



Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Norbert Roewer

**Die Bedeutung des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals mit großer Leitfähigkeit im
Rahmen der ischämischen Postkonditionierung gegen Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Johannes Richl
aus Rauhenebrach

Würzburg, Februar 2014

Referent: Priv.-Doz. Dr. Markus Lange

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gessler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. April 2016

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kardioprotektion.....	1
1.2. Mechanismen der ischämischen Postkonditionierung (IPOST).....	4
1.2.1. Mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle (mito K_{ATP} -Kanäle).....	7
1.2.2. Calcium-regulierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}).....	7
1.2.3. Die Rolle der Mitochondrien in der Kardioprotektion und die Bedeutung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP).....	9
1.3. Hypothese.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Versuchstiere und Versuchsgenehmigung.....	13
2.2. Präparation.....	13
2.3. Induktion der myokardialen Ischämie.....	15
2.4. Infarktgrößenbestimmung.....	16
2.5. Experimentelles Protokoll.....	19
2.6. Hämodynamische und statistische Auswertung.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Gravitoplanimetrie und Hämodynamik.....	22
3.2. Infarktgrößen.....	26
4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung	41
6. Literaturverzeichnis	42
7. Abbildungsverzeichnis	48

Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie
AAR	engl.: area at risk; ischämisches Myokardareal
ANT	engl.: adenine nucleotid translocase; Adenin Nukleotid Translokase
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
APOST	Anästhetika-induzierte Postkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	Atractylosid
BL	engl.: baseline; Äquilibrierungsphase
BK _{Ca}	engl.: large conductance calcium-activated potassium channel; Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
Ca ²⁺	Calcium
CAO	engl.: coronary artery occlusion; Koronararterienokklusion
CON	Kontrollgruppe
CK	Kreatinkinase
CYC A	Cyclosporin A
CyP-D	Cyclophilin-D
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
Erk 1/2	p42/p44 extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen
et al.	lat.: et alii
HF	Herzfrequenz pro Minute
i. p.	Intraperitoneal
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPOST	Ischämische Postkonditionierung
I/RS	Ischämie-/Reperfusionsschaden
IbTx	Iberiotoxin
IL-6	Interleukin 6
IS	engl.: infarct size; Infarktgröße

JAK-STAT	Janus Kinase-Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator-Signalweg (STAT: signal transducer and activator of transcription)
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP-abhängige Kaliumkanäle
KG	Körpergewicht
LAD	engl.: left anterior descending coronary artery; absteigender Ast der linken Koronararterie
M	Musculus
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
mito	Mitochondrial
mPTP	engl.: mitochondrial permeability transition pore; mitochondriale Permeabilitätspore
NaCl	Natriumchlorid
PCI	engl.: percutaneous coronary intervention; Perkutane Koronarintervention
PI3K-Akt	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase-Akt Signalweg
RISK pathway	engl.: reperfusion injury salvage kinase pathway
PKC	Proteinkinase C
SEM	engl.: standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes
SPECT	engl.: single photon emission computed tomography; Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
STEMI	engl.: ST-segment elevation myocardial infarction; ST-Strecken Hebungsinfarkt
Temp	Temperatur
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
V	Vena
VDAC	engl.: voltage dependent anion channel; spannungsabhängiger Anionen-Kanal
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1 Einleitung

1.1 Kardioprotektion

Kardiale Erkrankungen stellten in Deutschland 2009 die häufigsten Todesursachen dar. An erster Stelle rangierte die Chronische ischämische Herzkrankheit mit einem Anteil von 8,6% aller Todesursachen, gefolgt vom Akuten Myokardinfarkt (6,6%) und der Herzinsuffizienz (5,7%). Konkreter formuliert sind im Jahre 2009 in Deutschland 56 226 Menschen an einem Akuten Myokardinfarkt verstorben.[1] Trotz verbesserter Prognose stellt der Myokardinfarkt noch immer eine der häufigsten Todesursachen vor allem in der westlichen Welt dar.[2]

Handelt es sich beim Myokardinfarkt um einen STEMI, so besteht die therapeutische Intervention in einer Reperfusion der verschlossenen Koronararterie.[3] Hierbei bieten sich die Möglichkeit einer Lysetherapie und - meist überlegen - einer Katheterintervention durch eine PCI an.[4-6] Je früher das Myokard wieder perfundiert wird, desto geringer ist das Ausmaß des Infarktes.

Mit zunehmender Infarktgröße geht ein Funktionsverlust des Herzens einher, von dem wiederum die Mortalitätsrate abhängt. [7-9]

Somit ist das Überleben nach einem akutem Myokardinfarkt von der frühzeitigen Reperfusion des ischämischen Gewebes[10, 11] sowie der Infarktgröße abhängig.

Zum einen werden Versuche unternommen die Zeit vom Einsetzen des Myokardinfarktes bis zur therapeutischen Intervention zu verkürzen.[12] Zum anderen gibt es Bestrebungen das Ausmaß des infarzierten Areals beim Myokardinfarkt zu minimieren. Hier versucht die Forschung im Bereich der Kardioprotektion Antworten zu liefern.

Die Größe des Infarktes ist nicht allein vom morphologischen und zeitlichen Ausmaß der Ischämie abhängig. Auch die zur Begrenzung des Infarktes notwendige Reperfusion führt zu Schäden und trägt wesentlich zur Infarktgröße bei. Durch die Reperfusion bedingter oxidativer Stress, intrazellulärer Calciumanstieg oder ein zu rascher Ausgleich einer Azidose können zu einem Reperfusionsschaden führen.[13]. Daher ist es ein wesentliches Ziel der Kardioprotektion den Reperfusionsschaden zu begrenzen. Es entstand der Begriff des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/RS).

Der Begriff „Kardioprotektion“ wird unterschiedlich weit interpretiert. In engerem Sinn umfasst er die Reduktion der Infarktgröße durch verschiedene Interventionen.[14] So wird er auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Im weiteren Sinn umfasst Kardioprotektion mehr als die Infarktgrößenreduktion durch Prä- und Postkonditionierung. So werden unter anderem die Auswirkungen von Hypothermie[15] oder Pharmaka auf die Herzinfarktgröße diskutiert. Zum Beispiel verbessern β -Blocker die myokardiale Sauerstoffbilanz und Statine[16] oder Adenosin[17, 18] werden kardioprotektive Effekte bei der PCI zugeschrieben. Die vorliegende Arbeit untersucht das Phänomen der ischämischen Postkonditionierung.

Im Jahre 1986 konnten Murry *et al.* an Hunden zeigen, dass kurze Ischämiephasen von 4x5Min Dauer, die einem 40minütigen Verschluss des Ramus circumflexus des Herzens mit anschließender Reperfusion vorangingen, zu einer Infarktreduktion im Vergleich zu den Tieren führten, die nur 40 Minuten Okklusion und Reperfusion unterzogen wurden. Die kurzen vorangeschalteten ischämischen Phasen hatten dazu geführt, dass die Kardiomyozyten während der Koronararterienokklusion gegenüber der Ischämie resistenter waren. Dieses Phänomen wird als ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet.[19]

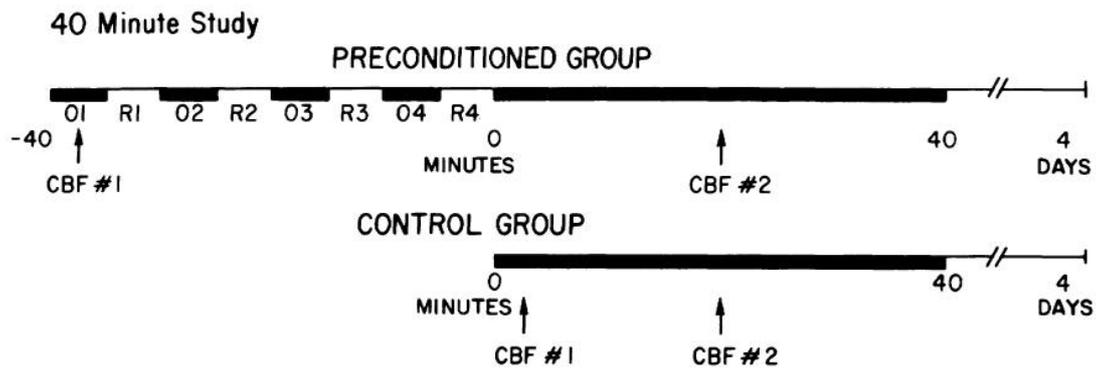


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Versuchsprotokoll von Murry et al.[19]; präkonditionierte Gruppe und Kontrollgruppe

Neben kurzen ischämischen Phasen können auch volatile Anästhetika präkonditionierende Effekte vermitteln. Damit erweiterte sich das Forschungsgebiet der Kardioprotektion um die sogenannte Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC).[20]

Aus dem zunehmendem Wissen um die schädigende Wirkung der Reperfusion [13, 21] leiteten sich Überlegungen ab, dass Interventionen, die während der Reperfusion und somit erst nach dem kritischen ischämischen Ereignis ansetzen, die Infarktgröße reduzieren könnten. Tatsächlich konnten Zhao *et al.* eine solche Reduktion erzielen indem sie vier Intervalle von je 30 Sekunden Reperfusion und Ischämie zu Beginn der Reperusionsphase setzten. Dabei konnte das Infarktareal in ähnlichem Ausmaß wie durch IPC verkleinert werden.[22] Dieses Experiment beschreibt zum ersten Mal das Phänomen der Postkonditionierung. Andere Studien bestätigten ebenfalls, dass die Postkonditionierung ähnlich große infarktmindernde Effekte hervorruft wie die Präkonditionierung.[23, 24] Neben diesem neuen Phänomen der ischämischen Postkonditionierung (IPOST) entwickelte sich, analog zur Präkonditionierung, eine durch Anästhetika induzierte Postkonditionierung (APOST).

Im Gegensatz zur Präkonditionierung bietet die Postkonditionierung die potentielle Möglichkeit nach einem Infarktgeschehen therapeutisch eingreifen zu können. Es zeigte sich, dass IPOST nur dann erfolgreich ist, wenn die Intervention unmittelbar zu Beginn der Reperfusion erfolgt.[24, 25]

1.2 Mechanismen der ischämischen Postkonditionierung

Kurze Ischämiephasen und volatile Anästhetika, nach einer längeren Ischämiephase appliziert, können die Infarktgröße vermindern. Bisherigen Vorstellungen nach wird die IPOST über Rezeptoren an der Zellmembran (vorwiegend G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) induziert, welche verschiedene Signaltransduktionswege im Zellinneren anstoßen und Veränderungen an den Mitochondrien hervorrufen, die als Endeffektoren der Kardioprotektion angesehen werden.[26]

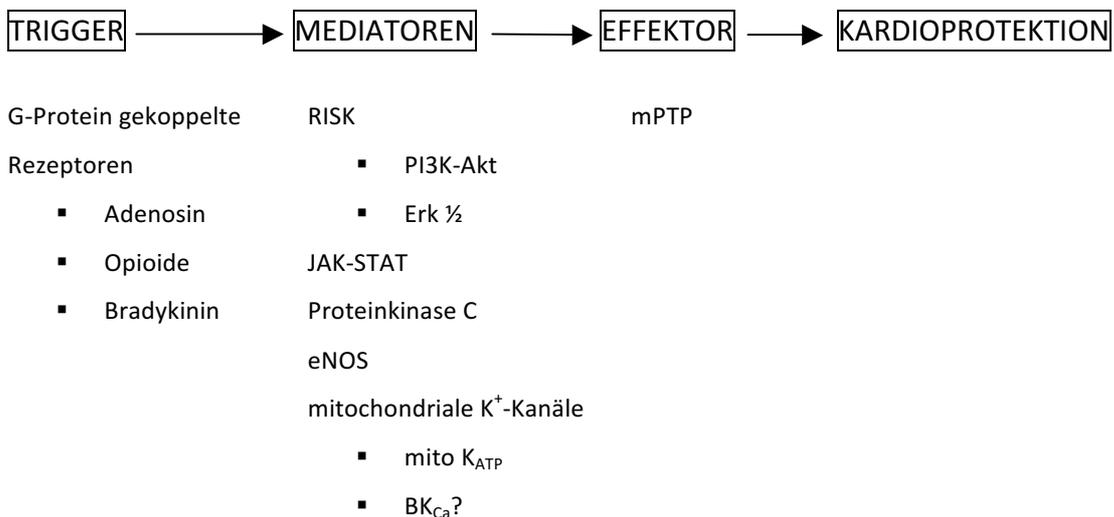


Abbildung 2: Mechanismen der IPOST. RISK = RISK-Signalweg, PI3K-Akt = Phosphatidylinositol-3-OH Kinase-Akt Signalweg, eNOS = endotheliale NO-Synthetase, mito K_{ATP} = mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle, BK_{Ca} = Calcium-aktivierter Kaliumkanal (modifiziert nach Vinten-Johansen et al.[27])

Aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln Kardioprotektion durch IPOST. Bisher konnten für Adenosin-Rezeptoren[28], den Bradykinin-Rezeptor B2[29, 30] und Opioid-Rezeptoren – der μ -Rezeptor, möglicherweise auch der δ -Rezeptor[31] – eine Beteiligung an der IPOST nachgewiesen werden.

Derzeitig wissenschaftlicher Konsens ist, dass der Reperfusionsschaden sowohl durch Apoptose als auch Nekrose bedingt ist. Der RISK-Signalweg (reperfusion injury salvage kinase pathway) spielt im Rahmen der Apoptoseregulation eine wichtige Rolle.[32, 33] Bedeutendste Bestandteile hiervon sind die aus Kinasen bestehenden Signalkaskaden des Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K) – Akt Signalweges und der p42/p44 extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (Erk1/2). Werden diese Kinasen aktiviert bewirken sie antiapoptotische Effekte.[34, 35] Dazu gehören ganz wesentlich die Inaktivierung von pro-apoptotischen Enzymen wie den Caspasen 3 und 9 sowie die Blockade proapoptotischer Enzyme (BIM, BAX, BAD), welche die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindert.

