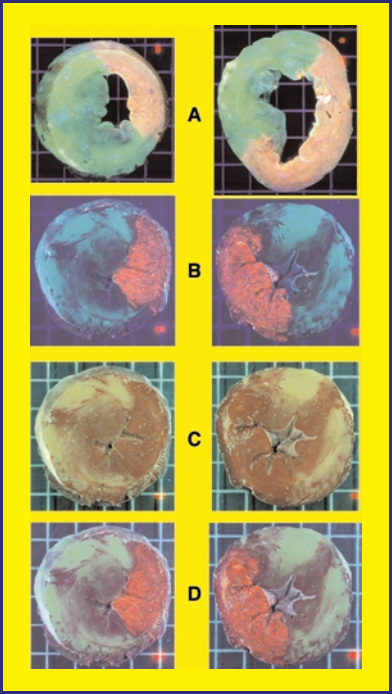
Die Rolle der Kalium-Ionen-Kanäle bei ischämischer Präkonditionierung



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sven Kilian, MSc

Verlag: DVG-Service GmbH

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.

1. Auflage 2003

© 2003 by Verlag: **D**eutsche **V**eterinärmedizinische **G**esellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-936815-67-4

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuerin: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. I. Käufer-Weiss

Die Rolle der Kalium-Ionen-Kanäle bei ischämischer Präkonditionierung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sven Kilian, MSc
Tierarzt aus Worms

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr.hc.. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. I. Käufer-Weiss

Tag der mündlichen Prüfung:

für meine Familie Mirjam und Silas
und meine Eltern und meine Großmutter

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 3

1. Preconditioning 3

2. IP am menschlichen Myokard 6

3. Der Adenosinrezeptor 8

4. Der adrenerge Rezeptor 10

5. Die Proteinkinase C 11

6. Der muskarinische M-2 Rezeptor 13

7. Der Bradykinin-B-2-Rezeptor 13

8. Die 5'-Ectonucleotidase 13

9. Die ATP abhängigen Kaliumkanäle 13

10. Mitochondriale und sarkolemmale K-ATP-Kanäle 16

11. HMR 1098 17

III. MATERIAL und METHODEN 21

1. Tiermodell 21

1.1. Tiere 21

1.2. Prämedikation und Narkose 21

1.3. Operationstechnik 21

2. Versuchsaufbau 28

2.1. Infarktgröße als Funktion der Zeit 28

2.2. Glibenclamid 29

2.3. HMR 1098/Mannitol 30

Seite

2.4. Rilmakalim 31

3. Herzaufarbeitung 32

3.1. Auswertungsmethodik 32

3.2. Ergebnisdokumentation 33

4. Materialien 36

4.1. Operation/Dokumentation 36

4.2. Auswertung 37

IV. ERGEBNISSE 39

1. Infarktgröße der Versuche mit und ohne IP bei 60 Minuten Verschluß 39

2. Infarktgröße der HMR und Mannitolversuche 39

3. Infarktgröße der Glibencalmidversuche 40

4. Infarktgröße der Rilmakalimversuche 40

5. Infarktkurven 40

5.1. Ergebnisse der Versuche ohne IP 40

5.2 Ergebnisse der Versuche mit IP 41

V. DISKUSSION 43

VI. ZUSAMMENFASSUNG 51

VII. SUMMARY 53

VIII. ABKÜRZUNGEN 55

IX. LITERATURVERZEICHNIS 57

X. DANKSAGUNG 71

Seite

Abbildungen

Abb. 1	Murry's Grafik	5
Abb. 2	Darstellung bisher angenommener Zusammenhänge	9
Abb. 3	Der K-ATP-Kanal unter Normoxie und Hypoxie	18
Abb. 4	Strukturformel HMR 1098 und HMR 1883	19
Abb. 5	Ansicht des Schweineherzens von Anterior	22
Abb. 6	Schematische Darstellung der Ligationstechnik	23
Abb. 7 – 13	Fotos der Operation	24-27
Abb. 14	Basisprotokoll mit und ohne Präkonditionierung	28
Abb. 15	Protokoll ohne Präkonditionierung mit fünf Verschlußzeiten	28
Abb. 16	Protokoll der Glibenclamidversuche	29
Abb. 17	Protokoll der HMR1098/Mannitolstudie	30
Abb. 18	Protokoll der Rilmakalimversuche	31
Abb. 19	schematische Darstellung der Schnittführung am Herzen	32
Abb. 20	Schematische Darstellung einer Herzscheibe	33
Abb. 21	Fotografien der gefärbten Herzscheiben	35
Abb. 22	Säulendiagramm	39
Abb. 23	Infarktkurve	40

I. EINLEITUNG

Das Herz ist jenes Organ, dessen Regenerationsfähigkeit ebenso wie seine Schutzmechanismen im Vergleich zu den anderen Organen recht unterentwickelt ist. Dies wird großteils durch den Verlust der Teilungsfähigkeit der Herzmyozyten nach der Geburt verursacht. Auffälligerweise ist bei Mensch und Tier das Herz junger, gesunder Individuen selten erkrankt - eine Ausnahme bilden die primären Kardiomyopathien bei Hund und Katze [2]. Zwar treten Schädigungen nach Infektionen auf, doch erst mit Zunahme der Lebenserwartung und der Überernährung in den Industrienationen begannen Herz-Kreislauferkrankungen an die erste Stelle der Erkrankungen mit Todesfolge zu rücken. 40% aller Todesfälle in den Industriestaaten haben kardiovaskuläre Ursachen. Mit zeitlicher Verzögerung und zunehmendem Wohlstand zeigt sich auch bei Hunden und Katzen eine deutliche Zunahme von Herzerkrankungen, da durch die optimierten Haltungsbedingungen deren Lebensalter, aber auch die Überernährung stetig zunimmt.

Evolutionär bestand bei Mensch und Tier durch die deutlich kürzere Lebenserwarung kein selektiver Druck zur Auslese hinsichtlich der Individuen mit ausgeprägt entwickelten Herzschutzmechanismen, die durchaus vorhanden sind.

Die Adaption von Geweben auf wiederholte Streßfaktoren, beispielsweise durch Hypertrophie, ist seit langem bekannt. Trotzdem ist die Beobachtung, daß eine Zelle auf akut schädigende Einflüsse mit sofortiger Adaption reagiert und folgend wieder zu ihrem Ausgangszustand zurückkehrt, noch nicht allzulange gemacht worden.

Die erste Veröffentlichung eines solchen akuten Adaptionsgeschehens wird von Noble berichtet [3]. Er sagt: „Resistente Tiere, die einem schweren Trauma ausgesetzt waren, erschienen in jeder Hinsicht normal und zeigten keinerlei Anzeichen des Schocks, verglichen mit nicht resistenten Tieren“. („Resistant animals, when exposed to severe trauma, appear normal in every respect and do not show any signs of shock as encountered in normal animals.“)

Endogene Toleranz gegenüber traumatischen Situationen ist stets reproduzierbar und eine Reihe von Untersuchungen haben nachgewiesen, daß traumatischer oder endotoxischer Schock eine Toleranz gegenüber gleichen oder zum Teil anderen Streßsorten induziert. Janoff. [4] gebraucht den Begriff „Preconditioning“ um das Phänomen einer streßinduzierten endogenen Toleranz zu beschreiben. Während er den Begriff „Preconditioning“ noch für die Adaptionsfähigkeit des gesamten

Organismus benutzte, wird von Murry [5] der Begriff zur Beschreibung der myokardialen Adaptionsfähigkeit gegenüber einem ischämischen Streß verwendet.

Ischemic preconditioning des Herzens ist 1986, erstmalig von Murry et al. [5] beschrieben worden. Enorme Fortschritte im Verständnis dieses hochpotenten Schutzmechanismus am Herzen sind seit jener Zeit erzielt worden. Erstmals bei Hunden beschrieben, hat sich Ischemic Preconditioning inzwischen auch am menschlichen Myokard gezeigt. Der erste Hinweis auf Ischemic Preconditioning beim Menschen kommt von Yellon et al. [6]. So wurde bei Bypasspatienten festgestellt, daß eine Phase vorübergehender Ischämie vor einem Absinken des ventrikulären ATP-Spiegels bewahrt, der zu Kammerflimmern führen würde.

Kloner (1995), Ottani (1995) und Andreotti (1996) [7-9] beobachteten unabhängig voneinander einen protektiven Effekt bei Angina pectoris-Anfällen, soweit sie einem Infarkt 24 bis 48 Stunden vorausgegangen sind. All diese klinischen Feststellungen weisen deutlich daraufhin, daß der Anginastreß einen endogenen Mechanismus auslöst, der das menschliche Myokard während einer kurzen Zeit von etwa einer Stunde vor Schaden bewahrt (Ischemic Preconditioning, IP). Mittels eines in vitro-Modells konnten Yellon et al. [6] am Vorhoftrabekel umfangreiche Informationen über Ischemic Preconditioning am menschlichen Myokard erlangen. Den Großteil unseres Wissens über Ischemic Preconditioning verdanken wir jedoch tierexperimentellen Forschungen, die an Hunden, Ratten, Kaninchen, Schweinen und neuerdings auch an Mäusen erarbeitet werden. IP ist somit ein ubiquitär vorhandener Mechanismus.

In der vorliegenden Arbeit wird zusammenfassend mit verschiedenen K-ATP-Kanal aktiven Substanzen gearbeitet, ausgelöst durch die Entdeckung, daß nicht alle K-ATP-Kanal Blocker IP aufheben.

Ziel der Forschung über Ischemic Preconditioning ist die Entwicklung einer medikamentösen Therapie für Risikopatienten, welche den Mechanismus auslöst und das Myokard solange schützt, bis durch eine weitere Medikation die Kollateralbildung der Koronargefäße erfolgt ist.

Erste Versuche, Preconditioning bei Bypassoperationen mit dem Ziel geringerer Gewebsschädigung einzusetzen, zeigen ein positives Ergebnis [10].

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Preconditioning

Bereits 1942 berichtete Noble [3] von Experimenten an Ratten, mit denen gezeigt wurde, daß wiederholte kleinere Traumata zu einer Toleranz gegenüber einem nachfolgenden Trauma führen, das ansonsten letale Folgen gehabt hätte.

Die Tiere wurden in eine Trommel gesperrt, die gedreht werden konnte. Die Größe der Schädigung korrelierte direkt mit der Zahl der den Tieren ausgesetzten Umdrehungen. Um die Tiere resistent zu machen, schleuderte man 120 bis 140 g schwere Ratten mit 200 bis 300 Umdrehungen pro Minute. Dieses Trauma führte nicht zu Todesfällen. Über den Zeitraum von 12 bis 14 Tagen wiederholte Noble diese Prozedur in zweitägigem Abstand, wobei er die Zahl der Umdrehungen auf 400, 600, 800 und 1000 steigerte. Danach erhielten die Tiere 1000 Umdrehungen wöchentlich (zur Aufrechterhaltung der Toleranz). Gleiche Experimente mit Meerschweinchen unterschieden sich lediglich in einer geringeren Eingangsschleuderzahl (125 Umdrehungen) und einer geringeren Steigerungsrate (25, 50 Umdrehungen). Unbehandelte Tiere überstanden die Prozedur von 1000 Umdrehungen nicht lebend. Hingegen überstanden von 106 vorbehandelten Ratten 105 die wiederholte Traumatisierung in 919 Versuchen. Sie hatten eine Toleranz entwickelt.

1964 verwendet Janoff [4] den Begriff Preconditioning erstmalig. Er arbeitete an der Erforschung der molekularbiologischen Vorgänge in und an den Lysosomen im Zustand des traumatischen und des Endotoxinschocks und deren Bedeutung hinsichtlich der schockbedingten Gewebsschädigung. Dazu nutzte er unvorbehandelte Tiere und Tiere mit einer Präkonditionierung nach dem Modell von Noble, sowie eine Cortisonvorbehandlung. Anschließend wurden die Lebern entnommen und deren Gehalt an β-Glucoronidase gemessen. Er kam zu dem Ergebnis, daß die Freisetzung lysosomaler Enzyme durch die Vorbehandlung signifikant vermindert wurde, er spricht von einer Natürlichen Toleranz, induziert durch Präkonditionierung („induction of natural tolerance by preconditioning, had an ... inhibitory effect on the release of lysosomal enzymes“).

Die Bedeutung des Begriffes „Preconditioning“ wurde seitdem mehrfach modifiziert und eingegrenzt. Diente er anfänglich der Benennung des Phänomens der streßinduzierten endogenen Toleranz gegenüber Verletzungen („the phenomenon of stressinduced endogenous tolerance against insults“), welches den gesamten Körper mit einschloß, wird heute vornehmlich von Ischemic Preconditioning (IP)

gesprochen als Benennung des Phänomens bei dem eine vorübergehende Ischämie eine Protektion gegen nachfolgende Verletzungen durch Ischämie und Reperfusion induziert („Ischemic Preconditioning is the phenomenon by which transient ischemia induces protection against subsequent ischemia and reperfusion injury“) [5].

Murrys Arbeitsgruppe nahm dazu Versuche an Hunden beiderlei Geschlechtes vor. Unter Pentobarbitalnarkose wurde eine Thorakotomie durchgeführt und die linke Koronararterie ligiert. Verschiedene Parameter wie der linksatriale Druck, der arterielle Druck, EKG und Perikardtemperatur wurden aufgezeichnet. Flimmernde Herzen wurden soweit möglich defibrilliert wenn erforderlich und sodann das Protokoll durchgeführt. Anschließend wurde der Thorax wieder verschlossen, und die Hunde hatten die folgenden vier Tage zu überstehen. Danach erfolgte die Tötung der Tiere und die Entnahme der Herzen. Das Protokoll enthielt folgende Versuchsanordnungen:

Jede Studie verglich die Effekte von Preconditioning, bestehend aus vier 5 minütigen Okklusionen, alternierend mit je 5 Minuten Reperfusion, mit den Effekten nach einer längeren ununterbrochenen Ischämieperiode.

Die erste Studie (n = 12) unterzog die Tiere fünf Ischämieperioden, getrennt durch jeweils fünf Minuten Reperfusion. Daran schloß sich eine 40 minütige ununterbrochene Koronarokklusion an. Die Kontrollgruppe (n = 9) hingegen enthielt nur den 40 minütigen Verschluß. Der myokardiale Blutfluß wurde vor und zur Halbzeit des Verschlusses gemessen, sowohl in der präkonditionierten wie in der Kontrollgruppe.

In der zweiten Studie erhielt die präkonditionierte Gruppe (n = 13) wiederum den gleichen Okklusions-Reperfusionszyklus, diesmal aber gefolgt von 180 Minuten Dauerverschluß. Die Kontrollgruppe (n = 9) unterzog man lediglich der 180 minütigen Okklusion. Auch hier maß Murry den myokardialen Blutfluß vor und in der 105. Minute des Verschlusses.

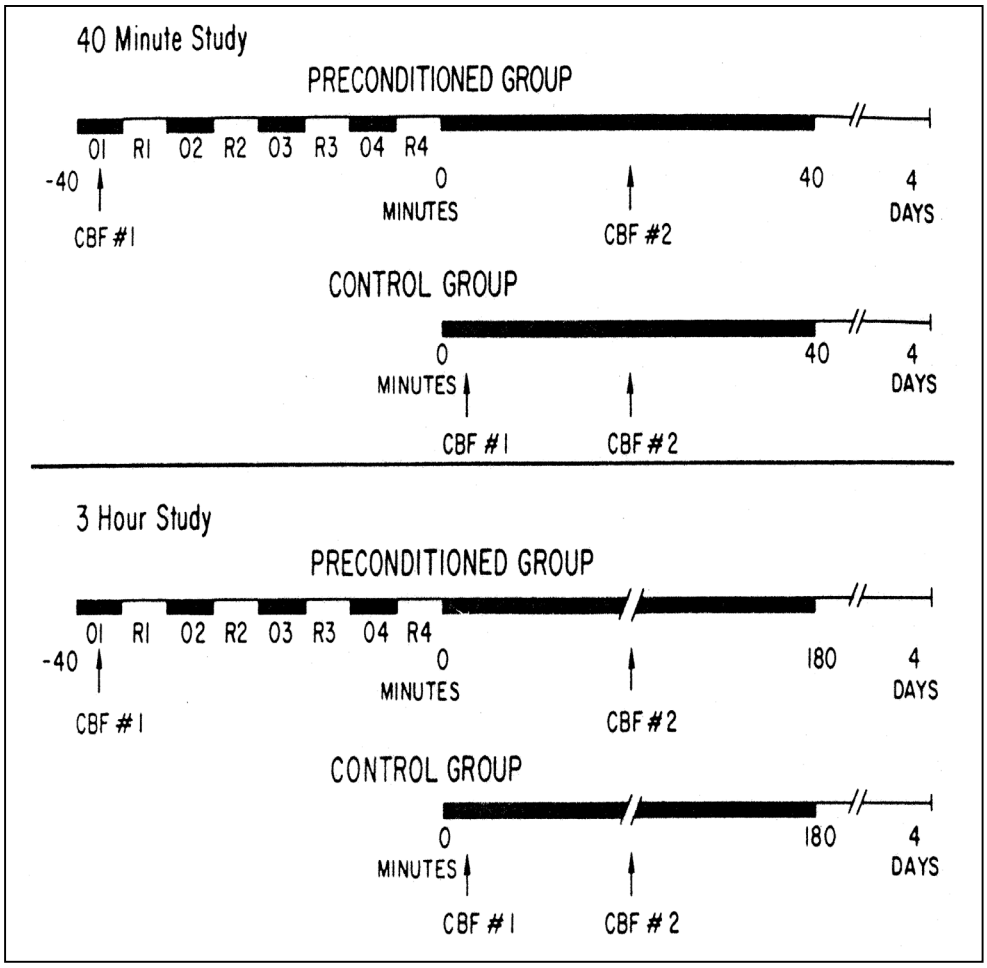


Abb. 1: die Abbildung zeigt das Protokoll der 40 bzw.180 Minuten Studien und das Konrtollprotokoll von Murry.

Zuvor hatte Murry Versuche unternommen mit einmaligem 15 minütigem Verschluß und zweimal 10 Minuten zur Präkonditionierung. In beiden Versuchsserien war die Mortalitätsrate enorm hoch. Erst eine Reduktion auf 5 Minuten reduzierte die Inzidenz letaler Arrhythmien drastisch. Der Grund für die Wahl von vier Zyklen zur Präkonditionierung lag in der Intention, die Bildung und anschließende Ausschwemmung ischämischer Metaboliten zu steigern sowie die Vermeidung von Reperfusionarrhythmien.

Die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung zeigten in der 40 Minutenstudie bei den Kontrolltieren 29,4 ± 4,4% des anatomischen Risikogebietes (Anatomic Area at Risk, AAR), bei den präkonditionierten Tieren hingegen nur 7,3 ± 2,1% der AAR. Addiert man die Verschlußzeiten, so ergeben sich 60 Minuten Verschluß und eine bemerkenswert geringe Infarktgröße von lediglich einem Viertel der Kontrolltiere mit 40 Minuten Verschluß. Ebenfalls auffällig waren die morphologischen Unterschiede. So zeigten die Kontrolltiere generalisierte, solide Infarkte, die sich von einer lateralen Begrenzung zur anderen erstreckten und dabei subendokardial

lagen, mit Inseln nicht nekrotischen Gewebes. Hingegen wiesen die Herzen der präkonditionierten Tiere selten konfluierende Infarkte auf, sondern vielmehr viele kleine Nekroseherde. Da die Arbeitsgruppe auch den kollateralen Blutfluß gemessen hatte und keinerlei Unterschiede zwischen Kontroll- und präkonditionierter Gruppe gefunden wurde, ist auszuschließen, daß die kleineren Infarkte durch einen größeren Kollateralfluß entstanden sind.

Die 180 Minutenversuche ergaben hingegen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe (AAR 47,9 ± 6,6%) und präkonditionierter Gruppe (AAR 47,1 ± 4,8%). Das makroskopische Infarktbild der Präkonditionierungsgruppe entsprach dabei dem konfluierenden Bild der 40 Minutenversuche und wies keinerlei Unterschiede zur 180 Minutengruppe auf.

Es lassen sich verschiedene Organe präkonditionieren: Herz, Leber, Lunge, Gehirn [11], Niere und Dünndarm. Versuche an den letzteren beiden Organen der Wistar-Ratte zeigen einen der ischämischen Präkonditionierung am Herzen gleichwertigen Schutzeffekt [12].

