

**Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung des  
Phenylalkylamins Verapamil und des Tetralins Mibefradil auf die  
 $K^+$ -Ströme  $i_{to}$  und  $i_{K1}$  sowie den Calciumstrom  $i_{si}$  an isolierten  
ventrikulären Kardiomyocyten der Ratte**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Klaus Mester**

aus

Soest

Bonn 2002



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Dr. U. Borchard

2. Referent: Prof. Dr. K. Mohr

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.



*„Manches hat in der Theorie einen trügerischen Glanz und erweist sich in der Praxis dennoch als ruinös. Manches sieht in der Theorie schlecht aus und erweist sich in der Praxis als ausgezeichnet.“*  
EDMUND BURKE in „The Impeachment of Warren Hastings“, 1788

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1. Problemstellung	8
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1. Versuchstiere	10
2.2. Einzelzellen	10
2.3. Zellisolation	11
2.4. Patch-Clamp-Technik	17
2.4.1. Meßkonfiguration	18
2.4.2. Voltage-clamp-Messungen	20
2.4.3. Current-clamp-Messungen	21
2.5. Aufbau des Meßplatzes	21
2.5.1. Funktionsprinzip des Verstärkers	21
2.5.2. Registrierung und Auswertung der Membranströme	24
2.5.3. Meßtisch und mechanische Komponenten	25
2.5.3.1. Mikroskop	25
2.5.3.2. Meßtisch	26
2.5.3.3. Mikromanipulator	26
2.5.3.4. Versuchsbäder	27
2.5.4. Elektrophysiologischer Versuch	28
2.5.4.1. Herstellung der Patchpipetten	28
2.5.4.2. Versuchsdurchführung	29
2.6. Verwendete Lösungen	31
2.7. Substanzen und Geräte	34
2.7.1. Untersuchte Wirkstoffe	34
2.7.2. Hilfsstoffe	35
2.7.3. Geräte	35
2.8. Statistik	37

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1. Transiente Auswärtsströme in der Rattenmyocyte	38
3.2. Vergleich der Wirkungen von Mibefradil und Verapamil auf den langsam inaktivierenden $K^+$ -Auswärtsstrom $i_{to,s}$	45
3.2.1. Effekte von Mibefradil auf den $i_{to,s}$	45
3.2.2. Effekte von Verapamil auf den $i_{to,s}$	50
3.2.3. $i_{to}$ -Tail-Ströme	55
3.3. Vergleich der Wirkungen von Mibefradil und Verapamil auf den schnell inaktivierenden $K^+$ -Auswärtsstrom $i_{to,f}$	59
3.3.1. Effekte von Mibefradil auf den $i_{to,f}$	59
3.3.2. Effekte von Verapamil auf den $i_{to,f}$	62
3.4. Versuche zum einwärtsgleichrichtenden Kaliumstrom $i_{K1}$	64
3.4.1. Hemmung durch Barium-Ionen	66
3.4.2. Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf den $i_{K1}$ -Strom	67
3.4.3. Veränderungen der Membranleitfähigkeit des $i_{K1}$ -Stroms	72
3.5. Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf den $i_{si}$	75
<b>4. Diskussion</b>	<b>86</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>96</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>108</b>





## 1. Einleitung

Mit über 430000 Sterbefällen jährlich zählen Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Mehr als ein Drittel dieser Todesfälle wird durch einen Myokardinfarkt oder durch sonstige ischämische Herzkrankheiten verursacht.

Die Entwicklung der Calciumantagonisten wurde als einer der größten Fortschritte auf dem Gebiet der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts bezeichnet (Braunwald, 1990). Bereits 1964 beschrieb A. Fleckenstein eine Senkung des Energieverbrauchs des Herzmuskels durch Verapamil über eine Hemmung der Calcium-abhängigen elektromechanischen Kopplung (Fleckenstein, 1964). Aufgrund der Hemmung des langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstroms (L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal) prägte er den Begriff des „Calciumantagonismus“. Mit der Synthese des Nifedipins Ende der 60er Jahre (Bossert und Vater, 1971) und des Diltiazems Anfang der 70er Jahre in Japan (Sato *et al.*, 1971) waren die drei Prototypen einer neuen pharmakologischen Stoffklasse entwickelt worden.

Nach ihrer chemischen Struktur unterscheidet man 1,4-Dihydropyridine (Nifedipin-Typ), Phenylalkylamine (Verapamil-Typ) und Benzothiazepine (Diltiazem-Typ) (Opie *et al.*, 1987). Die Hauptindikationen dieser heutzutage verwendeten Calciumantagonisten sind die Behandlung der arteriellen Hypertonie, der stabilen und vasospastischen Angina pectoris und der supraventrikulären Arrhythmien (Sandmann und Unger, 1997). Die WHO (11/1996) ordnet heute Dihydropyridine (L-Typ) und Mibefradil (T-Typ) den Calciumantagonisten mit vorwiegend vaskulärem Effekt bzw. Phenylalkylamine (L-Typ) und Benzothiazepine (L-Typ) denen mit direkt kardialen Effekten zu.

Ziel der Arzneimittelforschung war es, Calciumantagonisten mit größerer Wirkstärke, verlängerter Wirkdauer und erhöhter Gewebeselektivität zu entwickeln. Der letztere Gesichtspunkt gewann besonders an Bedeutung, nachdem sich die negative Inotropie von Verapamil in Frühstadien des Herzinfarkts (Danish Study Group, 1986) oder die abrupte Herabsetzung des Blutdrucks von Nifedipin (HINT Research Group, 1986) als problematisch erwies. Die Entwicklung neuer Substanzen setzt die Kenntnis der verschiedenen Calcium-Kanal-Typen an Gefäßen, Myokard sowie Sinusknoten und anderen Abschnitten des kardialen Erregungsleitungssystems voraus.

Man unterscheidet beim Menschen sechs spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-,N-,P-,Q-,R- und T-Typ (Hofmann *et al.*, 1994; Varadi *et al.*, 1995). Im kardiovaskulären System sind lediglich T- und L-Kanäle von Bedeutung (Nilius *et al.*, 1985; Mitra und Morad, 1986). L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle findet man im Myokard und in der glatten Muskulatur, insbesondere der peripheren Gefäße. T-Kanäle kommen vorwiegend an peripheren und koronaren Gefäßmuskulaturzellen (Hermsmeyer, 1991), in neurohumoralen Zellen, im Sinusknoten und den Purkinje-Fasern (Bean, 1989) vor. Die Calciumkanäle unterscheiden sich in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften wie z.B. Schwellenpotential, Aktivierung, Inaktivierung und vor allem der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Calciumantagonisten.

Die Vertreter der ersten Generation weisen eine Reihe von unerwünschten Wirkungen auf. Bedeutendste nachteilige Wirkung von Diltiazem, Verapamil und Nifedipin ist ihre mehr oder weniger ausgeprägte negative Inotropie (Schwinger *et al.*, 1990). Zur Behandlung von Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion sind sie daher ungeeignet, während ihr Einsatz bei der koronaren Herzkrankheit differenzierter gesehen werden muß. Verapamil (Hansen, 1991) und Diltiazem (Gibson, 1991) sind hier einsetzbar, da sie im Unterschied zu Nifedipin keine reflektorische Tachykardie verursachen, die auf einer Aktivierung des peripheren und des kardialen sympathischen Nervensystems (Corea *et al.*, 1979; Saito *et al.*, 1986) beruht. Weitere unerwünschte Wirkungen bei der Behandlung mit L-Typ-Calciumantagonisten der ersten Generation sind Beinödeme, Kopfschmerzen und spezifisch für Verapamil die Obstipation (Man-in't-Veld, 1989). Darüberhinaus ist ihr pharmakokinetisches Profil gekennzeichnet durch einen „First-pass“-Metabolismus, relativ kurze Plasmahalbwertszeit und eine niedrige Bioverfügbarkeit, die zu stark variierenden Plasmakonzentrationen führt (Reid *et al.*, 1988). Weiter sind proischämische (Egstrup und Andersen, 1993), prohämorrhagische (Furberg *et al.*, 1995; Wagenknecht *et al.*, 1995) und proarrhythmische Wirkungen (Furberg und Psaty, 1995) aufgezeigt worden. Besonders ausgeprägt ist beim Verapamil die negativ-inotrope Wirkung (Boyd *et al.*, 1988), so daß für die Entwicklung neuer Calciumantagonisten eine hohe Selektivität für vaskuläres Gewebe und eine geringe kardiodepressive Wirkung gefordert wurde.

Bei der 2. Generation der Calciumantagonisten, wie z.B. Amlodipin besteht sowohl eine längere Wirkdauer als auch eine höhere Selektivität für die Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur (Packer *et al.*, 1996). Ein langsames Anfluten von Amlodipin sorgt für eine langsame Drucksenkung, so daß die über Barorezeptoren ausgelöste reflektorische

Tachykardie als Antwort auf einen plötzlichen Abfall des systemischen Widerstands nicht auftritt.

Mit der Entwicklung einer neuen Substanzklasse, der T-Kanal-selektiven Calciumantagonisten erhoffte man sich Verbesserungen in der Behandlung der Angina pectoris, der arteriellen Hypertonie und vor allem der Herzinsuffizienz.

Erster Vertreter dieser Klasse ist Mibefradil (Prüfname Ro 40-5967), das 1986 von Dr. F. Marti (Hoffmann-la-Roche Ltd., Basel) synthetisiert wurde und keinem der drei bisher bekannten Typen von Calciumantagonisten zugeordnet werden konnte. Chemisch betrachtet ist es ein substituiertes Tetralinderivat, das selektiv an Calciumkanälen vom T-Typ (Mishra und Hermsmeyer, 1994) und in höheren Konzentrationen auch an die spannungsabhängigen Dihydropyridin-sensitiven Calciumkanäle vom L-Typ (Mehrke *et al.*, 1994) bindet.

T-Typ-Calciumkanäle sind nur kurz („transient“) geöffnet bzw. schnell inaktiviert und werden bei einem negativeren Schwellenpotential (ca. -70 mV) als die L-Typ-Kanäle (ca. -10 mV) aktiviert. In vielen ventrikulären Kardiomyocyten fehlen T-Kanäle und somit auch ihre Beteiligung an der Kontraktion (Bean, 1989). Dagegen wirken sie an der spontanen Erregungsbildung im Sinusknoten mit (Bean, 1989; Godfraind, 1994). Eine Hemmung durch Mibefradil hat in der Regel eine Frequenzverlangsamung zur Folge (Chapelle *et al.*, 1994). Zahlreiche präklinische Modelle belegen, daß Mibefradil im Gegensatz zu Verapamil und Diltiazem in Dosierungen, die gleich stark vasodilatierend sind, nicht negativ inotrop wirkt (Clozel *et al.*, 1989, 1990). Dank seiner guten Verträglichkeit, seines langsamen Anflutens in Verbindung mit einer hohen Bioverfügbarkeit (ca. 90%) bei einmal täglicher Verabreichung sowie einer langen Plasma-Halbwertszeit (17-25h) (Clozel *et al.*, 1991) war Mibefradil ein vielversprechender Arzneistoff. Die günstige Kombination von Vasodilatation und einer moderaten dosisabhängigen Senkung der Herzfrequenz sorgen für einen antiischämischen Effekt, der bei gleichzeitiger Nachlastsenkung eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung des ischämischen Myokards ermöglicht.

Unter den Handelsnamen **Posicor®** und **Cerate®** wurde Mibefradil im September 1997 zur Behandlung der stabilen Angina pectoris und der arteriellen Hypertonie in der Bundesrepublik Deutschland zugelassen.

Die Verwendbarkeit von Mibefradil für die Therapie der Herzinsuffizienz wurde in der sogenannten MACH I-Studie (Mortality Assessment in Congestive Heart Failure) untersucht. Diese wurde im Frühjahr 1998 beendet mit dem Ergebnis, daß Mibefradil bei 2590 Patienten mit Herzinsuffizienz des Schweregrades NYHA III und IV (auf dem Boden einer

ischämischen oder nicht-ischämischen Kardiomyopathie) und einer Auswurfleistung kleiner 35% nach einer mittleren Therapiedauer von 26 Monaten zu einer nicht-signifikanten Mortalitätszunahme um 11% führte (Levine, 1997; Elkayam, 1998). Die Studie zeigte jedoch ein ausgeprägtes Interaktionspotential von Mibefradil mit einer Vielzahl anderer zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzter kardiovaskulärer Medikamente. Grund war die Hemmung der zum Cytochrom-P450-System gehörenden Isoenzyme CYP-3A4 und CYP-2D6 durch Mibefradil und seine Stoffwechselprodukte. Angesichts der zahlreichen Hinweise auf diese Wechselwirkungen mit Mibefradil vertrat die FA. Roche im Falle **Posicor®** die Ansicht, daß die erforderliche Produktinformation in der täglichen Praxis zu aufwendig wäre und nahm das Arzneimittel im Juni 1998 vom Markt. Wenig später stellte auch die FA. Asta Medica AWD die Auslieferung von **Cerate®** ein.

Da die physiologische Rolle der T-Kanäle an der glatten Muskelzelle (Akaike *et al.*, 1989) und an Zellen des Sinusknotens (Hagiwara *et al.*, 1988) nur unzureichend bekannt ist, stellt sich die Frage, ob die pharmakodynamischen Wirkungen von Mibefradil auf der Hemmung von T-Kanälen oder möglicherweise auch auf einer Blockade von L-Kanälen beruhen. Radioliganden-Bindungs-Versuche zeigen, daß Mibefradil sowohl mit der Phenylalkylamin-, der Indolizinsulfon- als auch mit der Benzothiazepin- jedoch nicht mit der 1,4-Dihydropyridin-Bindungsstelle interagiert (Rutledge und Triggle, 1995). Mibefradil vermag demnach diese Stoffe aus ihrer Bindung zu verdrängen. Die  $pK_a$ -Werte des als Enantiomer eingesetzten Dihydrochlorids betragen für die Benzimidazolyl-Gruppe 4,8 und für die tertiäre Amino-Gruppe 5,5 (Abernethy, 1997), so daß beim physiologischen pH-Wert Mibefradil, im Gegensatz zum kationisch amphiphil sich darstellenden Verapamil, überwiegend ungeladen vorliegt. Mit Hilfe von „Molecular-Modelling-Untersuchungen“ wurde ein Strukturvergleich zwischen Verapamil und Mibefradil hinsichtlich Elektronenverteilung (quantenchemisch), Raumerfüllung und Van-der-Waals-Volumina vorgenommen (Höltje und Jessen, 1998). Trotz strukturell unterschiedlicher Moleküle fanden die Autoren gleichartige Wechselwirkungsmöglichkeiten mit dem Rezeptor, so daß sie einen analogen Wirkmechanismus und identische Bindungsstellen postulierten. Demnach sollte Mibefradil auch L-Typ-Calciumkanäle und umgekehrt Verapamil auch T-Kanäle hemmen.

## 1.1. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit werden mit Hilfe der „Patch-Clamp“-Technik die elektrophysiologischen Wirkungen von Verapamil und Mibefradil verglichen, um zu klären, ob es den Wirkungsmechanismus betreffende Unterschiede gibt.

Dazu wurden Versuche mit isolierten ventrikulären Kardiomyocyten der Ratte im „whole-cell“-Modus durchgeführt.

Da bislang keine Untersuchungen über die Wirkung von Mibefradil auf den transienten Kaliumauswärtsstrom  $i_{to}$  vorliegen, beschäftigt sich der erste Teil der Arbeit mit den Effekten der beiden zu untersuchenden Substanzen auf das potential- und zeitabhängige Verhalten des schnell inaktivierenden  $i_{to,f}$ -Stroms sowie der langsamen Komponente  $i_{to,s}$  und ihrem Tailstrom.

Weiterhin wurde der Einfluß von Verapamil und Mibefradil auf den einwärtsgerichteten Kaliumstrom  $i_{K1}$  und die Leitfähigkeit der entsprechenden  $K^+$ -Kanäle untersucht.

Ferner wurden Versuche am L-Typ-Calciumkanal durchgeführt, um mit Hilfe von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen Aussagen über die Selektivität beider Substanzen für kardiale  $Ca^{2+}$ -Kanäle zu erhalten. Aufgrund der Annahme, daß Mibefradil und Verapamil ähnliche Wechselwirkungen mit dem  $Ca^{2+}$ -Kanal-Rezeptor eingehen können, sind speziell die Untersuchungen zur zeitabhängigen Inaktivierung des  $i_{si}$ -Stroms von Interesse. Diese ermöglichen Aussagen über die Art der Bindung in den Zuständen „rested“, „activated“ und „inactivated“ der beiden Substanzen.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Auf der Suche nach einem Modellpräparat, welches dem humanen Myokard hinsichtlich der Ionenströme ähnlich erschien, wurde in den Anfängen der „Patch-clamp“-Versuche das ventrikuläre Myokard des Meerschweinchens favorisiert. Es weist einen langsam aktivierenden  $i_K$ -Strom auf (in der Literatur als „delayed outward rectifier“ bezeichnet (Hume *et al.*, 1990)), der vorwiegend die Repolarisation bestimmt. Allerdings fehlen starke transiente Auswärtsströme, wie sie im humanen Ventrikel vorkommen (Wettwer *et al.*, 1994), beim Meerschweinchen. Dies grenzt die Übertragbarkeit der Untersuchungen stark ein.

Aus den oben genannten Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit ventrikuläre Rattenmyozyten verwendet, die sich für elektrophysiologische Untersuchungen seit langem bewährt haben.

Für die Versuche wurden männliche „Wistar“-Ratten mit einem Gewicht von 140g bis 150g eingesetzt. Sie wurden speziell für Versuchszwecke von der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet.

### **2.2. Einzelzellen**

Der Arbeitsgruppe von Hamill und Neher war es erstmals gelungen, Einzelzelluntersuchungen mit Hilfe der Spannungsklemmtechnik durchzuführen (Hamill *et al.*, 1981).

Aus isolierten Herzen lassen sich mit Hilfe der Langendorff-Apparatur Kardiomyocyten gewinnen, die mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften näher untersucht werden. Einzelzellen bieten gegenüber Zellverbänden in Gewebepreparaten eine Reihe von Vorteilen (Powell, 1985). Hier sind die geringeren Ströme der Einzelzellen und damit weniger kapazitiven Ströme zu nennen. Desweiteren wird in der Arbeit von Isenberg und Klöckner (1994) darauf hingewiesen, daß sich das Membranpotential aller Zellen eines Gewebes nicht so gleichmäßig und schnell ändern kann wie es bei einer isolierten Zelle der Fall ist.

### 2.3. Zellisolation

Die Kardiomyocyten umkleidet eine Matrix aus Proteinen wie z.B Kollagen und Elastin, die ein mechanisches Stützgerüst bilden. Darüber hinaus sind benachbarte Zellen im Bereich der Glanzstreifen („intercalated discs“) durch Desmosomen („tight junctions“) und elektrische Synapsen („gap junctions“) untereinander verbunden. Diese Strukturen gilt es bei der Isolation selektiv zu entfernen, ohne jedoch Oberflächenstrukturen wie Ionenkanäle und Rezeptoren zu zerstören oder zu schädigen. Die „tight junctions“ müssen voneinander abdissoziieren, damit eine mechanische Trennung der Zellen möglich wird. Eine weitere Voraussetzung für die Gewinnung isolierter Kardiomyozyten ist bei ihrer Trennung der geschlossene Zustand der „gap junctions“. Bei einer Öffnung würde sofort extrazelluläres Calcium einströmen und zu einer irreversiblen Hyperkontraktion des kontraktilen Apparates führen. „Gap junctions“ sorgen für eine schnelle Fortleitung der Erregungsfront während der Herzmuskelkontraktion und eignen sich daher besser zur Signalübertragung als chemische Botenstoffe. Die Modulation der elektrischen Synapsen in Bezug auf das Öffnungsverhalten und damit der Leitfähigkeit ist sowohl von der intrazellulären (White *et al.*, 1990) als auch von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Muir, 1967) abhängig und entscheidend für die Zellisolation. Die hauptsächliche Schwierigkeit bei der Trennung ist der Erhalt Calcium-toleranter Myozyten. Anfang der 70er Jahre wurden mit der Anwendung gereinigter Proteasen sowie Kollagenasen zwar Verbesserungen erzielt, die Calcium-Intoleranz blieb jedoch weiterhin ein Problem.

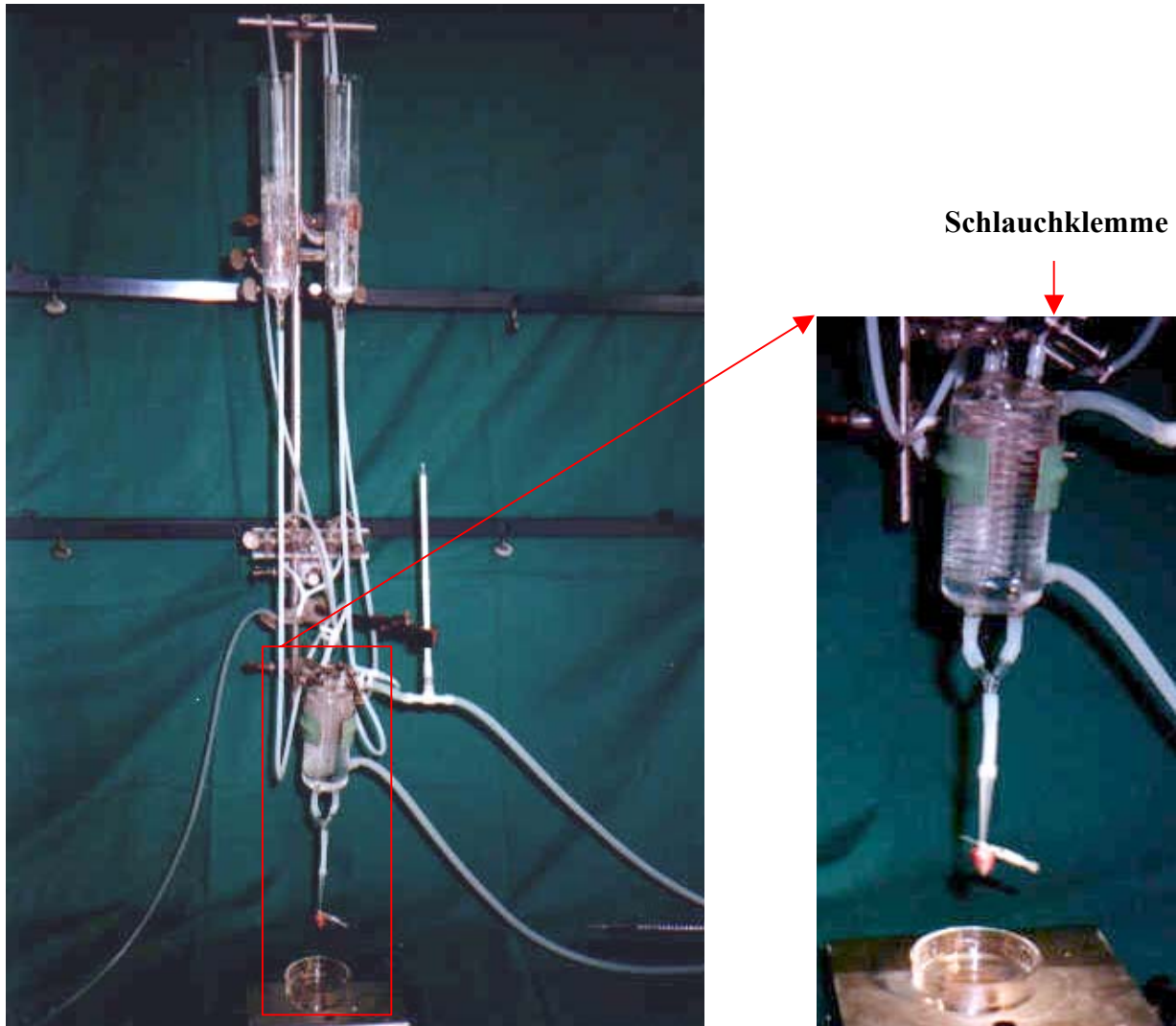
Eine Methode, die häufig zur Isolation von Kardiomyozyten angewendet wird, ist die Perfusion nach Langendorff, der erstmals die Funktion von kompletten, isolierten Frosch- und Warmblüterherzen unter künstlicher Koronarperfusion untersuchte (Langendorff, 1885). Es erfolgt eine retrograde Perfusion des gerade entnommenen Herzens mit definierten enzymhaltigen Lösungen über die kanülierte Aorta. Anschließend nimmt man das Herz von der Langendorff-Apparatur und zerschneidet es in einer Nährlösung, um danach die Einzelzellen zu extrahieren (Piper und Isenberg, 1989).

Die im folgenden beschriebene Zellisolationstechnik ist eine weitgehende Modifikation des von Isenberg und Klöckner (1982) aufgeführten Verfahrens.

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 140g bis 150g wurden durch  $\text{CO}_2$ -Begasung getötet. Anschließend wurden die beiden Carotiden durchschnitten. Nach



Freilegung des Herzens im geöffneten Toraxraum wurde es mit Thymusdrüse, Lunge und intaktem Aortenbogen aus dem Brustraum herausgeschnitten und in die auf 37 °C vorgewärmte nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung (Lösung I, Seite 31) überführt. Es folgte die Entfernung von Lunge und Thymus. Dann wurde am Truncus brachiocephalicus der Aortenbogen angeschnitten. Eine konisch zulaufende Pipettenspitze wurde in die Öffnung geführt, ohne die Aortenklappe zu beschädigen. Jetzt wurde die Aorta mit einer Bulldogklemme auf der Pipettenspitze fixiert und letztere auf den Schlauch der modifizierten Langendorff-Apparatur gesteckt (Abbildung 1, Seite 13). Mit Hilfe einer Glassinterfritte wurde für ausreichende Sauerstoff-Sättigung der Lösungen in den Glasrohren gesorgt. Sofern die Aortenklappen unbeschädigt waren, strömte nun nach Öffnung der Schlauchklemme (Abbildung 1, Seite 13) „Low  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung“ (Lösung I, Seite 31), die zuvor über einen Wärmetauscher auf 37 °C temperiert wurde, über die Koronararterien ins Myokard. Das Perfusat gelangte größtenteils (ca. 60 %) in den Sinus coronarius und passierte den rechten Vorhof und den rechten Ventrikel, um dann über den Truncus pulmonalis ins Freie zu fließen. Ein gewisser Teil des Perfusats erreichte über die sogenannten Thebesius-Gefäße direkt den Ventrikelraum. Die Aorta wurde unterhalb der Bulldogklemme mit einem Bindfaden an der Apparatur fixiert. Durch die Perfusion wurde das Herz entblutet und war somit thrombenfrei. Der hydrostatische Druck, der sich aufgrund eines Höhenunterschiedes von einem Meter zwischen Präparat und Lösungsbehälter ergab, betrug ca. 100 mbar. Bei ordnungsgemäßer Durchführung der Präparation sollten sich bekanntlich die beiden Ventrikel und Vorhöfe aufblähen und das Herz etwa das Doppelte seines vorherigen Volumens einnehmen. Weiter sollte auch eine Farbveränderung nach „zart rosa“ festgestellt werden. Unter diesen als optimal anzusehenden Bedingungen wurde mit Lösung I (Seite 31), die nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -frei war, für den Zeitraum von 2,5- bis maximal 3,5 Minuten perfundiert. Eine Perfusionsdauer von über 3,5 Minuten führte zu einer schlechteren Toleranz der Zellen gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Calcium-Paradox (Zimmermann und Hulsmann, 1966; Mitra und Morad, 1985)). Aufgrund des Fehlens von extrazellulärem Calcium dissoziierten die tight junctions voneinander ab, wodurch die Myozyten mechanisch voneinander gelöst wurden. Außerdem schlossen sich die gap junctions unter diesen Bedingungen und verhinderten so die oben beschriebene Hyperkontraktion. Die Zellen waren nun nur noch über eine interzelluläre Matrix miteinander verbunden, die es galt, mit Hilfe verschiedener Enzyme zu lysieren.



*Abbildung 1: Modifizierte Langendorff-Apparatur*

*Die Lösungen in den Glasbehältern wurden ständig mit Sauerstoff begast. Der Wärmetauscher sorgte für eine konstante Temperatur von 37 °C. Die Regulation der perfundierenden Lösungen erfolgte über einen Dreiweghahn bzw. eine Schlauchklemme.*

Oftmals werden für die Zellisolation unterschiedliche Kollagenasen (Boyle und Nerbonne, 1991) mit zum Teil stark differierenden Enzymaktivitäten verwendet. Nach eigene Erfahrungen ist es daher nicht ratsam, eine fixe Enzymkonzentration zu bestimmen, sondern vom Enzymtyp abhängig durch häufige Konzentrationsanpassung die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Für die in dieser Arbeit verwendete Kollagenase C-0130 von der Fa. Sigma mit einer „Collagen digestion activity“ von 289 units/mg solid galt eine Konzentration von 1 mg/ml als optimal. In der Literatur wurden sowohl die alleinige Verwendung von proteolytischen Enzymen (Mitra

und Morad, 1985) als auch Gemische von z.B. Kollagenasen mit Hyaluronidasen (Castle, 1990), Proteasen (Fermini *et al.*, 1992), Elastasen (Shibata *et al.*, 1989) oder Trypsin (Ogbaghebiel und Shrier, 1994) beschrieben. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Enzymaktivitäten variierten die angegebenen Enzymeinwirkzeiten zwischen wenigen Minuten und einigen Stunden. Zufriedenstellende Zellausbeuten ergaben sich unter Verwendung von 1 mg/ml Kollagenase C-0130, wenn die Perfusionsdauer 8 bis 10 Minuten betrug. In dieser Zeit wurden genügend Zellen enzymatisch herausgelöst. Bei längerer Einwirkzeit kam es zur Abnahme des Anteils intakter Zellen. Visuell war das Ende des Enzymdurchflusses erkennbar am leicht glasig schimmernden, auch teigig wirkenden Aussehen des Herzens, das sich durch die Lyse weiter aufgebläht hatte. Desweiteren nahm zum Ende der Enzymbehandlung die Geschwindigkeit der Perfusion zu. Die Kollagenase-Lösung (Lösung II, Seite 31) enthielt BSA (Bovine Serum Albumin) und 50-100  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CaCl}_2$ , um für eine ausreichende Aktivität der Kollagenase zu sorgen. Die Erhöhung der Calcium- Konzentration war zur Verhinderung des Calcium-Paradox (s.o.) notwendig. Nach der vorherigen langen Durchspülung mit der calciumarmen Lösung I konnten sich so die Zellen wieder langsam an die Calciumionen gewöhnen. BSA sollte als Protein zusätzlich die unspezifische Enzymaktivität verhindern. Da 50 ml von Lösung II normalerweise in weniger als 10 Minuten das Herz passierten, wurde das Perfusat aufgefangen und wieder in den Kreislauf zurückgeführt. Nach der Enzymperfusion wurde das Herz für ca. 3 Minuten mit Lösung III (Seite 32) durchspült, die auf 37 °C erwärmt und sauerstoffbegast war. Zum einen konnte so die Enzymlösung aus dem Gewebe gespült und zum anderen das Myokard mit der endgültig verwendeten Inkubationslösung (Lösung III, Seite 32) in Kontakt gebracht werden.

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Herz von der Langendorff- Apparatur abgenommen und in eine Petrischale, in der sich die auf 37°C temperierte Lsg. III befand, gelegt. Dort wurde das supraventrikuläre Gewebe abgetrennt und verworfen. Die übriggebliebenen Ventrikel wurden mit einer feinen Schere in Stücke von ca. 2 mm Kantenlänge zerschnitten. Mit vorsichtigem Schütteln wurden die Myocyten aus der verbliebenen Matrix herausgelöst. Der Überstand wurde dekantiert und die Ventrikelstückchen in ein Gläschen mit frischer Lösung III überführt. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit Lösung III aufgefüllt. Ein Zentrifugieren der Zellen war zum einen aufgrund dieser Reinigungsprozedur nicht notwendig und zum anderen nach eigenen Erfahrungen schädlich für die Myocyten. Denkbar ist eine mechanische oder durch Hypoxie bzw. Anoxie ausgelöste Schädigung. Die Zellen wurden für mindestens 60 Minuten in Lösung III unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine längere Verweildauer bis zu 10 Stunden in

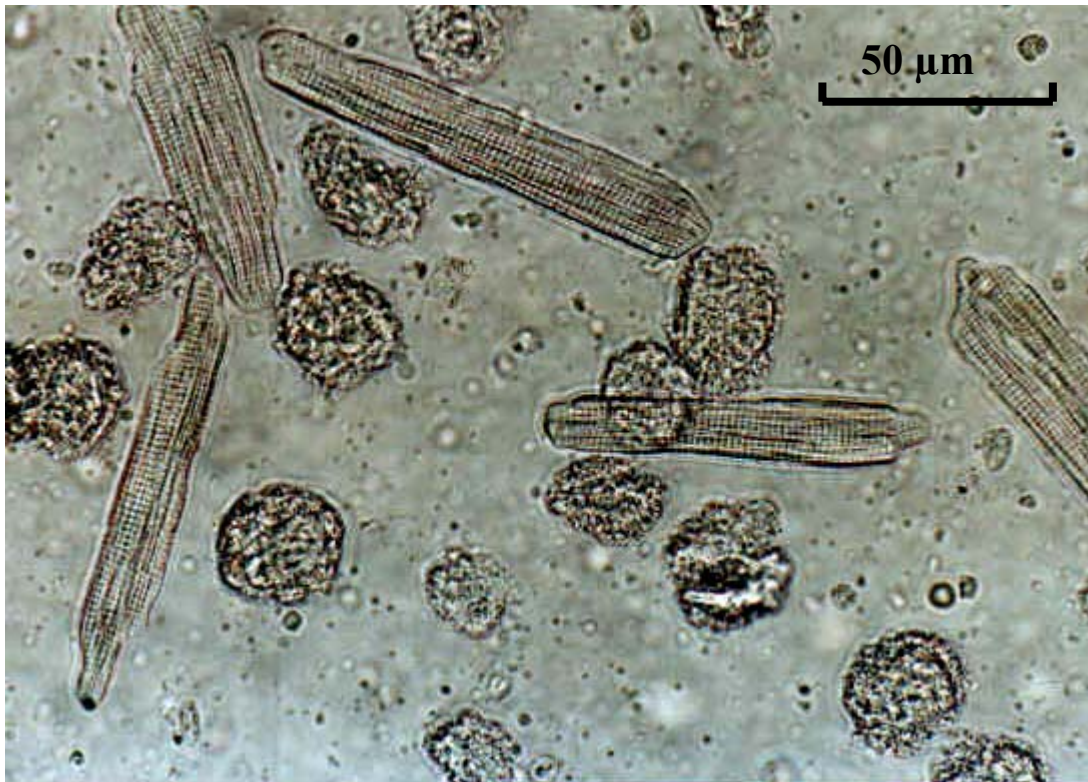
Lösung III oder eine erniedrigte Temperatur nahe dem Gefrierpunkt hatten nach eigenen Versuchen weder positive noch negative Auswirkungen auf die Zellen. Für den Erhalt calciumtoleranter Zellen war die Aufbewahrung in Lösung III unbedingt erforderlich, da so das Entstehen des „Calcium-Paradox“ (Zimmerman und Hülsmann, 1966) vermieden wurde, das in der Regel zur Zerstörung der Zelle führte.

Das „Calcium-Paradox“ läßt sich folgendermaßen beschreiben:

Wird die extrazelluläre Calciumkonzentration nach der Isolation der Zellen wieder auf ein physiologisches Niveau (ca. 1-2 mmol/l) angehoben, so kann man spontane u. rhythmische Kontraktionen der Zellen erkennen. Diese kontraktile Bewegungen setzen sich wellenartig über die gesamte Zelle fort. Wahrscheinlich wird dies durch Schwankungen der intrazellulären Calciumspiegel und nicht durch Membrandepolarisationen ausgelöst. Dieses belegen Membranpotentialableitungen von spontan kontrahierenden Zellen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dadurch bedingt kommt es zur spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, die zur irreversiblen Kontraktur des kontraktile Apparates führt. Die Zelle geht von der „rod-shaped“ (langgestreckt) in eine kartoffelartige Form über (Abbildung 2, Seite 16). Oftmals kommt es zu metabolischen Fehlfunktionen (Isenberg und Klöckner, 1982), die zum Energieverlust der Zelle beitragen.

Zur Vermeidung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung sind die in der Literatur häufig beschriebenen Kraftbrühen (KB) verwendet worden. Sie bestanden z.B. aus 155 mmol/l Kaliumionen, ATP, Pyruvat sowie einiger Aminosäuren (Isenberg und Klöckner, 1982). Auf diese Weise sollte sich die intrazelluläre Stoffwechsellage über Aktivierung von Ionenpumpen und Austauschern (Na-K-ATPase, Ca-ATPasen, Na-Ca-Austauscher) wieder normalisieren. Außerdem wurde der Kraftbrühe PVP und EGTA (Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure) zugesetzt. Eine Verbesserung der Calciumtoleranz der Zellen aufgrund dieser Zusätze konnte in der vorliegenden Arbeit in zahlreich durchgeführten Versuchen jedoch nicht festgestellt werden.

Der eigentliche Grund für die irreversible Hyperkontraktur liegt möglicherweise darin, daß die nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung I (Seite 31) durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Salze verschiedenster Art bis zu Konzentrationen von 10  $\mu\text{mol/l}$  verunreinigt sein dürfte, obwohl ihr kein Calcium zugesetzt wurde. Im Vergleich zur extrazellulären Konzentration ist diese zwar sehr gering, übertrifft jedoch die intrazelluläre ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) um Zehnerpotenzen (Leblanc und Hume, 1990), so daß durchaus noch weiter Calcium in die Zelle einströmen kann. Gespeichert wird es zuerst im sarkoplasmatischen Retikulum und zusätzlich in den Mitochondrien, die bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung eine typische Granulierung im Lichtmikroskop zeigen.



*Abbildung 2: Aufnahme vitaler und hyperkontrahierter Myocyten im Zellbad.*

*Intakte Zellen erkennt man an ihrer langgestreckten Form (rod shaped) und ihrer charakteristischen Querstreifung (striated). Ihre Länge beträgt ca. 70-140  $\mu\text{m}$ . Daneben befinden sich zahlreiche kartoffelähnliche Gebilde, die aufgrund ihrer Calciumintoleranz den Zelltod erlitten haben.*

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß während der Perfusion mit Lösung I die niedrige extrazelluläre Calciumkonzentration dazu führt, daß die Membranleitfähigkeit unspezifisch stark ansteigt (Isenberg und Klöckner, 1982). Eine Normalisierung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration würde jetzt, da noch immer eine erhöhte Leitfähigkeit besteht, zu einem starken Calcium-Influx führen. Die Speicherkompartimente können kein zusätzliches Calcium mehr aufnehmen, so daß das drastisch angestiegene cytosolische Calcium möglicherweise noch weiter die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigen läßt, indem es die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum triggert. Hinzu kommt ein zusätzlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aufgrund erhöhter Aktivität des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, ausgelöst durch den oben beschriebenen Leitfähigkeitsanstieg für  $\text{Na}^+$ -Ionen. Das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveau steigt letztendlich so stark an, daß die Hyperkontraktur unvermeidlich eintritt.

