiationsmoduls möglich war. Die Reizstärke lag in der Regel 20 – 30 % oberhalb des Schwellenwertes und betrug 3 – 6 V. Da der Abstand zwischen der intrazellulären Ableitelektrode und den Reizelektroden durch unterschiedliche Positionen der Ableitelektrode im Herzmuskelpräparat das Meßsignal beeinflußte, konnten mittels einer Schaltvorrichtung verschiedene fixe Reizelektroden an der Wand der Perfusionskammer ein- bzw. ausgeschaltet werden, um die Trennung des Aktionspotentials vom Reizartefakt zu optimieren. Im Verlauf des Versuches wurde die Latenzzeit zwischen Beginn des Reizartefaktes und Depolarisation der Zelle (4 – 10 ms) ständig kontrolliert. Bei einer Änderung dieser Zeitspanne, z.B. durch Substanzeinwirkung, wurde die Reizamplitude so nachreguliert, daß die initiale Latenzzeit wieder eingehalten wurde. Damit wurde sichergestellt, daß der registrierten maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit dV/dt_{max} immer vergleichbare zeitliche Parameter der Torkinetiken, besonders des Inaktivierungstores h_∞ zugrunde lagen (Walton M und Fozzard HA, 1979).

Bei der Anpassung der Versuchsbedingungen von „fast response“ auf „slow response“ wurde mittels einer Schaltung am o.g. Analog-Differenzierer darauf geachtet, daß die Umstellung der Messung von 200 V/s auf ca. 10 V/s. den langsameren Aufstrichgeschwindigkeiten der „slow response“ Rechnung trug. Die Reizfrequenz betrug unter „slow response“-Bedingungen in der Regel 0.167 Hz.

2.3. **Verwendete Substanzen** (s. Abb. 2)

Die für die Versuche benötigten Substanzen wurden für jeden Versuch neu angesetzt, wenn sie länger als 2 Wochen im Kühlraum lagerten. In der Regel wurden für Verapamil bzw. Mibefradil folgende Konzentrationen in aqua destillata durch kumulative Verdünnung hergestellt :

Verapamil : $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l

Mibefradil : $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Die Substanzeinwirkung erfolgte solange, bis sich bezüglich der Meßsignals ein stationärer Zustand eingestellt hatte.

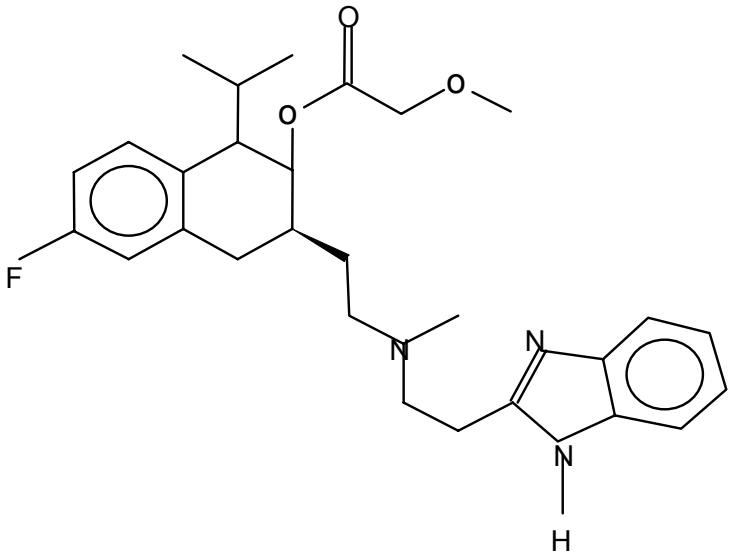
2.4. **Datenerfassung und Auswertung**

Die Triggerung der Meßvorgänge erfolgte durch das Reizsignal. Die mit Hilfe eines digitalen Speicheroszilloskops gespeicherten Signale wurden mittels Floppy disk auf einen Computer übertragen und mit einem von Herrn Dr. T. Kammer in Quick-Basic (Microsoft) speziell entwickelten Programm, welches die registrierten Meßpunkte grafisch darstellte, ausgewertet. Das Ruhepotential wurde ermittelt, indem mindestens 20 Meßpunkte (entsprechend 10 ms) vor dem Aktionspotential gemittelt wurden. Der so erhaltene Spannungswert wurde auf den Wert der Referenzelektrode bezogen. AP-Elektrode und Referenzelektrode wurden zu Beginn des Versuchs auf Null abgeglichen. Die gemessenen Parameter der Kontrollregistrierungen zu Versuchsbeginn (ohne Substanzen) wurden als Bezugswerte auf 100% gesetzt. Anschließend wurden die Daten zunächst in eine Microsoft-Excel-Tabelle eingegeben und zur weiteren Auswertung in das Programm Prism3 (Graphpad Software Incorprated © 1994-1999) übertragen.

Abb. 2 Verwendete Substanzen

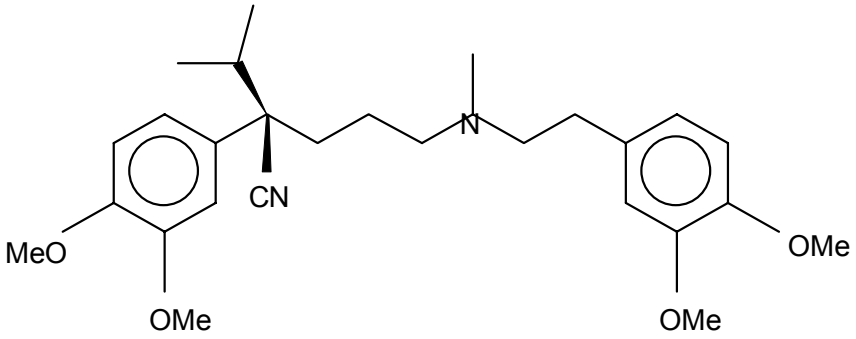
Mibefradil :
(1S,2S)-2-[2-[[3-(2-benzimidazolyl)-propyl]methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphtyl methoxyacetat dihydrochlorid

Molekulargewicht : 568.65 [H_2O]



Verapamil :
5-[(3,4-dimethoxyphenethyl)methylamino]-2-(4-methoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril

Molekulargewicht : 491.09 [H_2O]



Folgende Aktionspotentialparameter wurden ermittelt : Aktionspotentialdauer auf dem Repolarisationsniveau von 30% (APD30) und 90% (APD90), die maximale Anstiegssteilheit des Aktionspotentials V_{max} als erste Ableitung des Membranpotentials nach der Zeit und die isometrische Kontraktionskraft des Muskels (FC = force of contraction).

Von jeweils mindestens 3-4 Experimenten zu einer Fragestellung wurden die in Prozent ermittelten Ergebnisse arithmetisch gemittelt und mit ihrem Standardfehler (SEM = standard error of the mean) angegeben unter der Annahme, daß die statistische Verteilung der Versuchsergebnisse einer Gauß´schen Normalverteilung entspricht, ohne daß dies allerdings bewiesen ist.

2.4.1. „slow-response“-Kontroll-Versuche

Alle Versuche dieser Arbeit erfolgten unter K^+-Depolarisation, d.h. unter den Bedingungen der „slow response“ ($[K^+]_0$: 27 mmol/l, $BaCl_2$: 0.5 mmol/l).

Um die Konstanz der Versuchsergebnisse unter K^+-Depolarisation über die teilweise großen Zeitabstände (z.B. bei den Konzentrations-Wirkungs-Kurven) ausreichend zu berücksichtigen, wurden Leerversuche unter „slow-response“-Bedingungen über längere Zeit durchgeführt.

Dabei wurde zunächst unter „fast-response-Bedingungen“ eine „steady-state“ Phase mit stabilem Aktionspotential abgewartet und dann durch eine Zugabe von KCl und $BaCl_2$ auf „slow response“–Bedingungen umgestellt. Anschließend wurden in 30 minütigem Abstand die Meßwerte registriert. In der Regel wurden die letzten Werte nach 300 Minuten aufgenommen.

2.4.2. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden durch kumulative Gabe der jeweiligen Substanz ermittelt. Nach Registrierung der Signale im stationären Zustand wurde die

nächst höhere Konzentration der Badlösung zugefügt. Die Einwirkdauer der jeweiligen Konzentration betrug mindestens 30 Minuten, so daß auch verzögert auftretende Wirkungen erfaßt wurden.

Die Messwert-Veränderungen durch die Substanzeinwirkungen wurden bei vorgegebener Reizfrequenz für jede Substanzkonzentration in Prozent des Kontrollwertes berechnet und graphisch in halblogarithmischer Form gegenüber der Konzentration dargestellt.

Signifikanzen wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0.05 = signifikant bzw. von < 0.01 = hochsignifikant angegeben. Darüber hinaus wurden EC_{50}-Werte ermittelt und deren 95%-Konfidenzintervalle berechnet.

2.4.3. Frequenz-Versuche

Für die Frequenz-Versuche wurde anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die V_{max}-Abnahme (kalziumantagonistische Wirkung) eine nahe der EC_{50} bei der Reizfrequenz 1 Hz liegende Konzentration gewählt. Diese betrug für Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l und für Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Der Substanzeffekt wurde als Prozentwert in Bezug auf den Kontrollwert bei der jeweiligen Reizfrequenz ermittelt (0.05, 0.17 und 0.33 Hz).

Es wurden die Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM = standard error of the mean) berechnet.

2.4.4. Doppelreiz-Versuche

Mit diesen Versuchen wurde der Einfluß der Kalziumantagonisten auf die Erholung der Ca^{2+}-Kanäle im Anschluß an eine reizbedingte Inaktivierung untersucht.

Die Präparate wurden einer periodisch wiederkehrenden Reizung von 10 / min (= Grundreiz) ausgesetzt. Nach Stabilisierung der Aktionspotential-Parameter, wurden

nun parallel zum Grundreiz verfrüht einfallende Testreize eingestreut. Dies wurde mittels einer Test-Schaltung möglich, die von Ing. grad. J. Springer, Pharmakologisches Institut Düsseldorf, konstruiert wurde. Die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} diente als Meßparameter. Zunächst wurde das kürzeste Zeitintervall zwischen Grundreiz und einfallendem Testreiz ermittelt, bei dem es unter dem Testreiz noch gerade zu einer Potentialänderung an der Herzmuskelzelle kam.

Anschließend wurde die Zunahme der Latenzzeit für den Testreiz möglichst klein gewählt, da die Änderungen der Anstiegssteilheit V_{max} rasch zunahm. Nach jeder ausgelösten Doppelreizantwort wurde die Rückkehr in den stationären Zustand durch Vergleich von V_{max} über mindestens 10 Grundrhythmus-Zyklen abgewartet.

Die V_{max} –Werte der Testreize (sowohl unter Substanzwirkung als auch unter Kontrolle ohne Substanz) wurden auf den jeweils höchsten V_{max} –Wert innerhalb einer Testreizserie in Prozent bezogen und gegen die Zeit graphisch aufgetragen.

Die Zeit zwischen Grundreizimpuls und t_0 des Testreizaktionspotentials wurde um die Aktionspotentialdauer des Grundreizes auf 90%-igem Repolarisationsniveau reduziert.

Die Wiedererholungs-Kinetik von V_{max} wurde durch Anpassung von e-Funktionen an die Meßwerte dargestellt. (s. Abb. 14 und 15)

Bei den Doppelreiz-Versuchen unter Einwirkung von Verapamil wie unter Mibefradil konnte durch folgende Gleichung eine Kurvenanpassung erfolgen :

$$Y(t) = Y_{max1} \cdot (1-e^{-k1(t-x0)}) + Y_{max2} \cdot (1-e^{-k2(t-x0)})$$

Zeichenerklärung :

Y_{max1} = Amplitude 1 für ersten zeitabhängigen (exponentiellen) Vorgang

Y_{max2} = Amplitude 2 für zweiten zeitabhängigen (exponentiellen) Vorgang

k_1 = Geschwindigkeitskonstante für erste e-Funktion (Halbwertzeit $T_{50}1 = \ln(2) / k_1$

k_2 = Geschwindigkeitskonstante für zweite e-Funktion (Halbwertzeit $T_{50}2 = \ln(2) / k_2$

t-x0 = : x0 gibt die Zeitverzögerung an, mit der die Wiedererholung startet

Die isometrische Kraftentwicklung wurde bei diesen Versuchen nur auf dem Papierschreiber registriert und nicht ausgewertet.

2.4.4. „Post-Pause“-Versuche

Der zunächst unter Kontrollbedingungen stimulierte Muskel wurde nach Abwarten eines steady state (s.o.) für 30 Minuten nicht mehr stimuliert.
Die Aufnahme der Signale nach der 30 minütigen Reizpause wurden durch den Autocycle-Betrieb des digitalen Magnetspeicheroszilloskops Nicolet ermöglicht. Dabei wurden die ersten mit der erneuten Reizung auftretenden Reizantworten registriert. Da aufgrund der Spurenbelegung des Magnetspeichers (Floppydisk) 39 Spuren kontinuierlich bespielt wurden, konnte nur jeweils ein Parameter untersucht werden. In der Regel wurde der Parameter V_{max} bestimmt. Es wurden, um auch Veränderungen nach einem größeren Zeitintervall zu erfassen, neben den ersten 39 Meßsignalen, das 50., 70., 90. und 150. Signal aufgezeichnet.

Die Reizfrequenz betrug während aller „Post-Pause“-Versuche 0.167 Hz (10/min), d.h. alle 6000 ms erfolgte ein elektrischer Reiz. Die isometrische Kraftentwicklung wurde bei diesen Versuchen nur auf dem Papierschreiber registriert und nicht ausgewertet.
Bei der Auswertung wurden Kurvenanpassungen an die Meßdaten (one phase exponential decay) verwendet und die Halbwertzeiten $t_{½}$ berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. „slow response“-Kontroll-Versuche

Die Stabilität der Versuchsbedingungen unter K^+-Depolarisation über die Zeit wurde für die Parameter der „slow response“ in Leerversuchen überprüft.

Dabei wurde analog zu den Substanz-Versuchen vorgegangen : zunächst wurde ein stabiles Aktionspotential unter „fast-response“ ($[K^+]$ = 4.7 mmol/l) -Bedingungen aufgesucht, und die „steady-state“-Phase von 60 Minuten abgewartet. Anschließend wurde die Membran durch KCl-Zugabe depolarisiert (s. Material und Methoden) auf ein Ruhepotential von im Mittel -42,3 ± 3,5mV (n = 6). Abb. 3 (s. S. 21) zeigt den Zeitverlauf der Parameter : Aktionspotentialdauer auf 30%igem und 90%igem Repolarisationsniveau, maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max}, isometrische Kontraktionskraft und Ruhepotential.

Alle Parameter bleiben weitgehend konstant mit Ausnahme der isometrischen Kontraktionskraft, die nach 120 Minuten langsam und kontinuierlich im Mittel um 1.02 mN auf 1.68 ± 0.31 mN zunimmt und nach 300 Minuten 283 % des Ausgangswertes erreicht.

V_{max} zeigt nach 90 Minuten zunächst einen kurzzeitigen Anstieg, befindet sich aber nach 300 Minuten wieder nahezu auf dem Ausgangsniveau.

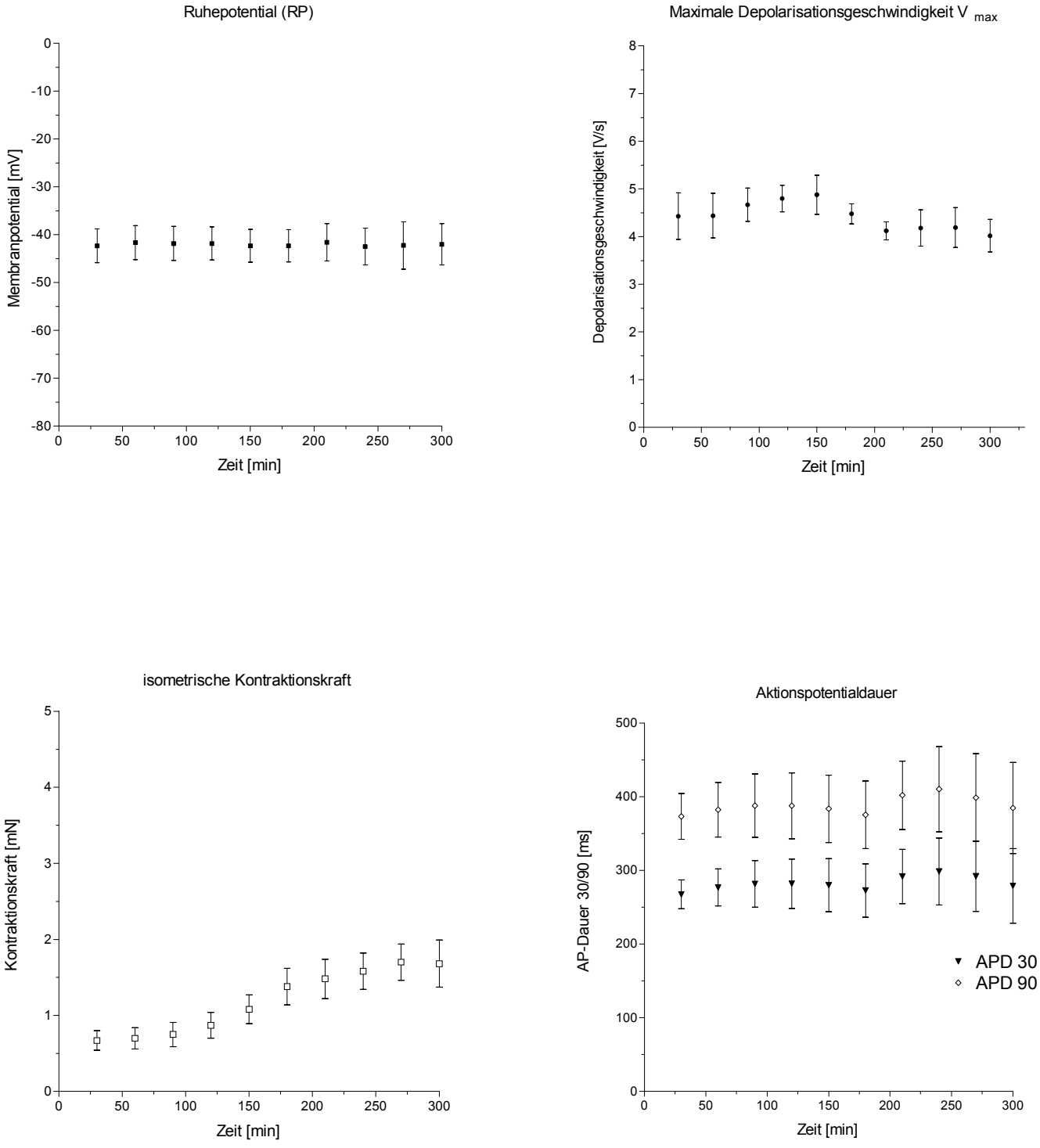


Abb. 3
Darstellung der Absolutwerte der Aktionspotentialparameter unter „slow response"-Bedingungen (K^+-Depolarisation $[K^+]_0$ = 27 mmol/l, $BaCl_2$ = 0.5 mmol/l) über die Zeit. Nicht dargestellt ist die vorgeschaltete Stabilisierungsphase von 60 Minuten bei physiologischer Kalium-Konzentration ($[K^+]_0$ = 4.7 mmol/l). n = 6.