Diverse Stimuli können dabei eine Präkonditionierung auslösen. Ischämie- und Reperfusionsstreß [5], Endotoxine [13,14], Zyklen wechselnder Koronarverschlüsse [15,16], pharmakologische Eingriffe und Tachykardiestreß [17].

Zudem konnte im Laufe der Jahre das Phänomen bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, bei Kaninchen, Schweinen, Hunden, Ratten (diese Spezies dienen üblicherweise als Modelle zur Erforschung des Phänomens) und neuerdings bei Mäusen [18] und Hühnern [19].

2. IP am menschlichen Myokard

1993 wurde IP am menschlichen Myokard durch Yellon et al. [6] nachgewiesen und 1995 konnte der Effekt bei Angina pectoris Patienten beschrieben werden. Andreotti et al. [9] verglichen dazu zwei Patientengruppen einer Herzklinik. 14 Patienten litten vor ihrem Herzinfarkt unter Anginaanfällen, die 9 Patienten der Kontrollgruppe waren frei von Angina. Als Meßgrundlage zur Bestimmung der Infarktgröße zog sie die Blutwerte von Kreatininkinase und Kreatininkinase MB heran. Sie stellte fest, daß bei den Anginapatienten unter thrombolytischer Therapie bereits nach 27 ± 6 Minuten eine vollständige Reperfusion der Infarktareale erreicht wurde, hingegen bei den Nichtanginapatienten erst nach 48 ± 17 Minuten. Auch Ottani et al. [8] und Kloner et al. (1995)[7].gehen auf diese Weise vor, indem sie Patienten heranziehen, die einer thrombolytischen Therapie unterzogen werden und die Infarktgröße mittels CK-Wert bestimmen.

Die Erforschung des Phänomens und letztlich seine therapeutische Nutzbarmachung setzt eine Trennung des Aufklärungsweges voraus.

Die zellulären Abläufe müssen getrennt werden in die Frage nach der Informationsvermittlung von extra- nach intrazellulär, also die membrangebunden molekularbiologischen Abläufe und Strukturen, sowie der intrazellulären Informationsweitergabe hin zum Zellkern, an bzw. in die Zellorganellen und den folgenden Veränderungen.

Eine Vermittlung von IP konnte bei verschiedenen membranständigen Strukturen nachgewiesen werden, und das zunehmende Verständnis von Preconditioning erlaubt immer häufiger, den protektiven Mechanismus ohne Ischämie experimentell in vivo auszulösen.

Alle Strukturen vermögen die frühe Phase des Preconditioning über die Aktivierung intrazellulärer Kinasen zu aktivieren. Diese folgende Phosphorylierung von Signalenzymen ist der Weg der Protektionsvermittlung, zur Verminderung der Zellnekroserate, gesteigerter Kontraktilität und verbesserter Resistenz gegenüber Reperfusionsarrhythmien. Extrazelluläre Signale triggern Rezeptoren der Zelloberfläche, die Second messenger und Effektoren aktivieren.

Der Effekt der ischämischen Präkonditionierung ist als frühe Phase (first window) bekannt, ebenso wird auch eine späte Phase diskutiert (second window), ein Schutzeffekt, der nach 24 Stunden auftritt.

Hierzu berichten Qiu et al. [20] von einem Versuch, der die frühe Phase mit der späten vergleicht hinsichtlich Infarktgröße und postischämischen Dysfunktionen am chronisch instrumentierten, wachen Schwein. Die Tiere erwachten nach einer Vorbereitung, die einen Verschluß im wachen Zustand ermöglichte, aus der Narkose. Vier verschiedene Gruppen wurden herangezogen für eine 40 minütige Okklusion, gefolgt von einer dreitägigen Reperfusion. Gruppe 1 diente als Kontrolle, Gruppe 2 erhielt 10 Zyklen von je 2 Minuten Verschluß und 2 Minuten Reperfusion vor der 40 minütigen Okklusion (frühes IP). Die Gruppen 3 und 4 erhielten 10 bzw. 25 Zyklen einer 2 minütigen Okklusion, gefolgt von jeweils 2 Minuten Reperfusion, 24 Stunden vor einem 40 minütigen Verschluß (spätes IP).

Die Kontrolltiere wiesen eine Infarktgröße von 45,1 ± 5,9% auf, die der Gruppe 2 (frühes IP) hatte eine Infarktgrößen von 9,4 ± 3,2%, was einer Reduktion von 79% entspricht. Im Gegensatz dazu stehen die Gruppen 3 und 4, deren Infarktgrößen mit 33,3 und 38,8% keine signifikante Differenz zur Kontrollgruppe darstellten. Qiu et al. [20] kommen nach zusätzlicher Einbeziehung der systolischen Wanddickenzunahme, die auch bei den Gruppen 3 und 4 im Gegensatz zur

Gruppe 2 von der Kontrollgruppe nicht signifikant abwichen, zu dem Ergebnis, daß ein später Effekt des Preconditionings nicht existiert, bzw. wenn er existiert, enorm schwächer sein muß als der frühe protektive Effekt.

Dazu im Widerspruch stehen die Ergebnisse von Tanaka et al [21], der die späte Phase des Preconditioning nicht darstellen konnte.

Potentielle Stimuli stellen die Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors, des α1-adrenergen Rezeptors, des Bradykinin-B-2-Rezeptors, des muskarinischen M-2-Rezeptors, der Proteinkinase C, der 5'-Ectonucleotidase und der K-ATP-Kanäle dar.

3. Der Adenosinrezeptor

Verschiedene Autoren berichten von positiven Effekten des Adenosins himsichtlich des ischämischen Myokards [22-32].

Die protektiven Effekte des Adenosins während der Hypoperfusion beinhalten eine Vasodilatation der Koronararterien, was zu verbesserter Sauerstoffzufuhr führt und eine negativ inotrope Wirkung mit der Folge geringeren Sauerstoffverbrauches hat.

Adenosin-induzierte, akute myokardiale Protektion wurde bei Studien entdeckt, die sich mit Ischemic Preconditioning beschäftigten. So konnte am isolierten Rattenherzen mittels Adenosin und R-Phenylisopropyladenosin (PIA), einem Adenosin-A1-Rezeptor-Agonist, eine signifikant höhere Zeit bis zum Einsetzen der ischämischen Kontraktion erzielt werden als mit einem A2-Rezeptor-Agonisten [23].

Liu et al. [24] unternahmen ebenfalls Versuche mit einem Agonisten des A1-Rezeptors am Kaninchenherzen in situ und gelangte ebenfalls zu einer signifikanten Protektion. Diese hielt auch an, nachdem die Adenosinkonzentration stark abgesenkt wurde. Während der Ischämie führte der myokardiale ATP-Verbrauch zu einer Akkumulation des Nukleosids Adenosin [29].

Die kardialen Effekte des Adenosins werden unterschiedlich verursacht durch A1- und A2-Rezeptorsubtypen [25]. Pharmakologische Antagonisten des A1-Rezeptors, nicht jedoch des A2-Rezeptors, verhindern einen Schutz durch IP. Es führte die Applikation des A1-Agonisten R-Phenylisopropyladenosin (PIA) am Kaninchen-herzen in situ zu einer signifikanten Protektion, nicht jedoch die Applikation des A2-Agonisten CGS 21680. Beide Substanzen führten allerdings zu systemischer Hypotension, so daß die Substanz direkt intrakoronar verabreicht werden mußte.

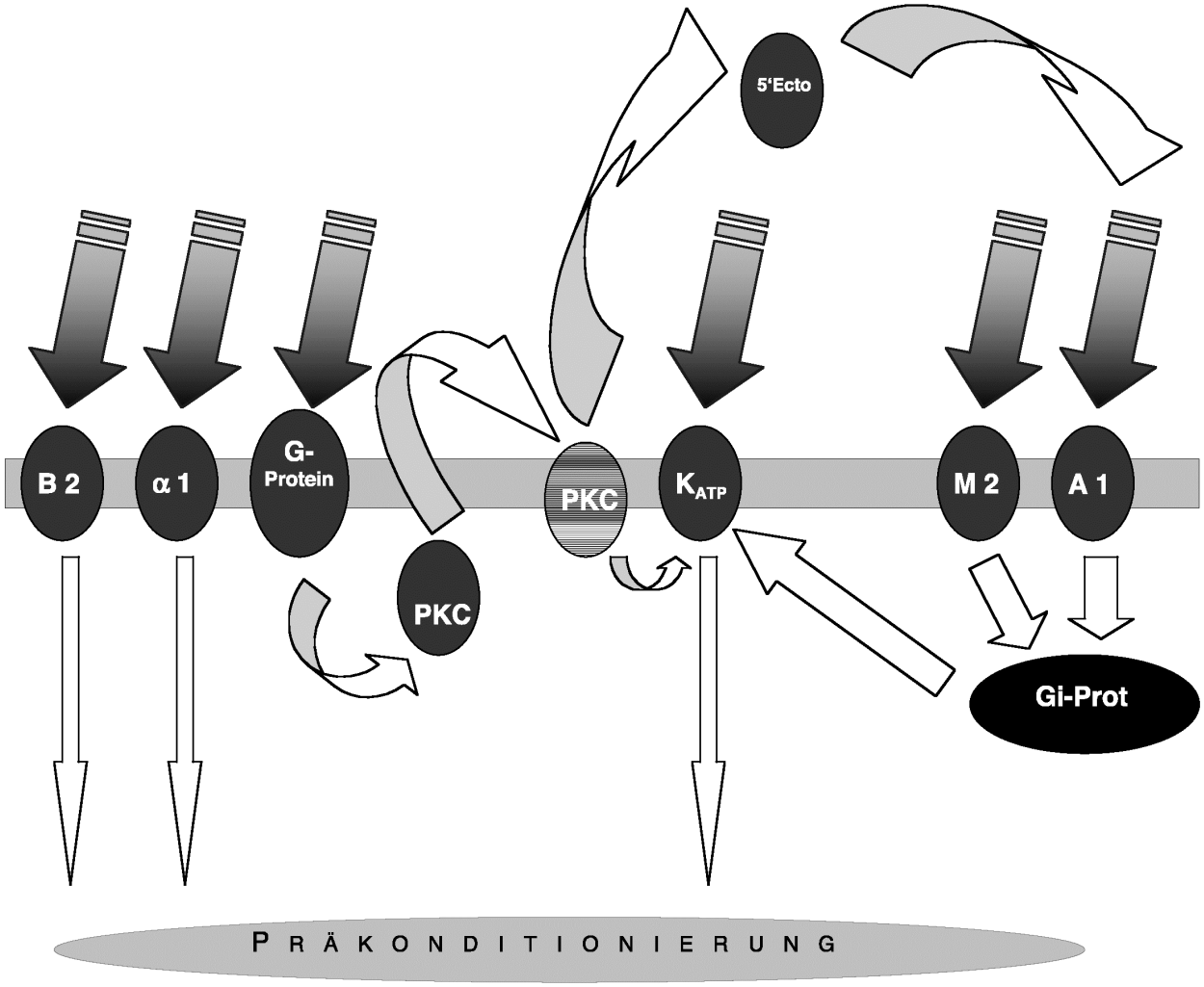


Abb. 2: Die Abbildung stellt die bisher angenommenen Zusammenhänge dar. Der Adenosinrezeptor 1 aktiviert über das Gi-Protein die K-ATP-Kanäle. Bei den adrenergen Rezeptoren wird eine direkte Effektvermittlung angenommen, ebenso bei den Bradykinin-(B-2)-Rezeptoren. Es wird angenommen, daß eine Aktivierung der PKC z.B. durch ein stimuliertes G-Protein oder durch einen präischämischen Kalziumanstieg aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Translokation der PKC führt, die dann wiederum über die Kaliumkanäle IP auslöst. Auch bei den Muskarin- und den Adenosinrezptoren wird unter anderem eine IP auslösende Wirkung über ein Gi-Protein diskutiert.

Der Mechanismus der adenosininduzierten Protektion ist Studien von Cleveland et al. [33] und Yao et al. [31] zufolge an die Aktivierung der K-ATP-Kanäle gebunden. Experimentelles Blockieren der Kaliumkanäle mit Glibenclamid verhinderte auch eine Protektion durch Adenosin und dessen Agonisten.

Speechly-Dick et al. [34,35] nimmt eine Aktivierung der PKC durch Adenosin an, auch Downey et al. [28] bestätigen dies. Dabei ist die Wirkung eines Kaliumkanalöffners umgekehrt nicht an den Anstieg von Adenosin gebunden [22]. Bei der Ratte wird dabei allerdings die Bedeutung des Adenosinsignalweges von verschiedenen

Autoren in Frage gestellt [26,30,36], da Versuche, IP über den Adenosinweg bei dieser Spezies auszulösen, erfolglos blieben. Der α1-adrenerge Signalweg scheint bei diesen Tieren der vorherrschende Mechanismus zu sein [37].

Die divergierenden Ergebnisse der Adenosinbedeutung könnten auf die unterschiedlichen Versuchsprotokolle hinsichtlich Dosierung und Schweregrad des Stresses zurückzuführen sein.

4. Der adrenerge Rezeptor

Verschiedene Autoren weisen auf die Bedeutung der α1-adrenergen Rezeptoren hinsichtlich IP hin. Es wird postuliert, daß eine vorübergehende Ischämie vom Myokard wahrgenommen wird und zu einer Freisetzung endogener Mediatoren führt, die Einfluß auf den zellulären Stoffwechsel nehmen. Streß des Myokards führt zur Freisetzung von Norepinephrin. Banerjee et al. [38,39] nehmen deshalb an, daß Norepinephrin in die rezeptorvermittelte Signaltransduktion eingebunden ist, die schließlich zur Auslösung des IP führt. Immerhin haben frühere Studien bereits an Leber und Darm eine positive Einflußnahme auf den Zellstoffwechsel bei Streß nachgewiesen [40].

Die Rolle der adrenergen Stimulation durch Katecholamine bei Ischemic Preconditioning wird unterstützt durch Beobachtungen von Banerjee et al. [38,39].

Zum Ersten fördern kurze Ischämien die Norepinephrinfreisetzung aus myokardialen adrenergen Neuronen, zum Zweiten sind die positiven Effekte bei vorheriger Entleerung der neuronalen Norepinephrinspeicher dadurch vollkommen aufgehoben, drittens stimuliert eine exogene Zugabe von Norepinephrin den Schutzeffekt von IP, viertens wird Preconditioning aufgehoben, sobald ein selektiver α1-adrenerger Rezeptorblocker vor oder nach einer Kurzischämie verabreicht wird, fünftens führen α1-adrenerge Rezeptorblocker auch zur Eliminierung des protektiven Effektes exogenen Norepinephrins und sechstens läßt sich mittels selektiver α1-adrenerger Stimulation durch Phenylephrine eine IP-äquivalente Protektion auslösen.

Kontrovers sind die Ergebnisse bezüglich des α1-adrenergen Rezeptors trotzdem, während Banerjee et al. zeigten, daß am Rattenherzen eine schnellere Wiedererholung der postischämischen kontraktilen Dysfunktionen nach Noradrenalingabe stattfand und die durch Ischämie induzierbare Protektion durch vorhergehende Entleerung der präsynaptischen Vesikel mittels Reserpinvorbehandlung verhindert wurde, fanden Weselcouch et al. [41] und Bugge et al. [42] ebenfalls nach Reserpin-

vorbehandlung weiterhin eine Protektion durch Ischämie. Am Kaninchen konnten Toombs et al. [43] keine Protektion nach Reserpinvorbehandlung mehr nachweisen.

Einer weiteren Studie von Takasaki et al. [44] zufolge, scheint an der Ratte eine Hemmung des sympathischen Nervensystem während Ischemic Preconditioning an der Schutzwirkung beteiligt, da die Aktivität aller Teile des sympathischen Nervensystems am Herzen während vorübergehender Ischämie am linken Ventrikel reduziert ist.

Beim Menschen scheint zwar der Adenosin Signalweg vorzuherrschen, jedoch kommt auch der α1-adrenerge Weg vor [45].

Sowohl die A1-Rezeptorstimulation, als auch die α1-Rezeptorstimulation sind externe Stimuli, die positiven Effekte des Ischemic Preconditioning von extrazellulär nach intrazellulär vermitteln. Beide Wege führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Intrazellulär bedeutet die Ca^{2+}-Freisetzung ein wichtiges Signal der PKC-Aktivierung, und A1- sowie α1-Rezeptorstimulation führen zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration durch verschiedene Mechanismen.

5. Die Proteinkinase C

Ebenfalls gegenläufig sind die Ergebnisse über die Bedeutung der Proteinkinase C. Ytrehus et al. [46] und Speechly-Dick et al. [35] führten Untersuchungen an isolierten Trabekularmuskeln des menschlichen Vorhofes durch. Sie stellten die Frage nach der möglichen Verbindung zwischen der Proteinkinase C und den K-ATP-Kanälen. Dazu wurden die isolierten Zellen in einer Nährlösung gehalten und mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Gemessen wurde zunächst die präischämische Kontraktilität. Die Angabe der Erholung der Kontraktilität nach der Ischämie erfolgte als Prozentsatz der Präischämie. Appliziert wurde der Kaliumkanalöffner Cromakalim, der PKC-Aktivator 1,2 Dioctanoyl-synglycerol (DOG), vergleichend dazu der Kaliumkanalschließer Glibenclamid und der PKC Antagonist Chelerythrin. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich bessere Erholung der Kontraktilität in den Präkonditionierungs-, Cromakalim- und PKC-Aktivator-versuchen bei Applikation vor der Ischämie im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Präkonditionierung. Hingegen hoben die Substanzen in einer Studie von Speechly-Dick et al. [35] Glibenclamid und Chelerythrin den Effekt der Präkonditionierung vollständig auf. Außerdem verhinderte Glibenclamid die präkonditionierende Wirkung von DOG. Daraus folgerte Speechly-Dick, daß beim Menschen der Effekt der Präkonditionierung durch die Proteinkinase C aktiviert wird und über die K-ATP-Kanäle als Endeffektor vermittelt wird.

An der Ratte [34,42] und am Kaninchen [46,47] führt eine Hemmung der PKC zum Verlust der protektiven Wirkung von Ischämie, während die Aktivierung der Proteinkinase C Protektion induziert. Am Hunde- [48] und am Schweinemyokard [49] dagegen führte eine Aktivierung bzw. Hemmung der PKC nicht zur Protektionsvermittlung respektive Blockade.

Das Kalziumgleichgewicht wird durch verschiedene Signalwege aufrechterhalten [50,51]. Intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationserhöhung wird als gemeinsamer Nenner von Ischämie / Reperfusionsstreß bedingter Zelldysfunktion und -tod angenommen [51,52]. Es ist bekannt, daß hohe Kalziumspiegel zu einer verminderten mitochondrialen Funktion führen [53]. Postischämische Dysfunktion reversibel geschädigter Myozyten als auch letale Schädigung stehen in Zusammenhang mit erhöhtem Ca^{2+} [54,55].

Ein endogener myokardialer Schutzmechanismus benötigt folglich einen Mechanismus um diese zelluläre Ca^{2+}-Konzentrationserhöhung zu verhindern [51]. Die genannten Stimuli (Ischämie, Adenosinrezeptorstimulation, Norepinephrin) des Preconditioning erhöhen die Ca^{2+}-Konzentration. Ca^{2+} muß also als Second messenger oder intrazellulärer Stressor dienen [50,51].

Meldrum et al. [50] fragen in einer Versuchsserie nach der Wirkung einer präischämischen Kalziumfreisetzung in Bezug zur Proteinkinase C. Dazu verwendeten sie Ryanodin, das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium freisetzt. Im Experiment erzeugte er am Rattenmodell mittels dieser Substanz zehn Minuten vor einer Ischämie einen erhöhten Kalziumspiegel. Ergänzend wurde eine Versuchsserie mit einem PKC-Hemmer kombiniert durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Erholungsrate hinsichtlich Blutdruckaufbau, enddiastolischem Druck, koronarem Blutfluß und der Kreatininkinaseaktivität. Dieser Effekt wurde durch den PKC-Inhibitor aufgehoben. Er schließt daraus, daß ein präischämischer Kalziumanstieg aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer funktionalen Protektion führt und diese Protektion durch eine Translokation von PKC Isoformen vermittelt wird. Die Translokation hatte er mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen. Aus vorherigen Versuchen war bekannt, daß eine vorübergehende Kalziumerhöhung die Zelle gegen Schädigung durch nachfolgende Entleerung und Überfüllung mit Kalzium schützt [50]. Somit war die Frage nach einem Schutz der Zelle gegen funktionelle Schädigung geboren. In weiteren Versuchen wies die Arbeitsgruppe diese kalziuminduzierte Protektion nach [50].