Um die Hyperkontraktur zu unterbinden und calciumtolerante Zellen zu erhalten, war es wichtig, nach der Perfusion mit Lösung I, die zu einer  $K^+$ -Verarmung und  $Ca^{2+}$ - und  $Na^+$ -Überladung führte, wieder für ein physiologisches Ionenmilieu zu sorgen. Dazu war es sinnvoll, die cytosolische  $K^+$ -Konzentration zu erhöhen und die  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu verringern. Die Entwicklung von Lösung III (Seite 32) führte zu dem gewünschten passiven Nettoinflux von  $K^+$  sowie Nettoefflux von  $Ca^{2+}$  und  $Na^+$  und brachte zufriedenstellende Ergebnisse. Hierfür war in erster Linie die stark erhöhte extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration verantwortlich (Harding und Duncan, 1994). Darüber hinaus wurde ein Nettoefflux von  $Ca^{2+}$  und  $Na^+$  durch die deutlich niedrigere extrazelluläre Konzentration beider Ionen im Vergleich zum Cytosol ermöglicht. Erreicht wurde dies durch Zugabe des spezifischen Chelatbildners EGTA zur Lösung III, die so eine sehr geringe Konzentration an freien Calciumionen (ca. 10 nmol/l) besaß. Darüber hinaus führte die hohe  $K^+$ -Konzentration der Lösung III zu einem passiven  $K^+$ -Einstrom. Möglicherweise kam es dadurch zur Normalisierung des  $K^+$ -Spiegels.

Es gibt aber auch Argumente, die dafür sprechen, daß eine hohe extrazelluläre Kaliumionenkonzentration, mit der Folge eines auf 0 mV erniedrigten Membranpotentials der Myocyten ( $K^+_{intra} = K^+_{extra}$ ), für ihren stabilen Zustand während der Perfusion und Lagerung sorgt. Bei 0 mV sind Calcium-Kanäle bekanntlich spannungsabhängig inaktiviert, so daß es zu keinem Calciuminflux kommen dürfte. Am Ende der Präparation sollte man calciumtolerante Zellen erhalten, die dem Aussehen der intakten Myocyten in Abbildung 2 (Seite 16) entsprechen.

Aber auch wenn die Form „rod shaped“ (langgestreckt) und die Oberfläche „striated“ (quergestreift) erschien, war dies keine Garantie, sondern nur eine Voraussetzung für eine elektrophysiologisch intakte Zelle. Nur wenn sie noch ein ausreichend langes und stabiles Aktionspotential aufwies, konnte mit den Messungen begonnen werden.

#### **2.4. Patch-Clamp-Technik**

Erste bahnbrechende Erkenntnisse in der Elektrophysiologie gelangen Hodgkin und Huxley (1952), als sie ein Aktionspotential an einer Riesennervenfaser des Tintenfisches ableiteten. Die Ergebnisse bewiesen erstmals, daß ein schneller und nur kurz anhaltender Natrium-Einwärtsstrom für die sprunghafte Depolarisation der Zellmembran verantwortlich ist und daß ein erst verzögert einsetzender, aber langanhaltender Kalium-Auswärtsstrom für die Repolarisation der Zelle sorgt. Damit konnte man von der Existenz selektiver, von der Zelle unterschiedlich gesteuerter Ionenkanäle ausgehen. Hodgkin und Huxley (1952) erfaßten jedoch

in ihren Versuchen alle Ionenbewegungen der Zelle, d.h. alle zum Zeitpunkt der Messung geöffneten Kanäle, durch die Ionen hindurchtraten.

Die beiden deutschen Wissenschaftler Erwin Neher (Physiker) und Bert Sakmann (Mediziner), die Anfang Dezember 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden, entwickelten das extrem empfindliche Verfahren der Patch-Clamp-Technik (Membranflechklemme (Hamill *et al.*, 1981)), mit dem sich einzelne Ionenkanäle in Echtzeit studieren lassen. Bert Sakmann sprach von der Möglichkeit, elektrische Signale in lebendem Gewebe mit hoher Auflösung zu registrieren und die „Gespräche“ von Zellen untereinander sozusagen zu „belauschen“.

Die Messung von Ionenströmen durch Einzelkanäle im Pikoampere-Bereich bereiteten damals erhebliche Schwierigkeiten. Das Hintergrundrauschen des Präparates überdeckte das eigentliche Meßsignal. Neher und Sakmann versuchten in den siebziger Jahren die Empfindlichkeit der Strommessung zu erhöhen. Sie isolierten kleine Membranflecke („patches“), indem sie fein ausgezogene Glaskapillaren mit Elektrolytlösung füllten und auf die Oberfläche aufsetzten. Ströme, die direkt unter der Pipettenöffnung flossen, sollten durch das schlecht leitende Glas von Strömen außerhalb der Pipette abgeschirmt werden. Der Durchbruch gelang im Januar 1980, als Neher durch Zufall entdeckte, daß der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran um drei Größenordnungen bzw. mehreren Zehnerpotenzen in den Gigaohm-Bereich („Gigaseals“) anstieg, wenn er eine sehr saubere, unbenutzte Pipette verwendete und beim Kontakt mit der Zelloberfläche einen leichten Unterdruck auf die Pipette einwirken ließ. Der enge Abstand zwischen Pipette und Membranfleck von etwa 0,1 nm sorgte für eine elektrische Isolierung und eine hohe mechanische Stabilität.

Mit dieser Technik war es möglich, den als Folge einer einzigen Kanalöffnung fließenden Ionenstrom, der je nach Konzentrationsgefälle von den für diesen Kanal spezifischen Ionen verursacht wird, zu erfassen (Neher und Sakmann, 1976; Neher *et al.*, 1978).

Über eine mit dem Zellinneren verbundene Elektrode und eine extrazelluläre Referenzelektrode können sowohl die oben erwähnten Ionenströme als auch die damit einhergehenden Änderungen des Membranpotentials gemessen werden (Abbildung 4, Seite 22).

#### **2.4.1. Meßkonfigurationen**

Bei der „Patch-Clamp“-Technik unterscheidet man verschiedene Meßkonfigurationen (Abbildung 3, Seite 19). In der vorliegenden Arbeit wurde die „Whole-cell“-Klemmtechnik verwendet.

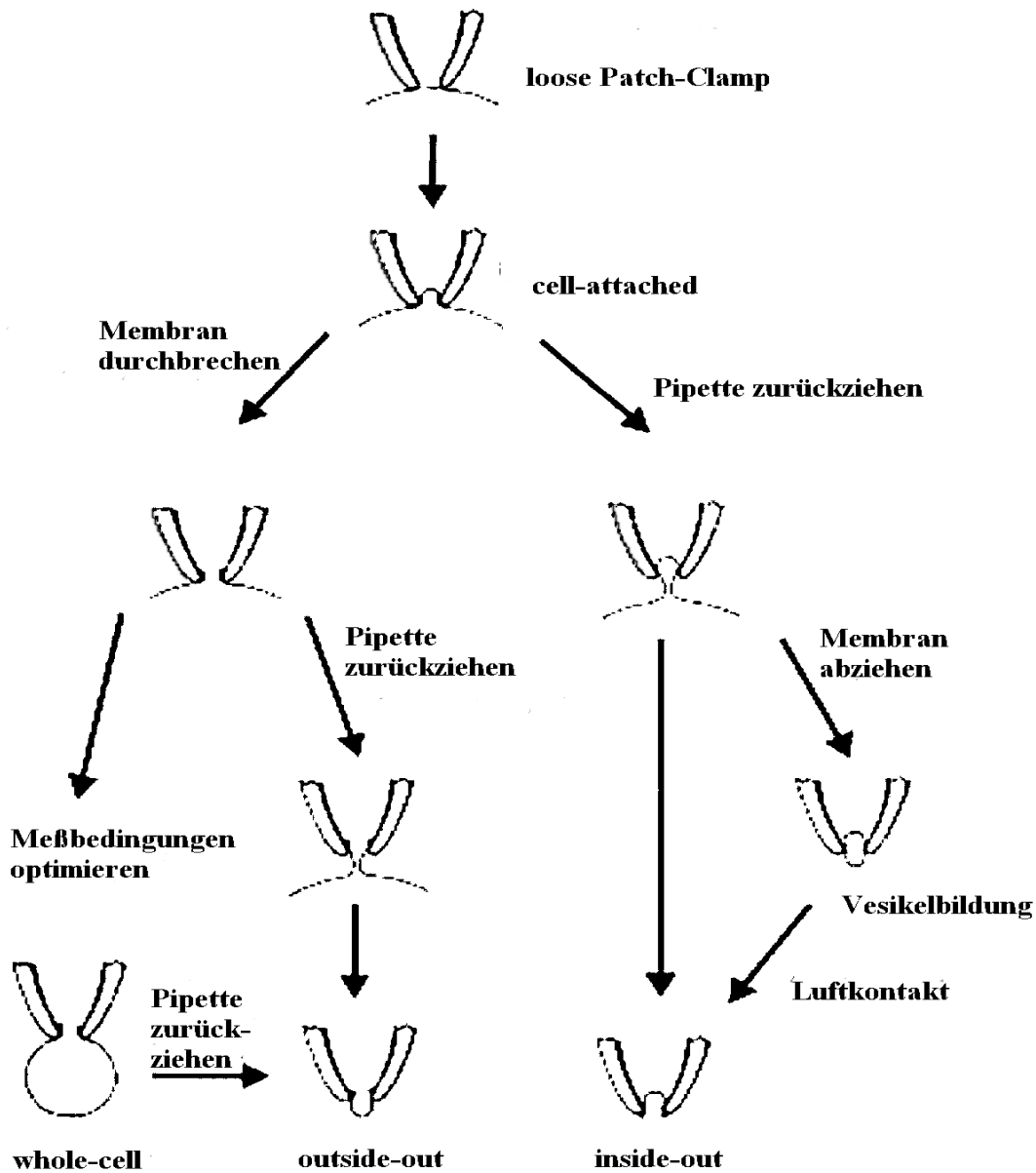


Abbildung 3: Die Messkonfigurationen und ihre Herstellung

Die Abbildung zeigt die vier wichtigsten Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und wie man sie im Prinzip herstellt (verändert nach Hamill et al., 1981). Mit dem Einsaugen der Zellmembran in die Pipette befindet sich das Präparat in der cell-attached-Konfiguration, wobei der Widerstand zwischen Pipetteninnerem und Bad im Bereich mehrerer Gigaohm liegen kann („Gigaseal“). Durchbricht man durch Anlegen eines höheren Unterdrucks im Pipetteninneren die Membran, so erhält man die whole-cell-Konfiguration. Durch unterschiedliche Manipulation lassen sich die Membranstücke so anordnen, daß entweder die ursprüngliche cytoplasmatische Seite der Zellmembran (inside-out-Konfiguration) oder die extrazelluläre Oberfläche (outside-out-Konfiguration) zur Badlösung weist. Bei niedrigen



*extrazellulären Calcium-Konzentrationen reißt die Membran bevorzugt so ab, daß die Innenseite zur Badlösung zeigt, daher auch der Name „inside-out“. Für den „outside-out“-Patch wird wie für die Ganzzellkonfiguration die Membran erst durchbrochen. Nach dem Abreißen von der restlichen Zelle verschließt sich die Membran unterhalb der Pipettenöffnung wieder und die Außenseite der Membran zeigt nun zur Badlösung.*

## **2.4.2. Voltage-Clamp-Messungen**

Zur Ableitung von Membranströmen und Membranspannungen muß die Meßpipette in Kontakt mit der Zellmembran treten. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Pipettenspitze vorsichtig auf die Zellmembranoberfläche gesetzt. Das Anlegen eines Unterdrucks sorgt dafür, daß ein Membranfleck (patch) in die Kapillare gesaugt wird. Dabei entwickelt sich ein Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran, der im Giga-Ohm-Bereich („Gigaseal“) liegt. Nun befindet sich das Präparat in der cell-attached-Konfiguration. Durch Einsaugen in die Pipette wird die Membran mehr oder weniger stark deformiert. Durchbricht man entweder durch Anlegen eines Unterdrucks im Pipetteninneren oder durch eine hochfrequente und hochamplitudige Wechselspannung die Membran, so erhält man die whole-cell-Konfiguration. Wenn dabei der hohe seitliche Leckwiderstand („seal“) erhalten bleibt und damit die Leckströme gering sind, mißt man jetzt alle elektrischen Ströme, die durch die gesamte verbleibende Membranfläche der Zelle fließen.

Ganzzellmessungen geben das makroskopische Strommuster einer Zelle wieder und entsprechen in gewisser Weise der herkömmlichen intrazellulären Ableitung mit sogenannten „scharfen“ Mikroelektroden jedoch mit deutlichen Unterschieden wie:

⇒ Kein Auftreten von Leckströmen durch Einstechen der Elektrode und damit Tolerierung von Ganzzelleableitungen auch bei sehr kleinen Zellen, die beim Einstechen intrazellulärer Elektroden absterben würden.

⇒ geringeres Rauschen durch den hohen Abdichtwiderstand und dadurch Erhalt von Auflösungen zwischen 5 bis 20 pA.

⇒ schneller Austausch zwischen Cytoplasma und Pipettenlösung mit dem Vorteil der klar definierten Zusammensetzung des Zellinneren. Ströme fließen aus der Pipette über die Zellmembran nach außen heraus und umgekehrt.

Bei der „whole-cell“-Anordnung sollte die Elektrolytlösung der Meßpipette ungefähr der intrazellulären Ionenverteilung (Kaliumkonzentration ca. 140 mmol/l) entsprechen.

### **2.4.3. Current-clamp-Messungen**

Oftmals ist es sinnvoll, in der „whole-cell“-Anordnung von dem „voltage-clamp“-Modus in die sogenannte „current-clamp“- oder Stromklemmanordnung umzuschalten, in der man einen definierten Strom durch die Membran fest vorgibt und das sich einstellende Potential mißt.

Auf diese Weise erhält man unmittelbar nach dem Durchbrechen der Membran bei Umschalten in den „current-clamp“-Modus das Membranruhepotential der Zelle. Mit Hilfe einer „current-clamp-command“-Einstellung am Verstärker ist es möglich, durch zunehmende Strominjektionen am Kommandoeingang Depolarisationen der Zellmembran auszulösen. Bei Erreichen der Reizschwelle lassen sich Aktionspotentiale der Myocyte beobachten und registrieren.

## **2.5. Aufbau des Meßplatzes**

### **2.5.1. Funktionsprinzip des Verstärkers**

Hauptaufgabe der Spannungsklemme ist es, ein gewünschtes Membranpotential an der untersuchten Zelle einzustellen. Sie erzeugt einen Kompensationsstrom, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, der diesem aber entgegengerichtet ist. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen, gewünschten Wert der Sollspannung verglichen wird. Jeder Unterschied zwischen der Sollspannung und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert einen Regelkreis, der einen entgegengerichteten Strom in die Zelle injiziert. Der Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp-Experimenten gemessen. Er läßt

unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von den Ionenkanälen oder Ionentransportern bestimmt wird. Abbildung 4 zeigt die Meßvorrichtung mit einem vereinfachten Schaltbild.

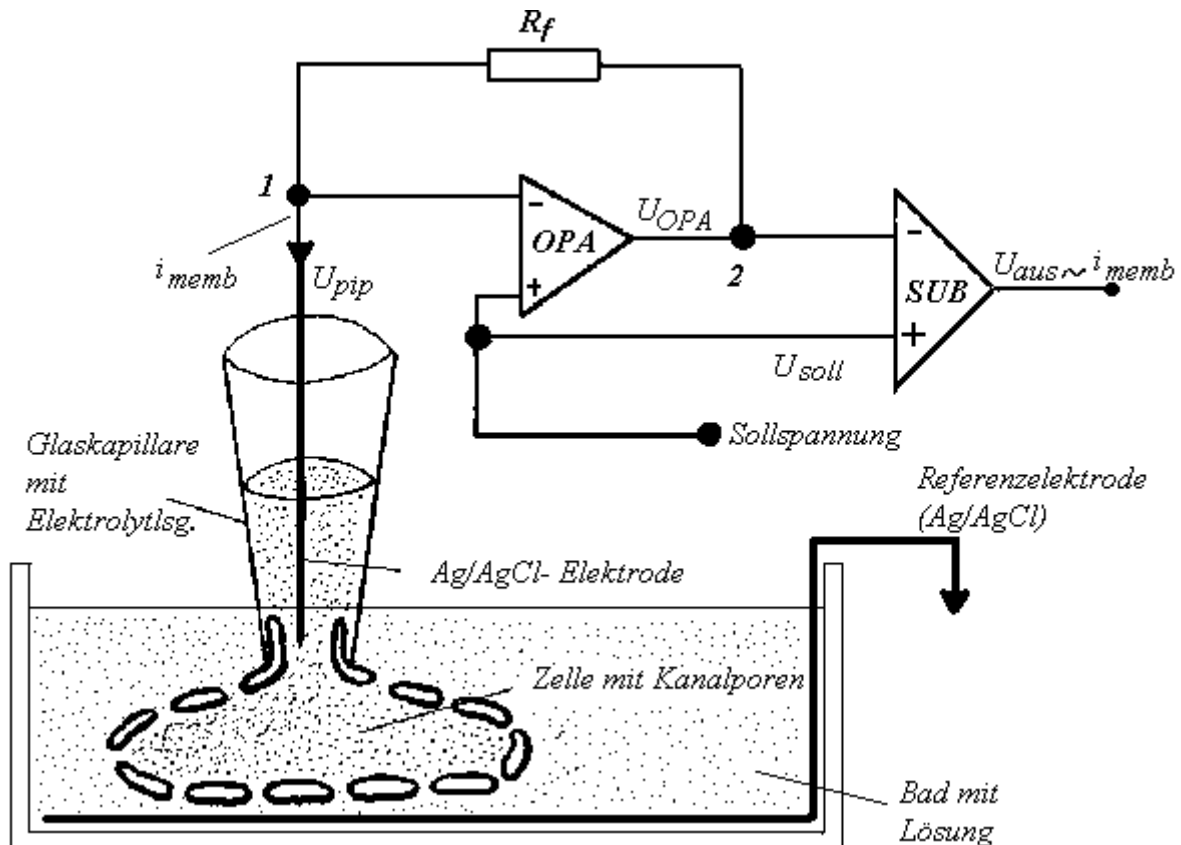


Abbildung 4: Meßvorrichtung

*OPA*: Operationsverstärker: Der Eingangswiderstand des Meßverstärkers (*OPA*) ist sehr hochohmig ( $>10^{12} \Omega$ ), damit nur vernachlässigbare Anteile des Membranstroms in den Verstärker fließen können.

*R<sub>f</sub>*: Rückkopplungswiderstand (mit *R<sub>f</sub>* wird der Zellmembranstrom gemessen)

*i<sub>memb</sub>*: Membranstrom

*U<sub>soll</sub>*: Sollspannung (setzt sich zusammen aus Stimulus, Offset und „Holding“-Potential)

*U<sub>OPA</sub>*: Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers ( $U_{OPA} = U_{soll} - i_{memb} \times R_f$ );

*R<sub>f</sub>* ist konstant

*U<sub>pip</sub>*: Pipettenpotential

*U<sub>aus</sub>*: Ausgangsspannung proportional zum gemessenen Zellmembranstrom

*SUB*: Subtrahierer oder Differenzverstärker

An den Eingängen des OPA liegen die Spannung der Pipette  $U_{\text{pip}}$  ((-)-Eingang, Punkt 1) und eine vom Experimentator vorzugebende Sollspannung  $U_{\text{soll}}$  ((+)-Eingang) an, die von der Steuereinheit des Verstärkers eingespeist wird. Weicht  $U_{\text{soll}}$  von  $U_{\text{pip}}$  ab, so entsteht am Ausgang des OPA (Operationsverstärkers) eine Spannung, die dieser Differenz proportional ist, aber durch Verstärkung sehr viel größer ist. Die unterschiedliche Spannung zwischen Punkt 1 und Punkt 2 verursacht einen Stromfluß durch  $R_f$ . Der extrem hohe Eingangswiderstand verhindert das Zurückfließen des Stroms in den OPA, so daß der in die Pipette fließende Strom ( $i_{\text{memb}}$ ) das Potential an Punkt 1 ( $U_{\text{pip}}$ ) ändert und solange fließt, bis keine Differenz mehr zwischen den beiden Eingängen ( $U_{\text{pip}}$  ist gleich dem Sollpotential) besteht. Auf diese Weise gleicht die Schaltung Abweichungen zwischen Pipetten- und Sollpotential aus und erzeugt zugleich an  $R_f$  eine Spannung, die proportional zu dem in die Pipette injizierten Strom ist. Der Ausgleich erfolgt so schnell ( $< 0,1$  ms, je nach Verstärkerleistung), daß das Pipettenpotential jederzeit gleich dem Sollpotential ist. Die Ausgangsspannung wird an die Steuereinheit weitergeleitet und kann von dort ausgelesen und mit einem entsprechenden Kalibrierungsfaktor (abhängig von der Größe von  $R_f$ ) in den Strom umgerechnet werden. Allerdings muß  $U_{\text{soll}}$ , wie in Abbildung 4 zu sehen, zuerst hinzu addiert und dann durch einen weiteren Differenzverstärker (SUB (Abbildung 4)) wieder abgezogen werden. Auf diese Weise läßt sich mit dem Voltage-Clamp-Verstärker eine Sollspannung der Zellmembran schnell aufzwingen, wobei das Potential der Zelle (genauer: der Pipette) stets gleich  $U_{\text{soll}}$  ist. Der hierzu notwendige Kompensationsstrom wird gemessen.

Angenommen, die Membran sei ein Ohmscher Widerstand, so besteht ein linearer Zusammenhang zwischen treibender Spannung und Strom, der durch  $U = R \times I$  beschrieben wird. Nun läßt sich die Leitfähigkeit  $G$  der Zellmembran als Kehrwert des Widerstandes über das Messen von Strom und Spannung bestimmen :

$$U = I/G \quad \text{oder} \quad G = I/U$$

Genauer läßt sich die Spannung  $U$  beschreiben als der Abstand der vorgegebenen Sollspannung  $U_{\text{soll}}$  vom Gleichgewichtspotential  $E_m$  der Zellmembran für diejenigen Ionen, die den zu messenden Strom tragen:

$$U = U_{\text{soll}} - E_m \quad \text{oder} \quad I = (U_{\text{soll}} - E_m) \times G$$

$E_m$	[V]	Potential, bei dem kein Strom durch den Ionenkanal fließt
$U_{soll}$	[V]	Sollpotential, das vom Experimentator vorgegeben wird
$U$	[V]	Spannung
$G$	[S]	Leitfähigkeit
$I$	[A]	Strom
$R$	[ $\Omega$ ]	Widerstand

Auf diese Weise erhält man über die aktuelle Leitfähigkeit  $G$  ein Maß für die gleichzeitig offenen Ionenkanäle der Membran beim Potential  $U_{soll}$ .

Bei dem hier verwendeten List EPC-7-Patch-Clamp-Verstärker unterscheidet man zwischen dem Vorverstärker, der das Stromsignal mißt und als Spannung wiedergibt, und dem Hauptverstärker mit der Steuereinheit. Letzterer kann das Signal verstärken und filtern und bietet außerdem die Bedienungsfläche für den Benutzer.

Der Vorverstärker ist mit einer Meßelektrode in der Meßpipette und mit der Bezugselektrode im Zellbad verbunden. Sowohl Referenz- bzw. Bezugselektrode (schematisch in Abbildung 4 dargestellt) als auch Meßelektrode bestehen aus chloriertem Silberdraht.

In Abbildung 4 ist der Schaltkreis des Vorverstärkers dargestellt, der nahe bei der Pipette angebracht ist und sämtliche Meßwerte zur Steuereinheit des Verstärkers liefert.

### 2.5.2. Registrierung und Auswertung der Membranströme

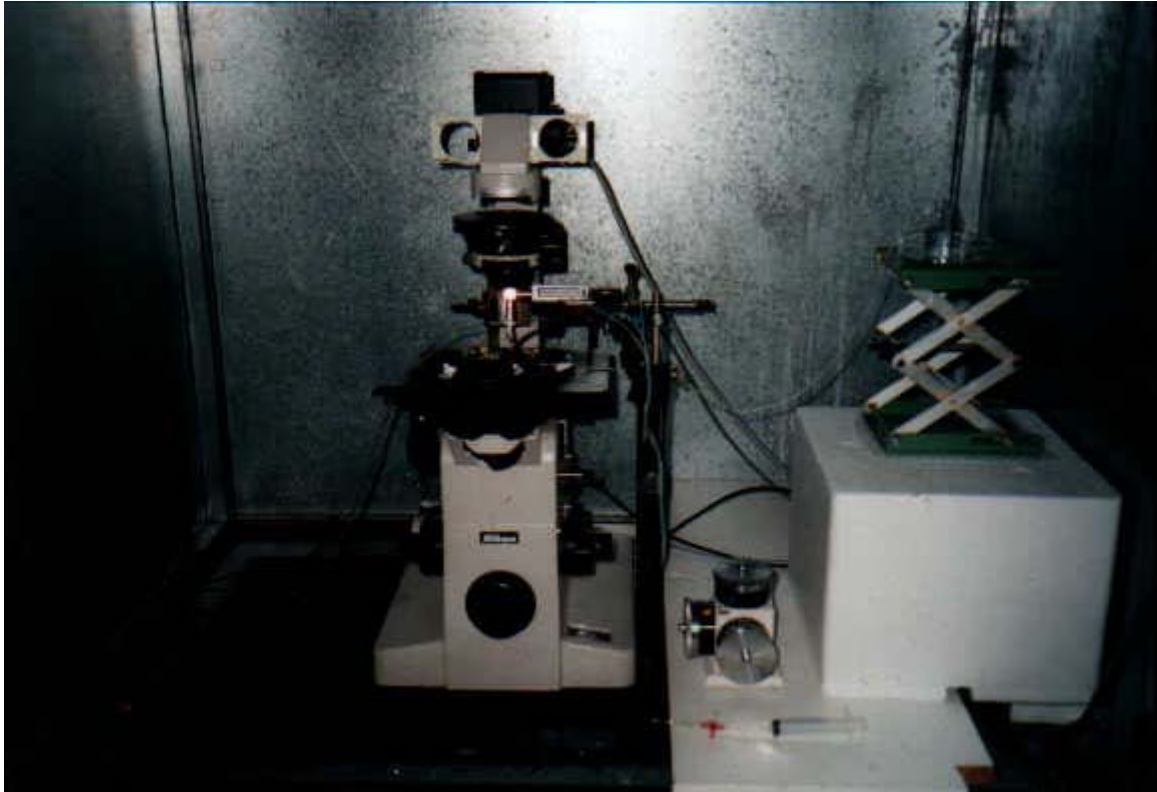
Bei den Experimenten wurde ein List EPC-7-Spannungsklemmverstärker eingesetzt. Die Kommandospannungssignale („voltage-clamp“-Modus) lieferte ein PC. Der im Current-Clamp-Modus vorgegebene Kommandostrom wurde von einem analogen Signalgenerator erzeugt (Konstruktion und Bau: J. Springer, Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf).

Der PC war ausgestattet mit einem Steuerprogramm zur Generierung von Signalmustern, die über einen nachgeschalteten 8-bit-D-A-Wandler den Spannungsklemmverstärker ansteuerten. Aktionspotentiale wurden in der Regel in Intervallen von 50-100  $\mu\text{s}$  abgetastet; die Kommandosignale und die Membranströme je nach Bedarf zwischen 100  $\mu\text{s}$  und 1 ms. Die Signalmuster und die entsprechenden Membranströme wurden auf einem Oszilloskop betrachtet, parallel über einen 12-bit-A-D-Wandler dem Rechner zugeführt und auf der Festplatte gespeichert. Die Auswertung der Signale erfolgte über ein spezielles Auswerteprogramm. Die Hard- und Software für die Registrierung und Auswertung der Meßdaten wurden von F.J. Katterbach und G. Chini erstellt.

### **2.5.3. Meßtisch und mechanische Komponenten**

#### **2.5.3.1. Mikroskop**

Um die Meßelektrode an die Kardiomyocyte heranzuführen und die Spitze der Patchpipette präzise auf die Zellmembran aufsetzen zu können, ist eine gute Optik notwendig. An der Meßelektrode bildet sich beim Eintauchen in die Badlösung ein Meniskus. Aufgrund unregelmäßiger Lichtbrechung an der Krümmung der Flüssigkeitsoberfläche ist die Beobachtung der Zellhaftung von oben unmöglich. Daher wurde ein inverses Mikroskop verwendet, bei dem das Objektiv nach oben gerichtet ist und das Präparat von unten durch einen durchsichtigen Plexiglasboden des Zellbades betrachtet wird. Zum Fokussieren wird beim inversen Mikroskop nicht der Mikroskoptisch, sondern das Objektiv auf und ab bewegt. Dieses ist für die Stabilität der Meßanordnung notwendig.



*Abbildung 5:*

*Das Bild zeigt das inverse Mikroskop, das auf einem luftgefederten Tisch steht und vom Faraday-Käfig umgeben ist. Rechts unten ist der Mikromanipulator zu sehen. Über dem Zellbad befindet sich die Meßpipette, die mit dem Vorverstärker verbunden ist.*

### **2.5.3.2. Meßtisch**

Um den Meßplatz vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung zu schützen wurde ein schwingungsgedämpfter Tisch, bestehend aus einer massiven Granitplatte mit Druckluftfederung, eingesetzt. Auf diesem wurde das Mikroskop zentral positioniert (Abbildung 5, Seite 26). Damit es während des Experimentierens nicht zur Tischberührung kam, war der luftgefederte Tisch von einem festen „Übertisch“ umgeben. Auf diesem war ein Faraday-Käfig montiert (Abbildung 5). Dieser verhinderte, daß es bei Strommessungen im Piko- oder Nano-Ampere-Bereich zur Überlagerung mit von außen eingestreuten Störströmen kam.

### **2.5.3.3. Mikromanipulator**

Ein hydraulisch betriebener Mikromanipulator (Fa. Narishige, Japan) ermöglichte ein präzises Aufsetzen der Meßpipette auf die nur wenige Mikrometer großen Zellen. Damit die

dreidimensionalen Bewegungen der Meßelektrode, die am Vorverstärker befestigt war, keine Vibrationen verursachten, wurde der Mikromanipulator auf dem Übertisch montiert. Die Bewegungsgenauigkeit lag unter  $1\ \mu\text{m}$ .

#### 2.5.3.4. Versuchsbäder

Die meisten Patch-Clamp-Versuche wurden bei Raumtemperatur in einem Plexiglasbad von ca.  $400\ \mu\text{l}$  Volumen durchgeführt. Eine temperierte Meßkammer auf der Basis eines Peltierelements ermöglichte die Untersuchung der Membranströme unter definierten Temperaturverhältnissen. Aufgrund minimierter thermischer Zeitkonstanten und hoher Leistung des Peltierelementes ( $25/50\ \text{W}$ ) wurden sehr schnelle Temperaturveränderungen ( $1^\circ\text{C/s}$ ) bei hoher Genauigkeit ( $\leq 0,1^\circ\text{C}$ ) und Temperaturkonstanz ( $\leq 0,05^\circ\text{C}$ ) über den Bereich von  $10\text{-}40\ ^\circ\text{C}$  erreicht. Mit Hilfe eines Mikrotemperatursensors (Siemens K18 bzw. K29) wurde die Temperatur im Bad gemessen und die voreingestellte Soll-Temperatur über einen Regelverstärker (Eigenbau) und ein Peltierelement konstant gehalten. Für eine ausreichende Temperaturkonstanz war es wichtig, daß die Flußgeschwindigkeit des Perfusats gleich blieb. Diese wurde über den hydrostatischen Druck eingestellt, der mittels eines höhenverstellbaren Fußes reguliert wurde. Mit  $0,5\ \text{ml/min}$  wurde eine Perfusionsgeschwindigkeit gewählt, bei der keine Druckschwankungen auftraten. Die Perfusion des Zellbades mit Badlösung erfolgte so schonend, daß ein Abreißen der Zelle von der Meßelektrode vermieden wurde. Die Badlösung wurde aus dem Meßbad mit einer Membranpumpe abgesaugt.

Damit das Anlegen eines Unter- bzw. Überdrucks in der Patchpipette möglich war, mußte diese sicher und stabil in dem Elektrodenhalter fixiert werden. Dieser war wiederum direkt am Vorverstärker befestigt, um zusätzliche Störsignale zu vermeiden. Mit Hilfe einer Glaskolbenspritze wurde über einen PVC-Schlauch zum einen beim Eintauchen ins Meßbad ein leichter Überdruck und zum anderen beim „cell-attached“-Zustand ein Unterdruck erzeugt. Um mögliche Störeffekte zu vermeiden, wurde der Pipettenhalter vor jedem Versuch mit Druckluft getrocknet.



## 2.5.4. Elektrophysiologischer Versuch

### 2.5.4.1. Herstellung der Patchpipetten

Bei den meisten Versuchen bestanden die zur Ableitung verwendeten Mikroelektroden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld) mit eingezogenem Filament (Außen-Ø: 1,5 mm, Innen-Ø: 0,87 mm, Filament-Ø: 0,2 mm). Entgegen der in der Literatur oftmals beschriebenen schlechten elektrischen Eigenschaften von weichem Sodaglas wurden einige Versuche mit Natriumglas bei vertretbarem Rauschen mit Erfolg durchgeführt. Mit den Sodaklarglaskapillaren (Außen-Ø: 1,5 mm, Innen-Ø: 0,938 mm, Filament-Ø: 0,2 mm (Hilgenberg, Malsfeld)) waren die Seals hervorragend. Aus ca. 50 mm langen Glasrohrstücken wurden mit Hilfe des Mikropipettenpullers P-87 (Firma Sutter Instrument Company) jeweils zwei Mikroelektroden gezogen. Die Parameter des letzten Ziehschritts wie Hitze, Zuggeschwindigkeit und Kühlung müssen präzise eingestellt werden, denn diese Einstellungen beeinflussen ganz entscheidend die Form und die Wandstärke der Pipettenspitze, die wichtige Faktoren für die Qualität der Ableitung sind. Die Spitzen der Mikroelektroden wurden durch vorsichtiges Glühen geglättet. Sowohl die Glättung als auch der Austausch der Elektrode nach jeder Membranberührung sind für die Bildung eines Gigaseals wichtig (Cahalan und Neher, 1992). Der Spitzendurchmesser der fertigen Mikroelektroden betrug ca. 0,5-1 µm. Sie wurden mit Pipettenlösung (Lösung IV, Seite 32) gefüllt. Das in der Pipette befindliche Filament ermöglichte eine problemlose und blasenfreie Füllung. Beim Eintauchen der gefüllten Mikroelektrode in die Badlösung betrug ihr Widerstand ca. 2-5 MΩ, so daß von dem oben schon erwähnten Pipettendurchmesser von 0,5-1 µm ausgegangen werden konnte. Pipetten mit kleineren Widerständen hielten zwar den Serienwiderstand niedrig, sorgten aber auch dafür, daß ein gutes „seal“ schwierig zu erhalten war. Gelang jedoch letzteres, so ermöglichte dieses aus eigenen Erfahrungen ein längeres Messen einer intakten Zelle in der „whole-cell“-Konfiguration.

#### 2.5.4.2. Versuchsdurchführung

Bevor die Zellen, die zur ausreichenden Oxigenierung mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln im Schüttelbad gestanden hatten, in das Meßbad gefüllt wurden, mußte die Meßkammer mit Badlösung (Lösung V, Seite 33) durchspült werden. Dieser Durchfluß mit auf 24 °C temperierter Lösung wurde mit einer Schlauchklemme nach ca. 5 Minuten unterbrochen und mittels einer Membranpumpe das Zellbad leergesaugt. Etwa 100 µl der Zellsuspension wurden mit einer Mikropipette in die Versuchskammer eingebracht. Intakte Kardiomyocyten sedimentierten gewöhnlich innerhalb von 5 Minuten. Nach erfolgter Adhäsion am Plexiglasboden wurde die Schlauchklemme so behutsam gelöst, daß es zu einem schwachen, dem hydrostatischen Druck entsprechenden Einfließen von Badlösung (Lösung V, Seite 33) kam. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug in der Regel ca. 0,5 ml/min. Für ca. zehn Minuten wurde nun die Meßkammer mit Lösung V gespült, um schlecht haftende oder tote Zellen und Zellabfall zu entfernen. Diese Maßnahme sorgte dafür, daß die Meßpipette später sauber auf die Zelle aufgesetzt werden konnte. Innerhalb dieses zehnmütigen Spülens erfolgte bereits eine Auslese von vitalen- und nicht intakten Zellen, die rhythmisch kontrahierten und wenig später durch Hyperkontraktur in ein kartoffelähnliches Gebilde (Calcium-Paradox, s.o.) übergingen. Nun wurde die mit Pipettenlösung (Lösung IV, Seite 32) gefüllte Mikropipette auf den chlorierten Silberdraht des Elektrodenhalters geschoben. Unter leichtem Überdruck zur Verhinderung von Lösungseintritt wurde die Meßelektrode in die Badlösung getaucht. Danach wurde der Elektrodenwiderstand in der Voltage-Clamp-Einstellung gemessen und das Elektrodenpotential gegen das Potential der Bezugselektrode abgeglichen. Zwischen der Badelektrode und der offenen Meßpipette floß nun kein Strom mehr. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Meßelektrode vorsichtig unmittelbar über der ausgesuchten Zelle positioniert. Zwei unbedingt zu beachtende Signale zeigten an, daß sich die Pipettenmündung bereits in der Nähe der Zelloberfläche befand und die Pipette nicht weiter bewegt werden durfte: Zum einen beobachtete man am Oszilloskop eine leichte Erhöhung des Pipettenwiderstandes und zum anderen sah man auf der Zelle einen charakteristischen Lichtreflex, der durch das Eindellen (dimpling) der Membran aufgrund ausströmender Flüssigkeit aus der Pipette entstand. Durch einen leichten Unterdruck in der Meßelektrode wurde eine hochohmige Verbindung ( $> 1 \text{ G}\Omega$ , Gigaseal) zwischen Pipettenspitze und Zellmembran erreicht. Nach der Sealbildung wurde die Zelle für ca. zwei Minuten in diesem Zustand belassen, um durch nachlassenden Unterdruck keine mechanosensitiven Kanäle zu

aktivieren und die Membran zu schonen. Danach wurde durch Anlegen eines zunehmenden Unterdrucks die unter der Meßpipettenspitze liegende Zellmembran („patch“) aufgerissen. Das Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration und damit der Zellzugang war sichtbar an der Reduktion des Elektrodenwiderstandes und der Entstehung kapazitiver Ströme. Nun wurde zuerst das Membranruhepotential der Zelle im Current-Clamp-Modus gemessen. War dieses konstant negativer als  $-70$  mV (4,7 mmolare  $K^+$ -Ionenkonzentration im Bad vorausgesetzt), so wurde die Erregbarkeit der Zelle untersucht. Bei einer Stromimpulsdauer von 0,5-1 ms wurde (am Nullpunkt beginnend) mit steigender Stromamplitude die Schwellenreizstärke zur Auslösung eines Aktionspotentials ermittelt. Waren die Zellen intakt, so betragen die Werte zwischen 0,4-1,5 nA. Bei Ausbleiben der Aktionspotentialauslösung wurde die Stromimpulsdauer auf bis zu fünf Millisekunden erhöht. Dieses hatte nach eigenen Erfahrungen oftmals einen negativen Einfluß auf die Dauer eines stabilen Aktionspotentials. Hinzu kam, daß eine eindeutige Trennung zwischen Reizimpuls und Aktionspotentialaufstrich mit zunehmender Dauer und Stärke des Stromimpulses schwieriger wurde. War jedoch auch bei dieser Reizdauer keine Erregung zu beobachten, so wurde die Zelle verworfen. Vor Versuchsbeginn wurde das Aktionspotential intakter Zellen für ca. 5 Minuten mit einer Frequenz von 2–3 Hz und einer 1,2-fachen Schwellenreizstärke auf Stabilität getestet. Zu beobachtende Kontraktionen in den ersten Minuten während der elektrischen Reizung waren auf die sich nur langsam einstellende Äquilibration von Cytosol und Pipettenlösung zurückzuführen. Erst wenn der EGTA-Puffer aus der Pipettenlösung seine Aufgabe in der Zelle, wo während des Aktionspotentials die Calciumkonzentration kurzfristig auf Werte von ca.  $10^{-6}$  mol/l ansteigt, erfüllt hatte, ließen die Kontraktionen nach. Die Pipettenlösung war daher mit dem Ausbleiben der Kontraktionen eingewaschen. Zur Messung der zu untersuchenden Ein- und Auswärtsströme der Zelle mußte ihr im Voltage-Clamp-Modus ein bestimmtes Spannungsmuster aufgeprägt werden. Dieses mußte für einige Minuten stabil sein, bevor mit den Messungen begonnen werden konnte. Nun wurden die Wirkstoffe der Badlösung zugegeben und wie oben beschrieben, eingewaschen.