3.2. Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Aktionspotentialparameter am K^+-depolarisierten Meerschweinchenpapillarmuskel

3.2.1. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Verapamil

Die Erhöhung der extrazellulären K^+-Ionenkonzentration von 4.7 mmol/l auf 27 mmol/l führte zur Depolarisation der Membran von im Mittel –80 mV auf –43,75 ± 1.11 mV (n= 35). Die Anwesenheit von 0.5 mmol/l $BaCl_2$ ermöglichte die Triggerung von langsamen Aktionspotentialen („slow response“). Die typischen Originalregistrierungen des Aktionspotentials einer Papillarmuskelzelle unter Kontrolle und dem Einfluß von Verapamil eines Konzentrations-Wirkungs-Versuches zeigt Abb. 4.

Verapamil reduzierte die Aktionspotentialparameter (s. Tab. 3) in unterschiedlichem Ausmaß: Die Aktionspotentialdauer auf 30%igem Repolarisationsniveau (APD 30) wurde bereits signifikant ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l um 9.7 ± 2.1% ($p < 0.05$) und auf 90%igem Repolarisationsniveau (APD 90) um im Mittel 6.5 ± 1.9% ($p < 0.05$) gesenkt. Ausgeprägter waren bei gleicher Konzentration die Veränderungen der maximalen Anstiegssteilheit des Aktionspotentials dV/dt_{max} : das gemessene Signal verringerte sich um im Mittel 20.3 ± 5.7% ($p < 0.05$) bezogen auf die Kontrolle.

Verapamil	Konzentration [µmol/l]	APD 30% [ms]	APD 90% [ms]	dV/dt_{max} [V/s]	Amplitude [mV]	FC [mN]	RP [mV]
Kontrolle (absolut)	0	242 ± 26	315 ± 29	4,4 ± 0,3	80,5 ± 2,1	1,0 ± 1,2	-43,7 ± 1,1
Werte unter Substanzwirkung in % der Kontrolle	0.01	99 ± 1	100 ± 1	95 ± 2	102 ± 2	105 ± 5	103 ± 1
	0.03	97 ± 1	99 ± 1	90 ± 2	102 ± 3	100 ± 4	102 ± 2
	0.1	90 ± 2	94 ± 2	80 ± 6	97 ± 2	85 ± 6	101 ± 1
	0.3	75 ± 2	82 ± 2	67 ± 5	92 ± 3	74 ± 7	104 ± 2
	1	53 ± 4	67 ± 5	47 ± 5	83 ± 1	54 ± 7	103 ± 2
	3	41 ± 5	58 ± 5	31 ± 4	71 ± 2	50 ± 8	98 ± 1

Tab. 3
Konzentrationsabhängige Wirkung von Verapamil (n = 4). Absolutwerte der Kontrolle und Substanzwirkung in Prozent der Kontrolle ± Standardfehler

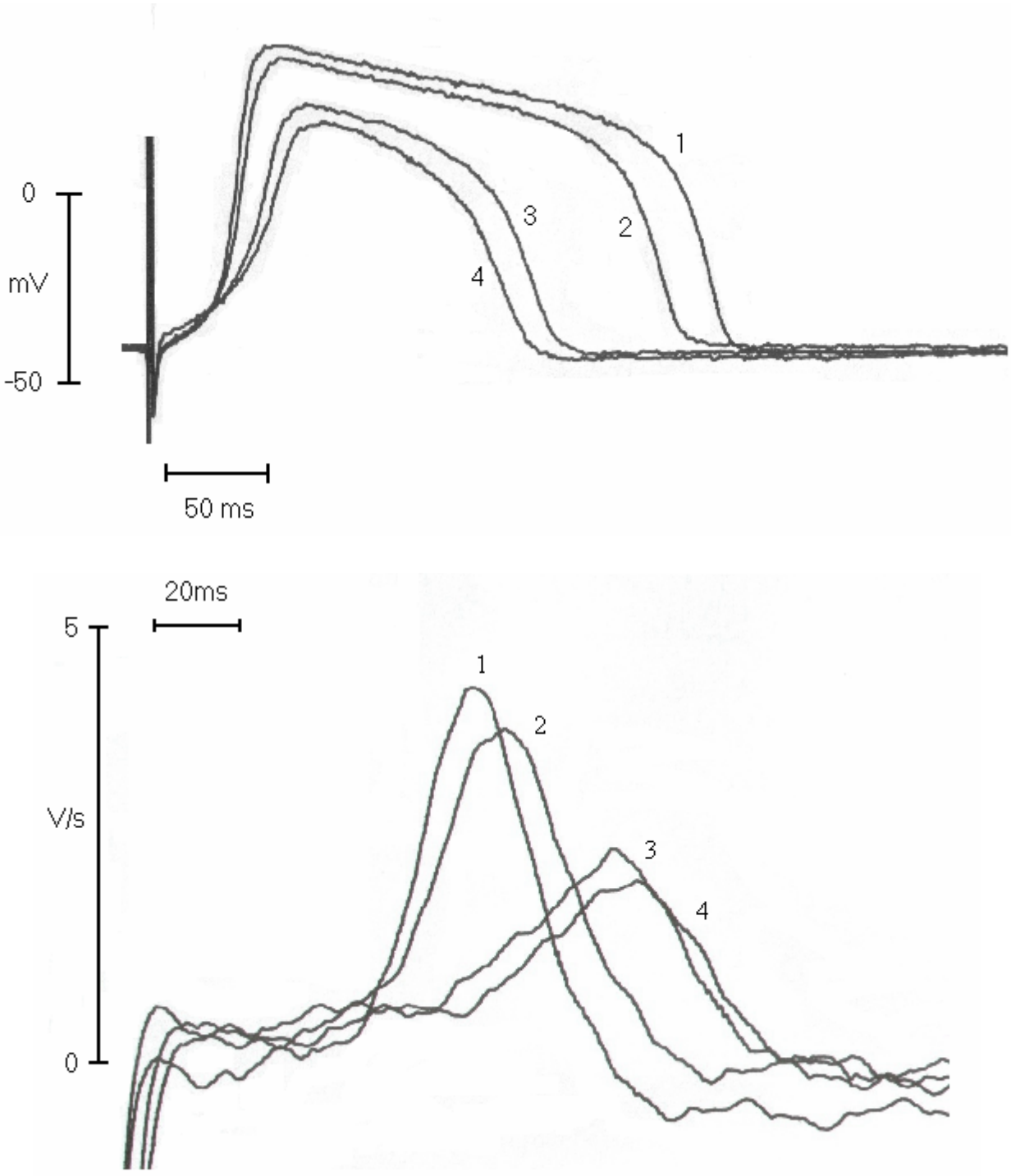


Abb. 4
Originalregistrierungen der Wirkung von Verapamil auf langsame Aktionspotentiale und ihre maximale Depolarisationsgeschwindigkeit am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel. $[K^+]_0$: 27 mmol/l, $BaCl_2$: 0.5 mmol/l, Reizfrequenz 0.167 Hz. Die Registrierungen sind übereinander projiziert. Die unten dargestellte Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} ist nicht die Ableitung nach der Zeit für die oben gezeigten Aktionspotentiale, daher liegt das Maximum der Anstiegssteilheit oben jeweils bei 25 – 50 ms, V_{max} in der Abb. unten jedoch bei ca. 80 – 120 ms
Konzentrationen :
1 = Kontrolle, 2 = $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, 3 = $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, 4 = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l

Bei Erhöhung der Konzentration auf $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l verkleinerte sich das Aktionspotential ausgehend von der Kontrolle mit einer Länge von 315 ± 29 ms hochsignifikant um 58 ± 5% (APD 90, $p < 0.01$) bzw. 42 ± 5% (APD 30, $p < 0.01$). Bei $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l wurde dV/dt_{max} sogar um 69 ± 4% ($p < 0.01$), d.h. von 4.4 ± 0.3 V/s auf im Mittel 1.4 ± 0.2 V/s erniedrigt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Parameter V_{max}, APD 30 und APD 90 sind für die Konzentrationen $1 \cdot 10^{-8}$- $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l in Abb. 5 dargestellt.

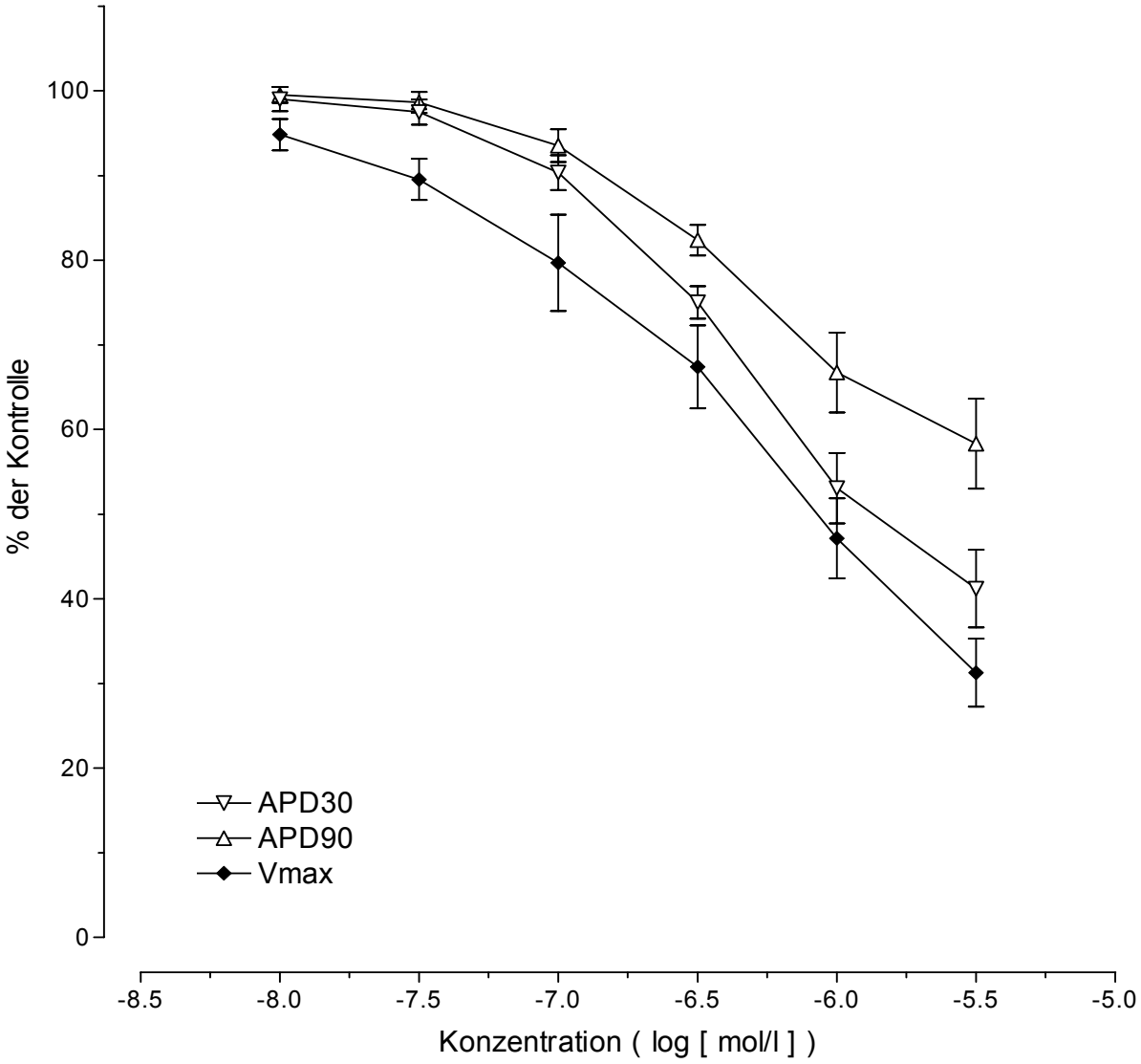


Abb. 5
Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel für Verapamil ($1 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Darstellung der Parameter APD 30, APD 90 und V_{max}, (n = 4), Reizfrequenz 0.167 Hz

Aus der Kurvenanpassung an die Meßwerte wurden folgende EC_{50}-Werte ermittelt : V_{max} : $8.97 \cdot 10^{-7}$ mol/l (Konfidenzintervall p_{95} : $7.04 \cdot 10^{-7}$, $1.41 \cdot 10^{-6}$); APD 30 bzw. APD 90 : $1.29 \cdot 10^{-6}$ mol/l bzw. $3.86 \cdot 10^{-6}$ mol/l (Konfidenzintervall p_{95} : $6.49 \cdot 10^{-7}$, $2.55 \cdot 10^{-6}$ bzw. $1.72 \cdot 10^{-6}$, $8.67 \cdot 10^{-6}$).

Die Parameter Amplitude und Kontraktionskraft sind in Abb. 6 dargestellt.

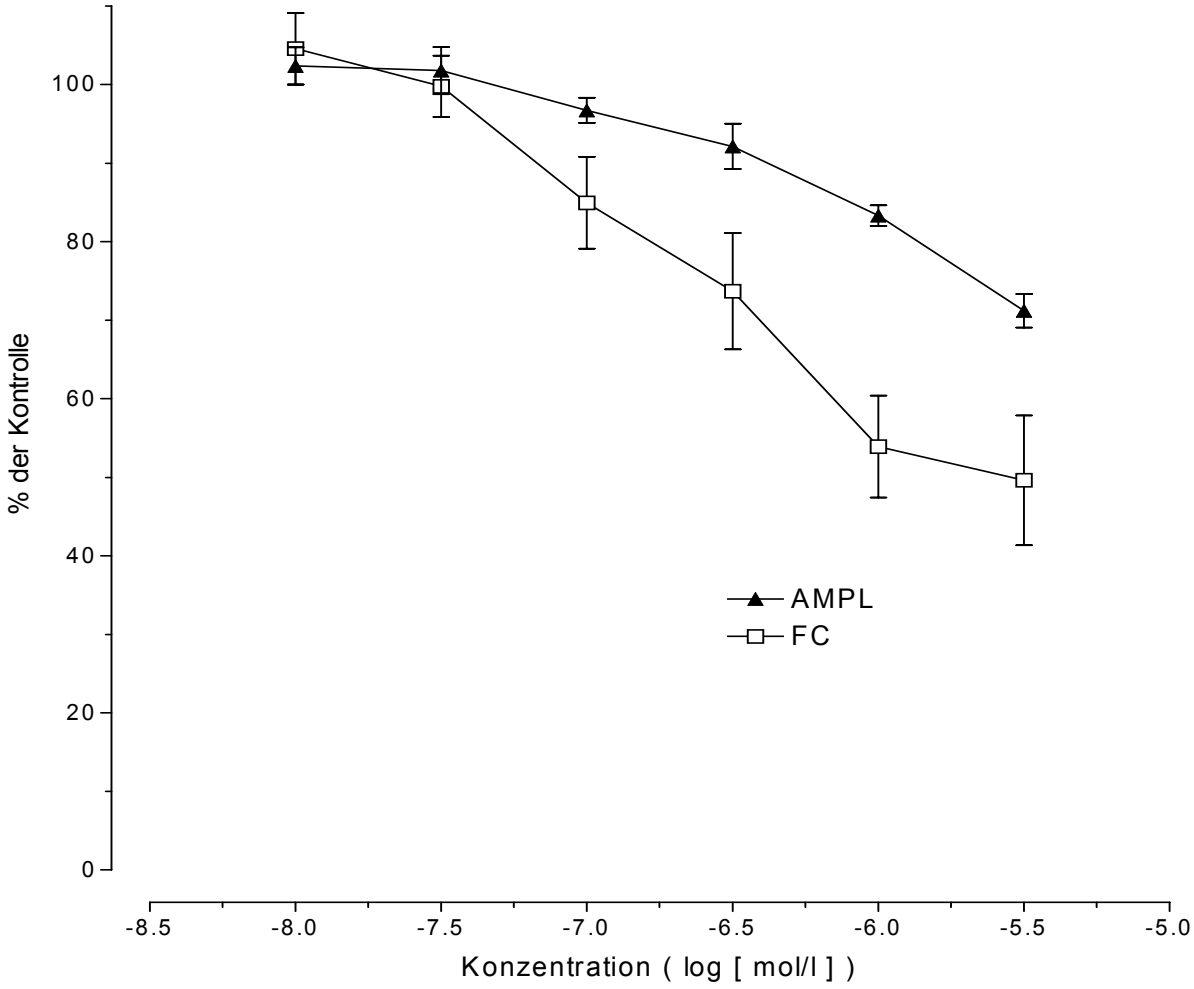


Abb. 6
Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel für Verapamil ($1 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Darstellung der Parameter Amplitude und Kontraktionskraft (FC), n = 4, Reizfrequenz 0.167 Hz

Die Amplitude des Aktionspotentials wurde durch Verapamil reduziert. Eine signifikante Änderung trat erst ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l auf. Dabei verkleinerte sich die Amplitude um 17 ± 1.3% ($p < 0.01$) auf im Mittel 67 ± 1.2 mV.

Die ab $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l negativ inotrope Wirkung von Verapamil zeigte die größte Streuung. Bezogen auf die Kontrolle (1.03 ± 0.17 mN) wurden maximale Abnahmen der Kontraktionskraft um 0.3 – 0.9 mN auf im Mittel 0.5 ± 0.11 mN festgestellt. Bei $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l wurde die Kontraktionskraft um im Mittel 26.3 ± 7.4 % ($p < 0.05$) auf 0.75 ± 0.13 mN und bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l um 52.8 ± 4.7% ($p < 0.01$) auf 0.55 ± 0.10 mN reduziert.