**Protecting the Heart Against Reperfusion Injury:
Targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-Pathway**

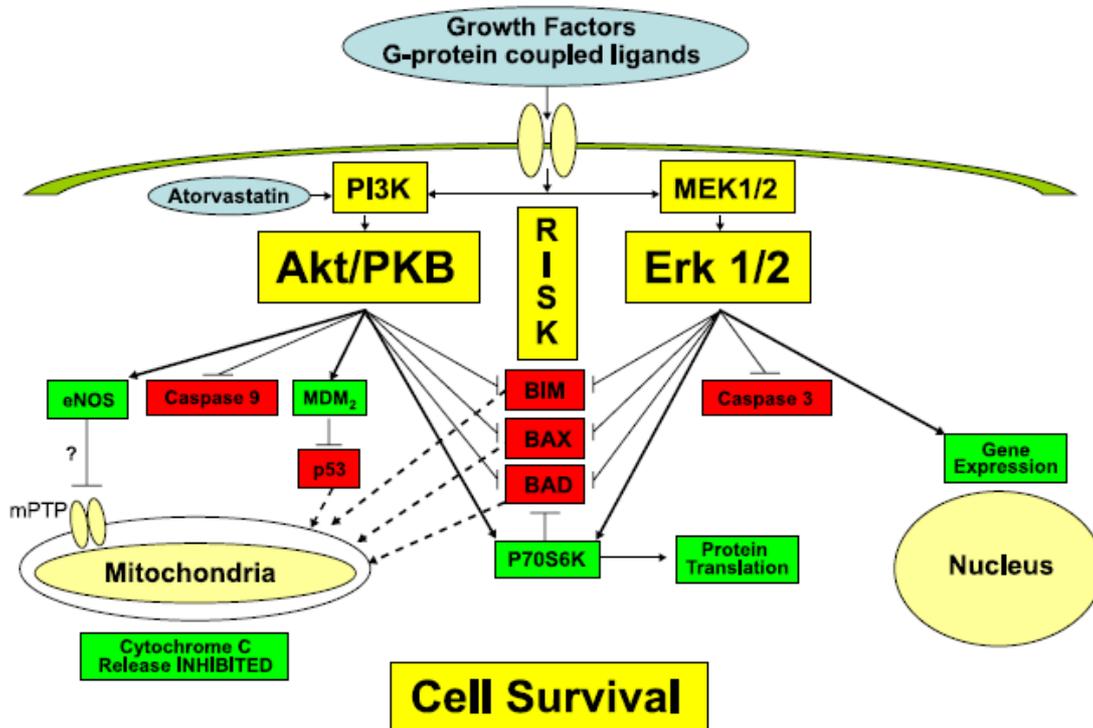


Abbildung 3: Hausenloy et al.[32]. Hypothetisches Schema. Die Aktivierung von Akt und Erk 1/2 über Wachstumsfaktoren und G-Protein gekoppelte Liganden führt zu: (1) Phosphorylierung und Inaktivierung der Caspasen 3 und 9 mit daraus resultierender Blockade der Apoptose; (2) Phosphorylierung und Inaktivierung der proapoptotischen Proteine BIM, BAX, BAD und p53; die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien wird so verhindert; (3) Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS, welche eine Öffnung der mPTP verhindern.

PI3K-Akt = Phosphatidylinositol-3-OH Kinase–Akt Signalweg; Erk1/2 = p42/p44 extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen; eNOS = endotheliale NO-Synthetase.

Auch eine Beteiligung des Janus Kinase (JAK)-Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator (STAT)-Signalweges an der IPOST ist beschrieben worden. Im Zuge myokardialer Ischämie zirkulieren Zytokine vermehrt im Blut, darunter Interleukin 6 (IL-6). Als Ligand bindet es an Zytokinrezeptoren und aktiviert den JAK-STAT-Signalweg. Auf welchen Wegen der JAK-STAT-Signalweg seine protektive Wirkung entfaltet ist im Detail noch nicht geklärt. Neben Auswirkungen auf der Ebene der Transkription und Genexpression werden auch direkte protektive Effekte auf die Mitochondrien vermutet.[36-38]

1.2.1 Mitochondriale ATP-regulierte Kaliumkanäle (mito K_{ATP} -Kanäle)

Bei den Versuchen, Signalwege der Kardioprotektion zu entschlüsseln, wurde eine Beteiligung von Kalium-Kanälen vermutet.[39] Dabei richtete sich die Aufmerksamkeit zunächst auf die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle (K_{ATP}). Es konnte nachgewiesen werden, dass deren Öffnung wesentlich zur Kardioprotektion bei IPC beiträgt.[40, 41] Dass hierbei nicht wie zunächst vermutet die sarkolemmalen, sondern die mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle (mito K_{ATP}) die IPC vermitteln, konnte von Garlid et al.[42, 43] erstmals demonstriert werden.[44] Die Aktivierung der mito K_{ATP} stabilisiert das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und hält die mitochondriale Permeabilitätspore, mPTP, in geschlossenem Zustand.[45] In weiteren Studien konnte dargestellt werden, dass die mito K_{ATP} auch an der APC beteiligt sind.[20, 46] Nach Entdeckung der IPOST durch Zhao et al.[22] wurden die mito K_{ATP} in Hinblick auf eine mögliche Rolle in der Postkonditionierung überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die mito K_{ATP} wesentliche intrazelluläre Mediatoren der IPOST sind.[47]

1.2.2 Calcium-regulierte Kaliumkanäle (BK_{Ca})

Neben K_{ATP} -Kanälen existieren in der mito-Membran weitere Kaliumkanäle. Einer von ihnen ist der BK_{Ca} , ein Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit.[48] Der BK_{Ca} ist ein für Kalium selektiver Kanal, der eine große Leitfähigkeit besitzt. Dieser Kaliumkanal ist Ca^{2+} - und spannungsabhängig, d. h. intrazellulärer Calciumanstieg und depolarisierendes mitochondriales Membranpotential führen zu seiner Aktivierung. Der Aufbau des BK_{Ca} ist im Wesentlichen bestimmt durch eine α -Untereinheit, welche die Pore beinhaltet, und eine β -Untereinheit, die Einfluss auf den Öffnungszustand des Kanals nimmt und selbst durch Aktivatoren und Inhibitoren beeinflusst wird.[49-51]

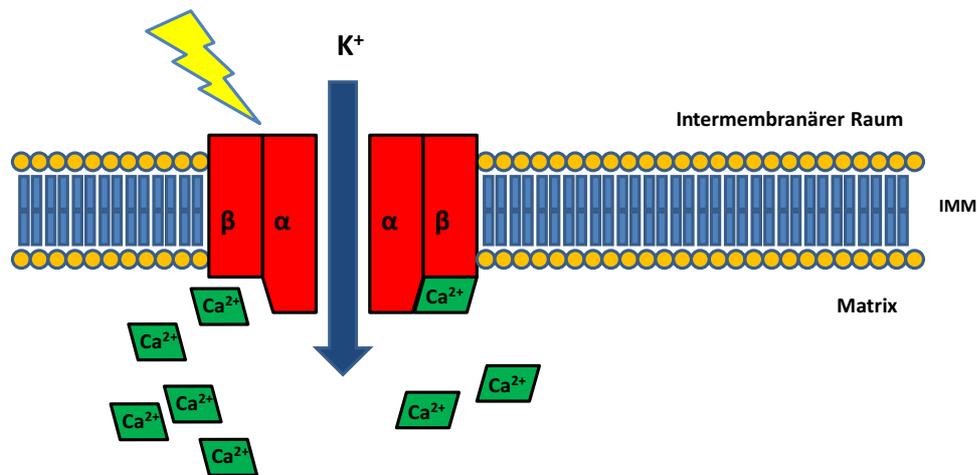


Abbildung 4: Schematische Darstellung des BK_{Ca}. Intrazellulärer Calciumanstieg oder depolarisiertes mitochondriales Membranpotential öffnen den Kanal. Es kommt zum Kaliumeinstrom in den Matrixraum. IMM = Innere Mitochondrienmembran

Xu *et al.* zeigten an Meerschweinchen, dass durch das Öffnen des BK_{Ca} Herzmuskelzellen des Ventrikels vor den Folgen eines Infarktes geschützt werden konnten.[48] Dass der BK_{Ca} in die Signalkaskaden der Präkonditionierung eingeschaltet und wesentlich beteiligt ist, konnte schließlich sowohl für die IPC[52] als auch die APC[53] dargestellt werden. Ziel dieser Arbeit ist es nun zu untersuchen ob der BK_{Ca} auch zur Kardioprotektion durch Postkonditionierung beiträgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine mögliche Beteiligung des BK_{Ca} an der IPOST untersucht.

Diese Überlegung erschließt sich daraus, dass sich beispielsweise am RISK-pathway zeigen ließ wie Signalwege in der Prä- und Postkonditionierung identisch sein können.[54] Auch die K_{ATP}-Kanäle wirken sowohl an Prä- als auch Postkonditionierung mit.

1.2.3 Die Rolle der Mitochondrien in der Kardioprotektion und die Bedeutung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP)

Die Lebensfähigkeit von Zellen im Allgemeinen, und somit auch die von Kardiomyozyten, ist an die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien gekoppelt. Mitochondrien regulieren z. B. die Calcium-Homöostase der Zelle und stellen ATP als Energieeinheit zur Verfügung. Tritt ein ischämisches Ereignis ein, können mitochondriale Funktionen empfindlich gestört werden, die u. a. in einer Abnahme des ATP-Angebotes an die Zelle sowie in einem intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg resultieren.[55] Hierdurch kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und konsekutiv zur Induktion der Apoptose.[56] Die mitochondriale Integrität ist entscheidend für die Existenzfähigkeit von Zellen und hat sich als Kernelement und Fokus der Kardioprotektion erwiesen.[55, 57] Die Kardioprotektion zielt darauf ab, den Zelltod sowohl durch Nekrose als auch Apoptose abzuwenden. Hierfür sind die Mitochondrien einerseits als ATP-Generator wichtig, wodurch die Integrität der Zelle aufrechterhalten und Nekrose verhindert wird, als auch andererseits als Schlüsselorganell der Apoptose.[58]

Zur genannten Stabilität der Mitochondrien trägt grundlegend die mPTP (mitochondrial permeability transition pore) bei. Die mPTP ist eine Pore in der inneren mitochondrialen Membran, die sich unter normalen physiologischen Bedingungen in geschlossenem Zustand befindet. Im Jahre 2002 konnten Hausenloy *et al.* zum ersten Mal nachweisen, dass der kardioprotektive Erfolg der IPC auf die Inhibition der Öffnung der mPTP zurückzuführen ist.[59] Heute gilt sie als einer der wichtigsten Endeffektoren in der Kardioprotektion.[60] Der exakte molekulare Aufbau der mPTP im Detail ist bis heute nicht geklärt. Es wird gegenwärtig angenommen, dass sich die mPTP vor allem aus drei mitochondrialen Proteinen zusammensetzt: dem VDAC (voltage-dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran, der ANT (adenine nucleotide translocase), einer Translokase, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und CyP-D (cyclophilin-D), welches sich in der mitochondrialen Matrix befindet.[61]

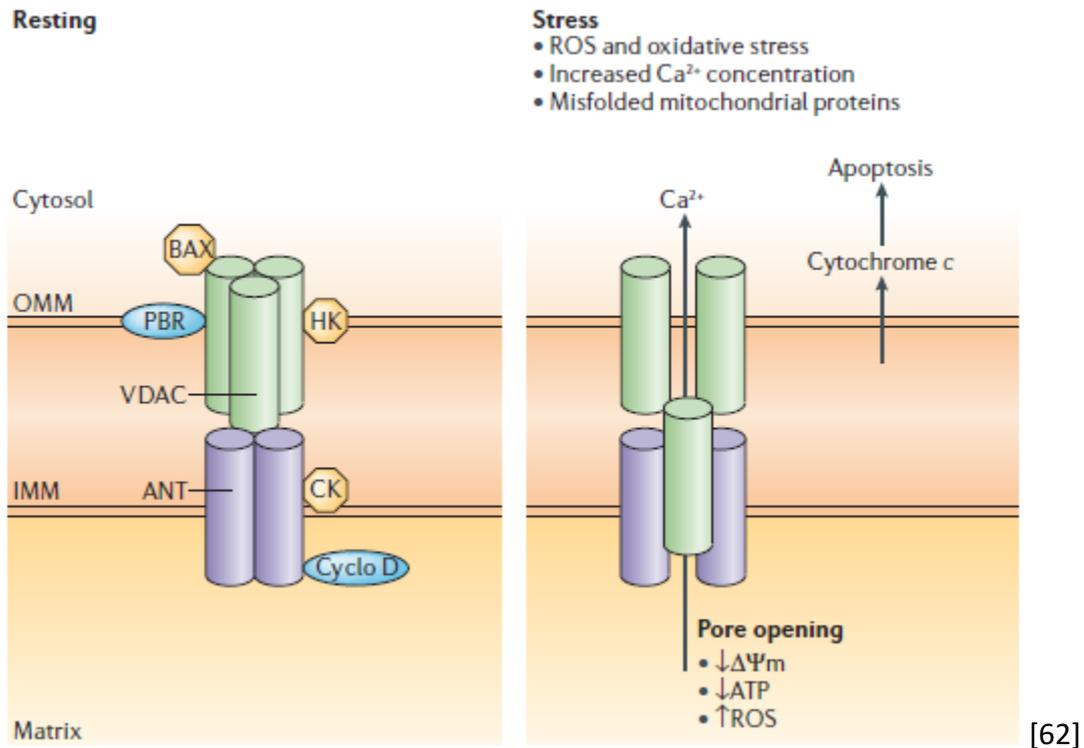


Abbildung 5: Schematische Darstellung der mitochondrialen Permeabilitäts-pore (mPTP) aus Abou-Sleiman et al.[62] VDAC = Spannungsabhängiger Anionen-Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran; ANT = Adenin Nukleotid Translokase, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist; CyP-D = Cyclophilin D, welches sich in der mitochondrialen Matrix befindet; OMM = Äußere Mitochondrienmembran; IMM = Innere Mitochondrienmembran

Unter ischämischen Bedingungen beispielsweise bindet CyP-D an ANT was zu einer Komplexbildung VDAC-ANT-CyP-D der drei Proteine führt und eine Pore (mPTP) bildet, die die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erhöht.[61, 63-66] Dadurch bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, welches für die oxidative Phosphorylierung benötigt wird um ATP zu generieren. Im Zuge weiterer Pathomechanismen schwellen die Mitochondrien an, Cytochrom C wird freigesetzt und induziert Apoptose.[60] Tritt ein Ischämie/Reperfusion-Ereignis ein, so bleibt die mPTP während der Ischämiephase geschlossen, öffnet aber mit Beginn der Reperfusion.[67] Als Trigger, die zur mPTP-Öffnung führen wurden ein Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration, der Zusammenbruch des mitochondrialen

Membranpotentials und der Anstieg von ROS vor allem während der frühen Reperfusion ausgemacht.[55, 68, 69]