Auch Miyawaki et al. [56] kommen zu dem gleichen Ergebnis. Dabei wird IP durch eine Blockade der L-type Ca^{2+}-Kanäle mittels Verapamil verhindert. Auch seine Ergebnisse sind am Rattenmodell erarbeitet worden.

6. Der muskarinische M-2 Rezeptor

Veröffentlichungen von Thornton et al. [57] und Yao et al. [58] berichten am perfundierten Rattenherzen und beim Hund von einer Reduktion der Infarktgröße durch Stimulation des muskarinischen M-2-Rezeptors mit Carbachol oder Acetylcholin. Der Adenosinrezeptor und der muskarinische M-2-Rezeptor sind dabei über ein Gi-Protein mit dem K-ATP-Kanal gekoppelt, und deren protektive Wirkung kann über eine Blockade der Kaliumkanäle gehemmt werden [58-64].

7. Der Bradykinin-B-2-Rezeptor

Der Bradykinin-B-2-Rezeptor konnte durch Gabe des spezifischen Bradykinin-B-2-Antagonisten HOE 140 blockiert werden mit der Folge der Verhinderung einer Ischämie induzierten Infarktgrößenreduktion. Im Gegenzug konnte von Martorana et al. [65] und Wall et al. [66] an Kaninchen und Hunden durch die Gabe von Ramiprilat – einem Hemmer des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) – welches identisch ist mit der für den Kininabbau zuständigen Kininase II und Bradykinin, Protektion induziert werden. Auch Linz et al. [67] und Hendrikx et al. [68] kommen zu diesem Ergebnis.

8. Die 5'-Ectonucleotidase

Kitakaze et al. [37,69] und Minamino et al. [70] erforschten die 5'-Ectonucleotidase hinsichtlich einer Mitbeteiligung bei Ischemic Preconditioning. Dabei konnten sie nachweisen, daß eine Blockade IP verhindert, während eine direkte Aktivierung Protektion auslöst. Sie stellten die Hypothesen auf, wonach die 5'-Ectonucleotidase bei kurzer Ischämie durch einen PKC-abhängigen Mechanismus aktiviert wird und diese gesteigerte Aktivität über erhöhte Adenosinproduktion die K-ATP-Kanäle aktiviert.

9. Die ATP-abhängigen Kaliumkanäle

Viele Studien belegen, daß die ATP abhängigen Kaliumkanäle wesentlich an der Vermittlung des Ischemic Preconditioning beteiligt sind, denn bei allen Spezies

Schweinen [71], Kaninchen [24,72,73], Ratten [74] und auch beim Menschen [35,75] sind die Experimente reproduzierbar und führten bisher zu den gleichen Ergebnissen. Ergänzend fügt sich diese Funktion gut in die bisherigen Erkenntnisse und es erklärt den bisher unverständlichen Anstieg der kardiovaskulären Mortalität von oral (K-ATP-Kanal-Blocker) behandelten Patienten im Vergleich zu rein diätetisch behandelten Diabetikern. Eine Studie des University Group Diabetes Program (UGDP) in den USA erarbeitete die Effektivität einer oralen Gabe von hypoglykämischen Substanzen im Vergleich zu Insulin und diätetischer Therapie bei Diabetes. Die Studie kam zu dem Ergebnis, daß Patienten, die 5 bis 8 Jahre mit Tolbutamid behandelt wurden, eine signifikant höhere Inzidenz zu kardiovaskulärer Mortalität aufwiesen, als rein diätetisch behandelte Diabetiker. Die Mortalitätskurve zwischen Tolbutamid und Placebo divergierte zunehmend und führte zu der auf den Beipackzetteln von Sulfonylharnstoffen gegebenen Warnung vor erhöhter kardiovaskulärer Mortalität [76]. Cleveland et al. [77] erforschten, ob sich das Myokard K-ATP-Kanal-Blocker therapierter Patienten präkonditionieren läßt. Dazu verwendeten sie isolierte Trabekularmuskeln des rechten Atriums in einer Zellkultur die mittels einer Schwingung von 1 Hz stimuliert wurden. Diese Trabekel versetzten sie in einen ischämischen Zustand mittels eines glucosefreien Mediums und einer Stimulation von 3 Hz über 45 Minuten. Anschließend erfolgte eine Reperfusion von 120 Minuten. Das Material der Vergleichsgruppen stammte von Patienten, die zuvor keinerlei orale Antidiabetica erhalten hatten, von Patienten mit Insulintherapie und Patienten mit vorheriger Langzeittherapie mit oralen Kaliumkanal-Blockern. Zur Präkonditionierung wurde das Gewebe vor der oben beschriebenen 45 minütigen Ischämie einer Ischämie von 5 Minuten ausgesetzt.

Die kontraktile Funktion der Trabekel wurde als Maß herangezogen und die Ergebnisse der Kontrollgruppen mit den Versuchsgruppen verglichen. Nach Auswertung der Resultate bestätigten auch die Gruppe um Cleveland die Bedeutung der K–ATP–Kanäle bezüglich IP, denn das Myokard der nicht oral therapierten Patienten wurde funktionell durch IP geschützt. Hingegen war das Myokard oral therapierter Patienten nicht geschützt durch IP.

Im Jahre 1983 entdeckte Noma [78] die ATP-abhängigen Kaliumkanäle am Herzen, aus dem Jahre 1970 stammten die unerklärlichen Effekte der Antidiabetica auf Kaliumkanal-Blockerbasis. Aber erst mit der Entdeckung des protektiven Effektes durch ischämische Präkonditionierung am Herzen durch Murry et al. [5] und der Erforschung der Rolle der Kaliumionenkanäle bei Ischemic Preconditioning ließ sich dafür eine Erklärung finden.

Verschiedene K-ATP-Kanäle sind bekannt, deren Unterscheidung in molekularbiologischen Unterschieden liegt. Ein Kaliumkanal setzt sich zusammen aus einer porenbildenden Untereinheit (Kir 6.2) und einem Regulatorprotein, dem sogenannten Sulfonylharnstoffrezeptor (sulfonylurea receptor, SUR). Drei SUR sind bekannt und bilden zusammen mit Kir 6.2 die unterschiedlichen Typen der K-ATP- Kanäle. So finden sich in den pankreatischen β-Zellen die Rezeptoren der Struktur SUR 1/ Kir 6.2, am Herzen und im Skelettmuskel die Kanäle SUR 2A/ Kir 6.2 und in der glatten Muskulatur der Gefäße der Typ Sur 2B/ Kir 6.2. Diese Kanäle zeigen in Säugerzellen klare pharmakologische Unterschiede:

Der SUR 1/ Kir 6.2 Kanal wird durch Diazoxid aktiviert und zeigt eine hohe Affinität zu Glibenclamid. SUR 2A bindet an Idoglibenclamid, SUR 2A/ Kir 6.2 läßt sich allerdings durch Diazoxid nicht aktivieren, aber durch die Kanalöffner Pinacidil und Cromakalim.

Beide Kanäle lassen sich zwar durch Glibenclamid blockieren, wobei SUR 2A/ Kir 6.2 (350 nM Glibenclamidkonzentration, Hälfte der möglichen Hemmung) erheblich unempfindlicher ist als SUR 1/ Kir 6.2 (1,8 nM Glibenclamidkonzentration, Hälfte der möglichen Hemmung).

SUR 2B/ Kir 6.2 kann durch Diazoxid und Pinacidil aktiviert werden und wird bei einer 20 μM Glibenclamidkonzentration gehemmt.

Verschiedene kaliumkanalaktive Substanzen sind bekannt. Dabei besteht ein eindeutiger Unterschied zwischen den Öffnern der kardialen und der pankreatischen K–ATP–Kanäle. Öffner des Cromakalimtyps aktivieren die Kanäle im Herzmuskel, zeigen aber keine Wirkung an der Bauchspeicheldrüse. Diazoxid hingegen aktiviert die Kanäle im Pankreas und im myokardialen Gewebe [1].

Bezüglich der Kanalblocker sind die Sulfonamide die wirkungsvollsten. Sie greifen sowohl an den Kanälen des pankreatischen swie des kardialen Gewebes an. Dabei sind die Sulfonylharnstoffe der ersten Generation, wie Tolbutamid, deutlich weniger wirkungsvoll im Vergleich zu jenen der zweiten Generation, wie Glibenclamid. Glibenclamid diente und dient von daher als gängiger Kanalblocker in der Mehrheit der Experimente [1].

Bestand bisher also Einigkeit darüber, daß es sich bei den K-ATP-Kanälen um den Effektor des IP handelt, weisen neuere Untersuchungen nun auf eine unterschiedliche Bedeutung der Subtypen der K-ATP-Kanäle hinsichtlich der ischämischen Präkonditionierung hin.

Die Öffnung eines Kationen-Kanals senkt die Ladung des Zellinneren ab, und diese Negativität reduziert die Möglichkeit einer plötzlichen oder langanhaltenden

Depolarisation. Dagegen würde der schnelle Ausstrom von Kalium bei akuter Ischämie das Kaliumpotential entlang der Zellmembran erheblich reduzieren und dieser Ausstrom somit die Gefahr mit sich bringen, die Herzmuskelzelle viel schneller zu depolarisieren.

So attraktiv das Konzept der K-ATP-Kanäle auch erscheint, kann es nicht darüber hinwegtäuschen, daß eine Reihe signifikanter Symptome der ischämischen Präkonditionierung nicht erklärt werden können, wie beispielsweise der Gedächtniseffekt, und ebensowenig ist zu verstehen, warum ein Mechanismus, von dem eine schnelle Reaktion angenommen wird, solch eine komplizierte Signalkaskade benötigt.

10. Mitochondriale und sarkolemmale K-ATP-Kanäle

Auch gibt es elektrophysiologisch keinen zwingenden Hinweis auf eine Mitbeteiligung der Ionenkanäle bei Ischemic Preconditioning. Hier hinzu fügt sich die Hypothese nach der Bedeutung der mitochondrialen K-ATP-Kanäle, insbesondere in Anbetracht der seit langem bekannten Tatsache, daß die Funktion der Mitochondrien durch IP nicht beeinträchtigt wird.

Gefunden wurde der mitochondriale Kaliumkanal in der Rattenleber von Inoue et al. [79]. Sie entdeckten einen für Kalium hochselektiven Kanaltyp, der sich durch ATP reversibel inaktivieren läßt.

Traditionell war man davon ausgegangen, daß die innere mitochondriale Membran relativ undurchlässig ist für Ionen. Die Unterdrückung des K^+stromes durch ATP und eine Empfindlichkeit gegenüber Kaliumkanalöffnern und Schließern führte zu der Annahme, daß K-ATP-Kanäle, gleich denen der Zelloberfläche auf der inneren Mitochondrialmembran existieren, wie O'Rourke [80] feststellt.

Später konnten die K-ATPm-Kaliumkanäle dann aus der Rattenleber und dem Rindherzen isoliert werden. Als Technik zum Nachweis einer Wirkung auf die Kanäle diente eine auftretende respektive verhinderte Schwellung der Mitochondrien in einer isotonischen Kaliumsalzlösung. Der K-ATPm-Kaliumkanal wurde durch eine ATP Konzentration von 100 μmol/L gehemmt und blockiert durch Glibenclamid oder 4-Aminipyridin. Andere Studien ergaben eine vollständige Blockade durch ATP, ADP, Palmotoyl und Oleyl-CoA, während durch GTP and GDP deren Wirkung aufgehoben wurde [80]. Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Daten erworben am isolierten Zellen und am ganzen Herzen [80].

Wie erwähnt lassen sich die K-ATPm-Kaliumkanäle mit Sulfonamiden beeinflussen. So konnte mittels des Sulfonylharnstoffderivates Glibenclamid bei 50 μM Konzentration der Kaliumeinstrom in die Mitochondrien der Leber vollständig gestoppt werden. In Anwesenheit von Mg^{2+} hingegen wurde die Wirkung von Glibenclamid gehemmt, so daß bei einer 70 μM Konzentration lediglich eine 10%ige Hemmung des Influx stattfand. Andere bekannte Öffner des K-ATP-m Kaliumkanales sind Pinacidil und Diazoxid [81].

Versuche mit Kaliumkanalöffnern führten zu einem IP gleichen Schutzeffekt, während mit dem Kaliumkanalschließer Glibenclamid in allen Experimenten Ischemic Preconditioning verhindert werden konnte [82]. Bisher wurde Glibenclamid als gängiger Kaliumkanalschließer herangezogen, wenn vergleichende Studien zur Wirksamkeit unterschiedlicher Öffner durchgeführt wurden.

Diese Substanz wirkt sowohl auf die sarkolemmalen (K-ATPs-) wie auf die mitochondrialen (K-ATPm-) Kaliumkanäle [81,83].

11. HMR 1098

Mit HMR 1098 1- [[5- [2–(5–chloro–o–anisamido)ethyl]–2-methoxyphenyl]sulfonyl]-3-methylthiourea steht nun ein kardioselektiver Kaliumkanalblocker auf der Testliste, von dem bekannt ist, daß er spezifisch auf die sarkolemmalen Kaliumkanäle (K-ATPs) wirkt.

Grundlage zur Entwicklung dieser neuen Substanz aus der Gruppe der Sulfonylthioharnstoffe war der Bedarf nach einem neuen Antiarrhythmikum. Hoechst Marion Roussel suchte den Weg über die Kaliumkanalblocker zu gehen, ausgehend von folgender These: Seit der Entdeckung der K-ATP-Kanäle weisen die Ergebnisse zunehmend auf eine essentielle Bedeutung der Aktivierung dieser Kanäle hinsichtlich der elektrophysiologischen Konsequenzen bei Ischämie hin. So konnte gezeigt werden, daß Glibenclamid (ein selektiver Blocker der K-ATP-Kanäle) die extrazelluläre Kaliumanreicherung reduziert und damit die Verkürzung des Aktionspotentials umkehrt, welches durch Hypoxie oder myokardiale Ischämie verursacht wurde. Wenn nun die extrazelluläre Kaliumakkumulation zu Ventrikelfibrillationen (VF) führt, ist anzunehmen, daß Pharmaka, die diese Akkumulation vermindern, auch eine Verminderung der Ventrikelfibrillationen bewirken. Eine begrenzte Anzahl experimenteller und klinischer Studien unterstützen diese Hypothese. So konnte bsw. gezeigt werden, daß Glibenclamid am isolierten Rattenherzen ventrikuläres Flimmern verhindert. Eine andere Veröffentlichung weist eine Reduzierung des Schweregrades der

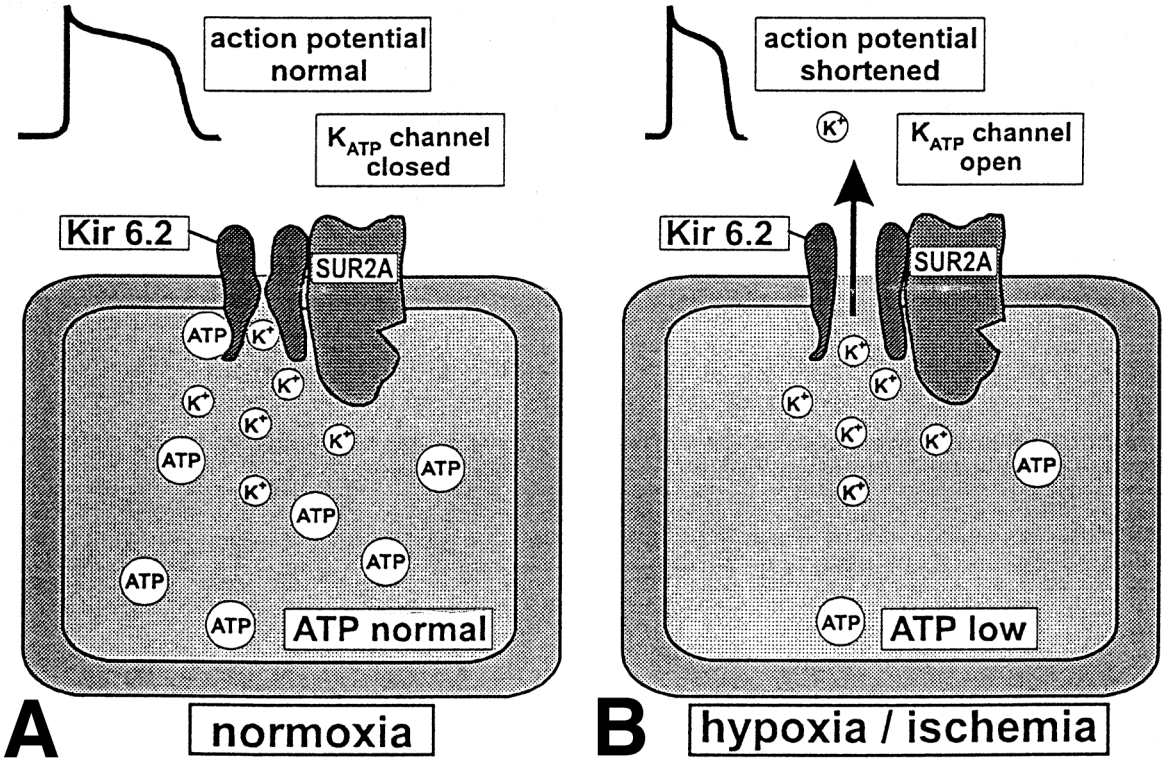


Abb. 3: Die Abbildung zeigt die herzständigen K-ATP-Kanäle (Sur2A/Kir 6.2) unter normoxischen Bedingungen (A) und hypoxischen Bedingungen (B). ATP blockiert unter normoxischen Bedingungen den Kanal. Es erfolgt kein Kaliumionenausstrom. Unter hypoxischen Bedingungen sinkt der ATP-Spiegel in der Zelle, der Kanal öffnet sich.Quelle: Gögelein et al. [1]

Arrhythmien während vorübergehender Ischämie bei Diabetikern durch Glibenclamid nach [84,85].

Ursprünglich entwickelt wurden die Sulfonamide als Medikamente zur Therapie infektiöser Erkrankungen von Domagk 1933. 1942 entdeckte man erstmalig die blutzuckersenkende Wirkung der Sulfonamide im Zuge der Behandlung von Typhuspatienten in Frankreich, diese wurde aber durch die Kriegswirren nicht weiter verfolgt und quasi 1955 erneut entdeckt. Bei der Erprobung eines neuen Sulfonylharnstoffderivates (Carbutamid) trat als Nebenwirkung Hypoglykämie auf. Lange Zeit war der Mechanismus jedoch ungeklärt. Die Zahl der bis heute synthetisierten Derivate geht in die Tausende, wenn auch nur wenige therapeutisch zur Verfügung stehen. 1966, elf Jahre nach Tolbutamid und Carbutamid, wurde Glibenclamid vorgestellt, das in einer 200 fach niedrigeren Dosis bereits blutzuckersenkend wirksam ist [86]. Die blutzuckersenkende Wirkung beruht auf einer Modulation der Insulinfreisetzung der pankreatischen Zellen, durch Beinflussung des Membranpotentials. Weitere 20 Jahre vergingen bis man

sich ausführlicher mit den kardialen Wirkungen beschäftigte. 1990 wird von einer potenten antifibrillatorischen Wirkung am Rattenherzen berichtet. Hoechst Marion Roussel nimmt diese Ergebnisse zum Anlaß, sich näher mit der antifibrillatorischen Wirkung verwandter Substanzen zu beschäftigen.

Chemisch ist Glibenclamid aus zwei Teilen zusammengesetzt, dem linken Methoxybenzamidorest sowie dem rechten Benzensulfonylharnstoffteil, beide verbunden durch zwei Kohlenstoffatome. Neben Glibenclamid haben alle bekannten antidiabetischen Sulfonylharnstoffe den Benzensulfonylharnstoffteil, der typischerweise am terminalen Stickstoffatom durch einen großen lipophilen Substituenten ersetzt ist. Im Gegensatz variiert der andere Anteil mit großer struktureller Vielfalt, zum Teil mit wenig Verwandtschaft zu dem Anteil am Glibenclamid (z.B. Tolbutamid, Glimeprid). Tolbutamid blockiert die pankreatischen Kanäle, zeigt aber wenig Wirkung an den kardialen Rezeptoren [1].