Konzentrationen > $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l wurden nicht ausgewertet, da in einigen Versuchen keine auswertbaren Signale zu registrieren waren.

3.1.2. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Mibefradil

Im Vergleich zu Verapamil zeigte Mibefradil qualitativ analoge Wirkungen auf die Parameter der „slow response“, allerdings erst in deutlich höheren Konzentrationen. Typische Originalregistrierungen der „slow response“ einer Papillarmuskelzelle unter Kontrollbedingungen und dem Einfluß von Mibefradil zeigt Abb. 7.
Eine hochsignifikante Abnahme von V_{max} ausgehend von 2.69 ± 0.42 V/s bei $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l um 4.8 % ($p < 0.01$) auf 2.56 ± 0.35 V/s zeigte sich bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Eine signifikante Verringerung der APD 30 bzw. APD 90 von 160 ± 15 ms bzw. 264 ± 16 ms bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l auf 147 ± 15.7 ms bzw. 250 ± 17.6 ms wurde erst durch Erhöhung der Konzentration auf $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l erreicht.

Eine Übersicht über alle Parameter findet sich in Tab. 4.

Mibefradil	Konzentration [µmol/l]	APD 30% [ms]	APD 90% [ms]	dV/dt_{max} [V/s]	Amplitude [mV]	FC [mN]	RP [mV]
Kontrolle (absolut)	0	184 ± 10	286 ± 11	2,9 ± 0,4	74,8 ± 2,6	0,4 ± 0,1	-48,6 ± 2,4
Werte unter Substanzwirkung in % der Kontrolle	0.01	102 ± 2	101 ± 1	98 ± 3	99 ± 1	96 ± 4	100 ± 1
	0.03	101 ± 3	101 ± 2	95 ± 4	99 ± 2	91 ± 6	101 ± 2
	0.1	99 ± 3	100 ± 3	90 ± 4	99 ± 2	87 ± 8	103 ± 2
	0.3	93 ± 4	96 ± 3	86 ± 3	97 ± 1	75 ± 7	103 ± 3
	1	85 ± 5	92 ± 4	79 ± 3	95 ± 3	75 ± 7	103 ± 3
	3	79 ± 5	87 ± 4	67 ± 1	91 ± 3	70 ± 3	101 ± 3
	10	70 ± 6	81 ± 4	54 ± 3	84 ± 4	57 ± 10	99 ± 3
	30	60 ± 6	75 ± 4	40 ± 4	74 ± 5	43 ± 15	94 ± 4
	100	54 ± 3*	69 ± 2*	30 ± 4*	55 ± 2*	57 ± 9*	87 ± 3*

Tab. 4
Konzentrationsabhängige Wirkung von Mibefradil (n = 5, soweit nicht markiert ; * : n = 4). Absolutwerte der Kontrolle und Substanzwirkung in Prozent der Kontrolle ± Standardfehler

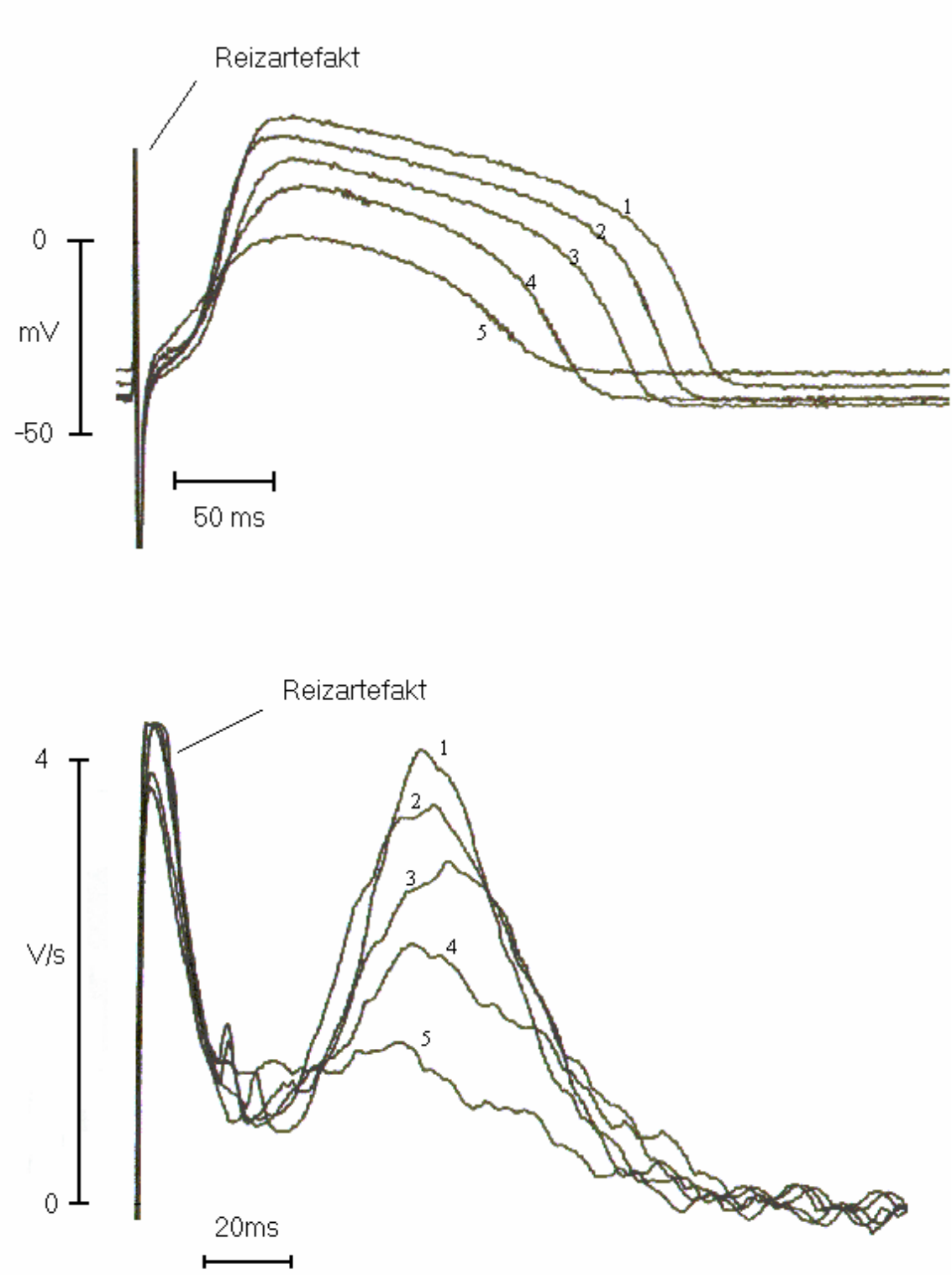


Abb. 7
Originalregistrierungen der Wirkung von Mibefradil auf langsame Aktionspotentiale und ihre maximale Depolarisationsgeschwindigkeit am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel. $[K^+]_0$: $2.7 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $BaCl_2$: $0.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, Reizfrequenz 0.167 Hz. Die Registrierungen sind übereinander projiziert. Konzentrationen :
1 = Kontrolle, 2 = $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, 3 = $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, 4 = $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, 5 = $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l

Abb. 8 zeigt für die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Mibefradil einen weniger steilen Verlauf als für Verapamil (vgl. Abb. 5).

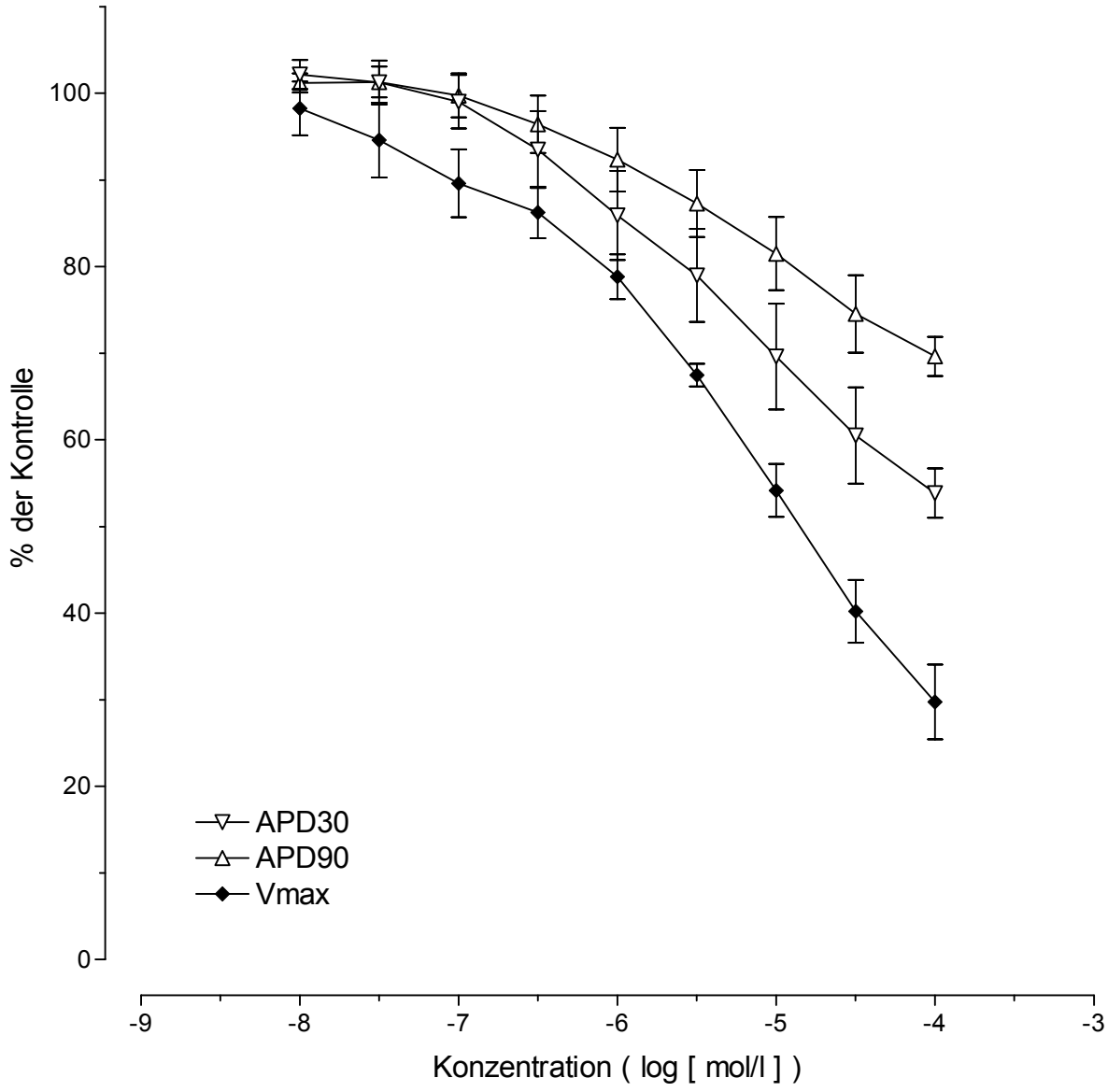


Abb. 8

Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel für Mibefradil ($1 \cdot 10^{-8}$ mol/l – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Darstellung der Parameter APD 30, APD 90 und V_{max}, n = 5, Reizfrequenz 0.167 Hz

Für die Abnahme von V_{max} um 70 ± 4.3% ist für Mibefradil eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, dagegen im Vergleich für Verapamil eine Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l notwendig. Bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l Mibefradil liegen die Werte für die APD 30 bzw. APD 90 noch bei 54 ± 3% bzw. 69 ± 2% der Kontrolle.

Die Werte konnten mit einer Kurvenanpassung erfaßt werden und ergaben für die Anstiegssteilheit des Aktionspotentials dV/dt_{max} einen EC_{50}-Wert von $1.43 \cdot 10^{-5}$ mol/l (Konfidenzintervall p_{95} : $1.84 \cdot 10^{-5}$, $1.73 \cdot 10^{-5}$). Für die Parameter APD 30 bzw. APD 90 ergab sich jeweils einen EC_{50}-Wert von $6.45 \cdot 10^{-5}$ mol/l (Konfidenzintervall p_{95} : $4.07 \cdot 10^{-5}$, $1.02 \cdot 10^{-4}$) bzw. $8.50 \cdot 10^{-4}$ mol/l (Konfidenzintervall p_{95} : $5.25 \cdot 10^{-4}$, $1.38 \cdot 10^{-3}$).

In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung von Verapamil und Mibefradil nebeneinander dargestellt.

Substanz	Parameter	EC_{50}	95%-Konfidenzintervall
Verapamil	V_{max}	$8.97 \cdot 10^{-7}$ mol/l	$7.04 \cdot 10^{-7}$, $1.41 \cdot 10^{-6}$ mol/l
	APD 30	$1.29 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$6.49 \cdot 10^{-7}$, $2.55 \cdot 10^{-6}$ mol/l
	APD 90	$3.86 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$1.72 \cdot 10^{-6}$, $8.67 \cdot 10^{-6}$ mol/l
Mibefradil	V_{max}	$1.43 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$1.84 \cdot 10^{-5}$, $1.73 \cdot 10^{-5}$ mol/l
	APD 30	$6.45 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$4.07 \cdot 10^{-5}$, $1.02 \cdot 10^{-4}$ mol/l
	APD 90	$8.50 \cdot 10^{-4}$ mol/l	$5.25 \cdot 10^{-4}$, $1.38 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Tab. 5 EC_{50}-Werte und deren 95%-Konfidenzintervalle für Verapamil und Mibefradil

Die Amplitude wurde durch Mibefradil bis zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l nur geringfügig gesenkt. Erst ab $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l kam es zu einer signifikanten Abnahme um 9.3 % ($p = 0.036$) auf 67.8 ± 2.6 mV. Bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l wurde die Amplitude auf 41.3 ± 3.2 mV (= 55 ± 2% der Kontrolle) reduziert.

Die isometrische Kontraktionskraft wurde ebenfalls gesenkt und lag unter der höchsten Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l bei 58.3 ± 10.2% der Kontrolle.

Abb. 9 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Parameter Kontraktionskraft (FC) und Amplitude (Ampl).

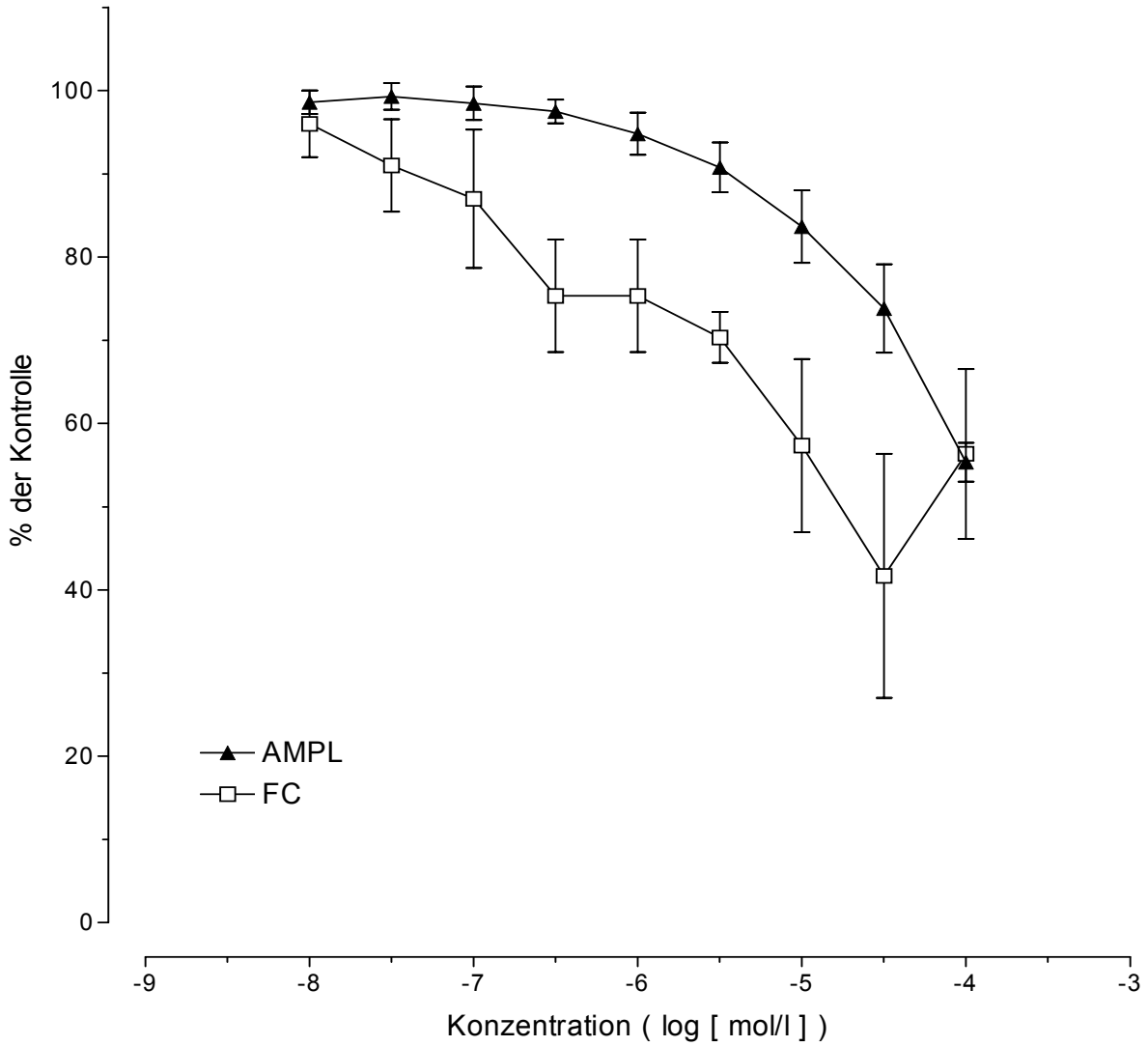


Abb. 9
Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am K^+-depolarisierten Meerschweinchen-Papillarmuskel für Mibefradil ($1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Darstellung der Parameter Amplitude (AMPL) und Kontraktionskraft (FC), n = 5, Reizfrequenz 0.167 Hz

Bei einer Konzentration von $\geq 3 \cdot 10^{-4}$ mol/l wurden die Versuchsreihen beendet, da die Kontraktionskraft bei einigen Versuchen nicht mehr meßbar war.

3.3. Frequenztreppen-Versuche

3.3.1. Frequenztreppen-Versuche mit Verapamil

Die Frequenzabhängigkeit der Wirkung von Verapamil auf die Parameter der „slow response“ wurde bei den Konzentrationen $1 \cdot 10^{-7}$ und $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l untersucht. Bei der niedrigsten Stimulationsfrequenz von 0.05 Hz (Reizintervall 20.000 ms) zeigte sich unter $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil bereits eine Verringerung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit V_{max} um 24 % von 5.1 ± 0.6 V/s auf 3.8 ± 0.4 V/s ($p < 0.01$).

In Abb. 10 ist der Einfluß von Verapamil auf die Frequenzabhängigkeit der Parameter V_{max}, APD 30 und APD 90 graphisch dargestellt.

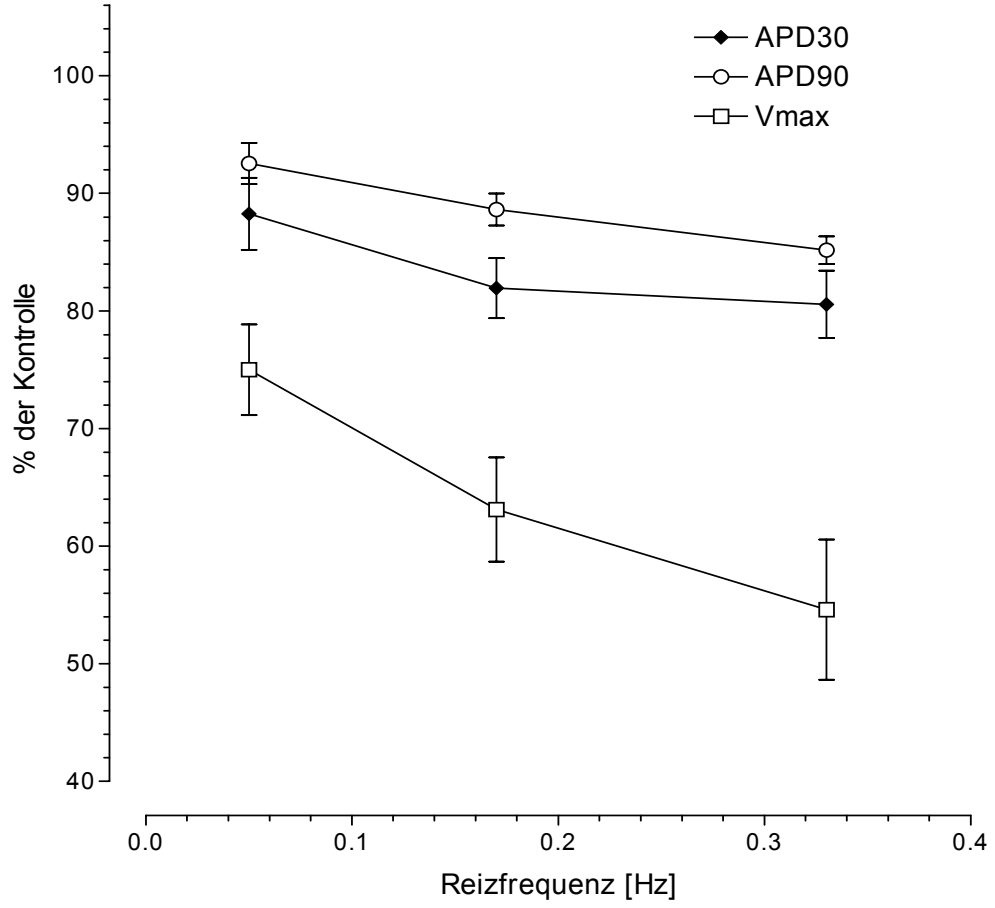


Abb. 10

Wirkung von Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l in Abhängigkeit von der Reizfrequenz (0.33, 0.17 und 0.05 Hz) auf die Parameter der „slow response“ APD 30, APD 90 und V_{max}

Die Veränderungen der Aktionspotentialparameter APD 30, APD 90 und der Kontraktionskraft waren weniger stark ausgeprägt. Während die Aktionspotentialdauer auf 30%-igem Repolarisationsniveau (APD 30) unter $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil (Reizfrequenz 0.05 Hz) von 178 ± 27 ms um 11.7 % auf im Mittel 155 ± 18 ms abnahm, betrug die Aktionspotentialdauer auf 90%-igem Repolarisationsniveau noch 92.5 ± 1.8 % des Kontrollwertes; die Amplitude des Aktionspotentials verringerte sich sogar nur um 4 ± 0.9 % .

Eine Übersicht über die Veränderungen der Parameter der „slow response“ unter den verschiedenen Reizfrequenzen zeigt Tab. 6 (S. 33) für Verapamil und Mibefradil.

Durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.05 auf 0.17 Hz bzw. 0.33 Hz verringerte Verapamil V_{max} von 75.6 ± 8.9 % auf 63.1 ± 4.4 % bzw. 54.6 ± 6.0 % ($p < 0.01$). Die APD 30 bzw. APD 90 wurden weniger stark reduziert und erreichten bei 0.33 Hz 80.6 ± 2.9 % ($p < 0.01$) bzw. 85.2 ± 1.2 % ($p < 0.01$) des Kontrollwertes.
Als Ausdruck der negativen Inotropie verminderte Verapamil die isometrische Kontraktionskraft analog zur maximalen Aufstrichgeschwindigkeit V_{max} bereits bei der niedrigsten Reizfrequenz um 17.3 ± 4.8 % ($n = 5$) und erreichte die maximale Senkung bei 0.33 Hz von 0.36 ± 0.07 mN auf 0.28 ± 0.06 mN, d.h. auf 55.2 ± 4.8 % ($p < 0.01$) des Ausgangswertes.

Der Einfluß von Verapamil auf die Amplitude der „slow response“ und die isometrische Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Reizfrequenz sind in Abb. 11 (S. 34) dargestellt.

	Frequenz [Hz]	Konzentration [mol/l]	Amplitude [mV]	APD 30 [ms]	APD 90 [ms]	V_{max} [V/s]	FC [mN]
Verapamil n = 5	0.05	Kontrolle (absolut)	79.4 ± 0.9	178 ± 27	284 ± 28	5.1 ± 0.6	0.60 ± 0.13
	0.05	$1 \cdot 10^{-7}$ (absolut)	76.2 ± 0.7	155 ± 18	262 ± 23	3.8 ± 0.4	0.48 ± 0.10
	0.05	$1 \cdot 10^{-7}$ (prozentual)	96 ± 1	88 ± 3	93 ± 2	76 ± 4	83 ± 5
	0.17	Kontrolle (absolut)	77.6 ± 0.9	163 ± 22	263 ± 21	4.5 ± 0.5	0.54 ± 0.12
	0.17	$1 \cdot 10^{-7}$ (absolut)	72.4 ± 0.9	132 ± 14	233 ± 17	2.8 ± 0.4	0.36 ± 0.07
	0.17	$1 \cdot 10^{-7}$ (prozentual)	93 ± 0.5	82 ± 3	89 ± 2	63 ± 4	68 ± 9
	0.33	Kontrolle (absolut)	75.4 ± 0.7	142 ± 16	243 ± 14	4.0 ± 0.5	0.52 ± 0.12
	0.33	$1 \cdot 10^{-7}$ (absolut)	67.8 ± 1.2	114 ± 11	207 ± 14	2.2 ± 0.4	0.28 ± 0.06
	0.33	$1 \cdot 10^{-7}$ (prozentual)	90 ± 1	81 ± 3	85 ± 1	55 ± 6	55 ± 5
Mibefradil n = 4	0.05	Kontrolle (absolut)	71.5 ± 0.9	130 ± 8	219 ± 9	2.7 ± 0.2	0.50 ± 0.04
	0.05	$1 \cdot 10^{-6}$ (absolut)	68.3 ± 2.3	125 ± 3	216 ± 2	2.4 ± 0.2	0.40 ± 0.04
	0.05	$1 \cdot 10^{-6}$ (prozentual)	95 ± 2	99 ± 9	98 ± 4	91 ± 3	80 ± 7
	0.17	Kontrolle (absolut)	67.8 ± 1.1	114 ± 6	200 ± 6	2.3 ± 0.2	0.43 ± 0.02
	0.17	$1 \cdot 10^{-6}$ (absolut)	63.3 ± 2.7	101 ± 3	190 ± 1	1.9 ± 0.8	0.35 ± 0.03
	0.17	$1 \cdot 10^{-6}$ (prozentual)	93 ± 3	91 ± 8	95 ± 4	83 ± 5	84 ± 10
	0.33	Kontrolle (absolut)	64.8 ± 1.3	100 ± 5	193 ± 4	1.9 ± 0.2	0.38 ± 0.03
	0.33	$1 \cdot 10^{-6}$ (absolut)	58.5 ± 3.1	86 ± 3	177 ± 3	1.5 ± 0.3	0.30 ± 0.04
	0.33	$1 \cdot 10^{-6}$ (prozentual)	90 ± 3	87 ± 7	91 ± 3	75 ± 5	79 ± 7

Tab. 6
Vergleich der Parameter der „slow response“ unter der Wirkung von Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l und Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulationsfrequenzen

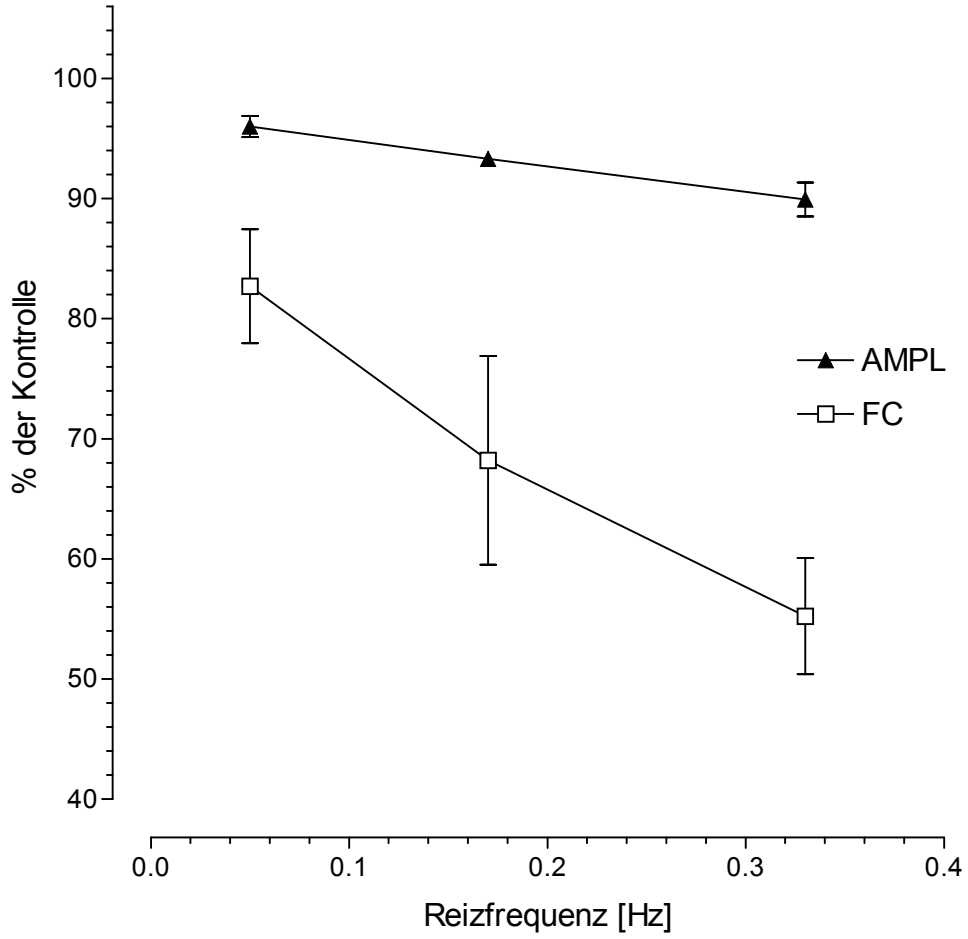


Abb.11
Wirkung von Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l in Abhängigkeit von der Reizfrequenz (0.33, 0.17 und 0.05 Hz) auf die Amplitude (AMPL) und die Kontraktionskraft (FC)

Durch Erhöhung der Konzentration von Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l auf $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l waren die Veränderungen der Parameter der „slow response“ qualitativ vergleichbar. Am deutlichsten aber zeigten sie sich durch Verminderung von V_{max} und Kontraktionskraft : bei einer Reizfrequenz von 0.05 Hz unter $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Verapamil betrug V_{max} 67.3 ± 7.7 % der Kontrolle und sank durch Erhöhung auf 0.33 Hz auf 60.3 ± 8.7 % (n = 3) . Die isometrische Kontraktionskraft sank von 60 ± 17.2 % bei einer Stimulationsfrequenz von 0.05 Hz auf 38.2 ± 9.7 % ($p < 0.01$) bei 0.33 Hz (n = 3), bezogen auf die Kontrolle. So konnte ein frequenzabhängiger Effekt auch unter höherer Konzentration ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) gezeigt werden.

3.3.2. Frequenztreppen-Versuche mit Mibefradil

Die frequenzabhängige Wirkung von Mibefradil (Konzentration : $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) wurde am K^+-depolarisierten (27 mmol/l) Papillarmuskel untersucht.
Eine graphische Darstellung der Parameter der „slow response“ APD 30, APD 90 und V_{max} zeigt Abb. 12.

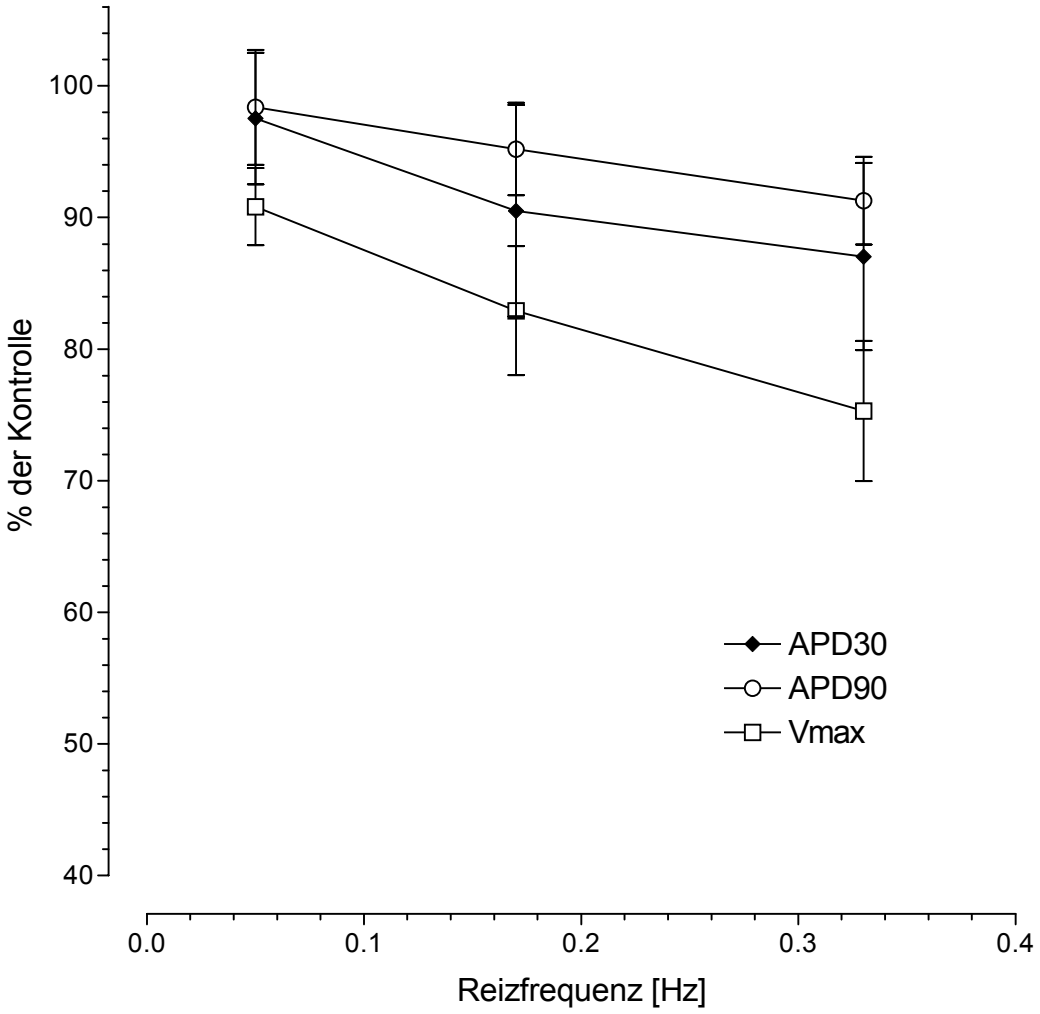


Abb. 12

Wirkung von Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l in Abhängigkeit von der Reizfrequenz (0.33, 0.17 und 0.05 Hz) auf die Parameter der „slow response“ APD 30, APD 90 und V_{max}

Mibefradil zeigte im Vergleich zu Verapamil qualitativ ähnliche, jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen auftretende Veränderungen der Aktionspotentialparameter, insbesondere der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max}. Die Abnahme von V_{max} durch Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l bei der niedrigsten Reizfrequenz (0.05 Hz) erfolgte von 2.7 ± 0.2 V/s auf 2.4 ± 0.2 V/s (d.h. auf im Mittel 90.8 ± 2.9 % der Kontrolle). Die Senkung von V_{max} bei 0.33 Hz um 24.7 ± 5.3 % von 1.9 ± 0.2 V/s auf 1.5 ± 0.3 V/s ($p < 0.05$) war aber nur halb so groß wie der Effekt unter Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