## 2.6. Verwendete Lösungen

### Lösung I

<b>Low-Calcium-Lösung:</b>	
Zusammensetzung:	Konzentration in mmol/l:
NaCl	110,0
KCl	10,0
Natriumpyruvat	10,0
Taurin	30,0
MgSO <sub>4</sub>	4,0
Glucose	20,0
HEPES	10,0

Die Lösung I wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 bei 20°C eingestellt!

### Lösung II

<b>Kollagenase-Lösung:</b>	
Zusammensetzung:	Konzentrationen:
Lösung A (50 ml)	
Kollagenase C 0130, Sigma Chemie	50 mg/50 ml
BSA	50 – 70 mg/50 ml
CaCl <sub>2</sub>	50 – 100 µmol/l

**Lösung III**

<b>High-Kalium-Lösung:</b>	
Zusammensetzung:	Konzentration in mmol/l:
Kaliumaspartat	50,0
KCl	60,0
Taurin	40,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Glucose	20,0
HEPES	10,0
EGTA	0,5

Die „high K<sup>+</sup>“-Lösung wurde mit 1 N KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 bei 20°C eingestellt!

**Lösung IV**

<b>Pipettenlösung:</b>	
Zusammensetzung:	Konzentration in mmol/l:
KCl	140,0
HEPES	10,0
Na <sub>2</sub> ATP	5,0
EGTA	2,1
MgCl <sub>2</sub>	0,5

Die Pipettenlösung wurde mit 1 N KOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 bei 20°C eingestellt!

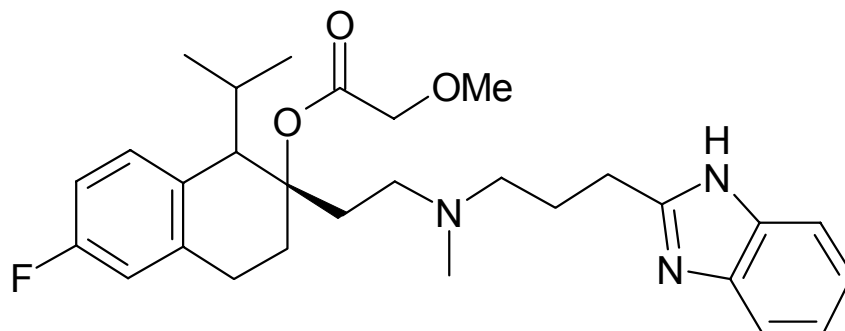
**Lösung V**

<b>Badlösung:</b>	
Zusammensetzung:	Konzentration in mmol/l:
KCl	4,0
NaCl	120,0
CaCl <sub>2</sub>	1,8
Natriumpyruvat	5,0
Glucose	20,0
HEPES	10,0
MgCl <sub>2</sub>	0,6

Die Lösung V wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 bei 20°C eingestellt!

## 2.7. Substanzen und Geräte

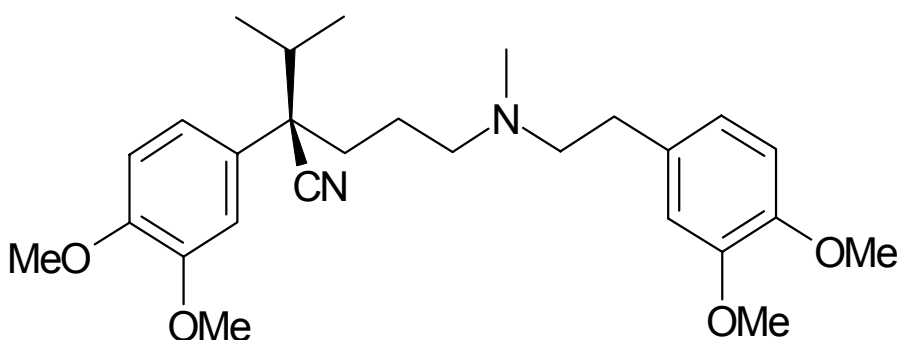
### 2.7.1. Untersuchte Wirkstoffe



**Mibefradil**

Abbildung 6:

Der chemische Name von Mibefradil (Ro 40-5967) lautet (1S,2S)-2-[2-[(3-(2-Benzimidazolyl)propyl)methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl-methoxyacetat-dihydrochlorid. Es wird auch als substituiertes Tetralinderivat bezeichnet. Das als einzelnes Enantiomer eingesetzte Dihydrochlorid besitzt ein Molekulargewicht von 568,56 und ist ein geruchloses weißes kristallines Pulver mit bitterem Geschmack, das chemisch stabil, wasserlöslich und nicht lichtempfindlich ist. Die  $pK_a$ -Werte betragen für die Benzimidazolyl-Gruppe 4,8 und für die tertiäre Amino-Gruppe 5,5 (Abernethy, 1997). Im Handel war die Substanz unter den Handelsnamen Posicor® (Fa. Hoffmann- La Roche) bzw. Cerate® (Fa. Asta Medica AWD GmbH).



**Verapamil**

Abbildung 7:

Die 1962 mit dem Handelsnamen Isoptin® auf den Markt gekommene Substanz trägt die INN-Bezeichnung 2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaoctannitril. Das verwendete Hydrochlorid hat ein Molekulargewicht von 491,1 und ist löslich in Wasser. Das(S)(-)-Enantiomer ist deutlich stärker wirksam als die (R)(+)-Form. Im Handel ist das Razemat.

## 2.7.2. Hilfsstoffe

BaCl <sub>2</sub> -Dihydrat, CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat, EGTA=Titriplex VI, D(+)-Glucose-Monohydrat, NaOH, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , KOH-Maßlösung (1N)(Ca <sup>2+</sup> - frei), NaOH-Maßlösung (1N), MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat, MgSO <sub>4</sub> -Heptahydrat, Natriumpyruvat, NaCl	E. Merck, Darmstadt
4-Aminopyridin, Cadmiumchlorid, Kalium-DL- aspartat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Taurin	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
HEPES, BSA = Bovine Serum Albumin, Kollagenase (TypI, C 0130)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82018 Taufkirchen
Bertosamil	Kali-Chemie, Pharma GmbH Hannover
Sauerstoff für med. Zwecke	Linde AG, Höllriegelskreuth
Mibefradil	Hoffmann-La Roche
Verapamil	Knoll, Ludwigshafen

## 2.7.3. Geräte

<b>Absaugpumpe Wisa Modell 120</b>	<b>Wisa</b>
Borosilikatglas-Röhrchen mit Filament (Außen-Ø: 1,5 mm, Innen-Ø: 0,87 mm), Sodaklarglaskapillaren mit Filament (Außen- Ø: 1,5 mm, Innen-Ø: 0,938 mm)	Hilgenberg, D- 34323 Malsfeld



Drucklufttisch, Faraday-Käfig, Meßkammer	Anfertigung durch feinmechanische Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, H.-H.- Universität Düsseldorf
Filterhalter FP 030/20 ; 0,45µm	Schleicher u. Schuell, Dassel, Germany
Bulldogklemme Modell BH 20	Aesculap
Meß- und Steuercomputer Deskpro 386/S	Compaq Computer GmbH, München
Meß- und Steuerinterface	Anfertigung durch Dipl. Phys. G. Chini, H.-H.- Univ. Düsseldorf
Meß- und Steuerprogramm	Programmierung durch Dipl. Phys. G. Chini, Dr. D. Hafner und Dipl. Ing. F. J. Katterbach, H.-H.- Universität Düsseldorf
Mikromanipulator WR-88	Narishige, Japan
Langendorff-Apparatur	Eigenkonstruktion nach Dipl. Biol. T. M. Weis, H.-H.-Universität Düsseldorf
Mikropipettenpuller P-87	Sutter Instrument Company, San Rafael, Ca. USA
Inverses Mikroskop Diaphot TMD	Nikon GmbH, Düsseldorf
Oszillograph 5113/5A26/5A14N/5B10N	Tektronix, Inc.; Beaverton, Oregon, USA
Patch-Clamp-Verstärker L/M-EPC 7	List-Medical-Elektronik, Darmstadt
Digital-pH-Meter- Knick Typ 647	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. Berlin
pH-Meter-Glaselektroden (InLab® 410)	Mettler Toledo, Gießen, Germany

Impulsgenerator	Eigenbau durch Dipl. Grad. J. Springer, H.-H. Universität Düsseldorf
Thermostat DP 8/17	Messgeräte-Werk Lauda, Lauda

## 2.8. Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte berechnet und als Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben:

$$\bar{x} \pm \text{SEM} (n) \quad \text{SEM} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}}{\sqrt{n}}$$

n = Anzahl der Einzelwerte

$\bar{x}$  = Mittelwert

$x_i$  = einzelne Versuchswerte

(n) gibt die Anzahl der Einzelwerte an, die zur Berechnung des Mittelwertes herangezogen wurden. Dabei repräsentiert (n) die Ergebnisse, die mit verschiedenen Präparationen von Myokardzellen erzielt wurden. Die Daten wurden auf Signifikanz mittels paariger oder unpaariger t-Tests geprüft, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  als signifikant angesehen wurde. Bei paarig vorliegenden Ergebnissen wurde neben den Mittelwerten der einzelnen Versuche auch der Mittelwert der Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollwerten angegeben, da dieser als Testparameter für den unpaarigen t-Test diente. Für den Wirkvergleich der untersuchten Substanzen wurden die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten Konzentrationen mit halbmaximaler Wirkung ( $IC_{50}$ ) herangezogen. Weitere Funktionsparameter sowie die Anpassung mathematischer Funktionen an die einzelnen Kurven wurden mit Hilfe der Software Graph-Pad Prism (Version 2.00) bestimmt. Neben dieser Software wurde für die graphische Darstellung der Originalkurven einzelner Zellen ein Statistical-Analysis-System-Programm (SAS-Institut, Heidelberg; Version 6.04 für Personalcomputer) eingesetzt.

### 3. Ergebnisse

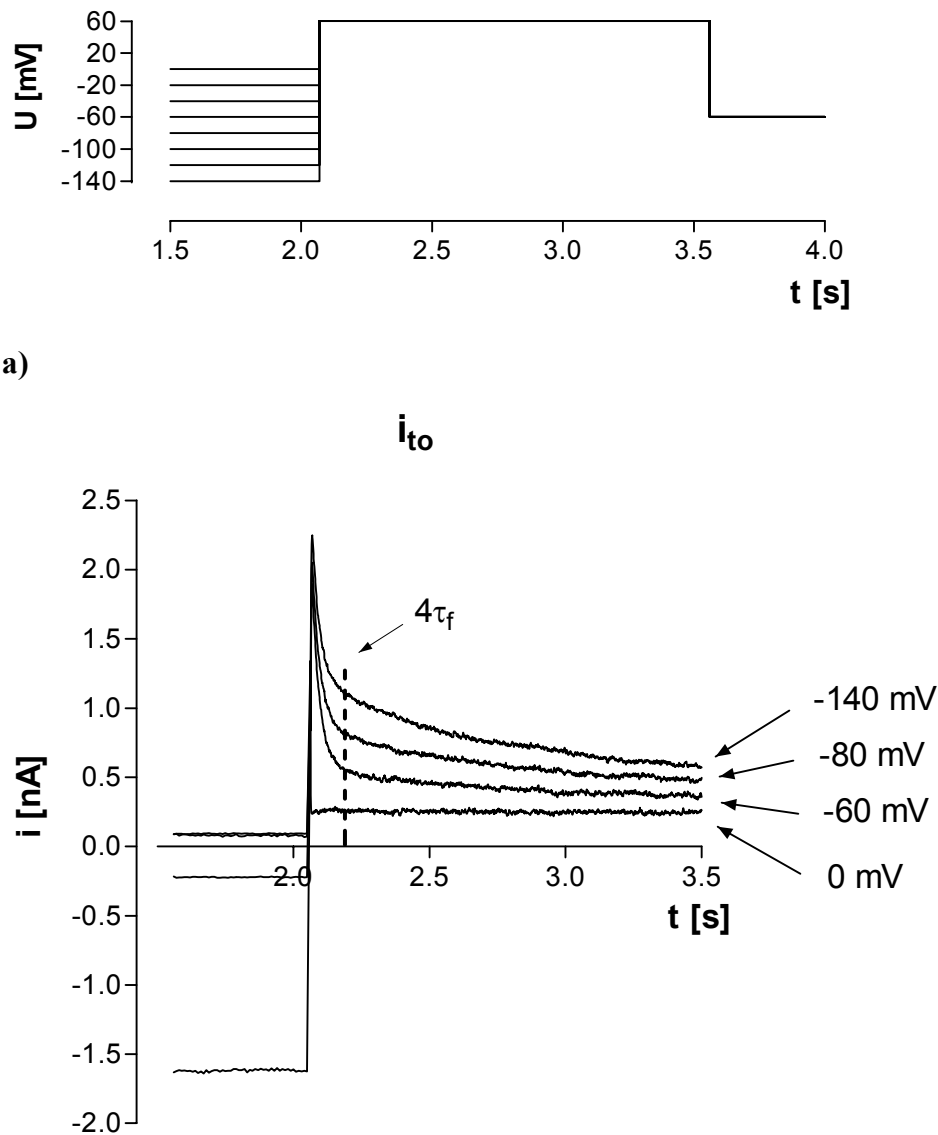
#### 3.1. Transiente Auswärtsströme in der Rattenmyocyte

Zunächst wurden in vergleichenden Untersuchungen der Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf die für die Repolarisation im Ventrikelmyokard der Ratte verantwortlichen Auswärtsströme untersucht. In der Literatur wurden zwei transiente  $K^+$ -Auswärtsströme ( $i_{to}$ ) beschrieben (Dukes und Morad, 1991). Oftmals war in der Vergangenheit die Rede von einem schnell inaktivierenden, durch 4-Aminopyridin hemmbaren  $i_{to}$ -Strom (Apkon und Nerbonne, 1991; Carignani *et al.*, 1991). Schon 1984 hatte Josephson erstmals die Spannungsabhängigkeit sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung des Aminopyridin-sensitiven Stroms charakterisiert (Josephson *et al.*, 1984). Weitere Untersuchungen bezogen sich auf die langsame Komponente des transienten Auswärtsstroms ( $i_{to,s}$ ). Dukes und Morad (1991) registrierten den langsam inaktivierenden Strom zwar mit, schrieben die Effekte des  $i_{to}$ -Hemmstoffes Tedisamil aber nur der Inhibition der schnell inaktivierenden Komponente  $i_{to,f}$  zu, da die langsam inaktivierende Komponente  $i_{to,s}$  noch nicht bekannt war. In den Arbeiten von Sheppard *et al.* (1992) wurde erstmalig an Schneckengangneuronen von Küken unterschieden zwischen einem schnell inaktivierenden transienten Auswärtsstrom  $i_{to,f}$  und einem langsamen Strom  $i_{to,s}$ , der von Tetraethylammoniumionen nicht gehemmt werden konnte. Eine genaue Charakterisierung dieser zwei repolarisierenden Auswärtsströme in ventrikulären Rattenmyocyten beschreibt erstmalig die Arbeit von Weis (1993). Sowohl Zeit- als auch Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung der zwei  $i_{to}$ -Komponenten konnten durch ihre Untersuchungen aufgezeigt werden. Ein durch Tetraethylammonium hemmbarer  $I_K$ -Strom, der auch als „delayed rectifier“ (Carignani *et al.*, 1991) oder „non-inactivating outward current“ bezeichnet wird und im Meerschweinchenventrikel zu finden ist, wurde in der Ratte nicht gefunden.

Im Folgenden soll die Wirkung der zu untersuchenden Pharmaka sowohl auf den schnell inaktivierenden  $i_{to,f}$  - als auch auf den langsam inaktivierenden  $i_{to,s}$ -Strom näher charakterisiert werden.

Klemmt man das Membranpotential einer ventrikulären Rattenmyocyte von ihrem Ruhepotential auf ein Testpotential positiv zu 0 mV, so löst man einen schnell aktivierenden Auswärtsstrom aus, der nach Erreichen seines Peaks zeitabhängig inaktiviert (Abbildung 8b).

Die Untersuchungen zur spannungsabhängigen Inaktivierung der transienten Auswärtsströme wurden bei einem konstanten Testpotential von +60 mV durchgeführt, wobei die vorhergehenden Konditionierungspotentiale in Schritten von 10 mV, angefangen bei -140 mV, variiert wurden. Die Zyklen wurden bis zu einem Konditionierungspotential von 0 mV durchlaufen. In Abbildung 8b) ist eine Originalaufnahme gezeigt.



b)

Abbildung 8:

a) Die Abbildung zeigt ein Spannungsklemmverhalten, das die transienten Auswärtsströme  $i_{to,s}$  und  $i_{to,f}$  aktiviert. Die Kardiomyocyte wurde ausgehend von einem Konditionierungspotential von -140 mV, jeweils in 10 mV-Schritten, auf ein Testpotential von +60 mV geklemmt. Anschließend wurde die Zelle wieder auf -60 mV geklemmt, um sie nahe ihrem physiologischen Ruhepotential zu schonen. Der Zyklus wurde 15-mal wiederholt, so daß

0 mV das am stärksten positive Konditionierungspotential war. Die Zykluslänge war auf vier Sekunden eingestellt. Zur besseren Übersicht wurden nur 20 mV-Schritte abgebildet.

b) Dargestellt ist die zeitabhängige Inaktivierung des transienten Kaliumauswärtsstroms mit seiner schnellen und langsamen Komponente  $i_{to,f}$  und  $i_{to,s}$ . Die jeweiligen Konditionierungspotentiale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Übereinkunftsgemäß werden auswärts fließende Ströme oberhalb der Abszisse, einwärts fließende Ströme unterhalb der Abszisse aufgetragen. Nach dem Peak inaktiviert der  $i_{to,f}$  sehr schnell ( $\tau_f$ : ca. 35 ms). An der  $4\tau_f$ -Marke ist dieser Strom auf ca.  $1/e^4$  oder ca. 1,8 % seines Maximalwertes gefallen. Diese  $4\tau_f$ -Marke ist mit - - - - - eingezeichnet. Sie ist für die Auswertung des  $i_{to,s}$ -Stroms relevant. Auf eine Darstellung der vollständigen Inaktivierung des  $i_{to,s}$  wurde verzichtet. Zur besseren Übersicht sind nur die Stromkurven bei den Konditionierungspotentialen -140 mV, -80 mV, -60 mV und 0 mV gezeigt.

Ein Testpotential von +60 mV wurde gewählt, weil der  $i_{to,s}$ -Strom zwischen -40 mV als Schwellenpotential und +60 mV einen sigmoidalen Verlauf nahm und bei +60 mV sein Maximum erreichte. Eine für die vollständige Darstellung des  $i_{to,s}$  notwendige Klemmdauer von 10 Sekunden war aufgrund des gewählten Auswerteverfahrens zum einen nicht erforderlich und zum anderen hätte es einen hohen Streß für die Zellen bedeutet. Die Folge wären instabile Messungen und zu geringe experimentelle Ausbeuten. Um höchstmögliche Stabilität der Zelle zu erreichen wurde nach dem 1,5 Sekunden dauernden Testpotential wieder auf ein physiologisches Haltepotential von -60 mV geklemmt.

Um eine Beteiligung von Calcium-Strömen an der Entstehung der transienten Auswärtsströme zu vermeiden, wurde  $\text{CdCl}_2$  in einer Konzentration von 200  $\mu\text{mol/l}$  der Badlösung zugesetzt. Denn viele Literaturstellen belegen eine Blockade des langsamen L-Typ-Calciumkanals durch Cadmiumchlorid in Konzentrationen zwischen 200 und 300  $\mu\text{mol/l}$  (Kilborn und Fedida, 1990). Die Arbeit von Weis (1993) zeigte, daß weder der  $i_{to,f}$  noch der  $i_{to,s}$  von Cadmiumionen inhibiert werden.

Der  $i_{to,f}$ -Strom kann mit einer monoexponentiell abfallenden Funktion beschrieben werden, wobei die Zeitkonstante  $\tau_f$  nach eigenen Untersuchungen ca. 35 ms betrug. Die Zeitkonstante

$\tau_f$  wurde bei einem Konditionierungspotential von  $-60$  mV bestimmt, das nach den Untersuchungen von Weis (1993) ganz in der Nähe des halbmaximal auslösbaren  $i_{to,f}$ -Stroms liegt. Demnach ist der  $i_{to,s}$ -Strom bei  $-55$  mV bereits vollständig inaktiviert.

Die Ergebnisse meiner Versuche, sowie Abbildung 9 verdeutlichen jedoch, daß auch bei Potentialen  $\leq -50$  mV ein schwacher  $i_{to,s}$ -Strom zu beobachten ist (Näheres dazu Seite 44). Mit dem Verstreichen von vier Inaktivierungszeitkonstanten  $\tau_f$  wird ein Zeitpunkt erreicht, an dem zum einen der Maximalwert des  $i_{to,f}$  auf  $1/e^4$  oder ca. 1,8 % fällt und zum anderen ein aussagekräftiger Meßpunkt für den langsam inaktivierenden Auswärtsstrom  $i_{to,s}$  gegeben ist. Mit Hilfe dieses  $4\tau_f$ -Wertes ließ sich nun ein Stromspannungsdiagramm, wie es in Abbildung 9 zu sehen ist, erstellen, wobei die Versuchsdaten folgendermaßen ausgewertet wurden:

Die Meßwerte für den  $i_{to,f}$  erhielt man durch Subtraktion des Auswärtsstroms zum „ $4\tau_f$ “-Zeitpunkt von seinem Peak-Wert. Der  $4\tau_f$ -Wert betrug in der Regel 130- bis 150 ms ( $24$  °C).

Auch der langsam inaktivierende transiente Auswärtsstrom  $i_{to,s}$  konnte mit einer abfallenden Monoexponentialfunktion beschrieben werden. Seine Zeitkonstante  $\tau$  betrug in der Regel 1-2 Sekunden. Die Werte für die langsame Stromkomponente  $i_{to,s}$  wurden durch Subtraktion an der  $4\tau_f$ -Stelle ermittelt. Genauer, es wurde der Strom mit dem Konditionierungspotential  $0$  mV, bei dem kein transienter Auswärtsstrom mehr aktivierbar war, von dem jeweiligen auszuwertenden Strom zum Zeitpunkt  $4\tau$  abgezogen.

Mit den so erhaltenen Meßwerten ließen sich die „steady-state“-Inaktivierungskurven (Abbildung 9) darstellen. Die Graphik zeigt, daß sowohl die Inaktivierung des  $i_{to,f}$  als auch des  $i_{to,s}$ -Stroms spannungsabhängig ist. Die Kurven der beiden Stromkomponenten des transienten Auswärtsstroms folgen einer Boltzmann-Funktion. Der sigmoidale Verlauf der Inaktivierungskurve läßt sich auf den potentialabhängigen Verschluß des virtuellen Aktivierungstores zurückführen.

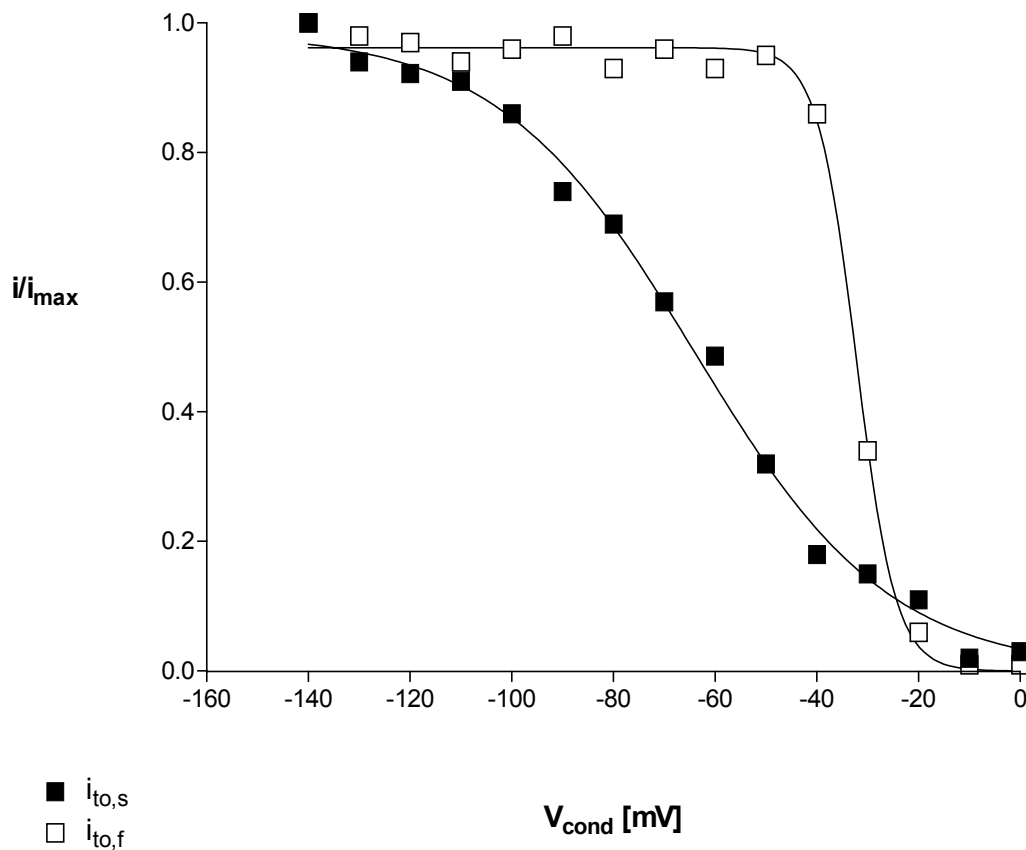


Abbildung 9: Spannungsabhängige Inaktivierung der transienten Kaliumauswärtsströme.

Auf der Abszisse sind die Konditionierungspotentiale und auf der Ordinate der Inaktivierungsstrom, normiert auf den maximalen Inaktivierungsstrom, aufgetragen. Sowohl der  $i_{\text{to},s}$ - als auch der  $i_{\text{to},f}$ -Strom zeigen einen sigmoidalen Verlauf, der mit einer Boltzmann-Funktion angepaßt wurde. Die Werte für die halbmaximale Inaktivierung betragen beim  $i_{\text{to},s}$   $-64,1$  mV und beim  $i_{\text{to},f}$   $-32,2$  mV. Der errechnete Steigungsfaktor  $k$  beträgt für die schnelle Komponente  $-3,84$  mV und für den langsamen  $i_{\text{to},s}$ -Strom  $-19,24$  mV.

Aufgrund der schnellen Inaktivierung des  $i_{\text{to},f}$ -Stroms konnte bei der Bestimmung vom  $i_{\text{to},s}$  auf den Einsatz von 4-Aminopyridin zur Hemmung vom  $i_{\text{to},f}$  verzichtet werden, da mit einem zu vernachlässigenden  $i_{\text{to},f}$ -Stromanteil von ca. 1,8 % bei dem beschriebenen Auswerteverfahren eine ausreichende Trennung der beiden Komponenten gegeben war.

Eine wichtige Kenngröße bei der Beschreibung eines Ionenstroms ist das halbmaximale Potential  $V_{50}$ , das bei der Hälfte des maximal auslösbaren Inaktivierungsstroms mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung ermittelt wird.

$$\frac{i}{i_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{(V_{50} - V_{\text{cond}})}{k}}}$$

$k$	= Steigungsfaktor	[ V ]
$V_{\text{cond}}$	= Konditionierungspotential	[ V ]
$V_{50}$	= Potential der halbmaximalen Inaktivierung	[ V ]
$i_{\max}$	= maximal auslösbarer Strom	[ A ]
$i$	= gemessener Strom	[ A ]

Mit dem Steigungsfaktor  $k$  konnte die Größe der Stromabnahme in Abhängigkeit vom Konditionierungspotential beschrieben werden. Sein Wert definiert den Membranpotentialbereich in mV, in dem der Strom um das  $e$ -fache zu- bzw. abnimmt (Abbildung 9). Aus dem Stromspannungsdiagramm läßt sich entnehmen, daß der  $i_{\text{to,s}}$  negativ zu  $-30$  mV stark zunahm, um ab  $-120$  mV sein Maximum zu erreichen. Für die Inaktivierungskurve des  $i_{\text{to,s}}$  Stroms ergab sich nach 32 Versuchen ein Mittelwert für die halbmaximale Inaktivierung von  $-68 \pm 1,2$  mV und für den Steigungsfaktor von  $-21 \pm 0,5$  mV. Die Regulation des virtuellen Inaktivierungstores erfolgt beim  $i_{\text{to,s}}$  somit über einen Spannungsbereich von ca. 90 mV. Der sehr kleine Steigungsfaktor von  $-3,4 \pm 0,2$  mV für die Inaktivierungskurve des  $i_{\text{to,f}}$ -Stroms, bedeutet, daß diese steil abfällt. Das halbmaximale Inaktivierungspotential beträgt  $-31 \text{ mV} \pm 0,7 \text{ mV}$  und das Schließen dieses Tores vollzieht sich über einen Potentialbereich von ca. 30 mV.

Mit der zeitabhängigen Auswertung des transienten Auswärtsstroms  $i_{\text{to,f}}$  wurde für das Beispiel in Abbildung 9 ein halbmaximaler Strom bei einem Potential von  $-32$  mV bestimmt. Der  $k$ -Wert betrug  $-3,84$  mV. Für das Potential der halbmaximalen Inaktivierung des  $i_{\text{to,s}}$  ergab sich in diesem Beispiel ein Wert von  $-64$  mV. Der Steigungsfaktor wurde mit  $-19,24$  mV berechnet.



Diese Meßwerte stimmen zwar mit den in der Literatur veröffentlichten Daten überein (Lefevre *et al.*, 1991), doch findet man oftmals auch sehr viel negativere Werte für das Potential der halbmaximalen Inaktivierung (Dukes und Morad, 1989; Weis, 1993).

Der Grund für die Abweichung bei der potentialabhängigen Steuerung liegt daran, daß in den vorliegenden Versuchen der Badlösung eine hohe Cadmium-Konzentration von ca. 200  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt wurde, um den L-Typ-Calciumstrom zu inhibieren. Viele Literaturstellen belegen den Einfluß von erhöhten Konzentrationen an divalenten Kationen wie z.B.  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen (Agus *et al.*, 1989) aber auch von  $\text{Na}^+$ -Ionen (Dukes und Morad, 1991) auf die Potentialabhängigkeit des  $i_{\text{to,s}}$ -Stroms. Der Steigungsfaktor  $k$  wird jedoch nicht durch die Anwesenheit von Cadmiumionen verändert, da nur die Lage der Inaktivierungskurve auf der Potentialachse verschoben wird (Dukes und Morad, 1991). Mit der Verwendung verschiedener Badlösungen sind die Unterschiede zwischen den eigenen und den in der Literatur beschriebenen Werten zu erklären. Auf den Zusatz des Chloridstromblockers DIDS (4,4-diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure) wurde verzichtet, da störende Chloridströme lediglich die Höhe der Amplitude, jedoch nicht die Lage der Inaktivierungskurven beeinflusst hätten (Bouron *et al.*, 1991).

Aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit der transienten Auswärtsströme und damit auch des Aktionspotentials wurde die Versuchstemperatur auf konstante 24 °C eingestellt. Temperaturunterschiede von  $\geq 1^\circ\text{C}$  hätten eine Änderung sowohl der Amplitude als auch der Kinetik der Ströme zur Folge gehabt. Weis (1993) zeigte, daß bei der physiologischen Temperatur von 37 °C der  $i_{\text{to,f}}$  vollständig inaktiv und damit bedeutungslos für den Repolarisationsvorgang des Aktionspotentials ist. Dagegen ist der  $i_{\text{to,s}}$  bei Körpertemperatur maximal aktiviert und dadurch als der maßgeblich repolarisierende Strom anzusehen. Von Nachteil war jedoch bei vielen der eigenen bei 37 °C durchgeführten Versuche die mangelnde Stabilität der Zellen. Daher wurde die Versuchstemperatur auf 24 °C eingestellt. Bei dieser Temperatur waren beide  $i_{\text{to}}$ -Komponenten ca. halbmaximal aktiv. Ihre Trennung mittels des beschriebenen Auswerteverfahrens stellte kein Problem dar.

### 3.2. Vergleich der Wirkungen von Mibefradil und Verapamil auf den langsam inaktivierenden $K^+$ -Auswärtsstrom $i_{to,s}$

Die Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials der Ratte wird größtenteils durch die beiden Kaliumauswärtsströme  $i_{to,f}$  und  $i_{to,s}$  bestimmt. Bei 37 °C ist nur die langsame Komponente  $i_{to,s}$  anwesend. In der Literatur gibt es für den Wirkstoff Mibefradil bisher keine Daten zur Wirkung auf den  $i_{to}$ .

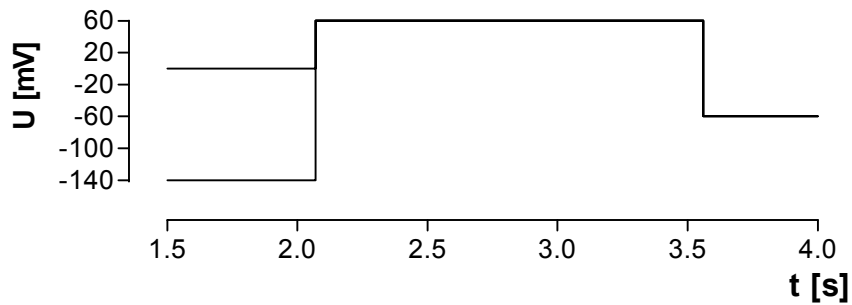
In Voltage-Clamp-Untersuchungen im „whole-cell“-Modus wurde lediglich die mehr oder weniger ausgeprägte Selektivität für den T-Typ-Calcium-Kanal beschrieben (Bian und Hermsmeyer, 1993; Mishra und Hermsmeyer, 1994; Heubach *et al.*, 2000). Gomora *et al.* (1999) bezeichnen Mibefradil als einen wenig selektiven  $K^+$ -Kanal-Blocker. Chouabe *et al.* (2000) beschreiben zwar eine Blockade des „delayed rectifier  $k^+$ -current“ durch Mibefradil, jedoch ist dieser Strom in der Rattenmyocyte nicht vorhanden.

Im Unterschied zu Mibefradil liegen Daten zur Wirkung von Calciumantagonisten des Verapamiltyps auf den  $i_{to}$ -Strom vor. Die Untersuchungen von Lefevre *et al.* (1991) haben eine inhibierende Wirkung von D600 (Gallopamil) auf die schnelle bzw. langsame Komponente der transienten  $K^+$ -Auswärtsströme gezeigt. Erste Ergebnisse, die eine beschleunigte Inaktivierung und eine geringfügige Reduktion des Peak-Auswärtsstroms durch Verapamil an ventrikulären Rattenmyocyten dokumentieren, wurden von Jahnel *et al.* (1994) veröffentlicht.

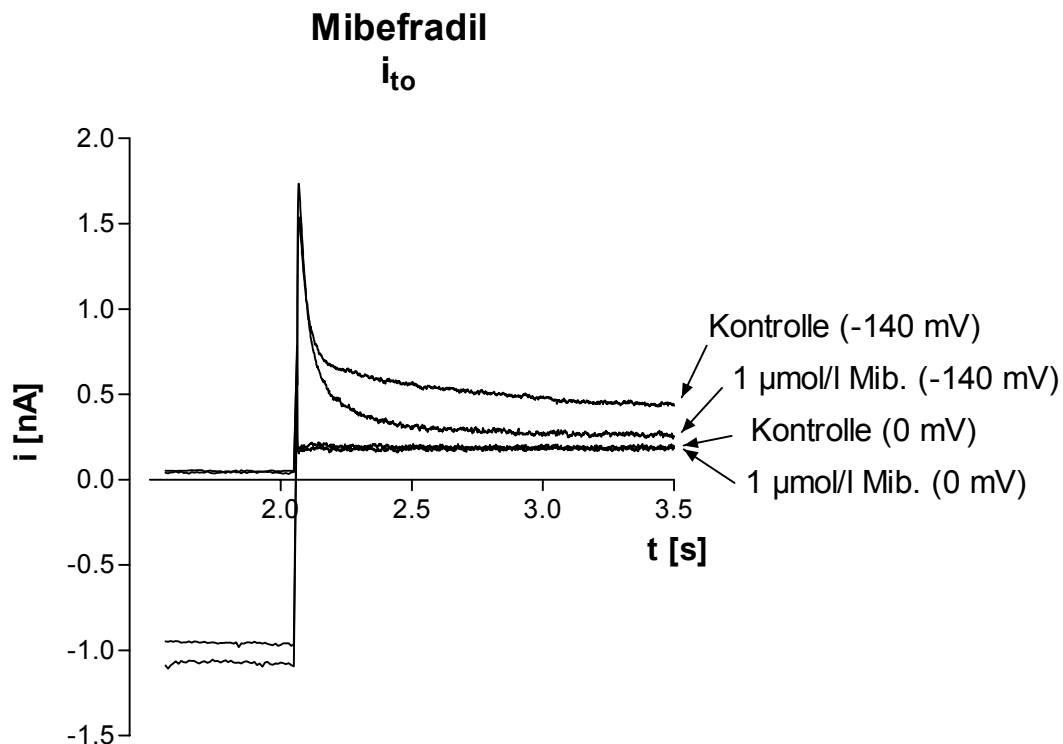
In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von Mibefradil und Verapamil auf die transienten Auswärtsströme  $i_{to,s}$  und  $i_{to,f}$  genauer charakterisiert.

#### 3.2.1. Effekte von Mibefradil auf den $i_{to,s}$

Zur Darstellung der Wirkung von Mibefradil auf den langsam inaktivierenden  $i_{to,s}$ -Strom wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Dazu kam das Klemmmuster aus Abbildung 8 zur Anwendung. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 10a) lediglich die Klemmspannungen und in Abbildung 10b) die Stromzeitpuren für die Konditionierungspotentiale 0 mV und -140 mV dargestellt.



a)



b)

Abbildung 10:

a) Klemmcluster, wie in Abbildung 8a) beschrieben, jedoch ist zur besseren Übersicht nur das Muster der Konditionierungspotentiale von  $-140$  mV und  $0$  mV dargestellt.

b) Ein typischer Versuch, der die Wirkung von  $1 \mu\text{mol/l}$  Mibefradil auf den  $i_{to}$ -Strom bei den Konditionierungspotentialen  $-140$  mV und  $0$  mV im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Durch zusätzliche Registrierungen der Referenzstromspuren bei  $0$  mV konnten die Amplitudeneffekte quantifiziert werden, da bei diesem Potential die transienten Auswärtsströme inaktiviert waren. Zur besseren Übersicht ist der für die Auswertung relevante Teil der Zeitskala bis  $3,5$  Sekunden dargestellt. Die Einwirkzeit für Mibefradil betrug  $10$  Minuten.