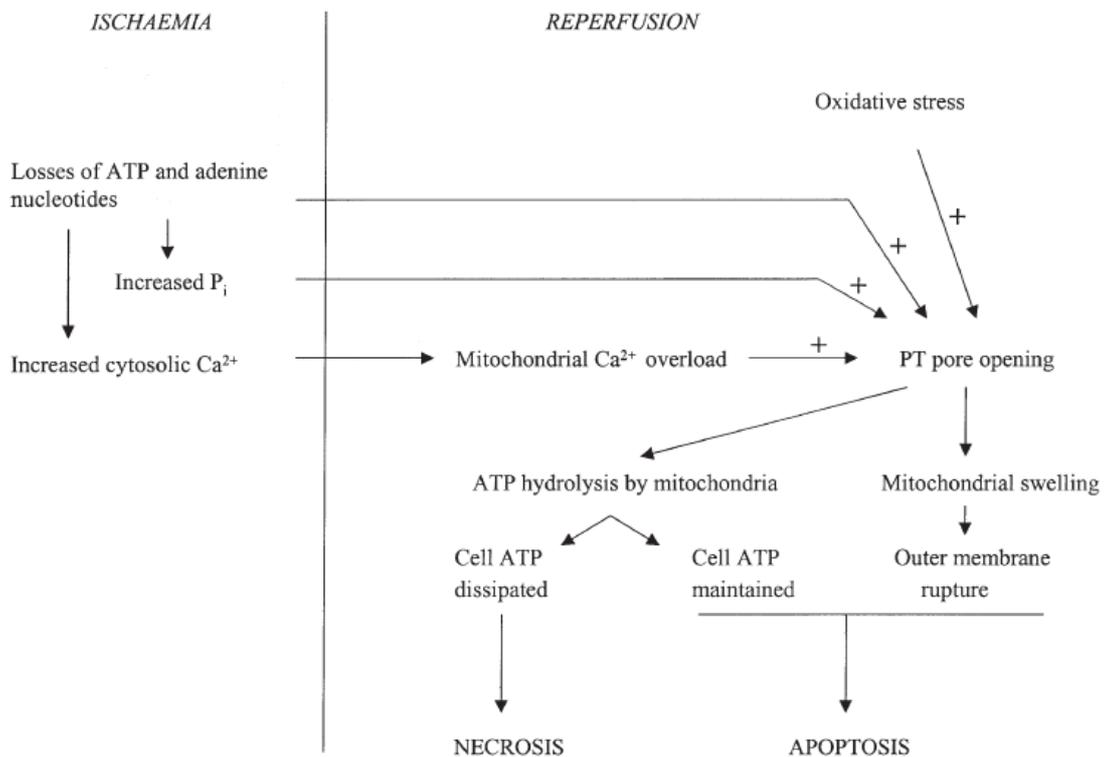


Abbildung 6: Crompton et al.[61] Beteiligung der mPTP an Nekrose und Apoptose bei Ischämie/Reperfusion. Ischämie führt zu Verbrauch von ATP, woraufhin intrazelluläres Calcium und Phosphat ansteigen. Während der Reperfusion triggern diese 3 Faktoren zusammen mit oxidativem Stress die Öffnung der mPTP. Bei ausgedehnter Öffnung der mPTP wird die Kapazität der Zelle ATP zu generieren überstiegen und die Zelle wird nekrotisch. Bei Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran werden die Caspasen aktiviert, welche die Apoptose einleiten.

Nach heutigem Stand der Forschung im Bereich der Kardioprotektion wird der mPTP eine Schlüsselrolle in der Prä- und Postkonditionierung zugeordnet. Es wird angenommen, dass die mPTP der wichtigste Endeffektor in den Signalketten der Kardioprotektion ist. Dies bedeutet, dass die mPTP am Ende der meisten Signalkaskaden steht und durch kardioprotektive Maßnahmen deren Öffnungswahrscheinlichkeit reduziert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob und in welcher Art eine Interaktion zwischen dem BK_{Ca} und der mPTP in der IPOST besteht.

1.3 Hypothese

Folgende Hypothesen wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft:

1. Die ischämische Postkonditionierung (IPOST) wird über den BK_{Ca} vermittelt.
2. Die mPTP ist dem BK_{Ca} in der Signalkaskade der IPOST nachgeschaltet.

Als primärer Endpunkt der kardioprotektiven Wirkung wurde die Reduktion der Infarktgröße formuliert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchsgenehmigung

Für die experimentellen Untersuchungen wurden männliche C57BL6 Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden artgerecht gehalten und erhielten flüssige und feste Nahrung ad libidum. Zu Beginn der Untersuchungen waren die Mäuse 8-12 Wochen alt. Die Versuchsgenehmigung wurde von der Regierung von Unterfranken unter dem Aktenzeichen 75/08 erteilt.

2.2 Präparation

Die Mäuse wurden gewogen und mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital 0,6% (Narcoren®, 60mg/kg KG, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Die Dosierung für die Einleitung der Narkose ist vergleichbar mit anderen Angaben aus der Fachliteratur.[70, 71]

Anschließend wurden die narkotisierten Versuchstiere auf einem 37° C beheizten Operationstisch (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Berbach, Deutschland) auf dem Rücken liegend an allen vier Extremitäten mittels Klebestreifen fixiert.

Ein unter den Schneidezähnen des Oberkiefers verlaufendes Gummiband sorgte für eine Reklination des Halses und hielt auf diese Weise die Atemwege offen. Mit Hilfe eines Overholts, der als Intubationsspatel diente, wurden die Mäuse orotracheal intubiert. Als Tubus wurde eine intravenöse Verweilkanüle (22 GA, 0,9x25mm, BD Insyte-W™, BD Vialon Material, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) verwendet. Die Beatmung erfolgte druckkontrolliert mit einer Frequenz von ca. 120-130 Atemzügen pro Minute und einem Luft-Sauerstoff-Gemisch (1:1) bei einem Frischgasfluss von 3l/min (Trajan 808, Dräger, Lübeck, Deutschland).

Mittels dreier Elektroden an den Extremitäten wurde ein EKG-Signal aufgezeichnet um Herzfrequenz und ST-Streckenveränderungen stetig beurteilen zu können.

Die kontinuierliche Temperaturmessung erfolgte über eine rektale Sonde.

Um die Blutgefäße am Hals präparieren zu können wurde ein ca. 2cm langer medianer Halsschnitt vom Os hyoideum bis zum Sternum gesetzt. Die Speicheldrüsen wurden stumpf voneinander getrennt und die rechte Arteria carotis communis freigelegt. Mit einem Seidenfaden (Seidenfaser, nicht resorbierbar, geflochten 6/0 USP, RESORBA, Nürnberg, Deutschland) wurden eine distale und eine proximale Schlinge um die Arterie gelegt und das distale Ende okkludiert. Im Anschluss wurde die Arterie gespannt um unter Anwendung einer Federschere (Katarakt-Schere) einen Schnitt in das Gefäß setzen zu können. Ein Polyethylen-Schlauch, welcher mit einer durch einen Bunsenbrenner ausgezogenen Spitze versehen wurde, fungierte als arterieller Katheter. Dieser wurde in die Arterie eingeführt und durch die proximale Schlinge fixiert. Auf diese Weise konnte der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) gemessen werden.

Ein zentraler Venenkatheter (ZVK) wurde nach dem gleichen Prinzip in der Vena jugularis interna plziert. Hierfür genügte ein einfacher Schlauch aus Polyethylen. Die Mäuse erhielten über den ZVK eine kontinuierliche Infusionstherapie mit Sterofundin (20µl/g KG/h, PHD 2000 Infusion, Harvard Apparatus, USA). Um den Flüssigkeitsverlust und den Temperaturabfall zu minimieren wurde der Halsschnitt per Naht verschlossen.

Mittels der Software NOTOCORD-hem 3.5 (Croissy sur Seine, Frankreich) konnten Herzfrequenz (HF), Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), EKG (eine Ableitung) und Temperatur aufgezeichnet werden. Auf diese Art waren die Vitalparameter zu jedem Zeitpunkt beurteilbar.

Die Narkosetiefe wurde klinisch über die Reaktion auf Druckreize an den Extremitäten sowie über Veränderungen der hämodynamischen Parameter (HF, MAP) ermittelt. Um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten, wurden bei Bedarf Boli von Pentobarbital 0,6% appliziert.

Die linksseitige Thorakotomie begann mit einem Hautschnitt von der Axilla zum Xiphoid. Der Musculus pectoralis major wurde abgehoben und am Sternum abgetrennt, der Musculus pectoralis minor an der Klavikula. Im vierten Interkostalraum wurde die Muskulatur stumpf durchtrennt, die vierte Rippe am Sternum abgesetzt und der 4. ICR nach dorsal erweitert. Nach Einsetzen eines kleinen Rippenspreizers wurde das Perikard stumpf eröffnet. Der prominente absteigende Ast der linken Herzkranzarterie, der LAD, wurde mit einem Faden (Perma-Hand Seide 6-0, Ethicon, Johnson + Johnson Intl) unterstochen. Um das Herz mechanisch und vor Austrocknung zu schützen wurde der M. pectoralis minor über das Herz zurückgeschlagen, der Thorax mit Parafilm und der Corpus mit Tüchern bedeckt.

2.3 Induktion der myokardialen Ischämie

Um einen Verschluss des LAD zu erreichen (coronary artery occlusion, CAO) wurde zunächst ein kurzes Stück eines Polyethylen-Schlauches über die beiden Enden des Okklusionsfadens gefädelt. Dieser sogenannte „Okkluder“ sitzt während der CAO über dem LAD auf dem Herzen auf und verschließt die linke Koronararterie indem an den beiden Fadenenden, die über einen Halter laufen und mit Gewichten von je 1,5 g beschwert sind, Zug ausgeübt wird. Um zu verhindern, dass die Ligatur aus dem Myokard gerissen wird, fixiert eine Kanülenspitze, die über dem Okkluder verläuft und am Brustkorb befestigt ist, den Okkluder am Myokard.[72] Unmittelbar nach erfolgter Okklusion muss überprüft werden, ob eine myokardiale Ischämie induziert wurde. Wichtigstes Kriterium zur Beurteilung hierbei war die epikardiale Abblassung des Myokards, weiter das sichtbare Hervortreten der Herzvenen und die ST-Streckenhebung im EKG.

Zu Beginn der Reperfusionphase wurden die Gewichte samt Okkluder entfernt. Das sich wieder rosig färbende Myokard wurde als wichtigster Indikator einer Reperfusion gewertet. Wie auch während der CAO wurden die ST-Strecken begutachtet. Der

Rückgang der ST-Hebung sowie eine während der frühen Reperfusionphase auftretende ST-Senkung waren Indikatoren einer suffizienten Reperfusion.

2.4 Infarktgrößenbestimmung

Nach 3-stündiger Reperfusion wurde das Experiment beendet. Der LAD wurde durch die Schlinge mit zweifachem Knoten verschlossen. Um einer Thrombosierung entgegenzuwirken wurde über den arteriellen Katheter 0,7ml Heparin (Heparin 25000 IE/50ml NaCl = 500 IE/ml) verabreicht. Es folgte die Färbung des Myokards, welches nicht vom LAD perfundiert wurde. Hierfür wurden 0,5ml EvansBlue 10% (5g/50ml NaCl) stoßweise über den arteriellen Katheter appliziert. So ließ sich die ungefärbte area at risk (AAR) von dem restlichen Myokard unterscheiden.

Nachdem sich das Myokard blau gefärbt hatte erhielt die Maus eine letale Dosis Pentobarbital i. p. Nun wurde das Herz mit einer Pinzette gegriffen, mit einer Federschere aus dem Thorax herausgeschnitten und unverzüglich in ein mit eiskaltem NaCl 0,9%-gefülltes Schälchen gegeben. Das Herz wurde daraufhin auf einer Platte aus Styropor mittels einer Kanülenspitze so fixiert, dass der rechte Ventrikel nach oben zu liegen kam. Die anschließende Präparation des Herzens geschah mit Hilfe von Pinzette und Federschere. Die beiden Vorhöfe wurden abpräpariert. Der rechte Ventrikel wurde abgetrennt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem N₂ schockgefroren. Der linke Ventrikel wurde im Kühlschrank bei -36°C für 25Min. gefroren, dann in einer Kristallmatrix (Kristallmatrix, Aster Industries) fixiert und mit Rasierklingen (Klingen mit Griffschutz 39x19mm, A. Hartenstein, Deutschland) in 1mm dicke Scheiben geschnitten.

Für die Färbung der noch intakten Herzmuskelzellen wurden die Schnitte in je 1ml TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland: 200mg auf 10ml Phosphatpuffer pH 7,4: Na₂HPO₄ 14,24g auf 800ml H₂O + NaH₂PO₄ 3,12g auf 200ml H₂O) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem

Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37°C für 25Min. temperiert und gemischt. Im Anschluss wurden die einzelnen Schnitte in Petrischalen über Nacht verwahrt, die mit einer 3,5%igen Formaldehyd-Lösung (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) gefüllt waren. Eckle *et al.* stellen in einem Videoclip in großen Teilen das beschriebene Verfahren dar: <http://www.jove.com/Details.php?ID=2526> [73]

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte aus der Lösung entnommen, gewogen, auf Objektträger gegeben, mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung versetzt und einem Deckglas versehen. So konnten die Schnitte von beiden Seiten digital fotografiert (Kamera: Digitalkamera FinePix S3 Pro, Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf, Deutschland; Objektiv: SIGMA Objektiv 105mm F2.8 EX DG MACRO, SIGMA (Deutschland) GmbH, Rödermark, Deutschland; Blitz: Sigma Electronic Flash Macro EM-140 DG, SIGMA (Deutschland) GmbH, Rödermark, Deutschland) und gespeichert werden. Mit der Software Adobe®Photoshop®Elements 7 wurde jeder Schnitt des linken Ventrikels mit drei Farben markiert. Mit einer Farbe wurde die gesamte Ventrikelfläche gefüllt, mit einer zweiten die area at risk (AAR), also der Anteil, welcher der Ischämie durch Okklusion des LAD ausgesetzt war. Die dritte Farbe kennzeichnete die Größe des Infarktes (IS = infarct size). Die Auswertung erfolgte somit gravitoplanimetrisch: Durch die Berücksichtigung des Gewichtes der einzelnen Schnitte (lat. gravitas=Gewicht) und durch die prozentuale Bestimmung des Anteils der IS an der AAR (lat. planum=Fläche).

