

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
Prof. Dr. med. Lars S. Maier  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die  
Elektrophysiologie humaner atrialer und  
ventrikulärer Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Inga Braun**

2022



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN II  
Prof. Dr. med. Lars S. Maier  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die  
Elektrophysiologie humaner atrialer und  
ventrikulärer Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Inga Braun**

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Samuel Tobias Sossalla

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Hilker

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2022

## **Inhaltsverzeichnis**

<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	3
<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	7
<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	8
<i>Formelverzeichnis</i> .....	9
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	10
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Zelluläre Elektrophysiologie von Kardiomyozyten .....	13
1.1.1 Aktionspotentiale .....	13
1.1.1.1 Aktionspotential-Phasen .....	14
1.1.1.2 Effektive Refraktärzeit .....	17
1.1.1.3 Unterschiedliche Verlaufsformen von Aktionspotentialen .....	18
1.2 Arrhythmogenese .....	19
1.2.1 Zelluläre proarrhythmogene Mechanismen .....	21
1.2.1.1 Späte Nachdepolarisationen (DADs) .....	23
1.2.1.2 Frühe Nachdepolarisationen (EADs) .....	24
1.2.2 Später Natriumstrom .....	24
1.3 Innovative Antiarrhythmika .....	26
1.3.1 Ranolazin .....	26
1.3.2 Dronedaron .....	26
1.3.3 Kombination aus Ranolazin und Dronedaron .....	27
1.4 Ziele und Fragestellungen .....	28
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1 Probengewinnung von humanen atrialen Kardiomyozyten .....	29
2.2 Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten .....	30
2.2.1 Material und Geräte .....	30
2.2.2 Lösungen .....	31
2.2.3 Isolationsprotokoll .....	32
2.2.3.1 Vorbereitungen .....	32
2.2.3.2 Reinigung der Probe .....	32
2.2.3.3 Erster enzymatischer Verdau .....	33

---

2.2.3.4	Zweiter enzymatischer Verdau.....	34
2.2.3.5	Finale Aufarbeitung und Ca <sup>2+</sup> -Aufbau .....	34
2.2.3.6	Ausplattierung der Zellen .....	35
2.2.3.7	Nachteile der Isolationsmethode.....	35
2.3	Probengewinnung von humanen ventrikulären Kardiomyozyten .....	36
2.4	Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten .....	37
2.4.1	Lösungen.....	37
2.4.2	Isolationsprotokoll.....	38
2.4.2.1	Vorbereitung der Probe.....	38
2.4.2.2	Erster enzymatischer Verdau.....	38
2.4.2.3	Weitere enzymatische Verdauungsschritte und Zentrifugation... ..	38
2.4.2.4	Finale Aufarbeitung und Ca <sup>2+</sup> -Aufbau .....	39
2.4.2.5	Ausplattierung der Zellen .....	40
2.4.2.6	Nachteile der Isolationsmethode.....	40
2.5	Die Patch-Clamp-Technik.....	40
2.5.1	Messverfahren.....	41
2.5.2	Aufbau der Patch-Clamp Messanlage.....	41
2.5.3	Patch-Clamp-Pipetten .....	42
2.5.4	Badlösung .....	43
2.5.5	Pipettenlösung.....	44
2.5.6	Versuchsdurchführung .....	45
2.5.7	Aktionspotential Messungen .....	47
2.5.8	Auswertung der Aktionspotentiale.....	47
2.6	Pharmakologische Substanzen .....	48
2.6.1	Ranolazin .....	48
2.6.2	Dronedaron .....	48
2.7	Statistik und Datenauswertung.....	48
2.8	Kompensation von Störgrößen.....	49
3	Ergebnisse .....	50
3.1	Patient*innenkollektiv .....	50

---

3.2	Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin, Dronedaron und deren Kombination auf humane atriale Kardiomyozyten.....	51
3.2.1	Effekte auf die Aktionspotentialdauer im Sinusrhythmus .....	51
3.2.1.1	Effekte von Ranolazin auf die APD .....	51
3.2.1.2	Effekte von Dronedaron auf die APD .....	53
3.2.1.3	Effekte von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron auf die APD	55
3.2.2	Effekte auf die Aktionspotentialdauer bei Vorhofflimmern.....	57
3.2.2.1	Effekte von Ranolazin auf die APD .....	57
3.2.2.2	Effekte von Dronedaron auf die APD .....	58
3.2.2.3	Effekte von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron auf die APD	60
3.2.3	Effekt auf das Ruhemembranpotential .....	61
3.2.3.1	Effekte der Substanzen auf das Ruhemembranpotential im Sinusrhythmus .....	62
3.2.3.2	Effekte der Wirkstoffe auf das Ruhemembranpotential bei Vorhofflimmern.....	63
3.3	Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf humane ventrikuläre Kardiomyozyten .....	65
3.3.1	Effekte auf die Aktionspotentialdauer in ventrikulären Kardiomyozyten	65
3.3.2	Effekte auf das Ruhemembranpotential in ventrikulären Kardiomyozyten .....	67
4	Diskussion .....	71
4.1	Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron in atrialen Kardiomyozyten.....	71
4.2	Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron in ventrikulären Kardiomyozyten .....	75
4.3	Klinische Relevanz .....	77
4.4	Limitationen .....	80
5	Zusammenfassung .....	82
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Genehmigungen .....	100

8	Veröffentlichungen und Förderung .....	101
8.1	Originalarbeit .....	101
8.2	Abstract .....	101
8.3	Förderungen .....	101
9	Danksagung.....	102



---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardiales Aktionspotential.....	14
Abbildung 2: Frühe (EAD) und späte (DAD) Nachdepolarisationen. ....	23
Abbildung 3: Humaner atrialer Kardiomyozyt aus eigener Zellisolation.....	35
Abbildung 4: Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung mit schnellen ( $C_{fast}$ ) und langsamen ( $C_{slow}$ ) kapazitiven Artefakten. ....	41
Abbildung 5: Effekte von Ranolazin auf die APD im SR. ....	52
Abbildung 6: Effekte von Dronedaron auf die APD im SR. ....	54
Abbildung 7: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD im SR. ....	56
Abbildung 8: Effekte von Ranolazin auf die APD bei VHF.....	57
Abbildung 9: Effekte von Dronedaron auf die APD bei VHF.....	59
Abbildung 10: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD bei VHF.....	60
Abbildung 11: Vergleich der Ruhemembranpotentiale. ....	62
Abbildung 12: RMP Messungen von rechtsatrialen Kardiomyozyten bei Patient*innen mit SR.....	62
Abbildung 13: RMP Messungen an linksatrialen Kardiomyozyten bei Patient*innen mit VHF. ....	64
Abbildung 14: Messungen der $APD_{90}$ an humanen ventrikulären Kardiomyozyten bei Patient*innen mit HI im Endstadium. ....	66
Abbildung 15: Messungen der RMP von humanen ventrikulären Kardiomyozyten bei Patient*innen mit HI im Endstadium. ....	69

---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Material und Geräte zur Kardiomyozytenisolation .....	30
Tabelle 2: Ca <sup>2+</sup> -freie Isolationslösung .....	31
Tabelle 3: Enzymlösungen Vorhofisolation .....	31
Tabelle 4: Feng-Medium .....	32
Tabelle 5: Ca <sup>2+</sup> -Aufbau bei atrialem Myokard .....	35
Tabelle 6: Enzymlösungen Ventrikelisolation .....	37
Tabelle 7: Stopp-Lösung .....	38
Tabelle 8: Ca <sup>2+</sup> -Aufbau bei ventrikulärem Myokard .....	39
Tabelle 9: Stammlösung .....	44
Tabelle 10: Badlösung .....	44
Tabelle 11: Pipettenlösung .....	45
Tabelle 12: Patient*innenkollektiv. ....	50
Tabelle 13: Effekte von Ranolazin auf die APD <sub>90</sub> im SR.....	53
Tabelle 14: Effekte von Dronedaron auf die APD <sub>90</sub> im SR.....	54
Tabelle 15: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD <sub>90</sub> im SR.....	56
Tabelle 16: Effekte von Ranolazin auf die APD <sub>90</sub> bei VHF. ....	58
Tabelle 17: Effekte von Dronedaron auf die APD <sub>90</sub> bei VHF. ....	59
Tabelle 18: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD <sub>90</sub> bei VHF. ....	61
Tabelle 19: Mittelwerte der APD <sub>90</sub> -Messungen an humanen Kardiomyozyten des linken Ventrikels von Patient*innen mit HI im Endstadium. ....	67

## **Formelverzeichnis**

Formel 1: Nernst-Gleichung für Kalium.....	15
Formel 2: Ohmsches Gesetz. ....	47
Formel 3: Standardfehler des Mittelwerts. ....	49

---

## **Abkürzungsverzeichnis**

AC(V)B	Aortokoronarer (Venen)-Bypass
ACE	Angiotensin- <i>converting</i> Enzym
AD/DA-Wandler	Analog-Digital/Digital-Analog-Umwandler
AKE	Aortenklappenersatz
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCS	<i>Bovine calve serum</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
DAD	<i>delayed afterdepolarisation</i> (späte Nachdepolarisation)
DKM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dron	Dronedaron
EAD	<i>early afterdepolarisation</i> (frühe Nachdepolarisation)
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ERZ	Effektive Refraktärzeit
EX	Gleichgewichtspotential X
F	Faraday-Konstante
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
HTX	Herztransplantation
I	Stromstärke
IKM	Ischämische Kardiomyopathie
I <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -Einstrom
LA	Linkes Atrium
<i>late</i> I <sub>Na</sub>	später Natriumstrom
LAVI	Linker atrialer Volumenindex

LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
MKE	Mitralklappenersatz
MW	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>v</sub> -Kanal	spannungsabhängiger Natriumkanal
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
P	Posphat
<i>peak</i>	Potentialmaximum
<i>peak</i> I <sub>Na</sub>	schneller Natriumstrom
R	Widerstand
RA	Rechtes Atrium
Ran	Ranolazin
Ran + Dron	Kombination aus Ranolazin und Dronedaron
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SER	sarko-endoplasmatisches Retikulum
SR	Sinusrhythmus
T	Temperatur in Kelvin
U	Spannung
VHF	Vorhofflimmern
z	Wertigkeit des Ions

# 1 Einleitung

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende und klinisch relevanteste Herzrhythmusstörung des Menschen mit ansteigender Inzidenz, hoher Mortalität und Morbidität (Kirchhof et al. 2016; Mozaffarian et al. 2015; Schotten et al. 2011). Dabei ist VHF mit einem erhöhten kardioembolischen Schlaganfall-Risiko sowie der Verschlechterung einer bestehenden Herzinsuffizienz oder Induktion einer Tachymyopathie vergesellschaftet (Mozaffarian et al. 2016).

Im Mittelpunkt der rhythmuserhaltenden Therapie stehen der Einsatz von Antiarrhythmika sowie die interventionelle und/oder chirurgische Behandlung von VHF. Unverändert wird die elektrophysiologische Katheterablation als Alternative zu einer medikamentösen Rezidivprophylaxe bei symptomatischem VHF und vorheriger ineffektiver Antiarrhythmikatherapie eingestuft. Ebenso besteht die Option einer *First-line*-Ablation unter Nutzen-Risiko-Abwägung und Berücksichtigung des Wunsches der Patientinnen und Patienten. Die Ablation hat sich in den letzten 20 Jahren stark weiterentwickelt, ist jedoch nicht immer möglich, teilweise nicht erfolgreich sowie mit Risiken und Komplikationen behaftet (Nattel und Dobrev 2017). Deshalb wird die elektrophysiologische Katheterablation durch eine antiarrhythmische Therapie ergänzt oder zum Teil durch diese ersetzt. Allerdings gibt es momentan keine zufriedenstellende rhythmuserhaltende Therapie, die die Prognose der Patient\*innen verbessert, und gängige Antiarrhythmika sind mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen behaftet. Insbesondere die Behandlung von Patient\*innen mit struktureller Herzerkrankung stellt ein großes Problem dar, da sich hier Klasse-I-Antiarrhythmika verbieten und somit zumeist nur Amiodaron als letzte Option bleibt, dessen viele extrakardiale organotoxische Nebenwirkungen therapielimitierend sind. Es besteht also ein großer Bedarf an neuen und innovativen Therapiestrategien.

Über die letzte Dekade konnte gezeigt werden, dass die pathophysiologische Genese des VHF multifaktorieller Genese ist. Eine zentrale Rolle spielen Ionenkanalveränderungen sowie strukturelle Umbauprozesse („elektrisches *Remodeling*“) des Vorhofs. Die vorliegende Arbeit versucht unter anderem zu klären, welche pharmakologischen Therapieansätze durch die zwei Medikamente, Ranolazin und Dronedaron, in der antiarrhythmischen Therapie des VHF auf zellulärer Ebene bestehen. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse könnten zu einer Entwicklung verbesserter pharmakologischer Therapieansätze beitragen. Um ein besseres

Verständnis des Zusammenhangs zwischen VHF, „elektrischem *Remodeling*“ und Arrhythmien zu bekommen, ist es jedoch zunächst erforderlich, auf die physiologischen Besonderheiten der Herzmuskelzelle einzugehen und diese zu beschreiben.

## **1.1 Zelluläre Elektrophysiologie von Kardiomyozyten**

Das Herz ist eine elektromechanische Pumpe, deren rhythmische Kontraktion im gesunden Herz von der funktionierenden elektrochemischen Kommunikation der Herzmuskelzellen untereinander abhängig ist. Diese Kommunikation erfolgt mittels sogenannter Aktionspotentiale (AP) und hängt von deren adäquater Bildung und Weiterleitung ab. AP werden grob durch die nacheinander erfolgende Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen gebildet. Durch diese können Ionen einwärts- ( $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und auswärts strömen ( $\text{K}^+$ ). In gesunden Herzmuskelzellen ist die Erregungsausbreitung durch die Inaktivierung und Refraktärphase von Ionenkanälen vorgegeben. Untereinander sind die Herzmuskelzellen durch sogenannte „*gap junctions*“ verbunden, sodass die Erregung von Zelle zu Zelle weitergegeben werden kann (Makowski et al. 1977; Unwin und Zampighi 1980).

Während eines ablaufenden APs kommt es durch die Konzentrationsänderung der Ionen zu Konformationsänderungen der Myofilamente der Zelle und dadurch zur Kontraktion der einzelnen Herzmuskelfasern. Somit ist das AP der elektrophysiologische Ursprung des Herzschlags.

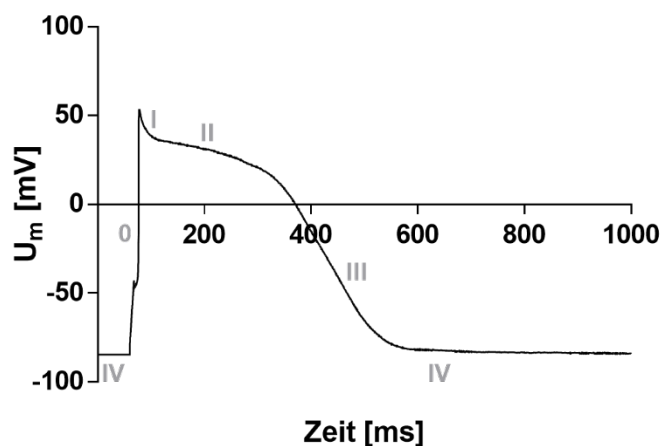
### **1.1.1 Aktionspotentiale**

AP verlaufen charakteristisch und sind wie bereits beschrieben durch Ionenströme hervorgerufene, kurzzeitige Veränderungen der Membranspannung elektrisch erregbarer Zellen. Initial werden sie durch eine Depolarisation der Zellmembran bis zu einem gewissen Schwellenwert ausgelöst und folgen danach dem „alles oder nichts“-Gesetz. Prinzipiell sind ihre Form und ihr zeitlicher Ablauf vom auslösenden Stimulus unabhängig. Deshalb können sie auch durch einen von außen in die Zelle induzierten, depolarisierenden Strom ausgelöst werden. Dieses Phänomen wurde sich für die Patch-Clamp Messungen der vorliegenden Arbeit zunutze gemacht. Der zeitliche Verlauf eines APs lässt sich grob in eine kürzere Depolarisationsphase gefolgt von einer längeren Repolarisationsphase gliedern. Je nach Zelltyp gibt es

dazwischen eine unterschiedlich lange andauernde oder auch ganz fehlende Plateauphase.

### 1.1.1.1 Aktionspotential-Phasen

Die einzelnen Phasen eines APs sind in Abbildung 1 anhand eines humanen ventrikulären APs beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 1: Kardiales Aktionspotential.**

Eigene Messung eines humanen ventrikulären APs (daher mit Stimulationszacke im Aufstrich). Aufgetragen ist die Membranspannung ( $U_m$  [mV]) gegen die Zeit [ms]. In hellgrau sind die einzelnen AP-Phasen eingezeichnet.

Die Kardiomyozyten haben ein Ruhemembranpotential (RMP), welches je nach Zelltyp zwischen ca. -75 mV bis -90 mV liegt (Phase IV). Das RMP wird vor allem durch die Leitfähigkeit der Zellmembran für  $K^+$ -Ionen bestimmt. Aufgrund des physiologischerweise (durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase hergestellten) hohen intrazellulären Kaliums, diffundieren  $K^+$ -Ionen entlang des chemischen Konzentrationsgradienten aus dem Kardiomyozyten hinaus. Die  $K^+$ -Ionen diffundieren so lange entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle, bis der Ausstrom aufgrund der elektrischen Spannung sistiert. Dieser Zustand nennt sich Gleichgewichtspotential ( $E_K$ ) und lässt sich für die einzelnen Ionen anhand der Nernst-Gleichung berechnen. Für Kalium beträgt das Gleichgewichtspotential ca. -89 mV (Fozzard und Sheu 1982).



$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

**Formel 1: Nernst-Gleichung für Kalium.**

$E_K$  = Gleichgewichtspotential für Kalium, R = ideale Gaskonstante, T = Temperatur in Kelvin, z = Wertigkeit des Ions, F = Faraday-Konstante,  $[K]_o/[K]_i$  =  $K^+$ -Konzentration außen/innen.

Das RMP erreicht jedoch nie ganz  $E_K$ , da die Zellmembran auch eine geringe Permeabilität für andere Kationen besitzt. Die sogenannte Goldman-Gleichung bezieht mehrere Ionen in die Berechnung des Gleichgewichtspotentials mit ein und bietet daher eine bessere Berechnung des RMP.

Vom Ruhemembranpotential ausgehend (Phase IV, siehe Abbildung 1) findet eine Depolarisation der Zellmembran bis zum Schwellenwert statt. Dies kann beispielsweise durch eine, zur spontanen Depolarisation-befähigten, Zelle geschehen (sog. Schrittmacherzellen). Erreicht die Depolarisation einen gewissen Schwellenwert (ca. -70 mV), beginnt nach dem „alles oder nichts“-Gesetz die Depolarisationsphase mit dem sog. Aufstrich oder *overshoot* des AP (Phase 0). In dieser Phase kommt es zu einem steilen Anstieg der Membranspannung, wobei diese die Nulllinie überschreiten kann und bis zu einem Membranpotential von etwa +20 bis +40 mV führen kann (Potentialmaximum oder *peak*) (Nerbonne und Kass 2005). Im humanen adulten Herzen ist diese Depolarisationsphase durch die Aktivierung von spannungsabhängigen  $Na^+$ -Kanälen ( $Na_v$ -Kanälen), hauptsächlich  $Na_v1.5$ , bestimmt. Es kommt zu einem Einstrom von Natriumionen in Richtung des Natrium-Gleichgewichtspotentials  $E_{Na}$ , welches ca. +70 mV beträgt. Dieses wird jedoch nie vollständig erreicht, da durch die Depolarisation der Zelle der repolarisierende  $K^+$ -Ausstrom entlang seines wieder größer werdenden elektrochemischen Gradienten zunimmt, während der elektrochemische Gradient für  $Na^+$  gleichzeitig sinkt. Da die Natriumkanäle binnen weniger als 1 ms öffnen, werden diese auch als „schnelle Natriumkanäle“ bezeichnet und führen zu einem schnellen  $Na^+$ -Einstrom (*peak*  $I_{Na}$ ) ins Innere der Zelle. Durch die beginnende Depolarisation verstärkt sich der Effekt, indem sich weitere  $Na_v$ -Kanäle öffnen. Nach einigen Millisekunden inaktivieren die Kanäle jedoch und sind dann eine Zeit lang nicht mehr aktivierbar. Natriumkanäle besitzen also insgesamt drei Hauptzustände: den aktivierbaren und geschlossenen Zustand, den offenen Zustand und den geschlossenen und inaktiven Zustand, in dem der Kanal durch eine Inaktivierungsdomäne blockiert wird. Erst durch Hyperpolarisation wird der Natriumkanal wieder aktivierbar.

In der nun folgenden frühen Repolarisationsphase (Phase I) öffnen sich spannungssensitive Kaliumkanäle ( $K_v$ ), und es kommt zum  $K^+$ -Ausstrom aus der Zelle, vorwiegend bedingt durch den „transienten“  $K^+$ -Strom ( $I_{to}$ ). Der Schwellenwert zur Aktivierung der  $K_v$ -Kanäle ist in etwa mit dem der  $Na_v$  gleich, allerdings öffnen die  $K_v$  im Gegensatz zu den schnellen  $Na_v$ -Kanälen erst nach etwa 10 ms. Zusätzlich kommt es zu einem Auswärtsstrom von Chlorid ( $I_{Cl}$ ), wobei die  $Cl^-$ -Ionen in die Zelle hineinfließen, wegen der negativen Ladung jedoch einem Auswärtsstrom entsprechen.

Nach der frühen Repolarisationsphase (Phase I) kommt es jedoch oft zu einer je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägten Plateauphase (Phase II), in der das Membranpotential weitgehend konstant bleibt. Die Dauer und Morphologie dieser Phase ist je nach Herzregion und aktueller Herzfrequenz unterschiedlich und kann auch fehlen. Typischerweise ist das atriale Plateau weniger stark ausgeprägt als das ventrikuläre. Die Plateauphase wird dadurch bedingt, dass die zuvor genannten repolarisierenden Ströme der Zelle durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom ( $I_{CaL}$ ) in die Zelle durch spannungsabhängige L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (sog. Dihydropyridin-Rezeptoren = DHPR) entlang des elektrochemischen Gradienten ausgeglichen wird. Sekundär, getriggert durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom, kommt es zu einer weiteren  $Ca^{2+}$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speicherorganellen, dem sarko-endoplasmatischen Retikulum (SER) (Bassani et al. 1993; Delbridge et al. 1996; Delbridge et al. 1997). Die Grundlage dieser Freisetzung (Fabiato 1983, 1985) ist einerseits die enge räumliche Beziehung zwischen L-Typ-Kalziumkanälen, den Ryanodinrezeptoren (RyR2) und dem SER und andererseits die spezifische Bindung von  $Ca^{2+}$  an die Ryanodinrezeptoren (Bers und Guo 2005; Zalk et al. 2007). Sofern eine Plateauphase vorliegt, ist der folgende starke  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsanstieg die Voraussetzung für die Aktivierung der Myofilamente und die Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten und somit der Kontraktion der Herzmuskelzellen. Dieser Vorgang, von der elektrischen Erregung des Herzens bis hin zur mechanischen Kontraktion der Herzmuskelzellen, nennt sich elektromechanische Kopplung (Bers 2002).

Im Anschluss an die Plateauphase setzt die späte Repolarisationsphase (Phase III) ein. Diese ist bedingt durch die Abnahme/Inaktivierung des L-Typ- $Ca^{2+}$ -Stroms und Zunahme des repolarisierenden Stroms. Dieser setzt sich aus verschiedenen

Strömen zusammen, unter anderem dem  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter ( $I_{Kr}$ ). Das Membranpotential strebt wieder dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotential entgegen (-90 mV). Sobald die Repolarisation das Ruhemembranpotential erreicht (RMP, Phase IV) inaktivieren die  $K_v$ -Kanäle wieder. Im Anschluss an ein AP werden, durch die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase, des  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers (NCX) und der  $Ca^{2+}$ -ATPase des SER die Ionengradienten zwischen Zytosol und Extrazellulärraum wiederhergestellt (Bers 2002).

### 1.1.1.2 Effektive Refraktärzeit

Nach Ablauf eines APs gibt es eine Phase, in der kein neues AP ausgelöst werden kann. Diese Zeit nennt sich effektive Refraktärzeit (ERZ). Die Dauer der ERZ entspricht ungefähr der Zeit, in der sich die  $Na_v$ -Kanäle im geschlossenen und inaktiven Zustand befinden und durch die Inaktivierungsdomäne blockiert werden. Dies nennt sich auch absolute Refraktärzeit. In der absoluten Refraktärzeit kann auch durch einen sehr starken Stimulus kein neues AP ausgelöst werden. Erst durch Hyperpolarisation wird der  $Na_v$ -Kanal wieder aktivierbar und das Myokard dadurch erregbar. Auf die absolute Refraktärzeit folgt eine sogenannte relative Refraktärzeit, die der Phase der Hyperpolarisation, durch Öffnung der spannungssensitiven Kaliumkanäle ( $K_v$ ), entspricht. In dieser Phase ist die Zelle nur durch einen starken Stimulus erregbar. Die relative Refraktärzeit endet mit dem Erreichen des Ruhemembranpotentials.

Die ERZ hat eine Schutzfunktion, da sie die vorzeitige Erregung des Myokards und dadurch die Bildung von Arrhythmien beispielsweise durch *re-entry* einer Erregungswelle verhindern kann. Bei VHF ist die ERZ im Atrium häufig verkürzt (Attuel et al. 1982; Boutjdir et al. 1986; Daoud et al. 1996; Franz et al. 1997), was sich „elektrisches *remodeling*“ nennt. Antiarrhythmische Medikamente nutzen oft die Verlängerung der atrialen ERZ als pharmakologischen Ansatz. Die gleichzeitige pharmakologische Verlängerung der ventrikulären ERZ wiederum kann problematisch sein, da diese ventrikuläre Arrhythmien (wie z.B. Torsade-de-Pointes Tachykardien) induzieren kann (Vincent et al. 1999).