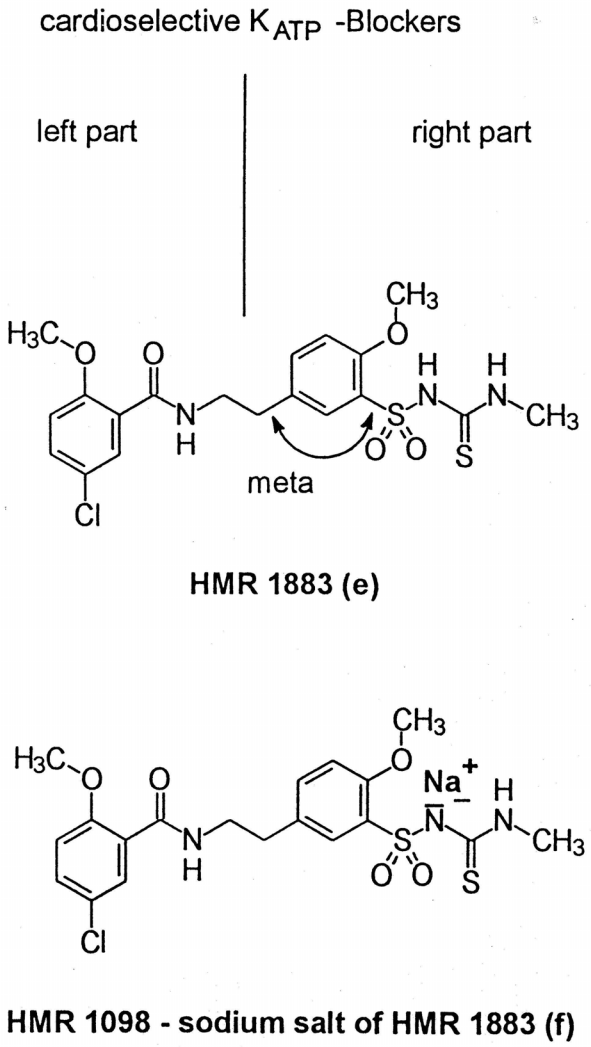


Abb. 4: Die Abbildung zeigt die chemischen Strukturformeln von HMR 1883 und seinem Salz HMR 1098. Quelle: Gögelein et al. [1].

Die Vorgehensweise zur Entdeckung neuer kardioselektiver Substanzen bestand darin, Verbindungen auszutesten, die den Benzamidanteil des Glibenclamid aufweisen, deren lipophiler Substituent am Sulfonamidanteil aber deutlich kleiner ist. Alle synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre pankreatische und kardiale Wirkung geprüft. HMR 1883 war zwar nicht die potenteste Verbindung, wurde aber wegen ihrer Kardioselektivität ausgewählt. Bei HMR 1883 ist der Benzamidanteil gleich dem des Glibenclamid, wohingegen der Sulfonylharnstoffteil grundlegend verändert ist. Eine nah verwandte Substanz, die ebenfalls die Metakonstellation wie HMR aufweist, war nicht kardioselektiv. Dies belegt, daß noch weitere Strukturen des HMR für diese Selektivität verantwortlich sind [1].

Aus den bereits erwähnten Studien von Engler et al. und Cleveland et al. [76,77] war jedoch bekannt, mit welchen Konsequenzen die Verwendung dieser Substanzen hinsichtlich IP verbunden ist. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an.

III. Material und Methoden

1. Tiermodell

Das Tiermodell einer alternierenden Ischämie und Reperfusion am Myokard des Schweines wurde in den Arbeitsgruppen Verdouw und Schaper entwickelt.

1.1. Tiere

Für die Versuche herangezogen wurden männlich-kastrierte Läuferschweine der Deutschen Landrasse (DL) mit einem Körpergewicht zwischen 30 und 40 kg.

1.2. Prämedikation und Narkose

Die Schweine wurden mit 0,5 ml/Tier Piritramid (Dipidolor®) i.m. und nach weiteren 5 Minuten mit 0,25 ml/kg KGW Ketaminhydrochlorid 10% prämediziert. Nach weiterer individueller Gabe (nach Wirkung) von 0,15 ml/kg bis 0,20 ml/kg KGW Ketamin 10% i.v. über die Ohrvene erfolgte eine Intubation mittels Endotrachealtubus nach Tracheotomie. Anschließend wurden die Tiere an ein pressluftgesteuertes Beatmungsgerät (Stephan Respirator ABV) angeschlossen und mit 5 l/min Raumluft und 2 l/min Sauerstoff beatmet. Desweiteren erfolgte eine Bolusgabe von 25 mg/kg α-Chloralose i.v. nach vorherigem Legen eines Venenverweilkatheters (Vasodrop, 20 G, 1,0 x 0,75 mm, Firma Braun) in die Ohrvene. Aufrechterhalten wurde die Narkose mit einer Dauerinfusion von 25 mg/kg α-Chloralose. Es wurden weitere 0,5 ml/Tier Piritramid intravenös appliziert und das Tier mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) über den gesamten Versuchszeitraum infundiert.

1.3. Operationstechnik

Das weitere Vorgehen bestand aus dem Freipräparieren der linken Arteria carotis und Vena jugularis, die anschließend mit jeweils einem arteriellen sheath catheter (7F) kanüliert wurden. Über einen mit 0,9% NaCl gefüllten PVC-Schlauch wird die Carotis an einen Statham transducer angeschlossen und über ein Druckmeßgerät somit invasiv der Blutdruck gemessen.

Der Katheter in der Vena jugularis dient der systemischen Applikation zu testender Substanzen.

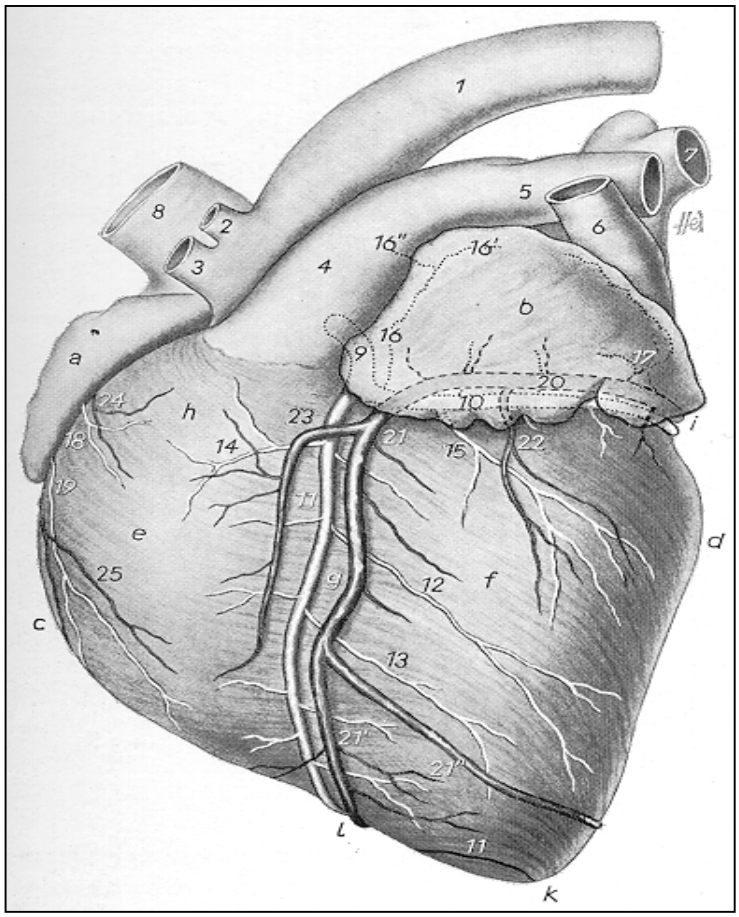


Abb. 5: Ansicht des Schweineherzens von Anterior; (Facies auricularis eines Schweineherzens) a rechtes Herzohr; b linkes Herzohr; c Margo ventricularis, d Margo ventricularis sin.; e Ventriculus dext.; f Ventriculus sin.; g Sulcus interventricularis paraconalis; h Conus arteriosus; i Sulcus coronarius sin.; k Apex cordis; I Incisura apicis I Arcus aortae; 2 A. subclavia sin.; 3 A. brachiocephalica; 4 Truncus pulmonalis, 5 A. pulmonalis sin.; 6 V. azygos sin.; 7 linke Lungenvenen; 8 V. cava cran.; 9 A.coronaria sin.; 10 ihr R. circumflexus, 11 ihr R. interventricularis paraconalis 12 R. collateralis prox.; 13 R. collateralis dist.; 14 A. coni arteriosi der A. coronaria sin.; 15 R. prox. ventriculi sin.; 16 R. prox. atrii sin., 16' sein zur Herzohrbasis ziehender Ast, sein zur Wand des linken Vorhofes ziehender Ast.; 17 R. intermed. atrii sin.; 18 A. coni arteriosi der A. coronaria dext.; 19 R. prox. ventriculi dext.; 20, 21 V. cordis magna, 20 ihr R.circumflexus, 21 ihr R. interventricularis paraconalis; 21', 21. Endäste des R. intenentricularis paraconalis; 22 V. ventriculi sin.; 23 Begleitast des R.interventricularis paraconalis der V. cordis magna. Quelle: Nickel [87]

Zusätzlich wurden die Tiere an ein EKG angeschlossen.

Die anschließende Eröffnung des Thorax erfolgte durch midsternale Thorakotomie. Dazu wurden mit einem Elektrokauter Haut und Bindegewebe über dem Sternum von der Apertura thoracica bis zum Cartilago xyphoideus durchtrennt und entstehende Blutungen gestillt. Mit einer Schere wurde das Zwerchfell unterhalb des Xyphoidknorpels durchstoßen und mit dem Finger die Pleura thoracalis abgelöst. Mit einer Knochensäge wurde nun das Sternum angesägt und anschließend mit einer Sternumschere in seiner gesamten Länge durchschnitten. Mittels Thoraxspreizer konnte das Brustbein gespreizt werden, und der Zugang zu dem darunterliegenden Herz wurde freigegeben. Die Blutungen auf den Schnittflächen des Sternums sind mittels des Elektrokauters gestillt worden. Das Perikard wurde nun kreuzweise inzisiert und ein “Herzcradle” hergestellt, eine Art Wanne (cradle, engl. = Wiege), in der das Herz ungestört pumpt und in seiner Lage dabei nicht von den Atembewegungen gestört wird.

Die linke absteigende Koronararterie (Left Anterior Descendens, LAD) wurde aufgesucht und jeweils im proximalen Drittel umstochen. Auf die beiden Fadenenden wurde ein Knöpfchen aufgefädelt, welches zwei Bohrkanäle aufweist, die auf der Unterseite je eine Öffnung haben und auf der Oberseite in der selben Öffnung münden. Danach wurden etwa 4 cm Infusionsschlauch über die Fäden geschoben.

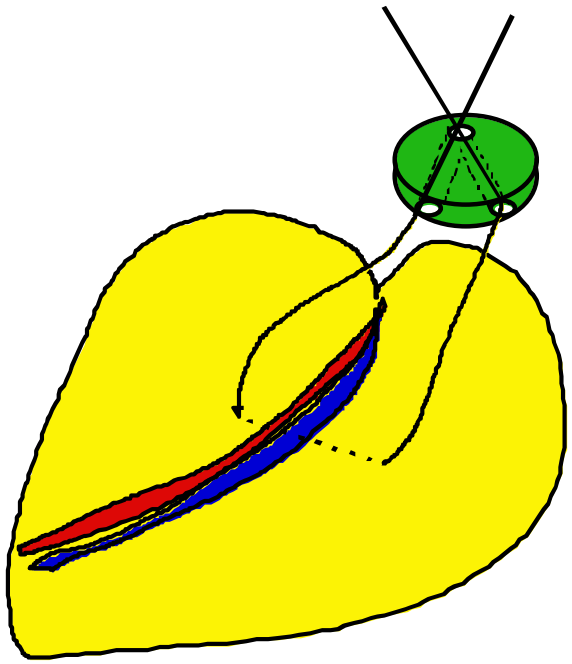


Abb. 6: Schematische Darstellung der Ligationstechnik. Die LAD (rot) ist umschlungen. Das Knöpfchen mit der speziellen Bohrung erlaubt einen gleichmäßigen, nicht einschnürenden Verschluß.

Nun erfolgte eine Gabe von 5000 IE Heparin.

Mittels Arterienklemme wurde nun der Schlauch gegen das Knöpfchen geschoben und dieses damit gegen die LAD gepresst und diese verschlossen. Diese aufwendige Prozedur ist notwendig weil die einfache direkte Ligatur des Gefäßes mit einer Fadenumschlingung häufig zu irreversiblen Spasmen führt.

Auftretende Ventrikelfibrillationen wurden durch einen Defibrillator behoben, wobei mit zunehmender Häufigkeit die Energie von 200 bis 350 J gesteigert wurde.

Durch eine Injektion von 1 g Fluorescein 15 Minuten vor Versuchsende wurden alle durchbluteten Bereiche des Tieres gelb gefärbt, diese Färbung diente dem Nachweis einer ausreichenden Reperfusion in der Infarktzone. Nach der letzten Minute wurde die Aorta mittels Aortenklemme verschlossen, die Ligatur der LAD erneut verschlossen und anschließend in den Aortenbulbus eine Suspension aus 10 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 g Zink-Cadmium-Sulfid-Mikrosphären (orange fluoreszierend) injiziert.

Nach Durchführung der entsprechenden Versuchsprotokolle und Färbungen wurde das Tier mittels einer Bolusinjektion von 20 ml einer 20%igen Kaliumchloridlösung euthanasiert und das Herz am Mesenterium abgetrennt und entnommen.

Die folgenden Fotos zeigen den Operationsablauf

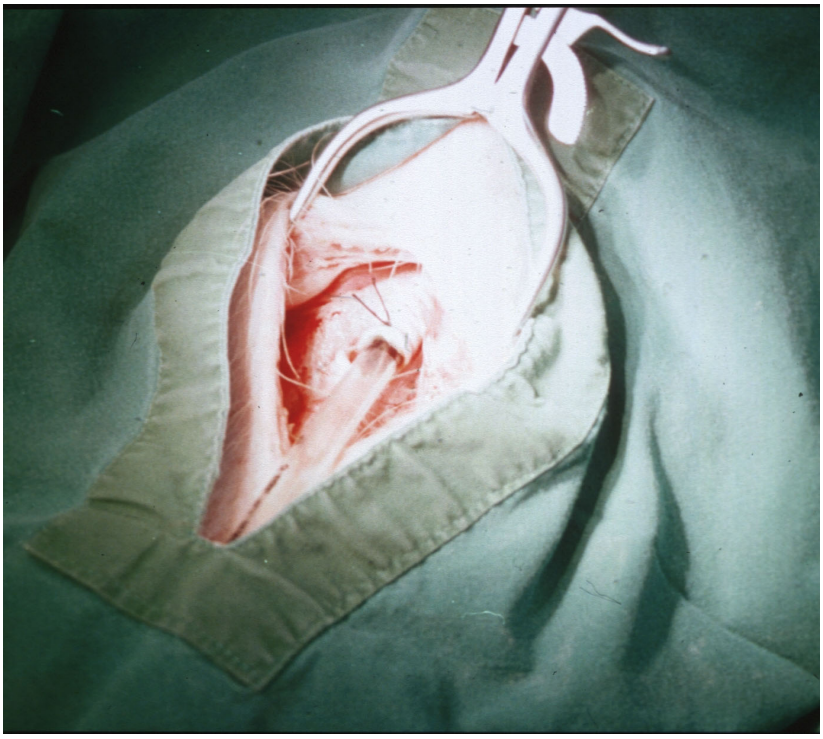


Abb. 7: Die ventrale Halsseite ist eröffnet, die Trachea direkt intubiert

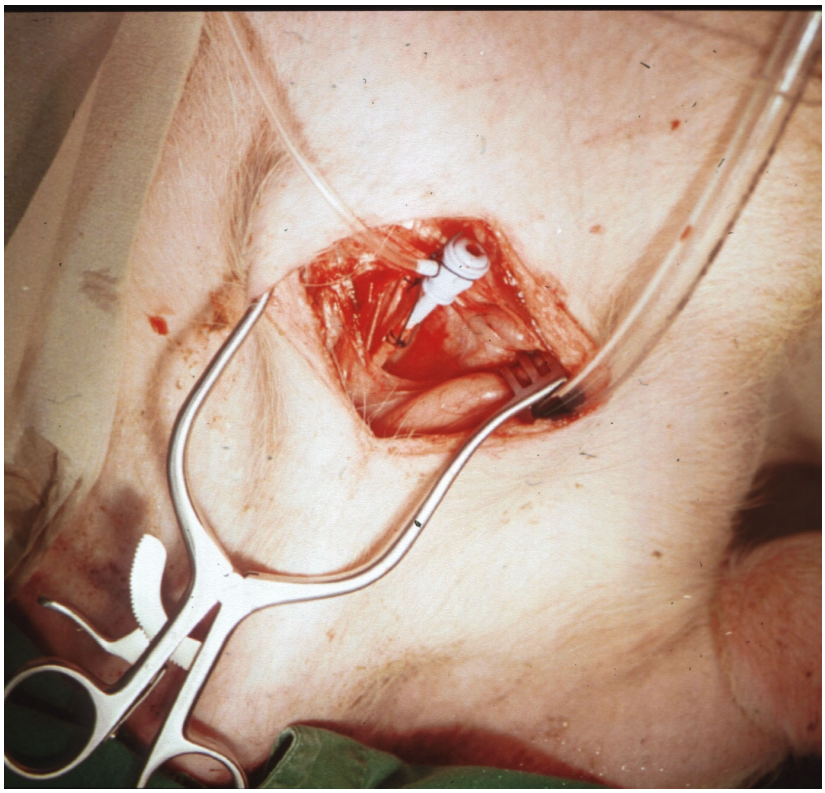


Abb. 8: Die Arteria carotis ist zur Blutdruckmessung katheterisiert.

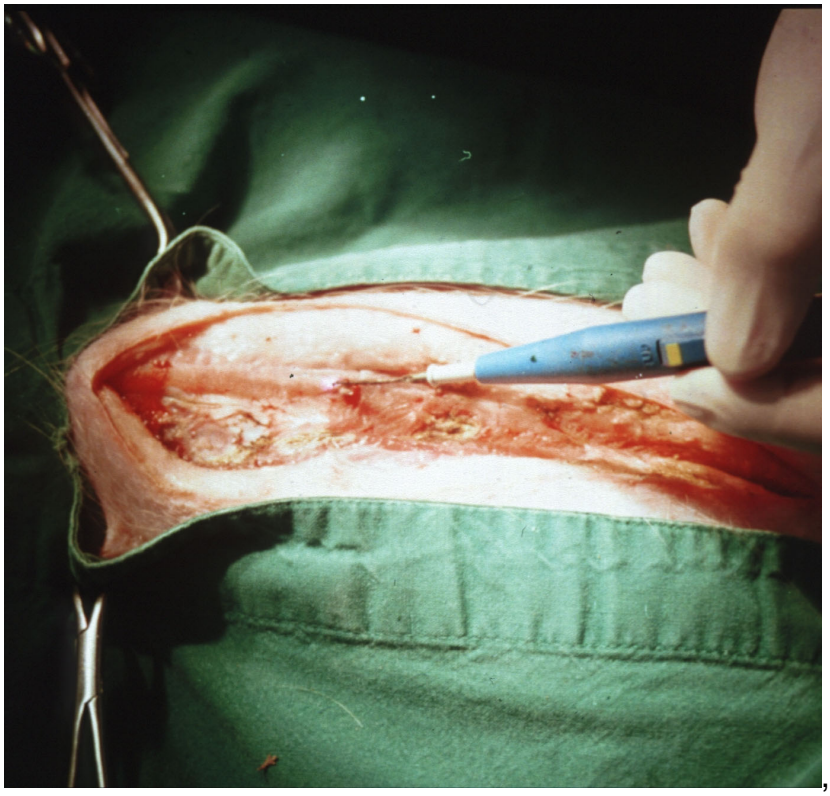


Abb. 9: Die Haut über dem Sternum wird mittels Kauter bis zum Knochen durchtrennt.

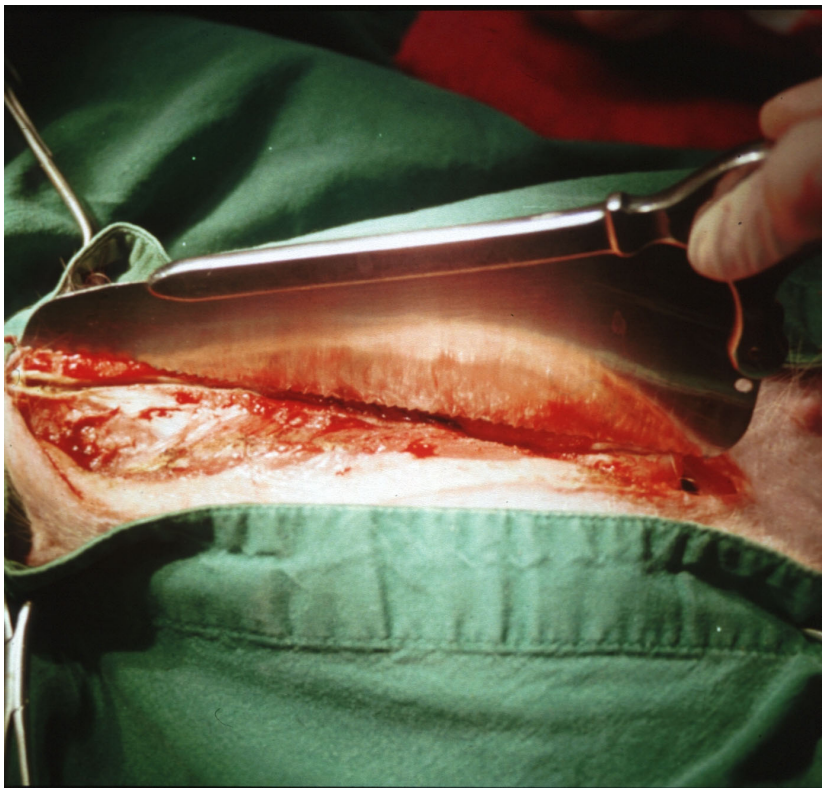


Abb. 10: Mittels chirurgischer Säge wird das Brustbein angesägt, um eine Führung für die Sternumschere zu bieten.

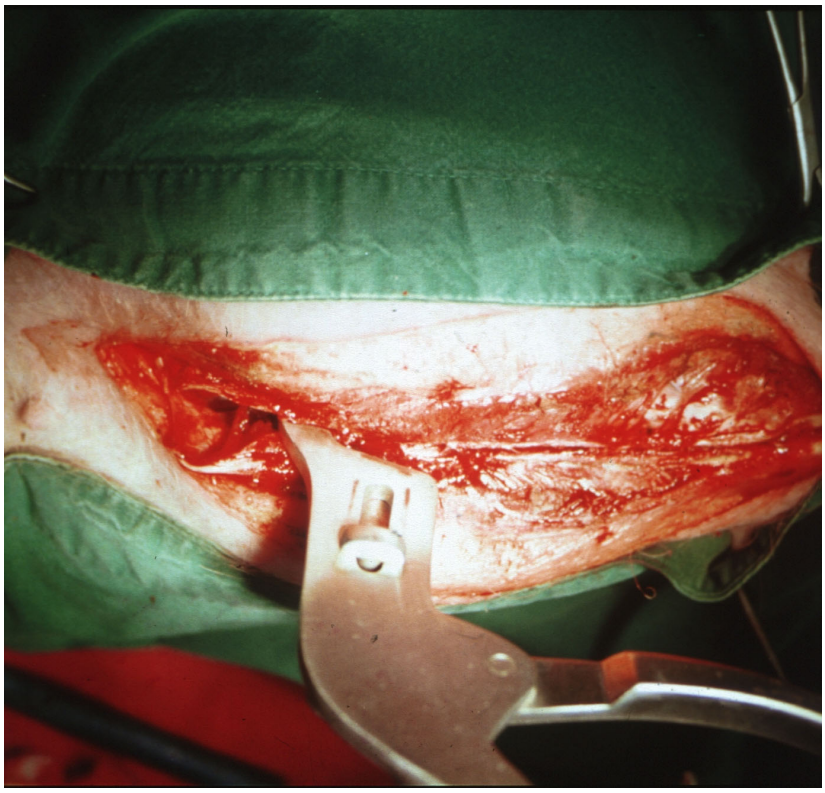


Abb. 11: Mittels Sternumschere wird das Brustbein durchtrennt.

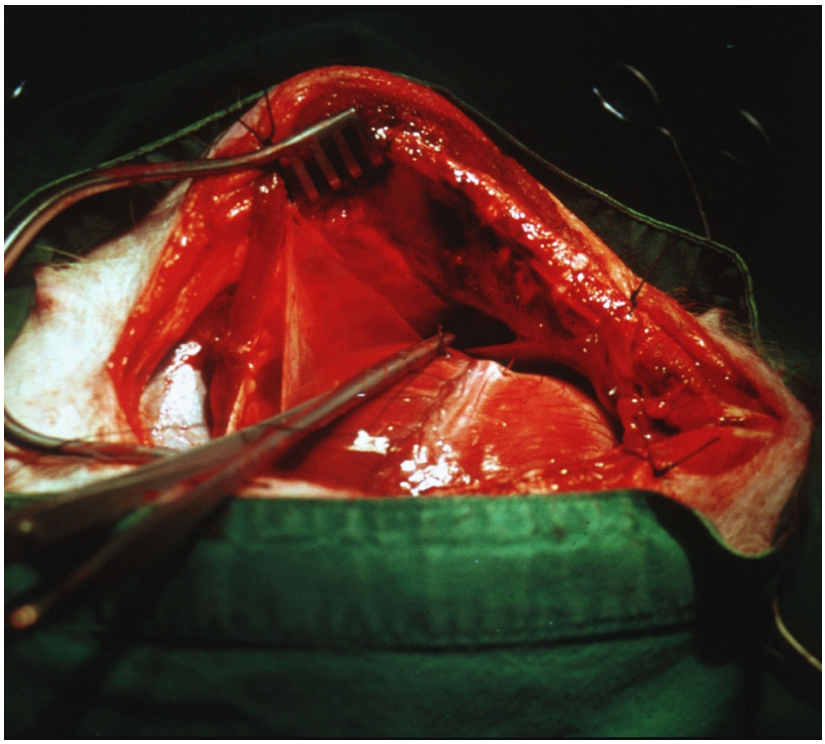


Abb. 12: Das Herzcradle wird angelegt.

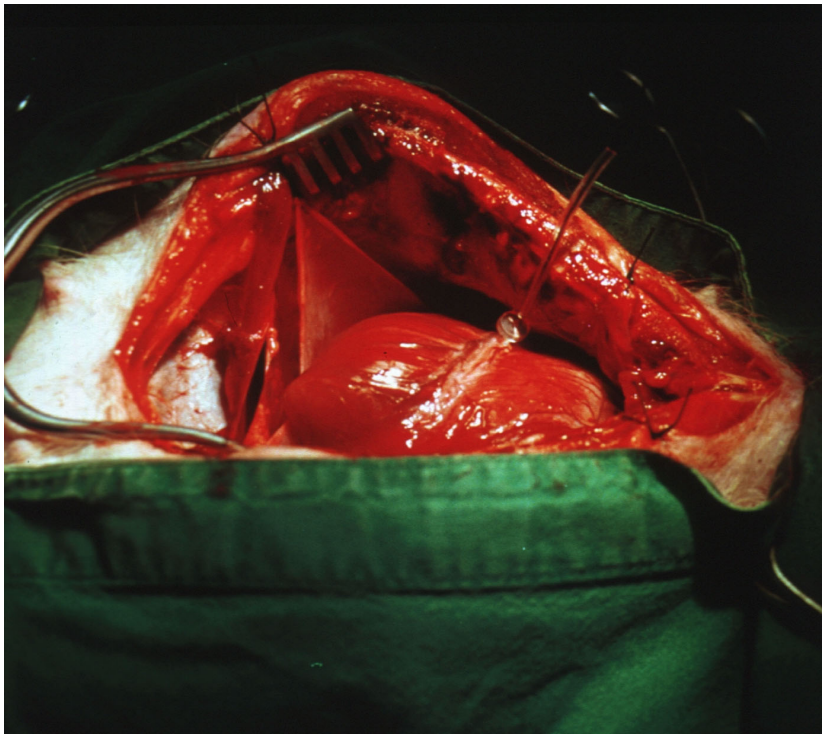


Abb. 13: Die LAD ist umstochen und das Knöpfchen aufgefädelt.

2. Versuchsaufbau

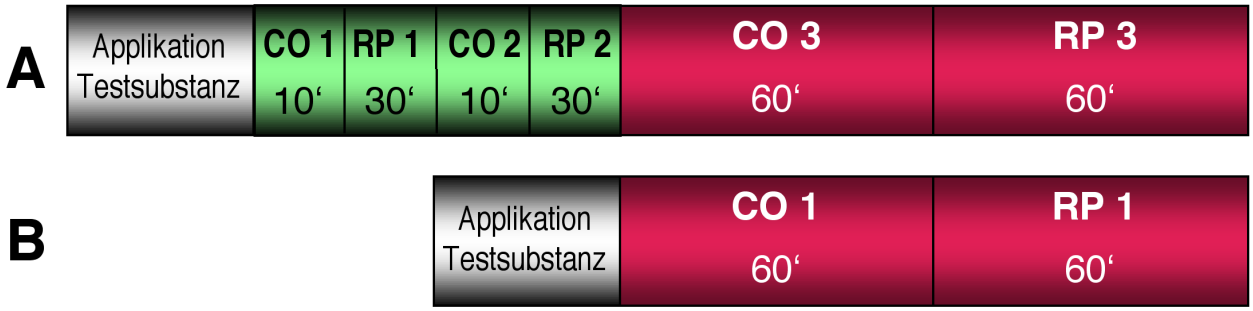


*Abb. 14: Basisprotokoll mit Präkonditionierung (**A**) und ohne Präkonditionierung (**B**)und Applikation einer Testsubstanz*

2.1. Infarktgröße als Funktion der Zeit

Um überhaupt beurteilen zu können, inwieweit die in den Versuchsserien zu applizierenden Substanzen die Infarktgröße (Nekroserate, Infarct size; IS) beeinflussen, wurde in einer ersten Studie erarbeitet, wie sich die Infarktgröße im Rahmen zunehmender Verschlußzeiten mit und ohne präkonditionierenden Zyklen entwickelt.

Hierzu wurden zwei Versuchsserien mit den folgenden Protokollen durchgeführt:

Abb. 15: Das obere Protokoll ist das der Versuche ohne Präkonditionierung mit fünf Verschlußzeiten. Das untere Protokoll ist das der Versuche mit Präkonditionierung und ebenfalls fünf Verschlußzeiten.

Protokoll 2:

Mit Präkonditionierung

CO 1	10 Minuten	Präkonditionierung
RP 1	30 Minuten	
CO 2	10 Minuten	
RP 2	30 Minuten	

CO 3	20, 30, 40, 50, 60, 90 Minuten	Indexischämie
RP 3	60 Minuten	

Protokoll 2:

CO 1	20, 30, 40, 50, 60, 90 Minuten	Indexischämie
RP 1	60 Minuten	

Für jede der Verschlußzeiten wurden drei Versuche durchgeführt.

Ziel war die Erstellung einer Kurve, aus der sich die IS–Entwicklung, aufgetragen zur Zeit ablesen läßt.

2.2. Glibenclamid

Glibenclamid ist ein K-ATP-Kanal-Blocker. Diese Substanz wird therapeutisch als orales Antidiabetikum eingesetzt und dient in unseren Versuchen als Kontrollsubstanz, deren Preconditioning verhindernde Wirkung aus vielen Veröffentlichungen bekannt ist.

Als Protokoll führten wir ein Modell mit präkonditionierenden Zyklen durch. Glibenclamid wurde als Vorlauf und während der präkonditionierenden Koronarokklusionen appliziert.

Protokoll:

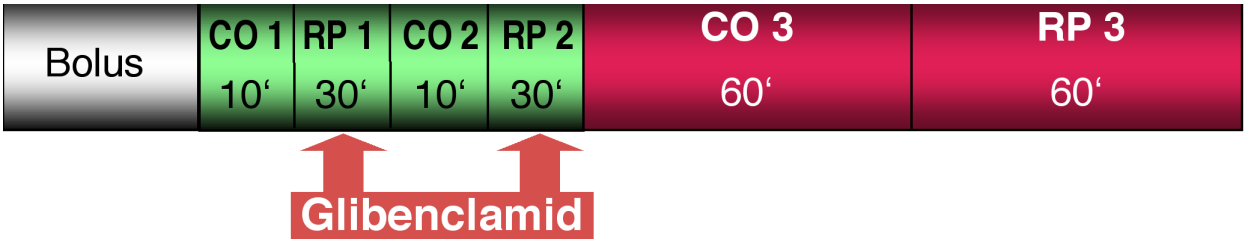


Abb. 16: Protokoll der Glibenclamidversuche

Substanzapplikation: 10 Minuten

CO 1	10 Minuten	Präkonditionierung
RP 1	30 Minuten	
CO 2	10 Minuten	
RP 2	30 Minuten	
CO 3	60 Minuten	Indexischämie
RP 3	60 Minuten	

2.3. HMR 1098/Mannitol

HMR 1098 ist ein neuer K-ATP-Kanal-Blocker, der von Hoechst entwickelt wurde und als Antiarrhythmikum einer neuen Generation eingesetzt werden soll. (Hinsichtlich der aus endemischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse, die zeigten, daß oral therapierte Diabetiker (K-ATP-Blocker als Therapeutikum) eine höhere Mortalität aufweisen, soll geklärt werden, inwieweit diese Substanz ebenfalls eine inhibierende Wirkung hinsichtlich der ischämischen Präkonditionierung aufweist).

Als K-ATP-Kanal-Blocker wurde die Substanz entsprechend dem Protokoll mit präkonditionierenden Zyklen getestet.

Die Studie war als Blindstudie angelegt. Als Kontrollsubstanz wurde Mannitol gewählt. Von allen Versuchen wurden Blutproben zu Beginn eines jeden Verschlusses gezogen und später von Hoechst der Plasmaspiegel der Substanz analysiert.

Protokoll:

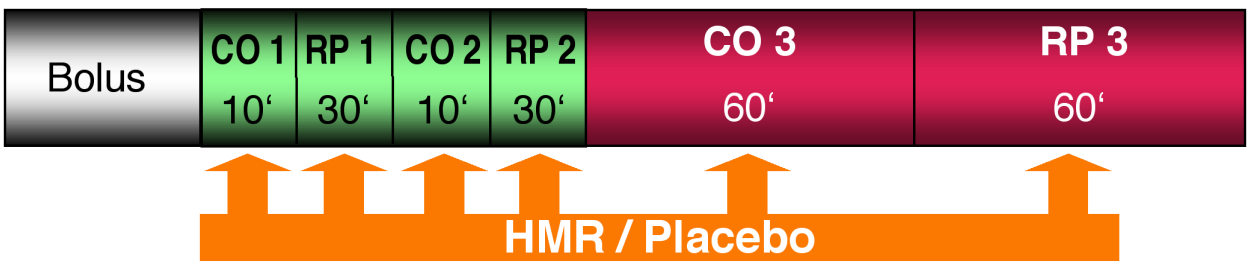


Abb. 17: Protokoll der HMR1098/Mannitolstudie

HMR 1098 Bolus

Dauerinfusion Beginn 5 Minuten vor dem ersten Verschluß

CO 1	10 Minuten	Präkonditionierung
RP 1	30 Minuten	
CO 2	10 Minuten	
RP 2	30 Minuten	

CO 3	60 Minuten	Indexischämie
RP 3	60 Minuten	

2.4. Rilmakalim

Rilmakalim ist ein K-ATP-Kanal-Öffner. Bisher ist davon ausgegangen worden, daß K-ATP-Kanal-Öffner generell den Effekt von Ischemic Preconditioning nachahmen. Experimente mit Substanzen dieser Stoffklasse bestätigten die Annahme bisher. Wir erprobten einen weiteren K-ATP-Kanal Öffner, dessen protektive Wirkung bisher nicht nachgewiesen wurde und dessen Spezifität hinsichtlich der m- oder s-K-ATP-Kanäle nicht bekannt ist.

Protokoll:

Abb. 18: Protokoll der Rilmakalimversuche

Rilmakalimapplikation: 20 Minuten

CO 1	60 Minuten	Indexischämie
RP 1	60 Minuten	

3. Herzaufarbeitung

3.1. Auswertungsmethodik

Den entnommenen Herzen wurden der rechte Ventrikel und der Atrialbereich vollständig abpräpariert. Der verbleibende linke Ventrikel wurde durch Ausstopfen mit Gazetupfer in eine runde Form gebracht und bei -80°C für 20 Minuten schockgefroren. Anschließend erfolgte die Entnahme der Tupfer und das Schneiden in sechs Scheiben, im rechten Winkel zur LAD, und ein Auswiegen der einzelnen Scheiben.

Die Scheiben wurden nun unter UV-Licht (366 nm) von beiden Seiten photographiert und darauffolgend für 20 Minuten in 1% igem TTC (Triphenyl Tetrazolium Chlorid, in PBS pH 7) ein weiteres Mal gefärbt [88]. Nach diesem Färbebad wurde jede Scheibe von beiden Seiten erneut photographiert, unter UV-Licht, unter Weißlicht sowie eine Doppelbelichtung unter UV- und Weißlicht.

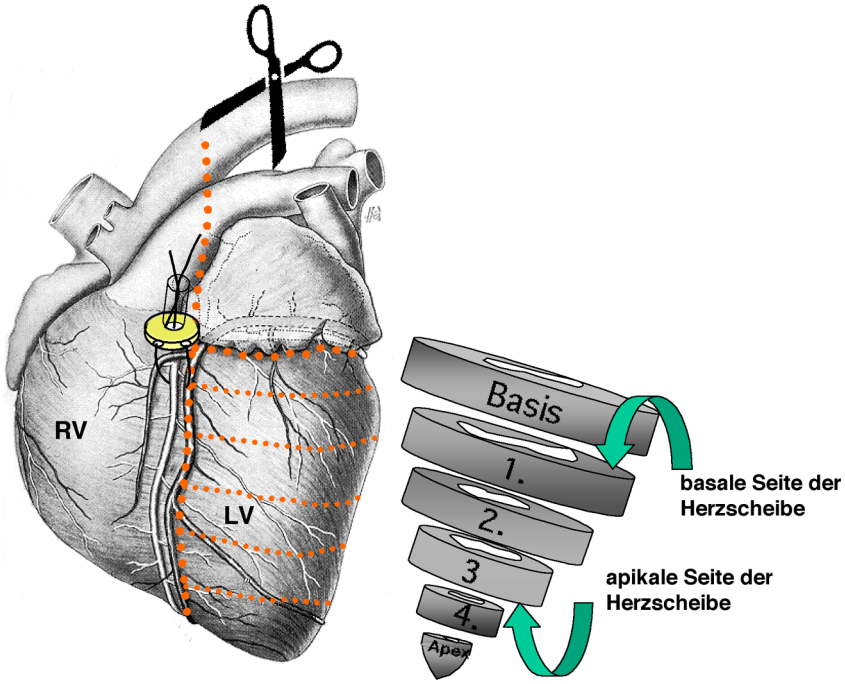


Abb. 19: Schematische Darstellung der Schnittführung am Herzen

3.2. Ergebnisdokumentation

Die Auswertung der Herzscheiben konnte nach Einlesen mittels Kleinbildscanner (Nikon LS1000) erfolgen. Die gescannten Bilder wurden mittels eines Meßprogrammes (NIH Image 1.62) planimetriert, und das prozentuale Verhältnis des Risikoreals (Riskarea, RA) zum Nicht-Risikoareal (Nonriskarea NRA) mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes ermittelt.
Um die Dicke der Scheibe als Faktor einzubeziehen, wurde das Scheibengewicht mit eingerechnet.

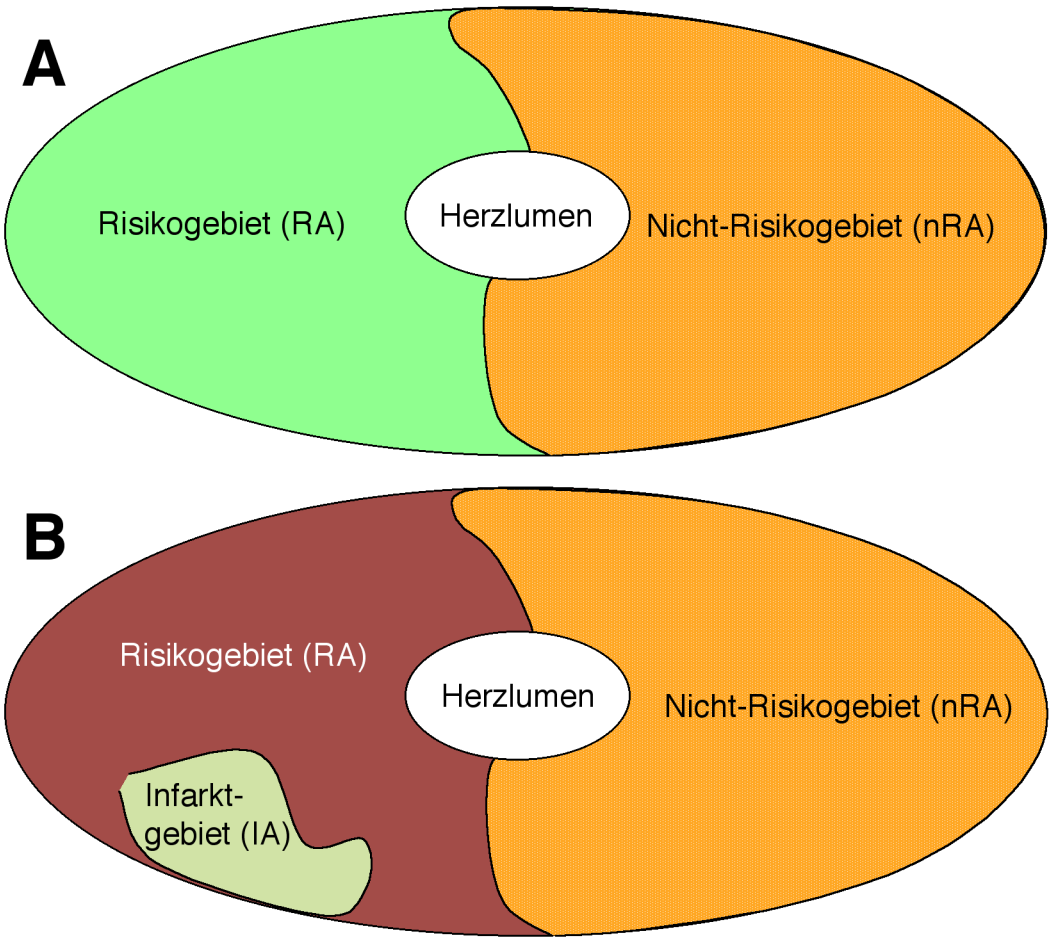
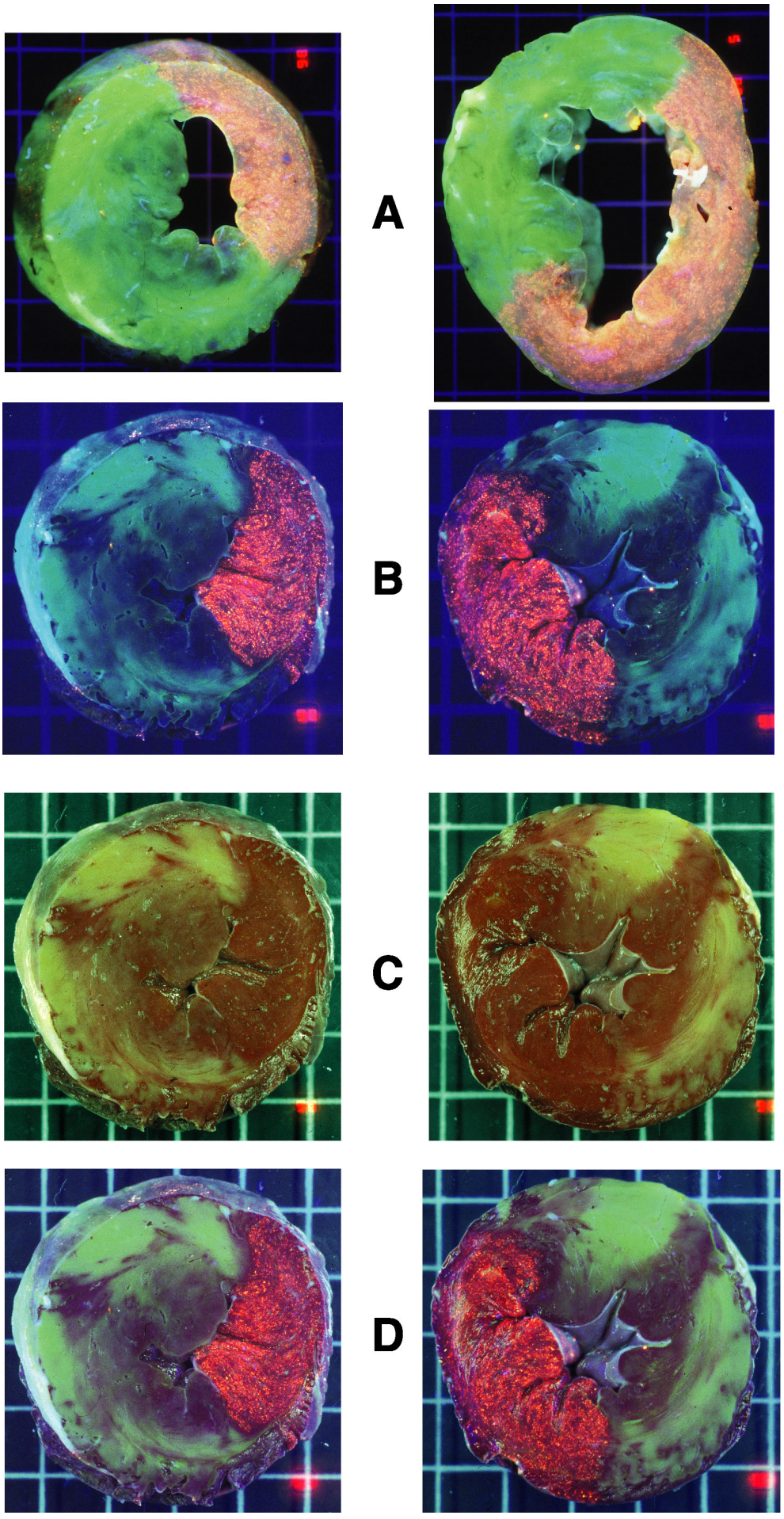


Abb. 20: Schematische Darstellung einer Herzscheibe unter (A) Weiß- und (B)UV-Licht

*Abb. 21: Die Fotografien **A** zeigen zwei Herzscheiben direkt nach der Aufteilung unter UV-Licht. Man sieht deutlich das durch die Mikrosphären angefärbt während der Koronarokklusion perfundierte Myokard, welches das Fluorescein überlagert. Die übrigen Areale sind durch Fluorescein gelb gefärbt. Ein Beleg für die vollständige Reperfusion des Gewebes bei Öffnung der Okklusion nach der 60 minütigen Indexischämie. Diese Gewebebereiche sind nicht mit Mikrosphären „gefärbt", da für diesen Vorgang die LAD wieder ligiert wurde. Der Ausschluß der Mikrosphären belegt umgkehrt den vollständigen Verschluß.*
*Die Photografien **B** zeigen die Herzscheiben aus A nach der TTC-Färbung unter UV-Licht. Die Infarktareale sind ungefärbt, die Herzscheiben deutlich geschrumpft und die Nicht-Risiko-Areale durch die unter UV-Licht fluorezierenden Mikrosphären deutlich abgegrenzt zu erkennen. Das Fluorescein ist ausgeschwämmt und deshalb nicht mehr zu sehen.*
*Die Photografien **C** zeigen die gleichen Herzscheiben aus B, nun unter Weißlicht abgelichtet. Deutlich sind die dumkelrote TTC-Färbung und die ungefärbten nekrotischen Infarktgebiete zu erkennen. Die Mikrosphären sind in diesem Licht nicht zu sehen.*
*Die Photografien **D** zeigen die selben Herzscheiben aus A,B, und C nun unter einer Doppelbelichtung mit UV- und Weißlicht. Deutlich sind sowohl die weißen Infarktareale, das gefärbte nicht nekrotische Gewebe und die Mikrosphären im Nicht-Risikogebiet zu erkennen.*


A
B
C
D

4. Materialien

4.1. Operation/Dokumentation

Deutsches Edelschwein	lokaler, geprüfter Züchter
Stephan Respirator	Heinemann & Gregori
EKG	Heinemann & Gregori
Statham	Heinemann & Gregori
Blutdruckmeßeinrichtung	Heinemann & Gregori
OP-Besteck mit Sternumschere nach Lebsche	Medicon
Infusionspumpe	Fresenius
MacLab 8	Wisstech
Defibrillator	Bosch
Gefrierschrank bis –80 °C	Queue System Corporation
Spiegelreflexkamera	Nikon
Makroobjektiv	Nikon
Diapositivfilm 400 ASA	Agfa
PowerMacintosh G3	Apple Macintosh
Diascanner LS1000	Nikon
<u>Chemikalien und Pharmaka:</u>	
Dipidolor®	Janssen
Ketaminhydrochlorid 10%	Medistar
α-Chloralose	Sigma
Borax	Sigma
Liquimin® 25 000 IE	La Roche
Kaliumchlorid	Sigma
Fluorescein	Sigma

Zink Cadmium Sulfid Mikrosphären	Duke Scientific
Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC)	Sigma
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Eigenprodukt

4.2. Auswertung

Software:

Chart 3.4.1	Wisstech
Excel	Microsoft
Word	Microsoft
Photoshop	Adobe
NIH Image 1.62	National Institute of Health

IV. ERGEBNISSE

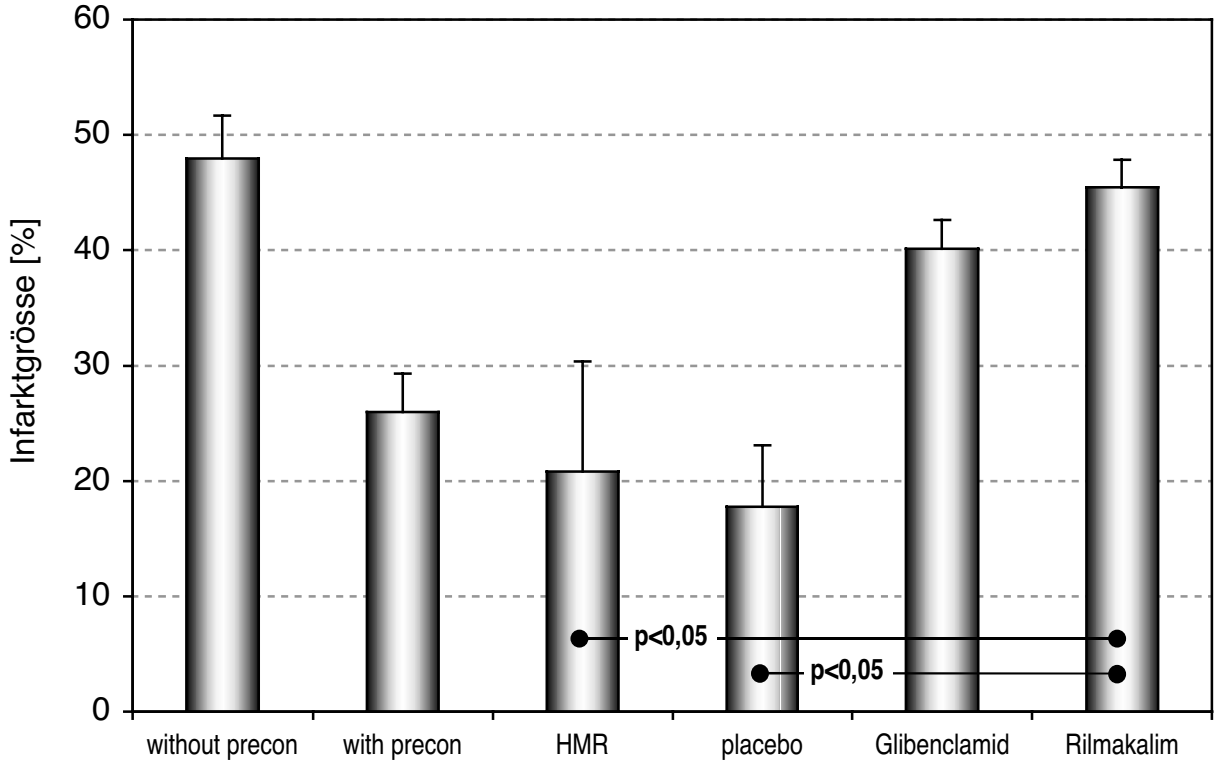


Abb. 22: Säulendiagramm der Mittelwerte der Infarktgrößen aus den Versuchen mit 60 Minuten Indexischämie, mit und ohne IP; HMR 1098, Mannitol, Glibenclamid und Rilmakalim.

1. Infarktgröße der Versuche mit und ohne IP bei 60 Minuten Verschluß

Die Infarktgröße (Infarctsize IS) der Versuche ohne Präkonditionierung und 60 minütigem Verschluß liegt bei 47,95 ± 3,75. Die IS der Versuche mit Präkonditionierung und 60 minütigem Verschluß liegt bei 25,99 ± 3,28.

2. Infarktgröße der HMR und Mannitolversuche

Die Infarktgröße der Versuchsserie mit HM 1098 liegt bei 20,8 ± 9,5%. Die IS der Mannitolversuche (Placebo) bei 17,8 ± 5,3%. Die Ergebnisse beider Substanzen sind verglichen mit den Ergebnissen der Rilmakalimversuche signifikant.

3. Infarktgröße der Glibencalmidversuche

Die Infarktgröße der Versuchsserie mit Glibenclamid liegt bei 40,1 ± 2,5.

4. Infarktgröße der Rilmakalimversuche

Die Infarktgröße der Versuchsserie mit Rilmakalim liegt bei 45,5 ± 2,3. Es besteht zu den Versuchsergebnissen von Mannitol und HMR 1098 ein signifikanter Unterschied.

5. Infarktkurven

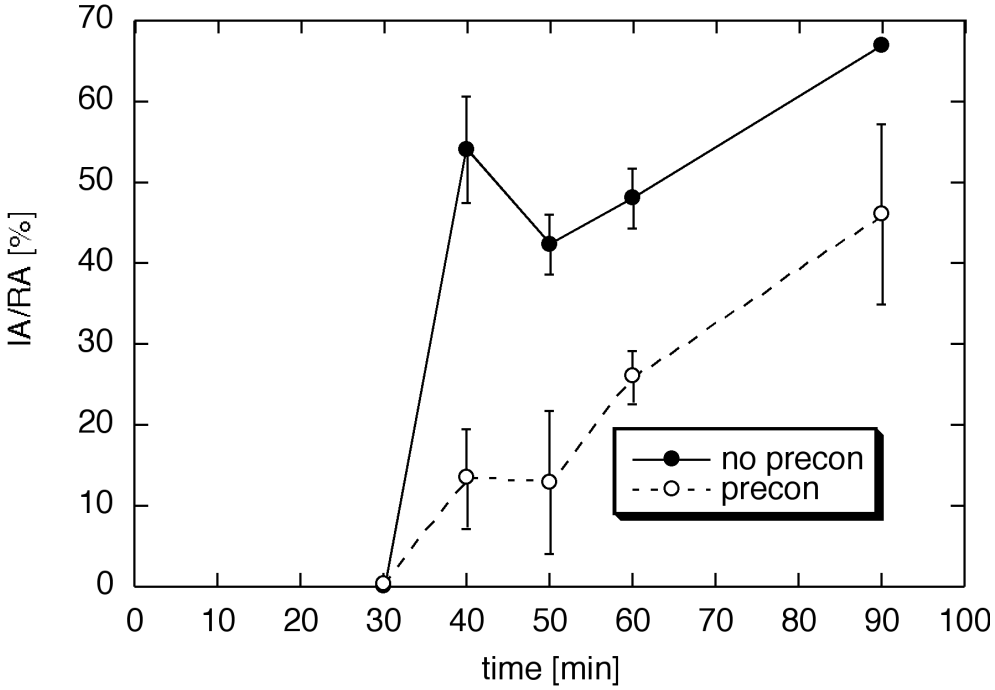


Abb. 23: Infarktkurve (IA/RA Werte aufgetragen zur Zeit) der Versuche mit und ohne IP und zunehmender Verschlußzeiten der Indexischämie.

5.1. Ergebnisse der Versuche ohne IP

Die IS der Versuche ohne ischämische Präkonditionierung liegen bei 30 Minuten Verschluß bei 0,00 ± 0,00; bei 40 Minuten Verschluß bei 54,00 ± 6,52; bei 50 Minuten Verschluß bei 42,3 ± 2,7; bei 60 Minuten Verschluß bei 47,95 ± 3,75, und bei 90 Minuten Verschluß konnte nur ein Wert, 69.2 ermittelt werden, da die übrigen Versuche auf Grund hohen Infarktgeschehens letal endeten und hinsichtlich der IS nicht auswertbar waren.

5.2. Ergebnisse der Versuche mit IP

Die IS der Versuche mit ischämischer Präkonditionierung liegen bei 30 Minuten Verschluß bei 0,27 ± 0,27; bei 40 Minuten Verschluß bei 13,33 ± 6,12; bei 50 Minuten bei Verschluß 12,80 ± 8,80; bei 60 Minuten Verschluß 25,99 ± 3,28 und bei 90 Minuten bei 46,00 ± 11,05.

V. Diskussion

Viele Ergebnisse der Ischemic Preconditioning Forschung wurden und werden an Ratten und Hunden, Schweinen und Kaninchen erarbeitet. "Bei allen bisher untersuchten Tierarten (Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Hund, Schwein) konnte der Präkonditionierungseffekt ausgelöst werden" [61]. Doch führen die Ergebnisse der Forschung nach den Vermittlungswegen der Ischämischen Präkonditionierung IP zum Teil zu kontroversen Ergebnissen. So führt zum Beispiel an der Ratte eine Hemmung der PKC zu einem gleichen Grad an Protektion gegenüber einem Infarkt wie die Ischämische Präkonditionierung. Speechly-Dick et al. [34] und auch Bugge et al. [42] erzielten am isolierten Rattenherzen mittels Blockade der Membranbindungsstelle oder einer direkten Hemmung der PKC eine Aufhebung der protektiven Wirkung der IP. Sakamoto blockiert am Kaninchen ebenfalls mit Polymyxin B die Membranbindung der PKC und erreicht eine signifikante Verminderung der Protektion durch die IP [47], diese Ergebnisse am Kaninchen bestätigen Ytrehus et al. [46] in einem ähnlichen Versuch mit zwei PKC Inhibitoren, die Aktivierung der PKC erzielt eine der Präkonditionierung entsprechende Schutzwirkung. Am Hundeherzen hingegen läßt sich die Protektion der IP durch eine Polymyxin B-Inhibition der Proteinkinas C nicht bewirken. Przyklenk et al. [48] kommen somit zu dem Ergebnis, daß einer Triggerung der PKC durch die Präkonditionierung am Hundeherzen nicht die angenommene Bedeutung als Signalweg der Ischämischen Präkonditionierung zukommt. Am Schweinemyokard wiederum führt nach Vogt et al. [49] eine Aktivierung bzw. Hemmung der PKC zur Protektionsvermittlung respektive Blockade.

So wird ebenfalls bei der Ratte die Bedeutung des Adenosinsignalweges von verschiedenen Autoren in Frage gestellt. Cave et al. [26] sehen in den Ergbenissen ihrer Versuche einer Applikation von Adenosin keine Evidenz zur Annahme, daß Adenosin eine Bedeutung bei der Vermittlung der IP hat. Li et al. [36] verwenden Adenosin sowie den Adenosinantagonisten 8-(p-Sulfopherryl) Theophyllin und können weder eine protektive Wirkung erzielen noch die Protektion der ischämischen Präkonditionierung aufheben. Meldrum et al. [30] stellen zwar nach Adenosin-Applikation am isolierten Rattenherzen fest, daß die "...Adenosin Präkonditionierung, ..., die myokardiale Funktion nach einer I/R (Infusions-Reperfusionsverletzung) schützt, aber keine allgemeine myokardiale Protektion gegen I/R bietet." Bugge et al. [42] triggern mittels der Aktivierung des Adenosinrezeptors die PKC und erreichen eine Protektion.

Obwohl das Schwein auf Grund seiner großen physiologischen Ähnlichkeit mit dem Menschen in vielen pharmakologischen Tierexperimenten herangezogen wird, ist es

bei der Erarbeitung des IP bisher eher in geringerem Maße eingesetzt worden. Die Gründe hierfür liegen sicherlich in einem größeren chirurgischen Aufwand und höheren Kosten. Die in unseren Studien erzielten Ergebnisse weisen alle auf ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich unserer Fragestllungen, wobei nurin bezug auf Rilmakalim signifikante Werte ermittelt wurden. Dies ist auf die Anzahl der Tierversuche pro Wert zurückzuführen. Auf Grund der im folgenden ausgeführten Aspekte weisen Schweineversuche eine hohe Streuung auf, die durch eine erhöhte Versuchszahl bei der Signifikanzanalyse mathematisch an Einfluß verlieren würde. Aus tierschützerischen Aspekten konnte die Versuchszahl jedoch nicht erweitert werden. Nachteile liegen auch in der hohen zum Teil noch vorhandenen Streßanfälligkeit mancher Schweinelinien, die unter Narkose zu maligner Hyperthermie führt und somit zum Ausfall des Tieres. Faktoren wie ein Auskühlen der Oberfläche des narkotisierten, geöffneten Schweines können die Ergebnisse verfälschen und sind trotz Isolationsmaßnahmen nicht ganz zu verhindern. Doch spricht die bereits genannte physiologische Ähnlichkeit zum Menschen für die Verwendung des Schweinemodells. Auch die Größe des Tieres und seiner Organe ermöglichen eine sicherere Instrumentierung im Gegensatz zu Ratten oder Kaninchen und somit zu einer verminderten Fehlerquote infolge chirurgischer Probleme.

Das Tiermodell einer alternierenden Ischämie und Reperfusion am Myokard des Schweines wurde von den Arbeitsgruppen Verdouw und Schaper [89-92]) entwickelt und hat sich in verschiedenen Versuchsserien bewährt. Wir bedienen uns einer Präkonditionierung aus zwei Zyklen 10 minütigen Koronarverschlusses, jeweils gefolgt von einer 30 minütigen Reperfusion und daran anschließend eine Indexischämie bestehend aus 60 Minuten Verschluß und 60 Minuten Reperfusion. Diese Schwelle von 10 Minuten wurde in mehreren Versuchen belegt [93-96]. Die Autoren erzielten am Schweinemyokard mit diesen Verschlußzeiten eine signifikante Infarktgrößenreduktion. Am Kaninchenherzen wurde eine notwendige minimale Ischämie von 2 x 2 bis 5 Minuten [97,98] und am Hund von 2,5 bis 5 Minuten [94,99-101] ermittelt. Unser Protokoll ähnelt sehr dem Protokoll, welches Murry et al. [5] in ihren Studien verwendete (siehe Abb.1) , die schließlich zur Definition des IP-Begriffes im heutigen Sinne führten.

Die Vorteile dieses Modells liegen in der Simplizität und somit Nachvollziehbarkeit der Versuche; zusätzlich minimiert sich die mögliche Fehlerquote durch chirurgische und technische Komplikationen sowie Ausfälle.

Generell ist zwischen *in vivo* Modellen am narkotisierten Tier und *in vitro* Versuchen an Zellkulturen zu unterscheiden. Die Anzucht und Pflege von myokardialen Zellen ist äußerst aufwendig und findet bei Versuchen an

menschlichen Myozyten Anwendung wie beispielsweise in den Versuchen von Cleveland et al. [45,77]. Dabei können aber keine quantitativen Aussagen über Infarktgrößen gemacht werden, dem Hauptkriterium unserer Versuche, denn es werden eben nur einige Zellen verwandt. Die Fragestellung nach den absoluten Infarktgrößen verlangt eine Organentnahme am Versuchsende, deshalb werden die Schweine intra operationem euthanasiert. Die Fragestellung erfordert keine chronisch instrumentierten, wachen Tiere über einen längeren Zeitraum. Solche Versuche sind bei der Frage nach den Langzeitfolgen oder dem Second Window des IP erforderlich [20,21].

Die Aufarbeitung des entnommenen Herzens ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Infarktgröße. Unterscheidungen zu quantitativen Versuchen anderer Arbeitsgruppen bestehen lediglich in unterschiedlichen Färbeverfahren des Myokards. Die Verwendung von Fluorescein als Reperfusionsmarker ist einfach und sicher, da die Substanz in der verwendeten Dosierung das Blut sehr gut färbt und somit jegliches perfundiertes Gewebe. Die Viskosität des Blutes wird dabei nicht im physiologisch relevanten Bereich verändert und auch eine Wirkung auf die Gefäßwände hinsichtlich des Lumens besteht nicht.

Die fluorescierenden Mikrosphären als Abgrenzung des Risikoareals (RA) vom Nicht-Risikoareal (NRA) können keinesfalls durch die Gefäßwand perfundieren und somit besteht keine Gefahr einer Anfärbung nicht perfundierten Gewebes durch Diffusion. Dabei dürfen keine zu großen Mikrosphären verwendet werden, um eine möglichst feine Verteilung auch in die Kapillaren zu erreichen.

Die anschließende TTC-Färbung grenzt klar und gut sichtbar nekrotisches Gewebe von Nicht-nekrotischem ab, Voraussetzung ist aber eine sorgfältige Durchführung des Verfahrens. Wichtig ist die ausreichende Reperfusion des Gewebes, denn die dunkelrote Färbung entsteht durch die Reduktion der farblosen Substanz mittels Dehydrogenasen und dem Coenzym NADH; in sterbenden Zellen entsteht kein NADH mehr, und folglich bleiben diese Bereiche farblos. Infolge unzureichender Reperfusion wird restliches NADH aus den nekrotischen Bereiches nicht vollständig ausgewaschen und führt dann zu einer Einfärbung nekrotischen Gewebes [88]. Der Vorteil der verwandten Methoden liegt in der einfachen Standardisierung, die gewährleistet, daß in jedem Versuch das Gewebe den gleichen Einwirkungen unterliegt.

Die Mängel unseres Modells liegen vor allem bei den Versuchstieren. Aus nicht spezifisch pathogenfreien (SPF)-Beständen stammend, besteht die Möglichkeit einer Myokardschädigung durch überstandene Infektionen; auch reagieren Schweine individuell sehr unterschiedlich auf Streß, so daß bereits bei

Versuchsbeginn das Myokard einen unterschiedlichen Ausgangszustand aufweisen kann. Auf diesen Umstand sind die statistischen Ausreißer in den Ergebnissen zurückzuführen, was eine höhere Versuchszahl erfordert, um diese statistisch auszugleichen.

Sollte HMR 1098 (Natriumsalz von HMR 1883) als kardioselektiver Blocker des sarkolemmalen Kaliumkanals (K-ATPs) wirken, der Effektor der ischämischen Präkonditionierung jedoch der mitochondriale K-ATP-Kanal (K-ATPm) sein, dürfte die protektive Wirkung von IP nicht verhindert werden. Am Kaninchen konnte die Hypothese bereits bestätigt werden durch Linz er al. [83]. Für das Schwein liegen hingegen noch keinerlei Untersuchungen vor.

In Relation gestellt wurden die Resultate mit den zuvor erarbeiteten Kurven, die den Verlauf der Infarktentwicklung mit und ohne ischämische Präkonditionierung zeigen. Bisher lag eine entsprechende Standardkurve für unser Modell und andere alternierende Okklusions/Reperfusionsmodelle nicht vor, lediglich Einzelwerte als Vergleichswerte, woraus der sigmoide Verlauf der Kurven angenommen wurde. In diesem Falle liegen erstmalig die Werte für die Eckzeitpunkte (30, 40, 60, 90 Minuten) mit und ohne Preconditioning vor.

Der Vergleich der Kurven der Versuche mit und ohne Präkonditionierung zeigt deutlich die Verschiebung der Relation von Okklusionsdauer zu Infarktgröße. Die Infarktgröße nach Präkonditionierung erreicht über den gesamten Bereich nicht den entsprechenden Wert ohne Präkonditionierung, es wird nicht einmal der Spitzenwert der Versuche ohne IP erreicht. Besonders deutlich wird die protektive Wirkung der Präkonditionierung durch das Überleben der Tiere bei 90 minütigem Verschluß nach IP, wohingegen es bei den Schweinen im Experiment ohne IP auf Grund der dramatischen Myokardschädigung zu signifikanten Ausfällen kam. Es ist von einer erheblich höheren Infarktgröße auszugehen, denn die sehr hohe, ad exitum führende Infarktgröße der vor Versuchsende ausgefallenen Tiere konnte folglich nicht in die Berechnung des 90 Minutenwertes einbezogen werden. Der ermittelte Wert stammt lediglich von einem Tier.

Die Kurve der Versuchsserie mit ischämischer Präkonditionierung gleicht in ihrer sigmoiden Form der Kurve ohne Präkonditionierung. Sie zeigt aber die bereits erwähnte deutliche Abflachung des gesamten Kurvenverlaufes und somit Rechtsverschiebung der Infarktgrößenentwicklung. So entstehen in beiden Fällen die ersten Myokardnekrosen im Zeitraum zwischen 30 und 40 Minuten. In diesen Zeitraum fällt in beiden Fällen die schnellste Zunahme des Infarktgeschehens, was sich im steilen Kurvenverlauf widerspiegelt. Anschließend flacht sich die Steigung

der Kurve stark ab, die Infarktgrößenentwicklung sinkt wieder ab, um dann relativ kontinuierlich mit geringer Steigung dem Maximalwert entgegenzustreben.

Das Myokard der Schweine, die systemisch HMR 1098 appliziert bekamen, wies nach 60 minütiger Okklusion eine mittlere Infarktgröße auf, die nicht signifikant über der mittleren Infarktgröße des als Placebo applizierten Mannitols liegt. Vergleicht man beide Werte mit den Werten aus den Kurven mit und ohne IP, zeigt sich, daß der HMR-Wert signifikant unter dem 60 Minutenwert ohne IP liegt und keine signifikante Abweichung zu dem Wert mit IP besteht. Gleiche Ergebnisse sind für Mannitol abzulesen.

Dazu steht im weiteren Vergleich die Versuchsserie mit Glibenclamid. Dessen protektionsverhindernde Wirkung zeigt sich in einem Infarktwert von nahezu gleicher Größe wie der Wert nach 60 minütiger Okklusion ohne vorherige Präkonditionierung. Verglichen mit den Werten von Mannitol und besonders HMR 1098 ist der Wert signifikant größer. Die protektionsverhindernde Einwirkung des Glibenclamid ist bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen und genutzt worden [74,75,77,80,82].

Ursprünglich ausgehend von der Fragestellung nach dem Einfluß von HMR 1098 auf das ischämische Myokard – eingedenk der aus den Studien von Engler et al. [76] und Cleveland et al. [77] bekannten Konsequenzen einer Verwendung kaliumkanalblockierender Substanzen hinsichtlich ischämischer Präkonditionierung – kann eine klare Antwort gegeben werden. HMR 1098 verhindert die protektive Wirkung von IP nicht. Verbunden mit dem gleichen Ergebnis am Kaninchen bei Linz et al. [83] ergibt sich indirekt auch ein Hinweis auf den Effektor des Preconditioning. Wiesen vorausgegangene Versuche durch Grover et al. [72], Liu et al. [24], Gross et al. [73], Rohmann et al. [71], Tomai et al. [75], Speechly-Dick et al. [35] und Schultz et al. [74] sehr stark auf die K-ATP-Kanäle hin, hat die Entdeckung der Subtypen der ATP abhängigen Kaliumkanäle die Ergebnisse relativiert. Bereits 1991 hatten Inoue et al. [79] den mitochondrialen K-ATP-(K-ATPm) Kanal entdeckt. Die Aufhebung der Protektion unter Einfluß von Glibenclamid, welches sowohl die sarkolemmalen (K-ATPs) als auch die mitochondrialen (K-ATPm) Kanäle blockiert, der hingegen unbeeinflußten Protektion bei Anwendung eines selektiven sarkolemmalen Kaliumkanalblockers, impliziert eine elementare Bedeutung der mitochondrialen K-ATP-Kanäle als Effektor der Ischämischen Präkonditionierung. Bestand bisher also Einigkeit darüber, daß es sich bei den K-ATP-Kanälen um den Effektor des IP handelt – die Öffnung der K-ATPs Kanäle führt zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und man nahm an, dieser Vorgang führe zu einem energiesparenden Effekt durch Reduzierung des Kaliumeinstromes – weisen die neueren Untersuchungen von Liu et al. [102] und Jaburek et al. [103] nun auf eine

unterschiedliche Bedeutung der Subtypen der K-ATP-Kanäle hinsichtlich der ischämischen Präkonditionierung hin. Denn Kardioprotektion tritt auch in Fällen auf, bei denen keine Aktionspotentialverkürzung gemessen werden kann [1].

Unsere Ergebnisse bestätigen diese Unterschiedlichkeit – am Schweineherzen verhindert ein K-ATPs selektiver Kanalschließer die Protektion des IP nicht. Dieses Ergebnis wird mehrheitlich, jedoch nicht generell durch andere Arbeitsgruppen gestützt.

Sanada et al. [104] bearbeiteten die Fragestellung nach der Bedeutung der sarkolemmalen, respektive der mitochondrialen Kaliumkanäle am Hund. Dazu verwandten sie einen spezifischen K–ATPm–Kanalöffner, Diazoxid und einen spezifischen Schließer, 5-Hydroxydecanoat (5HD). Dabei erreichte die Arbeitsgruppe mit Diazoxid bei intravenöser Applikation zwar einen kardioprotektiven Effekt, doch sowohl in niedriger als auch in höherer Dosierung lag diese Protektion deutlich unter der des IP. In weiteren Versuchen erfolgte eine intrakardiale Gabe von Diazoxid, die ebenfalls zu einer Infarktgrößenreduktion von nur 50% der des IP führte. Auch Nicorandil, ein Öffner beider Kanäle, reduzierte die Infarktgröße im Vergleich zu IP nur um 50%. Die Versuche mit Glibenclamid führten zu einer vollständigen Aufhebung der Protektion, während 5HD den Schutz nur zu etwa 50% aufhob. Sanada et al. schließen daraus, daß somit beim Hund die K-ATPm- und die K-ATPs-Kanäle gleichermaßen als Effektoren der IP fungieren. Kein anderer Autor bestätigt jedoch diese These. Auchampach et al. [105], konnte mittels 5HD bei Hunden den Effekt von IP vollständig aufheben. O'Rourke [80] führt in seinem Review auf, daß 5HD jedwede Protektion blockiert, ob nun induziert durch u.a. Ischämische Präkonditionierung, Adenosin, Nicorandil, Opioide, Diazoxid, Hitzeschock, Inhalationsanästhetika, etc.

Auch Liu et al. [102] führen Versuche mit Diazoxide und 5HD an isolierten Kardiomyocyten durch. Sie stellen an intakten Zellen die Öffnung der K-ATPm-Kanäle fest. Bei Diazoxiddosen bis zu 100 μmol/L steigerte sich die Flavoproteinoxidation, während 5HD den Redoxeffekt hemmte. Zur Bestimmung des pharmakologischen Profils einer K-ATP aktiven Substanz wird die *Flavoprotein-Fluoreszenz-Methode* herangezogen, dabei wird die Autofluoreszenz der mitochondrialen Flavoproteine genutzt. 5HD hemmt immer die Protektion [80], während HMR 1883 [106] ebenso wie dessen Salz, das auch in unseren Studien verwendete HMR 1098 keinen solchen Effekt hat. Dhein et al. [107] sehen zudem bei HMR 1883 eine höhere Affinität zu kardiomyozytären K-ATPs-Kanälen als zu den vaskulären, da die Reperfusionshyperämie zwar durch Glibenclamid, nicht jedoch durch HMR 1883 verhindert wurde. Am menschlichen Myokard kommen Gosh et al. [108] expressis verbis zu dem Ergebnis, daß die Protektion durch die K-ATPm-

Kanäle vermittelt wird und diese somit den Endeffektor darstellen. Auch er verwenden 5HD, Glibenclamid und Cromakalim.

Weitere Studien stellen den Zusammenhang zwischen den K-ATPm-Kanälen und den bereits bekannten IP-auslösenden Bradykinin- und Adenosin-Rezeptoren sowie der PKC her [109-111]. In allen Fällen konnte gezeigt werden, daß diese über den K-ATPm-Kanal die Ischämische Präkonditionierung triggern. Auch bei der späten Phase des IP scheinen die K-ATPm-Kanäle der Endeffektor zu sein. Eine Publikation von Tokano et al. [112] weist auch für die späte Phase des IP eine eindeutige IP-auslösende Wirkung des Diazoxids nach. Zwar bringen sie dieses Ergebnis selbst nicht in Zusammenhang mit den K-ATPm-Kanälen, sondern lediglich mit den Kaliumkanälen allgemein, doch ist Diazoxid ja nun inzwischen bekannt als spezifischer Öffner der K-ATPm-Kanäle.

Die Ergebnisse aus allen Versuchen und besonders jenen mit HMR 1883 respektive 1098 und 5HD weisen auf eine Kernrolle der mitochondrialen K-ATP-Kanäle als Vermittler des IP hin, unterstützt neuerdings durch die Ergebnisse mit dem hochpotenten, K-ATPm-Kanal selektiven Öffner BMS 191095 [113]. BMS 191095 findet sich erstmalig beschrieben 1996 als potenter Kaliumkanalöffner am menschlichen Myokard in einer Publikation von Carr und Yellon [114], seinerzeit noch in Unkenntnis seiner Spezifität zu den K-ATPm-Kanälen. Rovnyak et al. [115] beziffern seine Selektivität gegenüber ischämischem Myokard im Vergleich zu BMS 180448 als 20 mal höher und 400 mal höher im Vergleich zu Cromakalim. Der in unseren Studien verwandte Kaliumkanalöffner Rilmakalim konnte als Nachahmer des IP nicht überzeugen. Die Infarktgröße wurde in unserem Modell nicht beeinflußt. Allerdings ist dessen Spezifität hinsichtlich K-ATPs oder K-ATPm nicht geklärt, somit besteht die Möglichkeit, daß die Substanz K-ATPs spezifisch ist oder aber Rilmakalims Selektivität gegenüber ischämischem Myokard deutlich geringer ist als die von Cromakalim und damit kein IP gleicher Effekt erzeugt werden konnte. Inzwischen wurde durch Gosh et al. [108] mittels Experimenten an Trabekeln des rechten Atriums auch am menschlichen Herzmuskel der K-ATPm-Kanal als Effektor der myokardialen Präkonditionierung belegt. (Zuvor war bereits die Bedeutung der Kaliumkanäle am menschlichen Myokard bekannt [35,75]).

Der Mechanismus, der durch Öffnung der K-ATPm-Kanäle zur Kardioprotektion führt, ist allerdings noch unklar. Dabei führt die Kanalöffnung zu einer Depolarisation der intramitochondrialen Membran, da der Kaliumioneneinstrom einen verminderten Kalziumeinstrom und eine Matrixschwellung zur Folge hat. Wie dies nun die mitochondrialen Abläufe beeinflußt und letztlich zur ischämischen Präkonditionierung führt, ist noch vollkommen unklar.

VI. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach den Effektoren der Ischämischen Präkonditionierung (IP). Die Forschungsergebnisse weisen bisher zunehmend darauf hin, daß die ATP-abhängigen Kaliumionenkanäle (K-ATP-Kanäle) die entscheidenden Vermittler des protektiven Effektes sind. Die Entdeckung der unterschiedlichen K-ATP-Kanäle an Mitochondrien (K-ATPm) und Sarkoplasmatischem Retikulum (K-ATPs) führte zu weiterem Forschungsbedarf. Zusätzlich belegt eine numerische Studie eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate kardiologischer Genese bei Diabetikern, die mit dem oralen Antidiabetikum Glibenclamid, einem Kaliumkanalblocker, behandelt wurden, im Vergleich zu diätetisch therapierten Patienten. Ein neues Antiarrhythmikum auf Basis eines Kanalschließers wurde entwickelt, und dessen Einsatz hängt damit wesentlich von den kardiologischen Eigenschaften ab. Die vorliegende Studie erarbeitete zunächst die Vergleichskurven für die Infarktgrößen als Funktion der Zeit mit und ohne ischämische Präkonditionierung. Anhand dieser Referenzkurven konnte dann die Substanz HMR 1098, ein selektiver Schließer der sarkolemmalen K-ATP–Kanäle, auf seine Eigenschaften bezüglich der IP vermittelten Kardioprotektion hin untersucht werden. Die Studie war als Blindstudie angelegt, wobei Mannitol als Placebo diente. Um einen direkten Vergleich mit einem bekannten K-ATP–Blocker ziehen zu können, wurde Glibenclamid, ein Schließer beider Kanalsubtypen nach dem gleichen Protokoll getestet. Dazu ein Kanalöffner, Rilmakalim, dessen Spezifität allerdings noch nicht bekannt ist. Die Ergebnisse zeigten eine Aufhebung der protektiven Wirkung des IP durch Glibenclamid, wohingegen HMR 1098 die Protektion nicht aufhob.

Das Ergebnis der Arbeit weist zum einen auf eine essentielle Bedeutung der K-ATPm als Vermittler der IP hin, während die K-ATPs nicht beteiligt scheinen. Somit ist hinsichtlich der Fragestellung nach einem Einsatz von HMR 1098 davon auszugehen, daß bei einem therapeutischen Einsatz der Substanz HMR 1098 keine Gefahr der negativen kardiologischen Beeinflussung besteht.

VII. Summary

This thesis is based on the question of the final effectors of ischemic preconditioning (IP). Previous results increasingly indicate an important role , probably the major role, of the ATP dependent potassium channels as final mediator of the IP effect. The discovery of a difference of mitochondrial and sarcolemmal ATP-potassium channels led to further research. An additional quantitative study revealed a significant higher mortality rate by heart failure in diabetes patients, treated with the oral antdiabetic drug Glibencalmide, than in patients treated by a special diet.

A new antiarrhythmic drug based on a potassium channel blocker was developed and the successful use for treatment is dependent on its cardiological effects.

The present study primarily evaluated the development of the necrosis of myocytes in the non perfused area (risk are RA) with and without ischemic preconditioning. Compared to this data the new substance HMR 1098 was than tested on its effects regarding to the protective effects of ischemic preconditioning. HMR 1098 is known to be selective to the sarcolemmal K-ATP channels. We performed a double blind study with Mannitol as a placebo. Glibenclamid, a non selective potassium channel blocker was tested using the same protocol. Additionally we tested Rilmakalim, a potassium channel of unknown selectivity.

The results showed an inhibition of the protective effect caused by IP under the influence of Glibenclamide, whereas HMR 1098 did not interfere with the protective effects of IP at all. Rilmakalim neither disturbed the protection nor mimiced protection when used instead of IP.

We conclude that the mitochondrial K-ATP postassium channel blockers are the major effectors of mediation of ischemic preconditioning.

VIII. Abkürzungen

∅	Durchmesser
°C	Grad Celcius
µ	my, mikro- (10^{-6})
α	alpha
β	beta
ATP	Adenosin-triphosphat
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
IP	ischämische Präkonditionierung; ischemic preconditioning
i.m.	intramuskulär
l	Liter
Lsg	Lösung
m	Meter
m..	milli- (10^{-3})
min	Minute(n)
n	nano- (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PKC	Protein Kinase C
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subcutan
SD	Standartabweichung
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler
t	Zeit
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
U	Units, Einheiten
UV	Ultraviolettes Licht
RA	Risikoareal, Riskarea
NRA	Nichtrisikoareal, Nonriskarea

IX. Literaturverzeichnis

1. Gögelein H, Hartung J, Englert HC. Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac K-ATP channels. *Cell Physiol Biochem*. 1999;in press.

2. Dahme E, Weiß E. *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Stuttgart: Enke-Verlag; 1988.

3. Noble RL. The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usally fatal. *Am J Physiol*. 1943;138:346.

4. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock: Effects of preconditioining (tolerance) and protective drugs. *Int Anesth Clin*. 1964;2:251.

5. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124.

6. Yellon DM, Alkhulafi A, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342:276.

7. Kloner RA, Shook T. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI-4: A clinical correlate to preconditioning. *Circulation*. 1995;91:37.

8. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F. Prodromal Angina limits infarct size. *Circulation*. 1995;91:291.

9. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1996;334:7.

10. Szmagala P, Morawski W, Krejca M, Gburek T, Bochenek A. Evaluation of perioperative myocardial tissue damage in ischemically preconditioned human heart during aorto coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Sur*. 1998;39:791-795.

11. Tauskela JS, Chakravarthy BR, Murry CL, Wang YZ, Comas T, Hogan M, Hakim A, Morley P. Evidence from cultured rat cortical neurons of differences in the mechanism of ischemic preconditioning of brain and heart. *Brain Res*. 1999;827(1-2):143-151.

12. Gho BCG, Shoemaker RG, Mirella A, van den Doel BS, Duncker DJ, , Verdouw PD. Myocardial Protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94:2193-2200.

13. Carrie RW, Karmazyn M, Kloe M, Mailer K. Heat shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res*. 1988;63:543-549.

14. Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman RM, Kagan VE, Kisin E, Tyurin V, Cordis GA, Das DK. Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am J Physiol*. 1995;269 (Cell Physiol 38):C907-C916.

15. Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation*. 1994;85:779-789.

16. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol*. 1994;266:H137-H146.

17. Vegh A, Szekeres I, Parrat JR. Transient ischemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1991;25:1051-1053.

18. Xi L, Hess ML, Kukreja RC. Ischemic preconditioning in isolated-perfused mouse heart - reduction in infarct size without improvement of portischemic ventricular- function. *Mol Cel Biochem*. 1998;186(N1-2):69-77.

19. Zhang, Yao Z. Flumazenil preconditions cardiomyocytes via oxygen radicals and K-ATP channels. *American Journal of Physiology*. 2000;279:in print.

20. Qiu Y, Tang XL, Park SW, Sun JZ, Kalya A, Bolli R. The early and late phases of ischemic preconditioning: a comparative analysis of their effects on infarct size, mycordial stunning and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-minute coronary occlusion. *Circ Res*. 1997;80(5):730-742.

21. Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K. Is the timecourse of infarct size limiting effect of ischemic preconditioning bimodal? *Circulation*. 1992;86(suppl I):I-343.

22. Mei DD, Nithippatikon K, Lasley RD, Gross GJ. Myocardial preconditioning produced by ischemia, hypoxia and a K-ATP-channel opener - Effects on interstitial adenosine in dogs. *J Mol Cell Cardiol*. 1988;30(6):1225-1236.

23. Lasley RD, Rhee JW, Wylen DGLV, Mentzer JRM. Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22:39.

24. Liu G, Thornton J, van Winkle D, Stanley A, Olsson R, Downey J. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 Adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84:350.

25. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretraetment with A1 selective adenosine analogs protects the heart against infarction. *Circulation*. 1992;85:659.

26. Cave AC, Collis CS, Downey JM, Hearse DJ. Improved functional recovery by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischemic isolated rat heart. *Cardiovasc Res*. 1993;27:663.

27. Baxter GF, marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a dealyed phase of protection 24 hours following ischemic preconditioning. *Circulation*. 1994;90:2993.

28. Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in the ischemic preconditioning: The role of endogenous adenosine and PKC. *Ann NY Acad Sci*. 1994;723:82.

29. Headrick JP. Ischemic preconditioning: Bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1227.

30. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheidan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Differential effects of adenosine preconditioning on the post-ischemic rat myocardium. *J Surg Res*. 1996;65:156.

31. Yao Z, Mizumura T, Mey DA, Gross GJ. K-ATP channels and memory of ischemic preconditioning in dogs: Synergism between adenosine and K-ATP channels. *Am J Physiol*. 1997;272:H334.

32. Cleveland JC, Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning of human myocardium is dependent upon the ATP-sensitive potassium channel. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:175.

33. Cleveland JC, Meldrum DR, Rowland RT, Sheridan BC, Banerjee A, Harken AH. The obligate role of protein kinase C in mediating clinically accessible cardiac preconditioning. *Surgery*. 1996;120:345.

34. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res*. 1994;75:586-590.

35. Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K+ channel? *Circ Res*. 1995;77:1030.

36. Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by adenosine receptors in the rat. *Circulation*. 1992;87:1642.

37. Kitakaze M, Hori M, Kamada T. Role of adenosine and its interaction with α-Adrenoceptor activity in ischemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovasc Res*. 1993;27:18.

38. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Bensard DD, Brew EC, Cairns CB, Harken AH. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha-1 adrenergic mechanism. *Circ Res*. 1993;73:656.

39. Banerjee A, Gamboni F, M.B. M, Rehring TF, Butler K, Cleveland JC, Meldrum DR, Shapiro JI, Meng X. Stress induced cardioadaptation reveals a code linking hormone receptors and spartial distribution of PKC isoforms. *Ann NY Acad Sci*. 1996;793:226.

40. Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Bensard DD, Parsons P, Anderson BO, Banerjee A. Gut and liver coordinated metabolic response following major torso injury. *J Surg Res*. 1992;52:27.

41. Weselcouch EO, Baird AJ, Sleph PG, Dzwonczyk S, Murray HN, Grover GJ. Endogenous catecholamines are not necessary for isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res*. 1995;29:126-132.

42. Bugge E, Ytrehus K. Ischemic preconditioning is protein kinase C dependent but not through stimulation of alpha adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. *Cardivasc Res*. 1995;29:401-406.

43. Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ. Ischemic preconditioning fails to limit infract size in reserpinized rabbit myocardium - implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. *Circulation*. 1993;88:2351-2358.

44. Takasaki Y, Adachi N, Dote K, Tsubota S, Yorozuya T, Arai T. Ischemic preconditioning supresses the noradrenaline turnover in the rat-heart. *Cardiovasc Res*. 1998;39(N2):373-380.

45. Cleveland JC, Meldrum DR, Rowland RT, Cain BS, Meng X, Gamboni-Robertson F, Banerjee A, Harken AH. Ischemic preconditioning of human myocardium: Protein kinase C mediates permissive role for alpha 1-adrenoceptors. *J Surg Res*. 1997;73(N1):H902.

46. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol*. 1994;26:H1145-H1152.

47. Sakamoto, Miura T, Goto M, Jimura O. Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by protein kinase C inhibitors in the rabbit. *Cardivasc Res*. 1995;29:682-68.

48. Przyklenk K, Sussmann MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model. *Circulation*. 1995;92(6):1546-1557.

49. Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig hearts in vivo. In: *Circulation*; 1994:3486 (abstr).

50. Meldrum DR, Cleveland JC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Calcium induced inotrophy is in part mediated by protein kinase C. *C J Surg Res*. 1996;63:400.

51. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann Thorac Surg*. 1996;61:1273.

52. Chaudry IH. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol*. 1993;245:R117.

53. Greenwald JW, Rossi CS, Lehninger AL. Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure and function of rat liver mitochondria. *J Cell Biol*. 1964;23:21-28.

54. Steenbergen C, Fralix T, Murphy E. Role of increased cytosolic calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol*. 1993;88:456.

55. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning: Ionic alterations. *Circ Res*. 1993;72:112.

56. Miyawaki H, Ashraf M. Ca^{2+} as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997;80:790.

57. Thornton JD, Liu GS, Downey JM. Pretreatment with pertussis toxin blocks the protctive effects of preconditioning: Evidence for a G-Protein mechnism. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:311-320.

58. Yao Z, Gross GJ. Role of nitric oxide, muscarine receptors, and the ATP-sensitive K+channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. *Cic Res*. 1993;73:1193-1201.

59. Yao ZH, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibencalmide mechanism in dogs. *Am J Physiol*. 1993;264:H2221-H2225.

60. Yao ZH, Gross GJ. A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs - efficacy, time ourse, and role of K-ATP channels. *Circulation*. 1994;89:1229-1236.

61. Strasser R, Vogt A, Schaper W. Myokardprotektion durch Präkonditionierung-Experimentelle und klinische Bedeutung. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1996;Band 85, Heft 2:79-89.

62. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive K+ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1990;259:H820-826.

63. Grover GJ, Seph PG, Dzwonczyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and thier possible interaction with adenosine A1-receptors. *Circulation*. 1992;86:1310-1316.

64. Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine-A1 receptors, K+ATP-channels and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*. 1993:H887-H1336.

65. Martorana PA, Kettenbach B, Breipohl G, Linz W, Schölkens BA. Reduction of infarct size by local angiotensin-converting-enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmakol*. 1990;182:395-396.

66. Wall T, Sheelhy R, Hartman J. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharm Exp Ther*. 1994;270:681-689.

67. Linz W, Schölkens B. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotension-converting enzyme inhibitors. *Cardiovasc Pharmakol*. 1992;20.

68. Hendrikx M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, Van Lommel A, Verbeken E, Lauweryns J, Flameng W. New Na+-H+exchange inhibtor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca2+ overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation*. 1994;89:2787-2798.

69. Kitakaze M, Hori M, Tamai J, Iwakura K, Koretsune Y, Kagya T, Iwai K, Kiabatake A, Inouo M, Kamada T. α1- Adrenoceptor avtivity regulates release of adenosine from the ischemic myocardium in dogs. *Circ Res*. 1987;60.

70. Minamino T, Kitakaze M, Morioka T, Node K, Komamura K, Takeda H, Inoue M, Hori, Kamada T. Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'nucleotidase. *Am J Physiol*. 1996;270:H238.

71. Rohmann S, Weygandt H, Schelling P, Kie Soei, P.D V, Lues I. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. *Basic Res Cardiol*. 1994;89:563-576.

72. Grover GJ, Sleph PG, Dzwoncyzk S. The protective effect of cromakalim and pinacidil on reperfusioin function and infarct size inisolated perfused rat hearts and anesthetized dogs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1990;4:465.

73. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. 1992;70:223-233.

74. Schultz JE, Yao Z, Cavero I, Gross GJ. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in infarct rat heart. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt 2):H2607-H2615.

75. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, De Peppo AP, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K+channel blocker. *Circulation*. 1994;90:700-70.

76. Engler R, Yellon D. Sulfonylurea K-ATP blockade in type II diabetes and preconditioning in cardiovascular diseases. *Circulation*. 1996;1994:2297.

77. Cleveland JC, Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A, Harken AH. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation*. 1997;96:29-32.

78. Noma A. ATP regulated K-channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983;305:147-148.

79. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive potassium channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature (London)*. 1991;352 (6332):244-247.

80. O'Rourke B. Myocardial K-ATP channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000;87845-855.

81. Szewczyk A, Czyz A, Wojcik G, Wojtczak L, Nalecz MJ. ATP-regulated K+channel in mitochondria: Pharmacology and function. *J Bioernerg Biomemeb*. 1996;28 (N2):147-152.

82. Rohmann S, Fuchs C, Schelling P. In swine myocardium, the infarct size reduction induced by U-89232 is a cardioselective opener of the ATP-snsitive potassium channels. *J Cardivasc Pharm*. 1997;29(1):69-74.

83. Linz W, Jung O, Jung W, Englert HC, B.A. S. The benefit of ischemic preconditioning is not abolished by the cardioselective K-ATP channel blocker HMR 1883 in rabbits. *Br J Pharmacol*. 1998;124.

84. Billman GE. The role of ATP-sensitive K+channel in K+accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res*. 1994;28:762-769.

85. Billman GE, Englert HC, Bernward A, SChölkens BA. HMR 1883, a novel cardioselective Inhibitor of the ATP-sensitive Poassium channel. Part II: Effect on suceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia in concious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286 No 3:1465-1473.

86. Hasselblatt A. Insuline; oral wirksame, blutzuckersenkende Arzneimittel. Therapie des Diabetes mellitus. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*: B.I. Wissenschaftsverlag; 1990:380-385.

87. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *g*: Paul Parey Verlag Berlin u. Hamburg; 1984.

88. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schäfer HJ, Mathey D, Bhakdi S. Infarct size measurement by Triphenyltetrazolium Chloride staining versus in vivo injection of Propidium Iodide. *J Moll Cell Cardiol*. 1997;29:2169-2175.

89. Brand T, Sharma HS, Fleischmann KE, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw P, Schaper W. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1992;71:1351-1360.

90. Andres J, Sharma HS, noell R, Stahl J, Sassen LMA, Verdouw PD, Schaper W. Expression of heat shock proteins in the normal and stunned porcine myocardium. *Cardvasc Res*. 1993;27:1421-1429.

91. Fraß O, Sharma HS, Knoell R, Duncker BJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. Enhanced gene expression of calcium regulatory proteins in stunned porcine myocardium. *Cardiovasc Res*. 1993;27:2037-2043.

92. Kluge A, Zimmermann R, Münkel B, Verdouw PD, Schaper J, Schaper W. Insuline-like growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res*. 1995;29.

93. Sack S, Mohri M, Arras M, Schwarz E, Schaper W. Ischaemic preconditioning - timecourse of renewal in the pig. *Cardiovasc Res*. 1993;27:551-555.

94. Strasser R, Arras M, Vogt A, Elsässer A, Schwarz ER, Schlepper M, Schaper W. Preconditioning of porcine myocardium: How much ischemia is required for induction? What is duration? Is a renewal of effect possible? *Circulation*. 1994;90:I-109.

95. Strasser R, Sprengel U, Arras M, Schlepper M, Schaper W. Blockade des K+ATP-Kanals verhindert die Infarktgrößenreduktion durch Adenosinagonisten am Schwein. *Z Kardiol*. 1995;84:846.

96. Schott RJ, Miura T, Goto M, O. J. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*. 1995;66:1133-1142.

97. Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Tsuchida A, Jimura O. Infarct size limiting effect of preconditioning: Its duration and "dose-response" relationship. *Circulation*. 1990;82:III-271.

98. Cohen MV, Yang X, Downey JM. Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic peconditioning. *Circ Res*. 1994;74:998-004.

99. Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*. 1990;82:609-619.

100. Nao BS, McClanahann TB, Groh MA, Schott RJ, K. G. The time limit of effective preconditioning in dogs. *Circulation*. 1990;82:III-271.

101. Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation*. 1992;85:2247-2254.

102. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependant potassiumchannels. Novel effectors of cardioprotection? *Circulation*. 1998;97:2463-2469.

103. Jaburek m, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD. State dependent inhibition of the mitochondrium K-ATP channel by glyguride and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem*. 1998;273:13578-13582.

104. Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H256-63.

105. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependant potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res*. 1992;26:1054-1062.

106. Jung O, Englert HC, Jung W, Gögelein H, Schölkens BA, Busch AE, Linz W. The K-ATP channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;361:445-451.

107. Dhein S, Pejman P, Krusemann K. Effects of the I(K-ATP) blockers glibencalmide and HMR 1883 on cardiac electrophysiology during ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2000;398:273-284.

108. Ghosh S, Standen N, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K-ATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardivasc Res*. 2000;45(4):934-940.

109. Light PE, Kanji HD, Fox JE, French RJ. Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial KATP channels during metabolic inhibition and recovery. *FASEB J*. 2000;15:2586-94.

110. Kita H, Miura T, Miki T, Satoshi G, Tanno M, Fukuma T, Shimamoto K. Infarct size limitation by bradykinin receptor activation is mediated by the mitochondrial but not by the sarcolemmal K-ATP channel. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2000;14:497-502.

111. Toyoda Y, Friehs I, Parker RA, Levitsky S, McCully JD. Differential role of sarcolemmal and mitochondrial K-ATP channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J of Physiol*. 2000;279:H2694-H2703.

112. Tokano H, Tang XL, Bolli R. Differential role of K-ATP channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol*. 2000;279:H2350-H2359.

113. Grover GJ. K-ATP channel openers. In: *International Society for Heart Research (ISHR)*. Louiville; 2000.

114. Carr CS, Yellon DM. A highly sensitve ATP-dependant potassium channel opener mimics ischemic preconditioning in isolated human atrium. *Medical Science Research*. 1996;24:651-654.

115. Rovnyak GC, Ahmed SZ, Ding CZ, Dzwonczyk S, Ferrara FN, Humphreys WG, Grover GJ, Santafianos D, Atwal KS, Baird AJ, MaLaughlin LG, Normandin DE, Sleph PG, Traeger SC. Cardioselective antiischemic ATP-sensitive potassium channel (K-ATP) openers. 5.Identification of 4-(N-Aryl)-substituted benzopyran derivates with high selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40:24-34.

X. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr.hc. Wolfgang Schaper, Direktor des Max-Planck-Institutes für Physiologische und Klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim, für die Überlassung des Theams, die Möglichkeit zur Erarbeitung am Insitut und die Betreuung dieser Arbeit. Besonders gedankt sei Frau Prof. Dr. Ilse Käufer-Weiß für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmediin in Gießen. Mein weiterer Dank gilt Herrn Gerd Stämmler, medizinscher Dokumentar des Institutes, für die tatkräftige Unterstützung bei der Vollendung, die statistische Hilfe und die Ausbildung vom blutigen EDV-Laien zum kenntnisreichen Computernutzer. Danken möchte ich ebenfalls Frau Sylvia Thomas, für die zuverlässige Hilfe, die sie mir, insbesonders während meines Auslandaufenthaltes, stets gewährte. Meinem Freund Prof. Dr. Dr. hc. Rüedi Leiser danke ich für die Korrekturen, die wichtigen Hinweise für Verbesserungen und die anspornenden Worte in den weniger motivierten Phasen des Zusammenschreibens. Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Frau Claudia Strohm, für die partnerschaftliche und freundschaftliche Zusammenarbeit, die entspannte Arbeitsatmosphäre und die hervorragende leibliche Versorgung während langer Stunden im OP. Allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung gilt mein Dank für die kollegiale Zusammenarbeit.

ISBN 3-936 815-67-4

Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: http://www.dvg.net