Abbildung 10b) zeigt ein typisches Experiment, in dem der Einfluß von  $1 \mu\text{mol/l}$  Mibefradil im Vergleich zur Kontrolle auf den  $i_{to}$ -Strom gemessen wurde. Zusätzlich sind die jeweiligen

Referenzstromspuren (0 mV Konditionierungspotential) dargestellt, in denen die transienten Auswärtsströme inaktiviert waren. Erkennbar ist eine starke Reduktion des  $i_{to,s}$ -Stroms durch Mibefradil.

Vorversuche zeigten, daß es sinnvoll war, als niedrigste Wirkkonzentration 0,03  $\mu\text{mol/l}$  und als höchste 10  $\mu\text{mol/l}$  zu wählen, da es bei der letzteren zur vollständigen Inhibition des  $i_{to,s}$  kam. Die Einwirkzeit bis zur Messung der „steady-state“-Inaktivierungskurven betrug in der Regel 10 Minuten. Die Versuchstemperatur wurde konstant bei 24 °C gehalten. Abbildung 11 zeigt typische Konzentrations-Wirkungsbeziehungen eines einzelnen Versuchs. Aus der Graphik geht hervor, daß Mibefradil den  $i_{to,s}$  konzentrationsabhängig über den gesamten Potentialbereich hemmt. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil ist selbst bei einem Konditionierungspotential von -140 mV nur noch ein Strom von 42 pA zu registrieren. Es tritt nur eine geringe Verschiebung der Potentiale für die halbmaximale Inaktivierung auf. Auch der Steigungsfaktor erfährt durch die verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle kaum eine Veränderung.

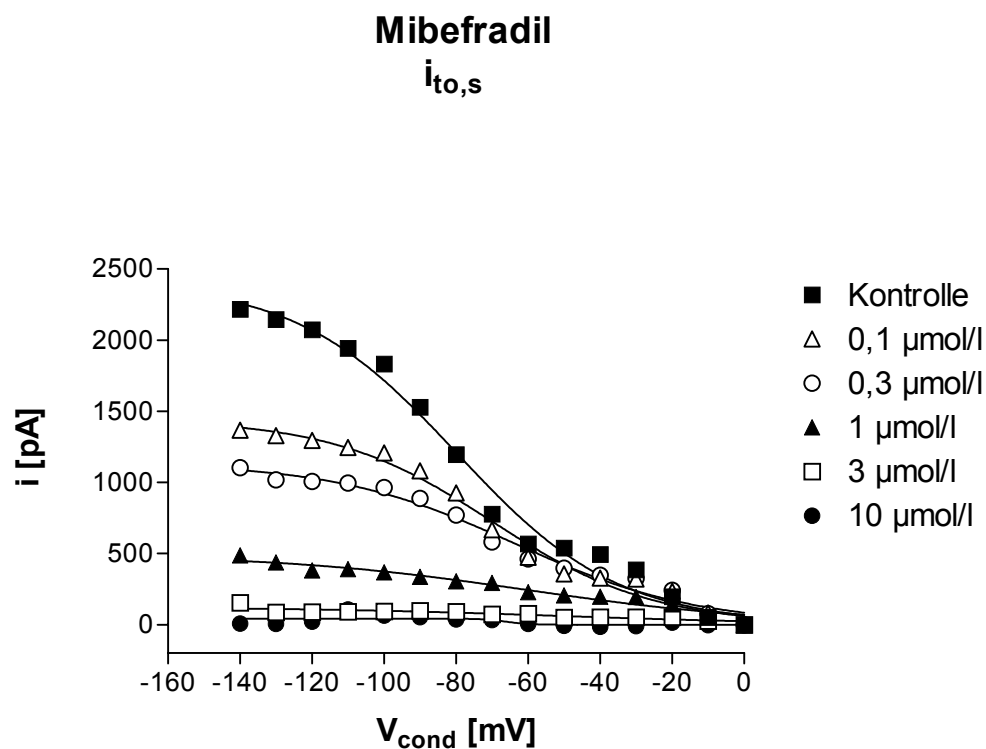


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Hemmung des langsam inaktivierenden transienten  $K^+$ -Auswärtsstroms  $i_{to,s}$  durch Mibefradil bei verschiedenen Konditionierungspotentialen. Die Einwirkzeit der verschiedenen Mibefradil-Konzentrationen betrug 10 Minuten. Eine maximale Stromamplitude erhält man bei -140 mV.

Um eine möglichst große Stromamplitude für die Messung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu erzielen, wird für die Auswertung der Substanzeffekte ein Konditionierungspotential gewählt, bei dem der  $i_{to,s}$  und der  $i_{to,f}$  maximal aktiviert sind. Bei einer Spannung von  $-140$  mV erhält man für den  $i_{to,s}$  eine maximale Stromamplitude. Der  $i_{to,s}$ -Strom wurde, wie bereits beschrieben, nach weitgehender Inaktivierung des  $i_{to,f}$ -Stroms gemessen. Für die Darstellung der konzentrationsabhängigen Wirkung von Mibefradil auf die Stromamplitude des langsam inaktivierenden Auswärtsstroms  $i_{to,s}$  wurden jeweils 5 bis 14 Versuche bei sechs verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. In Abbildung 12 ist die Konzentrations-Wirkungskurve gezeigt, die sich aus den gemittelten Werten bei einem Konditionierungspotential von  $-140$  mV ergibt.

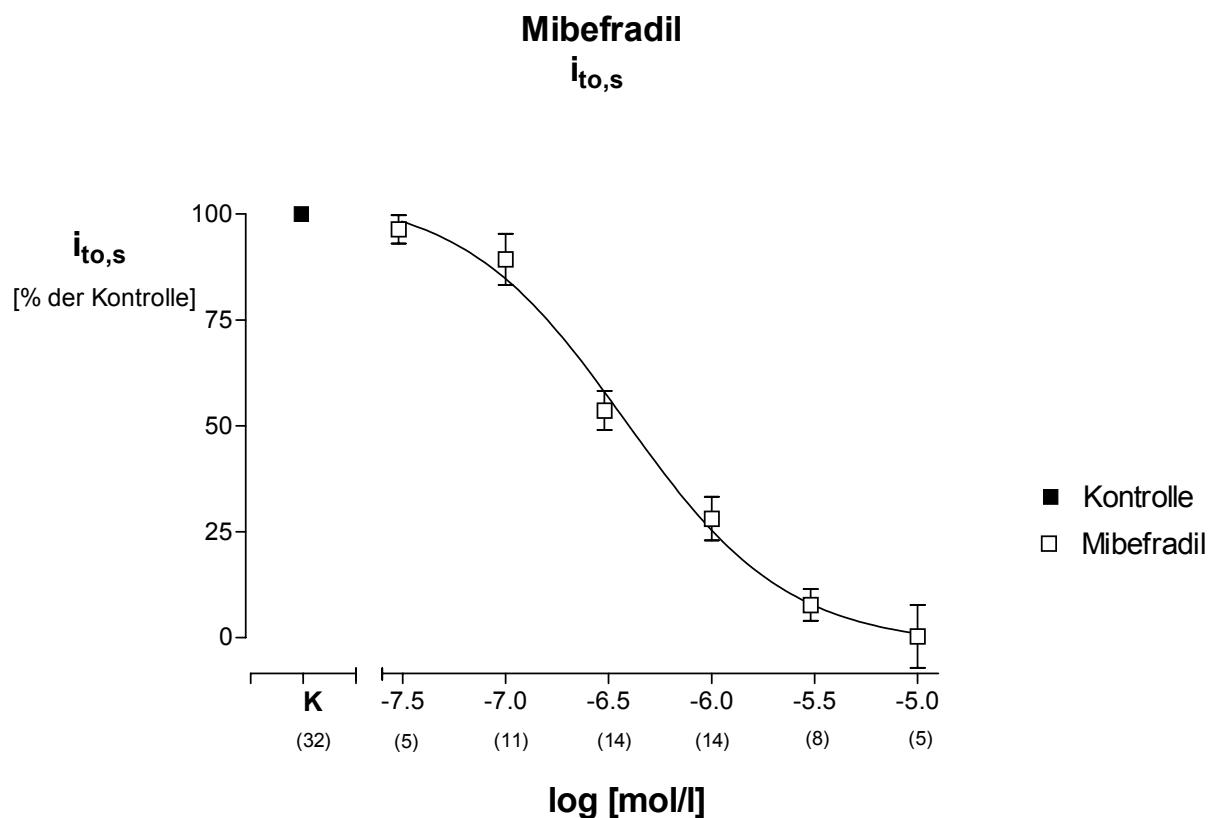


Abbildung 12:

Konzentrations-Wirkungskurve von Mibefradil für den langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstrom  $i_{to,s}$  in % des Kontrollwertes vor Mibefradil-Gabe. Auf der Abszisse sind unterhalb der Konzentrationen die Anzahl der Versuche in Klammern angegeben. Auf der Ordinate ist die Prozentzahl des maximal gemessenen Stroms aufgetragen.

Die Stromamplitude, dargestellt in % der Kontrolle, wird durch ansteigende Mibefradil-Konzentrationen reduziert. Wie schon in Abbildung 11 zu erkennen ist, setzt die Wirkung von Mibefradil bei einer Konzentration von  $0,03 \mu\text{mol/l}$  ein. Bei Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  ist die Blockade des  $i_{\text{to},s}$ -Stroms vollständig. Die  $\text{IC}_{50}$  beträgt  $0,38 \mu\text{mol/l}$ .

Die konzentrationsabhängigen Effekte von Mibefradil auf den Steigungsfaktor  $k$  und das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$  sind in Abbildung 13 dargestellt.

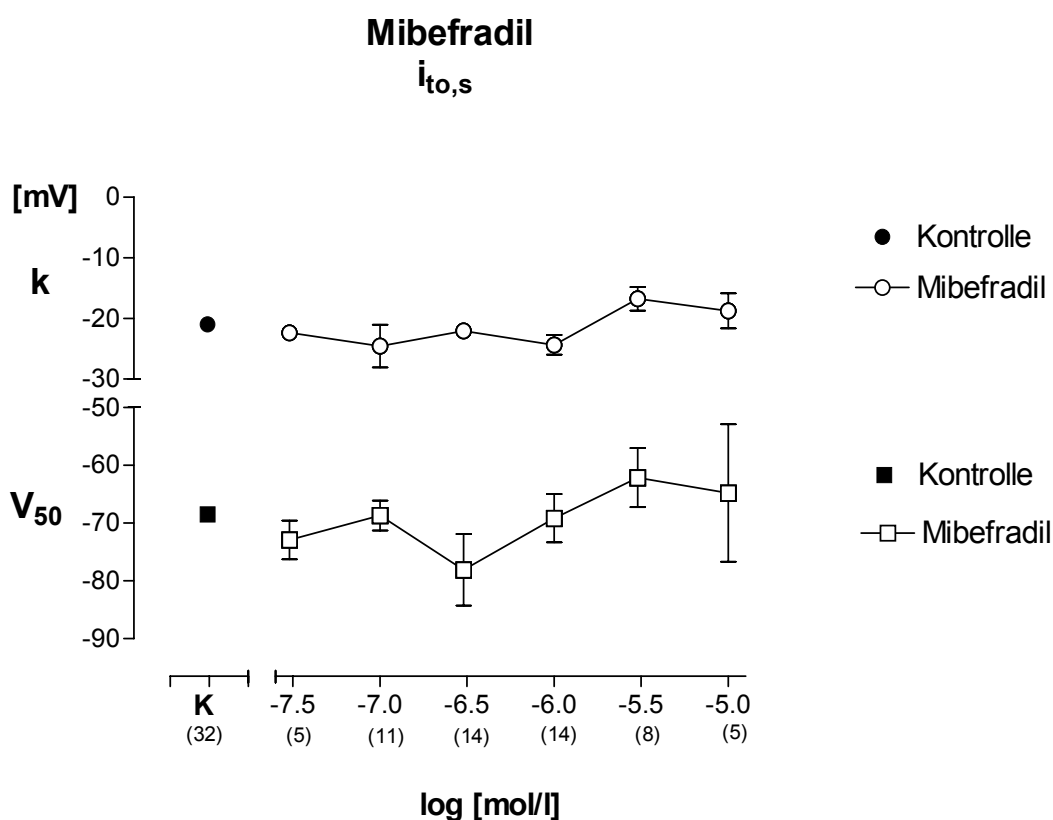


Abbildung 13:

Konzentrationsabhängigkeit des halbmaximalen Inaktivierungspotentials  $V_{50}$  und des Steigungsfaktors  $k$  der  $i_{\text{to},s}$ -Inaktivierungskurve von der Mibefradil-Konzentration. Die Mittelwerte beider Kurven zeigen im gesamten Verlauf keine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf den Steigungsfaktor und den  $V_{50}$ -Wert. Der mittlere Kontrollwert (K) aus 32 Versuchen beträgt für  $V_{50}$   $-68,5 \pm 1,1 \text{ mV}$  und für den Steigungsfaktor  $-21,0 \pm 0,4 \text{ mV}$ . In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben.

In der Graphik sind die aus 32 Versuchen gemittelten Werte abgebildet und auf Signifikanz untersucht worden. Einige der Zellen hielten der langen Versuchsdauer, die für das vollständige Konzentrationsspektrum nötig war, nicht stand und starben den Zelltod. Daher erklärt sich die hohe Zahl an Kontrollen und die geringere Anzahl an Versuchen bei den verschiedenen Konzentrationen.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, weicht der Steigungsfaktor über den gesamten Konzentrationsbereich nicht signifikant von der Kontrolle ab ( $P \geq 0,05$ ). Dies gilt auch für das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$ . Es steht also mit Mibefradil ein Hemmstoff des langsam inaktivierenden transienten  $K^+$ -Auswärtsstroms  $i_{to,s}$  zur Verfügung, der konzentrationsabhängig dessen Stromamplitude reduziert. Hingegen wird unter dem Einfluß von Mibefradil weder die Inaktivierungskurve auf der Spannungsachse noch der Steigungsfaktor verändert.

### 3.2.2. Effekte von Verapamil auf den $i_{to,s}$

Zur Untersuchung des Einflusses von Verapamil auf den  $i_{to}$ -Strom wurden wiederum Voltage-Clamp-Versuche durchgeführt, wobei das Spannungsklemmmuster aus Abbildung 8 verwendet wurde. Abbildung 14 zeigt einen typischen Versuch, der die konzentrationsabhängige Reduktion des  $i_{to,s}$ -Stroms im Vergleich zur Kontrolle darstellt. Desweiteren sind die jeweiligen Referenzstromspuren (0 mV Konditionierungspotential) dargestellt, in denen die transienten Auswärtsströme inaktiviert waren. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 14 lediglich die Stromspuren für die Konditionierungspotentiale 0 mV und -140 mV dargestellt.

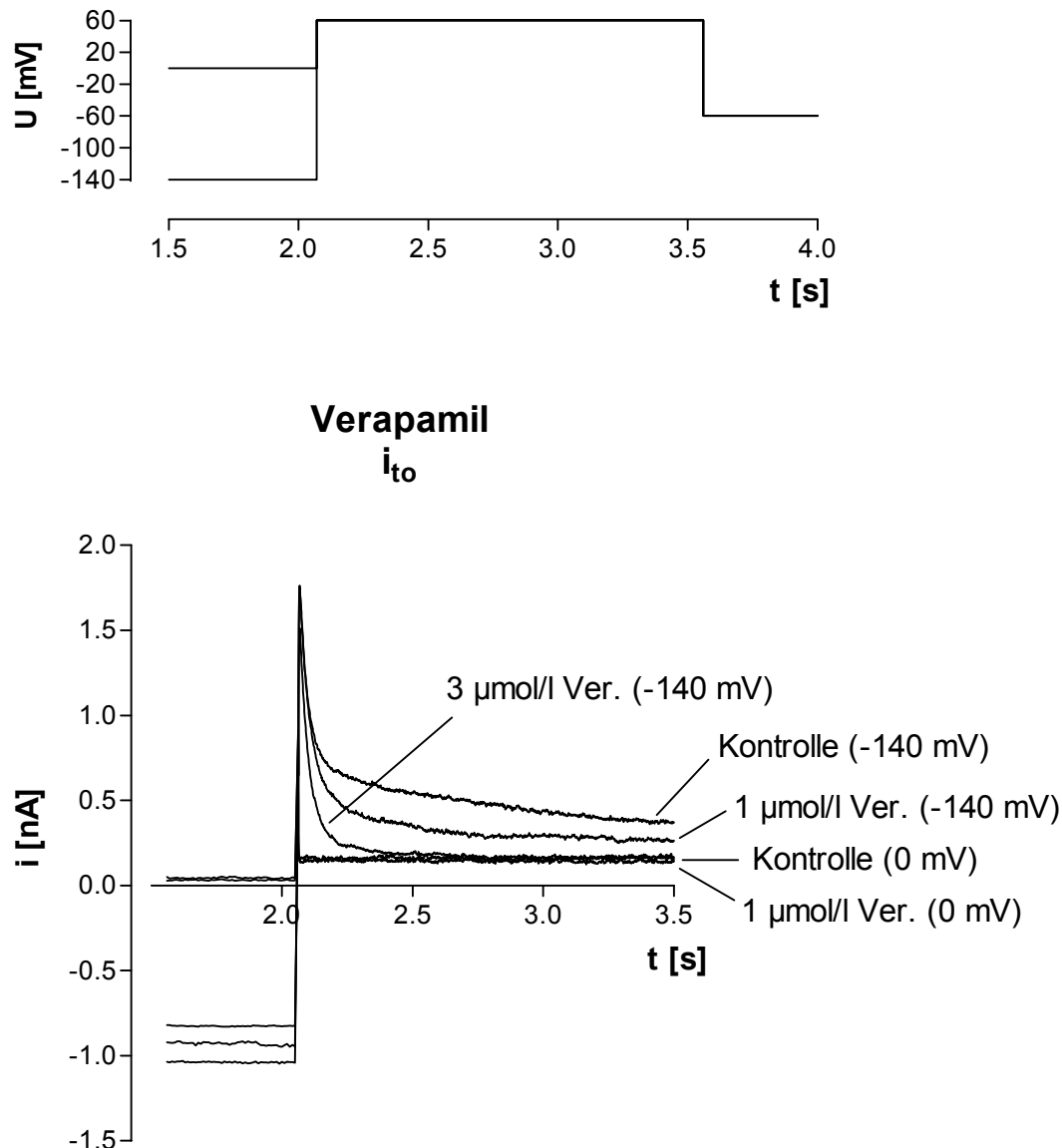


Abbildung 14: Effekte von Verapamil auf den transienten Auswärtsstrom  $i_{to}$ .

Verwendet wurde das Klemmmuster aus Abbildung 10a). Dargestellt ist ein typischer Versuch, der die Wirkung von 1  $\mu\text{mol/l}$  und 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil auf den  $i_{to}$ -Strom bei den Konditionierungspotentialen  $-140$  mV und  $0$  mV im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Zusätzlich sind die Referenzstromspuren bei  $0$  mV dargestellt, da bei diesem Potential die transienten Auswärtsströme inaktiviert sind. Die Einwirkzeit für die jeweiligen Verapamilkonzentrationen betrug 10 Minuten.

Darüber hinaus wurden wie bei Mibefradil Konditionierungspotentiale im Spannungsbereich von  $-140$  mV bis  $0$  mV (10 mV-Schritte) gewählt. Die Versuchsdurchführung erfolgte beim Verapamil analog zu der mit Mibefradil, wobei sich bei Verapamil der untersuchte



Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 10  $\mu\text{mol/l}$  erstreckte.

In Vorversuchen wurden beim Verapamil Konzentrationen  $< 0,01 \mu\text{mol/l}$  eingesetzt, die jedoch keine Wirkung auf die Stromamplitude zeigten. Die Schwellenkonzentration lag bei  $0,01 \mu\text{mol/l}$ . Die Abbildung 15 zeigt ein typisches Beispiel für die Stromspannungskurven unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluß verschiedener Verapamilkonzentrationen.

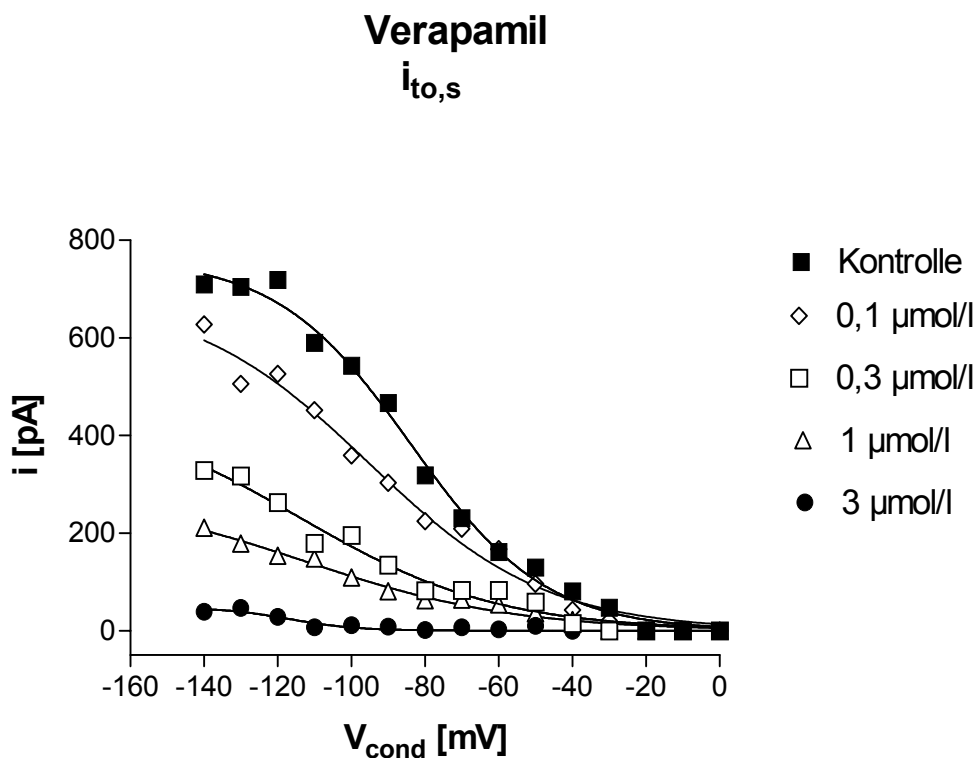


Abbildung 15:

Konzentrationsabhängige Hemmung des  $i_{to,s}$ -Stroms durch Verapamil bei Konditionierungspotentialen von 0 mV bis  $-140 \text{ mV}$ . Die Einwirkzeit der dargestellten Verapamil-Konzentrationen betrug 10 Minuten. Bis auf die Werte der 3  $\mu\text{mol/l}$ -Konzentration können alle anderen mit einer Boltzmann-Funktion angepaßt werden.

Wie man anhand der Grafik erkennen kann, hemmt auch Verapamil konzentrationsabhängig den  $i_{to,s}$  über den gesamten Potentialbereich. Bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  war der Stromverlauf so flach, daß keine sigmoide Anpassung erfolgen konnte. Für die anderen  $i_{to,s}$ -Stromkurven konnten jedoch halbmaximale Inaktivierungspotentiale und Werte für den Steigungsfaktor bestimmt werden.

In Abbildung 16 ist der Effekt der verschiedenen Verapamil-Konzentrationen auf die Stromamplitude in Prozent der Kontrolle dargestellt. Für Verapamil konnte eine  $IC_{50}$  von  $0,29 \mu\text{mol/l}$  berechnet werden.

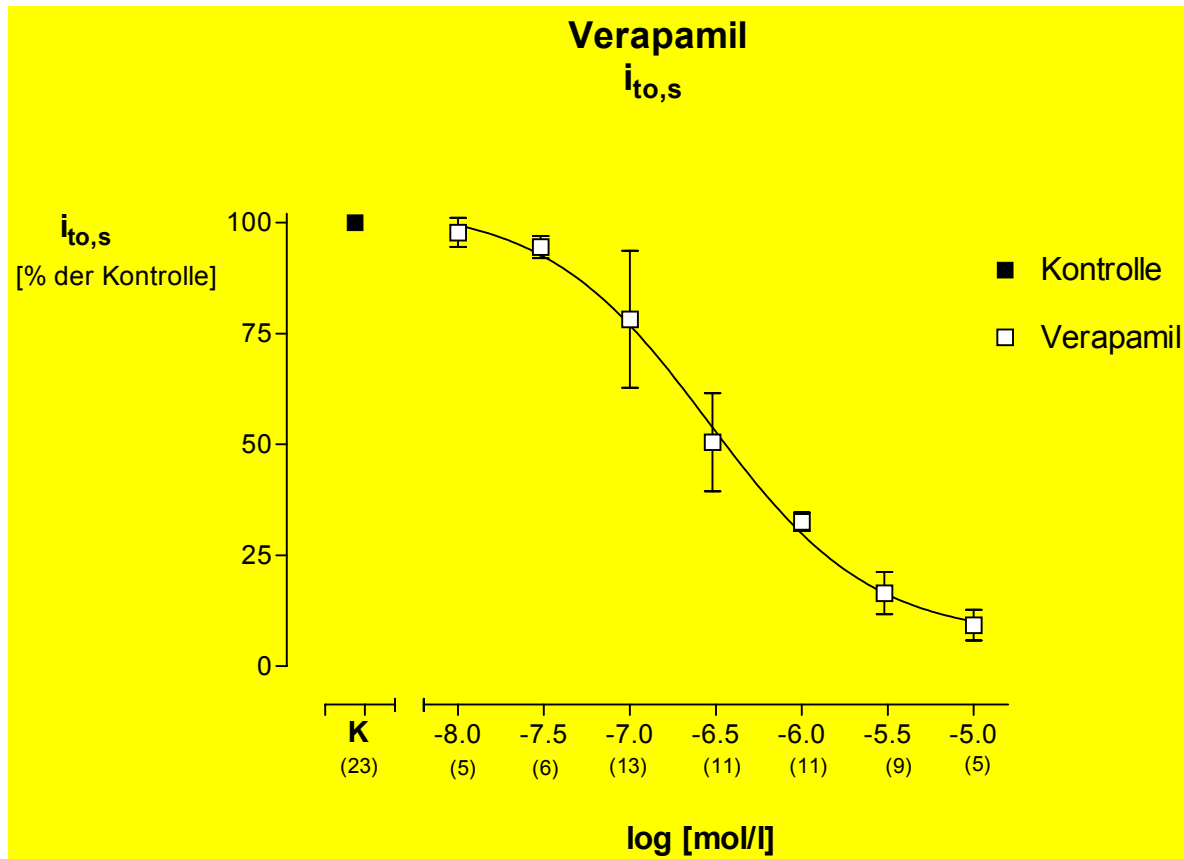


Abbildung 16:

Konzentrations-Wirkungskurve für die Wirkung von Verapamil auf den langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstrom  $i_{to,s}$ .

Auf der Abszisse sind unterhalb der Konzentrationen die Anzahl der Versuche in Klammern angegeben. Auf der Ordinate ist der  $i_{to,s}$ -Strom in Prozent der Kontrolle bei einem Konditionierungspotential von  $-140 \text{ mV}$  aufgetragen.

Analog zur Auswertung bei Mibefradil ist auch hier, aufgrund des maximal auslösbaeren  $i_{to,s}$ -Stroms, das Konditionierungspotential von  $-140 \text{ mV}$  gewählt worden. Wie aus dem in Abbildung 16 dargestellten Kurvenverlauf der aus mehr als 23 Versuchen ermittelten Werte abzulesen ist, erzielt Verapamil die gleichen Effekte wie Mibefradil, jedoch mit einer teilweise geringeren Konzentration. Dies drückt sich in der Schwellenkonzentration aus, die

für Mibefradil 0,03  $\mu\text{mol/l}$  und für Verapamil 0,01  $\mu\text{mol/l}$  beträgt. Eine vollständige Hemmung des  $i_{\text{to,s}}$ -Stroms erfolgt bei Mibefradil durch 10  $\mu\text{mol/l}$ , dagegen bei Verapamil schon bei 3  $\mu\text{mol/l}$ . Die konzentrationsabhängigen Effekte von Verapamil auf den Steigungsfaktor  $k$  und das halbmaximale Inaktivierungspotential sind in Abbildung 17 gezeigt.

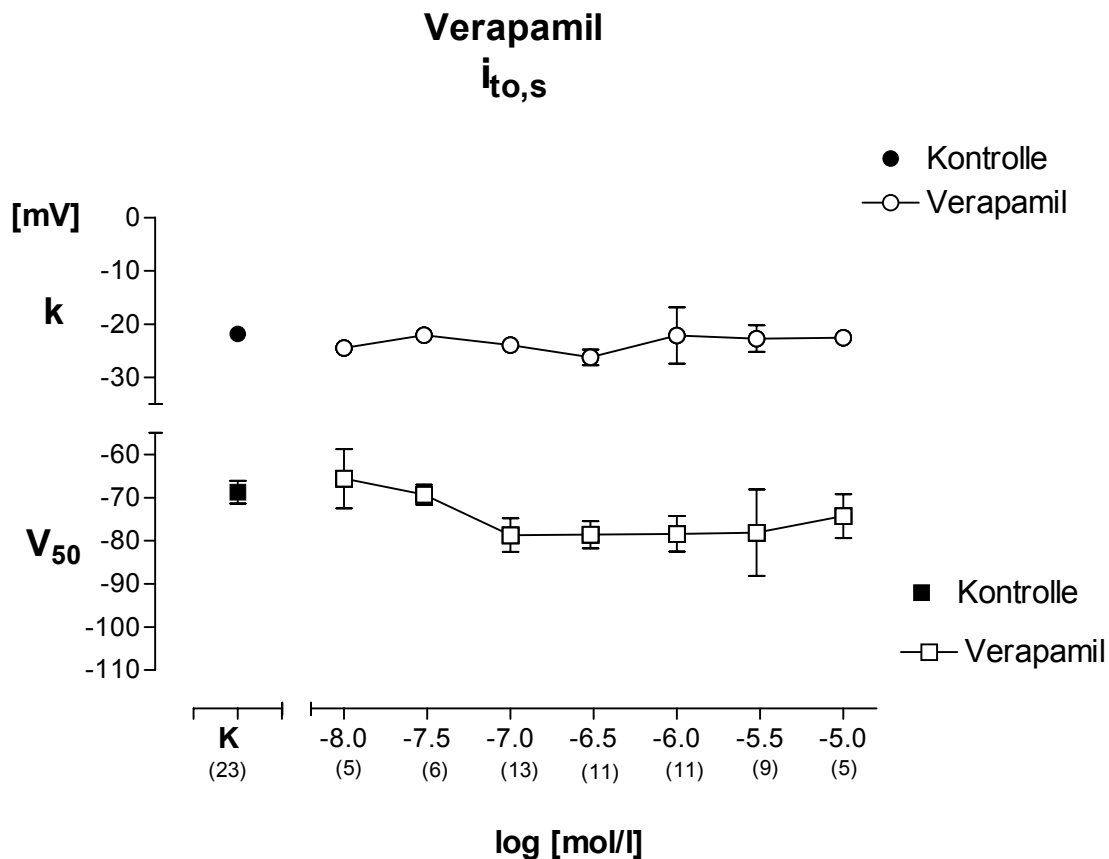


Abbildung 17:

Konzentrationsabhängigkeit des halbmaximalen Inaktivierungspotentials  $V_{50}$  und des Steigungsfaktors  $k$  der  $i_{\text{to,s}}$ -Inaktivierungskurve von der Verapamil-Konzentration.

Die Mittelwerte beider Kurven zeigen im gesamten Verlauf keine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf den Steigungsfaktor und den  $V_{50}$ -Wert. Der mittlere Kontrollwert ( $K$ ) aus 23 Versuchen beträgt für  $V_{50}$   $-68,7 \pm 2,6$  mV und für den Steigungsfaktor  $-21,8 \pm 0,6$  mV. In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben.

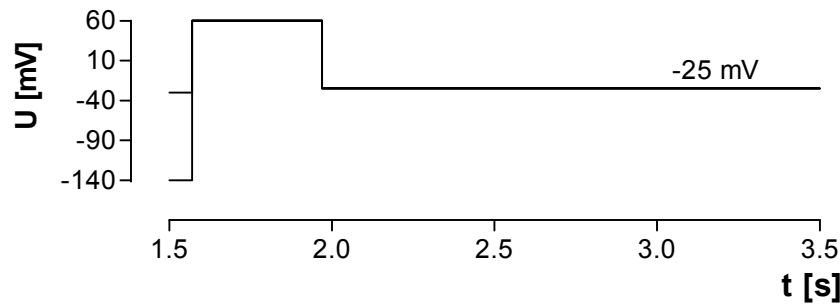
Wie man aus den gemittelten Werten von insgesamt 23 Versuchen sehen kann, weichen diese zwei Parameter über den gesamten Konzentrationsbereich statistisch nicht signifikant ( $P \geq 0,05$ ) von der Kontrolle ab. Aus den bisher dargestellten Daten läßt sich schließen, daß

mit Verapamil und Mibefradil zwei Blocker des langsam inaktivierenden  $K^+$ -Auswärtsstroms  $i_{to,s}$  existieren, die weder einen Effekt auf die Lage der Inaktivierungskurven noch auf den Steigungsfaktor  $k$  haben. Unterschiede zwischen beiden Substanzen in Bezug auf die  $i_{to,s}$ -Hemmung betreffen lediglich die Hemmkonzentrationen.

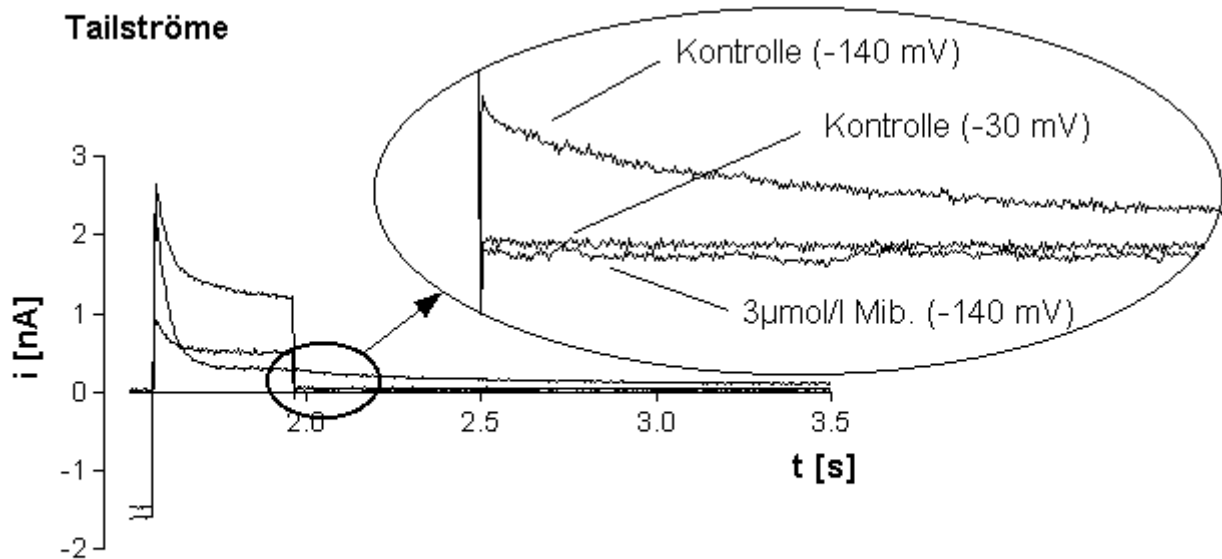
### 3.2.3. $i_{to}$ -Tail-Ströme

Zum Vergleich der beiden Substanzen wurde ferner ihre Wirkung auf die spannungsabhängige Aktivierung der  $i_{to,s}$ -Tail-Ströme gemessen. Für den  $i_{to,f}$ -Strom konnten hingegen im „whole-cell“-Modus keine Tailströme registriert werden, da der  $i_{to,f}$ -Strom bei Raumtemperatur zu schnell inaktivierte. Dagegen inaktivieren der  $i_{to,s}$ - bzw. seine Tail-Ströme, die ein Maß für den jeweiligen Öffnungszustand des virtuellen  $i_{to,s}$ -Aktivierungstores sind, so langsam, daß direkt nach dem Klemmen auf ein Potential, bei dem im „steady-state“ das Aktivierungstor geschlossen ist, eine  $i_{to,s}$ -Tail-Amplitude zu beobachten ist. Letztere verhält sich proportional zur Amplitude des  $i_{to,s}$ . Um die Tailströme zu messen, wurde zuerst der  $i_{to}$ -Strom ausgehend von den Konditionierungspotentialen  $-140$  mV und  $-30$  mV durch Klemmung auf ein Potential von  $+60$  mV aktiviert. Anschließend wurden innerhalb der Inaktivierungsphase des langsamen transienten Auswärtsstroms nach ca.  $400$  ms durch Umschalten auf ein Potential von  $-25$  mV die Tail-Ströme aktiviert. Das entsprechende Klemmuster ist in Abbildung 18a) dargestellt. Abbildung 18b) zeigt einen typischen Versuch, in dem der Einfluß von  $3$   $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil auf die Tailströme im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde.

Ein Konditionierungspotential von  $-30$  mV (Abbildung 18b)) wurde gewählt, um den  $i_{to,s}$ -Strom spannungsabhängig zu inaktivieren und somit eine Referenzstromspur zu erhalten. Diese wurde in der Auswertung von dem erhaltenen Peak-Strom (Konditionierungspotential  $-140$  mV) subtrahiert. Auf eine vollständige Darstellung des Tail-Stroms, dessen Spur am Ende des sechs Sekunden dauernden Testpulses das Niveau der Referenzstromspur (Konditionierungspotential  $-30$  mV) erreichte, wurde in Abbildung 18b) und 19b) verzichtet.



a)



b)

Abbildung 18: Effekte von  $3 \mu\text{mol/l}$  Mibefradil auf die Tailströme

a) Spannungsklemmmuster zur Aktivierung der Tailströme. Ausgehend von  $-30 \text{ mV}$  und  $-140 \text{ mV}$  wurden die Zellen für ca.  $400 \text{ ms}$  auf ein Potential von  $+60 \text{ mV}$  geklemmt und dann für ca. sechs Sekunden (hier sind nur ca.  $1,5 \text{ Sekunden}$  abgebildet) auf einem Testpotential von  $-25 \text{ mV}$  gehalten, um den Tailstrom auszulösen.

b) Stromspuren einer ventrikulären Rattenmyocyte. Der durch Klemmung auf  $-25 \text{ mV}$  aktivierte Tailstrom wird durch  $3 \mu\text{mol/l}$  Mibefradil (Mib.) nahezu vollständig gehemmt. Die Amplitude der Referenzstromspur (Konditionierungspotential  $-30 \text{ mV}$ ) sowie die Stromspur von Mibefradil liegen auf einem Niveau (Ausschnittsvergrößerung).

Die Stromspannungskurven für die Inaktivierung des  $i_{\text{to,s}}$ -Stroms bzw. der Tailströme sind nahezu identisch. Daher wird, wie in Abbildung 18b) (Ausschnittsvergrößerung) zu sehen, die Hemmwirkung von Mibefradil auf die Tailströme mit den vorliegenden Versuchen bestätigt.