### 1.1.1.3 Unterschiedliche Verlaufsformen von Aktionspotentialen

Im Sinusknoten werden spontane AP gebildet. Diese entstehen dadurch, dass hier kein stabiles RMP herrscht (einen Einwärtsgleichrichterstrom ( $I_K$ ) und den schnellen Natriumstrom ( $I_{Na}$ ) gibt es hier nicht). Ihr maximales negatives Potential liegt bei etwa -60 mV, und sie beginnen mit einer spontanen Depolarisation. Den Beginn der Depolarisationsphase trägt hauptsächlich ein  $Na^+$  getragener Schrittmacherstrom ( $I_f$ ) durch HCN-Kanäle („*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated*“ – „durch Hyperpolarisation aktiviert und zyklische Nukleotide gesteuert“). Außerdem zeigten neuere Studien, dass auch intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen aus dem SER zur spontanen Depolarisation und somit zur Rhythmogenese beitragen (Maltsev und Lakatta 2008). Ab ca. -40 mV werden L-Typ-Calciumkanäle geöffnet, und die Depolarisation geht weiter bis zu einem Höchstwert von ca. +20 mV. Der verzögert einwärtsgleichrichtende Kaliumstrom ( $I_{K1}$ ) leitet eine langsame Repolarisation ein. Es gibt hier keine Plateauphase. Wenn der  $I_{K1}$  nach und nach bei zunehmend negativeren Potentialen deaktiviert, beginnt die spontane Depolarisation von neuem. So entsteht eine Taktgeberfrequenz von ca. 60-80/min.

$I_f$  wird dabei durch adrenerge Stimulation gesteigert, was zu einer schnelleren Depolarisation führt und durch cholinerge Stimulation gebremst.

Die Schrittmacherzellen des AV-Knotens haben ganz ähnliche Eigenschaften wie die des Sinusknotens. Auch sie können durch den Sympathikus und den N. vagus stimuliert und gebremst werden. Ihre Eigenfrequenz liegt bei 40-50/min.

Die Zellen des ventrikulären Erregungsleitungssystems ähneln denen des Arbeitsmyokards. Allerdings sind auch sie zu einem Schrittmacherstrom, mit einer Taktgebefrequenz von 30-40/min, fähig.

Vorhofarbeitsmyokard repolarisiert deutlich schneller als Ventrikelarbeitsmyokard. Dies ist durch eine unterschiedliche  $K^+$ -Kanalexpression bedingt, die in Vorhofzellen zu einer schnelleren Repolarisation und damit zu einer kürzeren Aktionspotentialdauer (APD) und auch zu einer kürzeren ERZ führt (Bers 2002; Nerbonne und Kass 2005).

Auch die Natriumkanalverteilung zeigt deutliche Unterschiede zwischen Atrium und Ventrikel. Die Dichte des schnellen  $I_{Na}$  ist in atrialen Myozyten größer als in ventrikulären Myozyten. Allerdings weisen die Natriumkanäle im Atrium eine negativere wiederkehrende Inaktivierungsspannung (*steady state inactivation voltage*) auf (Burashnikov et al. 2007) und das RMP im Atrium ist typischerweise weniger

negativ als im Ventrikel. Daher ist die Menge an verfügbarem Strom im Atrium und Ventrikel ungefähr identisch (Burashnikov und Antzelevitch 2013).

In den Purkinje-Fasern wiederum sind die AP besonders lang mit einem stabilen Plateau, sodass sie als eine Art „Frequenzfilter“ auf die Erregungsübertragung auf das ventrikuläre Arbeitsmyokard wirken. Im Arbeitsmyokard der Ventrikel gibt es wiederum nicht unerhebliche Unterschiede bezüglich der APD. Subendokardial ist die APD teilweise doppelt so lang wie subepikardial.

## **1.2 Arrhythmogenese**

Die Entstehung von bradykarden oder tachykarden Herzrhythmusstörungen bezeichnet man als Arrhythmogenese. Bei VHF handelt es sich um eine tachykarde Herzrhythmusstörung, daher sollen sich die folgenden Erläuterungen hierauf beziehen. Herzrhythmusstörungen können grob eingeteilt durch zwei Mechanismen entstehen. Einerseits durch eine abnormale Erregungsbildung, andererseits durch eine abnormale Erregungsweiterleitung. Beide Mechanismen können zu VHF führen, dessen ungerichtete Erregung wiederum dafür sorgt, dass die geordnete Vorhofkontraktion verloren geht. Hierdurch entsteht die Gefahr einer verschlechterten Herzfunktion, die Möglichkeit einer Thrombenbildung im Vorhof und dadurch die Gefahr eines thromboembolischen Geschehens mit der Folge eines Schlaganfalles (Wolf et al. 1991).

Die genannten Mechanismen sollen im Folgenden näher erläutert werden. Unter abnormaler Erregungsbildung versteht man beispielsweise einen ektopen Erregungsfokus mit abnormaler Automatizität oder aber getriggerte Aktivität, die durch ein instabiles oszillierendes Zellmembranpotential gebildet wird und somit die Ausbildung neuer Aktionspotentiale verursachen kann.

Auf der Seite der gestörten Erregungsweiterleitung können beispielweise Narbengewebe, Fehlfunktionen der Gap junctions, oder der Ionenkanäle (mit konsekutiver lokaler Veränderung des Ruhemembranpotentials oder der APD) zu einer fehlerhaften Reizweiterleitung und einer Leitungsverzögerung führen (Weiss et al. 2005). Wenn nun also eine Erregungswelle auf ein solches Hindernis stößt, kann die Erregung retrograd umgeleitet werden und dort wieder auf erregbares Gewebe stoßen und so eine *Reentry*- oder Rotoren-Bewegung auslösen. Die Erregung kann nun so lange kreisen, wie erregbares Myokard vorhanden ist oder die gestörte

Reizweiterleitung unterbrochen wird (beispielweise medikamentös oder durch Kardioversion).

Diese beiden Hauptmechanismen lassen sich nun weiter auf die Erkrankung VHF spezifizieren.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass VHF einzig durch den Wiedereintritt (*reentry*) einer generalisierten Erregungswellenfront in den Vorhof verursacht würde (Schotten et al. 2011). Durch weitere Forschung über mehrere Jahrzehnte wurden dann drei klassische Haupttheorien bezüglich der Ursache von VHF entwickelt.

Einerseits bewährte sich die Idee eines ektopen Fokus mit hoher Spontanaktivität. Hierbei waren sowohl ein einziger Fokus oder multiple simultan-entladende Foki denkbar (Schotten et al. 2011). Im Jahre 1998 wurde in einer umstrittenen Arbeit der Arbeitsgruppe um Haissaguerre festgestellt, dass es rund um die Pulmonalvenen von 45 Patient\*innen zu einem oder mehreren fokalen ektopen Schrittmachern kommen kann (Haissaguerre et al. 1998; Schotten et al. 2011). Die Idee von spontan aktiven Schrittmacherarealen rund um die Pulmonalvenen ist zwar eine umstrittene Theorie, allerdings könnten die ektopen Foki auch in Zellen entstehen, die durch jede Art von Strom depolarisiert werden, der den Schwellenwert für ein AP erreicht. Sie würden so möglicherweise nicht selbst den depolarisierenden Strom generieren, würden aber beispielsweise, insbesondere  $Ca^{2+}$  getragen, zur Bildung von AP angeregt werden.

Die zweite klassische Theorie zur Ursache von VHF ist die o.g. lokalisierte schnell kreisende Erregung, die durch eine zum Teil verzögerte Ausbreitung auf bereits nicht mehr refraktäres Myokard treffen kann (Nattel und Dobrev 2017).

Die dritte Theorie ist das Vorhandensein von multiplen simultanen instabilen kreisenden Erregungswellen im Vorhof (Nattel und Dobrev 2017).

In den letzten zehn bis 15 Jahren wurden diese klassischen Ideen weiter erforscht und durch drei neue experimentelle Theorien nicht unbedingt ersetzt, sondern eher ergänzt (Nattel und Dobrev 2017). Eine erste prospektive Studie an 92 Patient\*innen zeigte, dass mutmaßlich mehrere kleine, in ihrer Position mehr oder weniger fixierte, Minuten bis Stunden anhaltende, Rotoren VHF unterhalten können (Narayan et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe observierte bei 518 Patient\*innen mittels non-invasiven MRT-Kartierungen ebenfalls Rotoren als Ursache für VHF, allerdings von eher instabilem und schwindendem Verhalten, mit einer Tendenz sich an

Fibrosezonen anzuheufen (Haissaguerre et al. 2016). Zuletzt zeigten endo- und epikardiale Messungen einer dritten Arbeit an einem Patienten mit permanentem VHF, dass eine transmurale, in drei Dimensionen raumzeitlich asynchrone Fortleitung von Flimmerwellen, VHF unterhalten kann, und erklärt somit weshalb Katheterablation teilweise nicht erfolgreich sein kann (van der Does et al. 2016).

Möglicherweise ist die Ursache auch innerhalb der einzelnen Patient\*innengruppen unterschiedlich. Die oben genannten bisherigen Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass die Katheterablation nicht bei allen Patient\*innen wirksam sein kann, so dass die medikamentöse antiarrhythmische Therapie weiterhin einen hohen Stellenwert besitzt.

In den letzten Jahren wurde auch der Begriff „atriale Kardio(myo)pathie“ zunehmend gebraucht. Eine Definition der Arbeitsgruppe um Goette et al. besagt, es sei „jeder das Atrium betreffende Komplex aus strukturellen, architektonischen, kontraktile oder elektrophysiologischen Veränderungen, der das Potential hat, klinisch-relevante Manifestationen zu produzieren“ (Goette et al. 2016). Der Begriff impliziert multiple zugrundeliegende pathophysiologische Prozesse und einen klinischen Progress der Erkrankung (Nattel und Dobrev 2017). Vermutlich sind bereits bei der ersten klinischen Manifestation von VHF viele dieser pathophysiologischen Vorgänge abgelaufen und entwickeln sich im Verlauf der Krankheit weiter (Nattel und Dobrev 2017). Daher scheint es umso wichtiger VHF so früh wie möglich zu unterbrechen, um es langfristig erfolgreich behandeln zu können (Goette et al. 2016).

So vielfältig die Risikofaktoren sind, die VHF begünstigen, so teilweise unübersichtlich zeigen sich die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen. Es bedarf sicherlich noch weiterer Forschung, um diese Krankheit besser zu verstehen und so immer bessere Therapieansätze zu entwickeln. Wahrscheinlich wird sich zeigen, dass es wohl keine allgemeingültige Pathophysiologie und somit keine immer gleiche Therapie geben kann.

### **1.2.1 Zelluläre proarrhythmogene Mechanismen**

Die zuvor genannten Mechanismen der Arrhythmogenese beziehen sich auf elektrophysiologische Untersuchungen am Herzen. Es konnte jedoch gezeigt werden,

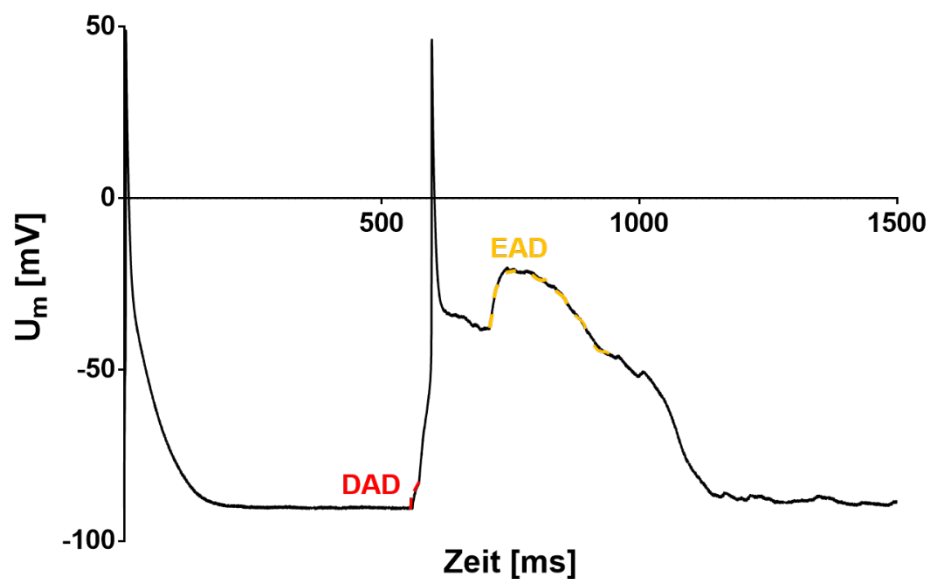
dass gerade fokale Arrhythmien ihren Ursprung größtenteils auf zellulärer Ebene haben (Pogwizd 1995, 1998).

Einerseits kann eine erhöhte Automtizität auftreten, wenn Zellen mit Schrittmacheraktivität plötzlich mit höherer Rate entladen (Schotten et al. 2011). Dies könnte zum Beispiel durch einen niedrigeren Grenzwert für den AP-Aufstrich oder ein weniger negatives RMP aufrechterhalten werden (Schotten et al. 2011). Wie bereits erwähnt, ist das Vorhandensein von Schrittmacherzellen im Umkreis der Pulmonalvenen oder an anderen Stellen des Atriums jedoch umstritten (Schotten et al. 2011).

Ein zweiter zellulärer Mechanismus ist eine abnormale Automtizität. Hier wird der Schwellenwert für den Aufstrich eines APs durch eine Art depolarisierenden Strom erreicht (Ferrier et al. 1985). Oft ist der Grad der Depolarisation nicht ausreichend für eine komplette Erholung der Na<sup>+</sup>-Kanäle, weshalb der AP-Aufstrich dann oft Ca<sup>2+</sup>-getragen ist (Schotten et al. 2011). Ein möglicher Behandlungsansatz dieser Art von Automtizität wäre eine Verschiebung des RMP zu negativeren Werten (Rosen et al. 1983; Schotten et al. 2011).

Des Weiteren sind getriggerte Aktivitäten zu nennen. Hier ist die Repolarisation des Myozyten gestört, sodass es am Ende oder nach Ablauf eines APs zu spontanen Schwankungen des Membranpotentials, sogenannten Oszillationen, kommen kann (Schotten et al. 2011; Voigt et al. 2014). Vor Ende der vollständigen Repolarisation nennt man diese Schwankungen „*early afterdepolarisations*“ (EADs) für „frühe Nachdepolarisationen“. Nach Ablauf einer kompletten Repolarisation nennt man sie „*delayed afterdepolarisations*“ (DADs) für „verspätete Nachdepolarisationen“ (Schotten et al. 2011; Voigt et al. 2014). Durch diese Schwankungen kann in der betroffenen Zelle oder in einer benachbarten Zelle bei Erreichen des Schwellenwertes ein neues AP entstehen (Schotten et al. 2011; Voigt et al. 2014). Das vorangegangene AP ist in diesem Fall der sogenannte „*trigger*“ für die Oszillationen. Da getriggerte Aktivität vermutlich eine wichtige Ursache für VHF ist (Voigt et al. 2014) soll im Folgenden weiter auf die zugrundeliegenden Mechanismen eingegangen werden.





**Abbildung 2: Fröhe (EAD) und späte (DAD) Nachdepolarisationen.**

Eigene AP-Messung an einem humanen atrialen Kardiomyozyten mit Aufzeichnung einer spontanen DAD, welche zu einem getriggerten neuen AP und einer EAD führte.

### 1.2.1.1 Späte Nachdepolarisationen (DADs)

DADs treten vor allem bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung eines Myozyten auf (wie Ischämie, niedriges extrazelluläres Kalium, Tachykardien und  $\beta$ -adrenerge Stimulation) (Katra und Laurita 2005). Die Calciumüberladung der Zelle löst eine weitere intrazelluläre Calciumfreisetzung aus dem SER aus, was zu zytosolischen Calcium-Oszillationen führen kann (Capogrossi et al. 1987; Fischer et al. 2015; Sag et al. 2014; Toischer et al. 2013) und gerade bei Patient\*innen mit VHF eine besondere Bedeutung hat. Studien zeigten hier, dass Patient\*innen mit VHF ein vergrößertes diastolisches Leck des endoplasmatischen Retikulums für  $\text{Ca}^{2+}$  haben (Voigt et al. 2014; Voigt et al. 2012). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und die Oszillationen wiederum verursachen auf unterschiedliche Weise einen vorübergehenden depolarisierenden Einwärtsstrom in die Zelle (*transient inward current*)  $I_{\text{TI}}$ . Dieser besteht zu einem kleineren Anteil aus einem  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerten  $\text{Cl}^-$  Auswärtsstrom. Durch den Auswärtsstrom negativer Ladung in Form von  $\text{Cl}^-$ -Ionen entsteht so eine Depolarisation (Zygmunt 1994; Zygmunt et al. 1998). Ein weiterer kleiner Anteil des  $I_{\text{TI}}$  besteht aus einem unselektiven Kationeneinstrom (Guinamard et al. 2004). Der Großteil des  $I_{\text{TI}}$  entsteht jedoch dadurch, dass die intrazelluläre Calciumüberladung und die Oszillationen den sogenannten vorwärts-Modus des NCX aktivieren (Fedida et al. 1987; Schlotthauer

---

und Bers 2000). Über den vorwärts-Modus des NCX wird das überschüssige  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle transportiert, während im Austausch  $\text{Na}^+$  in die Zelle gelangt (1  $\text{Ca}^{2+}$  raus, 3  $\text{Na}^+$  rein) (Reeves und Hale 1984). Hierdurch entsteht netto ein depolarisierender Einwärtsstrom. Zudem wurde festgestellt, dass die NCX-Aktivität bei humanem VHF erhöht ist (Voigt et al. 2012). Dadurch verstärkt sich der  $I_{\text{Ti}}$ , der wiederum der zugrunde liegende Strom eines DADs ist (Fedida et al. 1987; Kass et al. 1978; Lederer und Tsien 1976; Schotten et al. 2011; Voigt et al. 2012).

### 1.2.1.2 Frühe Nachdepolarisationen (EADs)

EADs treten in Phase II oder III eines APs auf und werden durch eine verlängerte Plateauphase, mit Reaktivierung von  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanälen verursacht (January und Riddle 1989; Schotten et al. 2011; Voigt et al. 2014). Wenn der eintretende Strom während der Plateauphase die repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ströme überschreitet, kann ein EAD auftreten. Eine verlängerte Plateauphase entsteht häufig bei einer verlängerten APD, beispielsweise durch einen erhöhten späten Natriumstrom (*late*  $I_{\text{Na}}$ ) (Coraboeuf et al. 1979; Fischer et al. 2015; Kiyosue und Arita 1989; Toischer et al. 2013), worauf später noch genauer eingegangen werden soll. Auch eine verstärkte vorwärts-Aktivität des NCX erleichtert die Formation von EADs (Armoundas et al. 2003; Volders et al. 2000). Ganz allgemein gesehen treten EADs eher bei bradykarden Konditionen auf, während DADs eher bei Tachykardien auftreten (Schotten et al. 2011). Allerdings wird auch davon ausgegangen, dass getriggerte Aktivitäten, hervorgerufen durch EADs nahe der – und in den – Pulmonalvenen, eine signifikante Rolle in der Entstehung von VHF spielen (Patterson et al. 2005).

### 1.2.2 Später Natriumstrom

Nachdem nun die generellen zellulären Mechanismen der Proarrhythmogenität erläutert wurden, soll nun auf den späten Natriumstrom (*late*  $I_{\text{Na}}$ ) eingegangen werden, der im Zusammenhang mit VHF ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Ein kleiner Anteil der kardialen  $\text{Na}_v$ -Kanäle zeigt eine alternative Leitfähigkeit und verursacht den sogenannten *late*  $I_{\text{Na}}$  (Maltsev und Undrovinas 2006). Bei Experimenten an Purkinje-Fasern von Hundeherzen wurde festgestellt, dass Tetrodotoxin (TTX) im nanomolaren Bereich die APD verkürzt (Coraboeuf et al. 1979). Dies führte zu der Erkenntnis, dass ein positiver einwärtsgerichteter  $\text{Na}^+$ -Strom

---

existieren muss, der im Gegensatz zum *peak*  $I_{Na}$ , sehr empfindlich auf TTX reagiert. Außerdem wurde gezeigt, dass dieser Strom nicht den bekannten Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen des *peak*  $I_{Na}$  unterliegt. Im Gegensatz zum *peak*  $I_{Na}$  besteht der *late*  $I_{Na}$  aus einer langsam inaktivierenden Komponente des Natriumstroms. Dies führt zu einem langsamen Natriumeinstrom in die Zelle über Millisekunden, oft sogar fast über die gesamte APD. Unter pathologischen Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie, Hypertrophie, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz kann der *late*  $I_{Na}$  erhöht sein (Coppini et al. 2013; Huang et al. 2001; Ju et al. 1996; Makielski und Farley 2006; Poulet et al. 2015; Sossalla et al. 2010; Toischer et al. 2013; Undrovinas et al. 1992; Valdivia et al. 2005; Ward und Giles 1997; Wu und Corr 1994) und somit im Integral sogar den *peak*  $I_{Na}$  übersteigen (Sossalla und Maier 2012). In Ventrikelzellen führt dies zu einer Depolarisation und einer Verlängerung der ventrikulären APD (Kiyosue und Arita 1989; Song et al. 2004). Bei VHF wurde ebenfalls eine Erhöhung des *late*  $I_{Na}$  festgestellt (Burashnikov und Antzelevitch 2013; Sossalla et al. 2010). Im Zusammenhang mit den o.g. zellulären proarrhythmogenen Mechanismen führt der *late*  $I_{Na}$  durch die Persistenz während des gesamten Plateaus des APs zu einer Überladung der Zelle mit Natrium (Makielski und Farley 2006; Maltsev et al. 2007; Song et al. 2006). Bei erhöhtem intrazellulärem Natrium kann sich der o.g. NCX in den sogenannten rückwärts-Modus umkehren (Leblanc und Hume 1990). Hierbei kommt es dann zum  $Na^+$ -Ausstrom und  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und dadurch zu einer Calciumüberladung der Zelle (Noble und Noble 2006). Zudem werden durch die verlängerte Plateaudauer die lange zuvor inaktivierten Calcium-Kanäle wieder reaktiviert, was wiederum ebenfalls zur Calciumüberladung der Zelle und somit zu Calcium-induzierten Calciumfreisetzung und zu Arrhythmien beitragen kann (Sipido et al. 1995). In Kohärenz zu dem o.g. konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter *late*  $I_{Na}$  im Atrium zu fortlaufenden EADs, DADs und anhaltender getriggelter Aktivität führen kann (Nattel 2003; Song et al. 2008; Wit 2018).

Angesichts der Tatsache, dass der *late*  $I_{Na}$  bei so vielen kardialen Pathologien eine Rolle spielt, scheint eine therapeutische Hemmung desselben sinnvoll (Antzelevitch und Burashnikov 2009; Burashnikov und Antzelevitch 2011; Burashnikov et al. 2010; Maier und Sossalla 2013; Moreno und Clancy 2012; Verrier et al. 2013).

---

## 1.3 Innovative Antiarrhythmika

### 1.3.1 Ranolazin

Der Einsatz von Ranolazin (N-(2,6-Dimethylphenyl)-4(2-Hydroxy-3-[2methoxyphenoxy]-propyl)-1-piperazinacetamidhydrochlorid) ist seit Januar 2006 in den USA sowie seit März 2009 auch in Deutschland als antianginöses Medikament zugelassen. Ranolazin ist ein Multikanalblocker und hemmt eine Reihe von verschiedenen Ionenkanälen, darunter *peak* und *late*  $I_{Na}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Na-Ca}$  (Antzelevitch et al. 2004). Ranolazin hemmt selektiv den atrialen *peak*  $I_{Na}$  (Burashnikov et al. 2007; Sossalla et al. 2010). Zudem weiß man, dass Ranolazin in klinisch relevanten Plasmakonzentrationen von 2 bis 8  $\mu$ M den *late*  $I_{Na}$  38-mal stärker hemmt als den *peak*  $I_{Na}$  (Undrovins et al. 2006). Dies reduziert die intrazelluläre  $Na^+$ -Akkumulation und verhindert dadurch die  $Na^+$ -abhängige  $Ca^{2+}$ -Überladung von Myozyten (Sossalla und Maier 2012; Sossalla et al. 2008). Zudem vermindert Ranolazin den Umkehrmodus des NCX und dadurch eine diastolische Ansammlung von  $Ca^{2+}$  (Fraser et al. 2006; Song et al. 2006; Sossalla et al. 2008). Diese Reduktion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Überladung verbessert die myokardiale Relaxation und folglich die diastolische linksventrikuläre Steifigkeit (Hwang et al. 2009; Rastogi et al. 2008; Sossalla et al. 2008).

Zudem zeigte sich eine antiarrhythmische Wirkung von Ranolazin, sowohl im Atrium als auch im Ventrikel (Sossalla und Maier 2012).

Es wurde zunächst vermutet, dass die bei VHF typischerweise ohnehin verkürzte APD im Atrium durch Ranolazin noch weiter verkürzt würde (Schotten et al. 2010), allerdings wirkt Ranolazin nicht nur auf den *late*  $I_{Na}$  sondern auch auf den  $I_{Kr}$ , weshalb eine Arbeitsgruppe an Kardiomyozyten von Hunden bereits eine leichte Verlängerung der APD im Atrium beobachtet hat, während die APD im Ventrikel unverändert blieb (Burashnikov et al. 2007; Burashnikov et al. 2010).

### 1.3.2 Dronedaron

Dronedaron Hydrochlorid, ein Benzofuranderivat (N-[2-Butyl-3-[4-(3-dibutylaminopropoxy)benzoyl]benzofuran-5-yl]methanesulfonamide hydrochloride) wurde gezielt als Nachfolgesubstanz von Amiodaron entwickelt. Es ist ein nichtionisiertes Derivat von Amiodaron, welches weniger extrakardiale Nebenwirkungen als Amiodaron vorweist. Eine zusätzliche Methan-Sulfonyl-Gruppe

---

sollte für eine geringere Lipophilie und dadurch zu einer geringeren Halbwertszeit und Organtoxizität führen (Lewalter et al. 2010). Die Entfernung der Jodkomponente sollte die Schilddrüsentoxizität verhindern (Lewalter et al. 2010).

