



Hochauflösende EKG-Meßmethoden und programmierte Stimulation (SST-EKG) am isolierten Herzpräparat*

H.A. Tritthart, G. Stark, U. Stark, und E. Hofer

Institut für Medizinische Physik und Biophysik
der Karl-Franzens-Universität Graz, Harrachgasse 21/IV, A-8010 Graz

Zusammenfassung

Durch eine neue Meßmethode, die programmierte EKG-Stimulation (SST-EKG), ist es möglich geworden, am isolierten Herzpräparat von Kleinnagern schwer belastende Kathederuntersuchungen an Grosstieren zu ersetzen. Das gesamte Spektrum der klinisch-elektrophysiologisch relevanten Parameter kann ohne verfälschende Narkose-Einflüsse erhoben werden. Durch die hohe Auflösung der Meßanordnung können von Schlag zu Schlag auch Signale mit geringer Amplitude, wie die früh-atriale und His-Bündel-Erregung, zusätzlich zu den konventionellen EKG-Parametern (Herzfrequenz, PQ-, QT-Zeit) detektiert und die Leitungsgeschwindigkeiten und Refraktärzeiten der einzelnen Teile des Reizleitungssystems und Myokards bestimmt werden. Außer den elektrophysiologischen können auch hämodynamische Parameter, wie linksventrikuläre Kontraktionsamplitude und Koronarfluß, vermessen werden. Eine große Stärke des Meßsystems liegt in der geringen Streuung der Meßwerte, da am isolierten Präparat die Narkose-Effekte und die vegetativen Einflüsse eliminiert sind, sowie die Unsicherheit der Katheterpositionierung fehlt.

In Zukunft wird die Ermittlung von elektrophysiologischen Substanzeffekten am intakten Herzen zwar noch immer den Einsatz von Labortieren benötigen, es kann aber die Gesamtzahl der benötigten Experimente wesentlich reduziert werden und die in vivo-Messung am Großtier (Hund, Schwein, Affe) zumeist durch eine in vitro-Messung (Organentnahme von Ratte oder Meerschweinchen) ersetzt werden.

* Diese Methode wurde 1988 mit dem Österreichischen Staatspreis für Alternativmethoden zum Tierversuch ausgezeichnet.

Summary: High Resolution ECG Methods and Programmed Stimulation (SST-ECG) on Isolated Heart Preparations as Alternative Method to Animal Experiments

There are not many "gates to death", but one of the most important is the sudden cardiac death. Therefore the exact knowledge of drug effects on the cardiac function, especially of arrhythmogenic side effects are crucial during the development of a new compound. Hitherto expensive catheter experiments in anesthetized animals (dogs, pigs or monkeys) were necessary to evaluate drug effects on the intracardiac electrophysiological activity of all parts of the cardiac conduction system. Only these intracardiac stimulation and recording methods were suitable to measure drug effects on all parameters used in clinical electrophysiology. A suitable method, to replace at least partly these catheter experiments, was developed with a new epicardiac surface and stimulation technique (SST-ECG method: Stark et al., Basic Res. Cardiol. 82, 437, 1987; Stark et al., J. Pharmacol. Meth. 21, 195, 1989) which received the prize of the Austrian government for "Alternative Methods to Animal Experiment" in 1988. With this method all parameters used in clinical electrophysiology can be evaluated in one isolated heart preparation and, thus, interactions with anesthetics and of the vegetative nervous system can be excluded. Due to the high resolution of this system, the common ECG-parameters (PQ-, QT-time and heart rate) and the low amplitude signals (such as early atrial and His-bundle signals) can be detected continuously. Additionally, the refractory periods of all parts of the conduction system can be determined. It is further possible to evaluate hemodynamic parameters such as left ventricular contraction amplitude and coronary flow. A great advantage of the SST-ECG method is the minor scattering of the values measured, due to the elimination of effects of anesthetics and of the vegetative nervous system and the lack of problems with the electrode position.

In the future, the evaluation of drug effects on the cardiac electrical activity will further need laboratory animals, but the number of experiments can be significantly reduced and in vivo experiments on anesthetized dogs, pigs or monkeys can mainly be replaced by in vitro experiments using isolated heart preparations of rats or guinea-pigs.