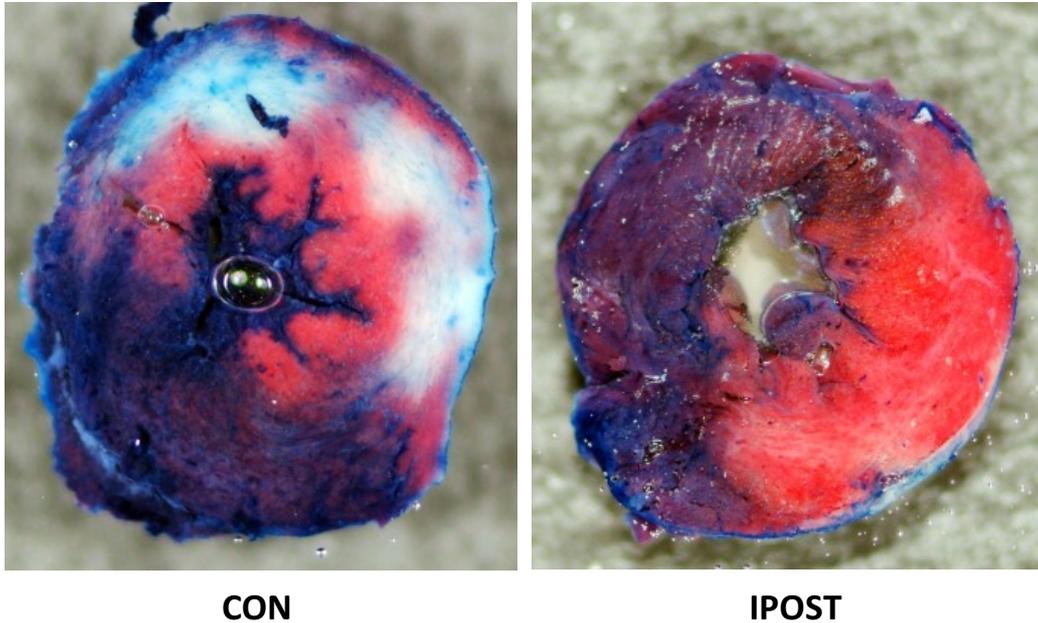


Abbildung 7: Zwei Schnitte des linken Ventrikels nach Färbung mit EvansBlue und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Das blau gefärbte Areal entspricht dem Myokard, welches nicht vom LAD perfundiert wurde. Die übrige Fläche (rot und weiß) zeigt die AAR, welche vom LAD perfundiert wurde und der Ischämie und Reperfusion ausgesetzt war. Die weiße Fläche entspricht dem Infarktgewebe, die rote Fläche Herzmuskelzellen, die trotz Ischämie und Reperfusion intakt geblieben sind. Links ist ein Schnitt aus der Kontrollgruppe (CON), rechts ein Schnitt aus der Gruppe, welche ischämisch postkonditioniert wurde (IPOST) zu sehen.

2.5 Experimentelles Protokoll

Die Zuordnung der Mäuse in 13 verschiedenen Versuchsgruppen zu je n=8 Tieren erfolgte randomisiert. Nach erfolgreicher Präparation erhielten alle Mäuse eine 30minütige Phase der Äquilibration, die sogenannte Baseline (BL). Daran schloss sich bei allen Tieren die Koronararterienokklusion (CAO) von 45 Minuten an. Mit Beendigung der CAO begann die 3-stündige Reperfusion. Schließlich wurde das Experiment durch die Färbung des Herzens beendet.

Die Applikation von Substanzen erfolgte intraperitoneal. In der Kontrollgruppe wurde keine weitere Intervention vorgenommen. Eine andere Gruppe erhielt das Lösungsmittel DMSO (10µl/g KG) 10Min. vor Ende der CAO. Die Tiere, die ischämisch postkonditioniert wurden (IPOST), erhielten im direkten Anschluss an die CAO drei Zyklen von je 10sekündigem Wechsel aus Reperfusion und Ischämie. In den weiteren Gruppen wurden unterschiedliche Wirkstoffe in verschiedenen Kombinationen verabreicht. Um die Bedeutung des BK_{Ca} im Kontext der IPOST zu untersuchen wurden folgende Substanzen verabreicht. NS1619, ein selektiver Stimulator des BK_{Ca}[48, 49] (100µg gelöst in 1ml DMSO, 1µg/g KG), und Iberiotoxin, ein Inhibitor des BK_{Ca}[48, 74] (5µg gelöst in 1ml H₂O, 0,05µg/g KG), wurden je 15 Minuten vor Ende der CAO appliziert. Zur Beurteilung der mPTP in Bezug auf die IPOST wurden weitere Substanzen verwendet. Der mPTP-Öffner (mitochondrial permeability transition pore) Atractyloside (ATRA) (2,5mg gelöst in 1ml H₂O, 25µg/g KG) und der Inhibitor der mPTP, Cyclosporin A (CYC A) (1mg gelöst in 1ml DMSO, 10µg/g KG) wurden jeweils 10 Minuten vor Ende der CAO verabreicht.

Die einzelnen Versuchsgruppen sind in nachfolgender Grafik aufgelistet.

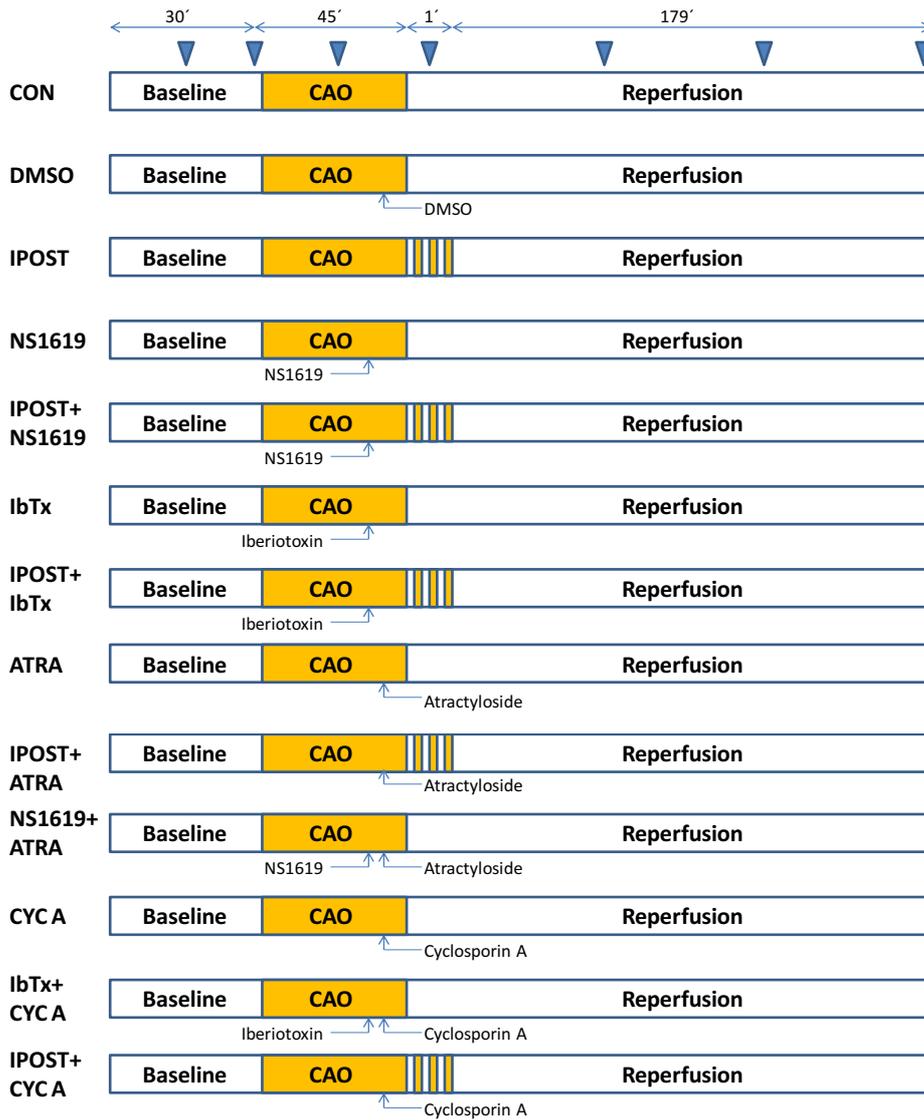


Abbildung 8: Experimentelles Protokoll. 30minütige Äquilibrationsphase (Baseline), gefolgt von einer Koronararterienokklusion (CAO) von 45 Minuten und anschließender 180minütiger Reperfusion. Die ischämische Postkonditionierung erfolgt im direkten Anschluss an die Phase der Koronararterienokklusion als drei Zyklen von je 10sekündigem Wechsel aus Reperfusion und Ischämie. Die Dreiecke ▼ kennzeichnen den Zeitpunkt der Erhebung der hämodynamischen Parameter.

2.6 Hämodynamische und statistische Auswertung

Während des gesamten Versuches wurden Vitalparameter gemessen und unter Anwendung der NOTOCORD Software aufgezeichnet. In allen Protokollen wurden die Herzfrequenz (HF), der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Körpertemperatur (Temp) zu 7 Zeitpunkten bestimmt. Diese wurden in der Baseline, der Phase vor der Myokardischämie, während der Koronararterienokklusion, der Phase unmittelbar zu Beginn der Reperfusion, in welcher die Postkonditionierung abläuft, sowie nach 1, 2 und 3 Stunden Reperfusion gemessen. Die erhobenen Größen wurden jeweils als Mittelwert (mean) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) vermerkt.

Die statistische Auswertung der Daten innerhalb und zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte durch die Varianzanalyse mittels ANOVA für wiederholte Messungen und den post-hoc Duncan`s Test (SPSS 17.0, USA).

3 Ergebnisse

Um 104 Ergebnisse erfolgreich abzuschließen wurden 115 männliche C57BL6 instrumentiert. Aufgrund einer AAR von weniger als 20% wurden 3 Tiere ausgeschlossen (jeweils eine Maus aus den Gruppen IbTx, IPOST+IbTx und IPOST+ATRA). Wegen neu aufgetretenem Kammerflimmern wurden weitere 8 Mäuse nicht berücksichtigt (1x IPOST, 2x NS1619, 1x IbTx, 1x IPOST+IbTx, 1x IPOST+ATRA, 2x NS1619+ATRA).

3.1 Gravitoplanimetrie und Hämodynamik

Die Mäuse in den einzelnen Gruppen unterschieden sich in ihrem Körpergewicht und dem Gewicht des linken Ventrikels – mit Ausnahme der Gruppe IPOST+ATRA - nicht signifikant voneinander. Der prozentuale Anteil des linken Ventrikels am Körpergewicht war in allen Gruppen gleich groß. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Größe der AAR zwischen den Gruppen.

In der nachfolgenden Übersicht sind die Ergebnisse der Gravimetrie und Planimetrie tabellarisch dargestellt.

Gravimetrie und Planimetrie

	N	KG	LV	LV/KG	AAR	IS	IS/LV	AAR/LV
		[g]	[mg]	[%]	[mg]	[mg]	[%]	[%]
CON	8	25,8 ± 0,9	70,9 ± 4,6	0,3 ± 0,0	25,6 ± 3,2	12,0 ± 1,6	16,6 ± 1,4	35,6 ± 2,7
DMSO	8	27,1 ± 1,3	78,1 ± 3,1	0,3 ± 0,0	28,1 ± 2,5	13,2 ± 2,0	16,7 ± 2,0	36,1 ± 3,0
IPOST	8	25,8 ± 0,4	75,4 ± 2,8	0,3 ± 0,0	25,9 ± 2,0	5,0 ± 0,6*	6,5 ± 0,6*	34,3 ± 2,0
NS1619	8	26,5 ± 1,0	76,7 ± 4,5	0,3 ± 0,0	25,6 ± 2,0	6,0 ± 1,3*	7,5 ± 1,2*	33,7 ± 2,6
IPOST+NS1619	8	26,1 ± 0,6	76,3 ± 3,5	0,3 ± 0,0	26,1 ± 3,3	6,5 ± 1,4*	8,3 ± 1,5*	33,6 ± 3,2
IbTx	8	24,8 ± 0,7	67,1 ± 3,4	0,3 ± 0,0	23,6 ± 2,5	11,3 ± 2,3	16,6 ± 3,1	35,2 ± 3,4
IPOST+ IbTx	8	24,3 ± 0,9	72,1 ± 3,7	0,3 ± 0,0	23,4 ± 1,6	10,7 ± 1,4	14,7 ± 1,6	32,3 ± 1,3
ATRA	8	25,9 ± 0,6	69,0 ± 3,6	0,3 ± 0,0	26,1 ± 3,2	12,7 ± 1,9	18,1 ± 2,1	37,4 ± 3,2
IPOST+ ATRA	8	27,1 ± 0,8	83,8 ± 4,1*	0,3 ± 0,0	25,8 ± 2,8	12,3 ± 2,4	14,3 ± 2,3	30,4 ± 1,8
NS1619+ ATRA	8	25,4 ± 0,9	75,7 ± 2,7	0,3 ± 0,0	31,5 ± 2,9	9,0 ± 1,5	11,9 ± 1,9	41,8 ± 4,0
CYC A	8	25,0 ± 0,8	78,4 ± 3,2	0,3 ± 0,0	29,3 ± 1,8	5,8 ± 1,0*	7,3 ± 1,1*	37,6 ± 2,6
IbTx+ CYC A	8	24,4 ± 0,6	75,6 ± 2,3	0,3 ± 0,0	25,3 ± 2,3	6,8 ± 1,6*	9,3 ± 2,5*	33,4 ± 2,9
IPOST+ CYC A	8	25,5 ± 1,1	75,2 ± 3,4	0,3 ± 0,0	26,3 ± 1,8	6,5 ± 1,5*	8,7 ± 2,0*	34,9 ± 1,7

Tabelle 1: Gravimetrie und Planimetrie

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *Signifikant ($p < 0.05$) verschieden von CON. KG = Körpergewicht, LV = Linker Ventrikel, AAR = area at risk, IS = Infarktgröße. CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, IbTx = Iberiotoxin, ATRA = Atractylosid, CYC A = Cyclosporin A.

Die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HR) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) unterschieden sich, wie in den unten angeführten Tabellen 2.1 und 2.2 zu sehen, in den einzelnen Gruppen in der Baseline nicht signifikant.

Herzfrequenz

	BL	PräCAO	CAO	POST	Reperfusion		
					60 min	120 min	180 min
HF (min⁻¹)							
CON	483 ± 16	501 ± 19	485 ± 17	478 ± 13	465 ± 13	462 ± 12	464 ± 10
DMSO	474 ± 16	475 ± 11	490 ± 12	497 ± 15	470 ± 9	483 ± 12	462 ± 8
IPOST	475 ± 13	464 ± 16	444 ± 10*	448 ± 9	430 ± 8*	458 ± 14	455 ± 14
NS1619	488 ± 14	497 ± 17	483 ± 16	503 ± 16	485 ± 13	513 ± 11 [§]	480 ± 15
IPOST+ NS1619	476 ± 11	492 ± 12	486 ± 6	497 ± 24	492 ± 8	479 ± 10	485 ± 14
IbTx	474 ± 15	482 ± 21	483 ± 10	473 ± 26	461 ± 34	471 ± 11	473 ± 7
IPOST+IbTx	485 ± 15	492 ± 12	492 ± 14	492 ± 11	482 ± 11	475 ± 10	455 ± 9
ATRA	485 ± 14	493 ± 12	472 ± 21	475 ± 25	474 ± 11	475 ± 16	465 ± 18
IPOST+ ATRA	484 ± 12	495 ± 13	476 ± 9	458 ± 9	445 ± 9	456 ± 14	451 ± 9
NS1619+ ATRA	488 ± 10	496 ± 12	471 ± 13	494 ± 16	473 ± 16	489 ± 16	487 ± 13
CYC A	492 ± 9	501 ± 17	481 ± 11	462 ± 12	467 ± 14	459 ± 14	469 ± 19
IbTx+CYC A	473 ± 12	482 ± 11	475 ± 14	472 ± 18	485 ± 18	494 ± 18	487 ± 16
IPOST+ CYC A	492 ± 16	482 ± 15	478 ± 10	483 ± 13	486 ± 14	470 ± 16	484 ± 18

Tabelle 2.1: Hämodynamik (Herzfrequenz)

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. N = 8 pro Gruppe. HF = Herzfrequenz, CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, IbTx = Iberiotoxin, ATRA = Atractylosid, CYC A = Cyclosporin A. Die Daten wurden am Ende der Baseline (= BL), vor (=PräCAO) und während (=CAO) der Koronararterienokklusion, unmittelbar zu Beginn der Reperfusion (=POST) sowie 60, 120 und 180 Min. nach Beginn der Reperfusion erhoben. *Signifikant (p<0,05) verschieden von BL, [§]signifikant (p<0,05) verschieden von CON.

Mittlerer arterieller Blutdruck

	BL	PräCAO	CAO	POST	Reperfusion		
					60 min	120 min	180 min
MAP (mmHg)							
CON	73 ± 3	68 ± 4	60 ± 2*	69 ± 3	72 ± 3	68 ± 4	70 ± 4
DMSO	81 ± 5	78 ± 5	71 ± 4 [§]	75 ± 4	72 ± 4	66 ± 3*	65 ± 4
IPOST	74 ± 5	66 ± 4	60 ± 2	63 ± 3	66 ± 5	68 ± 3	66 ± 4
NS1619	74 ± 5	77 ± 2	69 ± 4	69 ± 5	62 ± 3	66 ± 5	70 ± 4
IPOST+ NS1619	69 ± 4	67 ± 4	60 ± 3	65 ± 4	60 ± 3	62 ± 3	61 ± 3
IbTx	72 ± 4	68 ± 2	57 ± 3*	67 ± 6	70 ± 4	70 ± 3	69 ± 3
IPOST+IbTx	72 ± 2	71 ± 3	64 ± 2	75 ± 3	76 ± 4	73 ± 3	70 ± 4
ATRA	74 ± 5	71 ± 5	69 ± 4	75 ± 2	70 ± 2	70 ± 3	68 ± 5
IPOST+ ATRA	72 ± 4	74 ± 5	65 ± 5	72 ± 4	74 ± 5	67 ± 5	70 ± 6
NS1619+ ATRA	71 ± 2	68 ± 3	59 ± 2	64 ± 4	67 ± 2	68 ± 3	65 ± 3
CYC A	70 ± 3	70 ± 2	63 ± 3	63 ± 2*	61 ± 3*	63 ± 2	61 ± 4*
IbTx+CYC A	71 ± 3	74 ± 2	62 ± 4	69 ± 3	67 ± 3	66 ± 4	64 ± 4
IPOST+CYC A	73 ± 5	76 ± 2	65 ± 2	67 ± 4	59 ± 2	60 ± 3	62 ± 3

Tabelle 2.2: Hämodynamik (mittlerer arterieller Blutdruck)

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. N = 8 pro Gruppe. MAP = mittlerer arterieller Blutdruck, CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, IbTx = Iberiotoxin, ATRA = Atractylosid, CYC A = Cyclosporin A. Die Daten wurden am Ende der Baseline (= BL), vor (=PräCAO) und während (=CAO) der Koronarokklusion, unmittelbar zu Beginn der Reperfusion (=POST) sowie 60, 120 und 180 Min. nach Beginn der Reperfusion erhoben. *Signifikant (p<0,05) verschieden von BL, [§] signifikant (p<0,05) verschieden von CON.

In der Gruppe IPOST fand sich während der CAO und der ersten Stunde der Reperfusion eine erniedrigte Herzfrequenz, welche sich jedoch im Verlauf normalisierte. Ein veränderter mittlerer arterieller Blutdruck konnte hierbei nicht beobachtet werden. In der Gruppe NS1619 wurde vorübergehend eine erhöhte Herzfrequenz in der zweiten Stunde der Reperfusion gemessen werden, die in der nächsten Messung rückläufig war. In zwei Gruppen (CON, IbTx) zeigte sich während der Koronararterienokklusion ein verminderter mittlerer arterieller Blutdruck im Vergleich zur Baseline, der in allen Gruppen reversibel war. Mit Beginn der Postkonditionierung wurde in der Gruppe CYC A ein erniedrigter mittlerer arterieller Blutdruck gemessen.

3.2 Infarktgrößen

Untersuchungen zum BK_{Ca}

Die Infarktgröße (IS) der Kontrollgruppe CON betrug $47\pm 2\%$ (prozentualer Anteil der IS an der AAR). Mit einer IS von $47\pm 4\%$ unterschied sich die Gruppe, welche das Lösungsmittel DMSO erhielt, nicht von der Kontrollgruppe, ebenso wenig die Gruppe mit dem BK_{Ca}-Inhibitor Iberiotoxin (IbTx) mit $46\pm 5\%$. IPOST dagegen zeigte eine signifikante Infarktgrößenreduktion auf $19\pm 1\%$. Desgleichen führte die pharmakologische Aktivierung des BK_{Ca} mittels NS1619 zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße ($23\pm 4\%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombination von IPOST und NS1619 bewirkte ebenfalls eine signifikante Infarktgrößenreduktion ($24\pm 3\%$), allerdings keine zusätzlichen additiven Effekte gegenüber einer alleinigen Applikation von IPOST oder NS1619. In der Gruppe IPOST+IbTx wurde die Infarktgrößenreduktion durch IPOST durch die Zugabe von IbTx aufgehoben ($45\pm 4\%$).

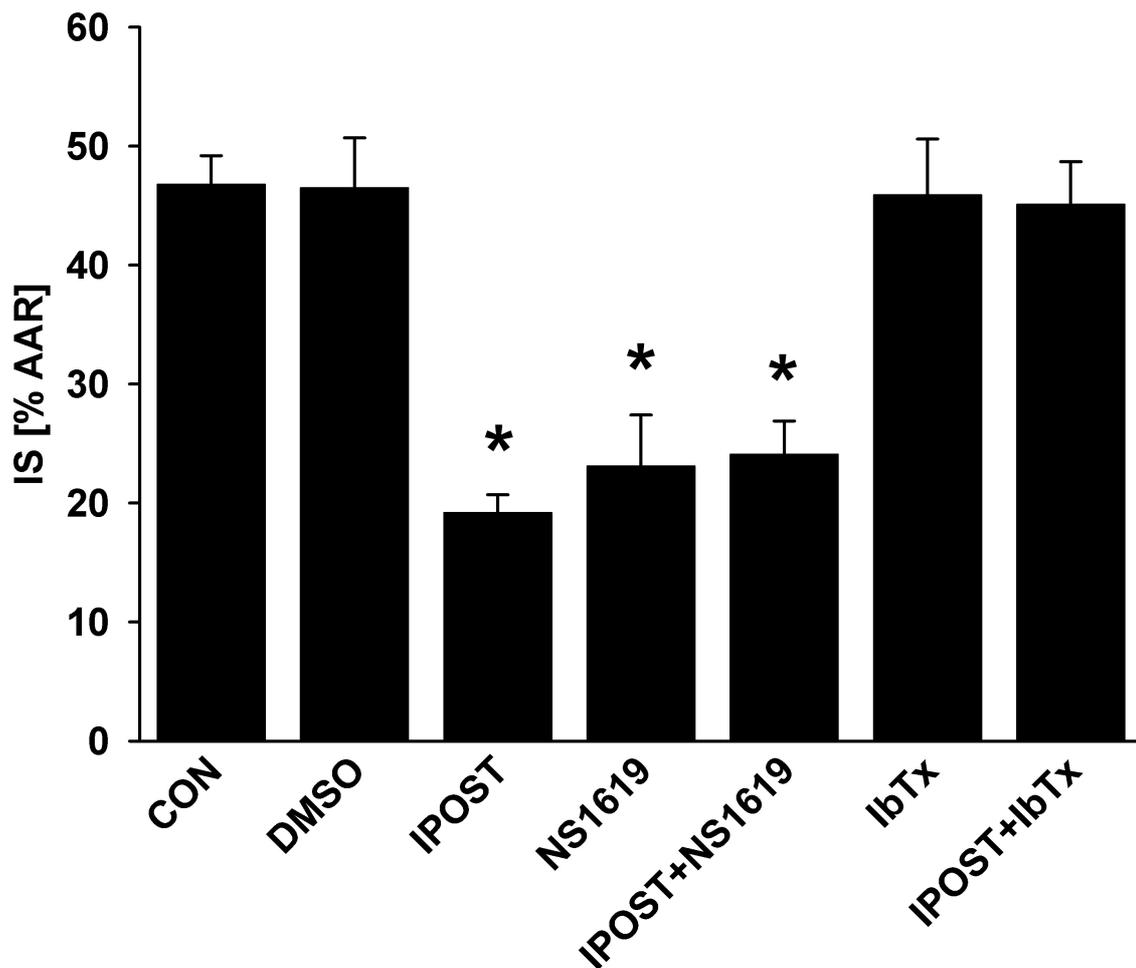


Abbildung 9: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals. Die Daten sind als Mittelwert±SEM angegeben. IS = Herzinfarktgröße, AAR = area at risk, CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, IbTx = Iberitoxin. *Signifikant verschieden ($p < 0,05$) von CON.

Untersuchungen zur mPTP

Die Öffnung der mPTP durch Atractyloside (ATRA) führte zu einer IS ($48 \pm 3\%$) auf Niveau der Kontrollgruppe. Die Effekte der IPOST wurden in der Gruppe IPOST+ATRA durch ATRA nivelliert ($46 \pm 6\%$). CYC A, ein Inhibitor der mPTP, welcher diese geschlossen hält, induzierte eine Infarktgrößenreduktion auf $19 \pm 3\%$. Ein ähnliches Niveau erreichte auch die Gruppe IPOST+CYC A mit $24 \pm 5\%$.

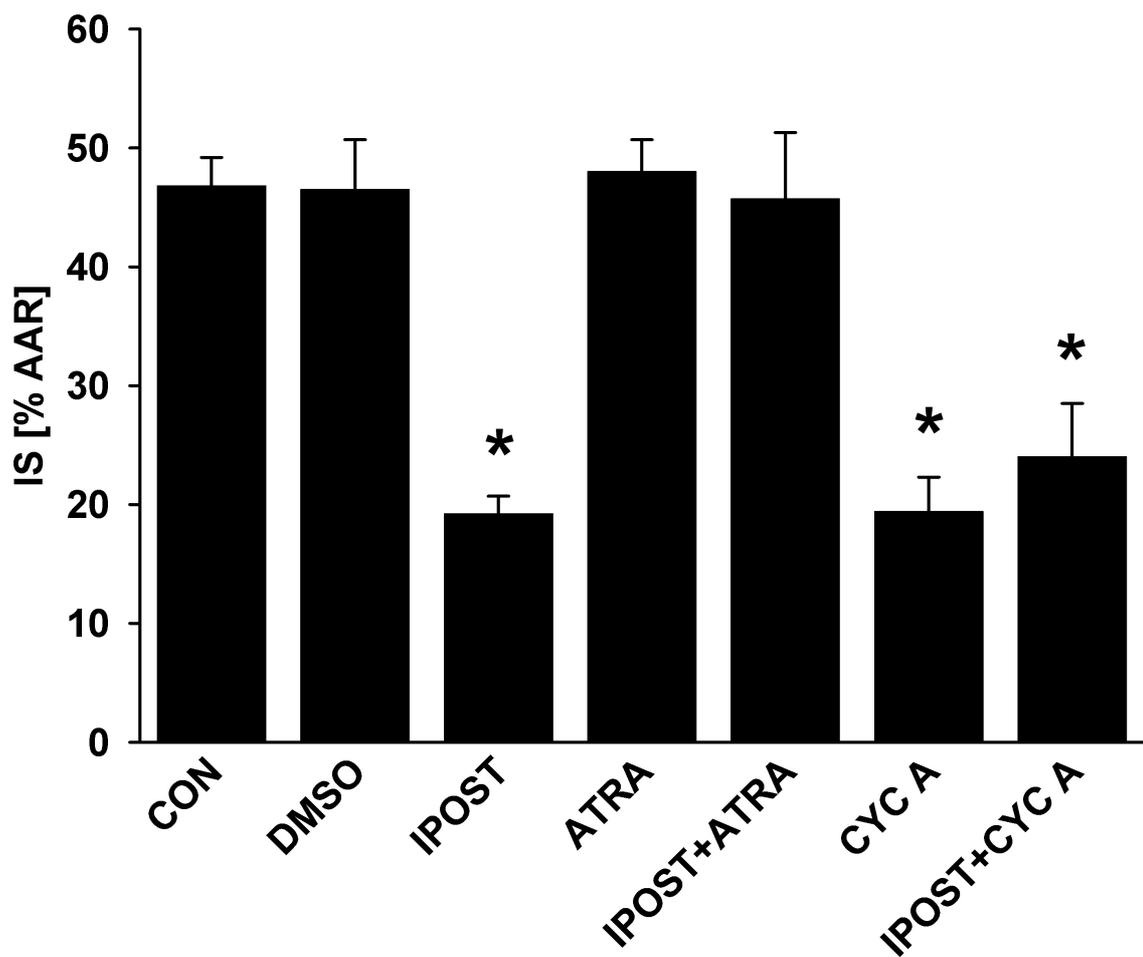


Abbildung 10: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals. Die Daten sind als Mittelwert±SEM angegeben. IS = Herzinfarktgröße, AAR = area at risk, CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, ATRA = Atractylosid, CYC A = Cyclosporin A. *Signifikant verschieden ($p < 0,05$) von CON. Die Daten der Versuchsgruppen CON, DMSO und IPOST sind die gleichen wie in Abbildung 9.

Untersuchungen zur Interaktion von BK_{Ca} und mPTP

Die Infarktgrößenreduktion durch NS1619 wurde in der Gruppe NS1619+ATRA durch ATRA nicht aufgehoben ($28 \pm 3\%$). NS1619+ATRA zeigte eine signifikante Infarktgrößenreduktion sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber ATRA.

Die Tiere der Versuchsgruppe IbTx+CYC A zeigten eine signifikante Reduktion der Herzinfarktgröße ($27 \pm 5\%$) gegenüber den Versuchsgruppen CON und IbTx.

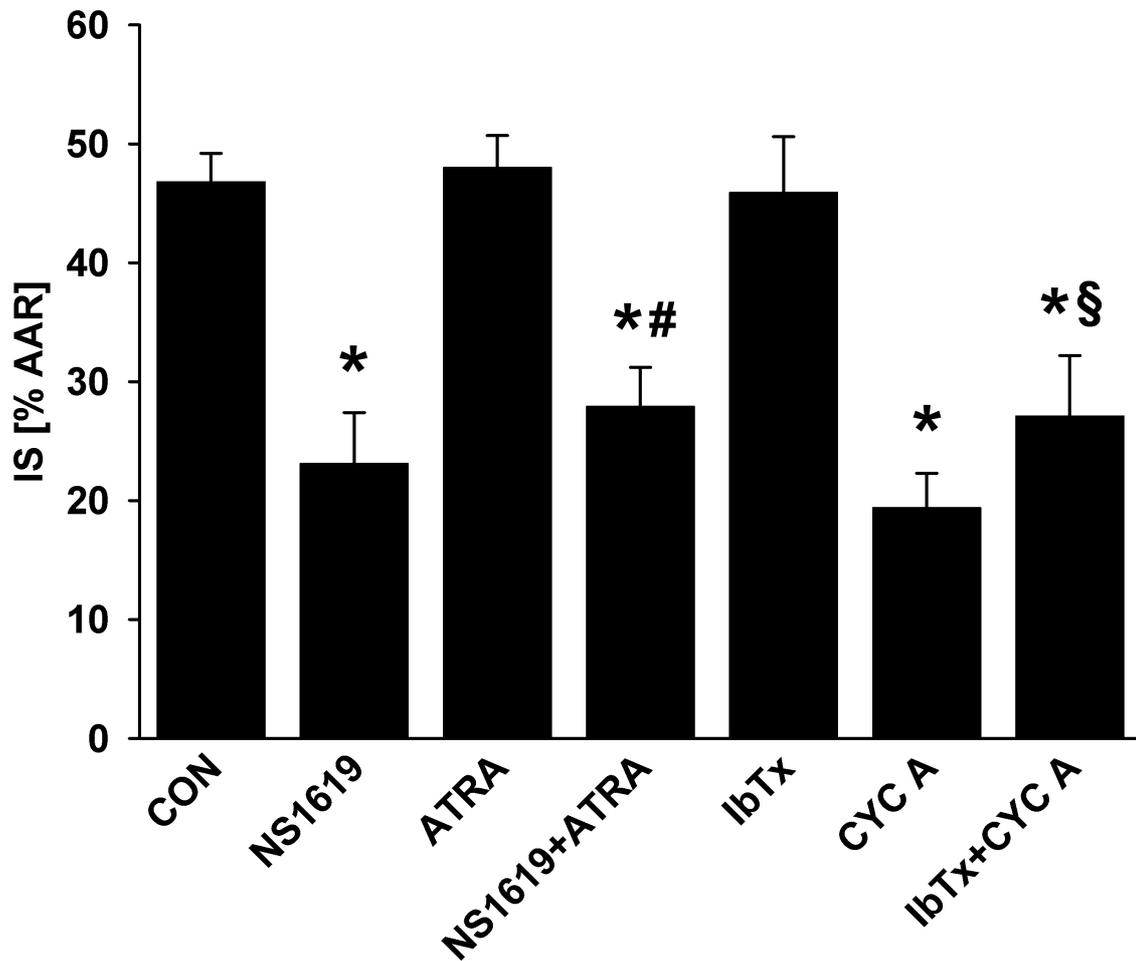


Abbildung 11: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals. Die Daten sind als Mittelwert±SEM angegeben. IS = Herzinfarktgröße, AAR = area at risk, CON = Kontrolle, DMSO = Dimethylsulfoxid, IPOST = Ischämische Postkonditionierung, IbTx = Iberiotoxin, ATRA = Atractylosid, CYC A = Cyclosporin A. *Signifikant verschieden ($p < 0,05$) von CON, # signifikant verschieden ($p < 0,05$) von ATRA, § signifikant verschieden ($p < 0,05$) von IbTx. Die Daten der Versuchsgruppen CON, NS1619, ATRA, IbTx und CYC A sind die gleichen wie in Abbildung 9 bzw. 10.

4 Diskussion

Das *in vivo*-Myokardinfarktmodell der Maus[70, 71, 75] stellt – neben *in vivo*-Verfahren an Hunden[22], Kaninchen[36] und Ratten[76] - ein etabliertes Verfahren im Forschungsfeld der Kardioprotektion, im Speziellen auch der IPOST, dar. Um kardioprotektive Effekte zu quantifizieren, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Infarktgröße und deren Reduktion als primäre Endpunkte definiert.

Herzinfarktgrößen

Die Kontrollgruppe und die Gruppe, welcher DMSO verabreicht wurde, unterschieden sich in ihrer Infarktgröße nicht signifikant. Es kann daher angenommen werden, dass DMSO in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Herzinfarktgröße nimmt. Parisi et al. konnten jedoch an Ratten zeigen, dass DMSO das Potential besitzt die Herzinfarktgröße zu reduzieren. Allerdings wurde dieser Effekt bei einer Vorbehandlung der Tiere mit DMSO über 3 Tage hergerufen. Die Applikation von DMSO 15 Minuten vor Beginn der Ischämiephase führte zu keiner signifikanten Infarktreduktion.[77] In der vorliegenden Arbeit wurde DMSO 10 Minuten vor dem Ende der CAO verabreicht. Somit kann spekuliert werden, dass DMSO nur dann eine organprotektive Wirkung entfalten kann, wenn eine ausreichend lange Exposition vorliegt.

IPOST reduzierte die Herzinfarktgröße signifikant. Bei einer Infarktgröße von $19\pm 1\%$ verglichen mit der Kontrollgruppe CON $47\pm 2\%$ liegt die effektive Infarktgrößenreduktion (als % der Kontrolle) bei -59%. In vergleichbaren Studien zur IPOST im *in vivo*-Myokardinfarktmodell der Maus wurden ebenfalls Infarktgrößenreduktionen beschrieben, die zwischen -25% und -61% rangieren.[37, 70, 71, 78-83] Die quantitativ unterschiedlich ausgeprägten kardioprotektiven Effekte sind am ehesten darauf zurück zu führen, dass kein einheitlicher Algorithmus für die IPOST vorliegt. So unterscheiden sich die Länge der CAO und der Reperfusion ebenso wie der

Applikationsmodus der IPOST. IPOST wird in Form von mehreren Zyklen abwechselnder kurzer Reperfusion- und Ischämieintervalle (R/I) zu Beginn der Reperfusionphase ausgeführt. Die Anzahl der Zyklen schwankt in Studien von 3 bis 6 Zyklen, die Intervalle von Reperfusion und Ischämie zwischen 5 und 60 Sekunden.[83] Kin et al. beschrieben, dass 3 Zyklen alternierender Reperfusion und Ischämie in der IPOST die Infarktgröße reduzieren, 6 Zyklen jedoch keinen zusätzlichen infarktgrößenreduzierenden Effekt erbrachten.[25] Allen Algorithmen gemeinsam ist die unmittelbare Applikation der IPOST zu Beginn der Reperfusion, da sich gezeigt hat, dass IPOST nur in den ersten 10 Minuten der Reperfusionphase effektiv ist[24].

Die Wirksamkeit von IPOST ist zudem abhängig vom zeitlichen Ausmaß der CAO. In einem murinen *in vivo*-Modell von Cai et al. konnte dargestellt werden, dass durch IPOST in Form von 3 Zyklen 10Sek/10Sek Reperfusion/Ischämie (R/I) kardioprotektive Wirkungen nur bei einer Dauer der CAO von 30 – 45 Minuten eintreten. Ab einer CAO von 60 Minuten war ein protektiver Effekt der IPOST nicht mehr nachweisbar.[84] Die Zeitintervalle von CAO und IPOST, welche kardioprotektiv wirkungsvoll sind unterscheiden sich zwischen den Spezies.[84, 85] Die in vorliegender Arbeit gewählten Zeiten von CAO, IPOST und Reperfusion entsprechen der Literatur.[83]

Der BK_{Ca}

In wissenschaftlichen Arbeiten zur Präkonditionierung wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} sowohl in der IPC als auch der APC zu einer Verminderung der Herzinfarktgrößen führt.[52, 53] Als selektiver Aktivator des BK_{Ca} wurde die Substanz NS1619, als Inhibitor Iberiotoxin beschrieben.[48]

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen nun erstmals in einem Postkonditionierungsmodell *in vivo*, dass durch eine Aktivierung des BK_{Ca} mittels NS1619 eine signifikante Verkleinerung der Herzinfarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden konnte. Wurde hingegen der BK_{Ca}-Inhibitor Iberiotoxin appliziert, so ergaben sich Infarktgrößen auf Niveau der Kontrollgruppe. Diese

Ergebnisse zeigen, dass ein aktivierter BK_{Ca} auch im Postkonditionierungsmodell kardioprotektiv wirksam ist.

In der Gruppe NS1619+IPOST minimierte sich die Infarktgröße ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Die Infarktgröße unterschied sich jedoch nicht signifikant von den Gruppen NS1619 und IPOST. Es traten somit keine additiven Effekte auf. Das legt die Vermutung nahe, dass über den aktivierten BK_{Ca} keine kardioprotektiven Kaskaden außerhalb des Signalweges der IPOST angestoßen werden. Der BK_{Ca} könnte somit in die Ablaufwege der IPOST eingebettet sein.

Demgegenüber bezweifelten Cancherini et al., dass das kardioprotektive Potential von NS1619 alleine auf eine Aktivierung des BK_{Ca} zurückzuführen ist.[86] In ihren *in vitro* Untersuchungen an isolierten Mitochondrien von Ratten berichteten sie, dass die Substanz NS1619 einen nicht-selektiven Ionentransport über die innere Mitochondrienmembran induziert, der weder über einen bestimmten Kanal noch einen spezifischen Transporter vermittelt wird. Danach würde NS1619 unabhängig vom BK_{Ca} kardioprotektiv wirksam sein.

Dass in der vorliegenden Arbeit die kardioprotektiven Effekte der IPOST durch Iberiotoxin aufgehoben wurden spricht jedoch für die Hypothese, dass der BK_{Ca} Bestandteil der Signalkette der IPOST ist. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnten Fretwell et al.[87] in ihrem *in vitro* Modell eine pharmakologische Postkonditionierung beschreiben, in der eine Aktivierung des Adenosin A1-Rezeptor eine Postkonditionierung hervorruft, die über eine Öffnung des BK_{Ca} vermittelt wird. Die Kardioprotektion wurde sowohl durch Iberiotoxin als auch durch Paxilline, einem weiteren Inhibitor des BK_{Ca} aufgehoben, was erneut für eine Beteiligung des BK_{Ca} an der Postkonditionierung spricht.

Die Diskrepanzen sind möglicherweise auf die sehr unterschiedlichen Methoden (z. B. *in vitro*- vs. *in vivo*-Modell) der einzelnen Studien zurück zu führen. Zudem fehlt der Studie von Cancherini et al. der Kontext von Ischämie und Reperfusion. Im Gegensatz dazu wurde in vorliegender Arbeit und der Studie von Fretwell et al. der BK_{Ca} in

Zusammenhang mit Ischämie/Reperfusion im *in vivo*-Modell bzw. mit Hypoxie/Reoxygenierung im *in vitro*-Modell betrachtet.

Die Selektivität von NS1619 für den BK_{Ca} wurde im Verlauf in Frage gestellt.[88] Daher benutzten Bentzen et al. eine für den BK_{Ca} selektivere Substanz – NS11021. Diese Forschungsgruppe lieferte erneut Daten, die dafür sprechen, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} zu einer Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens führt.[89]

Die mPTP

Die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP) wird als wesentlicher Endeffektor der Prä[59]- und Postkonditionierung[90] angesehen. Die Mechanismen der Kardioprotektion zielen darauf ab die mPTP in geschlossenem Zustand zu halten und somit eine Induktion des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes zu verhindern.

Cheng et al. zeigten in mehreren Arbeiten, dass möglicherweise eine Interaktion zwischen dem BK_{Ca} und der mPTP besteht. Diese ist dergestalt, dass eine Aktivierung des BK_{Ca}, die zu einer Öffnung des Ionenkanals und einem K⁺-Einstrom in die mitochondriale Matrix führt, die mPTP in geschlossenem Zustand hält.[51, 91, 92]

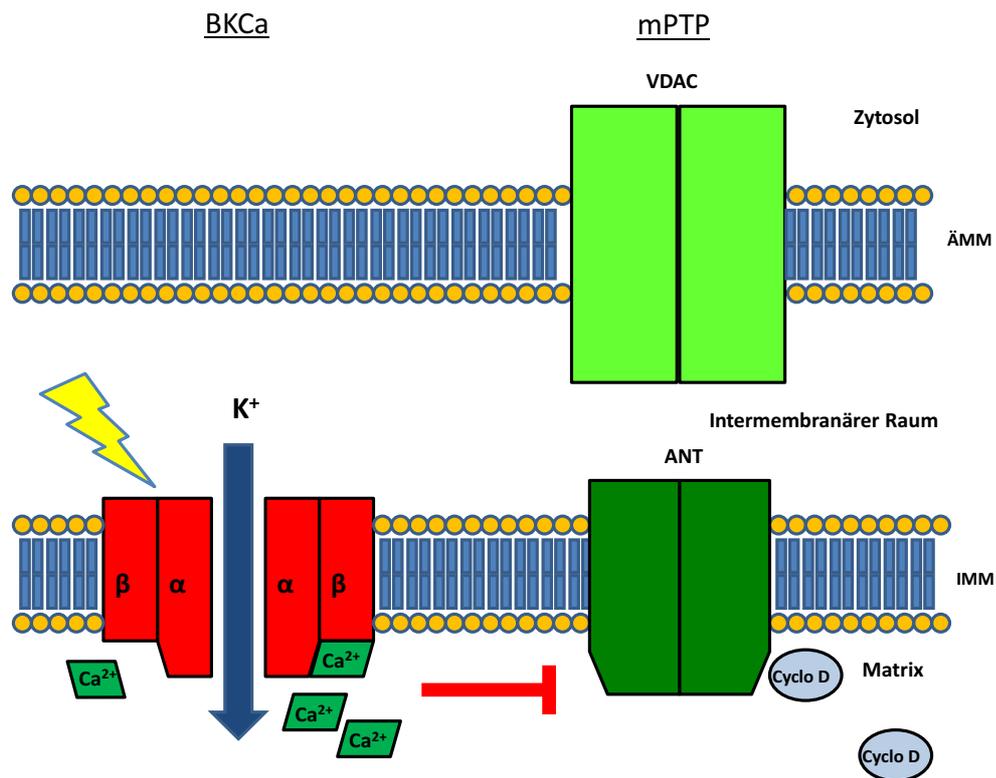


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Interaktion von BK_{Ca} und mPTP. Die Aktivierung des BK_{Ca} durch intrazellulären Calciumanstieg oder Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt dazu, dass die mPTP geschlossen bleibt.

In Übereinstimmung mit vielen weiteren Studien[93-97] konnte die kardioprotektive Wirkung von Cyclosporin A auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Cyclosporin A reduzierte die Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe signifikant. Die Kombination IPOST+CYC A führte zu keiner weiteren Infarktreduktion gegenüber IPOST oder CYC A. Dass sich keine additiven Effekte nachweisen ließen, spricht dafür, dass die mPTP in die Signalwege der IPOST integriert ist.

In der Gruppe des mPTP-Öffners ATRA wurden Infarktgrößen auf Niveau der Kontrollgruppe gemessen. Wurde der mPTP-Öffner ATRA mit IPOST kombiniert, so ergaben sich ebenfalls Infarktgrößen in Höhe der Kontrollgruppe. Es kann angenommen werden, dass ATRA die Wirkung der IPOST aufhob. In Kongruenz mit anderen Studien zur mPTP und IPOST ergibt sich weitere Evidenz für eine Beteiligung der mPTP an der IPOST.[90, 94]

Zusammenhänge zwischen BK_{Ca} und mPTP

Neben der Reduktion eines mitochondrialen Calciumüberschusses können aktivierte Kaliumkanäle wie der BK_{Ca} ihre kardioprotektive Wirkung beispielsweise dadurch entfalten, dass sie das mitochondriale Membranpotential stabilisieren und so einen frühzeitigen Kollaps desselben hinauszögern bzw. verhindern können.[98-100] Einer der wichtigsten Stabilisatoren des mitochondrialen Membranpotentials ist die mPTP. Diese Tatsache führt zur Vermutung, dass möglicherweise eine Verbindung zwischen einem aktivierten BK_{Ca} und einer geschlossenen mPTP besteht.[101]

An isolierten Herzen von Ratten konnten Cao et al.[52] in der IPC zeigen, dass die mPTP durch eine Aktivierung der BK_{Ca}-Kanäle in geschlossenem Zustand gehalten wird. Es wurde damit angenommen, dass die mPTP dem BK_{Ca} in der IPC nachgeschaltet ist. In der Studie wurden mit NS1619, Paxilline statt Iberiotoxin, Atractyloside und Cyclosporin A annähernd die gleichen Substanzen wie in vorliegender Arbeit verwendet. Um mögliche Zusammenhänge zwischen dem BK_{Ca} und der mPTP in der IPOST aufzuzeigen, wurden in der jetzigen Untersuchung Stimulatoren bzw. Inhibitoren sowohl des BK_{Ca} als auch der mPTP miteinander kombiniert.

In einer Signalkette ist der an letzter Stelle stehende Faktor, der sogenannte Endeffektor, der, welcher den entscheidenden Einfluss in der Signalkaskade nimmt und ein Ereignis hervorruft. Wird dieser beeinflusst, so werden Veränderungen hervorgerufen. Der Hypothese folgend, dass die mPTP dem BK_{Ca} in der Signalkaskade der IPOST nachgeschaltet ist, würde man bei einer Kombination aus IbTx und CYC A erwarten, dass die Effekte durch CYC A auf die mPTP als dem Endeffektor ausschlaggebend für die Infarktgröße sind und die antiprotektive Wirkung von IbTx aufgehoben wird. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Untersuchung in der Gruppe IbTx+CYC A eine signifikante Infarktgrößenreduktion gegenüber den Gruppen CON und IbTx nachgewiesen werden. Der Vergleich der Infarktgrößen zwischen IbTx+CYC A und IbTx zeigt, dass CYC A die Wirkung von IbTx aufgehoben hat. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass die mPTP dem BK_{Ca} nachgeschaltet ist.

Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Gao et al. unterstützt, in welcher ebenfalls die Auswirkungen von BK_{Ca} und mPTP auf die Infarktgröße durch Verwendung von pharmakologischen Stimuli und Inhibitoren untersucht wurde. CYC A induzierte eine signifikante Infarktgrößenreduktion gegenüber der Kontrollgruppe. Anstelle von Iberiotoxin wurde Paxilline verwendet, ebenfalls ein Inhibitor des BK_{Ca}. Paxilline führte zu Infarktgrößen auf Kontrollgruppenniveau. In der Kombination von CYC A und Paxilline zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion gegenüber Paxilline. Die Wirkung von Paxilline wurde durch Zusatz von CYC A aufgehoben. Umgekehrt bewirkte eine Aktivierung des BK_{Ca} durch NS1619 eine Verkleinerung der Infarktgröße, die in der Kombination von NS1619 und ATRA wieder aufgehoben wurde. Daraus wurde postuliert, dass BK_{Ca} und mPTP interagieren und der BK_{Ca} der mPTP in der Signalkette vorgeschaltet ist.[102]

Eine Abweichung gegenüber den Arbeiten von Cao[52] und Gao[102] fand sich in der vorliegenden Studie in der Gruppe NS1619+ATRA. Die durch NS1619 hervorgerufene Reduktion der Infarktgröße wurde durch die Zugabe von ATRA nicht aufgehoben. Die Gruppe NS1619+ATRA zeigte eine Herzinfarktgröße, die sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber ATRA signifikant verschieden war.

Möglicherweise ist dieses divergierende Ergebnis auf die unterschiedliche Methodik bzw. ein unterschiedliches experimentelles Protokoll zurückzuführen. Während in den Arbeiten von Cao[52] und Gao[102], welche beide an isolierten Herzen von Ratten durchgeführt wurden, die Applikation von NS1619 15 bzw. 10 Minuten vor Beginn der Ischämiephase durchgeführt wurde, wurde in der vorliegenden Studie NS1619 30 Minuten nach Beginn der Koronararterienokklusion und damit während der Ischämiephase verabreicht. Atractyloside wurde in allen Arbeiten zum Ende der Ischämiephase oder zu Beginn der Reperfusionphase gegeben. Es ist nicht ausgeschlossen, dass sich im vorliegenden Experiment die Wirkung von NS1619 durch die spätere Applikation während des Ischämieintervalls sowie einem engen, zeitlichen Zusammenhang zur Atractyloside-Gabe, stärker entfaltete als in den beiden anderen Protokollen.

Ein anderer Grund für die Infarktreaktion der Gruppe NS1619+ATRA könnte eine zu gering gewählte Dosis Atractyloside sein. Die in der Studie gewählte Menge an ATRA findet sich jedoch auch in der Literatur des *in vivo*-Modells der Maus.[103]

Wie bereits oben beschrieben stellten Cancherini et al. in Frage, ob die Substanz NS1619 nicht auch unabhängig vom BK_{Ca} kardioprotektive Wirksamkeit besitzt.[86] So könnte die Infarktreaktion von NS1619+ATRA auf zusätzliche Effekte von NS1619 zurückzuführen sein.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Beteiligung des BK_{Ca} an der IPOST und dafür, dass die mPTP dem BK_{Ca} in der Signalkaskade der IPOST nachgeschaltet ist. Zusätzliche kardioprotektive Effekte durch einen aktivierten BK_{Ca}, die unabhängig von der Einflussnahme auf die mPTP sind, können jedoch nicht ausgeschlossen werden und bedürfen weiterer Studien.

Einflussfaktoren auf die Herzinfarktgröße

Die Mäuse wurden hinsichtlich unerwünschter Einflussfaktoren auf die Infarktgrößen beobachtet. So können beispielsweise Veränderungen in der Hämodynamik oder unterschiedlich große Risikoareale (AAR) die Infarktgröße beeinträchtigen. Es ist bekannt, dass eine größere AAR zu einer größeren IS führt.[104] Daher ist es notwendig, dass in etwa gleich große ischämisch betroffene Areale vorliegen, um die Infarktgrößen miteinander vergleichen zu können. In der vorliegenden Untersuchung wiesen die Risikoareale in ihrer Größe keine signifikanten Unterschiede zueinander auf, sodass die Infarktgrößen hiervon nicht wesentlich beeinflusst wurden.

Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck nehmen unmittelbar Einfluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch und somit die myokardiale O₂-Bilanz. Zum einen geht eine Herzfrequenzsteigerung, die das Herzminutenvolumen anheben soll, immer zu Lasten einer verkürzten Diastole. Damit einher geht eine Verminderung der diastolischen Koronarperfusion. Zum anderen garantiert der Blutdruck die suffiziente

Perfusion der Koronarien. Veränderungen der Herzfrequenz und des Blutdrucks können Ergebnisse im Forschungsfeld der Kardioprotektion beeinflussen.

In der Auswertung der vorliegenden hämodynamischen Daten zeigten sich zu Beginn der Untersuchung in der Baseline weder in der Herzfrequenz noch dem mittleren arteriellen Blutdruck signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die hämodynamischen Voraussetzungen zu Beginn der Experimente waren in allen Gruppen gleich.

Im Verlauf der Untersuchung fanden sich in zwei Gruppen (IPOST, NS1619) Veränderungen in der Herzfrequenz, die sich in der nächsten Frequenzmessung reversibel zeigten. Bedingt durch die Koronararterienokklusion wurde in drei Gruppen (CON, DMSO, IbTx) ein verminderter mittlerer arterieller Blutdruck gemessen. Dieser normalisierte sich in allen Gruppen mit Beginn der Reperfusion. Bei insgesamt gleichen hämodynamischen Bedingungen zu Beginn der Versuchsreihen und einzelnen, kurzzeitigen und im Verlauf reversiblen Veränderungen in Herzfrequenz und Blutdruck ist am ehesten davon auszugehen, dass die Hämodynamik die Infarktgrößen in den vorliegenden Untersuchungen nicht beeinflusste.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die bisher vermutete wichtige Rolle, die dem BK_{Ca} in der Kardioprotektion zukommt. Sie zeigen, dass der BK_{Ca} auch an der Signaltransduktionskaskade der ischämischen Postkonditionierung beteiligt ist und liefern weitere Evidenz für die mPTP als einem der wichtigsten Endeffektoren der Kardioprotektion.

Klinische Relevanz

Mit voranschreitender Entschlüsselung protektiver Mechanismen und Signalwege ergeben sich weitere Interventionsmöglichkeiten um das Myokard vor I/R-Schaden zu schützen. Mit der Erforschung der Postkonditionierung ist die Hoffnung verbunden in

der klinischen Arbeit nach einem ischämischen Ereignis die Funktionsfähigkeit des Herzens aufrecht zu erhalten und damit die Mortalitätsrate zu senken.

Der STEMI wird in Deutschland in der Mehrzahl der Fälle mittels primärer PCI in therapeutischer Absicht behandelt.[105] Das Setzen kurzer ischämischer Phasen mittels Herzkatheter in der Reperfusionphase, nach Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes, könnte womöglich – im Sinne der ischämischen Postkonditionierung - die Infarktgröße des Ischämieareals reduzieren und damit die Funktionsfähigkeit des Herzens vermehrt erhalten, denn die Größe des Infarktes nach einer Myokardischämie bestimmt die Prognose wesentlich.[7, 8]

Bisher gestaltete sich die Umsetzung der organprotektiven Grundlagenforschung in die klinisch-praktische Anwendung als schwierig. Die beeindruckenden Infarktgrößenreduktionen, wie sie in experimentellen Studien regelmäßig festzustellen waren, konnten bisher in den wenigen klinischen Studien nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Limitation für die klinische Umsetzung ist das meist hohe Alter der Patienten verglichen mit den jungen Tieren in den experimentellen Untersuchungen. Es wird vermutet, dass mit zunehmendem Alter die Wirksamkeit kardioprotektiver Effekte abnimmt, unter anderem aufgrund von altersbedingten Veränderungen bei der Expression von Proteinen.[106] Zudem sind die Versuchstiere in den meisten Fällen gesund, während Herzinfarktpatienten oftmals multimorbide sind. Komorbiditäten wie beispielsweise arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus beeinträchtigen die Kardioprotektion.[107] Medikamente haben ebenfalls Einfluss auf die Kardioprotektion. Während es Diskussionen über den negativen Einfluss von Sulfonylharnstoffen auf die Kardioprotektion gibt[108], sind viele Patienten bereits mit Medikamenten wie β -Blockern, ACE-Inhibitoren, Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten, Statinen oder Thrombozyten-hemmenden Medikamenten versorgt, welche das Herz schützen.[109]

Dennoch gab es in den letzten Jahren auch vielversprechende erste klinische Studien. Staat et al.[110] haben in einer multizentrischen, randomisiert-kontrollierten, klinischen Studie eine ischämische Postkonditionierung am Menschen erfolgreich

durchgeführt. In die Studie eingeschlossen waren 30 Patienten, die sich mit einem STEMI vorstellten und durch PTCA therapiert wurden. Die ischämische Postkonditionierung wurde nach einer Minute Reperfusion begonnen und durch vier Zyklen von je einer Minute Okklusion durch den Ballon und einer Minute Reperfusion hervorgerufen. Die Infarktgröße wurde anhand von freigesetzter Kreatinkinase (CK) quantitativ im Blut bestimmt. Die Gruppe, welche postkonditioniert wurde, zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine Infarktreduktion von 36%. Allerdings wurden die Patienten nur über die ersten 3 Tage nach der Intervention beobachtet. Klinische Ergebnisse über langfristige Effekte konnte diese Studie nicht liefern.

Diese Lücke wurde von der gleichen Gruppe einige Jahre später in einer weiteren Studie geschlossen. Das Studiendesign war ähnlich, nur wurden diesmal die Infarktgrößen der Kontrollgruppe und der postkonditionierten Gruppe auch nach einem halben Jahr bestimmt. Die Messung erfolgte mittels SPECT und zeigte eine Infarktgrößenreduktion der postkonditionierten Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Ein Jahr nach dem Infarkt ereignis zeigte die postkonditionierte Gruppe in einer durchgeführten Echokardiographie eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion gegenüber der Kontrolle. Damit konnte ein langfristiger Nutzen durch ischämische Postkonditionierung dokumentiert werden.[111]

Inwiefern sich die ischämische Postkonditionierung in die klinische Kardioprotektion integrieren lässt werden weitere Studien an größeren Fallzahlen zeigen.

5 Zusammenfassung

Ischämische Postkonditionierung beschreibt in der Kardioprotektion ein Phänomen bei dem kurze Wechsel von Reperfusion und Ischämie zu Beginn der Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes dazu führen den Ischämie/Reperfusionsschaden zu begrenzen. Verschiedene Kaliumkanäle in der inneren mitochondrialen Membran sind in aktiviertem Zustand an der Kardioprotektion durch Konditionierung beteiligt. Die Rolle des Calcium-aktivierten Kalium-Kanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) in der ischämischen Postkonditionierung wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass die ischämische Postkonditionierung durch den BK_{Ca} vermittelt wird. Derzeit wird die mPTP als wichtigster Endeffektor der Kardioprotektion in Prä- und Postkonditionierung beschrieben. Als weitere Hypothese wurde überprüft, ob die mPTP dem BK_{Ca} in der Signalvermittlung der ischämischen Postkonditionierung nachgeschaltet ist.

Die Experimente wurden an einem etablierten *in-vivo*-Myokardinfarktmodell der Maus durchgeführt. Männliche C57BL6-Mäuse wurden randomisiert auf 13 verschiedene Gruppen verteilt. In den einzelnen Gruppen wurden IPOST sowie Aktivatoren und Inhibitoren von BK_{Ca} und mPTP in verschiedensten Kombinationen verabreicht. Es wurden die Infarktgrößen in den Gruppen bestimmt und miteinander verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass der BK_{Ca} an der Kardioprotektion durch IPOST beteiligt ist. Die Blockade des BK_{Ca} hob die Effekte der IPOST auf. Auch die mPTP ist an der IPOST beteiligt. Durch Öffnung der mPTP mittels Atractyloside wurde die IPOST aufgehoben. Trotz der Blockade des BK_{Ca} durch Iberiotoxin führte CYC A in der Kombination IbTx+CYC A zur Infarktgrößenreduktion. In der Gruppe NS1619+ATRA fand sich eine Infarktgrößenreduktion gegenüber CON und ATRA.

Insgesamt zeigt sich, dass IPOST kardioprotektiv ist und über BK_{Ca} und mPTP vermittelt wird. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann eine mögliche Interaktion von BK_{Ca} und mPTP nicht abschließend beurteilt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt, S.:
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt.psm!>
2. McGovern, P.G., et al., *Recent trends in acute coronary heart disease--mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators.* N Engl J Med, 1996. **334**(14): p. 884-90.
3. van Domburg, R.T., et al., *Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(1): p. 15-20.
4. *Guidelines on myocardial revascularization.* European Heart Journal, 2010. **31**: p. 2501-2555.
5. Andersen, H.R., et al., *A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction.* N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 733-42.
6. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials.* Lancet, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
7. Halkin, A., et al., *Prognostic implications of creatine kinase elevation after primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(5): p. 951-61.
8. Nienhuis, M.B., et al., *Prognostic importance of creatine kinase and creatine kinase-MB after primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction.* Am Heart J, 2008. **155**(4): p. 673-9.
9. Burns, R.J., et al., *The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(1): p. 30-6.
10. Terkelsen, C.J., et al., *System delay and mortality among patients with STEMI treated with primary percutaneous coronary intervention.* JAMA, 2010. **304**(7): p. 763-71.
11. Zahn, R., et al., *Impact of prehospital delay on mortality in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty and intravenous thrombolysis.* Am Heart J, 2001. **142**(1): p. 105-11.
12. Dracup, K., et al., *A randomized clinical trial to reduce patient prehospital delay to treatment in acute coronary syndrome.* Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2009. **2**(6): p. 524-32.
13. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial Reperfusion Injury.* New England Journal of Medicine, 2007. **357**(11): p. 1121-1135.
14. Yellon, D.M. and G.F. Baxter, *Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?* Heart, 2000. **83**(4): p. 381-7.
15. Ly, H.Q., et al., *A pilot study: the Noninvasive Surface Cooling Thermoregulatory System for Mild Hypothermia Induction in Acute Myocardial Infarction (the NICAMI Study).* Am Heart J, 2005. **150**(5): p. 933.
16. Patti, G., et al., *Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial.* J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(12): p. 1272-8.
17. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II).* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.

18. Kloner, R.A., et al., *Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial*. Eur Heart J, 2006. **27**(20): p. 2400-5.
19. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
20. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. Anesthesiology, 1997. **87**(2): p. 361-70.
21. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J. Clin. Invest, 1985. **76**: p. 1713-1719.
22. Zhao, Z.Q., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2003. **285**: p. H579-H588.
23. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 230-2.
24. Yang, X.M., et al., *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1103-10.
25. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p. 74-85.
26. Hausenloy, D.J., *Signalling pathways in ischaemic postconditioning*. Thromb. Haemost., 2009. **101**: p. 626-634.
27. Vinten-Johansen, J. and W. Shi, *Perconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 260-6.
28. Philipp, S., et al., *Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 308-14.
29. Penna, C., et al., *Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(1): p. 168-77.
30. Xi, L., et al., *Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice*. Circulation, 2008. **118**(14 Suppl): p. S32-7.
31. Zatta, A.J., et al., *Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1444-51.
32. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
33. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
34. Cross, T.G., et al., *Serine/threonine protein kinases and apoptosis*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 34-41.
35. Erhardt, P., E.J. Schremser, and G.M. Cooper, *B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5308-15.

36. You, L., et al., *Postconditioning reduces infarct size and cardiac myocyte apoptosis via the opioid receptor and JAK-STAT signaling pathway*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(1): p. 437-43.
37. Boengler, K., et al., *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 131-5.
38. Boengler, K., et al., *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure*. Pharmacol Ther, 2008. **120**(2): p. 172-85.
39. Grover, G.J., et al., *Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **251**(1): p. 98-104.
40. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, *Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs*. Circ Res, 1992. **70**(2): p. 223-33.
41. Auchampach, J.A., G.J. Grover, and G.J. Gross, *Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(11): p. 1054-62.
42. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection*. Circ Res, 1997. **81**(6): p. 1072-82.
43. Garlid, K.D., et al., *The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8796-9.
44. Sato, T., et al., *Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2418-23.
45. Akao, M., Y. Teshima, and E. Marban, *Antiapoptotic effect of nicorandil mediated by mitochondrial atp-sensitive potassium channels in cultured cardiac myocytes*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(4): p. 803-10.
46. Toller, W.G., et al., *Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection*. Anesthesiology, 2000. **92**(6): p. 1731-9.
47. Mykytenko, J., et al., *Persistent beneficial effect of postconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 472-84.
48. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
49. Gribkoff, V.K., et al., *Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(1): p. 206-17.
50. Wang, X., et al., *Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(5): p. H2070-7.
51. Cheng, Y., G. Debska-Vielhaber, and D. Siemen, *Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore*. FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 2005-12.
52. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 644-50.
53. Redel, A., et al., *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning*. Anesth Analg, 2008. **106**(2): p. 384-91, table of contents.
54. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(2): p. 69-75.

55. Di Lisa, F., et al., *Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(4): p. 235-41.
56. Halestrap, A.P., *A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 841-60.
57. Jennings, R.B. and C.E. Ganote, *Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury*. Circ Res, 1976. **38**(5 Suppl 1): p. 180-91.
58. Murphy, E., *Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 7-16.
59. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
60. Hausenloy, D.J., S.B. Ong, and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(2): p. 189-202.
61. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 11-21.
62. Abou-Sleiman, P.M., M.M. Muqit, and N.W. Wood, *Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(3): p. 207-19.
63. Miura, T., M. Nishihara, and T. Miki, *Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: role of GSK-3beta in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury*. J Pharmacol Sci, 2009. **109**(2): p. 162-7.
64. Liu, L., et al., *Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A*. Acta Anaesthesiol Scand, 2011. **55**(5): p. 622-30.
65. Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
66. Woodfield, K., et al., *Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition*. Biochem J, 1998. **336 (Pt 2)**: p. 287-90.
67. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307 (Pt 1)**: p. 93-8.
68. Pain, T., et al., *Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 460-6.
69. Cohen, M.V., et al., *Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 273-8.
70. Bouhidel, O., et al., *Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(4): p. H1580-6.
71. Redel, A., et al., *Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(10): p. 1186-91.
72. Eckle, T., et al., *Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2533-40.
73. Eckle, T., M. Koeppen, and H. Eltzschig, *Use of a hanging weight system for coronary artery occlusion in mice*. J Vis Exp, 2011(50).
74. Candia, S., M.L. Garcia, and R. Latorre, *Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K+ channel*. Biophys J, 1992. **63**(2): p. 583-90.

75. Gomez, L., et al., *Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion.* Circulation, 2008. **117**(21): p. 2761-8.
76. Guo, H.T., et al., *Endogenous kappa-Opioid Peptide Mediates the Cardioprotection Induced by Ischemic Postconditioning.* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **58**(2): p. 207-15.
77. Parisi, A., et al., *Protective effect of dimethyl sulfoxide on acute myocardial infarction in rats.* J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(1): p. 106-9.
78. Heusch, G., et al., *No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice.* Basic Res Cardiol, 2006. **101**(4): p. 354-6.
79. Kaljusto, M.L., et al., *Postconditioning in rats and mice.* Scand Cardiovasc J, 2006. **40**(6): p. 334-41.
80. Lim, S.Y., et al., *Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore.* Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 530-5.
81. Tsutsumi, Y.M., et al., *Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization.* Life Sci, 2007. **81**(15): p. 1223-7.
82. Gomez, L., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1654-61.
83. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms.* Basic Res Cardiol, 2009. **104**(5): p. 469-83.
84. Cai, M., et al., *Endothelial NOS activity and myocardial oxygen metabolism define the salvageable ischemic time window for ischemic postconditioning.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(3): p. H1069-77.
85. Manintveld, O.C., et al., *Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1551-60.
86. Cancherini, D.V., B.B. Queliconi, and A.J. Kowaltowski, *Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K+ channel activity in isolated heart mitochondria.* Cardiovasc Res, 2007. **73**(4): p. 720-8.
87. Fretwell, L. and J.M. Dickenson, *Role of large-conductance Ca(2+)-activated K+ channels in adenosine A(1) receptor-mediated pharmacological postconditioning in H9c2 cells.* Can J Physiol Pharmacol, 2011. **89**(1): p. 24-30.
88. Park, W.S., et al., *The mitochondrial Ca2+-activated K+ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca2+ channels in rat ventricular myocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(1): p. 31-6.
89. Bentzen, B.H., et al., *Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury.* Pflugers Arch, 2009. **457**(5): p. 979-88.
90. Argaud, L., et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition.* Circulation, 2005. **111**(2): p. 194-7.
91. Cheng, Y., et al., *Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore.* Cell Physiol Biochem, 2008. **22**(1-4): p. 127-36.
92. Cheng, Y., E. Gulbins, and D. Siemen, *Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel.* Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(3-4): p. 191-200.
93. Halestrap, A.P., et al., *Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury.* Mol Cell Biochem, 1997. **174**(1-2): p. 167-72.
94. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.* J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.

95. Nazareth, W., N. Yafei, and M. Crompton, *Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A*. J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(12): p. 1351-4.
96. Griffiths, E.J., et al., *Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels*. Cell Calcium, 2000. **27**(2): p. 87-95.
97. Piot, C., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N. Engl. J. Med., 2008. **359**: p. 473-481.
98. Kang, S.H., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H307-13.
99. Heinen, A., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C148-56.
100. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 198-203.
101. Katragadda, D., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids limit damage to mitochondrial function following stress in cardiac cells*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 867-75.
102. Gao, Q., et al., *The mitochondrial permeability transition pore and the Ca²⁺-activated K⁺ channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor- α* . Cytokine, 2005. **32**(5): p. 199-205.
103. Wang, G., et al., *Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H1290-5.
104. Ytrehus, K., et al., *Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing*. The American journal of physiology, 1994. **267**(6 Pt 2): p. H2383-90.
105. Widimsky, P., et al., *Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries*. Eur Heart J, 2010. **31**(8): p. 943-57.
106. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Loss of cardioprotection with ageing*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 247-61.
107. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic*. Lancet, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
108. Meier, J.J., et al., *Is impairment of ischaemic preconditioning by sulfonylurea drugs clinically important?* Heart, 2004. **90**(1): p. 9-12.
109. Mochly-Rosen, D. and K.V. Grimes, *Myocardial salvage in acute myocardial infarction--challenges in clinical translation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 451-3.
110. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
111. Thibault, H., *Long-term benefit of postconditioning*. Circulation, 2008. **117**: p. 1037-1044.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Versuchsprotokoll von Murry et al.[19]

Abbildung 2: Mechanismen der IPOST (modifiziert nach Vinten-Johansen et al.[27])

Abbildung 3: Hausenloy et al.[32]

Abbildung 4: Schematische Darstellung des BK_{Ca}

Abbildung 5: Schematische Darstellung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) aus Abou-Sleiman et al.[62]

Abbildung 6: Crompton et al.[61] Beteiligung der mPTP an Nekrose und Apoptose bei Ischämie/Reperfusion

Abbildung 7: Zwei Schnitte des linken Ventrikels nach Färbung mit EvansBlue und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

Abbildung 8: Experimentelles Protokoll

Abbildung 9: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals

Abbildung 10: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals

Abbildung 11: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Interaktion von BK_{Ca} und mPTP

Tabelle 1: Gravimetrie und Planimetrie

Tabelle 2.1: Hämodynamik (Herzfrequenz)

Tabelle 2.2: Hämodynamik (mittlerer arterieller Blutdruck)

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Markus Lange für die Überlassung des Themas sowie die angenehme, engagierte und produktive Arbeit in der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ herzlich danken.

Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Norbert Roewer für die Möglichkeit in seiner Klinik experimentell-wissenschaftlich zu forschen.

Mein außerordentlicher und herzlichster Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Jan Stumpner. Sein Engagement und Enthusiasmus für die Forschung haben mich beeindruckt und geprägt. Ich danke für die intensive, kompetente und freundschaftliche Zusammenarbeit. Er hat mich immer konstruktiv unterstützt und an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt.

Danken möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ für die gute Zusammenarbeit in einem Team, in welchem eine Atmosphäre von Freude, wissenschaftlicher Begeisterung und Kollegialität zu erfolgreicher Arbeit führt.

Schließlich hätte diese Arbeit nicht ohne die Unterstützung meiner Familie, insbesondere meiner Eltern und meines Bruders, entstehen können. Ich danke meinen Eltern von Herzen, die mir mein Studium und damit die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Johannes Richl
Geburtsdatum	02. Juli 1984
Geburtsort	Schweinfurt

Ausbildung

1995 – 2004	E.T.A. Hoffmann-Gymnasium, Bamberg; Abitur
2004 – 2011	Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
09/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2007 – 06/2008	Studium der Medizin an der Umeå University, Schweden

Stipendien

2006 – 2011	Stipendiat des Cusanuswerks
2007 – 2008	Partnerschaftsstipendium der Universität Würzburg für zwei Semester an der Umeå University, Schweden
2010	Partnerschaftsstipendium der Universität Würzburg für ein Tertial am Bugando Medical Centre, Mwanza, Tansania

Beruflicher Werdegang

Seit 01.12.2011	Assistenzarzt in der Inneren Medizin II der Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden, Direktor: Prof. Dr. med. C. Ell
-----------------	---

Mainz, 07. Februar 2014

Johannes Richl