Dronedaron blockiert multiple Ionenkanäle und zeigt daher antiarrhythmische Charakteristika aller vier Vaughan-Williams-Klassen. An ventrikulären Myozyten von Ratten zeigte es eine signifikante Hemmung des repolarisierenden Kaliumstromes ( $I_{Kr}$ ) und daher eine Verlängerung des AP, nicht jedoch bei bereits verlängertem AP nach Infarkt (Aimond et al. 2000). Dies zeigte sich ähnlich in einer Studie an Purkinjefasern von Hunden (Varro et al. 2001). Außerdem fand sich hier eine Hemmung des  $I_{Ca,L}$  (Varro et al. 2001). Andere Studien an ventrikulärem Papillarmuskel von Meerschweinchen zeigten eine Hemmung von  $I_{Ca,L}$  (belastungs- und frequenzabhängig),  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$  (Gautier et al. 2003). An Vorhofzellen von Kaninchen und Meerschweinchen wurde eine Inhibierung des  $I_{K,Ach}$  festgestellt (Altomare et al. 2000; Guillemare et al. 2000). Außerdem wurde an menschlichen Vorhofmyozyten eine Hemmung des *peak* und *late*  $I_{Na}$  festgestellt, die sogar stärker ist als die von Amiodaron (Lalevee et al. 2003). Dronedaron zeigte in der klinischen Standarddosierung (zweimal täglich 400 mg) in einer großen klinischen, randomisierten und kontrollierten Studie (ATHENA-Studie) bei Patient\*innen mit paroxysmalem oder persistierendem VHF eine signifikante Reduktion kardiovaskulär bedingter Todesfälle und Klinikaufnahmen (Hohnloser et al. 2009). Bei Patient\*innen mit permanentem VHF hingegen, kam es zu einer Zunahme von kardiovaskulären Todesfällen sowie einer Zunahme von Herzinsuffizienzfällen (Connolly et al. 2011; Doggrell und Hancox 2012). Dronedaron ist daher in der üblichen Standarddosierung nicht für Patient\*innen mit permanentem VHF oder einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz geeignet.

### 1.3.3 Kombination aus Ranolazin und Dronedaron

Ein diskutierter neuer Therapieansatz ist die Kombinationstherapie von Ranolazin und besonders niedrig dosiertem Dronedaron, welches durch die niedrige Dosierung weniger Nebenwirkungen verursacht. Von der Kombinationstherapie erhofft man sich eine Potenzierung der antiarrhythmischen Effekte der jeweiligen Substanzen, die zusätzlich vorhofspezifisch ist und geringere Nebenwirkungen hat als eine Therapie mit Amiodaron oder Dronedaron in Standarddosierung (Burashnikov et al. 2010).

Tatsächlich zeigte eine, 2014 auf dem Heart Rhythm Congress präsentierte randomisierte und kontrollierte klinische Phase II Studie (*HARMONY*-Studie), eine starke Reduktion der Vorhofflimmerlast bei Patient\*innen mit paroxysmalem VHF bei der Kombination beider Substanzen (Reiffel et al. 2015a).

#### **1.4 Ziele und Fragestellungen**

Ziel der vorgestellten Arbeit ist es, einen Beitrag zur Erforschung neuer Therapieformen des VHF, zu leisten. Gerade die medikamentöse Therapie ist noch unzureichend und nebenwirkungsträchtig. Im Speziellen soll diese Arbeit die Auswirkungen der komplexen Kanalinhibition von Ranolazin, Dronedaron sowie deren Kombination mittels der Patch-Clamp-Methode an humanen Kardiomyozyten des rechten und linken Atriums untersuchen. Schwerpunktmäßig soll vor allem der Effekt der Medikamente auf die APD und auf das RMP analysiert werden. Vergleichend wird auch der Effekt auf humane ventrikuläre Kardiomyozyten von Patient\*innen mit Herzversagen im Endstadium untersucht, an denen bisher noch keinerlei Untersuchungen mit Ranolazin durchgeführt wurden.

Ferner soll erforscht werden, ob sich die Effekte der Substanzen auf die Ionenkanäle des Ventrikels von denen des Atriums unterscheiden. Hintergrund ist auch, eine mögliche ventrikuläre Proarrhythmogenität zu erkennen und zu evaluieren, die bei einigen Therapieansätzen mit anti-arrhythmischen Medikamenten therapielimitierend sein kann.

Somit soll insgesamt der, bereits klinisch vielversprechende Therapieansatz von VHF, durch die Kombination von Ranolazin und Dronedaron besser untersucht und verstanden werden. Hierdurch wird sich eine bessere Einschätzung des Wirkungsprofils und des Sicherheitsprofils beider Medikamente erhofft. Es wird gehofft einen Beitrag zur besseren Behandlung des VHF leisten zu können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probengewinnung von humanen atrialen**

#### **Kardiomyozyten**

Das Arbeiten mit humanem atrialen Myokard wurde durch eine Kooperation mit der Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen ermöglicht. Hierfür lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (Antragsnummer 14/9/11 für linksatriales Gewebe und Antragsnummer 21/10/00 für rechtsatriale Proben). Die Studie ist konform mit der WMA Deklaration von Helsinki. Vor Einschluss in die Studie wurde von allen Teilnehmenden eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Die Myokardstücke stammten von Patient\*innen, die sich einer Herzklappen- oder Herzbybypassoperation unterzogen. Bei Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine war es meist nötig, ein kleines Stück des rechten Herzohres abzuschneiden, welches dann für die Humanzellisolation verwendet werden konnte. Bei einigen Patient\*innen mit permanentem Vorhofflimmern wurde außerdem das linke Herzohr chirurgisch entfernt, um einer Thrombusbildung vorzubeugen. Auch das linke Herzohr konnte dann zur Zellisolation benutzt werden.

Das humane Gewebe wurde durch die Operierenden direkt in auf 4°C gekühlte kardioplegische Custodiol®-Lösung (CH.-B. 0933411, Dr. Franz Höhler Chemie GmbH) gegeben. Danach wurde das Gewebe so schnell wie möglich ins Labor transportiert und einzelne Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband isoliert.

## 2.2 Isolation humaner atrialer Kardiomyozyten

### 2.2.1 Material und Geräte

Tabelle 1: Material und Geräte zur Kardiomyozytenisolation

Material oder Gerät	Typ	Firma
Isolationsgefäß	F3-CH; 25 ml; vom Wasserbad erwärmbar	Haake Circulator
2 Bechergläser	100 ml	
Trichter	Ø 7 cm	
Objekträger		
2 Krokodilklemmen		
Magnetrührstäbchen		
2 Nylonsiebe	250-300 µm 7,5 x 5,5 cm und 7 x 8,5 cm (#510-9527)	VWR-Germany
Schere	12 cm, spitz, gerade (# 14068-12)	FST (Fine Science Tools)
Pinzette	spitz, gebogen (# 11274-20)	FST (Fine Science Tools)
Pinzette	stumpf, gebogen, gezahnt (# 11009-13)	FST (Fine Science Tools)
2 Messbecher	2 L und 1 L	
Plastikpasteurpipetten		
Wägeschälchen		
Falkonröhrchen	50 ml	



## 2.2.2 Lösungen

**Tabelle 2: Ca<sup>2+</sup>-freie Isolationslösung**

Ca <sup>2+</sup> -freie Isolationslösung	Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Gebrauchslösung [mM]	<i>gelöst in Aqua bidest; 5x-Stock ohne Glucose ansetzen, steril filtrieren und bei 4°C lagern;  für die 1x-Tyrode jeden Tag frisch Glucose zugeben und pH 7,0 mit NaOH bei 22°C einstellen</i>
	KCl	74,55	10	
	NaCl	58,44	100	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	1,2	
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	246,47	5	
	Taurin	125,15	50	
	MOPS	209,26	5	
	Glucose (erst zur 1x-Lösung zugeben)	180,16	20	

**Tabelle 3: Enzymlösungen Vorhofisolation**

Enzyme	Substanz	Konzentration [units/mg]	Abgewogene Menge/ Isolation [g]	<u>Enzymlösung 1:</u>
	Collagenase Typ I (Worthington)	370	0,0154	<i>Collagenase Typ I und Protease in 20 ml Ca<sup>2+</sup>-freier-1x-Tyrode kurz vor der Präparation lösen (37°C)</i>
	Protease XXIV (Sigma Aldrich)	7,0-14,0	0,0080	<u>Enzymlösung 2:</u> <i>Collagenase Typ I in 20 ml Ca<sup>2+</sup>-freier-1x-Tyrode kurz vor der Präparation lösen (37°C)</i>

**Tabelle 4: Feng-Medium**

Feng-Medium	Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Gebrauchslösung [mM]	<i>gelöst in Aqua bideist;  pH 7,4 bei 22°C mit 25% KOH einstellen;  sterilfiltrieren; in 25 ml Aliquots bei 4°C aufbewahren</i>
	KCl	74,55	20	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	10	
	D-Glucose	180,16	10	
	L-Glutaminsäure	147,13	70	
	DL-β-Hydroxybutyric acid sodium salt	126,09	10	
	Taurin	125,15	10	
	Albumin	66 kDa	1%	
	EGTA	380,35	10	

### 2.2.3 Isolationsprotokoll

Die allgemein gebräuchliche Technik zur Gewinnung humaner atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten für Patch-Clamp-Versuche besteht aus einem enzymatischen Verdau der Extrazellulärmatrix. Das Isolationsprotokoll der vorliegenden Arbeit für humanes atriales Gewebe war eine, für unsere Zwecke modifizierte Version der Methode der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Niels Voigt (Voigt et al. 2013), welche in unserem Labor neu etabliert und angepasst wurde.

#### 2.2.3.1 Vorbereitungen

Zur Vorbereitung wurden zunächst das Heizbad (Haake Circulator F3-CH) und das Isolationsgefäß auf 37,7°C vorgewärmt. Die benötigten Lösungen wurden bereitgestellt, und die Enzyme frisch abgewogen und bis zur Isolation bei 4°C aufbewahrt (siehe Tabelle 2.2). 20 ml der Ca<sup>2+</sup>-freien-Isolationslösung wurden in einer Glaspetrischale bei 4°C kaltgestellt, die restliche Lösung wurde zum Erwärmen in einem Wasserbad bei 37,7°C gelagert. Ein 25 ml Aliquot mit Feng-Medium wurde zum Erwärmen auf Raumtemperatur aus dem Kühlschrank genommen.

#### 2.2.3.2 Reinigung der Probe

Das humane Gewebe wurde dann mit der Custodiol®-Lösung in eine Glaspetrischale gegeben und zunächst inspiziert. Fettgewebe, große Stücke Perikard und

Blutgerinnsel wurden entfernt. Dann wurde das Gewebe auf einem Zellstofftuch vorsichtig trocken getupft und abgewogen. Die optimale Gewebegröße für ein gutes Isolationsergebnis lag zwischen 200 und 600 mg. Bei mehr Gewebe wurden zusätzlich Gefrierproben für weitere Analysen genommen.

Das Vorhofgewebe wurde in die Glaspetrischale mit 4°C kalter  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Isolationsstyrode gegeben und in ca. 1 mm große Stücke zerschnitten. Mit Hilfe eines Trichters wurden die Gewebestücke mitsamt Isolationsstyrode in das 37°C warme Isolationsgefäß gegeben. Die Isolationsstyrode wurde ab jetzt konstant mit 100% Sauerstoff begast. Um eine starke Blasenbildung zu verhindern, wurde eine Pipettenspitze auf dem Sauerstoffschlauch platziert. Mit Hilfe eines Magnetrührstabes wurde das Gewebe 3 Minuten in der Isolationsstyrode gewaschen. Nach 3 Minuten wurde der Rührstab ausgeschaltet und es wurde gewartet, bis sich die Gewebestückchen absetzten. Der Überstand wurde vorsichtig durch ein Nylonsieb (250-300  $\mu\text{m}$ ) gegeben, während jedoch idealerweise die meisten Gewebestückchen im Isolationsgefäß blieben. Gewebe, welches sich auf dem Nylonsieb befand, wurde mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig zurück ins Isolationsgefäß gegeben, wobei ganz weiße oder gelbe Stücke zuvor aussortiert wurden. Daraufhin wurde das Isolationsgefäß erneut mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier-Lösung aufgefüllt, und der Waschschrift wurde noch zwei Mal wiederholt.

### 2.2.3.3 Erster enzymatischer Verdau

Die zuvor abgewogene Collagenase I und Protease XXIV wurden in insgesamt 20 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freier-Lösung aufgelöst und ins Isolationsgefäß überführt (Enzymlösung 1, siehe Tabelle 3). Die Gewebestücke wurden durch vorsichtiges ca. vier- bis fünfmaliges langsames auf- und abpipettieren mit einer 25 ml Pipette in der Enzymlösung resuspendiert. Hierbei sollten möglichst keine Luftblasen entstehen. Danach wurden die Gewebestückchen sorgfältig für 10 Minuten mit Hilfe des Magnetrührstabes durchgerührt. Nach 10 Minuten wurden 40  $\mu\text{l}$  einer 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzugefügt, um im Isolationsgefäß eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Nach diesem Schritt wurde das Gewebe für 35 Minuten weiter verdaut, um eine erste Isolationszeit von insgesamt 45 Minuten zu erhalten. Der Magnetrührer wurde abgeschaltet und es wurde einige Sekunden gewartet, bis sich die Gewebestückchen absetzten. Dann wurde der Überstand vorsichtig durch das Nylonsieb abgegossen, sodass der Großteil des Gewebes im Isolationsgefäß verblieb. Alternativ konnte der Überstand

vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen werden. Gewebestücke, die sich auf dem Nylonsieb befanden, wurden mit einer Pinzette zurück ins Isolationsgefäß überführt.

#### **2.2.3.4 Zweiter enzymatischer Verdau**

Die zweite abgewogene Collagenase Typ I wurde in 20 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Isolationslösung aufgelöst (Enzymlösung 2, siehe Tabelle 3) und ins Isolationsgefäß überführt. Es wurden direkt 40  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu erhalten. Die Gewebestückchen wurden wieder mit einem Magnetrührer durchgerührt. Bei Bedarf wurden sehr große zusammenhängende Gewebeklumpen vorsichtig mit einer Schere zerteilt.

Nach 5 Minuten wurde mit einer 10  $\mu\text{l}$  Pipette eine erste Stichprobe aus dem Isolationsgefäß entnommen. Dieser Schritt wurde alle 2 bis 3 Minuten wiederholt, bis die ersten rechteckigen, quergestreiften Kardiomyozyten unter dem Mikroskop zu sehen waren. Sobald Kardiomyozyten zu sehen waren, wurde der zweite Verdau abgebrochen. Nach maximal zehn bis 15 Minuten ohne Zellen in der Stichprobe wurde der zweite enzymatische Verdau ebenfalls beendet. Hierzu wurde der Magnetrührstab ausgeschaltet, und die Gewebestücke sanken für ca. 20-30 Sekunden ab. Das zweite Nylonsieb wurde zu einem Trichter geformt, und der Überstand aus dem Isolationsgefäß wurde durch das Sieb in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben.

Die Gewebestücke wurden vom Sieb erneut in das Isolationsgefäß überführt und in 20 ml Feng-Medium (siehe Tabelle 4) resuspendiert. Nun wurde mechanisch für eine weitere Dissoziation der Zellen gesorgt, indem mit einer 25 ml Serologischen Pipette vier bis fünf Mal auf- und abpipettiert wurde. Hierbei war erneut darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden, da diese sich nachteilig auf die Zellzahl und -qualität auswirkten. Der Überstand wurde erneut durch das Nylonsieb in ein zweites Falconröhrchen gesiebt.

#### **2.2.3.5 Finale Aufarbeitung und $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau**

Die beiden Falconröhrchen wurden bei 95 x g für 7 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Transferpipette vorsichtig abgenommen, sodass das Pellet mit den Kardiomyozyten nicht gestört wurde. Die Pellets wurden je

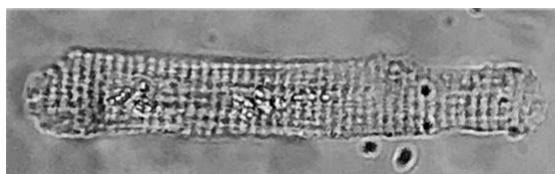
nach Größe entweder in jeweils 1 ml oder 1,5 ml Feng-Medium resuspendiert. Der schrittweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau folgte durch Zugabe von 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .

**Tabelle 5:  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau bei atrialem Myokard**

1 ml Feng-Medium mit EGTA (bei kleinem Pellet)	1,5 ml Feng-Medium mit EGTA (bei größerem Pellet)
Zunächst wurden <b>20 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,2 mM).	Zunächst wurden <b>30 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,2 mM).
Dann wurden <b>10 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,3 mM).	Dann wurden <b>15 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,3 mM).
Zuletzt wurden <b>20 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben (Endkonzentration = 0,5 mM).	Zuletzt wurden <b>30 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben (Endkonzentration = 0,5 mM).

### 2.2.3.6 Ausplattierung der Zellen

Die Messkammern wurden zur Vorbereitung mit ca. 4  $\mu\text{l}$  Laminin (Lot: 039K4001, Sigma Aldrich, München, Deutschland) eingestrichen, um ein besseres Anhaften der Zellen auf dem Glasboden zu erreichen. Nachdem dieses getrocknet war, wurden zwischen 200 und 500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in die Messkammer gegeben, und es wurde ca. eine halbe Stunde abgewartet, um den Zellen Zeit zu geben sich auf den Glasboden abzusenken.



**Abbildung 3: Humaner atrialer Kardiomyozyt aus eigener Zellisolation.**

(Mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Pabel.)

### 2.2.3.7 Nachteile der Isolationsmethode

Der Verdau der Zellen erfolgte größtenteils in  $\text{Ca}^{2+}$ -armer Lösung. Hierdurch kam es, während des anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbaus, möglicherweise zu einer gewissen

Selektion von Zellen mit einer besonders robusten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Dieser Nachteil der Isolationsmethode wurde jedoch in Kauf genommen, da es für die vorliegende Arbeit besonders wichtig war, dass die Zelloberfläche der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten frei von Extrazellulärmatrix war, um eine stabile Verbindung mit der Patch-Pipette einzugehen.

Auch sollte erwähnt werden, dass es mit dieser Isolationsmethode, in Kombination mit dem Patch-Clamp-Verfahren schwer war, eine hohe Anzahl an Messergebnissen zu produzieren.

### **2.3 Probengewinnung von humanen ventrikulären**

#### **Kardiomyozyten**

Das Arbeiten mit humanem ventrikulärem Myokard wurde durch eine Kooperation mit der Herzchirurgie des Herz- und Diabeteszentrums Bad Oeynhausen ermöglicht. Hierfür lag ein positives Votum der Ethikkommission (Antragsnummer 31/9/00) vor. Auch diese Studie ist konform mit der WMA Deklaration von Helsinki. Vor Einschluss in die Studie wurde von allen Teilnehmenden eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Die terminal insuffizienten Herzen (NYHA IV) stammten in der Regel von Patient\*innen mit dilatativer Kardiomyopathie oder ischämischer Kardiomyopathie, die eine allogene Herztransplantation erhielten.

Des Weiteren bestand eine Kooperation mit der Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Bei starker Aortenklappenstenose kann es zu einer linksventrikulären Hypertrophie des Ausflusstraktes kommen, sodass eine klassische Myektomie (Herzoperation nach Morrow) notwendig wird. Hier wurde linksventrikuläres Myokard ohne Herzinsuffizienz gewonnen.

Das humane Gewebe wurde jeweils von den Operierenden direkt in gekühlte kardioplegische Custodiol®-Lösung (CH.-B. 0933411, Dr. Franz Höhler Chemie GmbH, Alsbach, Germany) gegeben. Danach wurde das Gewebe so schnell wie möglich ins Labor transportiert und isoliert.

## 2.4 Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten

### 2.4.1 Lösungen

Alle Lösungen wurden vor der Isolation vorbereitet. Eine Einheit Joklik-MEM-Pulver (Joklik-MEM, modifiziert für Zellkultur, Lot-No. 5750815, Pan – Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) wurde in etwas weniger als 1 L ddH<sub>2</sub>O gelöst (B. Braun, Melsungen, Germany) und mit Hilfe eines Magnetrührstabs so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis das Pulver vollständig gelöst war. Das im Behälter verbleibende Pulver wurde sorgfältig aus dem Behälter gespült und der pH-Wert mit 1 mmol NaOH Lösung auf 7,4 angepasst. Anschließend wurde die Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf genau 1 L aufgefüllt.

50 ml der Joklik-MEM-Lösung (pH 7,4) wurden in eine 100 ml Flasche gefüllt. Die übrigbleibende Lösung wurde auf 37°C erhitzt und der pH-Wert erneut auf 7,4 angepasst.

Alle Verdauungsenzyme wurden in Joklik-MEM-Lösung gelöst. Für den ersten enzymatischen Verdau wurden 15 mg Collagenase Typ II (Lot. - Nr. 45A15450, 265u/mg, Worthington Biochem®, Lakewood, New Jersey, USA) und 1 ml Trypsin (Gibco® Trypsin 2.5%, Cat.No. 15090-046, Invitrogen) in 20 ml Joklik-MEM-Lösung gelöst. Für den zweiten enzymatischen Verdau wurden 40 mg Collagenase Typ II in 40 ml Joklik-MEM-Lösung aufgelöst. Alle enzymenthaltenden Gefäße wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Enzyme mit Aluminiumfolie bedeckt.

**Tabelle 6: Enzymlösungen Ventrikelisolation**

	Substanz	Konzentration	Abgewogene Menge/ Isolation	<i>Enzymlösung 1: 0,015 g Collagenase Typ II und 1 ml Trypsin in 20 ml Joklik-MEM kurz vor der Präparation lösen (37°C)</i>
<b>Enzyme</b>	Collagenase Typ II (Worthington)	265 units/mg	1. Verdau: 0,015 g 2. Verdau: 0,04g	<i>Enzymlösung 2: 0,04 g Collagenase Typ II in 40 ml Joklik-MEM-Lösung kurz vor der Präparation lösen (37°C)</i>
	Trypsin (Gibco)	2,5%	1,0 ml	

Tabelle 7: Stopp-Lösung

	Substanz	Menge	
<b>Stopp-Lösung</b>	Joklik-MEM-Lösung	10 ml	<i>Für die Stopplösung werden 10 ml Joklik-MEM-Lösung mit 1 ml BCS gemischt (37°C; pH 7,4)</i>
	BCS (Bovine Calf Serum)	1,0 ml	

## 2.4.2 Isolationsprotokoll

### 2.4.2.1 Vorbereitung der Probe

Zur Isolation wird ein ca. 1 cm<sup>3</sup> großes Stück aus dem linken Ventrikel geschnitten bzw. das exzidierte Gewebe der Myektomie weiterverarbeitet. Beide Gewebetypen wurden gleich behandelt. In einer Präparierschale mit Joklik-MEM-Lösung wurde das Gewebe analog zur Vorhof-Isolation von fettigem Gewebe, Bindegewebe und Epikard befreit und zu ca. 1 mm<sup>3</sup> großen Stücken verarbeitet und mit einer abgesägten Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend folgten eine dreimalige Waschung mit Joklik-MEM-Lösung und die Überführung in das Isolationsgefäß.

### 2.4.2.2 Erster enzymatischer Verdau

Im Isolationsgefäß wurde das Gewebe in der ersten Enzymlösung (siehe Tabelle 6) bei 37°C inkubiert, und währenddessen für 45 Minuten mit Hilfe des Magnetstabes sorgfältig durchgerührt. Während der Inkubation wurden die Isolationsgefäße immer mit Aluminiumfolie bedeckt.

### 2.4.2.3 Weitere enzymatische Verdauungsschritte und Zentrifugation

Im Anschluss an den ersten enzymatischen Verdau wurde der Überstand aus dem Gefäß entfernt und durch die zweite Enzymlösung (siehe Tabelle 6) ersetzt. Das Gewebe wurde erneut für 10 Minuten inkubiert und durchgerührt. Im Anschluss wurde der Überstand durch ein Nylonsieb in ein neues Falconröhrchen gesiebt und für 5 Minuten bei 700 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde



bereits das übriggebliebene Gewebe erneut mit 10 ml frischer Joklik-MEM-Lösung ohne Enzyme resuspendiert und erneut für 10 Minuten durchgerührt.

Wenn die Zentrifugation beendet war, wurde aus dem zentrifugierten Röhrchen vorsichtig der Überstand abgenommen und das Pellet je nach Größe in 1-3 ml Stopplösung (siehe Tabelle 7) resuspendiert. Hieraus wurde ein Tropfen entnommen, um unter dem Lichtmikroskop die Quantität und Qualität der ventrikulären Kardiomyozyten zu beurteilen, und daraus das Enzymmischungsverhältnis für die nächsten Isolationsschritte zu bestimmen. Für die nächsten Isolationsschritte wurde die „Enzymlösung 2“ je nach Zellzahl- und Beschaffenheit mit frischer Joklik-MEM-Lösung verdünnt, sodass 10 ml einer individuellen Enzymlösung entstanden. Die Enzymlösung wurde erneut auf das humane Gewebe gegeben und dieses wurde für 10 Minuten durchgerührt. Der Überstand wurde wieder abzentrifugiert, das Pellet in Stopplösung resuspendiert und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Dieser Schritt wurde vier bis sieben Mal wiederholt. Für die Patch-Clamp-Messungen wurden nur die Isolationsschritte verwendet, die längliche Kardiomyozyten mit deutlich sichtbarer Querstreifung sowie möglichst wenig tote Zellen enthielten.

#### 2.4.2.4 Finale Aufarbeitung und $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau

Der schrittweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau folgte durch Zugabe von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufbau bei ventrikulärem Myokard**

1 ml Stopp-Lösung (kleines Pellet)	1,5 ml Stopp-Lösung (größeres Pellet)
Zunächst wurden <b>20 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,2 mM).	Zunächst wurden <b>30 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,2 mM).
Dann wurden <b>10 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,3 mM).	Dann wurden <b>15 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben und für 10 Minuten inkubiert (Endkonzentration = 0,3 mM).
Zuletzt wurden <b>20 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben (Endkonzentration = 0,5 mM).	Zuletzt wurden <b>30 <math>\mu\text{l}</math></b> der 10 mM $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben (Endkonzentration = 0,5 mM).

#### **2.4.2.5 Ausplattierung der Zellen**

Analog zur Vorhofisolation wurden die Messkammern mit ca. 4 µl Laminin behandelt, und es wurden ebenfalls zwischen 200 und 500 µl Zellsuspension in die Messkammer gegeben. Es wurde ca. eine halbe Stunde abgewartet, um den Zellen Zeit zu geben sich auf den Glasboden abzusenken.