Einleitung

Bei der Einführung aller neuen Pharmaka kann auf die Untersuchung der wichtigsten Herzwirkungen solcher Substanzen nicht verzichtet werden. Selbst bei unmittelbaren vitalen Indikationen, wie z.B. dem Einsatz von Chemotherapeutika in der Tumorthherapie, muß aus sicherheitspharmakologischen Aspekten die mögliche Einflußnahme auf das Herz bekannt sein. Darüber hinaus gibt es eine

sehr große Zahl herzwirksamer Pharmaka, für die in der Stufe des Screenings eine erste präzise Information über die Wirkung auf das ganze Herz außerordentlich wünschenswert und für die Weiterentwicklung des Produkts entscheidend wichtig wäre. Unter solchen Herzwirkungen stehen Effekte auf die erregungsbildenden und erregungsleitenden Strukturen im Myokard ganz im Vordergrund. Dazu muß in der Regel neben dem normalen Oberflächen-EKG auch an Versuchstieren mit intrakardialen Kathetern die elektrische Aktivität in der Nähe des Sinusknotens, des AV-Knotens bzw. His-Bündels detektiert werden. Diese intrakardialen Kathetermethoden werden in der Regel kombiniert mit speziellen Stimulationsprogrammen (Sinusknotenerholungszeit, Wenckebachpunkt, Refrakärzeiten der einzelnen Abschnitte des Myokards, etc.), die alle im Effekt dazu dienen, präzise Information über die Erregungsbildung im Sinusknoten und die Erregungsleitung durch den AV-Knoten bzw. durch das His-Bündel in die Kammer zu erhalten.

Solche Versuche an wachen oder narkotisierten Versuchstieren sind methodisch sehr aufwendig, kostspielig und zählen zu jenen Untersuchungen, die jeder Experimentator den Versuchstieren gerne ersparen würde.

Ein sehr wesentlicher Teil der so erhaltenen Information über die elektrophysiologischen Kenngrößen im Herzen unter Pharmakoneinfluß könnten auch am isolierten und nach Langendorff perfundierten Myokard gewonnen werden (Langenfeld et al., 1984; Logan et al., 1982; Onuagulechi et al., 1983; Tanz et al., 1978). Dazu wäre nur eine schmerzlose Tiertötung mit Organentnahme erforderlich. Die am häufigsten verwendeten Versuchstiere (Ratte, Meerschweinchen) eignen sich aber durch die Kleinheit der Herzen kaum dazu, mit intrakardialen Kathetern die entsprechenden Meßsignale zu erheben. Von einigen Autoren (Belardinelli et al., 1980; Carmeliet et al., 1979) wurden derartige Versuche durchgeführt, allerdings war es dazu erforderlich, Vorhöfe bzw. Kammer zu eröffnen und entsprechende spezielle Elektroden unter Sicht zu positionieren. Unter diesen Bedingungen müssen die Herzen in der Regel auch künstlich stimuliert werden, und somit ist eine Messung der Spontanerregungsbildung und Erregungsleitung unter der Einwirkung von Pharmaka nicht mehr möglich.

Methode

Intensive Bemühungen wurden unternommen, eine Methode zu entwickeln, die geeignet ist, intrakardiale Katheteruntersuchungen am narkotisierten Großtier wie

Hunden, Schweinen oder Affen wenigstens zu einem weiten Teil zu ersetzen. Durch einen Forschungsauftrag des österreichischen Wissenschaftsministeriums (Programm: Reduktion von Tierversuchen) wurde das Umfeld geschaffen, sich eingehendst mit der Entwicklung einer hochauflösenden EKG-Meßmethode (SST-EKG) zu befassen. Die Methode muss sich eignen, kardiale elektrische Signale, die bislang aufgrund ihrer geringen Amplitude nur am Ort ihrer Entstehung mit intrakardialen Methoden detektierbar waren, von der epikardialen Oberfläche isolierter und spontan schlagender Herzen kontinuierlich zu erfassen (nach Langendorff perfundierte Säugetierherzen). Um die isolierten Herzpräparate über einen möglichst langen Zeitraum rhythmisch schlagend und in den Leitungszeiten stabil zu erhalten, mußte zuerst die klassische Langendorff-Apparatur modifiziert werden, um durch das Einführen zweier Ventile eine individuelle Regulation des Perfusionsdrucks und des Perfusionsvolumens zu ermöglichen.