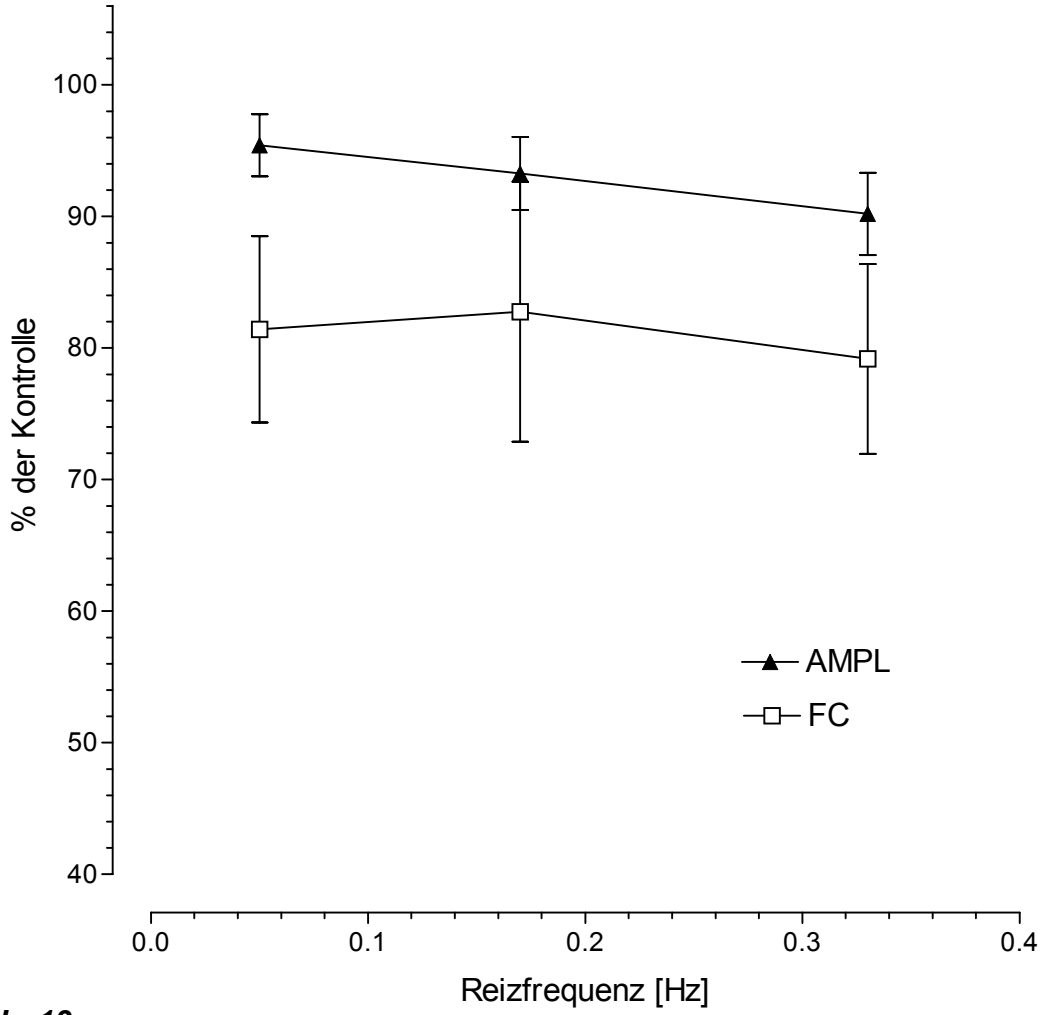


Abb. 13

Wirkung von Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l in Abhängigkeit von der Reizfrequenz (0.33, 0.17 und 0.05 Hz) auf die Amplitude (AMPL) und die Kontraktionskraft (FC)

Die Repolarisationsdauer auf 30%-igem bzw. 90%-igem Niveau wurde in Gegenwart von Mibefradil durch die Erhöhung der Reizfrequenz von 0.05 Hz auf 0.33 Hz nur geringfügig von 98.5 ± 8.7 % bzw. 98.4 ± 4.4 % auf 87.0 ± 7.1 % bzw. 91.3 ± 3.3 % der Kontrolle gesenkt.

Ein ebenfalls deutlicher Unterschied zu Verapamil ergab sich für den Einfluß von Mibefradil auf die isometrische Kontraktionskraft. Die Abnahme der Kontraktionskraft bei einer Reizfrequenz von 0.05 Hz betrug 0.4 ± 0.04 mN, d.h. die Kontraktionskraft betrug 80 % des Kontrollwertes. Durch Erhöhung der Reizfrequenz auf 0.33 Hz kam es jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung. Die Kontraktionskraft lag immer noch bei 79.2 ± 7.2% der Kontrolle.

Eine graphische Darstellung des Einflusses von Mibefradil auf die Kontraktionskraft und die Amplitude der „slow response“ in Abhängigkeit von der Reizfrequenz findet sich in Abb. 13.

Das Ruhemembranpotential war bei allen Versuchen nach Depolarisation unter K^+ - Erhöhung (27mmol/l) stabil und lag im Mittel bei –44.6 ± 5.9 mV.

3.4. Doppelreiz-Versuche

Die Wiedererholung der Ca^{2+}-Kanäle nach reizbedingter Inaktivierung (recovery from inactivation) wurde unter „slow response“-Bedingungen für die jeweiligen Substanzen durch verfrüht einfallende Testreize während Grundreizstimulation untersucht.
Abb. 14 gibt eine schematische Darstellung des Reizmusters.
Für die Untersuchung des Einflusses der Substanzen auf die Wiedererholung wurden verschiedene Darstellungen gewählt :

1.) Vergleich von t_{test} unter jeweiliger Substanzwirkung : Um den Einfluß der Substanz auf die Veränderung der Refraktärzeit am Ende der „slow response“ zu untersuchen, wurden Zweitreize (Testreize) mit zunehmendem zeitlichem Abstand vom Erstreiz ausgelöst (Abb. 14). Bezeichnet man t_{TR} als das Zeitintervall zwischen Grundreiz und Testreiz, dann ergibt sich die Refraktärzeit t_{test} als Differenz aus t_{TR} und APD 90. t_{test} wurde unter Kontrollbedingungen und unter Substanzeinwirkung untersucht. Da die vorwiegende Wiedererholung von V_{max} in wenigen ms erfolgte, wurden in dem in Frage kommenden Bereich die Testreize in geringem zeitlichem Abstand gewählt (vgl. Abb. 15)
Tabelle 7 enthält die ermittelten t_{test} -Werte für die jeweiligen Konzentrationen der Substanzen.

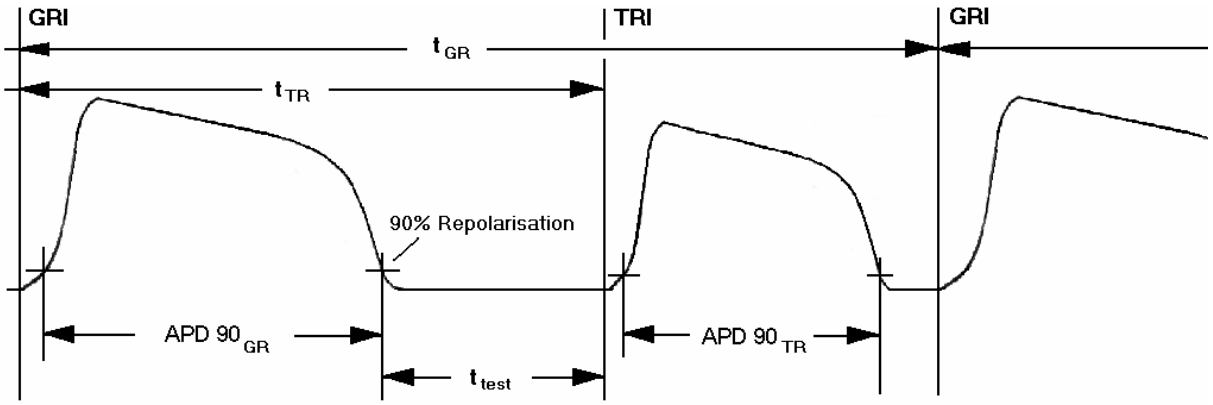


Abb. 14
Schematische Darstellung eines Doppelreiz-Versuches mit definierten Zeitabständen

t_{GR} = Grundreizintervall (10/min, d.h. Reizabstand 6000 ms)
t_{TR} = variables Testreizintervall (bis zum doppelten Grundreizintervall, Reizabstand dann 12000 ms)
APD 90_{GR} = Aktionspotentialdauer auf 90%-igem Repolarisationsniveau der „slow response“ des Grundreizes
APD 90_{TR} = Aktionspotentialdauer auf 90%-igem Repolarisationsniveau der „slow response“ des Testreizes
t_{test} = Zeitabstand zwischen 90% Repolarisation der „slow response“ bei Grundrhythmus und Beginn der Anstiegsflanke der Antwort auf den Testreiz, berechnet nach der Gleichung $t_{test} = t_{TR}$ - APD 90_{GR}
GRI = Grundreizimpuls (Rechtecksreiz, Reizdauer 1 ms)
TRI = Testreizimpuls (Rechtecksreiz, Reizdauer 1 ms)

A	t_{test} in ms	SEM	n	Faktor
Kontrolle	79	43	8*	1.00
Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l	323	118	3	4.09
Verapamil $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l	615	132	3	7.78
Verapamil $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l	1153		2	14.60
Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	225	102	5	2.84
Mibefradil $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	334	142	4	4.20

B	V_{max} (Plateau) in %	SEM	n
Kontrolle	100	0	7
Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l	76.8	2.8	4
Verapamil $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l	64.3	0.6	3
Verapamil $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l	48.1	0	2
Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	74.8	3.6	5
Mibefradil $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	47.4	2.1	4

Tab. 7
t_{test} – Werte (***A***) und V_{max}-Plateau-Werte (***B***) von Mibefradil und Verapamil im Vergleich zur Kontrolle (SEM = Standardfehler). Bei $n \leq 2$ wurde der Standardfehler weggelassen.
* : Für die Kontrolle wurden die t_{test}-Werte aus den Mibefradil- *und* Verapamil-Versuchen gemittelt (n = 8)

Mibefradil verlängerte t_{test} um im Mittel 225 ms bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, bzw. um 334 ms bei $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Die Substanzwirkung zeigte sich außerdem in einer Depression des Wiedererholungsplateaus von V_{max} . Tabelle 7 macht deutlich, daß Mibefradil t_{test} weniger ausgeprägt verzögerte als Verapamil. Die Veränderungen von t_{test} waren ähnlich wie die Effekte auf die Amplitude der Wiedererholung :

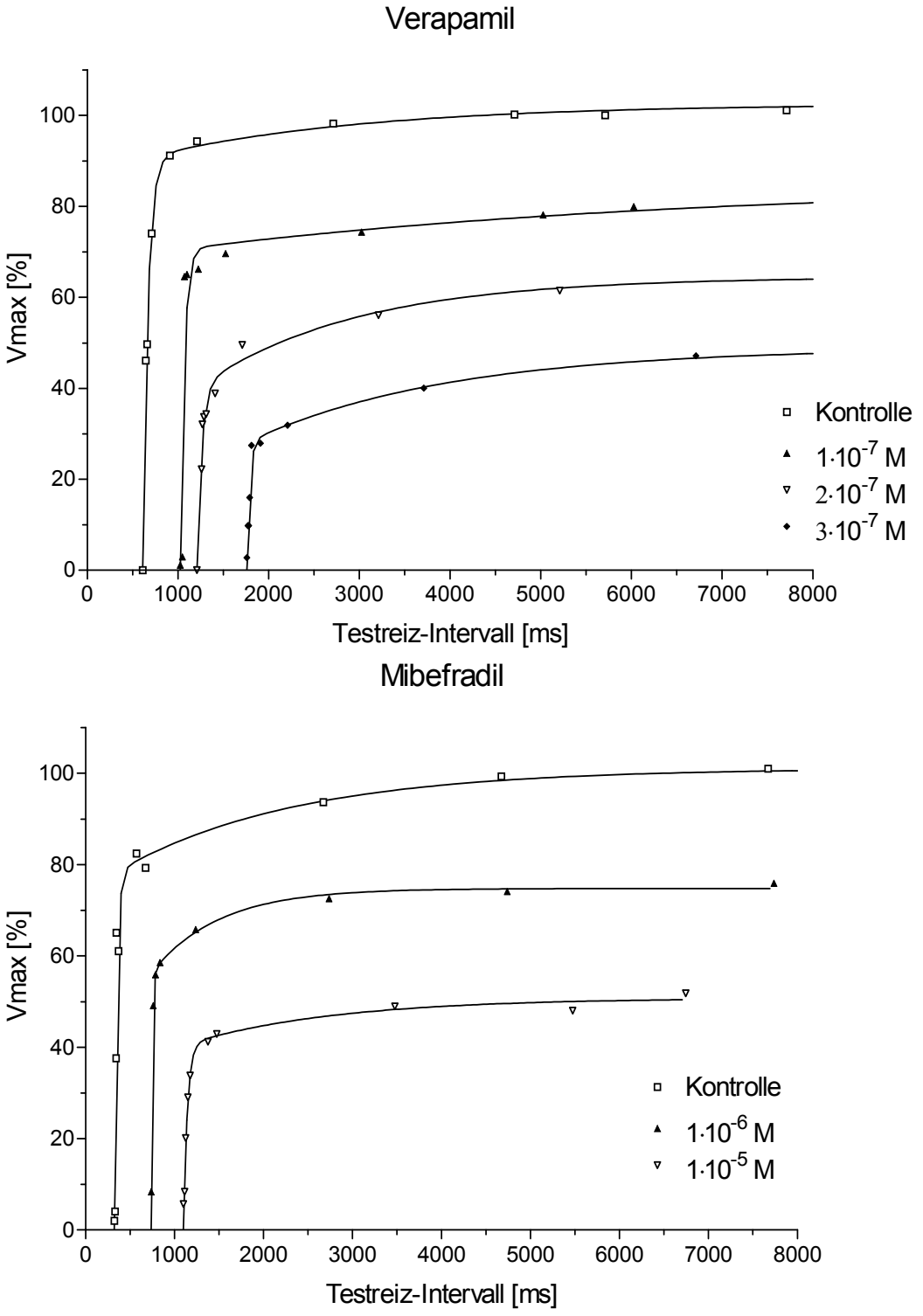


Abb. 15
Doppelreiz-Versuche unter Verapamil (oben) und Mibefradil (unten). Dargestellt wurden 2 Einzelversuche mit unterschiedlichen Präparaten. Der letzte V_{max}-Wert im Wiedererholungsplateau der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Kurvenanpassung erfolgte mit biexponentiellen Funktionen.
Grundreizstimulation mit 0.167 Hz, $[K^+]_0$ = 27 mmol/l

Konzentrationsabhängig senkte Verapamil die Amplitude des Wiedererholungsplateaus um 22 ± 2.8% bei $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, um 35 ± 0.6% bei $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l und um 51% bei $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Mibefradil zeigte bei Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l eine Reduktion von V_{max} um 25 ± 3.6%, bzw. 52 ± 2.1%. In Abb. 15 sind repräsentative Beispiele für die recovery-Kinetik unter Mibefradil und Verapamil dargestellt.

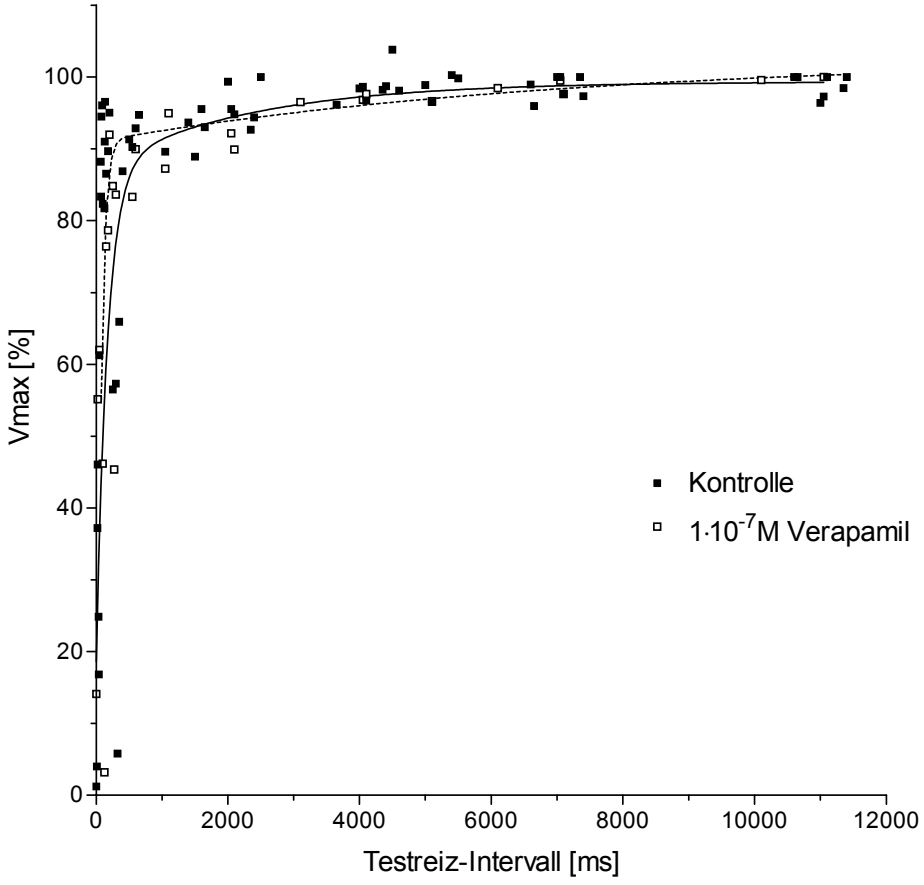
2.) Vergleichbarkeit des Zeitganges der Kanal-Wiedererholung hinsichtlich schneller und langsamer Komponente : Hierfür wurden jeweils die höchsten V_{max}-Werte von jedem Testreizdurchgang (sowohl Kontrolle als auch Substanzwirkung) auf der Y-Achse auf 100 % normiert, so daß der Substanzeffekt hinsichtlich der Amplitude nicht dargestellt wurde.

Um die unterschiedlichen Refraktärzeiten und Aktionspotentialdauern der Grundreizaktionpotentiale zwischen den Einzelversuchen in der Zusammenfassung zu berücksichtigen, wurde der erste einfallende Testreiz (t_0) auf Null gesetzt. Insgesamt konnten bei dieser Darstellung keine signifikanten Unterschiede zwischen Verapamil und Mibefradil für die Beeinflussung der Recovery-Kinetik festgestellt werden. Der Vergleich ist in Abb. 16 dargestellt.