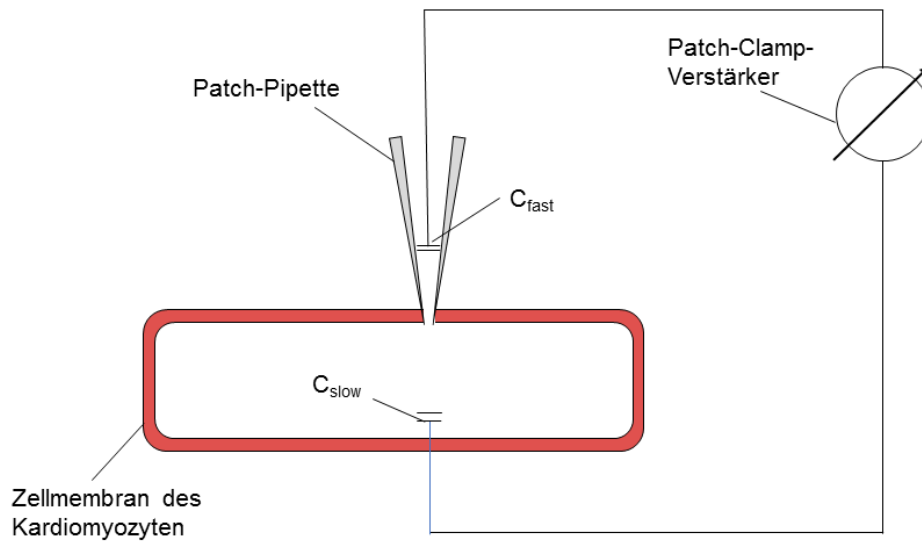
#### **2.4.2.6 Nachteile der Isolationsmethode**

Analog zu den Nachteilen der Vorhofisolation.

### **2.5 Die Patch-Clamp-Technik**

Eine der wichtigsten elektrophysiologischen Methoden, die Patch-Clamp-Technik, wurde in ihrer heutigen Form von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt. Hierfür erhielten sie 1991 den Nobelpreis (Hamill et al. 1981; Neher und Sakmann 1976). Die Methode ermöglicht wichtige Erkenntnisse über die AP sowie Ionenströme zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum von Nerven- und Muskelzellen. Zudem liefert sie Einblicke in die Eigenschaften von Ionenkanälen und ist von großer Bedeutung für die angewandte pharmakologische Forschung.

Zur Messung elektrischer Signale einzelner Zellen wird eine sehr feine, mit Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette auf die Zelloberfläche gesetzt. Ein Stück der Zellmembran („patch“) wird dadurch elektrisch von der umgebenden Lösung isoliert. Durch Anlegen eines Unterdrucks oder bestimmter Pharmaka kann nun die Zellmembran selektiv unterhalb der Pipette durchbrochen werden und eine Verbindung zum Inneren der Zelle hergestellt werden. In der Pipette befindet sich eine Elektrode, die nun Kontakt zum Intrazellulärraum der Nerven- oder Muskelzelle hat. Eine andere Elektrode befindet sich in der Umgebungslösung der Zelle. Somit sind Messungen von Aktionspotenzialen und Strömen über die gesamte Zellmembran der entsprechenden Zelle möglich („whole cell modus“). Voraussetzung für diese Messungen ist eine besonders feste Verbindung zwischen Zelle und Patch-Pipette. Eine solche Verbindung benötigt einen Widerstand zur Umgebungslösung im Gigaohm-Bereich und wird Gigaseal genannt (Hamill et al. 1981; Neher und Sakmann 1976). Um eine solche feste Verbindung zu erhalten, muss die Zelloberfläche frei von Extrazellulärmatrix sein. Dies wurde durch unsere spezielle Isolationsmethode ermöglicht.



**Abbildung 4: Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung mit schnellen ( $C_{fast}$ ) und langsamen ( $C_{slow}$ ) kapazitiven Artefakten.**

### 2.5.1 Messverfahren

Bei erreichtem Zugang zur Zelle mit stabilem Gigaseal kann zwischen zwei Messverfahren gewählt werden. Im sogenannten „voltage clamp“ Modus wird das Membranpotential der Zelle auf einen bestimmten Wert festgelegt („geklemmt“), und die entstehenden Ströme über Ionenkanäle können gemessen werden. Im „current clamp“ Modus wird ein vorgegebener Strom in die Zelle injiziert, und die über der Membran entstehende Spannung wird aufgezeichnet.

Die Zellen aus dem Arbeitsmyokard aus Atrium und Ventrikel, die für diese Arbeit vorlagen, waren nicht spontan elektrisch aktiv. Daher wurde ein Strom bestimmter Stärke und Dauer in die Zellen injiziert, sodass diese bis zu einem Schwellenwert depolarisierten und schließlich Aktionspotentiale generierten.

### 2.5.2 Aufbau der Patch-Clamp Messanlage

Die Patch-Clamp Messanlage steht in einem fensterlosen, vom restlichen Labor abgetrennten Raum, um Störungen und Luftströme zu minimieren. Um Gebäudeschwingungen abzdämpfen, befindet sich die Anlage auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Auf den schwingungsgedämpften Tisch ist zur Abschirmung elektromagnetischer Störungen ein Faradayscher Käfig montiert. Das

Inversmikroskop (Aiovert 200 / Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) befindet sich innerhalb des Faradayschen Käfigs und in einer Vertiefung des Mikroskops ist Platz für die Messkammer. Ein 40x-Objektiv und ein 10x-Okular ergeben zusammen eine bis zu 400-fache Gesamtvergrößerung des Mikroskops. Außerdem am Arbeitstisch befestigt sind ein Pipettenhalter, der über einen Mikromanipulator (Mikromanipulator 5170 / Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe eines Steuerungshebels gesteuert werden kann und über ein luftdichtes Schlauchsystem Anschluss an ein Unter- und Überdrucksystem hat. Eine am Pipettenhalter befestigte Elektrode aus chloriertem Silberdraht sowie eine Referenzelektrode aus massivem Silber/Silberchloridpellet (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) sind über einen Vorverstärker (EPC-9 / HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) mit einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC-10 / HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) außerhalb des Faradayschen Käfigs verbunden. Dieser enthält einen Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler (AD/DA-Wandler), welcher die Messdaten auf einen Computer überträgt. Zur Kontrolle des Verstärkers sowie zur Aufzeichnung der Daten dient das Programm Patchmaster 2.0 (Software Patchmaster™, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland). Außerdem befindet sich außerhalb des Faradayschen Käfigs noch ein Perfusionssystem (ALA VC3-4, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) welches die Zufuhr verschiedener Badlösungen ermöglicht. Die Superfusion erfolgt durch Gravitation mit einem Fluss von etwa 70 ml/h. Die Temperatur der Badlösungen wird mithilfe einer Perfusionsheizung (HPC-G, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland), die sich mittels eines mechanischen Mikromanipulators im Blickfeld des Mikroskops positionieren lässt, konstant bei 37 °C gehalten. Die Kontrolle der Temperatur erfolgt mit einem elektrischen Thermometer (DigiSense / Cole-Parmer Company, Vernon Hills, USA). Die Absaugung der Badlösungen erfolgt kontinuierlich über eine regelbare Walzenpumpe (Modell MV-CA/ Ismatec GmbH, Wertheim-Monfeld, Deutschland).

### **2.5.3 Patch-Clamp-Pipetten**

Die zum Patchen benötigten Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (TW 150 F-3 World Precision Instrumets, Inc., Sarasota, USA) mit Hilfe eines Ziehgerätes (DMZ Universal-Puller, Firma Zeitz-Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland)

gezogen. Die Kapillaren haben eine Länge von 76 mm, einen Außendurchmesser von 1,5 mm und einen Innendurchmesser von 1,2 mm. Die Kapillaren wurden horizontal in das Ziehgerät eingespannt und in definierten Schritten erhitzt und gezogen, sodass zwei spitz zulaufende Pipetten entstanden. Durch Veränderung der Parameter Hitze, Zugkraft und Wartezeit kann die Geometrie der Spitzen angepasst werden. Die Pipetten wurden vor jeder Messung frisch gezogen und hitzepoliert und jeweils nur einmal verwendet, da sie zur Bildung eines Gigaseals frei von Schmutzpartikeln sein mussten. Es zeigte sich, dass zur Messung von humanen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten Pipetten mit einem Widerstand von 3-6 M $\Omega$  am besten geeignet waren. Unmittelbar vor den Messungen erfolgte die Befüllung der Pipetten mithilfe einer Einfüllhilfe (Microfil/ World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) über einen Filter (0,2  $\mu$ m Porengröße, Filtropur, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland).

Der Silberdraht für die Pipetten-Elektroden wurde über Nacht in eine Chlor-Bleichlauge getaucht und so chloriert. Chlorierte Silberdrähte vermindern sogenannte Offset-Potentiale zwischen Pipettenlösung und Elektrode. Auch zwischen den Benutzungen wurden die Pipetten-Elektroden in dieser Lösung aufbewahrt. Um Oxidationen vorzubeugen, wurden die Elektroden regelmäßig (nach spätestens einer Woche) abgeschliffen und gereinigt oder komplett ausgetauscht.

### **2.5.4 Badlösung**

Die Badlösung für die Patch-Clamp Versuche entspricht in ihrer Zusammensetzung der physiologischen Ionenkonzentration des Extrazellularraumes. Die Badlösung wurde jeden Tag frisch aus einer kühl (4 °C) gelagerten, 10-fach konzentrierten, Stammlösung angesetzt. Zu der Stammlösung wurde vor jeder Messung frisch Glucose und CaCl<sub>2</sub> in entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Je nach Messung wurden zusätzlich Badlösungen mit 5  $\mu$ M Ranolazin, 0,3  $\mu$ M Dronedaron oder einer Kombination aus 5  $\mu$ M Ranolazin und 0,3  $\mu$ M Dronedaron vorbereitet. Da Dronedaron in DMSO gelöst war, wurde auch der Kontrolllösung und der Ranolazinslösung immer DMSO hinzugefügt, um einen durch DMSO-verursachten Effekt auszuschließen (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

Tabelle 9: Stammlösung

10-fach konzentrierte Stammlösung der Badlösung	Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Gebrauchslösung [mM]	<i>Aqua bidest ad 1000 ml; pH 7,0 mit NaOH bei 22°C einstellen; Stammlösung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren</i>
	KCl	74,55	4	
	NaCl	58,44	140	
	MgCl <sub>2</sub>	95,1	1	
	HEPES	238,31	10	

Tabelle 10: Badlösung

Badlösung	Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Gebrauchslösung [mM]	<i>10-fach Stammlösung ohne Glucose und Calcium herstellen, dann täglich frisch 5 ml der Stammlösung, mit Aqua bidest auf 50 ml auffüllen und Glucose und CaCl<sub>2</sub> zugeben  pH 7,4 mit NaOH bei 37°C einstellen</i>
	KCl	74,55	4	
	NaCl	58,44	140	
	MgCl <sub>2</sub>	95,1	1	
	HEPES	238,31	10	
	Glucose (erst zur 1x-Lösung zugeben)	180,16	10	
	CaCl <sub>2</sub> (erst zur 1x-Lsg zugeben)	238,31	2	

### 2.5.5 Pipettenlösung

Die Pipettenlösung (siehe Tabelle 11) entspricht in der Zusammensetzung ihrer Ionen der Zusammensetzung des physiologischen Intrazellulärraumes. Um eine konstante Zusammensetzung der Lösung an den verschiedenen Messtagen zu gewährleisten, wurde während der gesamten Versuchsreihe mit einem Ansatz gearbeitet. Dieser wurde sorgfältig abgemessen und schließlich in 1 ml Eppendorf Cups aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Pipettenlösung wurde dann an jedem Messtag frisch aufgetaut, in eine Spritze aufgezogen und mit einer Einfüllhilfe und einem Filter

versehen. Die Spritze wurde während der Messungen auf Eis gelagert, da die Lösung das bei Raumtemperatur instabile Adenosintriphosphat (ATP) enthielt.

**Tabelle 11: Pipettenlösung**

Pipetten- lösung	Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Endkonzentration Gebrauchslösung [mM]	<i>Aqua bidest ad 50 ml;  pH 7,2 mit KOH bei Raumtemperatur einstellen;  Lösung in 1 ml Aliquots aufteilen und bei -20°C einfrieren</i>
	K-Aspartat	171,2	92	
	KCl	74,56	48	
	Mg-ATP	507,2	1	
	EGTA	380,35	0,02	
	GTP-Tris	886,59	0,1	
	Na <sub>2</sub> -ATP	551,1	4	
	HEPES	238,31	10	

### 2.5.6 Versuchsdurchführung

Zunächst wurden alle Badlösungen (Kontrolllösung und Interventionslösungen) wie oben beschrieben frisch angesetzt und in das Perfusionssystem eingefüllt. Eine Messkammer mit frisch isolierten humanen Kardiomyozyten wurde in die Vertiefung des inversen Mikroskops eingebracht, und die Superfusionsheizung eingestellt. Die dann auf 37°C erhitzte Kontrolllösung wurde zunächst für mindestens 10 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 70 ml/min eingewaschen, während das „Feng-Medium“ abgepumpt wurde. Die aufgetaute Pipettenlösung wurde auf Eis gelagert. Eine frisch gezogene Pipette wurde mit der Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Mithilfe einer kleinen luftgefüllten Spritze wurden dann einige ml Überdruck auf die Pipette gegeben, um beim Eintauchen in die Badlösung zu verhindern, dass sich Schmutz an der Pipettenspitze sammelte. Außerdem wurde die Superfusion für einige Minuten ausgestellt, um ein Verschmutzen der Pipette zu verhindern. Nun wurde die Pipette mithilfe des Mikromanipulators und dem Steuerungshebel in die Badlösung der Versuchskammer eingebracht. Hierbei war wichtig, dass die Luft-Flüssigkeitsgrenze nur einmal überquert wurde. Nach dem Eintauchen der Pipettenspitze erschien auf dem Computerbildschirm ein biphasischer, rechteckiger Kommandospannungsimpuls mit einer Amplitude von 5 mV in beide Richtungen. Die Pipettenspitze wurde vorsichtig unter Sicht an die gewünschte Zelle angenähert. Durch den leichten Überdruck im Pipetteninneren

bildete sich ein Flüssigkeitspolster vor der Pipettenspitze, welches bei der Annäherung von Nutzen sein konnte, da man eine leichte Eindellung in Form eines Lichtreflexes an der Zellmembran sehen konnte. Zudem wurde, für die letzten Schritte der Annäherung, der Teststrom auf dem Computerbildschirm beobachtet. Dieser war ein indirektes Maß für den Widerstand zwischen den beiden Elektroden. Bei Annäherung der Pipette an die Zellmembran erhöhte sich der Widerstand zur Badelektrode, was an einer Abnahme des Teststroms zu erkennen war (Ohmsches Gesetz, siehe Formel 2). Etwa bei einer Halbierung der Stromamplitude wurde der Überdruck von der Pipette genommen, und man erzeugte sogleich einen leichten Unterdruck. Die Pipettenöffnung schloss nun dicht mit der Zellmembran ab, und der Widerstand stieg von einigen Megaohm in den Gigaohmbereich – es bildete sich ein sogenanntes „Gigaseal“. Nach Erreichen des Gigaseals wurde die Superfusion wieder angestellt, was entweder das Seal zerstörte, sodass die Messung abgebrochen werden musste, oder stabiler machte, sodass mit der Messung begonnen werden konnte. Dieser Zustand, in dem die Pipette dicht mit der Zellmembran verbunden ist, nennt sich „*cell-attached*-Konfiguration“. Nun wurde im Patchmaster Programm auf den „*on-cell-modus*“ umgestellt. Dabei wurden die schnellen kapazitiven Ströme ( $c_{fast}$ ) kompensiert. Nun wurde die Zellmembran selektiv unterhalb der Pipette zerstört (*rupturing*). Dies kann auf verschiedene Weisen geschehen. Für humane Kardiomyozyten zeigte sich, dass eine langsame vorsichtige Erhöhung des Unterdrucks die besten Resultate erzielte. Nachdem die Zellmembran zerstört wurde, entstand ein offener Zugang zum Zytoplasma der Zelle und die sogenannte *whole-cell*-Konfiguration war erreicht. Nach dem *rupturing* wurden die Membrankapazität ( $c_{slow}$ ) und der Serienwiderstand ( $R_{series}$ ) kompensiert. Der Zugangspipettenwiderstand wurde im Bereich von ~ 5-15 M $\Omega$  gehalten. Nun wurden der Pipettenlösung und dem Zytoplasma ein Zeitraum von ungefähr 5-10 Minuten gegeben, um sich auszutauschen. Außerdem wurde die Superfusion mit der auf 37,0 °C erhitzten Kontroll-Badlösung wieder eingestellt. Es wurde mindestens 10 Minuten gewartet, bis sich die Zelle in ihrem RMP und der AP Morphologie stabilisierte. Erst nach dieser Wartezeit wurden die eigentlichen Messprotokolle gestartet.



### 2.5.7 Aktionspotential Messungen

Zunächst wurde in der Patchmaster™ Software in den Stromklemmmodus (*current-clamp*) umgeschaltet. Dieser erlaubt es den Strom, der über die Zellmembran fließen soll, fest vorzugeben, während das Membranpotential variabel bleibt. Die Ströme wurden so gewählt, dass ein physiologisches Ruhemembranpotenzial von humanen Kardiomyozyten (je nach Zelltyp von ungefähr -75 mV bis -90 mV) erreicht wurde. Dies basiert physikalisch auf dem Ohmschen Gesetz.

$$U = R \times I$$

**Formel 2: Ohmsches Gesetz.**

U=Spannung [V], R=Widerstand [ $\Omega$ ], I=Stromstärke [A].

Hierbei war darauf zu achten, dass der eingestellte Strom einen Wert von 100 pA nicht überschritt. Im weiteren Verlauf wurde die Zelle, durch eine im Messprotokoll vorgegebenen Stromstärke (*current*) mit einer Amplitude von 1-2 nA und 1-5 ms Dauer (*duration*) stimuliert und versucht ein AP auszulösen. Die Zelle wurde zunächst unter Superfusion der Kontrolllösung gemessen, und die Stimulationsfrequenz wurde von 0,5 Hz bis 3,0 Hz gesteigert. Im Anschluss wurde eine der Badlösungen mit einer der entsprechenden Substanzen eingewaschen (Ranolazin 5  $\mu\text{mol/L}$ , Dronedaron 0,3  $\mu\text{mol/L}$  oder die Kombination aus beiden Medikamenten). Es wurde mindestens 10 Minuten gewartet, bis das Medikament ausreichend eingewaschen war, und die Zelle sich ausreichend stabilisiert hatte, bis die Messungen durchgeführt wurden. Auch hier wurden die Messungen mit den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen durchgeführt. Schließlich wurde das Medikament wieder für mindestens 10 Minuten ausgewaschen, und es wurden abschließende AP Messungen durchgeführt.

Diese gepaarte Vorgehensweise ermöglichte eine sehr genaue Beobachtung der elektrophysiologischen Auswirkungen der Testsubstanzen auf die einzelne Zelle und erhöhte die Aussagekraft der Messergebnisse.

### 2.5.8 Auswertung der Aktionspotentiale

Die Rohdaten der gemessenen AP wurden aus der „Pulse“-Software exportiert und anschließend mittels der Software „ABF-Utility“ (Synaptosoft Inc., Fort Lee, USA) konvertiert und in die „Clampfit“-Software (Clampfit 8/Molecular Devices Corporation,

Sunnyvale, USA) eingefügt. Hieraus erfolgte der Export der AP in das Auswertungsprogramm „LabChart“, welches die Auswertung der einzelnen AP-Kenngrößen übernahm. Es wurde die Aktionspotentialdauer zu verschiedenen Repolarisationszeitpunkten ausgewertet, hier war vor allem die 90%ige Repolarisation von Bedeutung ( $APD_{90}$  [ms]). Zudem wurden das Ruhemembranpotential [mV] und auch weitere Kenngrößen wie die Aktionspotentialamplitude [mV], die Aufstrichgeschwindigkeit [mV/s] und der *Peak* (der positive Maximalwert eines AP in [mV]) aufgezeichnet.

## **2.6 Pharmakologische Substanzen**

Für die AP Messungen wurden der Badlösung Ranolazin in einer Konzentration von 5  $\mu$ M, Dronedaron in einer Konzentration aus 0,3  $\mu$ M oder die Kombination aus beidem zugesetzt. Alle Patch-Clamp-Messungen wurden bei 37,7°C durchgeführt.

### **2.6.1 Ranolazin**

Ranolazin (Molekülformel:  $C_{24}H_{33}N_3O_4$ , molekulare Masse: 427.54 g/mol, CAS-Nummer: 142387-99-3, Gilead Sciences, Paolo Alto, USA) wurde frisch in einer 0,1 mol/L HCl-Lösung gelöst und in einer finalen Konzentration von 5  $\mu$ mol/l verwendet. Diese Konzentration liegt im therapeutisch, klinisch relevanten Bereich (Belardinelli et al. 2006).

### **2.6.2 Dronedaron**

Dronedaron Hydrochlorid (Molekülformel:  $C_{31}H_{44}N_2O_5S \cdot HCl$ , molekulare Masse: 593.22 g/mol; CAS-Nummer: 141625-93-6, Sigma-Aldrich, Germany) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einer finalen Konzentration von 0,3  $\mu$ mol/L verwendet. Diese Konzentration liegt im niedrigeren klinisch relevanten Bereich (Reiffel et al. 2015a). Um einen Effekt von DMSO auf die Zellen auszuschließen, wurde den anderen Gruppen in gleicher Menge DMSO hinzugefügt.

## **2.7 Statistik und Datenauswertung**

Die Rohdatenerfassung erfolgte mit der Software Patchmaster™ (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland). Die Weiterbearbeitung der Daten

erfolgte in der Software LabChart (ADInstruments, USA). Die Endauswertung, die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen erfolgten mit dem Programm *GraphPad Prism 6™* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Alle Daten der vorliegenden Arbeit sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Dieser wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{SEM} = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

**Formel 3: Standardfehler des Mittelwerts.**

SEM = Standardfehler des Mittelwertes,  $\sigma^2$  = Varianz,  $\sigma$  = Standardabweichung, n = Anzahl der Beobachtungen.

Die statistischen Auswertungen für die gepaarten Messungen der APD wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt.

Für die RMP Messungen wurde der gepaarte Student's t-test benutzt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

## **2.8 Kompensation von Störgrößen**

Während einer Patch-Clamp-Messung im Current-Clamp-Modus können kapazitive Artefakte entstehen. Zellbestandteile, wie die Zellmembran, können sich wie ein Kondensator aufladen und später Strom abgeben. Dies würde die Amplitude und Kinetik des AP verfälschen und muss daher korrekt kompensiert werden (Numberger und Draguhn 1996). Im Wesentlichen bestehen zwei kapazitive Artefakte.  $C_{\text{fast}}$  entsteht hierbei durch die Kapazität des Elektrolyts in der Pipettenlösung,  $C_{\text{slow}}$  steht für die Kapazität der Zellmembran nach der Ruptur, an der auch die Zellgröße abgeschätzt werden kann (siehe Abbildung 4). Diese Artefakte werden über den Patch-Clamp-Verstärker registriert und kompensiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patient\*innenkollektiv

**Tabelle 12: Patient\*innenkollektiv.**

Charakteristika der, in den verschiedenen Gruppen eingeschlossenen, Patient\*innen. Die Werte sind n, MW  $\pm$  SEM oder n (%). \*P<0.05 SR verglichen mit VHF.

SR: Sinusrhythmus; VHF: Vorhofflimmern; HI: Herzinsuffizienz im Endstadium; DKM: dilatative Kardiomyopathie; IKM: ischämische Kardiomyopathie; EF: Ejektionsfraktion; LA: linkes Atrium; LAVI: linker atrialer Volumenindex; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; HF: Herzfrequenz; ACE: Angiotensin-converting Enzym; AC(V)B: Aortokoronarer (Venen)-Bypass; AKE: Aortenklappenersatz; MKE: Mitralklappenersatz; HTX: Herztransplantation.

Parameter	SR (n=27)	VHF (n=24)	HI (n=20; 9 DKM; 11 IKM)
Männliches Geschlecht	74,1	62,5	65,0
Alter (MW $\pm$ SEM)	68,0 $\pm$ 2,1	68,3 $\pm$ 2,1	55,5 $\pm$ 3,2
EF (MW $\pm$ SEM, %)	52,4 $\pm$ 2,6	47,7 $\pm$ 3,2	27,0 $\pm$ 3,4
LA Durchmesser (MW $\pm$ SEM, mm)	38,1 $\pm$ 1,9*	51,5 $\pm$ 2,3	45,3 $\pm$ 1,9
LAVI (MW $\pm$ SEM, ml/m <sup>2</sup> )	49,8 $\pm$ 4,7*	70,6 $\pm$ 9,8	
LVEDD (MW $\pm$ SEM, mm)	43,8 $\pm$ 3,0	50,3 $\pm$ 2,1	64,2 $\pm$ 3,6
HF (MW $\pm$ SEM, /min)	71,2 $\pm$ 2,4	90,5 $\pm$ 3,5	77,9 $\pm$ 4,5
Ischämische Herzkrankheit (%)	85,2	83,3	42,1
Diabetes mellitus (%)	18,5	41,7	10,5
ACE Inhibitoren (%)	44,4	25,0	40,0
$\beta$ -Blocker (%)	63,0*	87,5	87,5
Diuretika (%)	55,6	79,2	87,5
Digoxin (%)	3,7*	33,3	12,5
Catecholamine (%)	0,0	0,0	12,5
Amiodaron (%)	0,0	8,3	31,3
AT1-Rezeptor-Blocker (%)	33,3	54,2	37,5
Aldosteronantagonisten (%)	11,1	16,7	50,0
PDE Inhibitoren (%)	3,7	8,3	31,3
Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Inhibitoren (%)	29,6	41,7	6,3
Statine (%)	55,6	47,8	25,0

Parameter	SR (n=27)	VHF (n=24)	HI (n=20; 9 DKM; 11 IKM)
AC(V)B (%)	66,7	29,2	
AKE (%)	7,4	29,2	
MKE (%)	3,7	12,5	
AC(V)B + AKE (%)	11,1	12,5	
AC(V)B + MKE (%)	0,0	8,3	
HTX (%)	3,7	8,3	100
AKE + MKE (%)	7,4	0,0	

### **3.2 Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin, Dronedaron und deren Kombination auf humane atriale Kardiomyozyten**

Die elektrophysiologischen Messungen an humanen atrialen Kardiomyozyten erfolgten mittels *whole-cell* Patch-Clamp-Technik (siehe Kapitel 2.5). Hierbei wurden die Stimulationsfrequenzen sukzessive von 0,5 Hz über 1,0 Hz, 2,0 Hz bis auf 3,0 Hz gesteigert. Die Messungen erfolgten bei 37 °C zunächst mit Kontrolllösung. Anschließend wurde eine Perfusion mit der Testsubstanz (Ranolazin, Dronedaron oder die Kombination beider Medikamente) eingeleitet, und weitere Messungen erfolgten an derselben Zelle (um gepaarte Ergebnisse zu erhalten). Zum Abschluss erfolgte, wenn von der Lebensdauer des Myozyten möglich, ein Auswaschen der Testsubstanzen.