Ähnliche Effekte auf den Tailstrom lassen sich auch für Verapamil feststellen. Dazu wurden, wie mit Mibefradil, Konzentrations-Wirkungsversuche in Bezug auf die Tail-Amplitude durchgeführt. Für die Untersuchung wurde das Klemmcluster aus Abbildung 18a) verwendet. Abbildung 19b) zeigt einen charakteristischer Versuch, der den Effekt von 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil auf die Tailströme im Vergleich zur Kontrolle beschreibt.

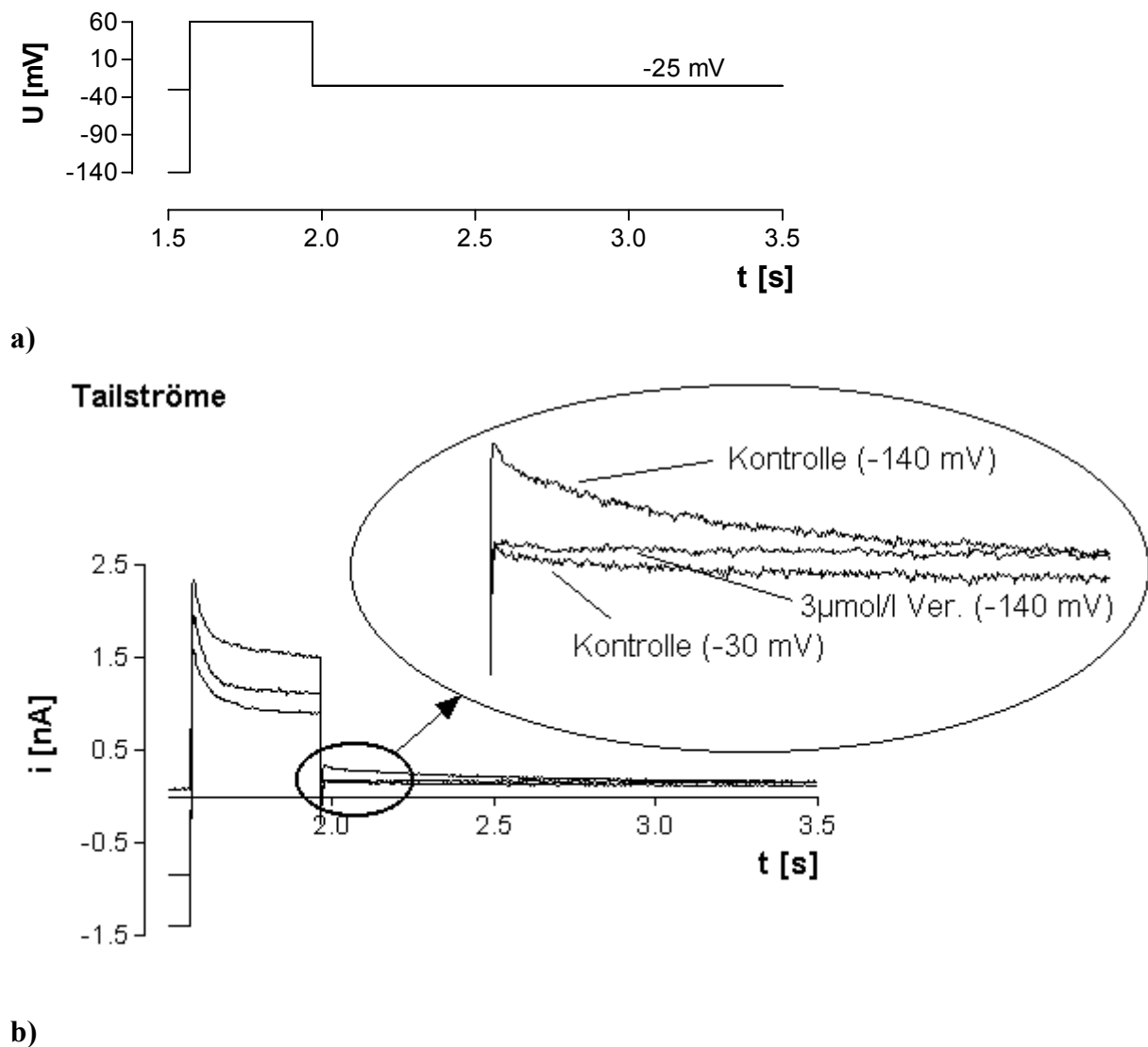


Abbildung 19: Effekte von Verapamil auf die Tailströme

a) Spannungsklemmcluster wie in Abbildung 18a) beschrieben

b) Stromspuren eines typischen Experiments, das die Hemmwirkung von 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil (Ver.) auf den Tailstrom zeigt. In der Ausschnittsvergrößerung ist zu erkennen, daß Verapamil die Amplitude der Kontrolle annähernd auf den Wert der Referenzstromamplitude (Konditionierungspotential  $-30$  mV) reduziert.

Die Ausschnittsvergrößerung in Abbildung 19b) verdeutlicht die massive Inhibition des Tailstroms durch Verapamil, so daß die Referenzstromlinie der Kontrolle bei  $-30$  mV nahezu auf dem Niveau der Tailstromspur von Verapamil bei  $-140$  mV liegt. Die unterschiedlichen Wirkungen verschiedener Mibefradil- und Verapamilkonzentrationen auf diese Tailamplituden sind in Abbildung 20 dargestellt.

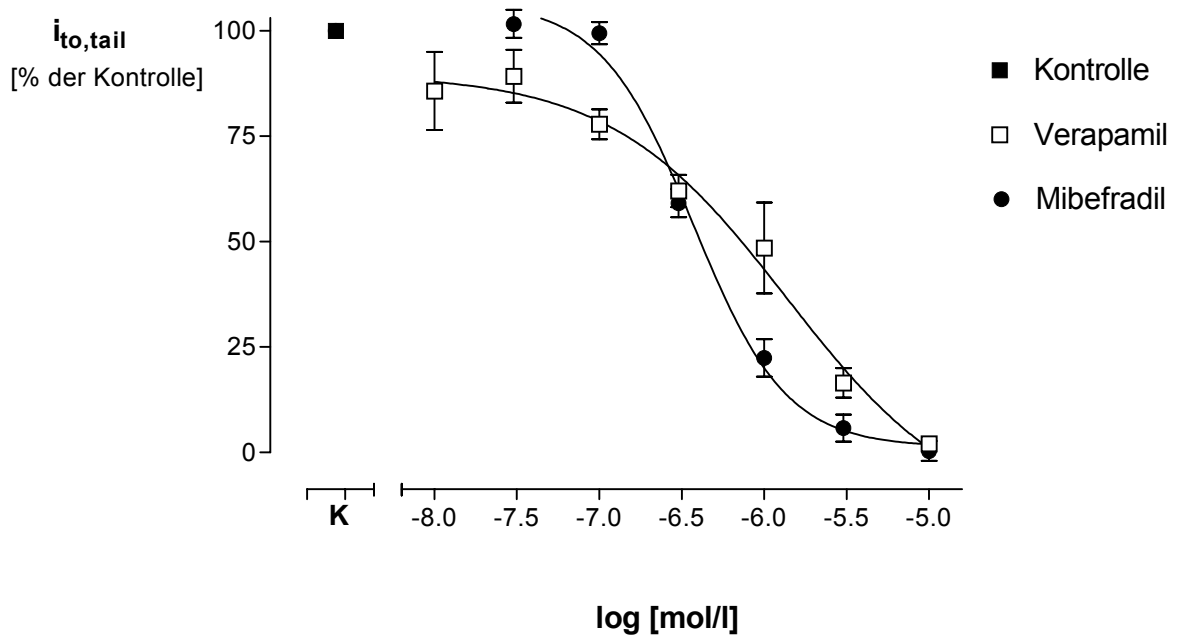


Abbildung 20: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von Mibefradil und Verapamil für die Tailstromamplituden.

Auf der Abszisse sind die Konzentrationen logarithmisch und auf der Ordinate die Tailströme in Prozent des maximal gemessenen Tailstroms aufgetragen. Die  $IC_{50}$  beträgt für Mibefradil  $0,37 \mu\text{mol/l}$  und für Verapamil  $1,37 \mu\text{mol/l}$ .

Es zeigt sich, daß Verapamil in ähnlicher Weise wie Mibefradil den  $i_{to,s}$ -Tailstrom konzentrationsabhängig hemmt. Unterschiede zwischen beiden Substanzen sind nur in Bezug auf ihre Wirkstärke festzustellen. Beispielsweise läßt sich für Mibefradil eine Inhibition des Tailstroms auf 50 % schon bei Konzentrationen von  $0,37 \mu\text{mol/l}$  und bei Verapamil erst bei  $1,37 \mu\text{mol/l}$  erzielen. Andererseits wurde bereits mit  $0,01 \mu\text{mol/l}$  Verapamil die Tailstromamplitude um ca. 15 % reduziert.

### 3.3. Vergleich der Wirkungen von Mibefradil und Verapamil auf den schnell inaktivierenden $K^+$ -Auswärtsstrom $i_{to,f}$

#### 3.3.1. Effekte von Mibefradil auf den $i_{to,f}$

Zur Darstellung der Wirkung von Mibefradil auf den  $i_{to,f}$  wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt, wobei das Spannungsklemmmuster aus Abbildung 8a) verwendet wurde. Eine Möglichkeit der Auswertung des  $i_{to,f}$ -Stroms wäre die Beschränkung auf den Potentialbereich von  $-60$  mV bis  $0$  mV, in dem der  $i_{to,s}$ -Strom eigentlich inaktiviert sein sollte (Weis, 1993). Dieses war jedoch in vielen der vorliegenden Versuche nicht der Fall. Daher wurde der selektive  $i_{to,s}$ -Blocker Bertosamil eingesetzt, der den  $i_{to,s}$ -Strom konzentrationsabhängig inhibiert, ohne den  $i_{to,f}$ -Strom zu verändern (Weis, 1993). Zur vollständigen Hemmung des  $i_{to,s}$ -Stroms wurde in den vorliegenden Versuchen eine Bertosamil-Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  verwendet. Abbildung 21 zeigt, daß nach zehnminütiger Einwirkzeit von Bertosamil ein nicht geringer Anteil des  $i_{to,s}$ , der noch bis zu Konditionierungspotentialen von  $-20$  mV vorhanden war, vollständig blockiert wurde. Eine anschließende Zugabe einer hohen Mibefradil-Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  führte, wie in der Abbildung 21 zu sehen, zu keiner nennenswerten Veränderung der Strom-Spannungskurve.

Dieses Ergebnis, das in fünf weiteren Versuchen bestätigt wurde, zeigt, daß Mibefradil wie Bertosamil nur den  $i_{to,s}$ -Strom hemmt, da bei vollständiger Ausschaltung des  $i_{to,s}$  keine Wirkung auf den verbleibenden  $i_{to,f}$  zu erkennen ist.



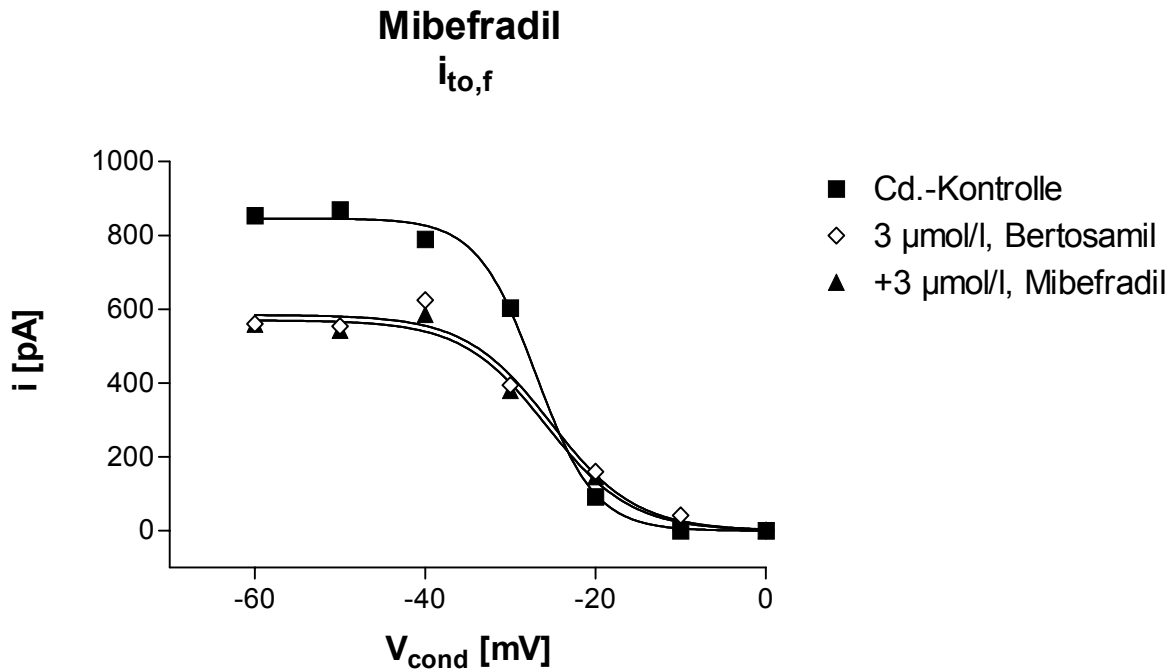


Tabelle 1

	Cd.-Kontrolle	3µmol/l Bertosamil	+3µmol/l Mibefradil
$V_{50}$ (mV)	-26.99	-25.26	-25.78
k (mV)	-3.454	-5.010	-4.949

Abbildung 21:

Ein charakteristischer Versuch, der die Wirkungen von 3 µmol/l Mibefradil und 3 µmol/l Bertosamil auf die Inaktivierungskurve des  $i_{to}$  mit seinen beiden Komponenten im Vergleich zur Kontrolle darstellt. Die Werte sind in Form von Stromspannungskurven abgebildet. Für die Auswertung ist nur der Potentialbereich von -60 mV bis 0 mV von Bedeutung, da bei negativeren Konditionierungspotentialen die  $i_{to,f}$ -Stromkurve kaum eine Veränderung erfährt. Die Abbildung zeigt die vollständige Blockade des  $i_{to,s}$ -Reststroms bis zu einem Konditionierungspotential von -20 mV durch den selektiven  $i_{to,s}$ -Blocker Bertosamil, so daß die Bertosamil-Kurve den  $i_{to,f}$  Strom darstellt. Nach zehnminütiger Einwirkzeit von 3 µmol/l Bertosamil erfolgte die Zugabe von 3 µmol/l Mibefradil, das ohne Wirkung auf den  $i_{to,f}$  ist. Die Daten für das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und den Steigungsfaktor sind in Tabelle 1 angegeben.

Da Bertosamil nicht selten bei den hier eingesetzten Konzentrationen die Lebensdauer der Kardiomyocyten verkürzte, wurden einige Versuche zur Untersuchung des halbmaximalen Inaktivierungspotentials und des Steigungsfaktors k ohne diesen Blocker durchgeführt. Entsprechend ist in Abbildung 22 der Einfluß von Mibefradil auf das halbmaximale

Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und den Steigungsfaktor  $k$  des  $i_{to}$ -Gesamtstroms dargestellt. Die Mittelwerte beider Parameter wurden über den gesamten Potentialbereich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle verändert ( $P \geq 0,05$ ).

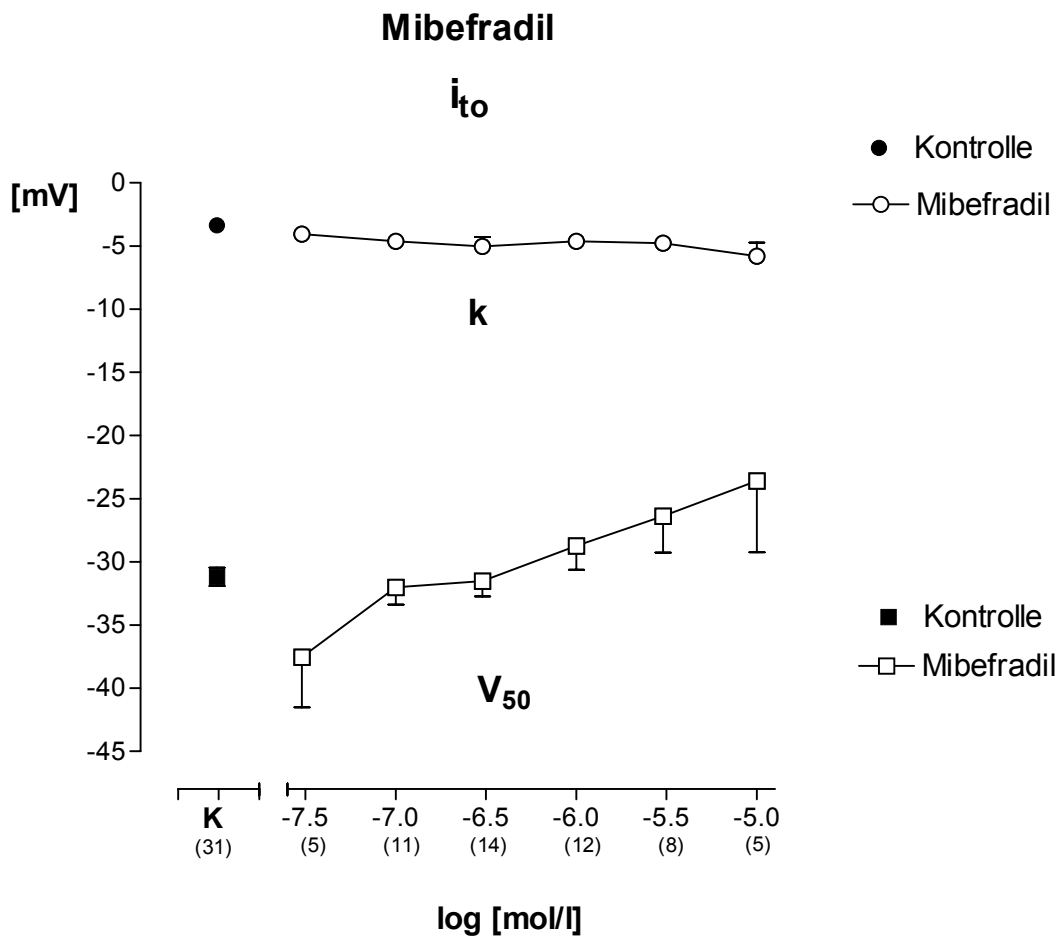


Abbildung 22:

Konzentrations-Wirkungskurve für die Wirkung von Mibefradil auf das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und den Steigungsfaktor  $k$  des transienten Kaliumauswärtsstroms  $i_{to}$ . Die Mittelwerte beider Kurven zeigen im gesamten Verlauf keine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf den  $k$ - und  $V_{50}$ -Wert der Kontrolle. Der mittlere Kontrollwert ( $K$ ) aus 31 Versuchen beträgt für  $V_{50}$   $-31,2 \pm 0,7$  mV und für  $k$   $-3,4 \pm 0,2$  mV. In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben.

Wie Bertosamil hatte auch Mibefradil keinen Einfluß auf die Lage der Inaktivierungskurven auf der Spannungsachse.

### 3.3.2. Effekte von Verapamil auf den $i_{to,f}$

Zur Klärung der Frage, welche Wirkung Verapamil im Vergleich zu Mibefradil auf den  $i_{to,f}$ -Strom besitzt, wurden Voltage-Clamp-Experimente unter den gleichen Versuchsbedingungen wie mit Mibefradil durchgeführt. Wiederum wurden 3  $\mu\text{mol/l}$  des selektiven  $i_{to,s}$ -Blockers Bertosamil eingesetzt, um durch die nachfolgende Zugabe von 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil dessen Effekte auf den  $i_{to,f}$  zu untersuchen. Abbildung 23 zeigt, daß sich für die Wirkung von Verapamil auf den schnell inaktivierenden  $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom  $i_{to,f}$  ein ähnliches Bild wie für Mibefradil ergibt. Die Stromspannungskurve der schnellen  $i_{to}$ -Komponente und der Kurve nach zehnminütiger Einwirkzeit von Verapamil sind nahezu identisch.

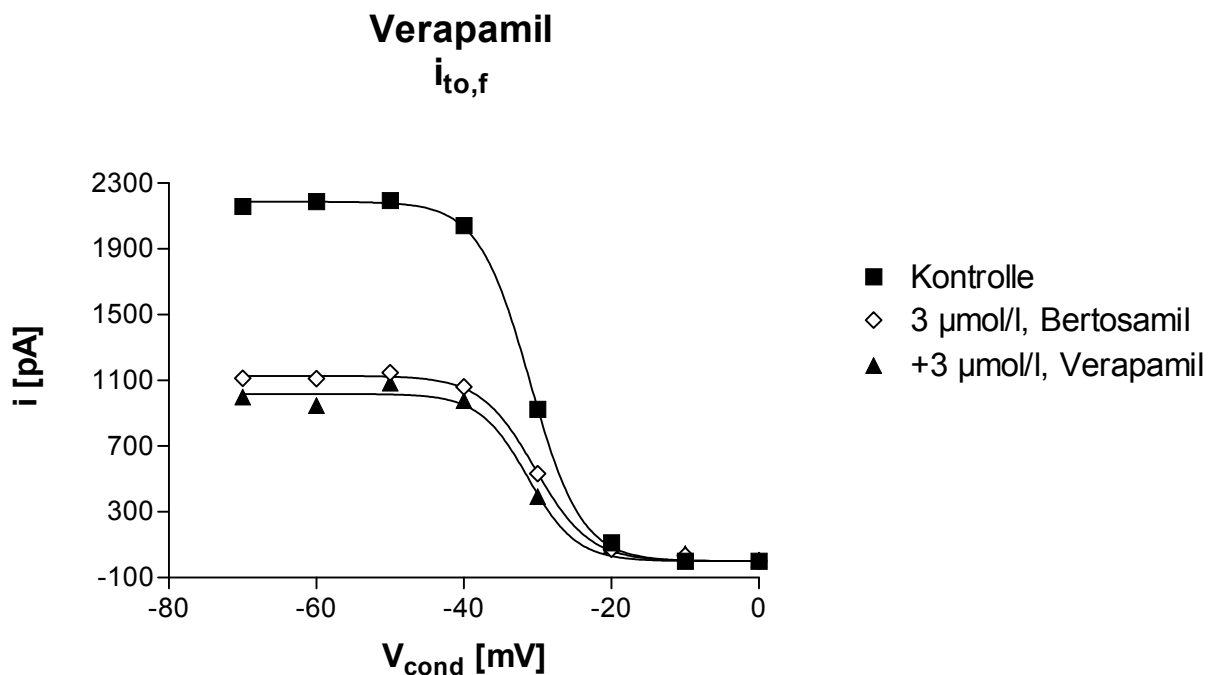


Tabelle 2:

	Kontrolle	3 $\mu\text{mol/l}$ Bertosamil	+3 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil
$V_{50}(\text{mV})$	-31.03	-30.35	-31.30
$k$ (mV)	-3.480	-3.672	-3.279

Abbildung 23:

Ein typischer Versuch, der die Wirkungen von 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil und 3  $\mu\text{mol/l}$  Bertosamil auf die Inaktivierungskurven des  $i_{to}$  mit seinen beiden Komponenten im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Kurve des  $i_{to,s}$ -Blockers Bertosamil beschreibt den schnell inaktivierenden Anteil des  $i_{to}$ . Die Stromspur nach zehnminütiger Einwirkzeit von 3  $\mu\text{mol/l}$

Verapamil zeigte kaum eine Veränderung im Vergleich mit der  $i_{t_0}$ -Kurve nach Bertosamil-Gabe. Gezeigt sind die Stromspannungskurven lediglich im für den  $i_{t_0}$ -Strom relevanten Potentialbereich von  $-70$  mV bis  $0$  mV. Die Daten für das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und den Steigungsfaktor sind in Tabelle 2 angegeben.

Auch durch Verapamil wird weder die Lage der Inaktivierungskurve auf der Spannungsachse noch der Steigungsfaktor  $k$  signifikant ( $P \geq 0,05$ ) verändert. Dies zeigen die Ergebnisse, die aus 23 Versuchen erhalten wurden und in Abbildung 24 in Form von Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt sind. Erkennbar ist, daß die gemittelten  $V_{50}$ - und  $k$ -Werte für die verschiedenen Verapamil-Konzentrationen über den gesamten Konzentrationsbereich auf einem Niveau bleiben. Es wurden in Abbildung 24 aus den bereits oben erwähnten Gründen die Parameter des  $i_{t_0}$ -Gesamtstroms dargestellt.

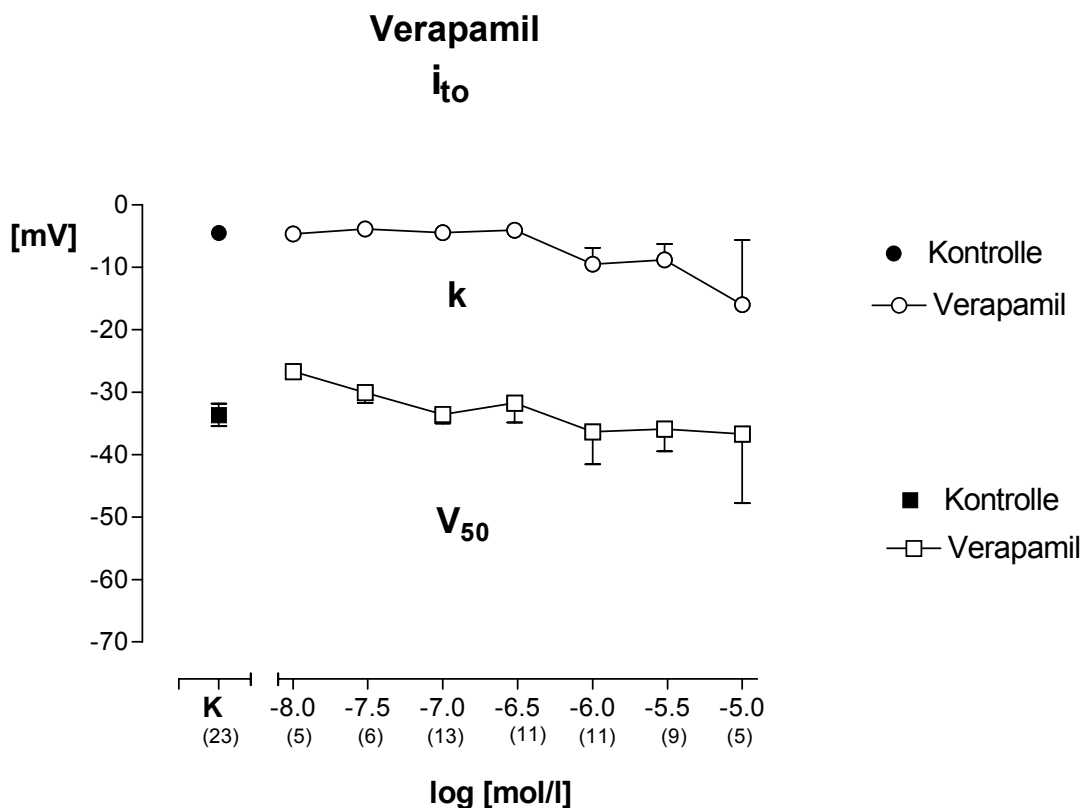


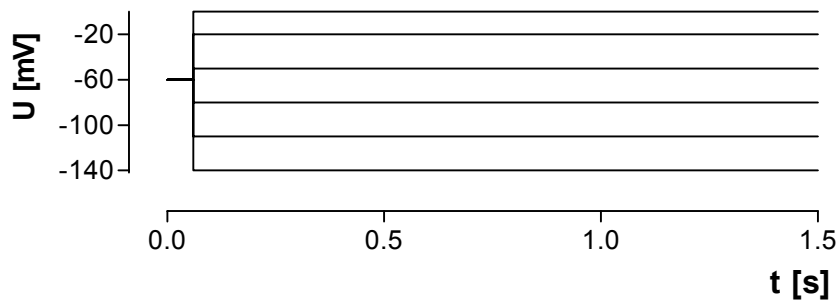
Abbildung 24:

Konzentrations-Wirkungskurve für die Wirkung von Verapamil auf das halbmaximale Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und den Steigungsfaktor  $k$  des  $i_{t_0}$ -Stroms. Die Mittelwerte beider Kurven zeigen im gesamten Verlauf keine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf den  $k$ - und  $V_{50}$ -Wert der Kontrolle. Der mittlere Kontrollwert ( $K$ ) aus 23 Versuchen beträgt für  $V_{50}$   $-33,6 \pm 1,8$  mV und für  $k$   $-4,5 \pm 0,9$  mV. In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben.

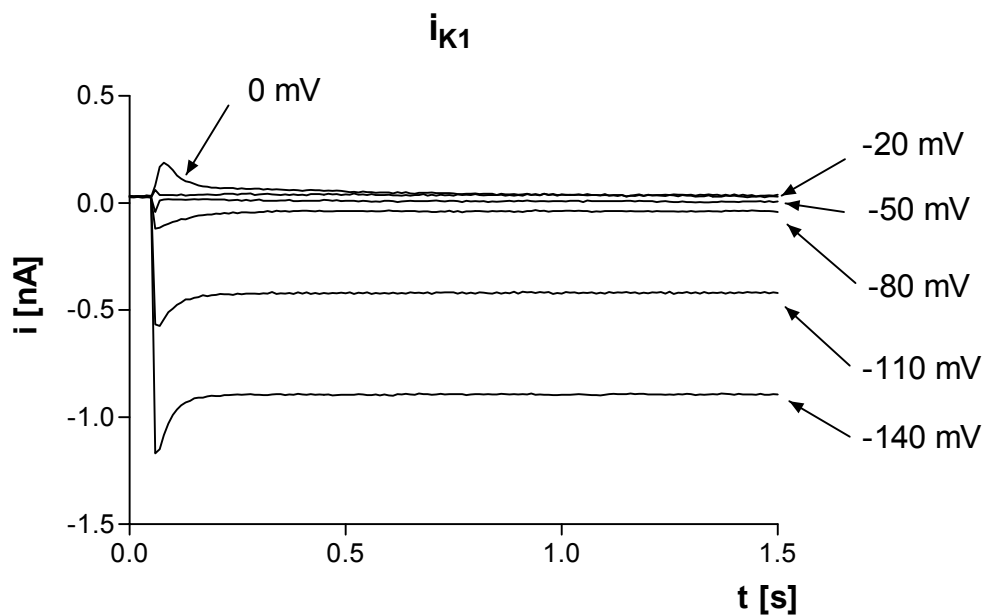
Ähnlich wie Mibefradil hat Verapamil keinen Einfluß auf den Steigungsfaktor und die Lage der Inaktivierungskurve des  $i_{to}$ . Darüber hinaus zeigen beide Substanzen nach Einsatz eines selektiven  $i_{to,s}$ -Blockers wie Bertosamil keinerlei Effekte auf die schnelle Komponente des transienten Auswärtsstroms  $i_{to,f}$ .

### 3.4. Versuche zum einwärtsgerichtenden Kaliumstrom $i_{K1}$

Ferner wurden vergleichende Untersuchungen zur Wirkung der beiden Substanzen auf den einwärtsgerichtenden Kaliumstrom  $i_{K1}$  durchgeführt, der für die finale Repolarisation der Zelle im Verlauf eines Aktionspotentials und auch für das Ruhepotential mitverantwortlich ist (Shimoni *et al.*, 1992). Zu finden ist der  $i_{K1}$ -Strom hauptsächlich im Ventrikel und in den Purkinjefasern, dagegen ist er im Vorhof, sowie im Sinus- und AV-Knoten kaum vertreten. Bei der Wahl eines geeigneten Klemmusters für den in der Literatur oftmals beschriebenen  $i_{K1}$ -Strom (Sakmann und Trube, 1984) war es wichtig, eine Überlagerung mit möglichen Störströmen zu vermeiden. Da die beiden transienten Auswärtsströme  $i_{to,s}$  und  $i_{to,f}$  erst bei Potentialen positiver als  $-40$  mV aktiviert werden, erwies sich ein Konditionierungspotential von  $-60$  mV als geeignet. Hinzu kam noch die gute Stabilität der Zelle aufgrund der Nähe zum Ruhepotential. Auch eine natriumabhängige Inaktivierung des  $i_{K1}$ -Stroms, die sich erst negativ zum Ruhepotential bemerkbar gemacht hätte, war nicht zu befürchten (Biermans *et al.*, 1987). Der langsame Calcium-Einwärtsstrom  $i_{si}$ , auf den später noch eingegangen wird, tritt bei einem Konditionierungspotential von  $-60$  mV nicht als Störfaktor auf. Durch die Anwesenheit von  $200$   $\mu\text{mol/l}$  Cadmiumchlorid, die keine Auswirkungen auf den  $i_{K1}$ -Strom hatten, war die Elimination sämtlicher Calciumkanalströme gewährleistet. Das angewendete Klemmuster wird in Abbildung 25a) gezeigt. Die Testpotentiale lagen in einem Potentialbereich von  $-140$  mV bis  $0$  mV, in dem eine aussagekräftige Aktivierung des  $i_{K1}$ -Stroms gewährleistet war. Negativere Potentiale als  $-140$  mV wären unphysiologisch gewesen und hätten die Überlebenszeit der Zellen unnötig verkürzt. Die Abbildung 25b) zeigt die Stromspuren der bei verschiedenen Testpotentialen ausgelösten  $i_{K1}$ -Ströme. Zur besseren Übersicht sind nur sechs der insgesamt fünfzehn registrierten Strom-Zeit-Spuren gezeigt.



a)



b)

Abbildung 25:

a) Spannungsklemmungen zur Aktivierung der  $i_{K1}$ -Ströme. Die Kardiomyocyte wurde ausgehend von einem Konditionierungspotential von  $-60$  mV auf Testpotentiale von  $-140$  mV bis  $0$  mV, jeweils in  $10$  mV-Schritten, geklemmt. Anschließend wurde die Zelle in der Nähe ihres Ruhepotentials bei  $-60$  mV gehalten (nicht abgebildet). Zur besseren Übersicht wurden nur sechs der fünfzehn Zyklen dargestellt.

b) Typisches Beispiel, das die transmembranären Ströme an einer ventrikulären Rattenmyocyte zeigt, die beim obigen Spannungsklemmungen fließen. Zu sehen ist, daß sich der  $i_{K1}$ -Strom aus zwei Komponenten zusammensetzt. Er besteht aus einer transienten inaktivierenden und einer nicht inaktivierenden „steady-state“-Komponente.

Abbildung 25b) beschreibt einen  $i_{K1}$ -Strom, der positiv zum Ruhepotential (ca.  $-90$  mV) nur eine kleine Stromamplitude besitzt, während bei negativeren Potentialen größere Ströme

durch die Zellmembran fließen. Diese Strom-Spannungs-Beziehung ist typisch für den  $i_{K1}$  und charakterisiert seine einwärtsgerichtete Funktion. Zur Erstellung einer Strom-Spannungs-Kurve wurde in Abbildung 26 die „steady-state“-Komponente des  $i_{K1}$  gegen das Testpotential aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist, daß bei ca.  $-50$  mV ein maximal auswärtsgerichteter- und negativ zu  $-80$  mV ein stetig ansteigender einwärtsgerichteter Strom fließt.

### 3.4.1. Hemmung durch Barium-Ionen

Es ist bekannt, daß sich der  $i_{K1}$ -Strom durch  $BaCl_2$  vollständig hemmen läßt (DiFrancesco *et al.*, 1984). Um zu prüfen, ob es sich bei dem gemessenen Strom tatsächlich um den  $i_{K1}$ -Strom handelte, wurden die Versuche unter den in 3.4. beschriebenen Versuchsbedingungen in Gegenwart von  $BaCl_2$  wiederholt. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, konnte nach fünfzehnminütiger Einwirkzeit von  $3,6$  mmol/l  $BaCl_2$  nur noch ein minimaler Strom registriert werden. Dies zeigt, daß es sich bei dem untersuchten Strom um den Bariumsensitiven  $i_{K1}$ -Strom handelt. Wie bereits unter 3.4. genauer begründet, war das Klemmsetup so ausgelegt, daß eine selektive Messung des  $i_{K1}$ -Stroms zu erwarten war.

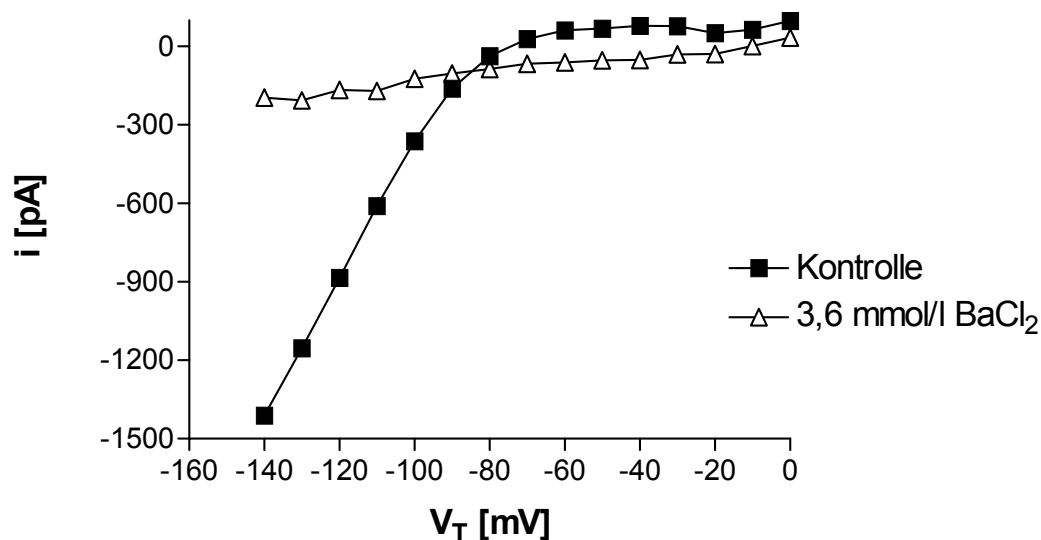


Abbildung 26: Einfluß von  $3,6$  mmol/l  $BaCl_2$  auf den  $i_{K1}$ -Strom

Strom-Spannungskurven einer ventrikulären Rattenmyocyte, dessen Zellmembran auf Testpotentiale im Bereich zwischen  $-140$  mV und  $0$  mV, jeweils in  $10$  mV-Schritten, geklemmt (Klemmsetup aus Abbildung 25a)) wurde. Über den gesamten Potentialbereich ist eine massive Hemmung des  $Ba^{2+}$ -sensitiven Stroms zu erkennen. Das zeigt, daß es sich bei der Kontrolle um den einwärtsgerichteten  $i_{K1}$ -Strom handelt.

Nachdem durch diese Untersuchungen eindeutig belegt war, daß mit Hilfe des Klemmusters der einwärtsgerichtete  $i_{K1}$ -Strom gemessen wurde, konnte in den weiteren Versuchen auf den Einsatz von  $BaCl_2$  verzichtet werden.

### 3.4.2. Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf den $i_{K1}$ -Strom

Um nun die Effekte von Mibefradil auf den einwärtsgerichteten Kaliumkanal genauer zu charakterisieren, wurden die erhaltenen „steady-state“-Einwärts- bzw. Auswärtsströme gegen die eingestellten Testpotentiale bei verschiedenen Konzentrationen von Mibefradil graphisch dargestellt. Abbildung 27 zeigt einen typischen Versuch, bei dem zur genaueren Beschreibung des  $i_{K1}$  Spannungsschritte von 10 mV durchgeführt wurden.