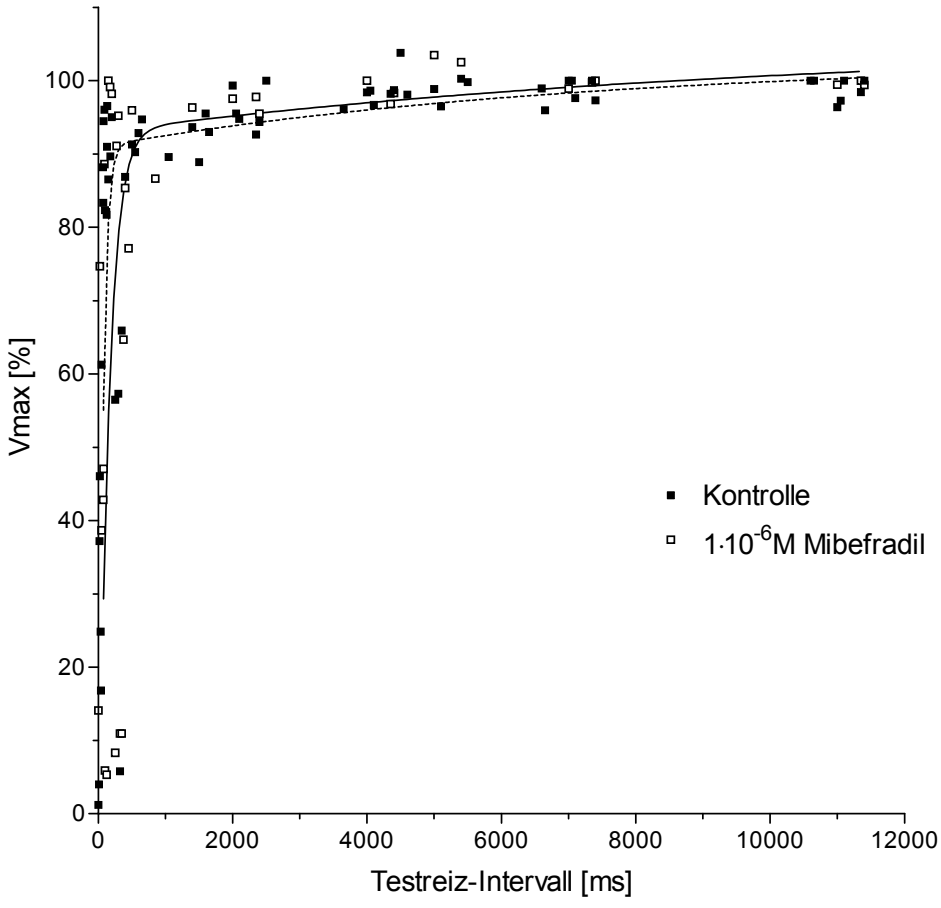
Legende ***Abb. 16*** (S. 44)
Doppelreiz-Versuche unter „slow-response“-Bedingungen : Vergleich der verfrüht einfallenden Testreize unter Kontrollbedingungen (n = 9) und unter Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ M (A, n = 4) sowie unter Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ M (B, n = 5).
Auf der X-Achse sind die Testreizintervalle (0 = bedeutet Beginn der Testreizantwort) in ms bei einem Grundreiz von 10/min (Intervall 6000 ms) aufgetragen. Um mögliche Veränderungen über den Grundreizabstand hinaus zu erfassen, wurden 2 Werte > 6000ms gewählt.
Auf der Y-Achse ist der V_{max}-Wert in Prozent des höchsten V_{max}-Wertes des jeweiligen Testreizdurchganges aufgetragen.
Die Anpassung an die Punktwolken erfolgte mit biexponentiellen Funktionen (s. Material und Methoden)

Abb. 16

A


Vmax [%]
Testreiz-Intervall [ms]
Kontrolle
1·10-7M Verapamil

B


Vmax [%]
Testreiz-Intervall [ms]
Kontrolle
1·10-6M Mibefradil

3.5. Post-Pause-Versuche

Die Versuche sollten Aufschluß darüber geben, mit welchen Kanal-Zustand die betrachtete Substanz interagiert. Durch die Unterbrechung der elektrischen Stimulation des Präparates und durch Applikation der Substanz zu Beginn der Reizpause bestand für sie die Möglichkeit, bereits im Ruhezustand an den Ca^{2+}-Kanal zu binden. Für Substanzen, welche durch sog. „rested-state-blockade“ den Kanal-Ruhezustand bevorzugen, wird postuliert, daß durch die Wiederaufnahme der Reizstimulation bereits beim ersten, oder aber direkt nach den ersten Reizen ein Höchstmaß blockierter Kanäle vorliegt und sich schnell eine Plateau-Phase einstellt, wie dies beispielsweise für Lidocain beschrieben wurde (Colatsky TJ, 1982; Gintant GA und Hoffmann BF, 1984).

Da zur Beurteilung des dynamischen Verhaltens der Ca^{2+}-Kanäle unter Substanzeinwirkung vor allem die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} der ersten und unmittelbar folgenden „slow response“-Potentiale nach einer Ruhepause von Bedeutung sind (Hondeghem LM, 1978), wurden nach Wiederaufnahme der Reizstimulation bei gleichbleibender Reizfrequenz von 0.17 Hz (= Reizintervall von 6000 ms) die ersten 39 V_{max}-Signale, sowie der 50., 75., 90. und 150. Wert aufgezeichnet. Die Reizfrequenz von 10/min gewährleistete, daß zwischen den Signalen ausreichend Zeit zur Verfügung stand, um die Signale auf dem Magnetspeicher (Floppy-Disk) des Speicheroszilloskops Nicolet festzuhalten.

Der letzte V_{max}-Wert vor der 30 minütigen Reizpause wurde auf 100% gesetzt und diente als Bezugswert für alle V_{max}-Wert der nach der Pause ausgelösten Aktionspotentiale. Da eine 30 minütige Reizunterbrechung bereits die APD verändert (Becher R und Ravens U, 1982) lag bei vereinzelten Versuchen der erste Wert unter Substanzwirkung oberhalb von 100% der Kontrolle vor der Reizpause. In der Berechnung der Mittelwerte über alle Versuche allerdings war das erste Signal (und auch die folgenden Signale) kleiner als 100% : für Verapamil ergab sich 97.8 ± 4.1% ($n = 7$, $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und für Mibefradil 90.5 ± 3.4% ($n = 4$, $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) bzw. 90.8 ± 2.7% ($n = 3$, $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l).

Für Verapamil wurde erwartet, daß der Ruhezustand eine verminderte Bindung der Substanz an den Kanal aufweist, und sich erst bei Wiederaufnahme der Reizstimulation, also periodischer Aktivierung der Kanäle, eine Zunahme der Kanalblockierung einstellt (Nawrath H und Wegener JW, 1997). Dieser, als „use-dependence“ beschriebene Effekt (Fang LM und Osterrieder W, 1991), macht sich als stetige Abnahme von V_{max} bis zum Erreichen einer Plateau-Phase bemerkbar.

3.5.1. Post-Pause-Versuche unter Verapamil

Nach 30 minütiger Reizpause zeigte Verapamil bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l nach Wiederaufnahme der Reizung eine stetig zunehmende Wirkung auf die maximale Aufstrichgeschwindigkeit V_{max} der ersten 20 Signale : Von zunächst 97,8 ± 4,1% sank V_{max} auf ein Plateau von im Mittel 75.6 ± 0.3% der Kontrolle und ließ auch nach 150 Reizen keine weitere Effektzunahme erkennen.

Mittels Kurvenanpassung mit einer monophasischen Exponentialfunktion wurde die Halbwertzeit $t_{½}$ der zeitabhängigen Substanzwirkung auf den Parameter V_{max} ermittelt. Nach im Mittel 7.34 Reizen (95%-Konfidenzintervall : p (6.46 , 8.49)) war der halbmaximale Effekt erreicht.

Dies entspricht einer Halbwertzeit von $t_{½} = 44$ s.

Die graphische Darstellung in Abb. 17 zeigt die Mittelwerte der „Post-Pause“-Veränderungen für den Parameter V_{max} von 7 Versuchen.

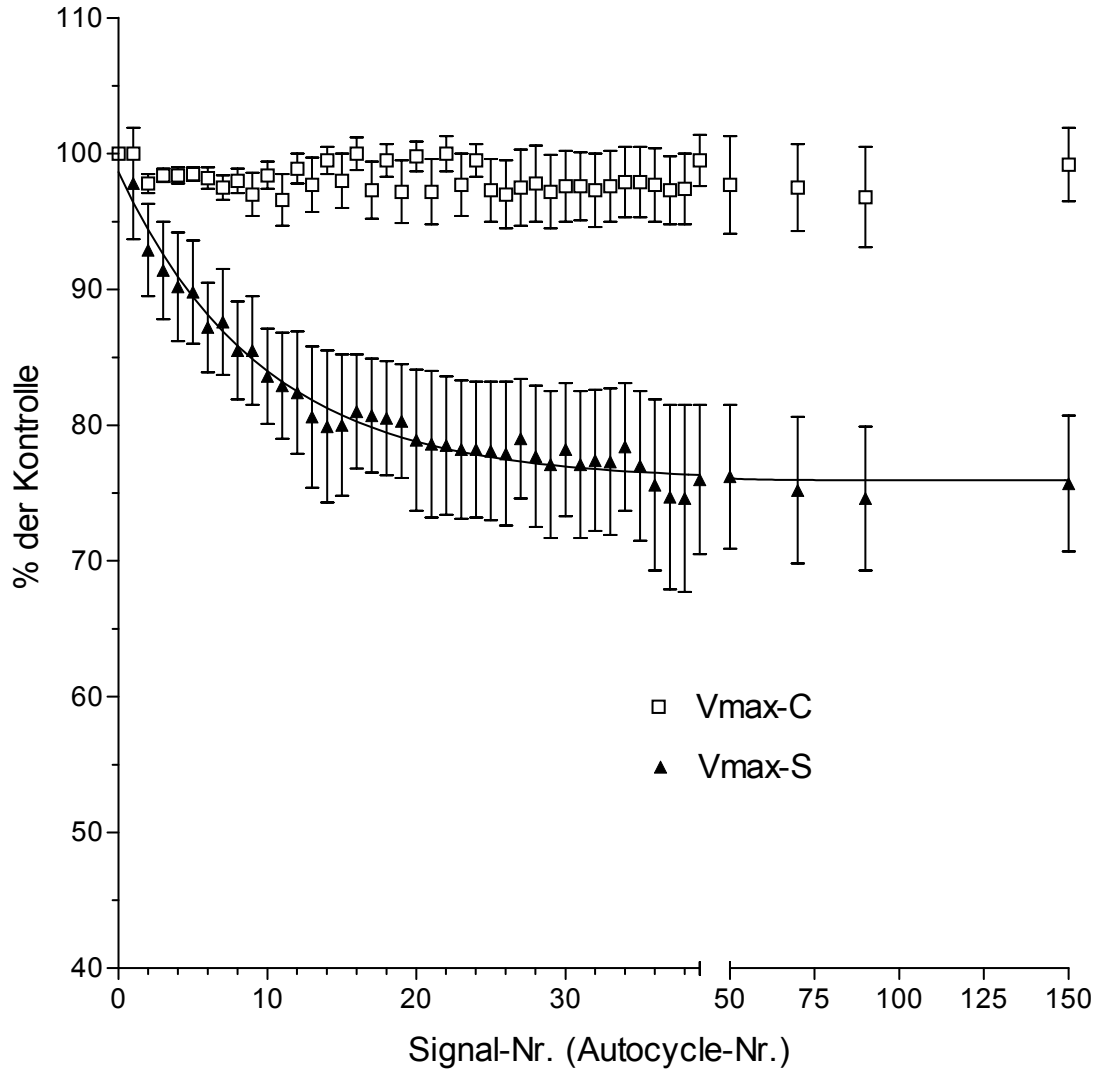


Abb. 17
„Post-Pause"-Versuch unter Verapamil $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l (n = 7). Dargestellt sind die ersten Signale nach Wiederaufnahme der Reizung im Anschluß an eine 30 minütige Reizpause für die Kontrolle (Vmax-C) und Verapamil (Vmax-S).
Für jeden Meßwert ist der Standardfehler (SEM) durch Balken eingezeichnet.

X-Achse : Nummer der Reizantwort nach der Reizpause
Y-Achse : maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} in Prozent des 1. Signals vor der Reizpause
Der Wert 0 auf der X-Achse entspricht dem „Prä-Pause"-Wert als Bezugswert.

Kurvenanpassung mittels monophasischer Exponentialfunktion für die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} unter Substanzwirkung

3.5.2. Post-Pause-Adaptation unter Mibefradil

Nach 30-minütiger Reizpause zeigten $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Mibefradil bei Wiederaufnahme der Reizung eine Verminderung von V_{max} der ersten Reizantwort um 9.5 ± 3.4% (n = 5), d.h. auf 90.5 % von V_{max} des 1. „Post-Pause"-Signals.
Die graphische Darstellung in Abb. 18 (s. S. 48) zeigt die Mittelwerte der Post-Pause-Veränderungen für den Parameter V_{max} von 5 Versuchen für $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l und für $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l.
Im Gegensatz zu Verapamil war bereits ab dem zweiten Signal eine Plateauphase erreicht. Durch die Kurvenanpassung konnte ein Plateau ermittelt werden, welches im Mittel bei 84.9 ± 0.2 % der Kontrolle lag. Die Berechnung der Halbwertzeit ergab sehr kleine Werte ($t_{½}$ = 0.67 s), was darauf zurückzuführen war, daß Mibefradil im Vergleich zu Verapamil nach Wiederaufnahme der Reizung nach einer Reizpause entweder wesentlich schneller den „activated state" der Kanäle blockiert, oder aber bereits ein erheblicher Anteil blockierter Kanäle im „rested state" vorlag (s. Diskussion).

Die Erhöhung der Konzentration auf $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l zeigte für die Post-Pause-Signale den gleichen Kurvenverlauf und führte zu einer weiteren Abnahme der Plateau-Werte auf im Mittel 77.2 ± 1.9% der Kontrolle. Die Berechnung der Halbwertzeit ergab $t_{½}$ = 1.38 s. Diese lag damit etwa 30 fach unter der Halbwertszeit von Verapamil.

Bei beiden Versuchsreihen (Verapamil und Mibefradil) konnte für die Kontrolle keine zeitabhängige Veränderung von V_{max} während der Post-Pause-Stimulation festgestellt werden.

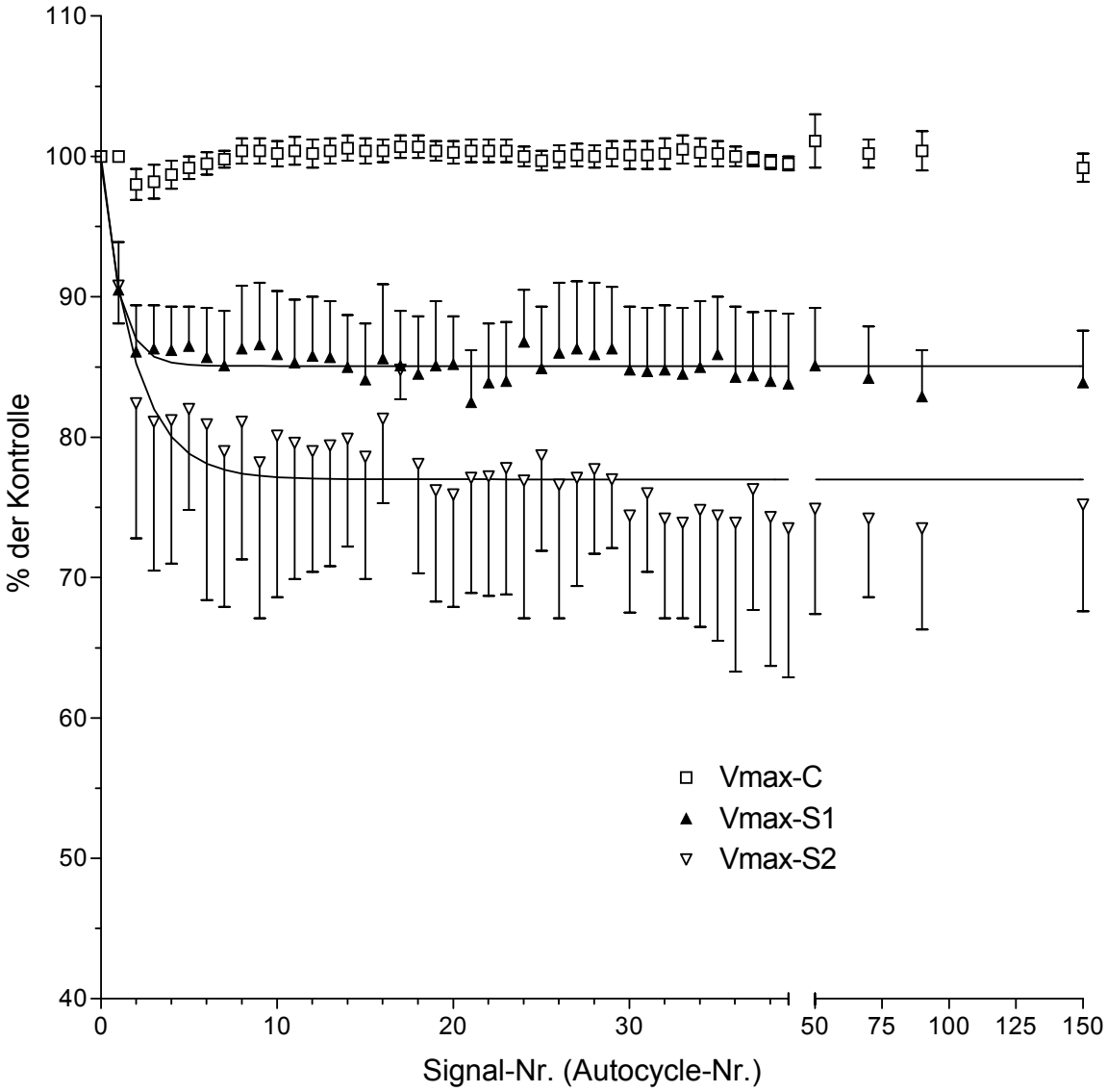


Abb. 18

„Post-Pause"-Versuch unter Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l (n = 5) und $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l (n = 3). Dargestellt sind die ersten Signale nach Wiederaufnahme der Reizung im Anschluß an eine 30 minütige Reizpause für die Kontrolle (Vmax-C) und Mibefradil $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l (Vmax-S1) bzw. $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l (Vmax-S2). Der Wert 0 auf der X-Achse entspricht dem „Prä-Pause"-Wert als Bezugswert.
Der Standardfehler (SEM) wurde der Übersichtlichkeit halber für $1 \cdot 10^{-6}$ mol nur nach oben und für $3 \cdot 10^{-6}$ mol nur nach unten dargestellt.

X-Achse : Nummer der Reizantwort nach der Reizpause
Y-Achse : maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} in % des 1. Signals vor der Reizpause

Kurvenanpassung mittels monophasischer Exponentialfunktion für die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} unter Substanzwirkung

4. Diskussion

Verapamil gehört nach der Einteilung von Vaughan und Williams (Vaughan und Williams, 1975) zur Gruppe 4 der Antiarrhythmika, deren Hauptwirkung auf die Blockade von L-Ca^{2+}-Kanälen, also des langsamen Ca^{2+}-Einstromes in die Myokardzelle zurückzuführen ist, ohne daß der schnelle Na^{+}-Kanal beeinflußt wird.
Diese vermeintlich homogene Gruppe stellt sich aber hinsichtlich chemischer Struktur, unterschiedlicher Bindungsstellen auf molekularer Ebene, Gewebeselektivität und vor allem klinischer Wirkung sowie therapeutischer Indikation als doch sehr heterogen dar. Dabei wird chemisch für die selektiven Ca^{2+}-Kanal-Blocker zwischen Dihydropyridinen, den Benzothiazepinen und den Phenylalkyaminen mit ihrem Vorreiter Verapamil unterschieden.
In letzter Zeit wurde aber auch über neuere Einteilungen diskutiert, wonach z.B. unter klinischen Gesichtspunkten zwischen den mehr modulierenden Substanzen (Verapamil wirkt insbesondere am AV-Knoten und Herzmuskel) und den vorwiegend gefäßerweiternden Substanzen (periphere Vasodilatation der Dihydropyridine) (Piepho RW und Fendler KJ, 1991) unterschieden wird.
Die Einteilung von Mibefradil mit seiner T-Ca^{2+}-kanalblockierenden Eigenschaft erfolgte bisher als „non-dihydropyridine“ in einer vierten Klasse von Kalzium-antagonisten (Bühler FR et al., 1996). T-Ca^{2+}-Kanäle, durch ein niedriges Schwellenpotential (-70 mV) aktiviert und durch rasche Inaktivierung charakterisiert, finden sich hauptsächlich in sinoatrialen Schrittmacherzellen und spontan aktiven Gefäßmuskelzellen (Cremers B und Böhm M, 1997). Das teilweise völlige Fehlen in Zellen des Arbeitsmyokards deutet darauf hin, daß sie für die Kontraktion der Ventrikelmyozyten ohne Bedeutung sind (Bean BP, 1989). Funktionelle Studien haben gezeigt, daß T-Ca^{2+}-Kanäle in der glatten Muskulatur (Mishra SK und Hermsmeyer K, 1994 b) und in humanen medullären Schilddrüsenkarzinom-Zellen (Mehrke et al., 1994) effektiver durch Mibefradil blockiert werden als L-Ca^{2+}-Kanäle. Es wurde deshalb angenommen, daß die Selektivität der Mibefradil-Wirkung für vaskuläres Gewebe auf die Blockierung von T-Ca^{2+}-Kanälen zurückzuführen ist (Mishra SK und Hermsmeyer K, 1994 a).

Die Rolle der T-Ca^{2+}-Kanäle ist aber letztlich noch nicht ausreichend hinsichtlich ihrer Bedeutung für den klinischen Alltag geklärt (Bühler FR et al., 1996). Vielmehr stellt sich nach wie vor die Frage, ob die pharmakologischen Eigenschaften von Mibefradil in therapeutischer Dosierung nicht eher auf ähnliche Wirkungsweisen zurückzuführen sind, wie sie z.B. für die L-Typ-Ca^{2+}-Kanalblockade unter Verapamil zu beobachten sind.

- **Dosis-Wirkungs-Kurven und Frequenzabhängigkeit**

In der vorliegenden Arbeit zeigen Verapamil und Mibefradil am K^+-depolarisierten Meerschweinchenpapillarmuskel ähnliche Wirkungen auf das Aktionspotential. Beide Substanzen senken konzentrationsabhängig die Aktionspotentialparameter. Die kalziumkanal-inhibitorische Wirkung dieser Substanzen ist erkennbar an der Verringerung der Plateaudauer des Aktionspotentials (APD 30 und 90) bei gleichzeitiger Abnahme der isometrischen Kontraktionskraft (Gettes LS und Reuter H, 1974). Verapamil zeigte eine signifikante Verminderung der Aktionspotentialdauer auf 30 und 90 %-igem Repolarisationsniveau (vgl. Abb. 5) ab $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Mibefradil bewirkte ebenfalls eine Verminderung der APD 30 / 90 (Abb. 8). Die signifikante Abnahme ab $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l erfolgte mit zunehmender Konzentration insgesamt aber weniger stark, was der Vergleich der EC_{50}-Werte für die APD 90 ergab : unter Verapamil $3.8 \cdot 10^{-6}$ mol/l, unter Mibefradil $8.5 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Vor allem aber zeigt sich die kalziumanatgonistische Wirkung an der Senkung von V_{max} der „slow response“, da gerade unter den Bedingungen der K^+-Depolarisation V_{max} ein direktes Maß für den Ca^{2+}-Einwärtsstrom darstellt (Malecot CO und Trautwein W, 1987). So beeinflußte Verapamil von den betrachteten Aktionspotential-parametern am stärksten die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} und erreichte bereits bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l eine Reduktion der Werte auf 31 ± 4 % der Kontrolle (s. Abb. 5). Mibefradil senkte von den Parametern der „slow response“ ebenfalls die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} am stärksten und führte zu einer Reduktion von V_{max} auf 30 ± 4% der Kontrolle bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Diese kalziumanatgonistische Wirkung wurde ferner durch die Änderung der Reizfrequenz, in der vorliegenden Arbeit durch sog. Frequenz-Treppen-Versuche, untersucht. Mit zunehmender Reizfrequenz nimmt die Ca^{2+}-Kanalblockade zu. Dieser auch als „use dependence blockade“ bezeichnete Effekt wurde zuerst an den Na^{+}-Kanälen des Meerschweinchenmyokards für Chinidin beschrieben (Johnson EA und McKinnon MG, 1957). Durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.05 auf 0.33 Hz verringerte $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil V_{max} auf 54.6 ± 6% der Kontrolle (s. Abb. 10). Mibefradil senkte V_{max} ebenfalls durch Erhöhung der Reizfrequenz von 0.05 auf 0.33 Hz : auf maximal 75 ± 5.3% der Kontrolle bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Mibefradil beeinflußte also die „slow response“-Parameter in ähnlicher Weise, allerdings waren hierfür höhere Konzentrationen erforderlich als für Verapamil, d.h. Mibefradil senkte die Aktionspotential-Parameter in einem weniger steilen Konzentrations-Wirkungs-Verlauf.

Die therapeutische Dosierung für Mibefradil wird von der Food and Drug Administration in den USA (1997) nach großen Multicenter-Studien mit 50 mg pro Tag (= $8.8 \cdot 10^{-5}$ Mol) angegeben. In höheren Dosierungen (200mg) mußten Patientenstudien abgebrochen werden wegen des Auftretens von ernsten Bradykardien (Schmitt R et al., 1992). Die hier teilweise verwendeten Konzentrationen liegen im klinischen Bereich. Die oben genannten, erst bei höheren Konzentrationen analogen Verminderungen der „slow response“-Parameter, könnten erklären, warum Mibefradil, in therapeutischer Dosierung angewendet, die für die herkömmlichen Kalziumantagonisten beobachteten Nebenwirkungen weniger aufweist (z.B. negative Inotropie (Bühler FR et al., 1996; Fang LM und Osterrieder W, 1991)).

Der für Verapamil erwartete, negativ inotrope Effekt (z.B. Chapell SP et. al., 1985) wurde durch die durchgeführten Versuche bestätigt. Mibefradil zeigte ebenfalls eine Verminderung der isometrischen Kontraktionskraft. Die in den „slow response“-Leerversuchen (s. Abb. 3) beobachtete Zunahme der Kontraktionskraft über eine lange Versuchsdauer hinweg (> 180 Minuten) wirft die Frage auf, ob der in Abb. 9 beschriebene negativ inotrope Effekt von Mibefradil nicht sogar unterbewertet ist. Die Kontraktionskraft stieg bei Erhöhung der Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ auf $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l in den Konzentrationswirkungskurven wieder leicht an auf über 50 % der Kontrolle. Die

durch die Einwirkzeiten für jede Konzentrationserhöhung verstrichene Zeit war im oberen Konzentrationsbereich für die Mibefradil Konzentrations-Wirkungs-Reihe länger als für Verapamil. Bei ähnlich langen Versuchsdauern in den „slow response"-Kontroll-Versuchen nahm die isometrische Kontraktionskraft zu. Bei hohen Konzentrationen unter Mibefradil war jedoch eine Abnahme der Kontraktionskraft zu sehen, die allerdings mit Blick auf die Leerversuche unterbewertet ist.

Insgesamt scheint aufgrund der Konzentrations-Wirkungs-Versuche der Unterschied zwischen Verapamil und Mibefradil hauptsächlich in der Lage der Konzentrations-Wirkungskurve auf der Konzentrationsachse zu liegen.

Die chemische Struktur von Mibefradil ist nach Angaben einiger Autoren von den bekannten Kalziumantagonisten deutlich verschieden (Clozel JP, 1997). Untersuchungen mit Hilfe von Molecular-Modelling-Verfahren jedoch weisen große Übereinstimmungen mit Verapamil hinsichtlich der räumlichen Ausdehnung, energetischen Konformation und Van-der-Waals-Kräfte auf (Höltje HD und Jessen G, 1998). Demnach müßte die Interaktion von Mibefradil mit dem Ca^{2+}-Kanal ähnlich sein.

Die Unterschiede in den Frequenz-Untersuchungen zwischen Verapamil und Mibefradil deuten jedoch darauf hin, daß von den Substanzen eventuell unterschiedliche Kanalzustände bevorzugt werden.

Nach einer Modellvorstellung (Abb. 19) für den Na^{+}-Kanal (Hodgkin AL und Huxley AF, 1990) durchlaufen die Kanäle während eines Aktionspotentials verschiedene Zustände, welche für die Interaktion mit kanal-blockierenden Substanzen von Bedeutung sind. Abb. 19 zeigt das modifizierte Modell vom modulierten Rezeptor (Hondeghem LM und Katzung BG, 1980). Durch die Abbildung wird deutlich, daß eine Substanz an drei verschiedenen Kanalzustände binden kann, bzw. die Affinität zum Kanal (mit ihren Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitkonstanten), zeit – und potentialabhängig, für die jeweiligen Kanalzustände unterschiedlich sein kann. Die im jeweiligen Zustand von der Substanz besetzten Kanäle (im Modell durch einen hochgesetzten Strich gekennzeichnet, s. Abb. 19) durchlaufen ebenso wie die unbesetzten Kanäle die potential- und zeitabhängigen Zustände R´, A´ und I´. Dieses Modell läßt sich durchaus auf den Ca^{2+}-Kanal übertragen.

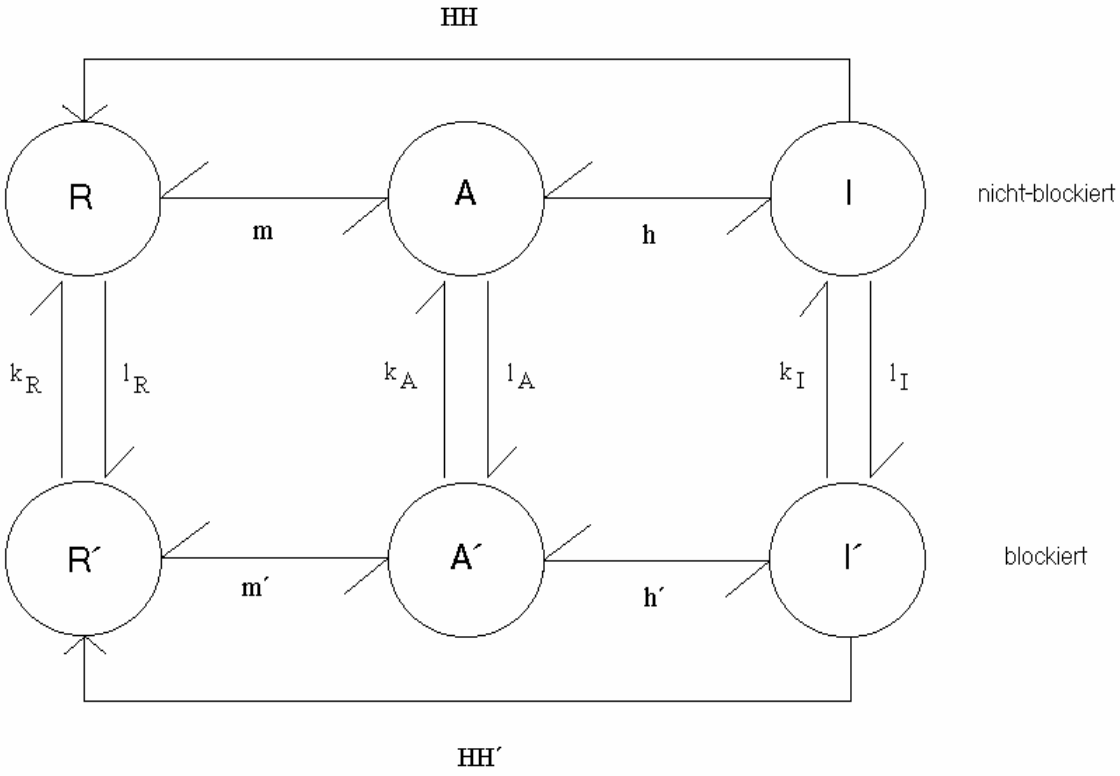


Abb. 19
Schematische Darstellung des modifizierten Hodgkin-Huxley-Modells (nach Hondeghem und Katzung, 1980) vom modulierten Rezeptor für Na^+-Kanäle. Gemäß einer Hodgkin-Huxley-Kinetik durchlaufen die Kanäle die Zustände R (Ruhe), A (aktiviert) und I (inaktiviert) welche durch das spannungsabhängige Aktivierungstor m und Inaktivierungstor h erreicht werden. Jeder Zustand weist eine Affinität zur Substanz auf, welche durch Assoziations- (k) und Dissoziations-geschwindigkeitskonstanten (l) bestimmt wird. Von der Substanz besetzte Kanäle (durch Strich gekennzeichnet) durchlaufen die Zustände R, A und I ebenso und zwar als R´, A´ und I´,sind aber blockiert, d.h. nehmen nicht an der Ionenleitung teil.

Für den Ca^{2+}-Kanal wird die entscheidende potential- und zeitabhängige Aktivierung bzw. Inaktivierung von zwei Kanaltoren bestimmt : dem d-Tor (Aktivierung) und dem f-Tor (Inaktivierung) (Borchard U und Hafner D, 1985). Durch diese Überlegungen kann z.B. unter anderem erklärt werden, warum Kalziumantagonisten eine unterschiedliche Gewebeselektivität aufweisen: durch die Erhöhung der Reizfrequenz

ändert sich der Aktivitätszustand des Kanals in der Form, daß statistisch gesehen die Wahrscheinlichkeit für den Zustand I (geschlossen, inaktiviert = nicht aktivierbar) zunimmt. Dadurch ändert sich die Affinität des Kanals zu seinem Inhibitor. Für Verapamil z.B. wird postuliert, daß die Affinität zunimmt (Nawrath H und Wegener JW, 1997). Dies wird in vivo durch die gute Wirksamkeit der Substanz am Vorhof bei supraventrikulären Tachykardien belegt. Hier liegt eine verstärkte Kanalaktivität vor, d.h. der inaktivierte Zustand wird bei Frequenzerhöhung verstärkt durchlaufen.
Die Potentialabhängigkeit der Ca^{2+}-Kanalinteraktion wird z.B. bei Verapamil und den Dihydropyridinen, mit ihrem Vorreiter Nifedipin, deutlich : sie wirken bevorzugt an der peripheren glatten Gefäßmuskulatur, in der ein positiveres Ruhemembranpotential als am Myokard vorliegt (Piepho RW und Fendler KJ, 1991).

- **Post-Pause-Versuche**

Die Interaktionen der Substanzen mit dem ruhenden, nicht aktivierten Kanal wurden mit Hilfe der „Post-Pause"-Versuche näher untersucht. Das erste Aktionspotential nach der Pause läßt Rückschlüsse zu auf eine während des Ruhezustandes der Membran eingetretene Bindung des Liganden an den Rezeptor. Außerdem kann verfolgt werden, wenn kein Ruheblock („rested-state blockade", RSB) eintritt, ob die anschließende regelmäßige Aktivierung der Kanäle zu einer Wechselwirkung mit der Substanz führt. Der Interaktionsvorgang kann mit zunehmender Aktivierungsfrequenz der Membrankanäle, also reizfrequenzabhängig, verstärkt werden und wird dann als „use-dependent blockade" (UDB) bezeichnet.
Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte in den Post-Pause-Versuchen zeigen für Verapamil ($1 \cdot 10^{-7}$ mol/l) eine nach der Pause gleichmäßig zunehmende Blockierung der Kanäle, bis nach ca. 40 Zyklen ($t_{½}$ = 44 sec.) ein Plateau erreicht ist. Ähnliche Wirkungen wurden in der Vergangenheit bereits für das Klasse-I-Antiarrhythmikum Chinidin beschrieben (Hirth et al., 1983). Es kann allerdings nicht sicher unterschieden werden, ob eine „activated state" oder „inactivated state blockade" vorliegt. „Voltage-clamp"-Untersuchungen deuten darauf hin, daß

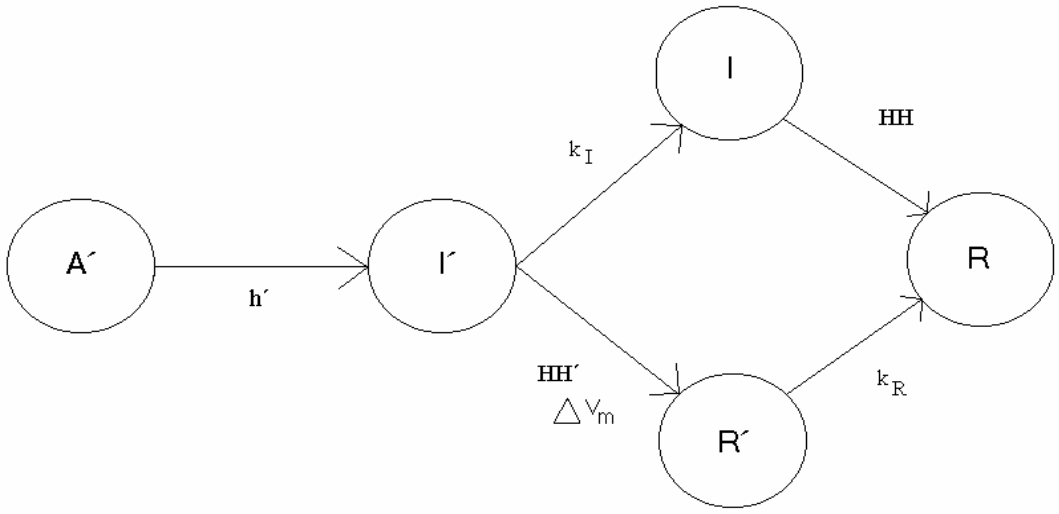
Verapamil den inaktivierten Zustand der Membran bevorzugt (Nawrath und Wegener, 1997; Mishra SK und Hermsmeyer K, 1994c).
Mibefradil zeigte während der Post-Pause-Versuche einen Wirkungsverlauf, der mehr dem Verhalten von Lidocain am Na^+-Kanal ähnelt (Borchard U und Hafner D, 1985; Hondeghem LM und Katzung BG, 1984). Die vorliegenden Versuche zeigten für beide Konzentrationen ($1 \cdot 10^{-6}$ und $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) einen nach der Stimulationspause initial einsetzenden Block für das erste Aktionspotential auf 90% der Kontrolle und erreichten bereits nach wenigen Reizen ein Plateau von im Mittel 84.9 ± 0.2 % ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) und 77 % ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l), d.h. die für Verapamil typische verzögerte V_{max}-Abnahme fehlte bei Mibefradil. Dies spricht entweder für eine Bindung von Mibefradil an den Kanal bereits im Ruhezustand oder für einen extrem schnell einsetzenden Aktivierungsblock, welcher einen „rested state block“ vortäuscht.
Andere Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, daß Mibefradil den Ruhe-Zustand des Ca^{2+}-Kanals bevorzugt (Mishra SK und Hermsmeyer K, 1994 a+c). An spontan aktiven glatten Gefäßmuskelzellen von neonatalen Ratten der Vena azygos konnten in der genannten Arbeit darüber hinaus bei Änderungen der Reizfrequenz keine „use-dependence“ Effekte erzielt werden.