Zur Ableitung der Signale werden chlorierte Silberdrahtelektroden verwendet, die, auf die epikardiale Oberfläche aufgesetzt, sich frei mit den Kontraktionen des Herzens bewegen. Bei der Konzeption des elektronischen Aufbaues wurde darauf geachtet, daß eine hohe Verstärkung ohne Filterung erreicht wurde, um das Signal weitgehend in seiner ursprünglichen Form zu belassen und nicht einen Teil der Informationen zu verwerfen. Die so verstärkten Signale werden auf einem digitalen Speicheroszillogoskop vermessen und digital gespeichert.

Durch systematische Studien wurde die optimalste Elektrodenposition ermittelt, die eine 100prozentige Erfolgsrate in der Erfassung der früh-atrialen- und His-Bündel-Aktivität gewährleistet. Diese befindet sich in der Ventilebene. Die bipolaren Elektroden werden gegenüberliegend, eine an der Vorderseite, nahe dem Abgang der Arteria interventricularis anterior, und die zweite zwischen den beiden Herzohren positioniert (Abb.1).

Nachdem sich die Methode als brauchbar erwies, die gewünschten, nieder-amplitudigen Signale kontinuierlich, langzeitstabil und jederzeit reproduzierbar zu detektieren, wurde in einem weiteren Schritt die Möglichkeit untersucht, an diesen isolierten Präparaten programmierte Stimulation durchzuführen. Mittels bipolarer Reizelektroden wurden zuerst durch kontinuierliches Verkürzen des Stimulus-Stimulusintervalls (alle 10sec um 10ms) die maximalen Reizfolgefrequenzen (i.e. die frequenzabhängigen effektiven Refraktärzeiten) der sino-atrialen-, AV-Knoten-, His-Bündel-Leitung und des Atriums- und Ventrikelmyokards bestimmt. Im weiteren wurde auch die Sinusknotenerholungszeit vermessen.

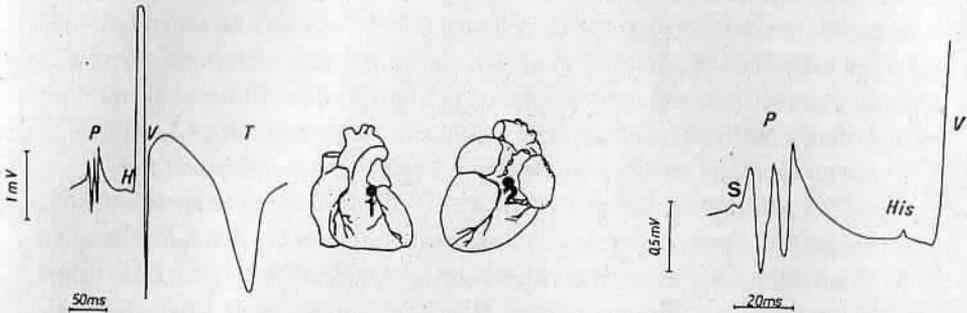


Abbildung 1:

Elektrodenposition an der epikardialen Oberfläche zur gleichzeitigen Registrierung von früh-atrialen und His-Bündel-Signalen und Originalkurven, die die niederamplitudigen EKG-Signale (S; His) beinhalten.

Dazu wurde das Herz bei einer Frequenz von 300 Schlägen pro Minute über 20sec stimuliert und anschließend die Stimulation gestoppt. Das Zeitintervall zwischen dem Beginn der letzten Stimulus-induzierten und der ersten spontan erscheinenden P-Welle ist die Sinusknotenerholungszeit. Die so gewonnenen Meßergebnisse zeigten eine so gute Reproduzierbarkeit, daß der Stimulationsgenerator weiter entwickelt wurde (Fa. Anton Paar KG). Anschließend wurden auch Stimulationsprogramme mit ein bis mehreren vorzeitig zum Grundrhythmus einfallenden Extrastimuli durchgeführt, um so die effektiven Refraktärzeiten zu bestimmen. Details zu dieser Methode sind bereits in wesentlichen Teilen veröffentlicht (Stark et al. 1987; Stark et al., 1989a).