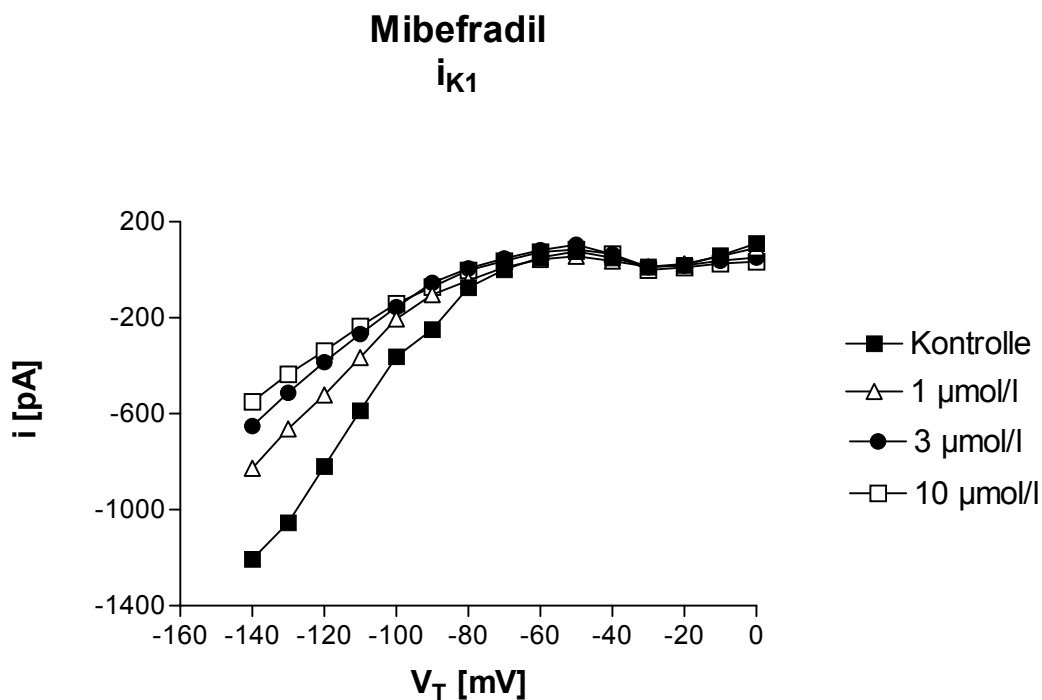


Abbildung 27: Charakteristische Stromspannungskurven nach zehnminütiger Einwirkzeit verschiedener Konzentrationen von Mibefradil.

Verwendet wurde das Klemmcluster aus Abbildung 25a). Eine konzentrationsabhängige Inhibition des  $i_{K1}$ -Stroms setzt erst bei Testpotentialen negativer als  $-90$  mV ein. Mit  $10 \mu\text{mol/l}$  ist für Mibefradil eine Konzentration erreicht, die bei einem Testpotential von  $-140$  mV eine ca. 50 %ige Hemmung des  $i_{K1}$ -Stroms bewirkt.



Es erschien am sinnvollsten, die Auswertung des  $i_{K1}$ -Stroms über die nichtinaktivierbare „steady-state“-Komponente vorzunehmen, da zum einen keine Unterschiede dieser Meßgröße zu dem oftmals in der Literatur (Biermans *et al.*, 1987) beschriebenen  $i_{K1}$ -Peak-Wert festzustellen waren und zum anderen kapazitive Störströme vermieden wurden.

Der Graphik in Abbildung 27 ist zu entnehmen, daß die konzentrationsabhängige Hemmung des  $i_{K1}$ -Stroms nur im unphysiologischen Bereich zwischen  $-100$  mV und  $-140$  mV erkennbar wird. Die Bedeutung dieser Blockade wird in der Diskussion näher erörtert. Ein ähnliches Bild wie in Abbildung 27 für Mibefradil ergibt sich auch für Verapamil.

Abbildung 28 zeigt einen typischen Versuch, der mit verschiedenen Konzentrationen von Verapamil unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurde wie beim Mibefradil.

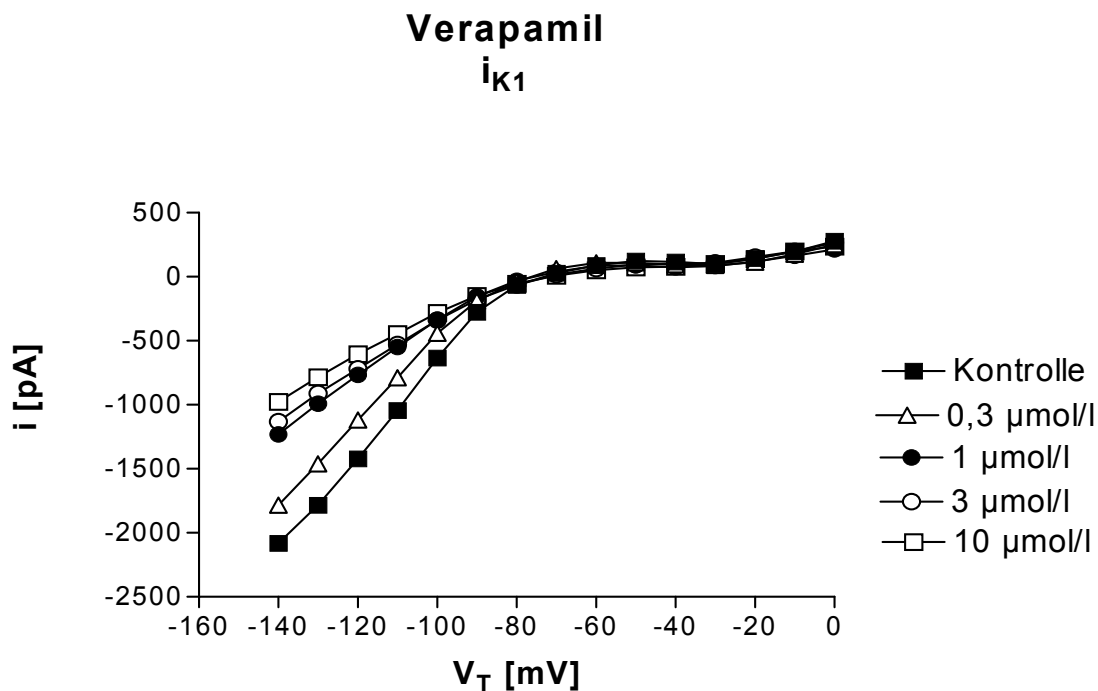
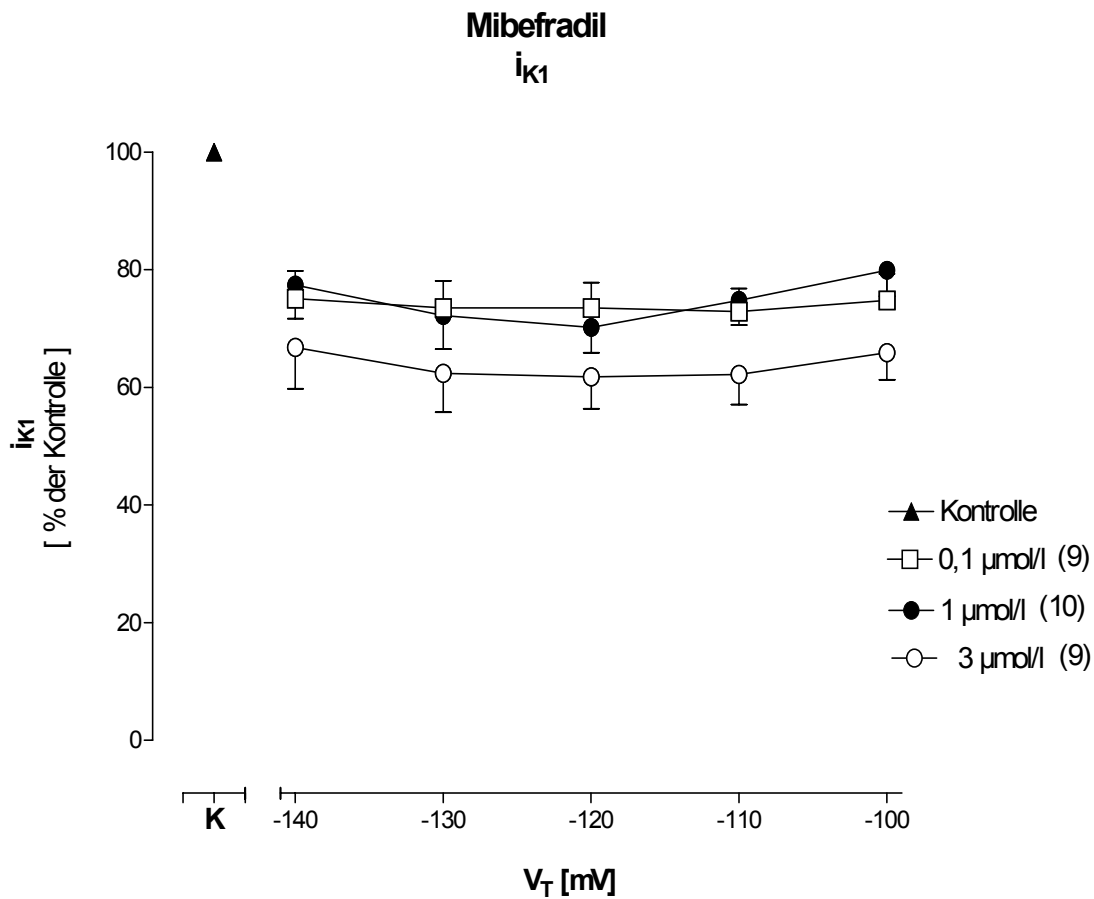


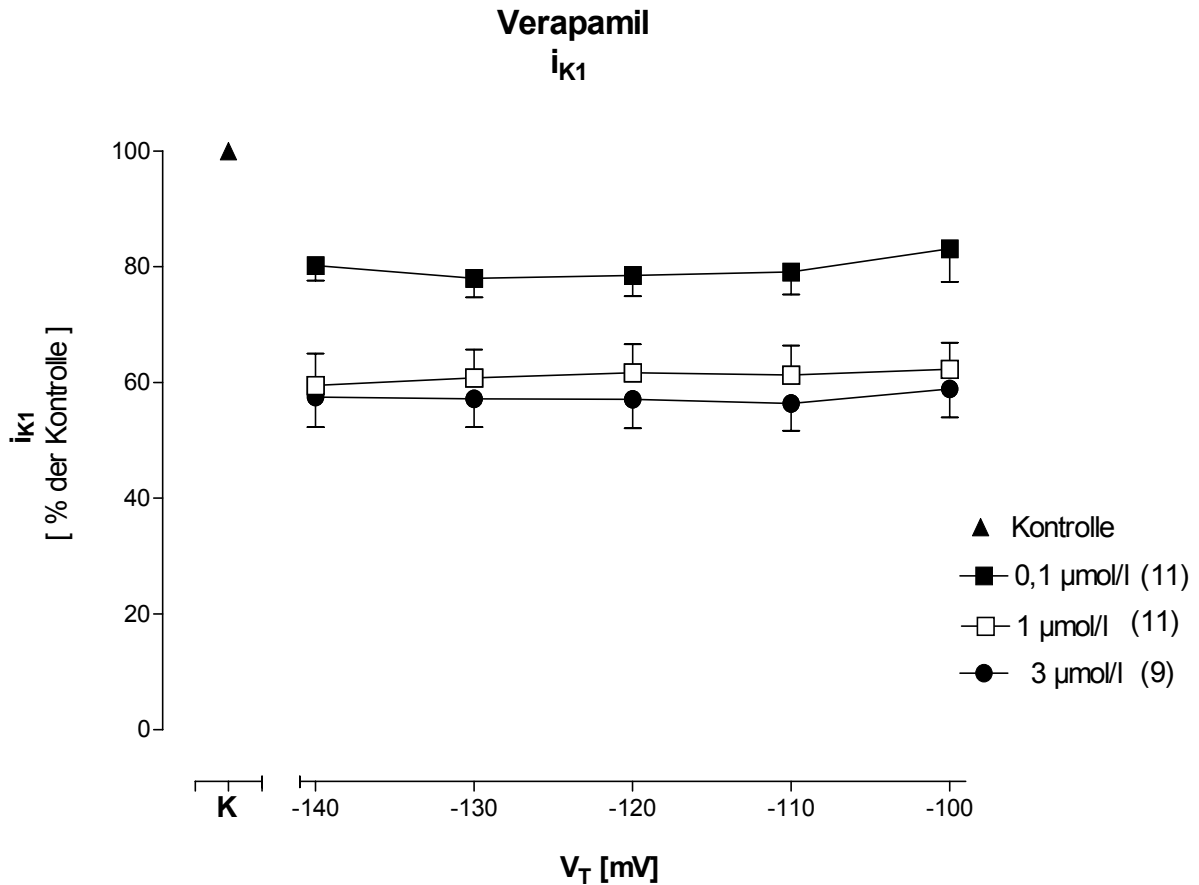
Abbildung 28:

Charakteristische Stromspannungskurven für Verapamil bei vier verschiedenen Konzentrationen nach zehnminütiger Einwirkzeit (bei  $3 \mu\text{mol/l}$ : 15 Minuten). Verwendet wurde das in Abbildung 25a) beschriebene Klemmcluster. Die Hemmung des einwärtsgerichteten  $i_{K1}$ -Stroms wird erst bei Testpotentialen negativ zu  $-90$  mV sichtbar. Durch  $3 \mu\text{mol/l}$  Verapamil erfolgt in diesem Versuch bei einem Testpotential von  $-140$  mV bereits ein nahezu halbmaximale Hemmung des  $i_{K1}$ -Stroms.

Um Unterschiede beider Substanzen zu quantifizieren, wurden für die verschiedenen Konzentrationen neun bis elf Versuche durchgeführt und die gemittelten Werte des  $i_{K1}$ -Stroms in Prozent der Kontrolle gegen das Testpotential aufgetragen. In Abbildung 29 ist das Ergebnis für drei verschiedene Mibefradil- bzw. Verapamilkonzentrationen dargestellt, wobei nur der Potentialbereich auf der X-Achse aufgetragen ist, in dem die Hemmung signifikant war ( $P < 0,01$ ).



a)



**b)**

Abbildung 29:

Konzentrationsabhängige Wirkungen von Mibefradil in a) und Verapamil in b) auf den  $i_{K1}$ -Strom bei unterschiedlichen Testpotentialen in Prozent der jeweiligen Kontrolle. Auf der Abszisse sind lediglich die Testpotentialen von  $-100$  mV bis  $-140$  mV aufgetragen, da nur bei diesen eine statistisch signifikante Inhibition ( $P < 0,01$ ) festgestellt wurde. In Klammern hinter den Konzentrationen steht die Anzahl der jeweiligen Versuche. Die Einwirkzeit der verschiedenen Mibefradil- bzw. Verapamil-Konzentrationen betrug 10 Minuten (bei  $0,1 \mu\text{mol/l}$  Mibefradil: 15 Minuten). Anzumerken ist, daß über den dargestellten Testpotentialbereich sowohl für Verapamil als auch für Mibefradil die Hemmung des  $i_{K1}$ -Stroms konzentrationsabhängig, aber nicht Testpotential-abhängig ist.

Vergleicht man nun die Wirkungen beider Arzneistoffe miteinander, so stellt man fest, daß die  $i_{K1}$ -Inhibition über den gesamten Testpotentialbereich konstant bleibt, d.h. es besteht keine Testpotentialabhängigkeit. Zur besseren Unterscheidung der Substanzeffekte wurde das Testpotential von  $-140$  mV für die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve für beide Pharmaka ausgewählt. In Abbildung 30 sind die  $i_{K1}$ -Werte in Prozent der Kontrolle aufgetragen.

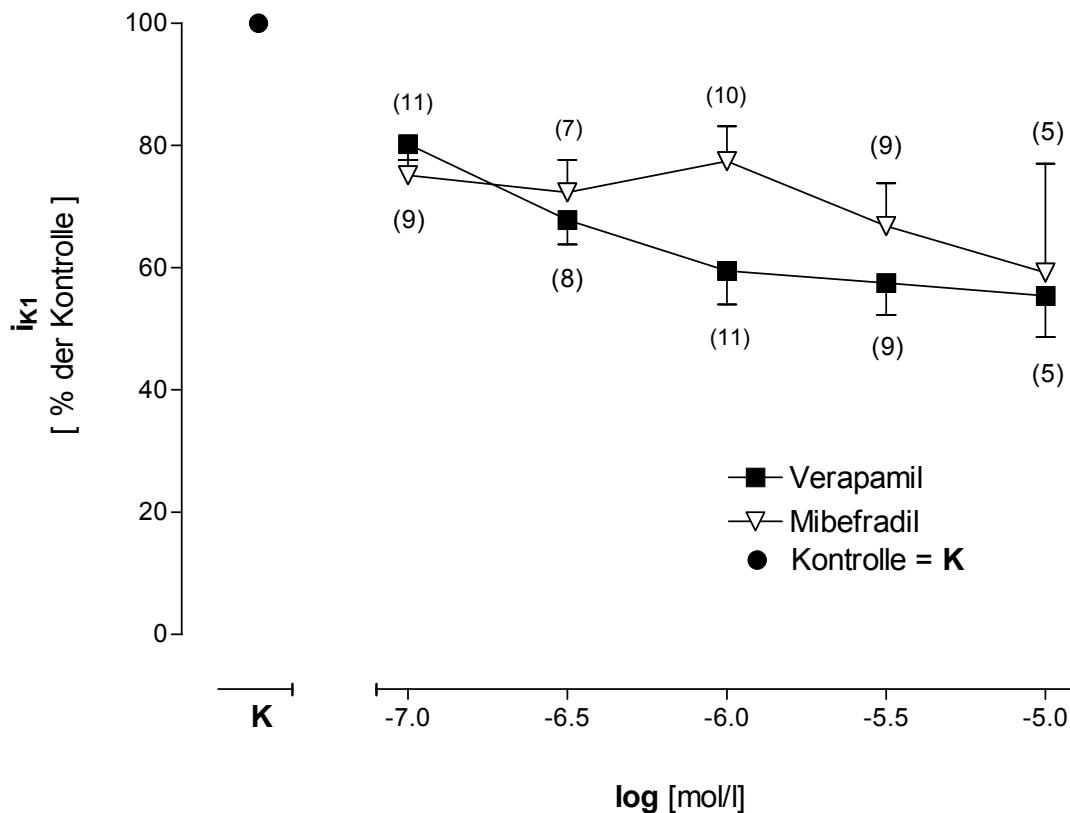


Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurven für die Wirkung von Mibefradil und Verapamil auf den  $i_{K1}$ -Strom in % der Kontrolle. Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen unterscheiden sich in dem Bereich zwischen  $0,1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$  statistisch nicht signifikant ( $P \geq 0,05$ ). In Klammern ist die Anzahl der jeweiligen Versuche angegeben.

Für beide Substanzen ergibt sich eine konzentrationsabhängige Inhibition des  $i_{K1}$ -Stroms. Die dargestellten Kurven weichen über den gesamten Konzentrationsbereich nicht signifikant voneinander ab. Demnach verhalten sich Mibefradil und Verapamil auch bezüglich der Hemmwirkung auf den  $i_{K1}$  ähnlich. Die in Abbildung 30 erkennbare Abweichung bei  $1 \mu\text{mol/l}$  erweist sich nicht als statistisch signifikant ( $P \geq 0,05$ ).

### 3.4.3. Veränderungen der Membranleitfähigkeit des $i_{K1}$ -Stroms

Im folgenden wird der Frage nachgegangen, wie sich die Membranleitfähigkeit bei verschiedenen Testpotentialen unter dem Einfluß von Mibefradil bzw. Verapamil verändert. Dazu wurden die errechneten „steady-state“- $i_{K1}$ -Ströme in die Gleichung zur Berechnung der Membranleitfähigkeit eingesetzt (Hodgkin und Huxley, 1952).

$$G = \frac{i_{ss}}{(V_T - E_K)}$$

$G$  = Membranleitfähigkeit [S]

$i_{ss}$  = „steady-state“-Membranstrom [A]

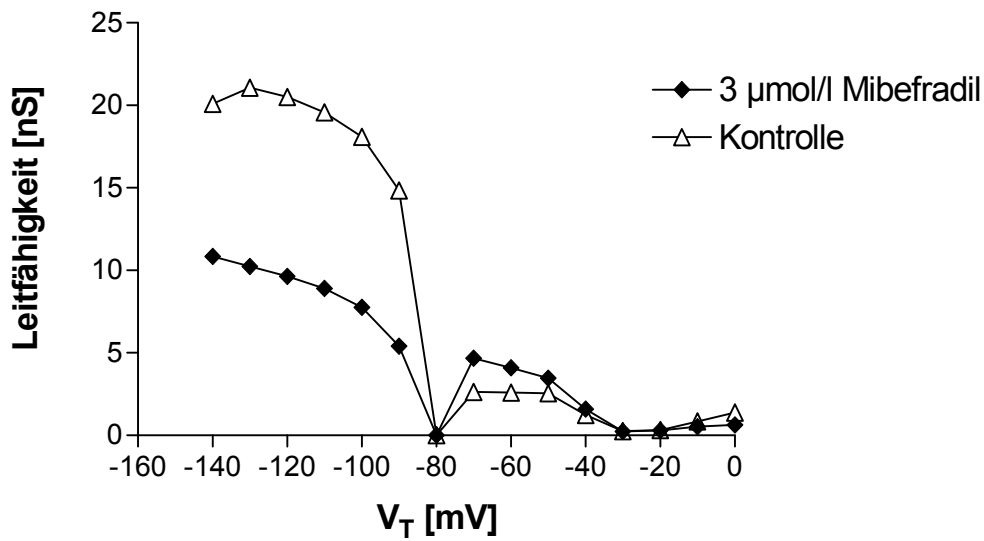
$V_T$  = Testpotential [V]

$E_K$  =  $K^+$ -Gleichgewichtspotential [V]

*Abbildung 31: Gleichung zur Berechnung der Membranleitfähigkeit*

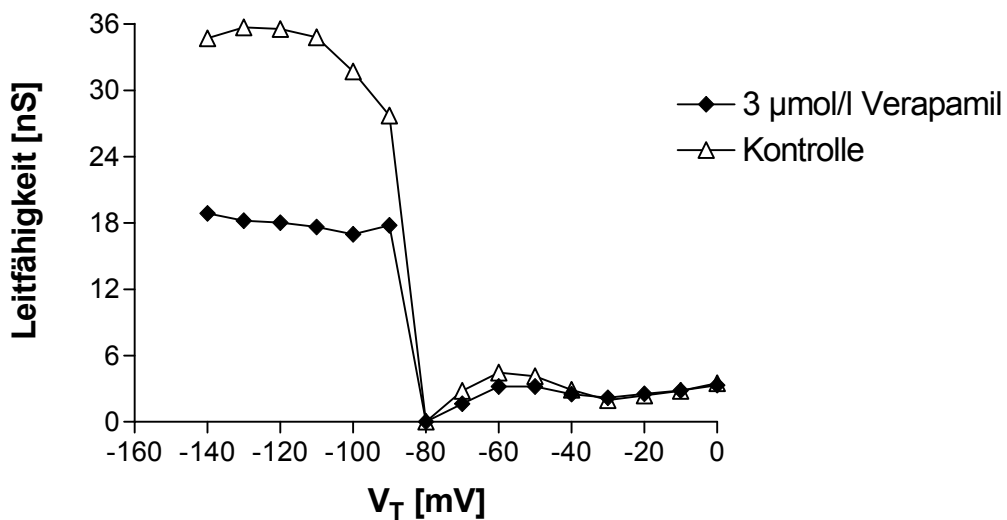
Die mit Hilfe dieser Gleichung berechneten Werte für die Membranleitfähigkeit des  $i_{K1}$ -Stroms werden in Abbildung 32a) für Mibefradil und 32b) für Verapamil anhand eines charakteristischen Versuchs dargestellt. Aufgrund des Nullwerts beim  $K^+$ -Gleichgewichtspotential konnte keine Anpassung mit der Boltzmann-Funktion vorgenommen werden. Der Graphik in Abbildung 32 ist zu entnehmen, daß sich die Hemmwirkung von 3  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil in a) bzw. 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil in b) auf die Membranleitfähigkeit besonders deutlich bei Testpotentialen negativ zum Ruhepotential zeigt.

### Mibefradil



a)

### Verapamil



b)

Abbildung 32: Einfluß von 3  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil (a) und 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil (b) auf die Leitfähigkeitskennlinie des  $i_{K1}$ -Stroms nach fünfzehnminütiger Einwaschung.

Die maximale Leitfähigkeit wird in a) durch 3  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil von 20,1 nS (Kontrolle) um 46% auf 10,85 nS und in b) durch 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil von 34,7 nS (Kontrolle) ebenfalls um 46% auf 18,87 nS verringert. Deutlich zu erkennen ist, daß die Effekte beider Substanzen im Testpotentialbereich zwischen  $-90$  und  $-140$  mV am stärksten sind.

Um die Hemmwirkung beider Substanzen auf die maximale Leitfähigkeit des  $i_{K1}$ -Stroms zu vergleichen, sind für letztere in Abbildung 33 die Mittelwerte in Prozent der Kontrolle von Mibefradil und Verapamil bei einem Testpotential von  $-140$  mV dargestellt.

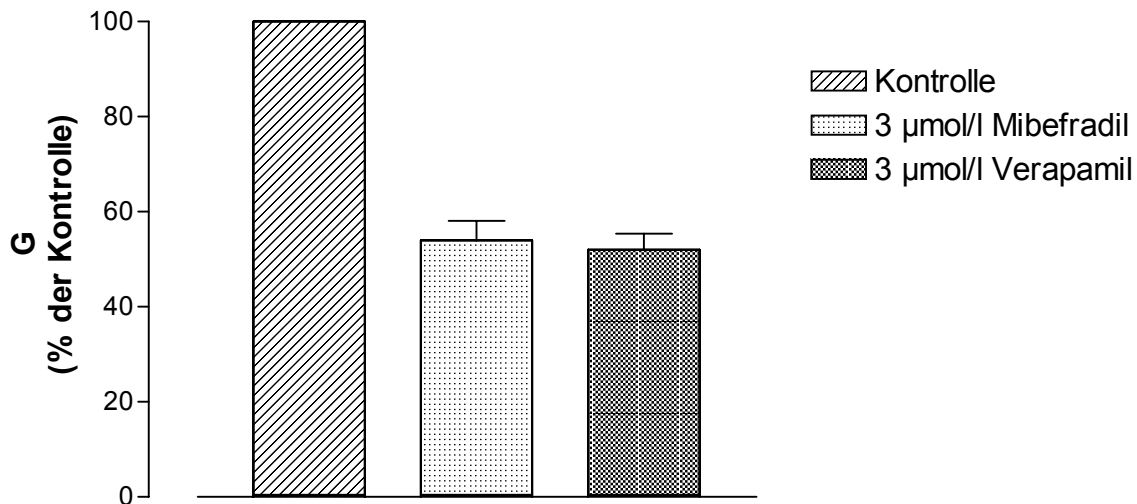


Abbildung 33:

*Einfluß von 3  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil und 3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil auf die maximale Membranleitfähigkeit bei einem Testpotential von  $-140$  mV. Beide Substanzen verringern die Leitfähigkeit der Kontrolle nahezu auf das gleiche Niveau. Die prozentuale Minderung beträgt für Mibefradil  $46 \pm 4,1$  % ( $n = 9$ ) und für Verapamil  $48 \pm 3,4$  % ( $n = 7$ ).*

Die Auswertung von insgesamt 16 Versuchen ergibt für Mibefradil eine Reduktion der Leitfähigkeit bei  $-140$  mV Testpotential auf  $54 \pm 4,1$  % ( $n = 9$ ) und für Verapamil auf  $52 \pm 3,4$  % ( $n = 7$ ), jeweils bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$ . Auch bezüglich der Hemmwirkung auf die Membranleitfähigkeit verhielten sich Mibefradil und Verapamil ähnlich.

### 3.5. Einfluß von Mibefradil und Verapamil auf den $i_{si}$

Calciumantagonisten entfalten ihre Wirkung, indem sie den  $Ca^{2+}$ -Strom durch die Calciumkanäle der Zellmembran blockieren. Die verschiedenen Calciumkanal-Typen, von denen insbesondere der L- und T-Typ für die kardiovaskuläre Wirkung von Bedeutung sind, unterscheiden sich im wesentlichen durch ihre elektrophysiologischen Merkmale. Zu nennen sind dabei unter anderem die Repolarisationsgeschwindigkeit, das Schwellenpotential und die Akzeptanz für Barium-Ionen anstelle von  $Ca^{2+}$ -Ionen (Bean, 1985). So zeichnet sich der L-Typ-Calciumkanal durch eine lange Inaktivierungszeit aus. Er wird auch als langsamer beziehungsweise „high-voltage-activated-channel“ bezeichnet, da für seine Aktivierung eine starke Depolarisation auf ca.  $-10$  mV erforderlich ist (Richard *et al.*, 1992).

Im Unterschied hierzu werden T-Typ-Calciumkanäle als „low-voltage-activated-channel“ bezeichnet, da sie mit ca.  $-70$  mV ein sehr niedriges Schwellenpotential besitzen (Richard *et al.*, 1992). Sie inaktivieren schnell und werden erst bei relativ hohen Konzentrationen von  $> 3$   $\mu\text{mol/l}$  von Dihydropyridinen gebunden (Bean, 1985; Nilius *et al.*, 1985; Mitra und Morad, 1986).

Die genaue physiologische Bedeutung dieser in glatten Muskelzellen (Akaike *et al.*, 1989) und in Zellen des Sinusknoten (Hagiwara *et al.*, 1988) vorkommenden T-Kanäle ist noch nicht bekannt. T-Typ-Calciumkanäle am Herzen regulieren laut Bean (1989) und Godfraind (1994) vor allem sinoatriale Schrittmacherfunktionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Untersuchungen am T-Kanal verzichtet, da das völlige Fehlen von T-Typ-vermittelten Calciumströmen in den meisten ventrikulären Kardiomyocyten der Ratte auf eine unbedeutende Funktion innerhalb der Arbeitsmuskulatur dieser Spezies hinweist (Bean, 1989). Hinzu kommt, daß schon zahlreiche Arbeiten über die Wirkung von Mibefradil auf den T-Kanal der Rattenmyocyte veröffentlicht wurden. Es zeigte sich, daß Mibefradil selektiv die T-Typ-Calciumkanäle der Herzmuskelzelle (Mishra und Hermsmeyer, 1994) blockiert und in höheren Konzentrationen auch an die L-Typ-Calciumkanäle bindet (Osterrieder und Holck, 1989; Clozel *et al.*, 1991; Mehrke *et al.*, 1994). So bezifferten Mishra und Hermsmeyer (1994) die Blockade von Mibefradil an T-Kanälen der Rattenmyocyte als zehnfach stärker im Vergleich zu L-Typ-Calciumkanälen. Obwohl in der Literatur einige



Publikationen über die Wirkung von Verapamil auf den L-Typ-Calciumkanal unter Verwendung der „whole-cell“-Voltage-Clamp-Technik verfügbar sind, so ist es sinnvoll, zum Vergleich mit Mibefradil Untersuchungen mit beiden Substanzen in demselben Modell durchzuführen, um die Wirkung auf den  $i_{si}$  zu quantifizieren. Sowohl das konzentrationsabhängige Ausmaß des Blocks wie auch seine Abhängigkeit vom Membranpotential sollten bestimmt werden.

Um nun die Wirkung beider Substanzen auf den  $i_{si}$  näher zu beschreiben, war es zweckmäßig, ein Spannungsklemmmuster zu wählen, bei dem keine fremden Ströme stören konnten. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-40$  mV wurde die Membran auf Testpotentiale zwischen  $-30$  mV und  $+50$  mV, jeweils in  $10$  mV-Schritten, geklemmt. Nicht nur aufgrund der Tatsache, daß in der Rattenmyocyte T-Typ-Calciumkanäle gänzlich fehlen (Heubach *et al.*, 2000), sondern auch wegen der kompletten Inaktivierung des T-Kanals bei  $-40$  mV, konnte eine T-Kanal-Strombeteiligung ausgeschlossen werden. Bei einem Haltepotential von  $-40$  mV ist auch der Natriumstrom ausgeschaltet. In Abbildung 34a) ist das verwendete Spannungsklemmmuster dargestellt.

Auf einen Austausch von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch Barium-Ionen zum Erhalt eines deutlich größeren Stromflusses durch den Calciumkanal (Hess und Tsien, 1984; McDonald *et al.*, 1994) wurde verzichtet, da hierdurch die calciumabhängige Inaktivierung des  $i_{si}$ -Stroms verändert worden wäre. Zwar stellte sich so ein leichter „run-down“-Effekt des Calciumstroms ein, doch konnte dieser, wie in Abbildung 34b) beschrieben, zeitabhängig korrigiert werden.

Die meisten Leerversuche zeigten nach vierzigminütiger Versuchsdauer eine Reduktion der  $i_{si}$ -Amplitude von ca. 10 bis 15 % bei Klemmung auf ein Testpotential von  $0$  mV (Abbildung 34b)). Somit konnte mit ausreichender Genauigkeit der Wirkvergleich zwischen Mibefradil und Verapamil bezüglich des  $i_{si}$ -Stroms vorgenommen werden.

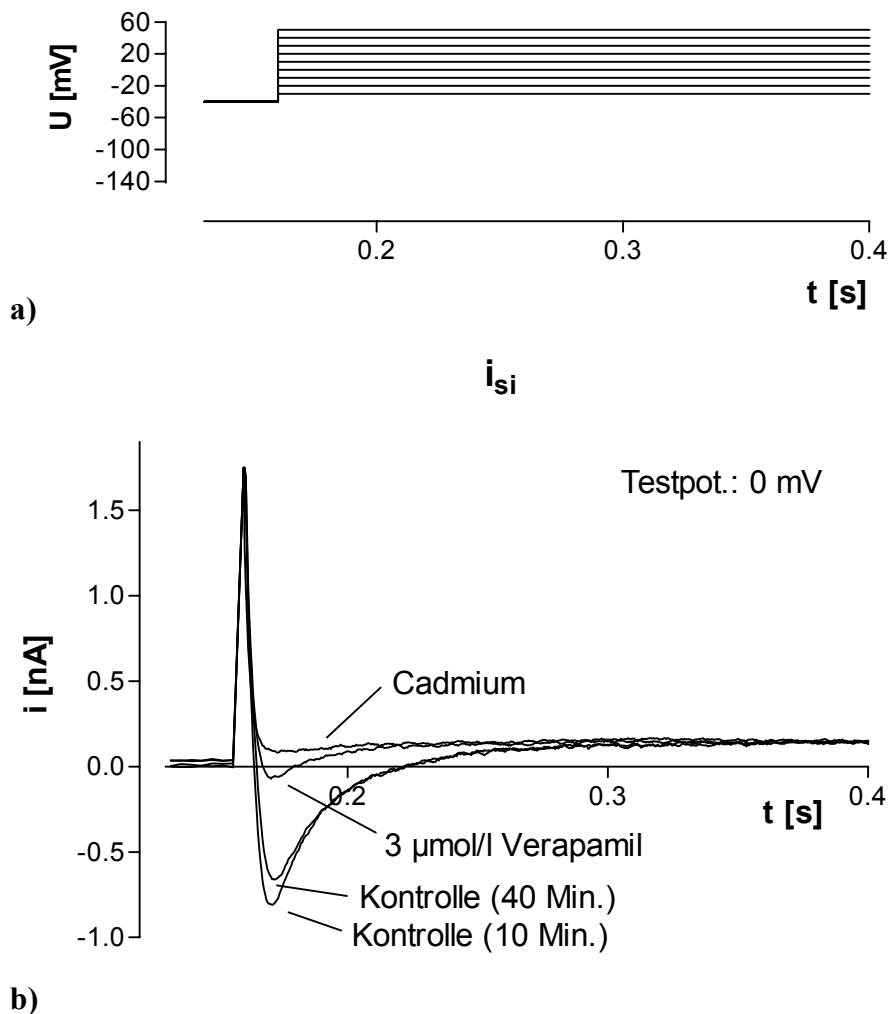


Abbildung 34: „Run-down“- und Verapamil-Effekte auf den langsamen Calciumeinwärtsstrom  $i_{si}$ :

a) Spannungsklemmuster zur Aktivierung des  $i_{si}$ -Stroms

Die ventrikuläre Rattenmyocyte wurde ausgehend von einem Konditionierungspotential von  $-40$  mV auf Testpotentiale von  $-30$  mV bis  $+50$  mV, jeweils in  $10$  mV-Schritten, geklemmt. Anschließend wurde die Zelle auf  $-40$  mV gehalten (nicht abgebildet).

b) Ein typischer Versuch, der die Wirkungen von  $3 \mu\text{mol/l}$  Verapamil und den „Run-Down“-Effekt auf die  $i_{si}$ -Stromspur bei dem Testpotential von  $0$  mV im Vergleich zur Kontrolle und zur Cadmium-Referenzstromspur zeigt. Nach vierzigminütiger Versuchsdauer konnte eine geringe Reduktion ( $15,7\%$ ) der Amplitude registriert werden. Anschließend führte eine zehnminütige Einwirkzeit von  $3 \mu\text{mol/l}$  Verapamil zu einer  $82\%$ igen Minderung des Amplitudenstroms. Die Cadmiumstromspur ergibt sich nach vollständiger Blockade des  $i_{si}$ -Stroms. Diese wurde in der Auswertung von dem erhaltenen Peak-Strom subtrahiert.

Auf den Einsatz von Cäsiumchlorid zur Eliminierung der Kalium-Auswärtsströme wurde verzichtet. Zum einen wurde durch die Anwesenheit von 2 mmol/l 4-Aminopyridin der schnell inaktivierende transiente Kaliumauswärtsstrom  $i_{to,f}$  vollständig blockiert und zum anderen wurden die Zellen verworfen, die große transiente Auswärtsströme mit langsamer Komponente  $i_{to,s}$  aufwiesen. Abbildungen 35a) und 35b) zeigen die Originalaufnahmen typischer Versuche (bei einem Testpotential von 0 mV) mit Mibefradil und Verapamil, die bei 24 °C mit einer 1,8 mmolaren  $CaCl_2$ -Badlösung durchgeführt wurden.