- **Doppelreiz-Versuche**

Anders als bei den Post-Pause-Versuchen wurde hier durch die Aktivierungszyklen im Grundrhythmus unter Substanzwirkung eine „use-dependence“ eingestellt. Durch anschließend verfrüht einfallende Testreize konnte der Zeitgang der Wiedererholung der Kanäle näher untersucht werden. Für die Kontrolle ergibt sich die Erholung von der Inaktivierung, unter Substanzeinfluß die Erholung von der Inaktivierung unter „use-dependence“ (Courtney KR, 1975).
Nach der Versuchsbeschreibung in Kap. 2.4.3. und Abb. 14 läßt der zwischen dem Grundrhythmus gewählte Reizabstand von 6000 ms (10/min) den Kanälen in Abwesenheit des Kanalblockers ausreichend Zeit, in den Ruhezustand zurückzukehren.

Mit Hilfe einer biexponentiellen Funktion wurde die Erholungs-Kinetik des Parameters V_{max} bei verfrüht einfallenden Testreizen für Kontrollbedingungen und unter Substanzeinwirkung angepaßt. Dabei konnten für die betrachteten Konzentrationen $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l und $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l (Verapamil) bzw. $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l und $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l (Mibefradil) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung unter „use-dependence" entspricht also näherungsweise der Zeitkonstanten der „recovery from inactivation" unter Kontrollbedingungen.

Nach der Vorstellung des o.g. Modells ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Wiedererholung des Kanals zu seinem Ruhezustand R die Dissoziation der



Substanz vom Kanalzustand I´. Dies kann prinzipiell auf 2 Wegen erfolgen :

1. Der Kanal geht von I´ in den Zustand R´ über. Dieser Schritt ist spannungsabhängig und setzt voraus, daß eine Mindestpotentialdifferenz ΔV_m überwunden wird, damit die Substanz wieder leichter vom Kanal abdiffundiert.
2. Die Dissoziation vom Rezeptor über den Zustand I erfolgt spannungsunabhängig.

Die Versuche haben ergeben, daß Verapamil die absolute Refraktärzeit stärker verlängerte als Mibefradil. $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil verlängerte t_{test} um den Faktor 4.09, $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Mibefradil hingegen um den Faktor 2.84. Unterschiede zwischen beiden Substanzen bestehen demnach in der Wiederverfügbarkeit aktivierbarer Kanäle nach

reizbedingter Blockade (Rückkehr zu den wieder verfügbaren, aktivierbaren Kanälen mit Dissoziation des Liganden vom Rezeptor).

Zusammenfassend legen die Versuche nahe, daß beide Substanzen am L-Typ-Ca^{2+}-Kanal qualitativ ähnliche Wirkungen aufzeigen, daß jedoch für Mibefradil höhere Konzentration notwendig sind.
Die vorgelegten Untersuchungen zeigten folgende Unterschiede zwischen Verapamil und Mibefradil :

1. Unter Verapamil verlängerte sich die absolute Refraktärzeit stärker als unter Mibefradil (s. Tab. 7).
2. Mibefradil zeigte einen nach einer Reizpause schneller einsetzenden Aktivierungsblock als Verapamil.
3. Mibefradil zeigte einen weniger stark inotropen Effekt als Verapamil.

Mibefradil wurde aus dem Handel genommen, da durch Interaktionen mit dem Cytochrom-P_{450}-System der Leber (CYP 3A4), insbesondere mit β-Blockern, lebensgefährliche AV-Blockierungen auftraten. Dies unterstreicht die vorliegenden Befunde, daß eine deutliche L-Typ-Ca^{2+}-Kanal-Blockade bei Mibefradil vorliegt.

Abkürzungsverzeichnis

Ampl	Amplitude des Aktionspotentials
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
	z.B. auf 30%-igem, 90%-igem Repolarisationsniveau
EC_{50}	zur halbmaximalen Wirkung erforderliche Agonistenkonzentration
FC	Force of Contraction = isometrische Kontraktionskraft [mN]
L-Typ	Ca^{2+}-Kanal vom Typ „long lasting“
RFI	„Recovery from inactivation„
t_{test}	absolute Refraktärzeit, hier zwischen Grundreiz und Testreiz
T-Typ	Ca^{2+}-Kanal vom Typ „transient opening“
V_{max}	Definition : maximale Depolarisationsgeschwindigkeit zu Beginn des Aktionspotentials, physikalisch hier ohne Punkt-Symbol (eigentlich $\dot{V}_{max}$) in der vorliegenden Arbeit durchgehend verwendet
VOCC	voltage operated calcium channel
UDB	„use-dependence“

Literaturverzeichnis

1. BAKX AL, VAN DER WALL EE, BRAUN S, EMANUELSSON H, BRUSCHKE AV, KOBRIN I, 1995. Effects of the new calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967) on exercise duration in patients with chronic stable angina pectoris: a multicenter, placebo-controlled study. Ro 40-5967 International Study Group. *Am. Heart J.* 130:748-757.

2. BEAN BP, 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51:367-384.

3. BECHER R, RAVENS U, 1982. Post-rest adaptation of electrical and mechanical activity in the isolated guinea-pig papillary muscle. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 90:317-327.

4. BERNINK PJ, PRAGER G, SCHELLING A, KOBRIN I, 1996. Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): a new generation of calcium antagonists? Mibefradil International Study Group. *Hypertension* 27:426-432.

5. BORCHARD U, HAFNER D, 1985. Kardiale Elektrophysiologie von Na+ - und Ca2+ Kanal-Inhibitoren.In: Bender, Greef, eds. *Kombinationstherapie der Herzrhythmusstörungen mit Chinidin und Verapamil*. C Steinkopff Verlag Darmstadt, 83-99.

6. BORCHARD U, 1993. Kalziumantagonisten – Perspektiven für die 90er Jahre *W. de Gruyter Verlag. Berlin; New York 1993*

7. BROGDEN RN, MARKHAM A, 1997. Mibefradil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the management of hypertension and angina pectoris. *Drugs* 54:774-793.

8. BÜHLER FR, CLOZEL JP, TRIGGLE DJ, TSIEN RW, 1996. Mibefradil, a new class of calcium antagonists : from molecular biology to clinical benefit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Vol. 23, suppl.A:1-4

9. CARBONE E, LUX HD, 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.

10. CHAPELL SP, HENDERSON AH, LEWIS MJ, 1985. Frequency-dependent depression of myocardial contractility by slow calcium channel blocking drugs. *Eur.J.Pharmacol.* 110: 129-132

11. CLOZEL JP, OSTERRIEDER W, SCHMITT R, WELKER HA, 1991. Ro 40-5967 : A new nondihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews* 9:4-17.

12. CLOZEL JP, 1997. Entdeckung und allgemeine Pharmakologie von Mibefradil : Der erste selektive T-Calciumkanalblocker. *Cardiology* 88:4-8.

13. COLATSKY TJ, 1982. Mechanisms of action of lidocaine and quinidine on action potential duration in rabbit cardiac Purkinje fibers. An effect on steady state sodium currents? *Circ. Res.* 50 : 17-27.

14. COURTNEY KR, 1975. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195: 225-236.

15. CREMERS B, BÖHM M, 1997. Effects of the novel T-type calcium channel antagonist mibefradil on human myocardial contractility in comparison with nifedipine and verapamil. *J. Cardiovasc. Cardiol.:* 29:692-696.

16. EHARA T, INAZAWA M, 1980. Calcium-dependent slow action potentials in potassium-depolarized guinea-pig ventricular myocardium enhanced by barium ions. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 315:47-54.

17. FANG LM, OSTERRIEDER W, 1991. Potential-dependent inhibition of cardiac Ca2+ inward currents by Ro 40- 5967 and verapamil: relation to negative inotropy. *Eur. J. Pharmacol.* 196:205-207.

18. GETTES LS, REUTER H, 1974. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J. Physiol* 240:703-724.

19. GINTANT GA, HOFFMANN BF, 1984. Use-dependent block of cardiac sodium channels by quarternary derivatives of lidocaine. *Pflügers Arch.* 400: 121-129

20. HERMSMEYER K, 1991. Differences of calcium channels in vascular muscle in hypertension. *Am. J. Hypertens.* 4:412S-415S.

21. HIRTH C, BORCHARD U, HAFNER D, 1983. Effects of the calcium antagonist diltiazem on action potentials, slow response and force of contraction in different cardiac tissues. *J. Mol. Cell Cardiol.* 15:799-809.

22. HODGKIN AL, HUXLEY AF, 1990. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bull. Math. Biol.* 52:25-71.

23. HÖLTJE HD, JESSEN G, 1998. Mibefradil und Verapamil im Strukturvergleich. *Pharmazie* 1/2:41-42.

24. HONDEGHEM L, KATZUNG BG, 1980. Test of a model of antiarrhythmic drug action. Effects of quinidine and lidocaine on myocardial conduction. *Circulation* 61:1217-1224.

25. HONDEGHEM LM, 1978. Validity of Vmax as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys. J.* 23:147-152.

26. HONDEGHEM LM, KATZUNG BG, 1984. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:387-423.

27. JOHNSON EA, MCKINNON MG, 1957. The Differential Effect of Quinidine and Pyrilamine on the Myocardial Action Potential at Various Rates of Stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 120:460-468.

28. MALECOT CO, TRAUTWEIN W, 1987. On the relationship between V max of slow responses and Ca-current availability in whole-cell clamped guinea pig heart cells. *Pflugers Arch.* 410:15-22.

29. MEHRKE G, ZONG XG, FLOCKERZI V, HOFMANN F, 1994. The Ca(++)-channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L- type Ca++ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:1483-1488.

30. MISHRA SK, HERMSMEYER K, 1994 a. Inhibition of signal Ca2+ in dog coronary arterial vascular muscle cells by Ro 40-5967. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24:1-7.

31. MISHRA SK, HERMSMEYER K, 1994 b. Selective inhibition of T-type Ca2+ channels by Ro 40-5967. *Circ. Res.* 75:144-148.

32. MISHRA SK, HERMSMEYER K, 1994 c. Resting state block and use independence of rat vascular muscle Ca++ channels by Ro 40-5967. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269:178-183.

33. NAWRATH H, WEGENER JW, 1997. Kinetics and state-dependent effects of verapamil on cardiac L-type calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355:79-86.

34. OPIE LH, BÜHLER FR, FLECKENSTEIN A, HANSSON L, HARRISON DC, POOLE-WILSON PA, SCHWARTZ A, VANHOUTTE PM, BRAUNWALD E,

NAYLER WG, 1987. International Society and Federation of Cardiology: Working Group on Classification of Calcium Antagonists for Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.* 60:630-632.

35. PIEPHO RW, FENDLER KJ, 1991. Antihypertensive therapy in the aged patient. Clinical pharmacokinetic considerations. *Drugs Aging* 1:194-211.

36. PURVES RD, 1980. The mechanics of pulling a glass micropipette. *Biophys. J.* 29:523-529.

37. RICHARD S, NEVEU D, CARNAC G, BODIN P, TRAVO P, NARGEOT J, 1992. Differential expression of voltage-gated Ca(2+)-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1160:95-104.

38. SARSERO D, FUJIWARA T, MOLENAAR P, ANGUS JA, 1998. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 125:109-119.

39. SCHMITT R, KLEINBLOESEM CH, BELZ GG, SCHROETER V, FEIFEL U, POZENEL H, KIRCH W, HALABI A, WOITTIEZ AJ, WELKER HA, 1992. Hemodynamic and humoral effects of the novel calcium antagonist Ro 40-5967 In patients with hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52:314-323.

40. SKRBO A, ZULIC I, HADZIC S, GAON ID, 1999. Anatomic-therapeutic-chemical-classification of drugs. *Med. Arh.* Vol. 3, suppl. 3 : 57-60

41. VAUGHAN EM, WILLIAMS DM, 1975. Classification of antidysrhythmic drugs. *Pharmacol. Ther. [B]* 1:115-138

42. WALTON M, FOZZARD HA, 1979. The relation of Vmax to INa, GNa, and h infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys. J.* 25:407-420

Lebenslauf

Name	Brauser
Vorname	Olaf, Rudolf
Geburtsort	Heerlen, Niederlande
Geburtstag	25.07.1973
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Heinz-Dieter Brauser, Oberstudienrat, Dipl.-Ing. Elektrotechnik Louise Brauser, Hausfrau
Schullaufbahn	Grundschule Tönisvorst 1979 - 83 Städtisches Gymnasium Thomaeum Kempen 1983 - 92
Zivildienst	Mobiler Sozialer Hilfsdienst Stadt Tönisvorst 1992 - 93
Hochschullaufbahn	Winter 93 : 1. Semester Biologie Sommer 94 – Frühjahr 2001 Humanmedizin Staatsexamen Medizin in Düsseldorf
z.Zt.	Arzt im Praktikum : HNO-Abteilung (Prof. Dr. med. A. Kurzeja) im Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf seit 01.10.2001

Zusammenfassung

Elektrophysiologische Untersuchungen zur kalziumantagonistischen Wirkung des T-Kanal-Blockers Mibefradil am Ventrikelmyokard des Meerschweinchens

Medizinische Dissertation von *Olaf Brauser*, 2002

Die Wirkung von Verapamil und Mibefradil auf die Aktionspotentialparameter V_{max}, APD 30, APD 90, Amplitude und isometrische Kontraktionskraft wurden in der vorliegenden Arbeit am depolarisierten Meerschweinchenpapillarmuskel mit Hilfe von intrazellulären Ableitungen durch konventionelle Glasmikroelektroden untersucht.

Bei einer Reizfrequenz von 0.167 Hz senkte Verapamil die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit V_{max} von im Mittel 94.3 % (4.15 V/s) bei $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l auf 30.9 % (1.36 V/s) bei $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l bezogen auf die Kontrolle. Mibefradil zeigte im Vergleich eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit insgesamt weniger steilem Verlauf und senkte V_{max} von im Mittel 97.8 % (2.90 V/s) der Kontrolle (2.96 V/s) bei $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l auf 27.0 % (0.80 V/s) bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Der EC_{50}-Wert für den Parameter V_{max} lag für Verapamil bei $8.97 \cdot 10^{-7}$ mol/l, für Mibefradil bei $1.43 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Beide Substanzen zeigten eine deutliche Frequenzabhängigkeit der Wirkung auf die „slow response“ : $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil senkte V_{max} signifikant ($p < 0.05$) von 3.77 V/s = 74.5 % (Kontrollwert : 5.06 V/s) bei 0.05 Hz Reizfrequenz (Reizintervall 20 s) auf 2.2 V/s = 54.5 % (Kontrollwert : 4.04 V/s) bei 0.33 Hz (Reizintervall 6 s).
$1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Mibefradil senkte V_{max} signifikant ($p < 0.05$) von 2.44 V/s = 91.4 % (Kontrollwert : 2.67 V/s) bei 0.05 Hz Reizfrequenz auf 1.52 V/s = 76.8 % (Kontrollwert : 1.98 V/s) bei 0.33 Hz.

In den durchgeführten Doppelreiz-Versuchen zeigten sowohl Verapamil als auch Mibefradil nahezu keinen Einfluß auf den Zeitgang der Kanal-Wiedererholung (recovery from inactivation). Beide Substanzen verlängerten jedoch in unterschiedlichem Ausmaß die Refraktärzeit der „slow response“ unter Grundreizstimulation von 0.33 Hz (Reizintervall 6 s) : Verapamil um den Faktor 4.09 bzw. 7.78 bzw. 14.60 bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l bzw. $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l bzw. $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l und Mibefradil um den Faktor 2.84 bzw. 4.20 bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l bzw. $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Die Interaktion der Substanzen mit dem Kalzium-Kanal im Ruhezustand wurde durch Hinzufügen der Substanz zu Beginn einer 30-minütigen Stimulationspause untersucht (Post-Pause-Versuche). Sie war für Verapamil und Mibefradil unterschiedlich : die Abnahme von V_{max} erfolgte mit einer Halbwertzeit von $t_{½}$ = 44 s unter $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l Verapamil bei einer Reizfrequenz von 0.33 Hz. Für Mibefradil ergab sich eine Halbwertzeit von $t_{½}$ = 0.67 s bzw. 1.38 s für die Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}$ bzw. $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Die Untersuchungen deuten darauf hin, daß Mibefradil bei deutlich höheren Konzentrationen ähnliche L-Typ-Ca^{2+}-Kanal blockierende Eigenschaften besitzt wie Verapamil.