Um auch eine Aussage über hämodynamische Parameter zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Anton Paar ein Druckmeßsystem entwickelt, dessen Sensor in die Langendorff-Einheit integriert ist. Eine solche Meßanordnung erlaubt Aussagen über Änderungen der linksventrikulären Kontraktionsamplitude ohne das Plazieren eines Ballonkatheters im linken Ventrikel. Im weiteren können Änderungen des Perfusiondrucks gemessen werden, aus denen sich in Kombination mit der Perfusionsrate der koronare Widerstand errechnen läßt.

Ergebnisse und Diskussion

Das S-EKG Signal des Sinusknotens und der P-Welle

In den mit so hoher Auflösung detektierten Signalen zeigt sich, daß der P-Welle eine kleine Deflektion voran geht, die durch die Impulsbildung im Sinusknotenareal zustande kommt. In der Equilibrierungsphase teils spontan auftretende und unter dem Einfluß von Kalzium-Antagonisten regelmäßig erscheinende Änderungen der Form der P-Welle, die auch eine Frequenzänderung mit sich bringen, zeigen, daß nicht nur die Leitungszeit zwischen erster Deflektion und Beginn der P-Welle verändert ist, sondern sich der Richtungsvektor der Erregung im Sinusknotenareal auch bei vektorieller Darstellung der Signale geändert hat (Abb. 2).

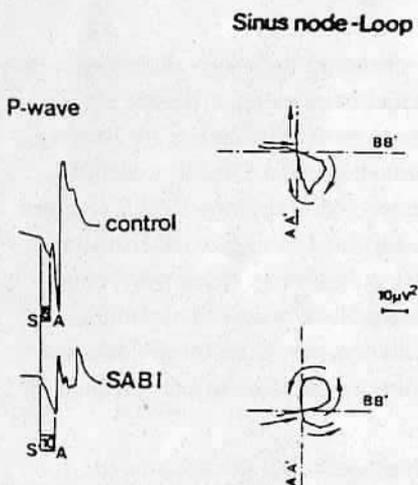


Abbildung 2:

Unter einem sino-atrialen Leitungsblock ersten Grades auftretende Änderung der P-Wellen Form (Bild links) und Änderung der Richtung des Maximalvektors der Sinusknotenschleife (Bild rechts)

Dieses Phänomen weist auf einen geänderten Ort der Erregungsentstehung hin und auf einen anderen Weg des Austritts der Erregung an der Crista terminalis vom Sinusknoten auf das Atrium. Da die sino-atriale und die intra-atriale Leitungszeit direkt vermessen werden kann, ist auch eine exakte Beurteilung der Beeinflussung dieser Parameter durch verschiedenste Pharmaka wie z.B. Kalzium-Antagonisten gewährleistet (Stark et al. 1989a).



His-Bündel-Signal

Ein weiteres Signal, dessen Erfassung bislang intrakardiale Kathetermethoden erforderte, ist das His-Bündel-Signal. Mit der SST-EKG Methode ist es möglich, dieses Signal kontinuierlich von der epikardialen Oberfläche zu detektieren. Um zu bestätigen, daß das von der epikardialen Oberfläche registrierte Signal vom His-Bündel stammt und um mögliche Leitungszeitunterschiede durch unterschiedliche Elektrodenpositionen zu verifizieren, wurden intrakardiale Signale aus dem His-Bündel-Areal mit epikardialen Signalen verglichen. Es zeigte sich, daß im Gegensatz zum intrakardial registrierten His-Bündel-Signal das von der epikardialen Oberfläche abgeleitete nicht biphasisch ist, sondern als eine positive Deflektion mit einer Amplitude von etwa 5-50 uV erscheint. Zeitliche Differenzen waren nicht zu ermitteln.

Die vektorielle Darstellung dieses Signals in der x-y Ebene ergab, daß das His-Bündel-Signal in zwei Anteile gespalten ist, die dem rechten und linken Tawaraschenkel entsprechen dürften.

Da diese niederamplitudigen Signale kontinuierlich und zusätzlich zu den konventionellen EKG-Parametern erfaßt werden können, ist es möglich, gerade im Bereich der atrio-ventrikulären Überleitung genau zu differenzieren, ob Leitungsänderungen den AV-Knoten oder das His-Bündel betreffen. Dies ist wesentlich, um Pharmakoneffekte genau beurteilen zu können. Als Beispiel sei die β -rezeptorblockierende Substanz Propranolol angeführt, die eine Leitungsblockierung im Bereich des His-Bündels bewirkt (Abb. 3) (Stark et al 1989b). Ohne solch eine hochauflösende Meßmethode wäre dieser Leitungsblock nicht von einem im Bereich des AV-Knotens gelegenen zu unterscheiden, einem Leitungsblock, der für andere Wirkstoffklassen (Kalzium-Antagonisten) charakteristisch ist (Stark et al, 1988).

Obwohl allein aus der Beeinflussung der Leitungszeiten und der spontanen Sinusknotenfrequenz viele Pharmaka gut charakterisiert werden können, besteht trotzdem ein wesentliches Defizit an Information, solange die Refraktärzeiten nicht ermittelt werden können.

Programmierte Stimulation am isolierten Herzen

Durch die einfache Zugänglichkeit aller epikardialen Oberflächen des Herzens am isolierten Herzpräparat war es relativ einfach, eine Stimulationsmethode zu entwickeln, die eine genaue Beurteilung der Refraktärzeiten aller Teile des

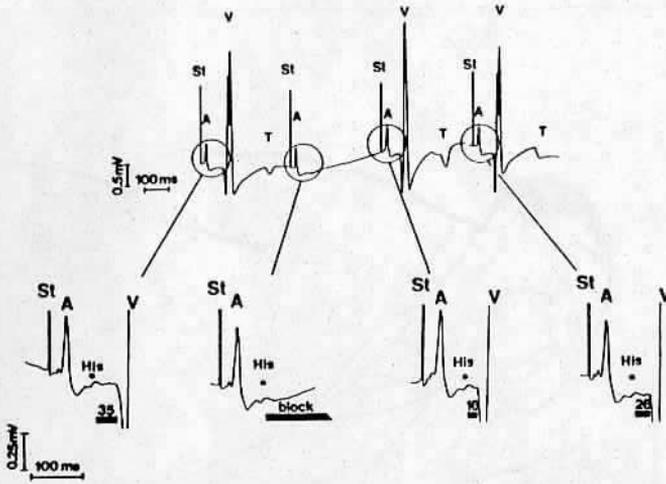
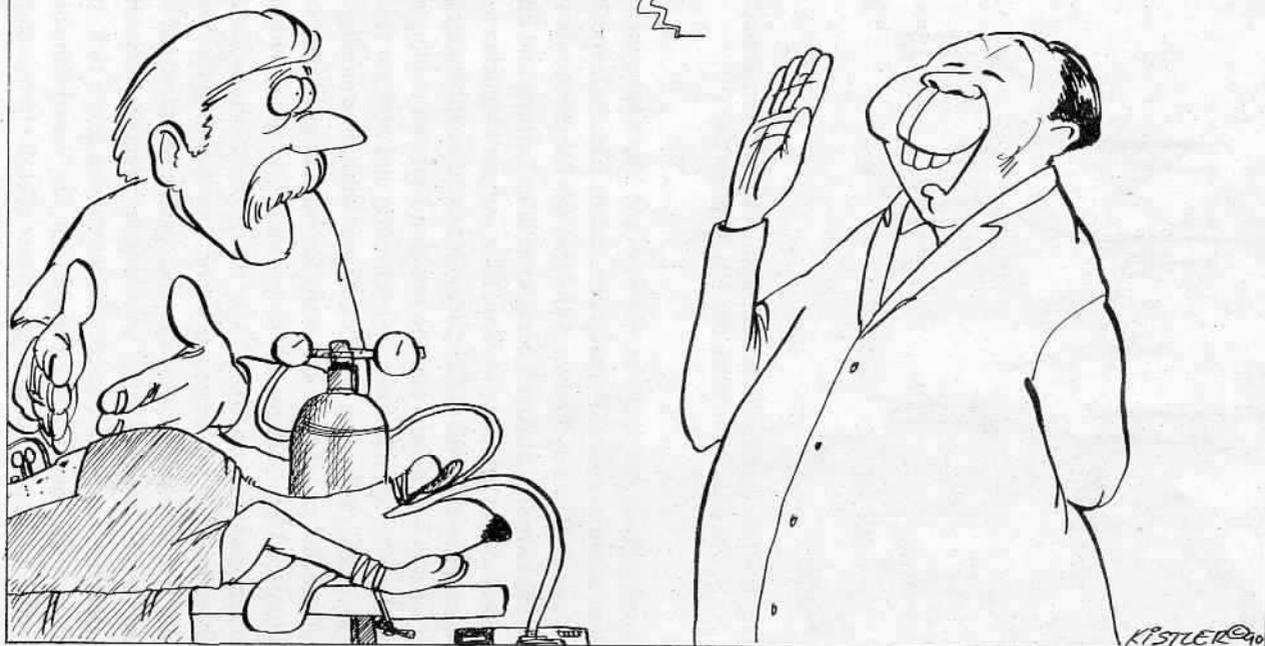


Abbildung 3: Atrio-ventrikulärer Leitungsblock vom Wenckebachtyp, der aber im Bereich des His-Bündels liegt.

Reizleitungssystems und auch des Atriums- und Ventrikelmyokards erlaubte. Außerdem ist am isolierten Präparat eine stabile Elektrodenposition gewährleistet. So können z.B. durch direktes Aufsetzen der Reizelektroden im Sinusknotenareal die effektive Refraktärzeit der sino-atrialen Leitung und die Sinusknotenerholungszeit direkt bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit, die das isolierte Herzpräparat bietet, ist die Bestimmung der frequenzabhängigen Refraktärzeiten. Da das Ganztier von seinem eigenen intakten Kreislauf abhängig ist, gestaltet sich eine hochfrequente Stimulation relativ schwierig und wird nur für bestimmte Fragestellungen, jedoch nicht zum routinemäßigen Substanzscreening angewendet. Daß aber dadurch viel an Information verworfen wird, zeigte sich in einer von uns durchgeführten Untersuchung mit Magnesium. Die antiarrhythmische Wirksamkeit von Magnesiumionen (Mg^{++}) bei durch Digitalisintoxikation auftretenden Tachyarrhythmien ist seit langem bekannt. Eine Bestätigung dieses Effekts von Seiten der Grundlagenforschung war aber noch ausstehend, da in electrophysiologischen Untersuchungen keine Änderung der Ventrikelrefraktärzeit durch Mg^{++} detektierbar war. In unseren Experimenten zeigte sich ebenfalls kein Einfluß von Magnesium auf die Refraktärzeit des Ventrikelmyokards, ermittelt mit vorzeitigem Extrastimulus. Dagegen war aber die frequenzabhängige Refraktärzeit stark verlängert (Stark et al 1989c).

NEIN DANKE! HUNDEDATEN
BITTE NUR VON PEKINESENEN!





Durch solch ein Meßsystem ist auch eine exakte Charakterisierung von Substanzeffekten nach den Standardkriterien der klinischen Elektrophysiologie möglich. So findet man unter dem Einfluß eines Klasse Ic Antiarrhythmikums (Propafenon) eine starke Frequenzabhängigkeit der Wirkung, während ein Klasse III Antiarrhythmikum (Sotalol) einen stärkeren Effekt auf die durch Stimulation mit vorzeitigem Einzelimpuls ermittelte Refraktärzeit bewirkt (Stark et al., 1989d). Durch diese genaue Differenzierungsmöglichkeit sind auch bei der Entwicklung neuer Pharmaka schon in einem frühen Stadium Rückschlüsse auf ihr mögliches klinisches Anwendungsgebiet zulässig.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Veröffentlichungen zeigen, daß durch hochauflösende EKG-Messungen in Kombination mit programmierter Stimulation am isolierten Herzpräparat ein großer Teil der Katheterexperimente an narkotisierten Großtieren ersetzt werden kann. Durch fehlende vegetative Kontrolle und Narkose-Effekte ist die Streuung der Meßwerte sehr gering, sodaß mit einer sehr kleinen Zahl an Experimenten gesicherte Ergebnisse erhoben werden können.

Für bestimmte Fragestellungen (Langzeitkoronarakklusion; erwünschte vegetative Gegenregulation von direkten Effekten) werden auch in Zukunft "in vivo"-Experimente an narkotisierten Großtieren erforderlich sein. Eine große Anzahl an Experimenten (Dosis-Wirkungsbeziehungen; direkte Substanzeffekte im Akutversuch) kann aber durch "in vitro"-Experimente ersetzt werden. Die bisher vorliegenden Ergebnisse mit dem Einsatz dieser neuen Methode in der Forschung der pharmazeutischen Industrie (Fa. Knoll AG, Ludwigshafen, war der erste Anwender) zeigen, daß es sich um eine einfache und in der Routine brauchbare Methode handelt, die ohne Verzicht auf Qualität der Meßergebnisse Zahl der Tierversuche und Kosten wesentlich reduzieren kann.

Literatur

- Belardinelli L, Belloni FL, Rubio R, Berne RM (1980) Atrioventrikular conduction disturbances during hypoxia; possible role of adenosine in rabbit and guinea-pig heart. *Circ Res* 47: 684-691



- Carmeliet E, Zaman MY (1979) Comparative effects of lignocaine and lorcaïnide on conduction in Langendorff perfused guinea-pig hearts. *Cardiovasc Res* 13: 439-449
- Langenfeld H, Haverkamp K, Antoni H (1984) Electrophysiological profile of the antiarrhythmic compound asocainol studied on perfused guinea-pig hearts and on isolated cardiac preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326:155-162
- Logan ME, Greenbaum LM (1982) Effects of pepstatin on reducing hypoxia-induced injury in the isolated guinea-pig heart. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 37,2: 243-258
- Onuaguluchi G, Tanz RD, Mc Cawley E (1983) Electrocardiographic changes induced by Amrinone in the isolated perfused guinea-pig Langendorff heart preparation. *Arch Int Pharmacodyn* 264: 263-273
- Stark G, Huber U, Hofer E, Tritthart HA (1987) Continuous ECG measurements of the intracardiac activity from the surface of Langendorff perfused guinea-pig hearts. *Basic Res Cardiol* 82: 437-444
- Stark G, Stark U, Tritthart HA (1988) Modulation of the cardiac impulse generation and conduction by nifedipine and verapamil analyzed by a refined surface ECG technique in Langendorff perfused guinea-pig hearts. *Basic Res Cardiol* 83: 202-212
- Stark G, Stark U, Tritthart HA (1989a) Assessment of the conduction of the cardiac impulse by a new epicardiac surface and stimulation technique (SST-ECG) in Langendorff perfused mammalian hearts. *J Pharmacol Meth* 21: 195-209
- Stark G, Stark U, Lueger A, Bertuch H, Pilger E, Pietsch B, Tritthart HA, Lindner W (1989b) The effects of the propranolol enantiomers on the intracardiac electrophysiological activities of Langendorff perfused hearts. *Basic Res Cardiol* 84: 461-468
- Stark G, Stark U, Pilger E, Hönlgl K, Bertuch H, Tritthart HA (1989c) The influence of elevated Mg^{++} concentrations on cardiac electrophysiological parameters. *Cardiovasc Drugs and Therapy* 3: 183-189
- Stark G, Hönlgl K, Bertuch H, Pilger E (1989d) Effects of propafenon and sotalol on cardiac refractoriness evaluated by a new ECG and stimulation technique. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Suppl to Vol 339 R57/225*
- Tanz R, Opie L (1978) Effect of drug or electrically induced tachyarrhythmias on the release of lactate dehydrogenase (LDH) in isolated perfused guinea-pig hearts. I. Comparison of the effects produced by ouabain calcium, epinephrine and aconitine. *J Pharmacol and Exper therapeut* 206, 2: 320-330