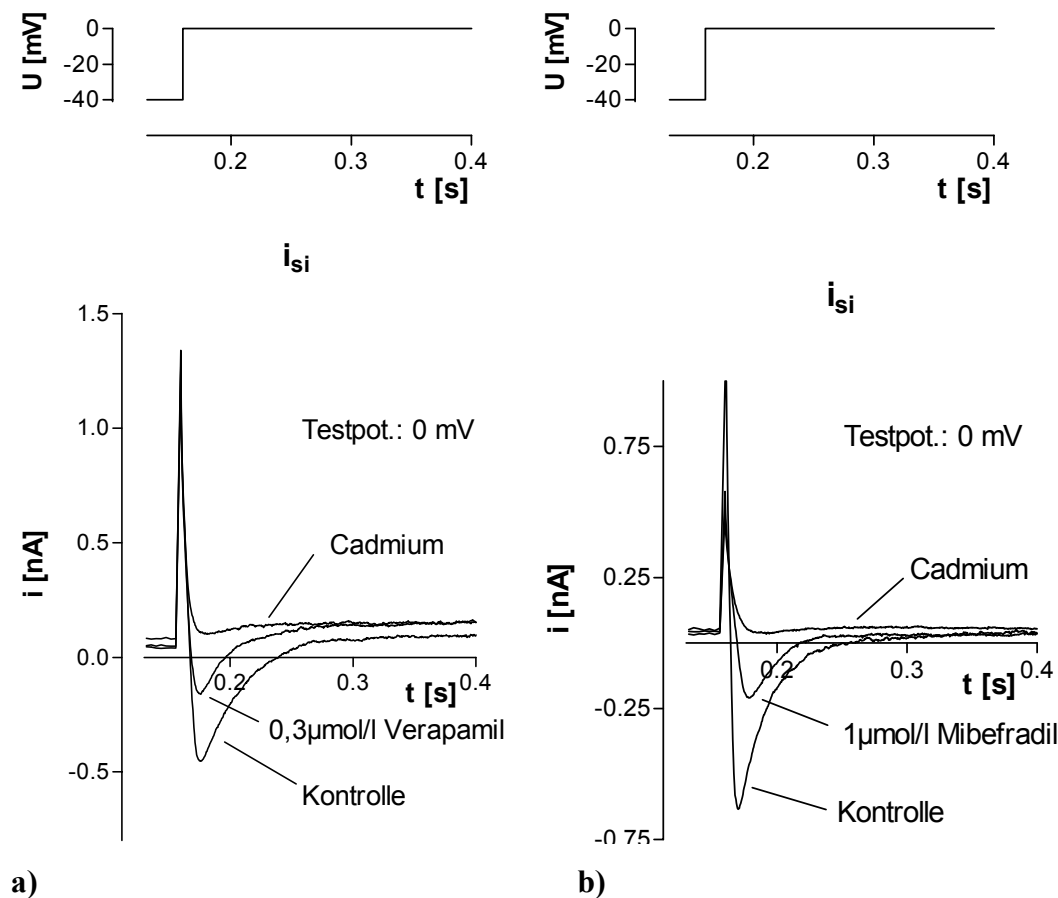


Abbildung 35: Stromspuren eines typischen Versuchs, der die Hemmwirkung von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  Verapamil in a) und 1  $\mu\text{mol/l}$  Mibefradil in b) auf den  $i_{si}$ -Strom im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Verwendet wurde das Klemmcluster aus Abbildung 34a) mit dem Unterschied, daß hier zur besseren Übersicht nur das 0 mV-Testpotential dargestellt ist. Als Referenzstromspure diente wiederum die Stromspure in Gegenwart von Cadmium. Deutlich zu erkennen ist, daß bei Verapamil eine Konzentration von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  ausreicht, um die  $i_{si}$ -Amplitude annähernd zu halbieren, während bei Mibefradil dafür eine Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  benötigt wird.

Da sowohl Verapamil in den Arbeiten von Nawrath und Wegener (1997) als auch Mibefradil in den Untersuchungen von Aczel (1998) eine „use-dependence“ zeigten, war es wichtig, jeweils bei der gleichen Frequenz zu messen. Die Zelle wurde nach der Klemmung auf das Testpotential bei  $-40$  mV gehalten, um so eine hohe Anzahl von inaktivierten Kanälen zu erhalten. Denn laut Nawrath resultiert daraus ein stärkerer Block durch Verapamil, das bevorzugt an den inaktivierten Kanal bindet. Auch Mibefradil verursacht bei weniger negativen Haltepotentialen einen stärkeren Block (Aczel *et al.*, 1998).

Im Folgenden werden die konzentrationsabhängigen Wirkungen von Mibefradil und Verapamil auf den  $i_{Si}$  beschrieben. In Abbildung 36 ist ein charakteristischer Versuch für Mibefradil dargestellt.

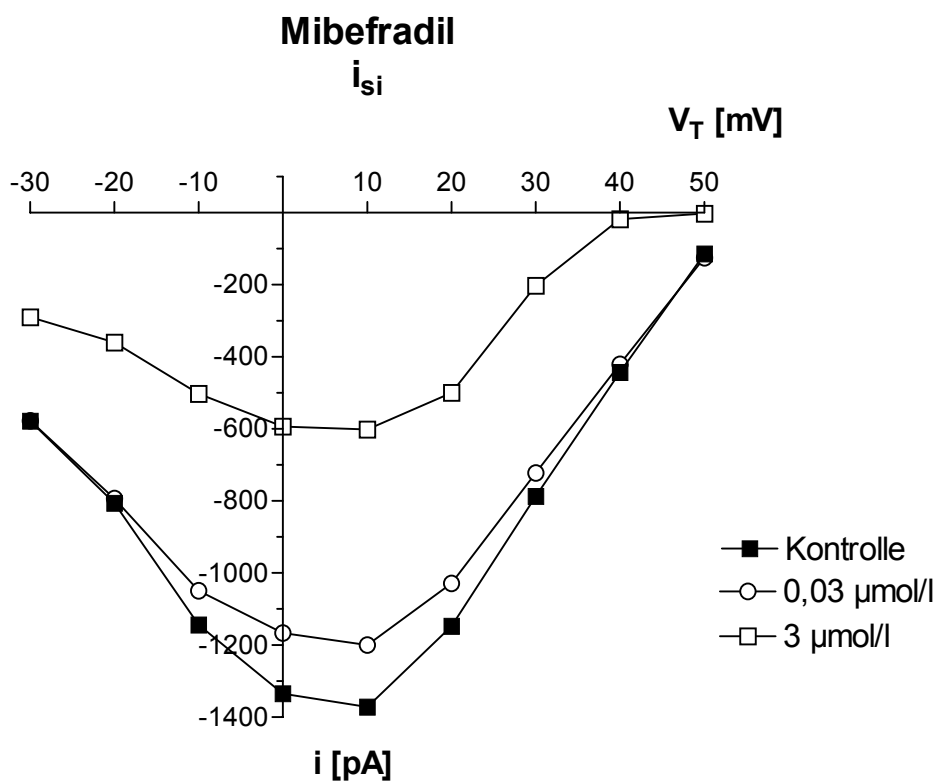


Abbildung 36:

Typischer Versuch, der die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Mibefradil auf den  $i_{Si}$ -Strom zeigt. Die Einwirkzeit der dargestellten Mibefradil-Konzentrationen betrug 10 Minuten. Eine Blockade ist erst bei einer Konzentration von  $0,03 \mu\text{mol/l}$  zu registrieren. Eine Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  führt hingegen zu einer teilweise über 50 %igen Inhibition des Stroms.

Mit den aus 14 Versuchen erhaltenen und gemittelten Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die Wirkung von Mibefradil auf den  $i_{si}$  bei verschiedenen Testpotentialen im Vergleich zur Kontrolle gemacht. Zur besseren Übersicht sind in der Abbildung 37 nur die Kurven der Testpotentiale von  $-10$  mV bis  $+10$  mV dargestellt. Auffällig ist hier, daß die Hemmung zwar konzentrationsabhängig ist, aber die Wahl des Testpotentials keinen signifikanten Einfluß auf den Block hat. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen.

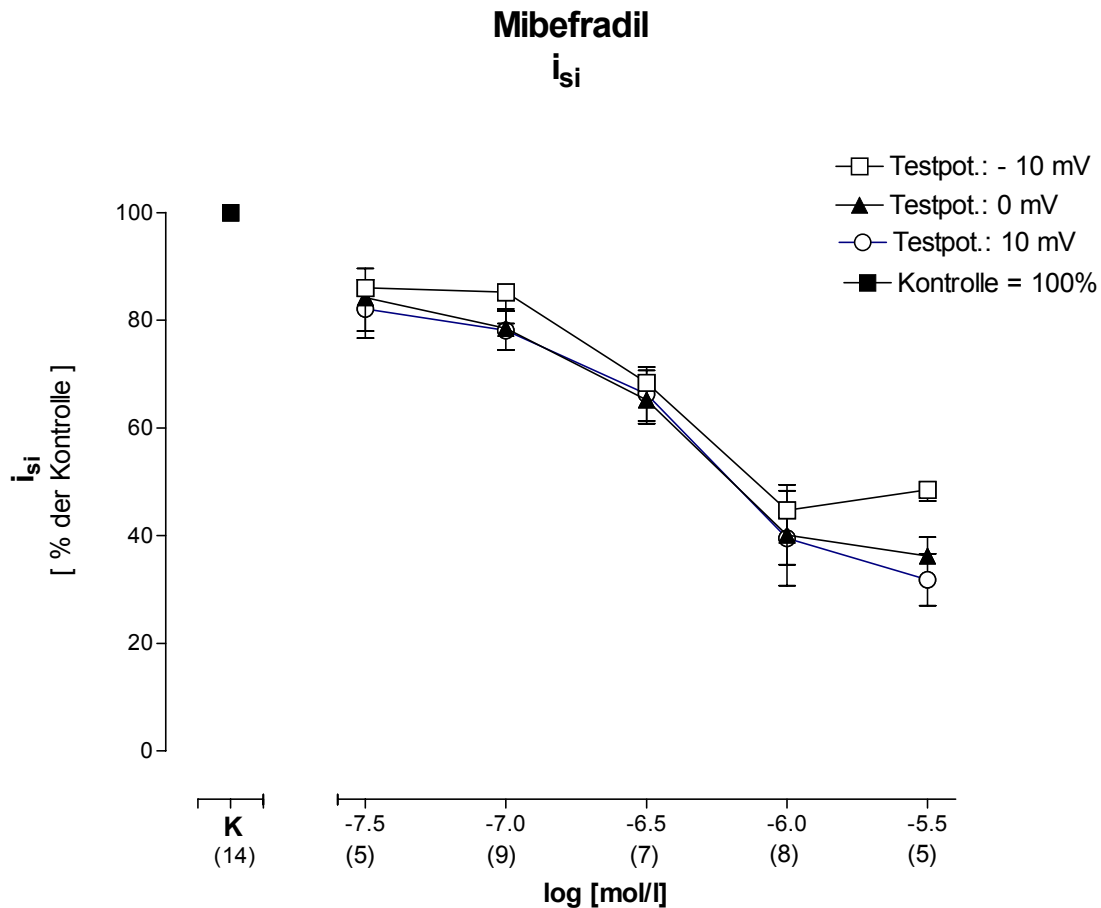


Abbildung 37:

Konzentrations-Wirkungskurven von Mibefradil auf den  $i_{si}$  bei verschiedenen Testpotentialen in % der jeweiligen Kontrolle. Wie anhand der Graphik zu erkennen ist, besteht zwar eine Konzentrationsabhängigkeit, aber keine Abhängigkeit von dem eingestellten Testpotential. Keine der Kurven weicht statistisch signifikant voneinander ab ( $P \geq 0,05$ ). In Klammern sind jeweils die Anzahl der Versuche angegeben.

Festzuhalten ist, daß Mibefradil mit einer  $IC_{50}$  von  $0,81 \mu\text{mol/l}$  bei einem Testpotential von  $0$  mV einen Wert zeigte, der annähernd mit vielen in der Literatur angegebenen Werten

übereinstimmt. Fang und Osterrieder (1991) erhielten an ventrikulären Meer-schweinchenmyocyten eine  $IC_{50}$  von  $0,23 \mu\text{mol/l}$  bei einem Testpotential von  $0 \text{ mV}$  (Haltepotential von  $-50 \text{ mV}$ ). Demnach erweist sich Mibefradil als wirksamer Hemmstoff kardialer Calciumkanäle vom L-Typ.

Der Einfluß von Verapamil auf den L-Typ-Calciumkanal ist vielfach in der Literatur beschrieben worden. So zeigt die calciumantagonistische Wirkung von Verapamil am Herzen eine „use-dependence“ und „voltage-dependence“ (Spannungsabhängigkeit), die auf einem ansteigenden Block bei höheren Frequenzen und positiveren Membranpotentialen beruht (Ehara und Daufmann, 1978; McDonald et al., 1980).

Aus diesem Grund wurden die Versuche mit Verapamil unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt, wie sie für Mibefradil unter 3.5.1. beschrieben sind. Abbildung 38 zeigt einen typischen Versuch, der die konzentrationsabhängige Blockade des L-Typ-Calciumkanals bei verschiedenen Testpotentialen wiedergibt.

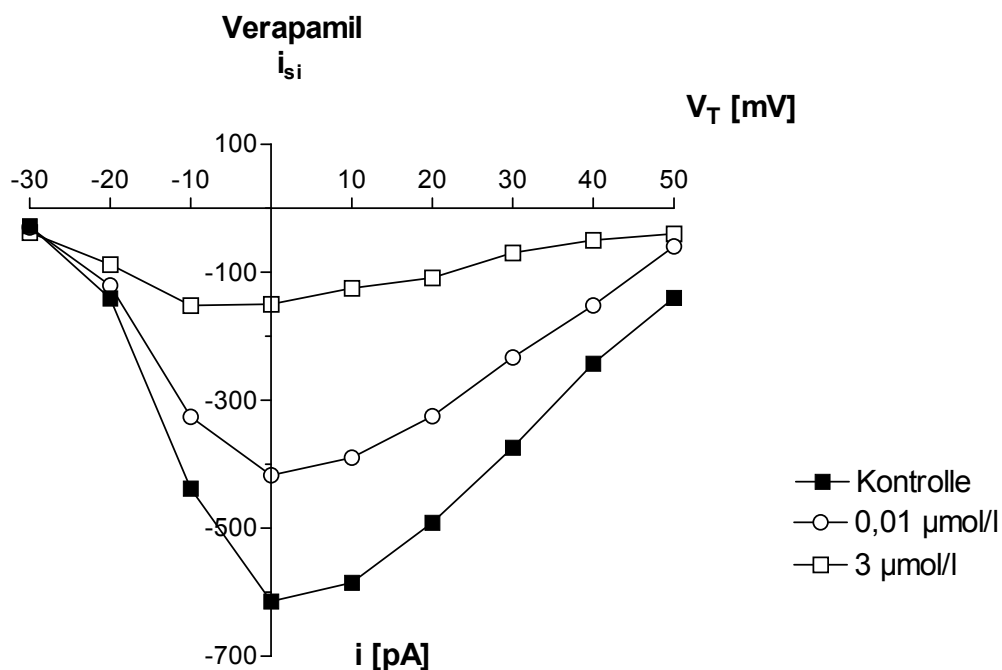


Abbildung 38:

Typischer Versuch, der die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Verapamil auf den  $i_{si}$ -Strom zeigt. Die Einwirkzeit der dargestellten Verapamil-Konzentrationen betrug 10 Minuten. Bereits bei einer Konzentration von  $0,01 \mu\text{mol/l}$  ist eine deutliche Blockade zu erkennen. Auffallend ist die über den gesamten Potentialbereich gleichartige Hemmung, d.h. je größer der registrierte Strom ausfällt, desto stärker ist die Inhibition. Bei  $3 \mu\text{mol/l}$  ist nur noch ein geringer Strom meßbar.

Für den Vergleich mit Mibefradil wurden die aus 16 Versuchen gemittelten Werte in Form einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei den Testpotentialen  $-10\text{ mV}$  bis  $+10\text{ mV}$  in Abbildung 39 dargestellt. Auffallend ist hier, daß sich in Bezug auf die Testpotentialabhängigkeit ein ähnliches Bild ergibt wie unter dem Einfluß von unterschiedlichen Mibefradilkonzentrationen in Abbildung 37.

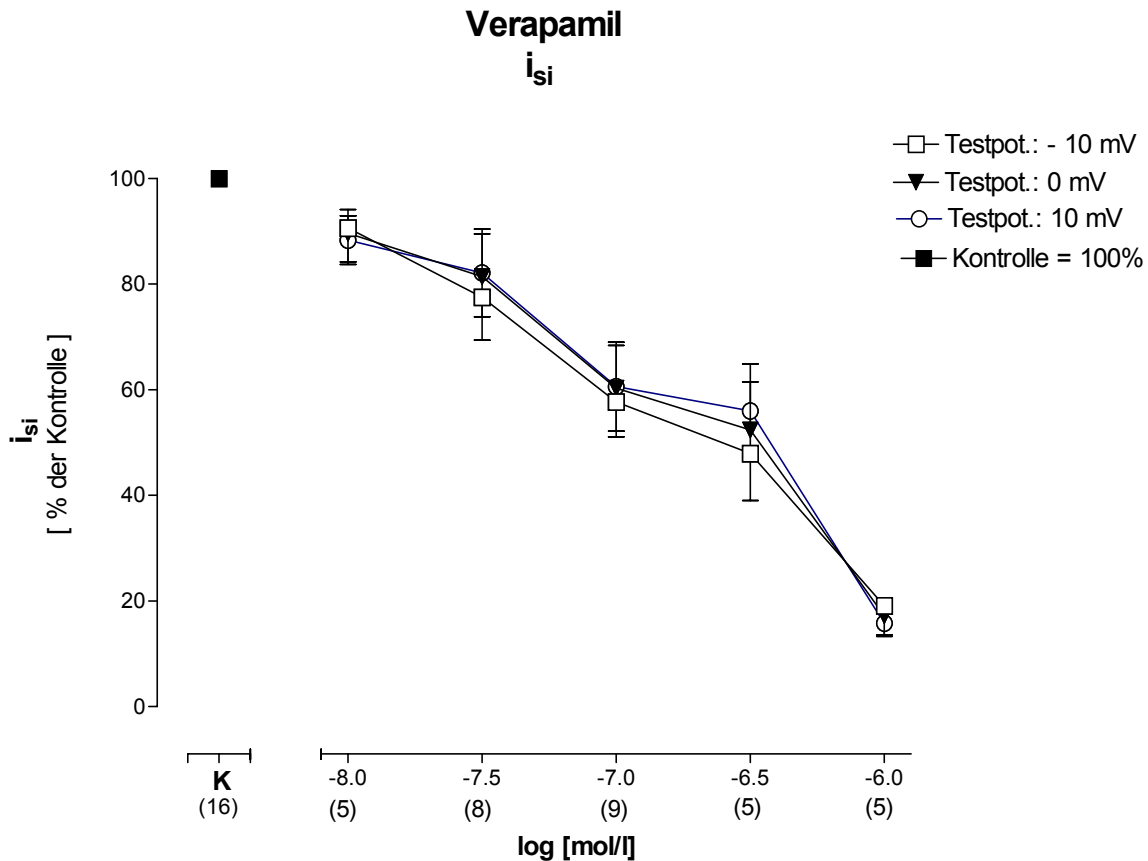


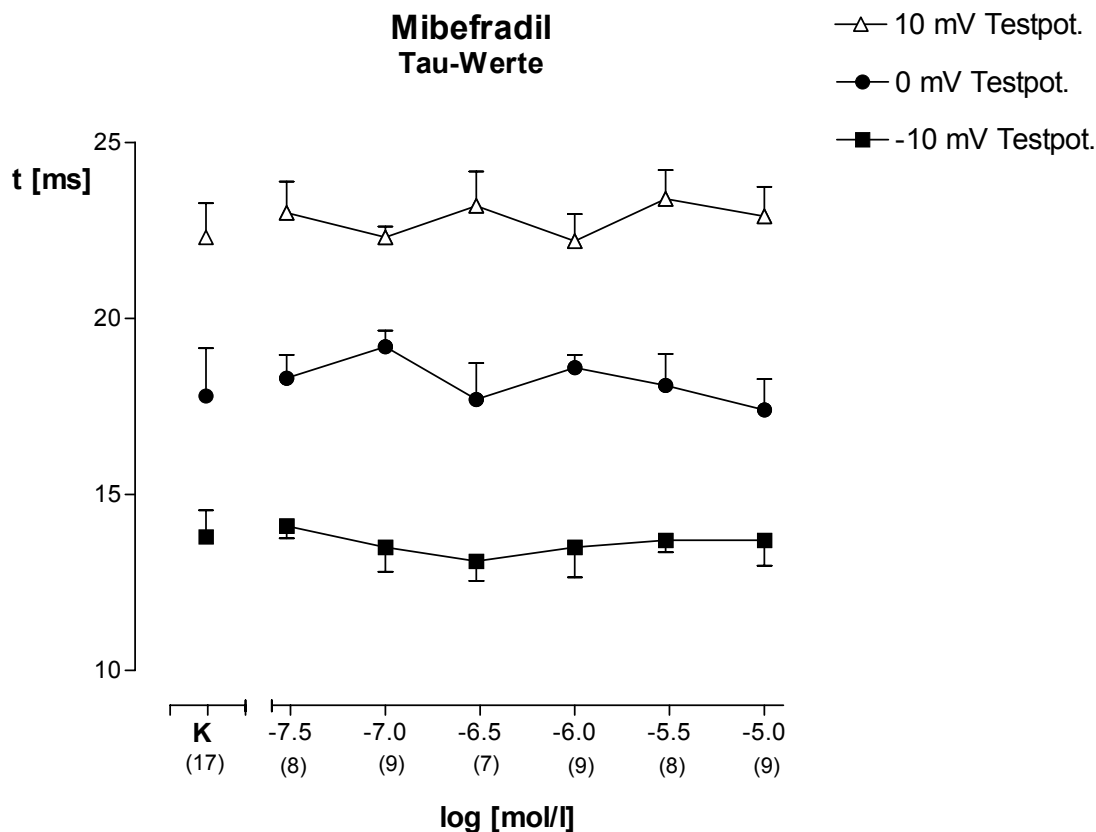
Abbildung 39:

Konzentrations-Wirkungskurven für die Wirkung von Verapamil auf den  $i_{si}$  bei verschiedenen Testpotentialen in % der jeweiligen Kontrolle. Die Konzentrationsabhängigkeit erweist sich als unabhängig vom eingestellten Testpotential. Keine der Kurven weicht statistisch signifikant voneinander ab ( $P \geq 0,05$ ). In Klammern ist die Anzahl der Versuche angegeben.

Ein erkennbarer Unterschied zwischen Mibefradil und Verapamil betrifft lediglich die Lage der Konzentrations-Wirkungskurve auf der Konzentrationsachse. Denn mit einer  $IC_{50}$  von

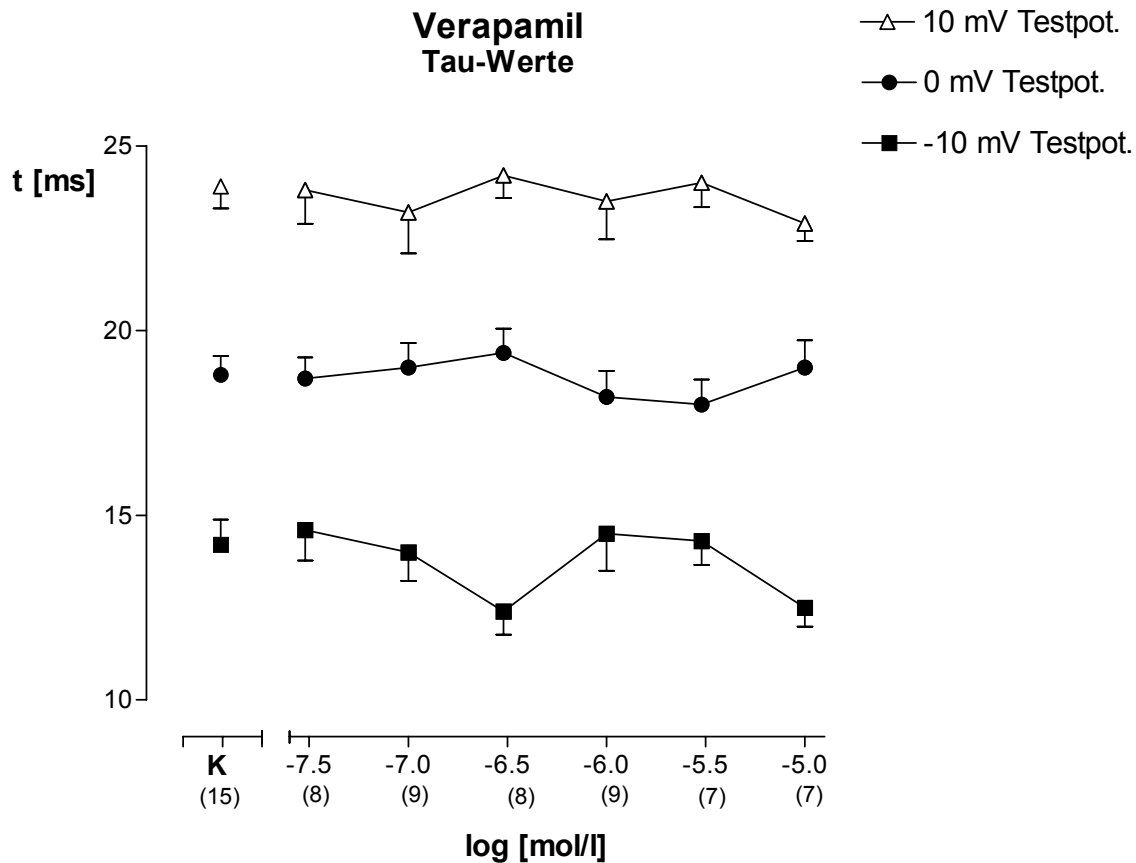
0,22  $\mu\text{mol/l}$  ist Verapamil stärker wirksam auf den langsamen Calciumeinwärtsstrom  $i_{\text{si}}$  als Mibefradil. Dieses deckt sich größtenteils mit den Ergebnissen von Fang und Osterrieder (1991), die für Verapamil eine  $\text{IC}_{50}$  von 0,14  $\mu\text{mol/l}$  bei einem Testpotential von 0 mV (Haltepotential von  $-50$  mV) ermittelten.

Desweiteren wurde der Einfluß von Verapamil und Mibefradil auf die Zeitkonstante  $\tau$  der Inaktivierung des langsamen Calciumeinwärtsstroms  $i_{\text{si}}$  bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen Aussagen über die anzunehmende Art der Bindung beider Substanzen zu. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen. Die aus den Versuchen registrierten und gemittelten Werte sind für Mibefradil in Abbildung 40a) und für Verapamil in Abbildung 40b) jeweils als Konzentrations-Wirkungskurven bei den Testpotentialen  $-10$  mV,  $0$  mV und  $+10$  mV dargestellt.



a)





b)

Abbildung 40: Konzentrations-Wirkungskurven von Mibefradil in a) und Verapamil in b), die den Einfluß beider Substanzen auf die Zeitkonstante  $\tau$  der  $i_{st}$ -Inaktivierung im Vergleich zur Kontrolle (K) zeigen. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte bei den Testpotentialen  $-10$  mV,  $0$  mV und  $+10$  mV. Deutlich zu erkennen ist, daß die  $\tau$ -Werte innerhalb der Testpotentiale, jedoch nicht im Vergleich zur Kontrolle voneinander abweichen.

Bei der Analyse der Abbildung 40a) und b) ist festzuhalten, daß sich die  $\tau$ -Werte bei verschiedenen Konzentrationen sowohl für Mibefradil als auch für Verapamil statistisch nicht signifikant ( $P \geq 0,05$ ) von der Kontrolle unterscheiden. Lediglich zwischen den unterschiedlichen Testpotentialen differieren die Werte. Die Tatsache, daß die Zeitkonstante bei verschiedenen Konzentrationen von Mibefradil nicht verändert wird, spricht gegen einen Block am offenen Kanalzustand. Demnach muß für Mibefradil genauso wie für Verapamil eine Bindung am inaktivierten Kanal angenommen werden. Dies deckt sich mit den Ausführungen von Nawrath und Wegener (1997), die für Verapamil ebenfalls keine Veränderung in der Zeitkonstante für die Inaktivierung und damit einen zeitunabhängigen Block beobachteten. Zwar wird in den Untersuchungen von Akzel et al.(1998) davon

gesprochen, daß der Block durch Mibefradil nicht aufgrund einer Bindung am inaktivierten Kanal, sondern wegen einer langsamen Erholung des Blocks offener Kanäle erfolgt, doch wurden bei diesen Versuchen  $Ba^{2+}$ -Ionen als Ladungsträger eingesetzt, welche die calciumabhängige Inaktivierung der L-Typ-Kanäle verhindern. Nach den bisherigen Ergebnissen läßt sich feststellen, daß sich Mibefradil im Vergleich zu Verapamil in der Wirkungsweise am langsam inaktivierenden Calciumkanal  $i_{si}$  lediglich in Bezug auf die wirksamen Konzentrationen unterscheidet.

#### 4. Diskussion

Fleckenstein hat als erster die kardiodepressive Wirkung von Verapamil (und anderen Calciumantagonisten) detailliert untersucht (Fleckenstein, 1964). Er stellte fest, daß Verapamil am isoliert arbeitenden Herzen eine Verminderung des Verbrauches energiereicher Phosphate, eine Reduktion der Kontraktionskraft sowie eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs verursacht. Fleckenstein begründete diese Wirkungen, die vergleichbar mit einer reduzierten intramyokardialen Calciumkonzentration waren, mit einer Inhibierung der elektromechanischen Kopplung, die aufgrund des ausbleibenden Calciumeinstroms durch die Calciumkanäle keine Kontraktion auslöste. Anfang der 70er Jahre kamen mit der Entwicklung des Nifedipins und des Diltiazems zwei weitere Prototypen zur Substanzklasse der Calciumantagonisten hinzu.

Die nach ihrer chemischen Struktur eingeteilten Hauptklassen der Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine werden heutzutage in der Therapie der arteriellen Hypertonie, der stabilen sowie der vasospastischen Angina pectoris und der supraventrikulären Arrhythmie eingesetzt. Ihre im Vordergrund stehende arterielle Vasodilatation beruht auf der spezifischen Hemmung des L-Typ-Calciumkanals (Wood, 1989; Triggle, 1990; Frohlich, 1991). Während die Hemmung dieses Kanals an der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Erschlaffung und damit Abnahme des Vasotonus führt, wirken Calciumantagonisten an der Herzmuskulatur negativ inotrop (Schwinger *et al.*, 1990). Trotz ihrer allgemeinen Fähigkeit, den Calciumioneneinstrom zu senken, unterscheiden sich die verschiedenen Calciumantagonisten in ihrer Selektivität und/oder Wirkstärke zu unterschiedlichen Gefäßbereichen im Vergleich zum Myokard (Halperin und Cibeddo, 1986) und in ihrer mehr oder weniger stark ausgeprägten negativen Inotropie. Letztere, sowie Reflextachykardie, neurohumorale Stimulation und unzureichende Gewebespezifität machten den Einsatz dieser Substanzen bei Patienten mit eingeschränkter Herzfunktion bedenklich (Furberg *et al.*, 1995). Die Verbesserung dieser nachteiligen Eigenschaften sorgte sowohl innerhalb der Substanzklasse als auch hinsichtlich ihres therapeutischen Einsatzes für eine schnelle Entwicklung neuer Substanzen.

Nachdem das pharmakologische Profil und die Wirkungsweise der Calciumantagonisten der ersten Generation (z.B. Verapamil) bei der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufgeklärt war (Nayler, 1988; Opie, 1990) und ihre oben erwähnten Nachteile Therapie-limitierend waren, wurde die zweite Generation von Calciumantagonisten entwickelt. Mit diesen Substanzen wurden u.a. eine höhere Gewebespezifität (z.B. Nimodipin (Towart, 1981;

Triggle, 1990)), eine ausgeprägte Vasoselektivität (z.B. Felodipin (Dunselmann *et al.*, 1989)) und eine lange Wirkungsdauer (z.B. Amlodipin (Packer *et al.*, 1996)) erreicht. Letzteres konnte auch durch eine verbesserte Galenik (Retardform vom Verapamil, GITS-Form (Gastric Intestine Therapeutic System) vom Nifedipin) erzielt werden. Desweiteren wurde nach Substanzen, die eine hohe Spezifität für vaskuläres Gewebe und eine niedrige Affinität zu Kardiomyocyten aufweisen und dadurch eine geringere negative Inotropie zeigen, gesucht. Mit Mibefradil, einem neuartigen Calciumantagonisten, der als Abkömmling des Verapamils chemisch ein substituiertes Tetralin darstellt und keiner der bekannten Klassen angehört, steht eine Substanz zur Verfügung, die im therapeutischen Dosisbereich von 50-100mg die oben erwähnten Nachteile bzw. Nebenwirkungen offensichtlich nicht oder in weit geringerem Maße aufweist. Der Grund für die in tierexperimentellen Untersuchungen fehlende negative Inotropie soll eine selektive Blockade an T-Typ-Calciumkanälen sein (Mishra und Hermsmeyer, 1994). T-Kanäle kommen vorwiegend an peripheren und koronaren Gefäßmuskulzellen, in der Nebennierenrinde und an kardialen Zellen mit Schrittmacherfunktion vor. Im kardiovaskulären System, wo lediglich L- und T-Kanäle von Bedeutung sind, unterstützen letztere bevorzugt die Schrittmacherfunktion (und sind am Calciumeinstrom nach sehr geringer Potentialänderung beteiligt). Ihre Aktivierungsspannung ist sehr niedrig (LVA-Kanäle, low voltage activation) und liegt nach schwachen Depolarisationen mit  $-70$  mV viel negativer als die der Calciumkanäle vom L-Typ ( $-10$  mV)(HVA-Kanäle, high voltage activation). L-Typ-Calciumkanäle („L“ wie „lang anhaltend“), die im Myokard und in der glatten, v. a. in der peripheren Gefäßmuskulatur, gefunden wurden, ermöglichen einen länger anhaltenden Calciumeinstrom in die Zelle. Die Öffnungsdauer bei T-Kanälen ist nur kurzzeitig, was einen transitorischen Ionenstrom zur Folge hat (daher T-Kanal). Die genaue physiologische Rolle der T-Kanäle ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Das völlige Fehlen von T-Typ-vermittelten Calciumströmen in den meisten ventrikulären Kardiomyocyten der Ratte deutet darauf hin, daß sie keine wichtige Funktion innerhalb der Arbeitsmuskulatur dieser Spezies aufweisen (Bean, 1989).

Die vorliegende Arbeit geht daher der Frage nach, ob das pharmakologische Profil von Mibefradil ausschließlich durch seine relative Selektivität auf T-Kanäle (Mishra und Hermsmeyer, 1994) oder auch durch seine Wirkungen auf andere elektrophysiologische Ionenkanäle geprägt wird. Da letzteres bisher nur unzureichend untersucht wurde, drängte sich ein Wirkvergleich mit dem bereits lange bekannten L-Kanal-Blocker Verapamil auf. Bindungsstudien zwischen Mibefradil und seinem Rezeptor, die von Goll *et al.* (1984) und Holck (1987) an kardialen Zellmembranen von Meerschweinchen durchgeführt wurden,

ergaben, daß Mibefradil etwas stärker an den Verapamil-Rezeptor als Verapamil selbst bindet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Mibefradil zum Teil auch am Verapamil-Rezeptor der Calciumkanäle kardialer Membranen bindet.

Höltje und Jessen (1998) stellten mit Hilfe von „Molecular-Modelling“-Untersuchungen einen Strukturvergleich zwischen Verapamil und Mibefradil an. Sollten die pharmakodynamischen Wirkungen von Mibefradil ausschließlich auf T-Kanäle beschränkt sein, so mußten eindeutige strukturelle Unterschiede zum Verapamil vorhanden sein.

Der Vergleich zeigte, daß sowohl in Bezug auf die Elektronenverteilung als auch auf die Van-der-Waals-Volumina kaum Unterschiede festzustellen waren. Da Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Arzneistoff nur über Elektronenhüllen stattfinden und Rezeptorbindungsstellen ein bestimmtes spezifisches Volumen besitzen, konnte von gleichartigen Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Verapamil und Mibefradil ausgegangen werden. Demnach sollten die beiden Substanzen an identischen Bindungsstellen angreifen und sich höchstens in quantitativer Hinsicht unterscheiden. Aufgrund dessen sollte Mibefradil auch L-Typ-Calciumkanäle und Verapamil auch T-Kanäle hemmen.

Methodische Schwierigkeiten bei der Untersuchung elektrophysiologischer Parameter an Herzmuskelgewebe, bedingt durch die komplizierte Morphologie vielzelliger Präparate, die Trennung einzelner spezifischer Stromkomponenten vom gesamten, tatsächlich gemessenen Membranstrom, sowie die oftmals schlechte Qualität der Spannungsklemme, haben in der Vergangenheit häufiger zu Zweifeln an der Aussage solcher Messungen geführt. Die vergleichenden Untersuchungen zur Wirkung von Verapamil und Mibefradil auf verschiedene Ionenkanalströme wurden daher in der vorliegenden Arbeit an Kardiomyocyten der Ratte mit Hilfe der Spannungs-Klemm-Technik („whole-cell-clamp“-Registrierungen) durchgeführt. Mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode zur Messung einzelner, aus dem Herzen durch Kollagenasebehandlung gelöster Kardiomyocyten lassen sich die oben genannten Schwierigkeiten überwiegend umgehen (Isenberg und Klöckner, 1982). Derart isolierte Zellen zeigen die gleichen morphologischen, mechanischen und elektrophysiologischen Eigenschaften wie ein Zellverband. Mit der von Hamill et al. (1981) beschriebenen Methodik können Potential- bzw. Gesamtzellströme von enzymatisch isolierten Einzelzellen abgeleitet werden.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Untersuchungen zum transienten Auswärtsstrom  $i_{to}$ . Er ist besonders an Zellen des supraventrikulären Gewebes und in den Purkinjenzellen

ausgeprägt (Coraboeuf *et al.*, 1982). Am ventrikulären Gewebe der Ratte ist er deutlich ausgebildet (Tohse *et al.*, 1990). Die vorliegenden Messungen zeigen die Existenz einer rasch inaktivierenden Komponente  $i_{to,f}$  mit einer Zeitkonstanten  $\tau$  von etwa 35 Millisekunden und einer langsamen Komponente  $i_{to,s}$  mit einer Zeitkonstanten  $\tau$  von mehr als einer Sekunde. Es ist anzunehmen, daß die langsame Komponente an der Repolarisation der Membran während des Aktionspotential-Plateaus beteiligt ist und dadurch die Kontraktionskraft moduliert. Hinzu kommt, daß der  $i_{to,f}$ -Strom bei Körpertemperatur nicht vorhanden ist und somit der  $i_{to,s}$  als wesentlicher repolarisierender Strom angesehen werden muß, da ein  $i_K$ -Strom im Rattenventrikel nicht gefunden wurde (Weis, 1993). Bei der Charakterisierung der beiden repolarisierenden Auswärtsströme wurde sowohl eine Zeit- als auch eine Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung festgestellt. Die Arbeiten von Weis (1993) belegen dieses auch für die Aktivierung. Die zwei transienten Auswärtsströme  $i_{to,f}$  und  $i_{to,s}$  können mit einer monoexponentiell abfallenden Funktion beschrieben werden. Die aus dem Strom-Spannungsdiagramm ermittelten Kurven wurden mit einer Boltzmann-Funktion angepaßt. Der sigmoidale Verlauf beschreibt das Schließen des virtuellen Aktivierungstores. Die halbmaximale Inaktivierung nimmt für den  $i_{to,s}$  einen Wert von  $-68 \pm 1,2$  mV und für den  $i_{to,f}$  einen Wert von  $-31 \pm 0,7$  mV an. Der berechnete Steigungsfaktor  $k$  beträgt für die schnelle Komponente  $-3,4 \pm 0,2$  mV und für die langsame  $-21 \pm 0,5$  mV. Die Spannungswerte für die halbmaximale Inaktivierung sind in der Literatur oftmals mit negativeren Werten beziffert (Dukes und Morad, 1989; Weis, 1993). Eine Erklärung für diese Abweichung ist der Einsatz von  $Cd^{2+}$ -Ionen zwecks Inhibition des L-Typ-Calciumstroms. Divalente Kationen können bekanntlich die Potentialabhängigkeit der transienten Auswärtsströme beeinflussen (Agus, 1989). Die Darstellung des spannungsabhängigen transienten Kaliumauswärtsstroms  $i_{to,s}$  zeigt ein Maximum bei  $-140$  mV. Daher wurden bei diesem Konditionierungspotential die inhibitorische Wirkung von Mibefradil und Verapamil in Form von Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Bei einer Versuchstemperatur von  $24^\circ C$ , bei der beide transiente Auswärtsströme ca. halbmaximal aktiv sind (Weis, 1993), wurden Konzentrationen von  $0,01$   $\mu mol/l$  bis  $10$   $\mu mol/l$  eingesetzt. Zwar zeigt sich über den gesamten Potentialbereich eine gleichmäßige Hemmung durch beide Substanzen auf den  $i_{to,s}$ , dennoch sind die Wirkunterschiede mit der beim Konditionierungspotential von  $-140$  mV erreichten maximalen Stromamplitude am stärksten. Die Konzentrations-Wirkungskurve von Mibefradil auf den langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstrom  $i_{to,s}$  ergibt eine konzentrationsabhängige Inhibition. Letztere setzt bei einer Konzentration von  $0,03$   $\mu mol/l$  ein und führt bei  $10$   $\mu mol/l$  zu einer vollständigen Hemmung. Die  $IC_{50}$  für Mibefradil beträgt

0,38  $\mu\text{mol/l}$ . Für Verapamil errechnet sich aus den durchgeführten Versuchen eine  $\text{IC}_{50}$  von 0,29  $\mu\text{mol/l}$ . Da bei einer physiologischen Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  nur die langsam inaktivierende Komponente  $i_{\text{to},\text{s}}$  und nicht, wie bislang angenommen, der  $i_{\text{to},\text{f}}$ -Strom maßgeblich an der Repolarisation des Rattenventrikels beteiligt ist, spielen diese Ergebnisse eine große Rolle für das Aktionspotential (hier nicht näher untersucht). Die Untersuchungen zum halbmaximalen Inaktivierungspotential  $V_{50}$  und dem Steigungsfaktor  $k$  des  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Stroms ergeben über den gesamten Konzentrationsbereich sowohl für Mibefradil als auch für Verapamil keine statistisch signifikante Abweichung von der Kontrolle ( $P \geq 0,05$ ). Damit reduzieren beide Substanzen den maximal verfügbaren  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Strom, ohne die Inaktivierungskurve auf der Spannungsachse zu verschieben. Die Versuche zeigen, daß sowohl Mibefradil als auch Verapamil in ähnlicher Weise und in nicht signifikant voneinander abweichenden Konzentrations-Wirkungskurven den  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Strom hemmen.