#### **3.2.1 Effekte auf die Aktionspotentialdauer im Sinusrhythmus**

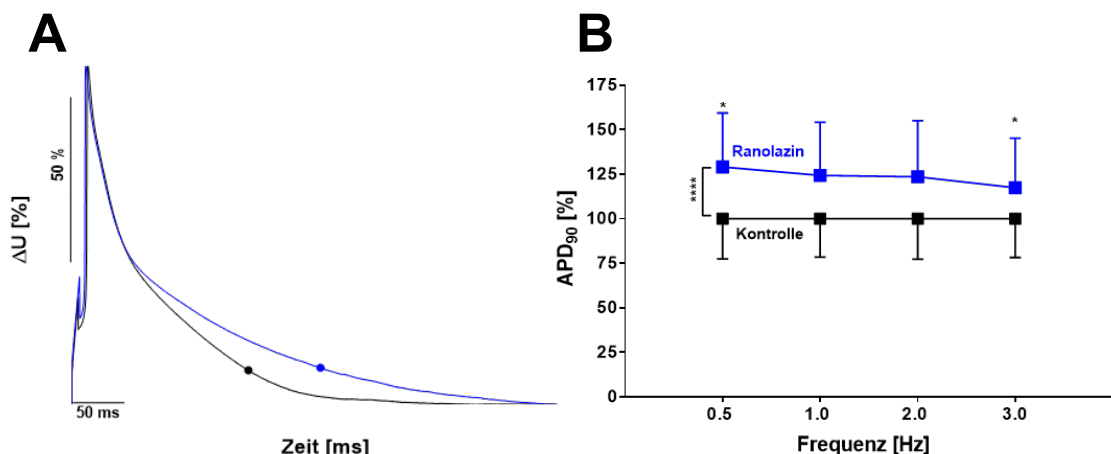
##### **3.2.1.1 Effekte von Ranolazin auf die APD**

Bei der Messung der Aktionspotentialdauer bis zur 90%igen Repolarisation (APD<sub>90</sub>), in humanen SR-Kardiomyozyten des rechten Atriums, ergaben sich folgende Ergebnisse. Zur übersichtlicheren Darstellung der prozentualen APD<sub>90</sub>-Veränderungen wurden die Werte normalisiert, indem die APD<sub>90</sub> der Kontrollmessung als 100% angenommen wurde und die Interventionsgruppe als prozentuale Änderung der Kontrolle dargestellt wurde (siehe Abbildung 5 B). Hier hat sich die APD<sub>90</sub> nach Zugabe von 5 µmol/L Ranolazin (Ran), bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, im

Vergleich zur Kontrolle um  $29,1 \pm 0,1\%$  signifikant verlängert (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5;  $P=0,03$ ). Bei den Stimulationsfrequenzen 1 Hz und 2 Hz hat sich die  $APD_{90}$  um  $24,32 \pm 0,1\%$  respektive  $23,05 \pm 0,1\%$  verändert, was allerdings nicht signifikant war (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5;  $P= 0,06$  bzw.  $P=0,08$ ). Eine signifikante Verlängerung um  $17,4 \pm 0,1\%$  der  $APD_{90}$  zeigte sich bei einer Stimulationsfrequenz von 3,0 Hz (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5;  $P<0,05$ ).

Die Verlängerung der  $APD_{90}$ , durch die Zugabe von Ranolazin, ist auch in der korrespondierenden Originalabbildung (Abbildung 5 A) zu sehen. Sie wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz aufgezeichnet.

Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Tabelle 13 die nicht-normalisierten Mittelwerte der APD-Messungen in Millisekunden bei den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen. Hier stellt sich nur die Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz als signifikant dar.



**Abbildung 5: Effekte von Ranolazin auf die APD im SR.**

**A:** Originalabbildung der AP-Messung, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von 1 Hz. Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von 5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin (dunkelblau). Der farbige Punkt im AP stellt den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Darstellung der  $APD_{90}$ -Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR nach Zugabe von 5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin (n=5/5), im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW  $\pm$  SEM. Die statistischen Auswertungen für die gepaarten Messungen der APD wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt. \* $P<0,05$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$

**Tabelle 13: Effekte von Ranolazin auf die APD<sub>90</sub> im SR.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen SR-Kardiomyozyten des rechten Atriums. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) nach Zugabe von Ranolazin (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5) dargestellt.

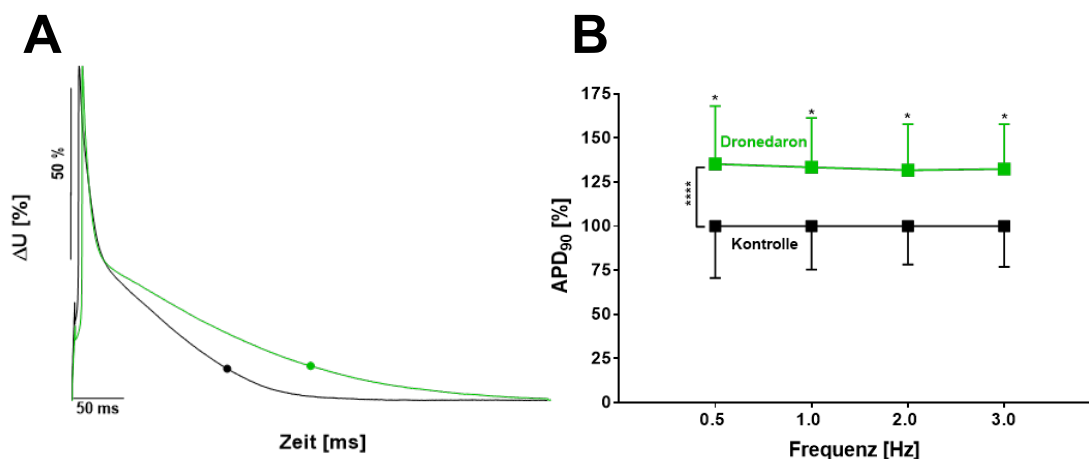
<b>Frequenz Hz</b>	<b>APD<sub>90</sub> Kontrolle ms</b>	<b>APD<sub>90</sub> Ranolazin ms</b>	<b>P-Wert</b>
<b>0,5</b>	119,6 $\pm$ 19,1	154,4 $\pm$ 26,6	0,02 *
<b>1,0</b>	117,6 $\pm$ 17,9	146,2 $\pm$ 27,2	0,05 ns
<b>2,0</b>	117,4 $\pm$ 18,8	145,1 $\pm$ 28,9	0,06 ns
<b>3,0</b>	119,0 $\pm$ 18,3	139,7 $\pm$ 25,2	0,24 ns

### 3.2.1.2 Effekte von Dronedaron auf die APD

Durch Zugabe von 0,3  $\mu$ mol/L Dronedaron (Dron) hat sich die APD<sub>90</sub> von atrialen SR-Kardiomyozyten, bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant um 35,2  $\pm$  0,1% verlängert (n=5/5; P=0,04; siehe Abbildung 6 B). Auch bei den anderen Stimulationsfrequenzen ergab sich eine signifikante APD<sub>90</sub>-Verlängerung. Bei 1,0 Hz um 33,4  $\pm$  0,1% (n=5/5; P=0,04), bei 2 Hz um 31,7  $\pm$  0,1% (n=5/5; P<0,05) und bei 3,0 Hz um 32,4  $\pm$  0,1% (n=5/5; P<0,05).

Die Mittelwerte der APD<sub>90</sub> in ms sind in

Tabelle 14 abgebildet. Die korrespondierende Originalabbildung (siehe Abbildung 6 A) zeigt ebenfalls die Verlängerung der APD nach Zugabe von Dronedaron bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.



**Abbildung 6: Effekte von Dronedaron auf die APD im SR.**

**A:** Originalabbildung der AP-Messung, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von 1 Hz. Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von 0,3 μmol/L Dronedaron (grün). Die farbigen Punkte im AP stellen jeweils den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Darstellung der APD<sub>90</sub>-Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR nach Zugabe von 0,3 μmol/L Dronedaron (n=5/5), im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW ± SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt. \*P<0,05; \*\*\*\*P<0,0001

**Tabelle 14: Effekte von Dronedaron auf die APD<sub>90</sub> im SR.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen SR-Kardiomyozyten des rechten Atriums. Die Werte sind als MW ± SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) bei Zugabe von Dronedaron (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5) dargestellt.

Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Dronedaron ms	P-Wert
0,5	102,3 ± 21,3	138,4 ± 17,4	0,02 *
1,0	100,4 ± 17,5	133,9 ± 15,8	0,03 *
2,0	98,6 ± 15,2	129,8 ± 16,1	0,04 *
3,0	93,4 ± 15,3	123,6 ± 12,3	0,05 ns



---

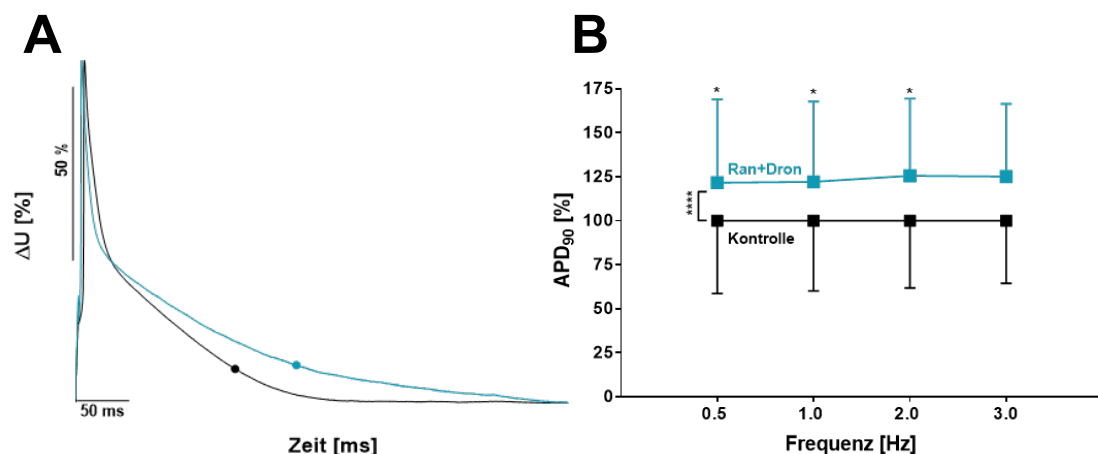
### 3.2.1.3 Effekte von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron auf die APD

Die Zugabe der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron (5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin und 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dronedaron) (Ran+Dron) verlängerte die  $\text{APD}_{90}$  von atrialen SR-Kardiomyozyten, im Vergleich zur Kontrolle, bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz signifikant um  $21,6 \pm 0,1\%$  ( $n=4/4$ ;  $P=0,02$ ; siehe Abbildung 7 B). Auch bei 1,0 und 2,0 Hz Stimulationsfrequenz ergab sich eine signifikante Verlängerung der APD um  $22,2 \pm 0,1\%$  ( $n=4/4$ ;  $P=0,04$ ) und um  $25,6 \pm 0,1\%$  ( $n=4/4$ ;  $P<0,05$ ). Die Verlängerung der APD bei 3,0 Hz Stimulationsfrequenz war mit  $25,1 \pm 0,1\%$  knapp nicht signifikant ( $n=4/4$ ;  $P=0,05$ ).

Vergleicht man die Verlängerung der  $\text{APD}_{90}$  durch Zugabe von Ranolazin allein im Vergleich zur Kombination von Ranolazin und Dronedaron, so zeigte dies keinen signifikanten Unterschied.

Die Verlängerung der  $\text{APD}_{90}$ , durch die Zugabe von Ran+Dron, ist auch in der korrespondierenden Originalabbildung (Abbildung 7 A) zu sehen. Sie wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz aufgezeichnet.

Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Tabelle 15 die Mittelwerte der APD-Messungen in Millisekunden bei den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen.



**Abbildung 7: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD im SR.**

**A:** Originalabbildungen der AP-Messungen, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von 1 Hz. Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron (türkis). Die farbigen Punkte im AP stellen jeweils den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Darstellung der  $APD_{90}$ -Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR nach Zugabe von der Kombination aus Ranolazin + Dronedaron (n=4/4) im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW  $\pm$  SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt. \*P<0,05; \*\*\*\*P<0,0001.

**Tabelle 15: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die  $APD_{90}$  im SR.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen Kardiomyozyten des rechten Atriums von Patient\*innen mit Sinusrhythmus. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM der  $APD_{90}$  (in ms) bei Zugabe von Ranolazin und Dronedaron (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5) dargestellt.

Frequenz Hz	$APD_{90}$ Kontrolle ms	$APD_{90}$ Ran+Dron ms	P-Wert
0,5	146,6 $\pm$ 42,9	178,3 $\pm$ 45,9	0,03 *
1,0	143,9 $\pm$ 40,5	175,8 $\pm$ 42,9	0,02 *
2,0	132,4 $\pm$ 35,8	166,2 $\pm$ 36,7	0,02 *
3,0	128,4 $\pm$ 32,3	160,6 $\pm$ 34,3	0,02 *

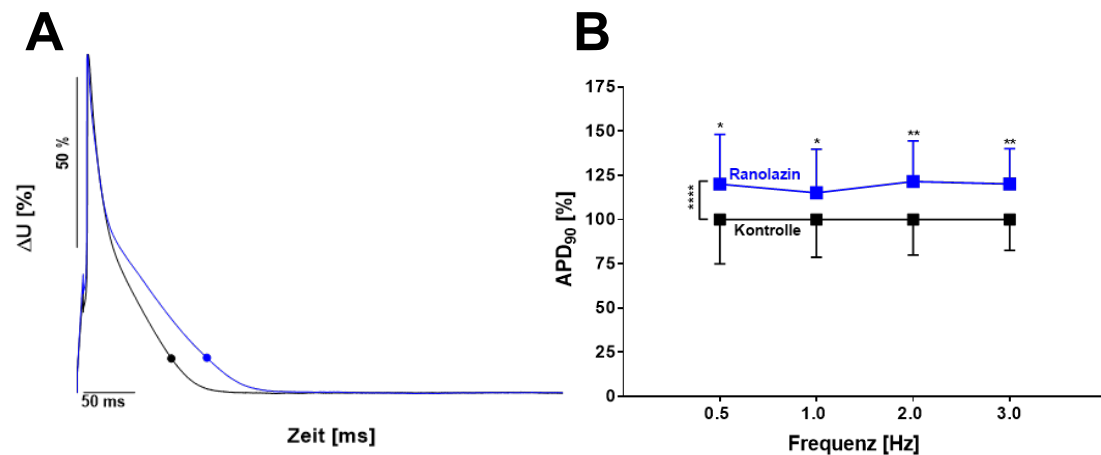
## 3.2.2 Effekte auf die Aktionspotentialdauer bei Vorhofflimmern

### 3.2.2.1 Effekte von Ranolazin auf die APD

Bei der Messung der  $APD_{90}$ , in humanen Kardiomyozyten des linken Atriums von Patient\*innen mit VHF, ergaben sich folgende Ergebnisse. Die  $APD_{90}$  hat sich nach Zugabe von  $5 \mu\text{mol/L}$  Ran, bei einer Stimulationsfrequenz von  $0,5 \text{ Hz}$ , im Vergleich zur Kontrolle um  $20,0 \pm 0,1\%$  signifikant verlängert ( $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen =  $6/6$ ;  $P=0,02$ ; siehe Abbildung 8 B). Ebenso verlängerte sich die APD auch bei einer Stimulationsfrequenz von  $1,0 \text{ Hz}$  um  $15,1 \pm 0,1\%$  ( $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen =  $6/6$ ;  $P=0,04$ ). Bei  $2,0 \text{ Hz}$  und  $3,0 \text{ Hz}$  verlängerte sich die APD sogar höchst signifikant (bei  $2,0 \text{ Hz}$  um  $21,6 \pm 0,1\%$ ;  $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen =  $6/6$ ;  $P=0,004$ ) (bei  $3,0 \text{ Hz}$  um  $20,2 \pm 0,1\%$ ;  $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen =  $6/6$ ;  $P<0,01$ ).

Die Verlängerung der  $APD_{90}$ , durch die Zugabe von Ranolazin, ist auch in der korrespondierenden Originalabbildung (Abbildung 8 A) zu sehen. Sie wurde bei einer Stimulationsfrequenz von  $1 \text{ Hz}$  aufgezeichnet.

Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Tabelle 16 die Mittelwerte der APD-Messungen in Millisekunden bei den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen.



**Abbildung 8: Effekte von Ranolazin auf die APD bei VHF.**

**A:** Originalabbildung der AP-Messung, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von  $1 \text{ Hz}$ . Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von  $5 \mu\text{mol/L}$  Ranolazin (dunkelblau), der farbige Punkt im AP stellt den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Darstellung der  $APD_{90}$ -Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF nach Zugabe von  $5 \mu\text{mol/L}$  Ranolazin ( $n=6/6$ ), im

Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW  $\pm$  SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001.

**Tabelle 16: Effekte von Ranolazin auf die APD<sub>90</sub> bei VHF.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen Kardiomyozyten des linken Atriums von Patient\*innen mit VHF. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) nach Zugabe von Ranolazin (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 6/6) dargestellt.

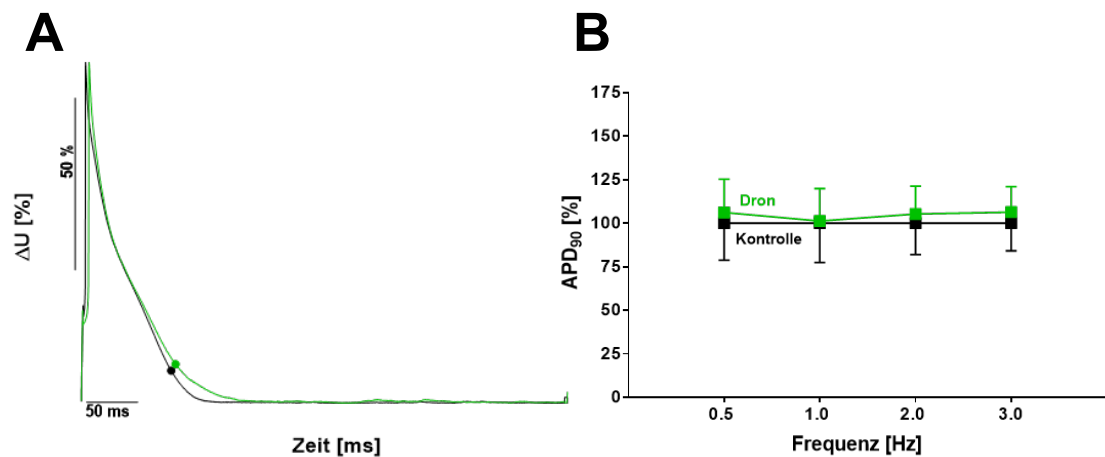
Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Ranolazin ms	P-Wert
0,5	128,3 $\pm$ 22,8	154,0 $\pm$ 23,6	0,004 **
1,0	128,3 $\pm$ 19,4	147,7 $\pm$ 22,5	0,034 *
2,0	118,5 $\pm$ 16,9	144,1 $\pm$ 17,8	0,004 **
3,0	120,2 $\pm$ 14,8	144,5 $\pm$ 15,9	0,006 *

### 3.2.2.2 Effekte von Dronedaron auf die APD

Durch Zugabe von 0,3  $\mu$ mol/L Dronedaron allein hat sich die APD<sub>90</sub> von linksatrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF in keiner der Stimulationsfrequenzen signifikant verändert (siehe Abbildung 9 B). Im Detail verlängerte sich die APD leicht bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, im Vergleich zur Kontrolle, um 6,2  $\pm$  0,05% (n=4/4; P=0,33). In den anderen Frequenzen kam es zu keiner stärkeren Veränderung.

Die Mittelwerte der APD<sub>90</sub> in ms sind in Tabelle 17 abgebildet.

Die korrespondierende Originalabbildung (siehe Abbildung 9 A) zeigt jeweils die APD vor und nach Zugabe von Dronedaron bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.



**Abbildung 9: Effekte von Dronedaron auf die APD bei VHF.**

**A:** Originalabbildung der AP-Messung, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von 1 Hz. Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dronedaron (grün). Die farbigen Punkte im AP stellen jeweils den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Darstellung der APD<sub>90</sub>-Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen linksatrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF nach Zugabe von 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dron ( $n=4/4$ ), im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW  $\pm$  SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt.

**Tabelle 17: Effekte von Dronedaron auf die APD<sub>90</sub> bei VHF.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen Kardiomyozyten des linken Atriums von Patient\*innen mit VHF. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) bei Zugabe von Dronedaron ( $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen = 4/4) dargestellt.

Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Dronedaron ms	P-Wert
0,5	157,7 $\pm$ 23,7	167,5 $\pm$ 16,6	0,98 ns
1,0	162,6 $\pm$ 25,9	164,6 $\pm$ 15,1	>0,99 ns
2,0	154,4 $\pm$ 19,7	162,5 $\pm$ 13,6	>0,99 ns
3,0	153,0 $\pm$ 17,1	162,7 $\pm$ 13,1	0,99 ns

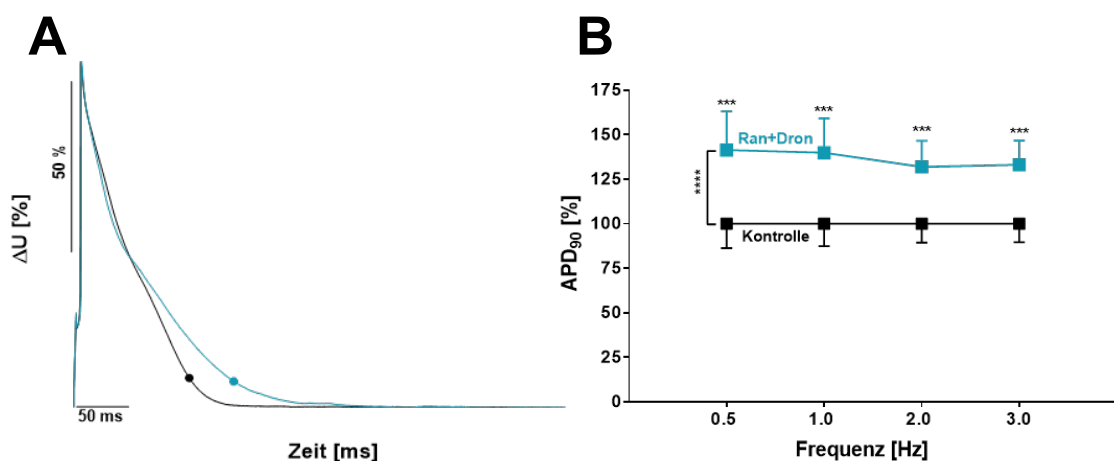
### 3.2.2.3 Effekte von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron auf die APD

Die Kombination von Ranolazin und Dronedaron hatte in allen Stimulationsfrequenzen eine deutliche und signifikante Verlängerung der APD<sub>90</sub> zur Folge (siehe Abbildung 10 B). Im Detail verlängerte sich die APD<sub>90</sub> bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz um  $41,4 \pm 0,1\%$  ( $n=8/8$ ;  $P=0,003$ ). Bei 1 Hz verlängerte sich die APD ebenfalls deutlich um  $39,9 \pm 0,1\%$  ( $n=8/8$ ;  $P=0,003$ ). Eine Verlängerung um  $31,9 \pm 0,1\%$  ( $n=8/8$ ;  $P=0,001$ ) fand bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz statt. Bei 3 Hz kam es zu einer Verlängerung um  $33,1 \pm 0,1\%$  ( $n=8/8$ ;  $P=0,0003$ ).

Zusätzlich war die Verlängerung der APD durch die Wirkstoffkombination aus Ranolazin und Dronedaron signifikant erhöht, verglichen mit der Verlängerung durch Ranolazin allein (Ran  $21,2 \pm 1,9\%$  vs. Ran+Dron  $37,0 \pm 2,1\%$ ;  $n=6$  vs.  $6$ ;  $P<0,05$ ).

Die Verlängerung der APD<sub>90</sub>, durch die Zugabe von Ran+Dron, ist auch in der korrespondierenden Originalabbildung (Abbildung 10 A) zu sehen. Sie wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz aufgezeichnet.

Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Tabelle 18 die Mittelwerte der APD-Messungen in Millisekunden bei den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen.



**Abbildung 10: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD bei VHF.**

**A:** Originalabbildungen der AP-Messungen, aufgetragen als Spannungsänderung gegen die Zeit, bei einer Frequenz von 1 Hz. Vor Zugabe der Substanzen (schwarz) und nach Zugabe von der Kombination von Ranolazin und Dronedaron (türkis). Die farbigen Punkte im AP stellen jeweils den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B:** Messungen der APD<sub>90</sub>-Veränderungen auf der Y-Achse (in %), in humanen linksatrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF, bei Zugabe von der Kombination von Ranolazin + Dronedaron (n=8/8) im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2,0 Hz und 3,0 Hz aufgetragen auf der X-Achse. Dargestellt sind jeweils der MW  $\pm$  SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt. \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001.

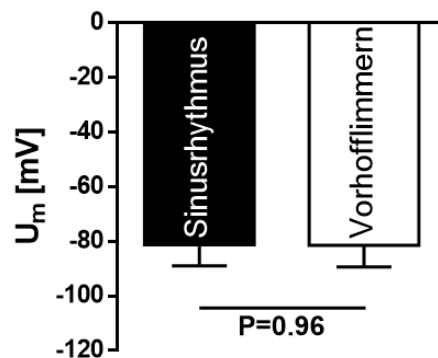
**Tabelle 18: Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf die APD<sub>90</sub> bei VHF.**

Mittelwerte der APD-Messungen in humanen Kardiomyozyten des linken Atriums von Patient\*innen mit VHF. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) nach Zugabe von Ranolazin und Dronedaron (n Kardiomyozyten/Patient\*innen = 8/8) dargestellt.

Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Ran+Dron ms	P-Wert
0,5	91,4 $\pm$ 8,8	129,3 $\pm$ 15,5	< 0,0001 ****
1,0	91,0 $\pm$ 8,1	127,3 $\pm$ 13,6	< 0,0001 ****
2,0	89,6 $\pm$ 6,7	118,2 $\pm$ 9,7	0,0009 ***
3,0	87,5 $\pm$ 6,4	116,5 $\pm$ 8,2	0,0008 ***

### 3.2.3 Effekt auf das Ruhemembranpotential

Ebenfalls interessiert der Effekt, den die einzelnen Substanzen jeweils auf das RMP der Zelle hatten. Zunächst wurden jedoch die unterschiedlichen Patient\*innenkollektive miteinander verglichen. Hier ist zu beachten, dass die Kardiomyozyten bei SR aus dem rechten Atrium (RA) stammten und die Kardiomyozyten bei VHF aus dem linken Atrium (LA). Im direkten Vergleich des RMP von Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit SR und VHF zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Werte des RMP als MW  $\pm$  SEM: RA Kontrolle SR - 81,3  $\pm$  2,0 mV; LA Kontrolle VHF: - 81,4  $\pm$  1,9 mV; n=14/18).

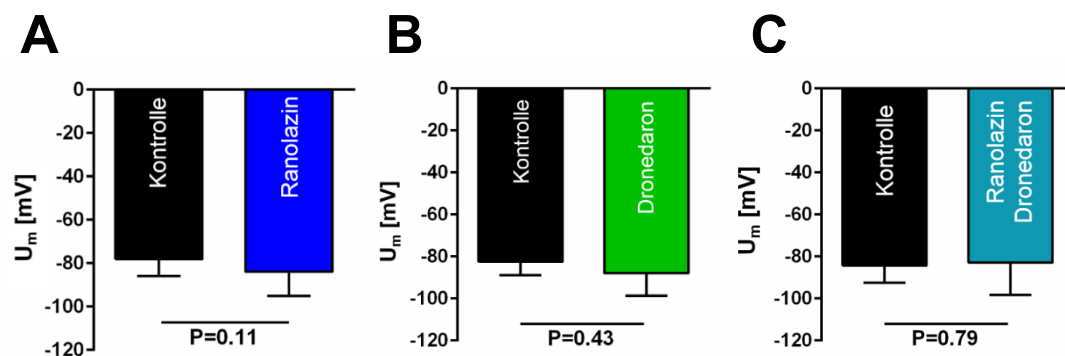


**Abbildung 11: Vergleich der Ruhemembranpotentiale.**

Vergleich der RMP ( $U_m$  [mV] aufgetragen auf der Y-Achse) von Patient\*innen mit SR und VHF.

### 3.2.3.1 Effekte der Substanzen auf das Ruhemembranpotential im Sinusrhythmus

Das RMP in humanen Kardiomyozyten des RA von Patient\*innen mit SR hat sich durch die Zugabe von 5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert ( $n$  Kardiomyozyten/Patient\*innen = 5/5; Abb. A). Ebenso war, bei der Zugabe von 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dronedaron ( $n=5/5$ ; Abb. B) und auch durch Zugabe der Kombination von Ranolazin und Dronedaron ( $n=4/4$ ; Abb. C) im Vergleich zur Kontrollgruppe, kein signifikanter Unterschied zu vermerken. Es lässt sich also zusammenfassen, dass keiner der Wirkstoffe eine signifikante Veränderung des RMP bei Kardiomyozyten des RA bei Patient\*innen mit SR bewirkt hat.



**Abbildung 12: RMP Messungen von rechtsatrialen Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit SR.**

Jeweils RMP (als  $U_m$  in mV) als Mittelwert  $\pm$  SEM bei Zugabe von: (A) 5  $\mu\text{mol/L}$  Ran ( $n=5/5$ ), (B) 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dron ( $n=5/5$ ), (C) der Kombination von Ran+Dron ( $n=4/4$ ), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die RMP Messungen wurde der gepaarte Student's t-test benutzt.

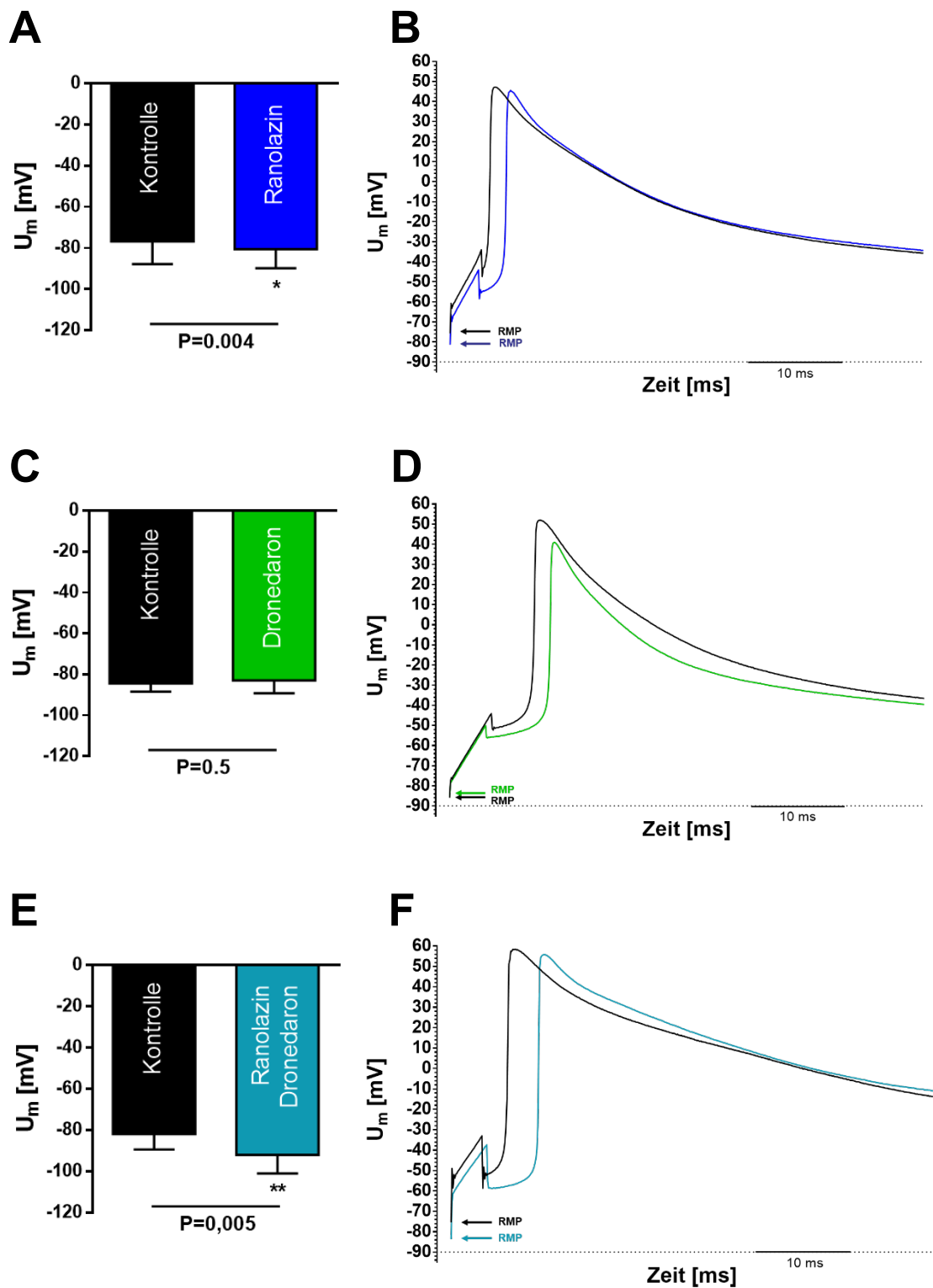


---

### 3.2.3.2 Effekte der Wirkstoffe auf das Ruhemembranpotential bei Vorhofflimmern

In humanen Kardiomyozyten des LA von Patient\*innen mit Vorhofflimmern ist das RMP durch die Zugabe von 5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin im Vergleich zur Kontrolle signifikant hyperpolarisiert ( $n=5/5$ ;  $-76,8 \pm 4,9$  mV Kontrollgruppe vs.  $-80,6 \pm 4,2$  mV Ranolazin;  $P=0,004$ ; Abbildung 13 A). Noch deutlicher war eine signifikante Hyperpolarisation bei der Zugabe von der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron zu verzeichnen ( $n=7/7$ ;  $-81,9 \pm 2,8$  mV Kontrolle vs.  $-92,0 \pm 3,4$  mV Ran+Dron;  $P=0,005$ ; Abbildung 13 E). Dronedaron allein hingegen sorgte für keine signifikante Hyperpolarisation im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=5/5$ ;  $-84,4 \pm 1,8$  mV Kontrollgruppe vs.  $-82,9 \pm 2,8$  mV Dronedaron;  $P=0,5$ ; Abbildung 13 C).

Die Abbildung 13 B, D und F zeigen korrespondierende repräsentative Originalabbildungen des Aufstrichs der AP und die jeweilige Verschiebung des RMP.



**Abbildung 13: RMP Messungen an linksatrialen Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit VHF.**

**A, C, E:** Messungen der RMP von humanen atrialen Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit VHF (RMP als  $U_m$  in mV auf der Y-Achse gegen die jeweilige Interventionsgruppe auf der X-

---

Achse). Jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM bei Zugabe von: (A) 5  $\mu\text{mol/L}$  Ran ( $n=5/5$ ; dunkelblau), (C) 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dron ( $n=5/5$ ; grün), (E) der Kombination von Ran+Dron ( $n=7/7$ ; türkis), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz). Für die RMP Messungen wurde der gepaarte Student's t-test benutzt. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ .

**B, D, F:** Korrespondierende Originalabbildungen des Aufstrichs der AP mit ihrem jeweiligen RMP und dessen Verschiebung.

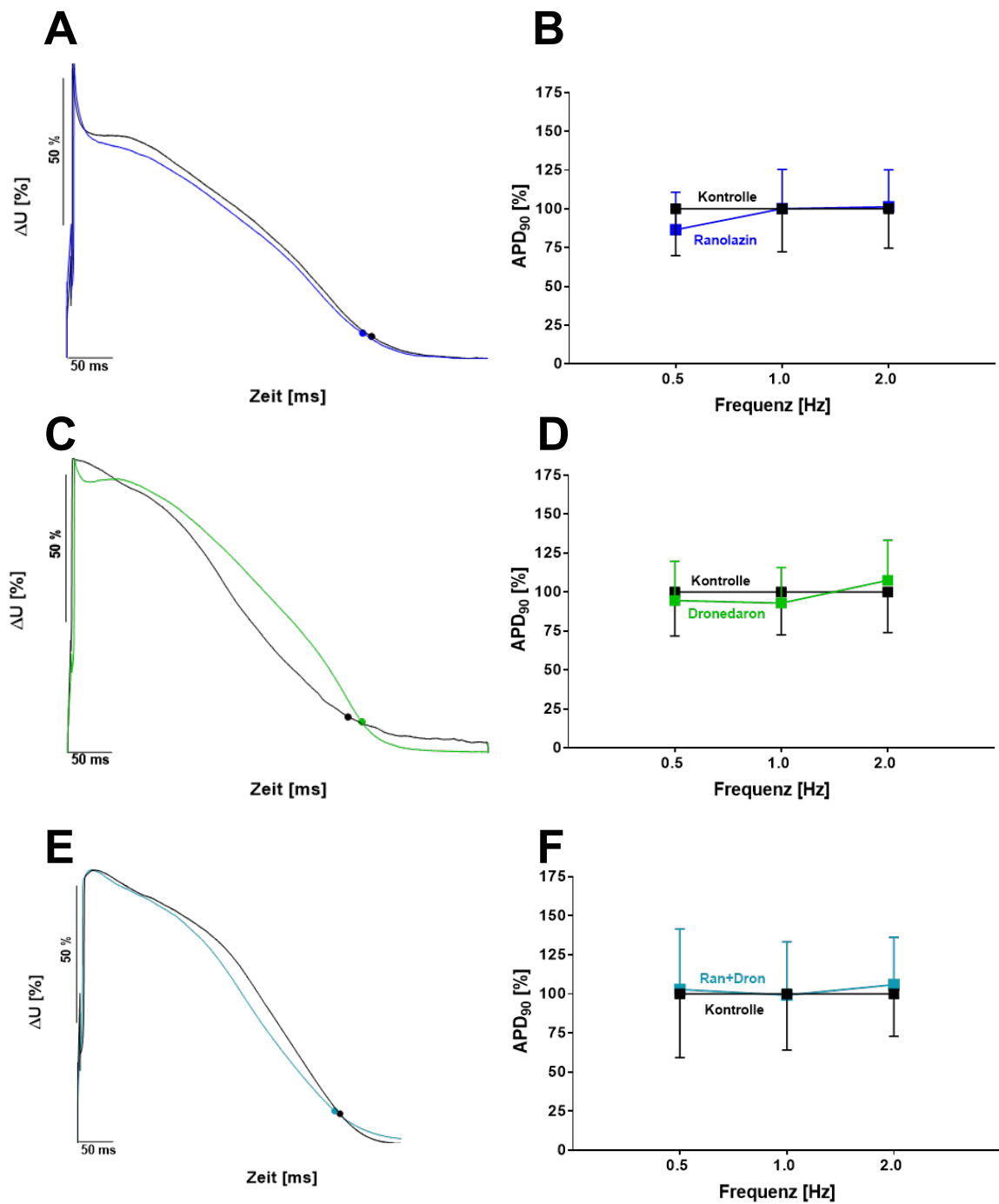
### **3.3 Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron auf humane ventrikuläre Kardiomyozyten**

#### **3.3.1 Effekte auf die Aktionspotentialdauer in ventrikulären Kardiomyozyten**

Die ventrikulären  $\text{APD}_{90}$ -Messungen erfolgten an humanen Kardiomyozyten des linken Ventrikels von Patient\*innen mit Herzinsuffizienz im Endstadium (für genauere Informationen zum Patient\*innenkollektiv siehe

Tabelle 12). Der Ablauf war analog zu den atrialen Kardiomyozyten, allerdings konnten die ventrikulären Kardiomyozyten nur bis zu einer Stimulationsfrequenz von 2,0 Hz stimuliert werden. Bei höheren Frequenzen wurde ein Großteil der ventrikulären Kardiomyozyten apoptotisch.

Zusammengefasst zeigte sich im Gegensatz zu den Effekten im Vorhof, dass weder die Zugabe von 5  $\mu\text{mol/L}$  Ranolazin, noch die Zugabe von 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dronedaron oder der Kombination von den beiden Wirkstoffen die APD bei einer der Stimulationsfrequenzen, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant veränderte (Ran:  $n=6/6$ ; Dron:  $n=4/4$ ; Ran+Dron:  $n=5/5$ ; Abbildung 14 B, D, F). Abbildung 14 A, C und E zeigen repräsentative Originalabbildungen von AP humaner ventrikulärer Kardiomyozyten bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz und Tabelle 19 zeigt die Mittelwerte der  $\text{APD}_{90}$ -Messungen (in ms).



**Abbildung 14: Messungen der APD<sub>90</sub> an humanen ventrikulären Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit HI im Endstadium.**

**A, C, E:** Originalabbildungen der AP-Messungen bei einer Frequenz von 1 Hz vor Zugabe der Medikamente und nach Zugabe von: (A) 5  $\mu\text{mol/L}$  Ran, (C) 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dron, (E) der Kombination von Ran+Dron.

Die Punkte im AP stellen jeweils den Punkt der 90%igen Repolarisation dar.

**B, D, F:** Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz auf der X-Achse. Jeweils MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub>-Veränderungen auf der Y-Achse (in %) bei Zugabe von: (B) 5  $\mu$ mol/L Ran (n=6/6; dunkelblau), (D) 0,3  $\mu$ mol/L Dron (n=4/4; grün), (F) der Kombination von Ran+Dron (n=5/5; türkis) im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz). Die statistischen Auswertungen wurden mit 2-way RM-ANOVA und Bonferroni post-test durchgeführt.

**Tabelle 19: Mittelwerte der APD<sub>90</sub>-Messungen an humanen Kardiomyozyten des linken Ventrikels von Patient\*innen mit HI im Endstadium.**

Die Werte sind MW  $\pm$  SEM der APD<sub>90</sub> (in ms) bei Zugabe von Ranolazin (n=6/6), Dronedaron (n=4/4) und der Kombination aus Ranolazin und Dronedaron (n=5/5).

Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Ranolazin ms	P-Wert
0,5	289,3 $\pm$ 61,8	250,3 $\pm$ 44,7	0,69 ns
1,0	270,3 $\pm$ 52,9	270,4 $\pm$ 43,5	>0,99 ns
2,0	244,4 $\pm$ 43,9	247,7 $\pm$ 37,6	>0,99 ns

Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Dronedaron ms	P-Wert
0,5	277,3 $\pm$ 55,4	262,2 $\pm$ 46,5	>0,99 ns
1,0	281,1 $\pm$ 54,7	261,1 $\pm$ 39,2	>0,99 ns
2,0	218,8 $\pm$ 40,4	235,1 $\pm$ 36,2	>0,99 ns

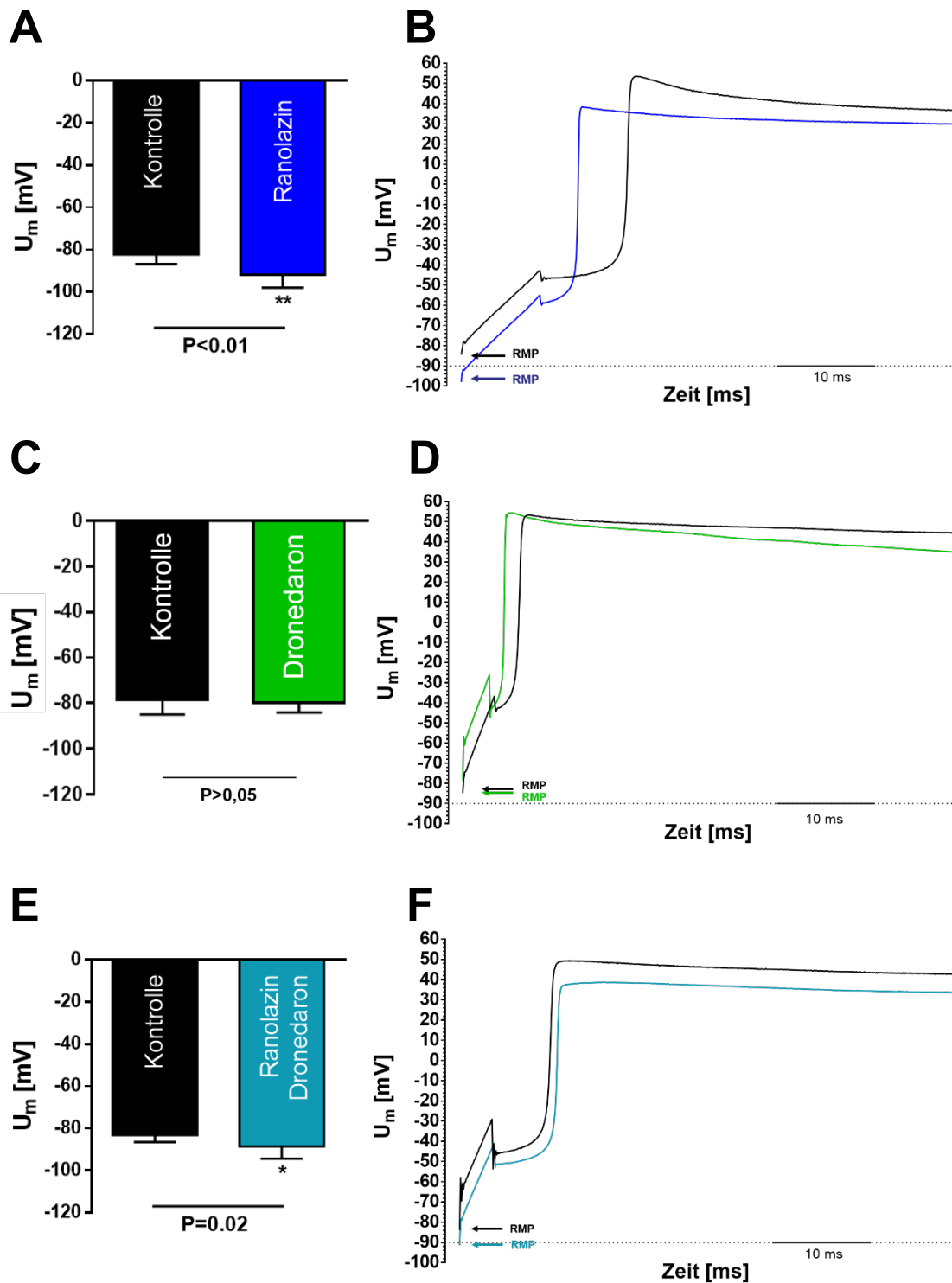
Frequenz Hz	APD <sub>90</sub> Kontrolle ms	APD <sub>90</sub> Ran+Dron ms	P-Wert
0,5	300,6 $\pm$ 86,9	309,0 $\pm$ 74,7	>0,99 ns
1,0	289,0 $\pm$ 73,3	286,9 $\pm$ 66,3	>0,99 ns
2,0	238,3 $\pm$ 45,8	252,3 $\pm$ 53,7	>0,99 ns

### 3.3.2 Effekte auf das Ruhemembranpotential in ventrikulären Kardiomyozyten

In humanen ventrikulären Kardiomyozyten von Patient\*innen mit Herzinsuffizienz im Endstadium zeigte sich ein gleichsinniger Effekt auf das RMP wie bei den atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit Vorhofflimmern. Durch die Zugabe von 5  $\mu$ mol/L Ranolazin, wie auch durch die Zugabe von 5  $\mu$ mol/L Ranolazin in Kombination mit 0,3  $\mu$ mol/L Dronedaron, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Hyperpolarisation des RMP (- 82,3  $\pm$  2,3 mV Kontrolle vs. - 91,9  $\pm$  3,0 mV

Ran; n=4/4; P=0,001; Abbildung 15 A) (- 83,2 ± 1,5 mV Kontrolle vs. - 88,5 ± 2,6 mV Ran+Dron; n=5/5; P=0,02; Abbildung 15 E). Nur durch die Zugabe von Dronedaron allein ließ sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielen (- 78,6 ± 3,2 mV Kontrolle vs. 79,7 ± 2,2 mV Dronedaron; n=4/4; n.s.; Abbildung 15 C).

Die Abbildung 15 B, D und F zeigen korrespondierende repräsentative Originalabbildungen vom Aufstrich der APs und die jeweilige Verschiebung des RMP bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.



**Abbildung 15: Messungen der RMP von humanen ventrikulären Kardiomyozyten bei Patient\*innen mit HI im Endstadium.**

**A, C, E:** RMP als  $U_m$  in mV auf der Y-Achse gegen die jeweilige Interventionsgruppe auf der X-Achse. Jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM des RMP bei Zugabe von: (A) 5  $\mu$ mol/L Ran ( $n=4/4$ ;

dunkelblau), (C) 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dron (n=4/4; grün), (E) der Kombination von Ran+Dron (n=5/5; türkis), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (schwarz).

**B, D, F:** zeigen korrespondierende Originalabbildungen vom Aufstrich der AP mit ihrem jeweiligen RMP und deren Verschiebung, \*P<0,05; \*\*P<0,01



---

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass im SR die APD von humanen atrialen Kardiomyozyten durch Ranolazin (5  $\mu\text{mol/L}$ ), Dronedaron (0,3  $\mu\text{mol/L}$ ) und durch die Kombination dieser Substanzen signifikant verlängert wird.

In atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF konnte Ranolazin allein, mehr jedoch noch in Kombination mit Dronedaron, eine signifikante Verlängerung der APD erzielen. Da die APD und damit die effektive Refraktärzeit (ERZ) bei VHF typischerweise verkürzt ist (Attuel et al. 1982; Boutjdir et al. 1986; Daoud et al. 1996; Franz et al. 1997), ist diese Verlängerung ein möglicher antiarrhythmischer Effekt. Ebenso konnte Ranolazin hier allein, wie auch in Kombination mit Dronedaron, eine Hyperpolarisation des atrialen RMP erzeugen. Auch dies kann als membranstabilisierender – und somit antiarrhythmischer – Effekt verstanden werden. Bei der Anwendung von Dronedaron allein, blieb die Hyperpolarisation aus. Bei linksventrikulären Kardiomyozyten von Patient\*innen mit terminaler Herzinsuffizienz zeigte sich weder durch Ranolazin noch Dronedaron oder die Kombination beider Medikamente eine signifikante Veränderung der APD. Eine Verlängerung der ventrikulären APD wird üblicherweise mit einer Gefahr für ventrikuläre Arrhythmien in Zusammenhang gebracht, sodass das Ausbleiben einer solchen Verlängerung als positiv bezüglich des Sicherheitsprofils gewertet wurde. In den vorliegenden Messungen wurde allerdings auch nicht zwischen den verschiedenen ventrikulären Zelltypen unterschieden. Zusätzlich zeigte sich, ähnlich wie bei den atrialen Kardiomyozyten, eine Hyperpolarisation des RMP der ventrikulären Kardiomyozyten durch Ranolazin und die Kombination beider Medikamente, nicht jedoch durch Dronedaron allein. Auch dieser Effekt wurde als potenziell membranstabilisierend gewertet.

### 4.1 Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron in atrialen Kardiomyozyten

Zunächst soll festgehalten werden, dass es nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die unterschiedlichen Formen von VHF zu unterscheiden (paroxysmal, persistierend oder permanent). Vielmehr war unsere Arbeitsgruppe daran interessiert ein realistisches Kollektiv von Patient\*innen zu erhalten, die in der täglichen klinischen

Praxis einer anti-arrhythmischen Behandlung bedürfen. Eine signifikante Anzahl der Patient\*innen aus unserem Kollektiv mit VHF erhielt bereits eine frequenzlimitierende Therapie mit einem Betablocker oder Herzglykosid. Die Ejektionsfraktion (EF) der Patient\*innen mit SR und VHF war wiederum maximal leicht bis mittelgradig eingeschränkt (siehe Tabelle 12: Patient\*innenkollektiv).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ranolazin (5  $\mu\text{mol/L}$ ) die APD humaner atrialer Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR und mit VHF signifikant verlängert. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits an einem *in-vitro* Hundemodell gezeigt (Burashnikov et al. 2007). Es ist bekannt, dass Ranolazin eine Reihe von verschiedenen Ionenkanälen hemmt, darunter  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ , den *peak*  $I_{Na}$ , den *late*  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Na-Ca}$  (Antzelevitch et al. 2004; Burashnikov et al. 2007). Die von uns beobachtete APD Verlängerung in humanen atrialen Kardiomyozyten scheint vor allem durch eine verstärkte Hemmung des atrialen Nettoausstroms bedingt zu sein, (am ehesten durch  $I_{Kr}$ ) (Antzelevitch et al. 2011; Burashnikov et al. 2004) wodurch sich die Repolarisation in der Plateauphase des APs verzögert. Die Verlängerung der Plateauphase und damit des APs führt zu einer Verlängerung der effektiven Refraktärzeit (ERZ), was zu einer Verringerung der atrialen Erregbarkeit führt. Hierdurch lässt sich eine geringere Anfälligkeit für eine gestörte Erregungsbildung oder -weiterleitung und dadurch auch die VHF-senkende Wirkung erklären (Aguilar et al. 2015; Burashnikov et al. 2015; Burashnikov et al. 2007).

In atrialen Hundekardiomyozyten führte Ranolazin durch die Hemmung des *peak*  $I_{Na}$  ebenfalls zu einer signifikanten Verlängerung der ERZ und somit zu einer Reduktion des VHF (Burashnikov et al. 2007). Ergänzend zu den Effekten auf zellulärer Ebene zeigten Miles und Murdock 2011 in einer kleineren retrospektiven Kohortenstudie, dass Ranolazin das erneute Auftreten von VHF bei Patient\*innen nach koronarer Bypass-Operation im Vergleich zu Amiodaron signifikant reduziert (Miles et al. 2011).

Dronedaron blockiert ebenfalls multiple Ionenkanäle (schnelle und langsame  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{K,Ach}$ ). Somit hängt der Effekt von Dronedaron auf die APD auch hier vom Nettoeffekt der ein- und auswärtsströmenden Ionen ab. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der klinisch relevanten und niedrig gehaltenen Konzentration von 0,3  $\mu\text{mol/L}$  Dronedaron eine signifikante APD-Verlängerung in humanen atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR, nicht jedoch bei Patient\*innen mit VHF. In

einer früheren Studie konnte an atrialen Kaninchen-Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Effekte von Dronedaron auf die APD dosisabhängig sind. Hierbei kam es in niedriger Dosierung (0,1  $\mu\text{mol/L}$  und 1  $\mu\text{mol/l}$ ) zu keinen signifikanten APD-Veränderungen, eine höhere Dosierung von 10  $\mu\text{mol/L}$  hingegen verursachte eine signifikante Verkürzung der APD (Sun et al. 2002).

Die Kombinationstherapie aus Ranolazin und Dronedaron führt in atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR, noch mehr jedoch bei der typischerweise verkürzten APD bei Patient\*innen mit VHF, zu einer signifikanten Verlängerung der APD. In Vorarbeiten von Burashnikov et al. konnten diese Effekte ebenfalls gezeigt werden. Hierbei konnte an atrialen Hundekardiomyozyten ein synergistischer Effekt der Kombination aus Dronedaron (10  $\mu\text{mol/L}$ ) und Ranolazin (5  $\mu\text{mol/l}$ ) gezeigt werden, resultierend in einer atrium-spezifischen Verlängerung der ERZ, welche jedoch von keiner bzw. nur einer kleinen Änderung der atrialen APD begleitet war (Burashnikov et al. 2010). Es ist jedoch zu beachten, dass die Dronedaronkonzentration in diesem Modell weit oberhalb der klinischen relevanten Konzentration lag und die Hunde in diesem Model nicht an VHF litten. Hier fehlt also der wichtige Aspekt des „elektrischen *Remodeling*“, welches in unserem Patient\*innenkollektiv vorlag.

Zudem wurde in einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe eine Verlängerung der  $\text{APD}_{90}$  durch Ranolazin allein festgestellt, welche mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmen (Burashnikov et al. 2007).

Interessanterweise ließen sich die positiven Ergebnisse durch die Substanzkombination aus Ranolazin und niedrig dosiertem Dronedaron auch im Rahmen einer randomisierten, kontrollierten klinischen Phase-II-Studie mit 131 eingeschlossenen Patient\*innen nachweisen (*HARMONY Trial*). Hierbei konnte die VHF-Last durch die Kombinationstherapie aus Ranolazin (750 mg zweimal täglich) mit niedrig dosiertem Dronedaron (150 mg oder 225 mg zweimal täglich) signifikant reduziert werden vor allem im Vergleich zur Therapie mit Ranolazin oder Dronedaron allein (Reiffel et al. 2015a).

In unseren Ergebnissen zeigte sich bei den APD-Messungen an atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR kein signifikanter Unterschied zwischen der Kombination von Ranolazin und Dronedaron, verglichen mit Ranolazin allein. Bei

Messungen von atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF hingegen, war die Verlängerung der  $APD_{90}$  durch die Substanzkombination, derer durch Ranolazin allein, signifikant überlegen. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Kombination von Ranolazin und Dronedaron, gerade bei VHF, potenziell überlegen ist, was die APD-Verlängerung angeht und somit einen besseren Schutz gegen VHF als die jeweiligen Einzelsubstanzen bieten könnte.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Ranolazin zu einer Hyperpolarisation der atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF führt. Auch in einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Ranolazin ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) in spontan schlagenden Kardiomyozyten von Meerschweinchen, eine Hyperpolarisation von ungefähr  $5 \text{ mV}$  verursachte (Song et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für die Hyperpolarisation durch Ranolazin ist die Hemmung des *late*  $I_{\text{Na}}$ . Dronedaron allein veränderte das RMP in atrialen Kardiomyozyten, in der vorliegenden Arbeit, nicht. Die Kombination von Ranolazin und Dronedaron wiederum zeigte eine potente Hyperpolarisation in atrialen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit VHF. Diese Hyperpolarisation könnte möglicherweise ebenfalls eine Ursache des antiarrhythmischen Effekts der Medikamentenkombination sein, da es zu einer elektrischen Stabilisierung der Kardiomyozyten führen könnte.

Andere Arbeiten berichteten, dass insbesondere die simultane Inhibition des  $I_{\text{Kr}}$  und, spezifisch im Bereich des Atriums, auch des *peak*  $I_{\text{Na}}$  durch Ranolazin, zu einer Verlängerung der ERZ führen. Die dadurch verursachte Verringerung der atrialen Erregbarkeit könnte somit das Risiko für Rhythmusstörungen reduzieren (Aguilar et al. 2015; Burashnikov et al. 2015; Burashnikov et al. 2007). Darüber hinaus soll dieser synergistische Effekt auf  $I_{\text{Kr}}$  und *peak*  $I_{\text{Na}}$  bei einer Kombination von Ranolazin und Dronedaron, noch ausgeprägter sein (Antzelevitch et al. 2011; Burashnikov et al. 2010).

Die atrium-spezifische Blockade des *peak*  $I_{\text{Na}}$  durch Ranolazin wird durch eine unterschiedliche atriale und ventrikuläre Elektrophysiologie, wie z.B. ein weniger negatives RMP im Atrium, verursacht (Burashnikov et al. 2007). Daher entschieden wir uns auch, das basale RMP von atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten zu vergleichen. Wir konnten zeigen, dass das RMP in ventrikulären Kardiomyozyten tatsächlich negativer ist als das in atrialen Muskelzellen. Zudem wurde in früheren

---

Studien gezeigt, dass der Natriumkanal im Atrium eine negativere wiederkehrende Inaktivierungsspannung (*steady state inactivation voltage*) als im Ventrikel hat (Burashnikov et al. 2007; Caves et al. 2017). Die Konsequenz ist, dass sich ein höherer Anteil von Natriumkanälen, bei dem im Vorhof vorkommenden weniger negativen RMP, im inaktiven Stadium befindet. Eine Theorie zur Inhibition des *peak*  $I_{Na}$  besagt, dass Ranolazin einen inaktivierten Natriumkanal präferiert blockiert (Burashnikov et al. 2007; Caves et al. 2017). Daraus ergibt sich eine wesentlich wahrscheinlichere und ausgeprägtere Hemmung des *peak*  $I_{Na}$  im Atrium als im Ventrikel. Daraus folgt eine deutliche Verlängerung der ERZ im Atrium, nicht aber im Ventrikel. Dies führt atriumspezifisch zu einer verminderten Erregbarkeit und könnte dadurch für eine Reduktion der VHF-Last sorgen (Burashnikov et al. 2007).

Zusammengefasst wird vermutet, dass eine Multi-Kanal-Blockade durch Ranolazin und Dronedaron, wie in unseren durchgeführten Messungen und der HARMONY-Studie, einen potenziellen und potenten Ansatz zur antiarrhythmischen Therapie des VHF liefern könnte (Aguilar et al. 2015; Reiffel et al. 2015a).

## **4.2 Elektrophysiologische Effekte von Ranolazin und Dronedaron in ventrikulären Kardiomyozyten**

In der vorliegenden Studie veränderten, weder Ranolazin oder Dronedaron noch die Kombination der Substanzen, die APD von linksventrikulären Kardiomyozyten von Patient\*innen mit terminaler Herzinsuffizienz. Da APD-Veränderungen am Ventrikel proarrhythmogen wirken können, wurde dies als potenzieller positiver Aspekt zum Sicherheitsprofil der Substanzkombination gewertet. Auch in früheren Arbeiten an anderen Spezies (Hund, Meerschweinchen) wurde keine Veränderung der ventrikulären APD festgestellt (Burashnikov et al. 2007; Burashnikov et al. 2010; Gautier et al. 2003). Der Effekt auf die ventrikuläre APD ist natürlich, wie auch am Vorhof, durch die Summe des Einwärts- und Auswärtsstromes bedingt. Zusätzlich ist die APD sowohl vom Zelltyp als auch von der Zellkondition abhängig. Mid-myokardiale (M) Zellen und Purkinjezellen haben beispielsweise eine längere APD als epikardiale Zellen, und bei ihnen wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass Ranolazin die APD verkürzt (Antzelevitch et al. 2004). Dieser Effekt rührt daher, dass in diesen Zelltypen ein kleinerer, langsam aktivierender verzögert gleichrichtender Strom ( $I_{Ks}$ ) (Kirchhof et al.) fließt und zudem ein größerer *late*  $I_{Na}$  (Liu und Antzelevitch

1995; Zygmunt et al. 2001). Daher ist in diesen Zellen der Effekt von Ranolazin auf den *late*  $I_{Na}$  im Vergleich zum  $I_{Ks}$  stärker ausgeprägt, was insgesamt zu einer Verkürzung der APD führt. Ranolazin und Dronedaron hatten möglicherweise in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Effekt auf die APD, weil nicht zwischen den unterschiedlichen Zelltypen unterschieden wurde. Eine andere Möglichkeit der Erklärung wäre jedoch, dass die multi-Kanal-Blockierungen durch Ranolazin und Dronedaron insgesamt keinen Effekt auf die APD hatten, da sich ihre Effekte auf den späten  $I_{Na}$  und  $I_{Ks}$  gegenseitig aufheben könnten.

Da die Inhibition von nach außen gerichteten Kaliumströmen mit einer Verlängerung der ventrikulären Repolarisation verbunden ist, kann es hierbei zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für sekundäre Depolarisationen, wie EADs und DADs kommen. Diese wiederum können zu ektopten ventrikulären Schlägen führen, welche in der Folge Torsade de Pointes Tachykardien auslösen könnten (Vincent et al. 1999). Eine zeitgleiche Inhibition von Einwärts- und Auswärtsströmen durch einen Multi-Kanal-Blocker könnte solche arrhythmogenen Auslöser möglicherweise verhindern. Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass die Kombination von Ranolazin und Dronedaron in ventrikulären Herzmuskelzellen von Hunden nicht zu einer Verlängerung der effektiven Refraktärzeit führt (Burashnikov et al. 2010). In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass es durch die Substanzkombination aus Ranolazin und Dronedaron keinen negativen Effekt auf die Repolarisation oder die Erregbarkeit der Ventrikel gibt (Burashnikov et al. 2010).

Zudem hat die Substanz Ranolazin wahrscheinlich noch einen ausgleichenden Effekt auf die heterogene Repolarisation in den einzelnen ventrikulären Zelltypen. So wurde in verschiedenen Arbeiten beobachtet, dass die Hemmung des *late*  $I_{Na}$  durch Ranolazin die Heterogenität der Repolarisation in den einzelnen Zelltypen vermindert (Antzelevitch und Belardinelli 2006). Dies wiederum ist wichtig, weil Arrhythmien beispielsweise durch eine raumzeitliche Heterogenität der Repolarisation und der Erregungsleitungsgeschwindigkeit verursacht werden können. Eine Verringerung der Heterogenität könnte also eine antiarrhythmische Eigenschaft bedeuten. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des *late*  $I_{Na}$  ventrikuläre Torsade de pointes Tachykardien verhindern kann (Shimizu und Antzelevitch 1997; Sossalla et al. 2014). Darüber hinaus konnte an humanen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit Herzinsuffizienz und somit erhöhtem *late*  $I_{Na}$ ,

gezeigt werden, dass Ranolazin die APD-Variabilität verringert (Maltsev et al. 2007). In einem Rattenmodell mit Kammerflimmern wurde beobachtet, dass Ranolazin Reentry-Mechanismen unterdrücken kann (Morita et al. 2011).

In der o.g. HARMONY-Studie wurde festgestellt, dass die Kombination von Ranolazin und niedrig dosiertem Dronedaron keinen signifikanten Einfluss auf das QRS-Intervall oder die QT<sub>c</sub>-Zeit hatten (Reiffel et al. 2015b), was ebenfalls eine Protektion vor ventrikulären Arrhythmien zur Folge haben könnte. Dies könnte ein klinisch bedeutsames Sicherheitsprofil der Substanzkombination bedeuten.

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass die Kombination von Ranolazin und Dronedaron keinen signifikanten Einfluss auf die APD und dadurch einen ausgleichenden bzw. einen stabilisierenden Effekt auf die zelluläre ventrikuläre Repolarisation bei Patient\*innen mit terminaler Herzinsuffizienz hat. Hieraus ergibt sich unserer Meinung nach ein wichtiges Sicherheitsprofil. Zudem zeigen unsere Ergebnisse, ähnlich wie schon im Vorhof, eine Hyperpolarisation des RMP der ventrikulären Herzmuskelzellen durch Ranolazin und durch die Kombination von Ranolazin und Dronedaron, nicht jedoch durch Dronedaron allein, was die Kombination favorisieren würde. Wie auch im Atrium könnte man argumentieren, dass ein negativeres RMP zu einer elektrischen Stabilisation der Zellen führt, was wiederum vor arrhythmogener Aktivität schützen könnte.

### **4.3 Klinische Relevanz**

Wie bereits erläutert, sind die aktuell vorhandenen medikamentösen Therapieoptionen für VHF durch kardiale und extrakardiale Nebenwirkungen, mangelnde effektive Wirksamkeit sowie fehlenden Optionen bei Patient\*innen mit struktureller Herzerkrankung limitiert. Die Inzidenz von VHF steigt in der aktuell alternden Bevölkerung weiter an, weshalb bessere und sicherere Therapieoptionen, insbesondere auch für Patient\*innen mit struktureller Herzerkrankung, dringend benötigt werden. Amiodaron, welches bisher eine der wenigen Optionen für Patient\*innen mit struktureller Herzerkrankung war, ist mit ausgeprägten kardialen und extrakardialen Nebenwirkungen, z.B. Organtoxizität im Bereich von Schilddrüse, Lunge, Haut und Auge behaftet (Vassallo und Trohman 2007). Neue

antiarrhythmische Medikamente, mit einem besseren Sicherheitsprofil, würden also einen großen medizinischen Fortschritt bedeuten.

Ranolazin ist bereits zur Behandlung von chronischer Angina pectoris zugelassen (Chaitman et al. 2004; Stone et al. 2010). Das Sicherheitsprofil von Ranolazin ist sowohl für eine akut-Behandlung als auch für eine Langzeitbehandlung günstig, sogar bei Patient\*innen mit struktureller Herzerkrankung (Karwatowska-Prokopczuk et al. 2013; Morrow und Scirica und Karwatowska-Prokopczuk und Murphy und Budaj und Varshavsky und Wolff und Skene und McCabe und Braunwald und et al. 2007; Morrow et al. 2010; Scirica et al. 2010). Insbesondere in der MERLIN-TIMI 36 Studie konnte die Sicherheit der Langzeitbehandlung mit Ranolazin an Patient\*innen mit akutem Koronarsyndrom ohne ST-Strecken-Hebungen gezeigt werden (Morrow und Scirica und Karwatowska-Prokopczuk und Murphy und Budaj und Varshavsky und Wolff und Skene und McCabe und Braunwald 2007). In einer zweiten Analyse der Studie fiel auf, dass Ranolazin außerdem antiarrhythmische Eigenschaften besitzt und das Auftreten von supraventrikulären Tachykardien signifikant verringern konnte (Scirica et al. 2015; Scirica et al. 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Patient\*innen mit paroxysmalem VHF unter Ranolazin eine signifikant geringere VHF-Last aufwiesen als die Placebo-Gruppe (Scirica et al. 2015). Hier ist allerdings zu beachten, dass Ranolazin in dieser Studie intravenös verabreicht wurde. In der prospektiven, multizentrischen, randomisierten und kontrollierten Phase II RAFFAELLO-Studie wurde Ranolazin nach elektrischer Kardioversion zur Prävention eines VHF-Rezidivs mit positiven Ergebnissen getestet. Allerdings konnte in keiner der gewählten Dosierungen eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Rückkehr des VHF erzielt werden (De Ferrari et al. 2015). Dies unterstützt unsere These, dass eine Substanzkombination mit einem anderen Multikanalblocker wie Dronedaron die Wirksamkeit erhöhen könnte.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur Ranolazin allein, sondern auch die Kombination mit Amiodaron, synergistische und rhythmusstabilisierende Effekte aufweist. In einer prospektiven randomisierten Pilotstudie wurde die Effektivität der klassischen Amiodaronmonotherapie zur medikamentösen Konversion von kürzlich begonnenem VHF mit einer Kombinationstherapie aus Amiodaron und Ranolazin verglichen. Es zeigte sich, dass der Zusatz von Ranolazin zur Standard Amiodaron Therapie ebenso sicher und scheinbar effektiver in der Konversion von kürzlich begonnenem VHF war (Fragakis



et al. 2012). Gleichsinnig zeigte eine experimentelle Studie an isolierten Kardiomyozyten von Hunden, dass die Substanzkombination aus Amiodaron und Ranolazin signifikant getriggerte Aktivität in Pulmonalvenen unterdrücken konnte bei gleichzeitig nur geringen Veränderungen in der ventrikulären Elektrophysiologie. Zusätzlich konnte die Kombination von Ranolazin und Amiodaron in diesem Modell signifikant die Induktion von VHF verhindern (Sicouri et al. 2010). Amiodaron hat jedoch, wie bereits erläutert, kein wünschenswertes Sicherheits- und Nebenwirkungsprofil. Dennoch führten diese Studienergebnisse zu der Idee, Ranolazin mit einem nebenwirkungsärmerem Multikanalblocker wie Dronedaron zu kombinieren. Dronedaron ist in höheren Dosierungen (400 mg zweimal täglich) als Antiarrhythmikum zugelassen, ist jedoch wegen einer negativ inotropen Wirkung dieser Dosierung ebenfalls bei Patient\*innen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz kontraindiziert (Kober et al. 2008). In einer großen klinischen, randomisierten und kontrollierten Studie (ATHENA-Studie) wurde festgestellt, dass 400 mg Dronedaron zweimal täglich bei Patient\*innen mit paroxysmalem oder persistierendem VHF das Risiko für kardiovaskulär bedingte Todesfälle und Klinikaufnahmen signifikant verringerte (Hohnloser et al. 2009). In einer nachfolgenden klinischen, randomisierten und kontrollierten Studie (PALLAS-Studie) sollte die Anwendung von Dronedaron bei Patient\*innen mit permanentem VHF getestet werden. Die Studie wurde wegen einer beobachteten Zunahme von kardiovaskulären Todesfällen sowie einer Zunahme von Herzinsuffizienzfällen im Dronedaron-Arm vorzeitig abgebrochen (Connolly et al. 2011; Doggrell und Hancox 2012). Wie sich in einer späteren Analyse der Ergebnisse zeigte, gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Häufigkeit an tödlichen kardiovaskulären und arrhythmischen Ereignissen und einer Komedikation mit Digitalis. Dronedaron als potenter Inhibitor des P-Glykoprotein-Transportsystems erhöhte die Digitalis-Spiegel der Patient\*innen, was mit einer Zunahme an kardialen Arrhythmien vergesellschaftet war. Die Inzidenz von Ereignissen einer Herzinsuffizienz stand hingegen in keinem Zusammenhang mit einer begleitenden Digitalis-Therapie (Hohnloser et al. 2014). Zusammengefasst ist Dronedaron offenbar in der üblichen Standarddosierung nicht für Patient\*innen mit permanentem VHF, eine Komedikation mit Digitalis oder fortgeschrittene Herzinsuffizienz geeignet. Da wie bereits erwähnt z.B. die APD-Veränderungen durch Dronedaron dosisabhängig sind (Sun et al. 2002), und auch die negativ inotrop wirkende Blockade von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen konzentrationsabhängig ist, wird davon ausgegangen, dass

niedrigere Dosierungen von Dronedaron zu einer besseren Verträglichkeit führen. Daher ist eine klinische Anwendung von niedrig dosiertem Dronedaron in Kombinationstherapie besonders spannend.

In der bereits erwähnten HARMONY-Studie wurde Ranolazin mit niedrig dosiertem Dronedaron bei Patient\*innen mit paroxysmale VHF getestet. Die Kombination der Substanzen führte in der Studie zu einem deutlichen Rückgang der VHF-Last durch die angewandte Kombination, bei insgesamt guter Verträglichkeit und gutem Sicherheitsprofil insbesondere, da die Kombination auch die Anfälligkeit für ventrikuläre Arrhythmien senkte (Burashnikov et al. 2010; Reiffel et al. 2015a; Verrier et al. 2013).

Diese positiven klinischen Ergebnisse decken sich mit unseren ermittelten elektrophysiologischen Auswirkungen. Um jedoch validere Aussagen über die Wirksamkeit und das Sicherheitsprofil treffen zu können, müsste sicherlich eine große klinische Phase III Studie durchgeführt werden. Hier könnte auch über die Inklusion von Patient\*innen mit persistierendem VHF und mit Herzinsuffizienz nachgedacht werden, da es gerade in der letzteren Gruppe nur stark limitierte Therapieoptionen gibt und die o.g. Daten eine gute Verträglichkeit bei niedriger Substanzdosierung von Dronedaron erhoffen lassen.

#### **4.4 Limitationen**

Die elektrophysiologischen Messungen fanden an Zellen aus unterschiedlichen Teilen des Atriums und des Ventrikels statt. Es ist bekannt, dass es einen beträchtlichen regionalen Unterschied bezüglich der APD und AP Morphologie aus verschiedenen Teilen des Herzens gibt (Schotten et al. 2011). Die atrialen Myozyten der Patient\*innen mit SR stammten ausschließlich aus dem rechten Herzohr, was aufgrund der Operationstechnik und aufgrund von ethischen Gesichtspunkten nicht anders durchzuführen war. Die Myozyten der VHF Patient\*innen stammten meist aus dem linken Herzohr, welches zur Thrombembolieprophylaxe intraoperativ entfernt wurde und wo laut Studienlage die meisten getriggerten Aktivitäten vorkommen (Schotten et al. 2011). Somit ist ein genereller Vergleich der APD von Patient\*innen mit VHF und Patient\*innen mit SR im Rahmen dieser Studie nicht gut möglich, da die Unterschiede mit den ohnehin schon vorhandenen regionalen Unterschieden der APD und AP Morphologie, interferieren würden. Es wurde zwar eine generelle

Verkürzung der APD bei VHF festgestellt, es war allerdings nicht das Ziel der Studie diesen Vergleich anzustellen.

Des Weiteren ist zu beachten, dass unser Kollektiv aus Patient\*innen einige Komorbiditäten besaß. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die elektrophysiologischen Auswirkungen, die wir gemessen haben, auch bei VHF-Patient\*innen ohne diese Komorbiditäten bestanden hätten. Insbesondere Diabetes mellitus und verschiedene Vormedikationen waren in der VHF-Gruppe häufig vertreten und sollten bei der Interpretation unserer Daten beachtet werden.

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die Experimente nicht verblindet durchgeführt wurden.

## 5 Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen und aufgrund des demographischen Wandels von zunehmender Bedeutung. Verschiedene elektrophysiologische Ursachen des VHF haben ihren Ursprung auf zellulärer Ebene. Die vorliegende Arbeit hat potenziell antiarrhythmische Wirkweisen eines neuen medikamentösen Therapieansatzes zur Behandlung von VHF an humanen Kardiomyozyten von Patient\*innen mit Sinusrhythmus (SR), VHF und terminaler linksventrikulärer Herzinsuffizienz untersucht. Mit Hilfe der Patch-Clamp Methode konnte gezeigt werden, dass Ranolazin (5  $\mu\text{mol/L}$ ) und niedrig-dosiertes Dronedaron (0,3  $\mu\text{mol/L}$ ) allein und insbesondere in Kombination die Aktionspotentialdauer (APD) von Kardiomyozyten von Patient\*innen mit SR und VHF verlängern. Es ist bekannt, dass die Verlängerung der atrialen APD und damit der effektiven Refraktärzeit (ERZ) wirkungsvolle antiarrhythmische Effekte sind. Zudem führte Ranolazin allein und die Kombination mit Dronedaron besonders in der VHF-Gruppe zu einer signifikanten Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials (RMP), was auf eine elektrische Stabilisierung der Kardiomyozyten hinweisen könnte. Insgesamt war dieser Effekt auf die APD und das RMP durch die Substanzkombination in der VHF-Gruppe signifikant größer als durch Ranolazin allein, was auf eine effektivere Wirkung der Kombination hinweist.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass weder durch Ranolazin noch Dronedaron oder die Kombination beider Substanzen eine relevante APD-Verlängerung in den gemessenen ventrikulären Kardiomyozyten von Patient\*innen mit linksventrikulärer Herzinsuffizienz im Endstadium verursacht wurde. Da eine APD-Verlängerung im Ventrikel als proarrhythmogen gilt, suggeriert dieses Ergebnis ein positives Sicherheitsprofil für die klinische Anwendung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen demnach, dass Ranolazin in Kombination mit niedrig dosiertem Dronedaron vielversprechende atriale antiarrhythmische Effekte auf dem Zellniveau bei VHF besitzt. Zugleich konnte eine unerwünschte Verlängerung der ventrikulären APD ausgeschlossen werden. Die Arbeit liefert durch den Nachweis der antiarrhythmischen Effekte der Substanzkombination im humanen Myokard die translationale Grundlage für weitere klinische Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

Aguilar M, Xiong F, Qi XY, Comtois P, Nattel S (2015): Potassium Channel Blockade Enhances Atrial Fibrillation-Selective Antiarrhythmic Effects of Optimized State-Dependent Sodium Channel Blockade Circulation

Aimond F, Beck L, Gautier P, Cherif OK, Davy JM, Lorente P, Nisato D, Vassort G (2000): Cellular and in vivo electrophysiological effects of dronedarone in normal and postmyocardial infarcted rats *J Pharmacol Exp Ther* 292, 415-424

Altomare C, Barbuti A, Viscomi C, Baruscotti M, DiFrancesco D (2000): Effects of dronedarone on acetylcholine-activated current in rabbit SAN cells *Br J Pharmacol* 130, 1315-1320

Antzelevitch C, Belardinelli L (2006): The role of sodium channel current in modulating transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenesis *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1, S79-s85

Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G (2004): Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties *Circulation* 110, 904-910

Antzelevitch C, Burashnikov A (2009): Atrial-selective sodium channel block as a novel strategy for the management of atrial fibrillation *J Electrocardiol* 42, 543-548

Antzelevitch C, Burashnikov A, Sicouri S, Belardinelli L (2011): Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine *Heart Rhythm* 8, 1281-1290

Armoundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B (2003): Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts *Circ Res* 93, 46-53

Attuel P, Childers R, Cauchemez B, Poveda J, Mugica J, Coumel P (1982): Failure in the rate adaptation of the atrial refractory period: its relationship to vulnerability *Int J Cardiol* 2, 179-197

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM (1993): Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes *Am J Physiol* 265, C533-540

Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H (2006): Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine *Heart* 92 Suppl 4, iv6-iv14

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling *Nature* 415, 198-205

Bers DM, Guo T (2005): Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes *Ann N Y Acad Sci* 1047, 86-98

Boutjdir M, Le Heuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, Carpentier A, Peronneau P (1986): Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol* 9, 1095-1100

Burashnikov A, Antzelevitch C (2011): Novel pharmacological targets for the rhythm control management of atrial fibrillation *Pharmacol Ther* 132, 300-313

Burashnikov A, Antzelevitch C (2013): Role of late sodium channel current block in the management of atrial fibrillation *Cardiovasc Drugs Ther* 27, 79-89

Burashnikov A, Belardinelli L, Antzelevitch C (2015): Inhibition of IKr potentiates development of atrial-selective INa block leading to effective suppression of atrial fibrillation *Heart Rhythm* 12, 836-844

Burashnikov A, Di Diego JM, Zygmunt AC, Belardinelli L, Antzelevitch C (2007): Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine *Circulation* 116, 1449-1457

Burashnikov A, Mannava S, Antzelevitch C (2004): Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of IKr and IKur/Ito block *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H2393-2400

Burashnikov A, Sicouri S, Di Diego JM, Belardinelli L, Antzelevitch C (2010): Synergistic effect of the combination of ranolazine and dronedarone to suppress atrial fibrillation *J Am Coll Cardiol* 56, 1216-1224

Capogrossi MC, Houser SR, Bahinski A, Lakatta EG (1987): Synchronous occurrence of spontaneous localized calcium release from the sarcoplasmic reticulum generates action potentials in rat cardiac ventricular myocytes at normal resting membrane potential *Circ Res* 61, 498-503

Caves RE, Cheng H, Choisy SC, Gadeberg HC, Bryant SM, Hancox JC, James AF (2017): Atrial-ventricular differences in rabbit cardiac voltage-gated Na(+) currents: Basis for atrial-selective block by ranolazine *Heart Rhythm* 14, 1657-1664

Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, Pepine CJ, Wang W, Nelson JJ, Hebert DA, et al. (2004): Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina *J Am Coll Cardiol* 43, 1375-1382

Connolly SJ, Camm AJ, Halperin JL, Joyner C, Alings M, Amerena J, Atar D, Avezum Á, Blomström P, Borggrefe M, et al. (2011): Dronedarone in high-risk permanent atrial fibrillation *N Engl J Med* 365, 2268-2276

Coppini R, Ferrantini C, Yao L, Fan P, Del Lungo M, Stillitano F, Sartiani L, Tosi B, Suffredini S, Tesi C, et al. (2013): Late sodium current inhibition reverses electromechanical dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy *Circulation* 127, 575-584

Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A (1979): Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart *Am J Physiol* 236, H561-567

Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, Morady F (1996): Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans *Circulation* 94, 1600-1606

De Ferrari GM, Maier LS, Mont L, Schwartz PJ, Simonis G, Leschke M, Gronda E, Boriani G, Darius H, Guillaumon Toran L, et al. (2015): Ranolazine in the treatment of atrial fibrillation: Results of the dose-ranging RAFFAELLO (Ranolazine in Atrial Fibrillation Following An Electrical Cardioversion) study *Heart Rhythm* 12, 872-878

Delbridge LM, Bassani JW, Bers DM (1996): Steady-state twitch Ca<sup>2+</sup> fluxes and cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffering in rabbit ventricular myocytes *Am J Physiol* 270, C192-199

Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, Bassani JW, Qi M, Ginsburg KS, Samarel AM, Bers DM (1997): Cardiac myocyte volume, Ca<sup>2+</sup> fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy *Am J Physiol* 272, H2425-2435

Doggrell SA, Hancox JC (2012): PALLAS: limiting indications for dronedarone treatment of atrial fibrillation? *Expert Opin Pharmacother* 13, 867-871

Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum *Am J Physiol* 245, C1-14

Fabiato A (1985): Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell *J Gen Physiol* 85, 291-320

Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ (1987): The arrhythmogenic transient inward current *i*<sub>TI</sub> and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes *J Physiol* 392, 523-542

Ferrier GR, Moffat MP, Lukas A (1985): Possible mechanisms of ventricular arrhythmias elicited by ischemia followed by reperfusion. Studies on isolated canine ventricular tissues *Circ Res* 56, 184-194



Fischer TH, Herting J, Mason FE, Hartmann N, Watanabe S, Nikolaev VO, Sprenger JU, Fan P, Yiao L, Popov AF, et al. (2015): Late INa increases diastolic SR-Ca<sup>2+</sup>-leak in atrial myocardium by activating PKA and CaMKII Cardiovasc Res

Fozzard HA, Sheu SS (1982): The resting potential in heart muscle Adv Myocardiol 3, 125-133

Fragakis N, Koskinas KC, Katritsis DG, Pagourelas ED, Zografos T, Geleris P (2012): Comparison of effectiveness of ranolazine plus amiodarone versus amiodarone alone for conversion of recent-onset atrial fibrillation Am J Cardiol 110, 673-677

Franz MR, Karasik PL, Li C, Moubarak J, Chavez M (1997): Electrical remodeling of the human atrium: similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter J Am Coll Cardiol 30, 1785-1792

Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS (2006): Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts J Mol Cell Cardiol 41, 1031-1038

Gautier P, Guillemare E, Marion A, Bertrand JP, Tourneur Y, Nisato D (2003): Electrophysiologic characterization of dronedarone in guinea pig ventricular cells J Cardiovasc Pharmacol 41, 191-202

Goette A, Kalman JM, Aguinaga L, Akar J, Cabrera JA, Chen SA, Chugh SS, Corradi D, D'Avila A, Dobrev D, et al. (2016): EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication Europace 18, 1455-1490

Guillemare E, Marion A, Nisato D, Gautier P (2000): Inhibitory effects of dronedarone on muscarinic K<sup>+</sup> current in guinea pig atrial cells J Cardiovasc Pharmacol 36, 802-805

Guinamard R, Chatelier A, Demion M, Potreau D, Patri S, Rahmati M, Bois P (2004): Functional characterization of a Ca(2+)-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes *J Physiol* 558, 75-83

Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Metayer P, Clementy J (1998): Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins *N Engl J Med* 339, 659-666

Haissaguerre M, Shah AJ, Cochet H, Hocini M, Dubois R, Efimov I, Vigmond E, Bernus O, Trayanova N (2016): Intermittent drivers anchoring to structural heterogeneities as a major pathophysiological mechanism of human persistent atrial fibrillation *J Physiol* 594, 2387-2398

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches *Pflugers Arch* 391, 85-100

Hohnloser SH, Crijns HJ, van Eickels M, Gaudin C, Page RL, Torp-Pedersen C, Connolly SJ (2009): Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation *N Engl J Med* 360, 668-678

Hohnloser SH, Halperin JL, Camm AJ, Gao P, Radzik D, Connolly SJ (2014): Interaction between digoxin and dronedarone in the PALLAS trial *Circ Arrhythm Electrophysiol* 7, 1019-1025

Huang B, El-Sherif T, Gidh-Jain M, Qin D, El-Sherif N (2001): Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium *J Cardiovasc Electrophysiol* 12, 218-225

Hwang H, Arcidi JM, Jr., Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, Shryock JC, Kloner RA (2009): Ranolazine as a cardioplegia additive improves recovery of diastolic function in isolated rat hearts *Circulation* 120, S16-21

January CT, Riddle JM (1989): Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca<sup>2+</sup> current *Circ Res* 64, 977-990

Ju YK, Saint DA, Gage PW (1996): Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes *J Physiol* 497 ( Pt 2), 337-347

Karwatowska-Prokopczuk E, Wang W, Cheng ML, Zeng D, Schwartz PJ, Belardinelli L (2013): The risk of sudden cardiac death in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome and prolonged QTc interval: effect of ranolazine *Europace* 15, 429-436

Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R (1978): Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres *J Physiol* 281, 187-208

Katra RP, Laurita KR (2005): Cellular mechanism of calcium-mediated triggered activity in the heart *Circ Res* 96, 535-542

Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener HC, Heidbuchel H, Hendriks J, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS *Eur Heart J* 37, 2893-2962

Kiyosue T, Arita M (1989): Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes *Circ Res* 64, 389-397

Kober L, Torp-Pedersen C, McMurray JJ, Gotzsche O, Levy S, Crijns H, Amlie J, Carlsen J, Dronedarone Study G (2008): Increased mortality after dronedarone therapy for severe heart failure *N Engl J Med* 358, 2678-2687

Lalevee N, Nargeot J, Barrere-Lemaire S, Gautier P, Richard S (2003): Effects of amiodarone and dronedarone on voltage-dependent sodium current in human cardiomyocytes *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 885-890

Leblanc N, Hume JR (1990): Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum *Science* 248, 372-376

Lederer WJ, Tsien RW (1976): Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres *J Physiol* 263, 73-100

Lewalter T, Pittrow D, Goette A, Kirch W, Hohnloser S (2010): [Clinical pharmacology and electrophysiological properties of dronedarone] *Dtsch Med Wochenschr* 135 Suppl 2, S43-47

Liu DW, Antzelevitch C (1995): Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell *Circ Res* 76, 351-365

Maier LS, Sossalla S (2013): The late Na current as a therapeutic target: where are we? *J Mol Cell Cardiol* 61, 44-50

Makielski JC, Farley AL (2006): Na(+) current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1, S15-s20

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977): Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data *J Cell Biol* 74, 629-645

Maltsev VA, Lakatta EG (2008): Dynamic interactions of an intracellular Ca<sup>2+</sup> clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function *Cardiovasc Res* 77, 274-284

Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI (2007): Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability *Eur J Heart Fail* 9, 219-227

Maltsev VA, Undrovinas AI (2006): A multi-modal composition of the late Na<sup>+</sup> current in human ventricular cardiomyocytes *Cardiovasc Res* 69, 116-127

Miles RH, Passman R, Murdock DK (2011): Comparison of effectiveness and safety of ranolazine versus amiodarone for preventing atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting *Am J Cardiol* 108, 673-676

Moreno JD, Clancy CE (2012): Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target *J Mol Cell Cardiol* 52, 608-619

Morita N, Lee JH, Xie Y, Sovari A, Qu Z, Weiss JN, Karagueuzian HS (2011): Suppression of re-entrant and multifocal ventricular fibrillation by the late sodium current blocker ranolazine *J Am Coll Cardiol* 57, 366-375

Morrow DA, Scirica BM, Karwatowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Budaj A, Varshavsky S, Wolff AA, Skene A, McCabe CH, Braunwald E (2007): Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial *Jama* 297, 1775-1783

Morrow DA, Scirica BM, Karwatowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Budaj A, Varshavsky S, Wolff AA, Skene A, McCabe CH, Braunwald E, et al. (2007): Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial *JAMA* 297, 1775-1783

Morrow DA, Scirica BM, Sabatine MS, de Lemos JA, Murphy SA, Jarolim P, Theroux P, Bode C, Braunwald E (2010): B-type natriuretic peptide and the effect of ranolazine in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: observations from the MERLIN-TIMI 36 (Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST Elevation Acute Coronary-Thrombolysis In Myocardial Infarction 36) trial *J Am Coll Cardiol* 55, 1189-1196

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, et al. (2016): Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association *Circulation* 133, e38-e360

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, et al. (2015): Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association *Circulation* 131, e29-322

Narayan SM, Krummen DE, Shivkumar K, Clopton P, Rappel WJ, Miller JM (2012): Treatment of atrial fibrillation by the ablation of localized sources: CONFIRM (Conventional Ablation for Atrial Fibrillation With or Without Focal Impulse and Rotor Modulation) trial *J Am Coll Cardiol* 60, 628-636

Nattel S (2003): Atrial electrophysiology and mechanisms of atrial fibrillation *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 8 Suppl 1, S5-11

Nattel S, Dobrev D (2017): Controversies About Atrial Fibrillation Mechanisms: Aiming for Order in Chaos and Whether it Matters *Circ Res* 120, 1396-1398

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

Nerbonne JM, Kass RS (2005): Molecular physiology of cardiac repolarization *Physiol Rev* 85, 1205-1253

Noble D, Noble PJ (2006): Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload *Heart* 92 Suppl 4, iv1-iv5

Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R (2005): Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation *Heart Rhythm* 2, 624-631

Poulet C, Wettwer E, Grunnet M, Jespersen T, Fabritz L, Matschke K, Knaut M, Ravens U (2015): Late Sodium Current in Human Atrial Cardiomyocytes from Patients in Sinus Rhythm and Atrial Fibrillation PLoS One 10, e0131432

Rastogi S, Sharov VG, Mishra S, Gupta RC, Blackburn B, Belardinelli L, Stanley WC, Sabbah HN (2008): Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure Am J Physiol Heart Circ Physiol 295, H2149-2155

Reeves JP, Hale CC (1984): The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system J Biol Chem 259, 7733-7739

Reiffel JA, Camm AJ, Belardinelli L, Zeng D, Karwatowska-Prokopczuk E, Olmsted A, Zareba W, Rosero S, Kowey P (2015a): The HARMONY Trial: Combined Ranolazine and Dronedaronone in the Management of Paroxysmal Atrial Fibrillation: Mechanistic and Therapeutic Synergism Circ Arrhythm Electrophysiol 8, 1048-1056

Reiffel JA, Camm AJ, Belardinelli L, Zeng D, Karwatowska-Prokopczuk E, Olmsted A, Zareba W, Rosero S, Kowey P (2015b): The HARMONY Trial: Combined Ranolazine and Dronedaronone in the Management of Paroxysmal Atrial Fibrillation: Mechanistic and Therapeutic Synergism Circ Arrhythm Electrophysiol

Rosen MR, Danilo P, Jr., Weiss RM (1983): Actions of adenosine on normal and abnormal impulse initiation in canine ventricle Am J Physiol 244, H715-721

Sag CM, Mallwitz A, Wagner S, Hartmann N, Schotola H, Fischer TH, Ungeheuer N, Herting J, Shah AM, Maier LS, et al. (2014): Enhanced late INa induces proarrhythmogenic SR Ca leak in a CaMKII-dependent manner J Mol Cell Cardiol 76, 94-105

Schlotthauer K, Bers DM (2000): Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials Circ Res 87, 774-780

Schotten U, Verheule S, Kerfant BG, Greiser M (2010): Enhanced late  $na(+)$  currents in atrial fibrillation new drug target or just an epiphenomenon? *J Am Coll Cardiol* 55, 2343-2345

Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011): Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal *Physiol Rev* 91, 265-325

Scirica BM, Belardinelli L, Chaitman BR, Waks JW, Volo S, Karwowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Cheng ML, Braunwald E, Morrow DA (2015): Effect of ranolazine on atrial fibrillation in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: observations from the MERLIN-TIMI 36 trial *Europace* 17, 32-37

Scirica BM, Braunwald E, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Spinar J, Wang W, Qin J, Karwowska-Prokopczuk E, Verheugt FW, Morrow DA (2010): Relationship between nonsustained ventricular tachycardia after non-ST-elevation acute coronary syndrome and sudden cardiac death: observations from the metabolic efficiency with ranolazine for less ischemia in non-ST-elevation acute coronary syndrome-thrombolysis in myocardial infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial *Circulation* 122, 455-462

Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Molhoek P, Verheugt FW, Gersh BJ, McCabe CH, et al. (2007): Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial *Circulation* 116, 1647-1652

Shimizu W, Antzelevitch C (1997): Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade des pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome *Circulation* 96, 2038-2047



Sicouri S, Burashnikov A, Belardinelli L, Antzelevitch C (2010): Synergistic electrophysiologic and antiarrhythmic effects of the combination of ranolazine and chronic amiodarone in canine atria *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3, 88-95

Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E (1995): Inhibition and rapid recovery of Ca<sup>2+</sup> current during Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes *Circ Res* 76, 102-109

Song Y, Shryock JC, Belardinelli L (2008): An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2031-2039

Song Y, Shryock JC, Belardinelli L (2009): A slowly inactivating sodium current contributes to spontaneous diastolic depolarization of atrial myocytes *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1254-1262

Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L (2006): Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction *J Pharmacol Exp Ther* 318, 214-222

Song Y, Shryock JC, Wu L, Belardinelli L (2004): Antagonism by ranolazine of the pro-arrhythmic effects of increasing late INa in guinea pig ventricular myocytes *J Cardiovasc Pharmacol* 44, 192-199

Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G, et al. (2010): Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium *J Am Coll Cardiol* 55, 2330-2342

Sossalla S, Maier LS (2012): Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes *Pharmacol Ther* 133, 311-323

Sossalla S, Wagner S, Rasenack EC, Ruff H, Weber SL, Schondube FA, Tirilomis T, Tenderich G, Hasenfuss G, Belardinelli L, et al. (2008): Ranolazine improves diastolic

dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts--role of late sodium current and intracellular ion accumulation J Mol Cell Cardiol 45, 32-43

Sossalla S, Wallisch N, Toischer K, Sohns C, Vollmann D, Seegers J, Luthje L, Maier LS, Zabel M (2014): Effects of ranolazine on torsades de pointes tachycardias in a healthy isolated rabbit heart model Cardiovasc Ther 32, 170-177

Stone PH, Chaitman BR, Stocke K, Sano J, DeVault A, Koch GG (2010): The anti-ischemic mechanism of action of ranolazine in stable ischemic heart disease J Am Coll Cardiol 56, 934-942

Sun W, Sarma JS, Singh BN (2002): Chronic and acute effects of dronedarone on the action potential of rabbit atrial muscle preparations: comparison with amiodarone J Cardiovasc Pharmacol 39, 677-684

Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, Sag CM, Hund TJ, Mohler PJ, Belardinelli L, et al. (2013): Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease J Mol Cell Cardiol 61, 111-122

Undrovinas AI, Belardinelli L, Undrovinas NA, Sabbah HN (2006): Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current J Cardiovasc Electrophysiol 17 Suppl 1, S169-s177

Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC (1992): Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine Circ Res 71, 1231-1241

Unwin PN, Zampighi G (1980): Structure of the junction between communicating cells Nature 283, 545-549

Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, Makielski JC (2005): Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart *J Mol Cell Cardiol* 38, 475-483

van der Does LJ, Kik C, Bogers AJ, Allessie MA, de Groot NM (2016): Dynamics of Endo- and Epicardial Focal Fibrillation Waves at the Right Atrium in a Patient With Advanced Atrial Remodelling *Can J Cardiol* 32, 1260.e1219-1260.e1221

Varro A, Takacs J, Nemeth M, Hala O, Virag L, Iost N, Balati B, Agoston M, Vereckei A, Pastor G, et al. (2001): Electrophysiological effects of dronedarone (SR 33589), a noniodinated amiodarone derivative in the canine heart: comparison with amiodarone *Br J Pharmacol* 133, 625-634

Vassallo P, Trohman RG (2007): Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications *Jama* 298, 1312-1322

Verrier RL, Pagotto VP, Kanas AF, Sobrado MF, Nearing BD, Zeng D, Belardinelli L (2013): Low doses of ranolazine and dronedarone in combination exert potent protection against atrial fibrillation and vulnerability to ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia *Heart Rhythm* 10, 121-127

Vincent GM, Timothy K, Fox J, Zhang L (1999): The inherited long QT syndrome: from ion channel to bedside *Cardiol Rev* 7, 44-55

Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XH, Nattel S, Dobrev D (2014): Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation *Circulation* 129, 145-156

Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, et al. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation *Circulation* 125, 2059-2070

Voigt N, Zhou XB, Dobrev D (2013): Isolation of human atrial myocytes for simultaneous measurements of Ca<sup>2+</sup> transients and membrane currents J Vis Exp, e50235

Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, Wellens HJ, Lazzara R (2000): Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts Cardiovasc Res 46, 376-392

Ward CA, Giles WR (1997): Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes J Physiol 500 ( Pt 3), 631-642

Weiss JN, Qu Z, Chen PS, Lin SF, Karagueuzian HS, Hayashi H, Garfinkel A, Karma A (2005): The dynamics of cardiac fibrillation Circulation 112, 1232-1240

Wit AL (2018): Afterdepolarizations and triggered activity as a mechanism for clinical arrhythmias Pacing Clin Electrophysiol

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991): Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study Stroke 22, 983-988

Wu J, Corr PB (1994): Palmitoyl carnitine modifies sodium currents and induces transient inward current in ventricular myocytes Am J Physiol 266, H1034-1046

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007): Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium Annu Rev Biochem 76, 367-385

Zygmunt AC (1994): Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes Am J Physiol 267, H1984-1995

Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko VV, Antzelevitch C (2001): Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle Am J Physiol Heart Circ Physiol 281, H689-697

Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM (1998): INaCa and ICl(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells Am J Physiol 275, H1979-1992

## **7 Genehmigungen**

Die Verwendung von Abbildung 3 des humanen atrialen Kardiomyozyten erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Pabel von der Universität Regensburg.

Die Verwendung der eigenen Daten und Abbildungen, die bereits im Journal of Cellular and Molecular Cardiology veröffentlicht wurden, erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

## 8 Veröffentlichungen und Förderung

### 8.1 Originalarbeit

Teile dieser Dissertation wurden bereits im Journal of Molecular and Cellular Cardiology veröffentlicht:

Hartmann N\*, Mason FE\*, **Braun I**, Pabel S, Voigt N, Schotola H, Fischer TH, Dobrev D, Danner BC, Renner A, et al. (2016): The combined effects of ranolazine and dronedarone on human atrial and ventricular electrophysiology. J mol Cell Cardiol

\* geteilte Erstautorenschaft

### 8.2 Abstract

N. Hartmann, **I. Braun**, F. Mason, N. Voigt, T. H. Fischer, L. S. Maier, G. Hasenfuß, S. T. Sossalla (2015): The combination of ranolazine and dronedarone as a novel treatment option for atrial fibrillation. Diskussion, 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Deutschland, 8.-11. April 2015.

### 8.3 Förderungen

Das Entstehen der vorliegenden Arbeit wurde durch das Promotionsstipendium des Herzzentrum Göttingen mit dem DZHK, der internationalen Graduiertenschule IRTG 1816, dem SFB 1002 und dem Heart Research Zentrum über einen Zeitraum von 6 Monaten unterstützt.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Samuel Sossalla**, der mir dieses spannende und klinisch sehr relevante Forschungsthema überließ, mein wissenschaftliches Interesse weckte und förderte und mich stets unterstützte. Sein Engagement als Doktorvater war bemerkenswert.

Auch möchte ich **Dr. Nico Hartmann** für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit, die in mich investierte Zeit und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die benötigten Methoden danken. Er stand mir stets als kompetenter Ansprechpartner zur Seite.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch recht herzlich bei **Prof. Dr. Niels Voigt** und seiner Arbeitsgruppe bedanken, die mir essenzielle Tipps für das Gelingen, sowohl der Humanisation als auch der Patch-Clamp-Experimente geben konnten und so maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Zudem möchte ich mich bei **Prof. Dr. Schöndube** und seiner Abteilung für Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie in Göttingen für die gute Zusammenarbeit bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Den Mitarbeiter\*innen aus unserem Labor der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, insbesondere **Dr. Fleur Mason**, **Dr. Steffen Pabel**, **Timo Schulte** und **Kim Hansing** möchte ich ausdrücklich für ihre Hilfe, die guten Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima danken.

Abschließend möchte ich meinen Dank Herrn **Prof. Dr. Lars Maier** aussprechen, der mir als Direktor der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Regensburg die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung die Doktorarbeit durchzuführen.