Mit dem Wirkvergleich beider Substanzen auf die spannungsabhängige Aktivierung der  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Tailströme sollten die Ergebnisse der Untersuchungen über die langsame Komponente des transienten Auswärtsstroms bestätigt werden. Denn die Tailströme stellen die Schließung des virtuellen Aktivierungstores dar und sind stets proportional zur Amplitude des  $i_{\text{to},\text{s}}$ . Die erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven für den Tailstrom zeigten für beide Substanzen ähnliche Hemmwirkungen wie auf den transienten Auswärtsstrom  $i_{\text{to},\text{s}}$ . Lediglich in Bezug auf ihre  $\text{IC}_{50}$ -Werte waren Unterschiede festzustellen. Für Mibefradil wurde eine  $\text{IC}_{50}$  von 0,37  $\mu\text{mol/l}$  und für Verapamil eine  $\text{IC}_{50}$  von 1,37  $\mu\text{mol/l}$  errechnet.

Weitere Versuche wurden durchgeführt, um die Selektivität beider Substanzen auf die schnelle Komponente des transienten Auswärtsstroms  $i_{\text{to},\text{f}}$  zu überprüfen. Denn die Arbeit von Gomora et al. (1999) beschreibt Mibefradil als einen wenig selektiven  $\text{K}^+$ -Kanalblocker. Daß sowohl Mibefradil als auch Verapamil den  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Strom hemmen, zeigen die Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Wirkung auf die schnelle Komponente  $i_{\text{to},\text{f}}$ . Durch den Einsatz des selektiven  $i_{\text{to},\text{s}}$ -Blockers Bertosamil konnte gezeigt werden, daß beide Substanzen keinen Einfluß auf den  $i_{\text{to},\text{f}}$ -Strom haben. Die Lage der Inaktivierungskurven auf der Spannungsachse und der Steigungsfaktor  $k$  wurden nicht signifikant zur Kontrolle verändert ( $P \geq 0,05$ ).

Darüberhinaus wurden Untersuchungen im Wirkvergleich zwischen Mibefradil und Verapamil beim einwärtsgerichtenden Kaliumstrom  $i_{\text{K1}}$  durchgeführt. Die physiologische Bedeutung des  $i_{\text{K1}}$ -Stromes besteht darin, daß er für die Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials, besonders am Ventrikel, mitverantwortlich ist. Darüber hinaus

bestimmt der  $i_{K1}$ -Strom die finale schnelle Repolarisationsphase von Aktionspotentialen (Arena *et al.*, 1990). In einer Arbeit von Liu *et al.* (1999) wird auf die nicht selektive Hemmung von Mibefradil an verschiedenen Kalium-Kanälen hingewiesen. Die Autoren ermittelten für Mibefradil eine  $IC_{50}$  für den  $i_{K1}$ -Strom von 5,6  $\mu\text{mol/l}$ . Ähnliche Ergebnisse zeigen die vorliegenden Untersuchungen:

Die Versuche ergeben für beide Substanzen eine konzentrationsabhängige Inhibition des  $i_{K1}$ -Stroms. Diese Hemmung wird jedoch erst bei Testpotentialen, die negativer als  $-90$  mV sind, deutlich sichtbar. Die Effekte von Mibefradil sowie von Verapamil sind zwar konzentrationsabhängig, jedoch nicht spannungsabhängig. Die Konzentrations-Wirkungskurven beider Substanzen weichen nicht signifikant voneinander ab ( $P \geq 0,05$ ). Zum Nachweis, daß es sich tatsächlich um den  $i_{K1}$ -Strom handelte und zum Erhalt einer Referenzstromlinie ( $i_{K1} = 0$ ) wurde als Inhibitor des  $i_{K1}$ -Stroms 3,6 mmol/l  $\text{BaCl}_2$  eingesetzt. Es stellt sich nun die Frage, ob die aus den Versuchen gewonnenen  $i_{K1}$ -Werte überhaupt für die Erstellung eines pharmakologischen Wirkprofils beider Substanzen herangezogen werden sollten, da die Inhibition nur im unphysiologischen Testpotentialbereich negativ zu  $-90$  mV deutlich war. Auch bezüglich der Hemmwirkung auf die Membranleitfähigkeit des  $i_{K1}$ -Stroms verhielten sich Mibefradil und Verapamil ähnlich.

Zahlreiche Arbeiten belegen, daß Mibefradil die kardialen (Lacinova *et al.*, 1994) und vaskulären (Welling *et al.*, 1995) spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ blockiert. Mit „Voltage-Clamp“-Experimenten an isolierten Muskelzellen von Meerschweinchen berechneten Fang und Osterrieder (1991) für Mibefradil eine  $IC_{50}$  von 0,23  $\mu\text{mol/l}$  auf den L-Typ-Calciumkanal. Darüber hinaus existieren einige Untersuchungen über die relative Selektivität von Mibefradil für T-Typ-Calciumkanäle der Herzmuskelzelle (Mishra und Hermsmeyer, 1994). Ziel der vorliegenden Arbeit war es vor allem, mögliche Unterschiede qualitativer wie auch quantitativer Art bei der Inhibition des L-Typ-Calciumkanals durch Mibefradil und Verapamil zu analysieren. Die Versuche ergeben für die Hemmung des L-Kanals durch Mibefradil eine  $IC_{50}$  von 0,81  $\mu\text{mol/l}$  bei Klemmung der Membran auf 0 mV. Die Abweichung von den in der Literatur genannten Werten ist u.a. mit der Verwendung eines anderen Haltepotentials zu erklären. Für Verapamil ergeben die Versuche eine  $IC_{50}$  von 0,22  $\mu\text{mol/l}$ . Dies zeigt, daß Verapamil den langsamen Calciumeinwärtsstrom  $i_{si}$  stärker hemmt als Mibefradil. Die gemessenen  $i_{si}$ -Stromkurven waren für beide Substanzen konzentrationsabhängig. Die Wahl des Testpotentials hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Inhibition. Hingegen besteht in Bezug auf das Haltepotential eine starke



Potentialabhängigkeit der  $i_{si}$ -Blockade (Fang und Osterrieder, 1991). Diese erklärt, weshalb Mibefradil bei therapeutischen Konzentrationen nicht negativ inotrop wirkt und an vaskulären glatten Muskelzellen, die vermehrt T-Kanäle und ein positiveres Membranpotential aufweisen, den Calciumeinstrom hemmen kann und dadurch zu einer deutlichen Vasodilatation (Fang und Osterrieder, 1991) führt.

Desweiteren wird in den vorliegenden Versuchen der Frage nachgegangen, an welchen Kanalzustand sowohl Mibefradil als auch Verapamil binden. Die zugrundeliegende Modellvorstellung als Hypothese vom „modulierten Rezeptor“ geht auf Hondeghem und Katzung (1984) zurück. Dabei folgen die potentialabhängigen Zustände „in Ruhe“ („resting-state“), „aktiviert“ („activated-state“) und „inaktiviert“ („inactivated-state“) einer „Hodgkin- und Huxley-Kinetik“. Die Untersuchungen von Nawrath und Wegener (1997) zeigen, daß Verapamil an den inaktivierten Kanalzustand bindet. Nach Ausführung der Autoren kam es zu einer stärkeren Blockade, je mehr Zeit dem Kanal für seine zuvor ausgelöste Inaktivierung zur Verfügung stand. Aus dem Grund wurden in den vorliegenden Versuchen die  $\tau$ -Werte für die Inaktivierung des  $i_{si}$ -Stroms für beide Substanzen bestimmt, um so Rückschlüsse auf den Kanalzustand zu ziehen. Die Ergebnisse zeigen, daß die  $\tau$ -Werte für Mibefradil und Verapamil über den gesamten Konzentrationsbereich bei einem bestimmten Testpotential statistisch nicht signifikant von der Kontrolle abweichen ( $P \geq 0,05$ ). Da sich die Zeitkonstante beim Mibefradil nicht konzentrationsabhängig ändert, dürfte der offene Kanalblock unwahrscheinlich sein. Hingegen deutet dies, wie beim Verapamil, auf eine Bindung an den inaktivierten Kanal hin. Auch die Arbeiten von Nawrath (1997) zeigen nach Einwirkung von Verapamil keine Änderung der Zeitkonstante für die Inaktivierung des  $i_{si}$ . Zusammenfassend läßt sich über die Wirkungen beider Substanzen auf den L-Typ-Kanal festhalten, daß in Bezug auf die Art der Bindung starke Ähnlichkeiten vorhanden sind.

Demnach ergeben sich zwischen Mibefradil und Verapamil in der Inhibition des  $i_{si}$  lediglich quantitative Unterschiede. Desweiteren spielen die Effekte beider Substanzen auf die anderen Ionenkanäle eine wichtige Rolle. Denn bei den Calciumkanal-hemmenden Konzentrationen trägt zusätzlich sowohl die Hemmung des  $i_{to,s}$ -Stroms wie auch des  $i_{K1}$ -Stroms zum pharmakologischen Wirkprofil von Mibefradil und Verapamil bei. Die Effekte des bereits lange bekannten L-Kanalblockers Verapamil und des neuartigen T-Kanalblockers Mibefradil auf die beschriebenen Ionenkanäle sind so ähnlich, daß trotz gewisser strukturchemischer Unterschiede von gleichartigen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor ausgegangen werden muß. Dies bestätigt den schon erwähnten Strukturvergleich, der von Höltje und Jessen (1998)

mit Hilfe von „Molecular-Modelling“-Versuchen beschrieben wurde. Demnach handelt es sich beim Mibefradil zwar um einen strukturell andersartigen Calciumantagonisten, der wie die vorliegenden Versuche zeigen, in allerdings zum Teil unterschiedlichen Konzentrationsbereichen, ähnliche Wirkungen wie Verapamil auf die kardialen Ionenkanäle besitzt. Aufgrund dessen muß angenommen werden, daß beim Mibefradil nur die höhere Selektivität für T-Kanäle für die bevorzugte Vasodilatation, für das Fehlen einer negativ inotropen Wirkung sowie eine geringere Herzfrequenzminderung verantwortlich ist. Mibefradil, der erste Vertreter der T-Kanalblocker hemmt demnach nicht, wie häufig behauptet wird, fast ausschließlich T-Kanäle, sondern erweist sich durchaus als effektiver Hemmstoff des  $i_{si^-}$ ,  $i_{to,s^-}$  und  $i_{K1}$ -Stroms. Dies entspricht klinischen Studien, die bei einem Anstieg der Mibefradil-Plasmakonzentration infolge Arzneimittel-Interaktionen oder bei Kombination mit  $\beta$ -Rezeptorenblockern einen besonders starken AV-Block zeigten. Dies hat letztlich zur Rücknahme der Substanz aus dem Markt geführt.

## 5. Zusammenfassung

Mit dem Tetralin-Derivat Mibefradil steht der erste Vertreter einer ganz neuen Klasse von Calciumantagonisten, den sogenannten T-Kanalblockern, zur Verfügung. Trotz gewisser struktureller Unterschiede haben „Molecular-Modelling“-Untersuchungen ergeben, daß für Mibefradil wie für den bereits lange bekannten L-Kanalblocker Verapamil gleichartige Wechselwirkungen mit dem Rezeptor angenommen werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Wirkungen Mibefradil, neben der bekannten relativen Selektivität für T-Kanäle, im Vergleich zu Verapamil auf die  $K^+$ -Ströme  $i_{to}$  und  $i_{K1}$  sowie den Calciumstrom  $i_{si}$  zeigt.

Dazu wurden mit Hilfe der „Patch-clamp“-Technik Versuche mit isolierten ventrikulären Kardiomyocyten der Ratte im „whole-cell“-Modus durchgeführt. Bei 24 °C wurden Ganzzellströme von Einzelzellen, die durch enzymatische Dissoziation unter Verwendung einer Langendorff-Apparatur gewonnen wurden, untersucht.

Die Untersuchungen des transienten Auswärtsstroms  $i_{to}$  zeigen, daß sowohl Mibefradil als auch Verapamil die langsame Komponente  $i_{to,s}$  selektiv blockieren. Dabei nehmen beide Substanzen keinen Einfluß auf die Spannungs- und Zeitabhängigkeit der Inaktivierung des  $i_{to,s}$ . Auch in den Konzentrations-Wirkungskurven lassen sich kaum Unterschiede feststellen. Für Mibefradil wurde eine  $IC_{50}$  von 0,38  $\mu\text{mol/l}$  und für Verapamil eine  $IC_{50}$  von 0,29  $\mu\text{mol/l}$  errechnet.

Im Wirkvergleich beider Substanzen in Bezug auf die spannungsabhängig aktivierten  $i_{to,s}$ -Tailströme verhielten sich Mibefradil und Verapamil ähnlich. Dies war zu erwarten, da die Tailströme stets proportional zur Amplitude des  $i_{to,s}$ -Stroms sind.

Desweiteren zeigten beide Substanzen, nach Zugabe des selektiven  $i_{to,s}$ -Blockers Bertosamil, keine Effekte auf den schnell inaktivierenden transienten Auswärtsstrom  $i_{to,f}$ . Die Lage der Inaktivierungskurven auf der Spannungsachse und der Steigungsfaktor  $k$  wurden nicht signifikant zur Kontrolle verändert.

Die vergleichenden Untersuchungen auf den einwärtsgerichteten Kaliumstrom  $i_{K1}$  ergaben sowohl für Mibefradil als auch für Verapamil eine konzentrations- jedoch keine

spannungsabhängige Hemmung. Die Inhibition war lediglich im unphysiologischen Testpotentialbereich (negativ zu  $-90$  mV) deutlich festzustellen. Auch bezüglich der Hemmwirkung auf die Membranleitfähigkeit des  $i_{K1}$ -Stroms verhielten sich Mibefradil und Verapamil ähnlich.

Ferner wurden Versuche zum Einfluß der beiden Wirkstoffe auf den langsamen Calciumeinwärtsstrom  $i_{si}$  durchgeführt mit dem Ergebnis, daß die halbmaximale Hemmkonzentration von Verapamil ( $IC_{50} = 0,22$   $\mu\text{mol/l}$ ) nahezu viermal niedriger ist als für Mibefradil ( $IC_{50} = 0,81$   $\mu\text{mol/l}$ ). Es ist anzunehmen, daß aufgrund der höheren Selektivität von Mibefradil für den T-Kanal und der schwächeren Wirkung auf den L-Kanal die Vasodilatation im Vergleich zur negativen Inotropie stärker ausgeprägt ist als bei Verapamil.

Beim Vergleich der  $\tau$ -Werte für die Inaktivierung des  $i_{si}$ -Stroms ergab sich weder für Mibefradil noch für Verapamil über den gesamten Konzentrationsbereich bei Testpotentialen von  $-10$  mV,  $0$  mV und  $+10$  mV eine signifikante Abweichung von der Kontrolle. Dies deutet auf Ähnlichkeiten bezüglich der bevorzugten Bindung an den inaktivierten Kanal hin.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Versuche zeigen, daß Mibefradil nicht, wie häufig angenommen wird, fast ausschließlich T-Kanäle blockiert, sondern auch hemmend auf den  $i_{si}$ -,  $i_{to,s}$ - und  $i_{K1}$ -Strom wirkt und diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede zu Verapamil aufweist. Klinische Studien haben dies bestätigt. Besonders bei Kombination mit  $\beta$ -Rezeptorenblockern traten verstärkt AV-Blockierungen auf. Infolge von Arzneimittelinteraktionen über die Inhibition der Isoenzyme CYP-3A4 und CYP-2D6 wurde die Hemmwirkung anderer Substanzen, vor allem der in der Leber metabolisierten  $\beta$ -Rezeptorenblocker, auf den AV-Knoten erheblich verstärkt. Dies führte schließlich zur Rücknahme der Substanz vom Markt. Ziel für die weitere Entwicklung neuer T-Kanalblocker sollte daher die Vermeidung von Arzneimittelinteraktionen und die Verbesserung der Selektivität für die T-Kanäle sein.

## **6. Literatur**

**Abernethy, D. R.:** Pharmacologic and pharmacokinetic profile of mibefradil, a T- and L-type calcium channel antagonist. *Am-J-Cardiol* 80(4B): 4C-11C, 1997.

**Aczel, S., Kurka, B. und Hering, S.:** Mechanism of voltage- and use-dependent block of class A  $\text{Ca}^{2+}$  channels by mibefradil. *Br-J-Pharmacol* 125: 447-54, 1998.

**Agus, Z. S., Dukes, I. D. und Morad, M.:** Divalent cations modulate transient outward current in rat ventricular myocytes. *J-Physiol-(Lond)* 418: 28P, 1989.

**Akaike, N., Kanaide, H., Kuga, T., Nakamura, M., Sadoshima, J. und Tomoike, H.:** Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J-Physiol* 416: 141-60, 1989.

**Apkon, M. und Nerbonne, J. M.:** Characterization of two distinct depolarization-activated  $\text{K}^+$  currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J-Gen-Physiol* 97: 973-1011, 1991.

**Arena, J. P., Walsh, K. B. und Kass, R. S.:** Measurement, block, and modulation of potassium channel currents in the heart. *Prog-Clin-Biol-Res* 334: 43-63, 1990.

**Bean, B. P.:** Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J-Gen-Physiol* 86: 1-30, 1985.

**Bean, B. P.:** Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu-Rev-Physiol* 51: 367-384, 1989.

**Bian, K. und Hermsmeyer, K.:**  $\text{Ca}^{2+}$  channel actions of the non-dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist Ro 40-5967 in vascular muscle cells cultured from dog coronary and saphenous arteries. *Naunyn-Schmiedebergs-Arch-Pharmacol* 348: 191-6, 1993.

**Biermans, G., Vereecke, J. und Carmeliet, E.:** The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers-Arch* 410: 604-613, 1987.

**Bossert, F. und Vater, W. :** Dihydropyridine, eine neue Gruppe stark wirksamer Koronartherapeutika. [Dihydropyridines, a new group of strongly effective coronary therapeutic agents]. *Naturwissenschaften* 58: 578, 1971.

**Bouron, A., Potreau, D. und Raymond, G.:** Possible involvement of a chloride conductance in the transient outward current of whole-cell voltage-clamped ferret ventricular myocytes. *Pflügers-Arch* 419: 534-536, 1991.

**Boyd, R. A., Giacomini, J. C. und Giacomini, K. M.:** Species differences in the negative inotropic response of 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers in myocardium. *J-Cardiovasc-Pharmacol* 12: 650-7, 1988.

**Boyle, W. A. und Nerbonne, J. M.:** A novel type of depolarization-activated  $K^+$  current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am-J-Physiol* 260: H1236-47, 1991.

**Braunwald, E.:** Foreword. In: Opie LH (ed) clinical use of calcium channel antagonist drugs. Kluwer, London, p ix. 1990.

**Cahalan, M. und Neher, E.:** Patch clamp techniques: An overview. *Methods-Enzymol* 207: 3-14, 1992.

**Carignani, C., Robello, M., Marchetti, C. und Maga, L.:** A transient outward current dependent on external calcium in rat cerebellar granule cells. *J-Membr-Biol* 122: 259-65, 1991.

**Castle, N. A.:** Bupivacaine inhibits the transient outward  $K^+$  current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J-Pharmacol-Exp-Ther* 255: 1038-46, 1990.

**Chapelle, F., Stoleru, L., Hayashida, W., Pouleur, H., Hess, O., Benedict, C. R. und Rousseau, M. F.:** Ro 40-5967, a new calcium antagonist profile- Bradycardia without myocardial depression? *Circulation* 4: abstr 139, 1994.

**Chouabe, C., Drici, M. D., Romey, G. und Barhanin, J.:** Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac  $K^+$  channels IKr and IKs. *Therapie* 55: 195-202, 2000.

**Clozel, J. P., Banken, L. und Osterrieder, W.:** Effects of Ro 40-5967, a novel calcium antagonist, on myocardial function during ischemia induced by lowering coronary perfusion pressure in dogs: comparison with verapamil. *J-Cardiovasc-Pharmacol* 14: 713-21, 1989.

**Clozel, J. P., Osterrieder, W., Kleinbloesun, C. H., Welker, H. A., Schlappi, B., Tudor, R., Hefti, F., Schmitt, R. und Eggers, H.:** A new nondihydropyridine calcium antagonist. *Cardiovasc-Drug-Rev* 9: 4- 17, 1991.

**Clozel, J. P., Veniant, M. und Osterrieder, W.:** The structurally novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [3H] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovasc-Drugs-Ther* 4: 731-6, 1990.

**Coraboeuf, E. und Carmeliet, E.:** Existence of two transient outward currents in sheep cardiac purkinje fibers. *Pflügers-Arch* 392: 352-359, 1982.

**Corea, L., Miele, N., Bentivoglio, M., Boschetti, E., Agabiti-Rosei, E. und Muiesan, G.:** Acute and chronic effects of nifedipine on plasma renin activity and plasma adrenaline and noradrenaline in controls and hypertensive patients. *Clin-Sci-(Lond)* 57 (Suppl. 5): 115s-117s, 1979.

**Danish Study Group:** The Danish studies on verapamil in acute myocardial infarction. The Danish Study Group on Verapamil in Myocardial Infarction. *Br-J-Clin-Pharmacol* 21: 197S-240S, 1986.

**DiFrancesco, D., Ferroni, A. und Visentin, S.:** Barium-induced blockade of the inward rectifier in calf Purkinje fibres. *Pflügers-Arch* 402: 446-53, 1984.

**Dukes, I. D. und Morad, M.:** Tedisamil inactivates the transient outward  $\text{K}^{+}$ -current in rat ventricular myocytes. *Am-J-Physiol* 257, 26: H1746-H1749, 1989.

**Dukes, I. D. und Morad, M.:** The transient  $\text{K}^{+}$  current in rat ventricular myocytes: evaluation of its  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  dependence. *J-Physiol* 435: 395-420, 1991.

**Dunselmann, P.H.J.M., Kuntze, C.E.E., van Bruggen, A., Hamer, J.P.M., Scaf A.H.J., Wesseling, H. und Lie, K.I.:** Efficacy of felodipine in congestive heart failure. *Eur-Heart-J* 10: 354-365, 1989.

**Egstrup, K. und Andersen, P. E.:** Transient myocardial ischemia during nifedipine therapy in stable angina pectoris, and its relation to coronary collateral flow and comparison with metoprolol. *Am-J-Cardiol* 71: 177-83, 1993.

**Ehara, T. und Daufmann, R.:** The voltage- and time-dependent effects of (-)-verapamil on the slow inward current in isolated cat ventricular myocardium. *J-Pharmacol-Exp-Ther* 207: 49-55, 1978.

**Elkayam, U.:** Presentation of the results of the MACH-1 Trial. XXI Congress of the European Society of Cardiology, 25. Aug. 1998.

**Fang, L. M. und Osterrieder, W.:** Potential-dependent inhibition of cardiac  $Ca^{2+}$  inward currents by Ro 40-5967 and verapamil: Relation to negative inotropy. *Eur-J-Pharmacol* 196: 205-7, 1991.

**Fermini, B., Wang, Z., Duan, D. und Nattel, S.:** Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am-J-Physiol* 263: H1747-54, 1992.

**Fleckenstein, A.:** Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myokards. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 70: 81-99, 1964.

**Frohlich, E. D.:** Calcium antagonists: Their physiological differences. *Am-J-Hypertens* 4: 430S-434S, 1991.

**Furberg, C. D. und Psaty, B. M.:** Should dihydropyridines be used as first-line drugs in the treatment of hypertension? The con side. *Arch-Intern-Med* 155: 2157-61, 1995.

**Furberg, C. D., Psaty, B. M. und Meyer, J. V.:** Nifedipine. Dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation* 92: 1326-31, 1995.



**Gibson, R. S.:** Management of acute non-Q-wave myocardial infarction. The role of prophylactic diltiazem therapy and indications for pre-discharge coronary arteriography. *Drugs* 42 (Suppl. 2): 28-37, 1991.

**Godfraind, T.:** Calcium antagonists and vasodilatation. *Pharmacol-Ther* 64: 37-75, 1994.

**Goll, A., Ferry, D. R., Striessnig, J., Scober, M. und Glossmann, H.:** (-)-(<sup>3</sup>H) Desmethoxy-verapamil, a novel calcium channel probe. *FEBS-Lett* 176: 106-107, 1984.

**Gomora, J. C., Enyeart, J. A. und Enyeart, J. J.:** Mibefradil potently blocks ATP-activated K<sup>(+)</sup> channels in adrenal cells. *Mol-Pharmacol* 56: 1192-7, 1999.

**Hagiwara, N., Irisawa, H. und Kameyama, M.:** Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J-Physiol* 395: 233-53, 1988.

**Halperin, A. K. und Cibeddo, L. X.:** The role of calcium channel blockers in the treatment of hypertension. *Am-Heart-J* 111: 363-382, 1986.

**Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J.:** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers-Arch* 391: 85-100, 1981.

**Hansen, J. F.:** Treatment with verapamil after an acute myocardial infarction. Review of the Danish studies on verapamil in myocardial infarction (DAVIT I and II). *Drugs* 42 (Suppl. 2): 43-53, 1991.

**Harding, R. J. und Duncan, C. J.:** Protective effect of raised extracellular potassium against rapid cell damage in the rat heart. *Biochem-Soc-Trans* 22: 440S, 1994.

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

**Hess, P. und Tsien, R. W.:** Mechanism of ion permeation through calcium channels. Nature 309: 453-6, 1984.

**Heubach, J. F., Kohler, A., Wettwer, E. und Ravens, U.:** T-Type and tetrodotoxin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil. Circ-Res 86: 628-35, 2000.

**HINT Research Group:** Early treatment of unstable angina in the coronary care unit: a randomised, double blind, placebo controlled comparison of recurrent ischaemia in patients treated with nifedipine or metoprolol or both. Report of The Holland Interuniversity Nifedipine/Metoprolol Trial (HINT) Research Group. Br-Heart-J 56: 400-13, 1986.

**Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F.:** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J-Physiol-(Lond) 117: 500-544, 1952.

**Höltje, H. D. und Jessen, G.:** Mibefradil und Verapamil im Strukturvergleich. Pharmazeutische Zeitung Nr.1/2, 143. Jahrgang, S.40-41, 8. Januar 1998.

**Hofmann, F., Biel, M. und Flockerzi, V.:** Molecular basis for  $\text{Ca}^{2+}$  channel diversity. Annu-Rev-Neurosci 17: 399-418, 1994.

**Holck, M.:** Effects of Ro 40-5967/001 in ( $^3\text{H}$ )-desmethoxy-verapamil binding assay and in several isolated organ preparations. Research-Report-B- 154`041: 10. Dec, 1987.

**Hondeghem, L. M. und Katzung, B. G.:** Antiarrhythmic agents: The modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. Ann-Rev-Pharmacol-Toxicol 24: 387-423, 1984.

**Hume, J. R., Uehara, A., Hadley, R. W. und Harvey, R. D.:** Comparison of  $\text{K}^+$  channels in mammalian atrial and ventricular myocytes. Prog-Clin-Biol-Res 334: 17-42, 1990.

**Isenberg, G. und Klöckner, U.:** Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". Pflügers-Arch 395: 6-18, 1982.

**Isenberg, G. und Klöckner, U.:** The electrophysiological properties of the isolated adult heart cell: An overview. *Basic-Res-Cardiol* 80 (Suppl. 2): 51-54, 1994.

**Josephson, I. R., Sanchez-Chapula, J. und Brown, A. M.:** Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ-Res* 54: 157-62, 1984.

**Jahnel, U., Klemm, P. und Nawrath, H.:** Different mechanisms of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedebergs-Arch-Pharmacol* 349: 87-94, 1994.

**Kilborn, M. J. und Fedida, D.:** A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. *J-Physiol-(Lond)* 430: 37-60, 1990.

**Lacinova, L., Welling, A., Bosse, E., Ruth, P., Flockerzi, V. und Hofmann, F.:** Interaction of Ro 40-5967 with the stable expressed  $\alpha 1$  subunit of the cardiac L-type calcium channel. *J-Pharmacol-Exp-Ther* 274: 54-63, 1994.

**Langendorff, O.:** Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers-Arch* 61: 291-332, 1885.

**Leblanc, N. und Hume, J. R.:** Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 248: 372-6, 1990.

**Lefevre, I. A., Coulombe, A. und Coraboeuf, E.:** The calcium antagonist D600 inhibits calcium-independent transient outward current in isolated rat ventricular myocytes. *J-Physiol* 432: 65-80, 1991.

**Levine, T. B.:** The design of the Mortality Assessment in Congestive Heart Failure Trial (MACH-1, mibefradil). *Clin-Cardiol* 20: 320-6, 1997.

**Liu, J. H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R. und Bernheim, L.:** Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  currents in human fusion-competent myoblasts. *Br-J-Pharmacol* 126(1): 245-50, 1999.

**Man-in't-Veld, A. J.:** Calcium antagonists in hypertension. *Am-J-Med* 86: 6-14, 1989.

**McDonald, T. F., Pelzer, D. und Trautwein, W.:** On the mechanism of slow calcium channel block in heart. *Pflügers-Arch* 385: 175-9, 1980.

**McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W. und Pelzer, D. J.:** Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol-Rev* 74: 365-507, 1994.

**Mehrke, G., Zong, X. G., Flockerzi, V. und Hofmann, F.:** The  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J-Pharmacol-Exp-Ther* 271: 1483-8, 1994.

**Mishra, S. K. und Hermsmeyer, K.:** Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ-Res* 75: 144-8, 1994.

**Mitra, R. und Morad, M.:** A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am-J-Physiol* 249: H1056-60, 1985.

**Mitra, R. und Morad, M.:** Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 83: 5340-4, 1986.

**Muir, A. R.:** The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J-Anat* 101: 239-61, 1967.

**Nawrath, H. und Wegener, J. W.:** Kinetics and state-dependent effects of verapamil on cardiac L-type calcium channels. *Naunyn-Schmiedebergs-Arch-Pharmacol* 355: 79-86, 1997.

**Nayler, W. G.:** Calcium antagonists. Academic-Press-(Lond), United Kingdom. 1-298, 1988.

**Neher, E. und Sakmann, B.:** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802, 1976.

**Neher, E., Sakmann, B. und Steinbach, J. H.:** The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers-Arch* 375: 219-28, 1978.

**Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B. und Tsien, R. W.:** A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316: 443-6, 1985.

**Ogbaghebriel, A. und Shrier, A.:** Inhibition of metabolism abolishes transient outward current in rabbit atrial myocytes. *Am-J-Physiol* 266: H182-90, 1994.

**Opie, L. H.:** Clinical use of calcium channel antagonist drugs. 2nd edn, Kluwer. Academic-Press-(Boston), USA. 1-286, 1990.

**Opie, L. H., Buhler, F. R., Fleckenstein, A., Hansson, L., Harrison, D. C., Poole-Wilson, P. A., Schwartz, A., Vanhoutte, P. M., Braunwald, E., Nayler, W. G. et al.:** International Society and Federation of Cardiology: Working Group on Classification of Calcium Antagonists for Cardiovascular Disease. *Am-J-Cardiol* 60: 630-2, 1987.

**Osterrieder, W. und Holck, M.:** In vitro pharmacologic profile of Ro 40-5967, a novel Ca<sup>2+</sup> channel blocker with potent vasodilator but weak inotropic action. *J-Cardiovasc-Pharmacol* 13: 754-9, 1989.

**Packer, M., O'Connor, C. M., Ghali, J. K., Pressler, M. L., Carson, P. E., Belkin, R. N., Miller, A. B., Neuberg, G. W., Frid, D., Wertheimer, J. H., Cropp, A. B. und DeMets, D. L.:** Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group. *N-Engl-J-Med* 335: 1107-14, 1996.

**Piper, H.M. und Isenberg, G.:** Isolated adult cardiomyocytes/structure and metabolism. CRC-Press, Inc., (Boca Raton), Florida, 1989.

**Powell, T.:** Electrophysiological properties of isolated ventricular myocytes. *Basic-Res-Cardiol* 80 (Suppl. 1): 87-91, 1985.

**Reid, J. L., Meredith, P. A., Donnelly, R. und Elliott, H. L.:** Pharmacokinetics of calcium antagonists. *J-Cardiovasc-Pharmacol* 12 (Suppl. 7): S22-6, 1988.

**Richard, S., Neveu, D., Carnac, G., Bodin, P., Travo, P. und Nargeot, J.:** Differential expression of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim-Biophys-Acta* 1160(1): 95-104, 1992.

**Rutledge, A. und Triggle, D. J.:** The binding interactions of Ro 40-5967 at the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in cardiac tissue. *Eur-J-Pharmacol* 280: 155-8, 1995.

**Saito, I., Takeshita, E., Saruta, T., Nagano, S. und Sekihara, T.:** Effect of a calcium entry blocker on blood pressure, plasma renin activity, aldosterone and catecholamines in normotensive subjects. *Clin-Endocrinol-(Oxf)* 24: 565-70, 1986.

**Sakmann, B. und Trube, G.:** Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J-Physiol* 347: 641-657, 1984.

**Sandmann, S. und Unger, T.:** *Blickpunkt Mibefradil*. Aesopus-Verlag: S56, 1997.

**Sato, M., Nagao, T., Yamaguchi, I., Nakajima, H. und Kiyomoto, A.:** Pharmacological studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative (CRD-401). *Arzneimittelforschung* 21: 1338-43, 1971.

**Schwinger, R. H., Bohm, M. und Erdmann, E.:** Negative inotropic properties of isradipine, nifedipine, diltiazem and verapamil in diseased human myocardial tissue. *J-Cardiovasc-Pharmacol* 15: 892-9, 1990.

**Sheppard, D. N., Valverde, M. A., Represa, J. und Giraldez, F.:** Transient outward currents in cochlear ganglion neurons of the chick embryo. *Neuroscience* 51: 631-9, 1992.

**Shibata, E. F., Drury, T., Refsum, H., Aldrete, V. und Giles, W.:** Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am-J-Physiol* 257: H1773-81, 1989.

**Shimoni, Y., Clark, R. B. und Giles, W. R.:** Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J-Physiol* 448: 709-727, 1992.

**Those, N., Nakaya, H., Hattori, Y., Endou, M. und Kanno, M.:** Inhibitory effect mediated by  $\alpha 1$ -adrenoceptors on transient outward current in isolated rat ventricular cells. *Pflügers-Arch* 415: 575-581, 1990.

**Towart, R.:** The selektive inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonist dihydropyridines. *Circ-Res* 48: 650-657, 1981.

**Triggle D. J.:** Calcium antagonist drug development. *Curr. Cardiovascular Patents* 2: 365-384, 1990.

**Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G. und Schwartz, A.:** Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  channel function and drug action. *Trends-Pharmacol-Sci* 16: 43-9, 1995.

**Wagenknecht, L. E., Furberg, C. D., Hammon, J. W., Legault, C. und Troost, B. T.:** Surgical bleeding: Unexpected effect of a calcium antagonist. *Bmj* 310: 776-7, 1995.

**Weis, T., Berger, F. und Borchard, U.:** A slowly inactivating transient outward current in rat ventricular myocytes. *Pflügers-Arch* 425: 184-6, 1993.

**Welling, A., Lacinova, L., Donatin, K., Ludwig, A., Bosse, E., Flockerzi, V. und Hofmann, F.:** Expression of the L-type calcium channel with two different beta subunits and its modulation by Ro 40-5967. *Pflügers-Arch* 429: 400-411, 1995.

**Wettwer, E., Amos, G. J., Posival, H. und Ravens, U.:** Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ-Res* 75: 473-82, 1994.

**White, R. L., Doeller, J. E., Verselis, V. K. und Wittenberg, B. A.:** Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by  $\text{H}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . *J-Gen-Physiol* 95: 1061-75, 1990.

**Wood, A.:** Calcium antagonists: Pharmacologic differences and similarities. *Circulation* 80: 84-88, 1989.

**Zimmerman, A. N. und Hülsmann, W. C.:** Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 211: 646-7, 1966.



## 7. Anhang

### Abkürzungen und Formelzeichen

ATP	Adenosin-triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
EGTA	Titriplex VI = Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure; Chelatbildner
$E_K$	$K^+$ -Gleichgewichtspotential
k	Steigungsfaktor = Konstante zur Beschreibung von Eigenschaften, die einer Boltzmann-Funktion gehorchen
G	Leitfähigkeit [S]
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-n-2-ethansulfonsäure; Puffer
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der 50 % der maximalen Inhibition erreicht wird
$i_K$	„delayed-rectifier“ = langsam aktivierender Kalium-Auswärtsstrom
$i_{K1}$	einwärtsgerichteter Kaliumstrom
$i_{si}$	Calciumionen-Einwärtsstrom durch L-Typ-Calciumkanäle
$i_{to}$	transienter Kalium-Auswärtsstrom
$i_{to,f}$	schnell inaktivierender transienter Kalium-Auswärtsstrom
$i_{to,s}$	langsam inaktivierender transienter Kalium-Auswärtsstrom
KWK	Konzentrations-Wirkungskurve
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PVP 40	Polyvinylpyrolidon (M = 40000g/mol)
$\tau$	Zeitkonstante zur Beschreibung von Eigenschaften, die einer exponentiellen Funktion gehorchen
V <sub>50</sub>	halbmaximales Potential; Parameter zur Beschreibung von Eigenschaften, die einer Boltzmann-Funktion gehorchen
V <sub>cond</sub>	Konditionierungspotential
V <sub>T</sub>	Testpotential



Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Vertretung der vorliegenden Arbeit vor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Borchard für die Überlassung des Themas, seine ständige Ansprechbarkeit und seine vielfältigen Vorschläge während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Karin Stöcker, Frau Renate Gelhaar, Herrn Jürgen Springer und Dr. Dieter Haffner für die freundliche Unterstützung und die technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche.