

Aus dem Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler)
und dem Zentrum der Inneren Medizin Abteilung Kardiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Zeiher)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main

**EINFLUSS VON GLIMEPIRID VERSUS GLIBENCLAMID IN KOMBINATION MIT DEM
KALIUMKANALÖFFNER RILMAKALIM AUF DIE KONTRAKTILITÄT UND DIE VITALITÄT
ISOLIERTER HERZMUSKELZELLEN DES MEERSCHWEINCHENS**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Marcus Müller aus Bad Homburg

Frankfurt am Main 1999

Dekan:	Prof. Dr. G. von Jagow
Referent:	Prof. Dr. Dr. E. Mutschler
1. Koreferent	PD Dr. H.G. Ollbrich
2. Koreferent	Prof. Dr. Dr. G. Geislinger

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Fragestellung.....	3
2	METHODEN	5
2.1	Materialien und Geräte	5
2.1.1	<i>Lösungen</i>	5
2.1.2	<i>Substanzen</i>	7
2.1.3	<i>Geräte</i>	8
2.2	Tierpräparation, Herzisolation	8
2.3	Zellisolierung.....	10
2.4	Durchführung der kardiomyozytären Kontraktilitätsbestimmung	11
2.4.1	<i>Analyse der kardiomyozytären Kontraktilität</i>	14
2.5	Bestimmung der Wirkung von Glibenclamid und Glimepirid auf die Vitalität von Kardiomyozyten.....	17
2.5.1	<i>Entwicklung einer Stimulationskammer</i>	19
2.6	Statistik	22
3	ERGEBNISSE.....	23
3.1	Zellausbeute.....	23
3.2	Ergebnisse der Kontraktilitätsbestimmungen	23
3.2.1	<i>Beeinflussung der Kontraktilität durch Rilmakalim</i>	23
3.2.2	<i>Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid bzw. Glimepirid in Kombination mit Rilmakalim</i>	26
3.2.3	<i>Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid bzw. Glimepirid</i>	28
3.3	Effekt der Sulfonylharnstoffe und Rilmakalim auf die Zellvitalität.....	30
4	DISKUSSION.....	33
4.1	Diskussion der Kontraktilitätsergebnisse	34
4.1.1	<i>Beeinflussung der kardiomyozytären Kontraktilität durch Rilmakalim</i>	35
4.1.2	<i>Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid und Glimepirid</i>	38
4.1.3	<i>Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid und Glimepirid in Verbindung mit Rilmakalim</i>	41
4.2	Effekt der Sulfonylharnstoffe und Rilmakalim auf die Zellvitalität.....	45
4.3	Schlußfolgerungen.....	46
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	47
6	LITERATUR	48
7	ANHANG.....	59
7.1	Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse	59
7.1.1	<i>Kontraktilitätsbestimmung</i>	59
7.1.1.1	Dosis-Wirkungskurve Rilmakalim (RK).....	59
7.1.1.2	Sulfonylharnstoffe	59
7.1.1.3	Sulfonylharnstoffe in Kombination mit Rilmakalim.....	60
7.1.2	<i>Cell-Injury-Index der LDH-Bestimmung</i>	61
7.2	Schaltplan der Stimulationskammer-Steuerungselektronik.....	62

Abkürzungen

Die hier alphabetisch aufgelisteten Abkürzungen werden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Konzentration, die 50% des Effekts hervorruft
GC	Glibenclamid
GP	Glimepirid
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
IC	integrated circuit
K ⁺ _{ATP}	Adenosintriphosphat-abhängiger Kaliumkanal
KRH	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus
p	Signifikanzniveau
RIA	Radio-immuno-assay
RK	Rilmakalim
SEM	standard error of the mean

1 Einleitung

Seitdem in den letzten Jahren die blutzuckersenkende Wirkung einiger Sulfonamid-Derivate beobachtet wurde und 1955 das erste orale Antidiabetikum in der medikamentösen Therapie eingeführt wurde, sind orale Antidiabetika wie der Sulfonylharnstoff Glibenclamid zu wesentlichen Medikamenten in der Behandlung des nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus (NIDDM) geworden. Ein Jahresumsatz laut Arzneiverordnungsreport 1998 von ca. 190 Mio. DM bei über 450 Mio. verordneten Tagesdosen überstreichet den Stellenwert der Sulfonylharnstoffe. Sie sind die häufigst verschriebene orale Medikation bei nicht insulinpflichtigem Diabetes mellitus, wobei bereits vor 25 Jahren davon ausgegangen werden mußte, daß die Einnahme dieser Medikamente in Verbindung mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems zu beträchtlichen Nebenwirkungen führen kann (University Group Diabetes Program 1970, Kannel et al 1979, Stamler et al. 1993, Pogátsa 1995). Von diesem Makel konnten die Sulfonylharnstoffe erst kürzlich freigesprochen werden (UKPDS 33, 1998). Nichtsdestoweniger werden mögliche Effekte der Sulfonylharnstoffe auf das kardiovaskuläre System auf die gleichen Wirkmechanismen zurückgeführt, die auch für ihre blutzuckersenkende Wirkung verantwortlich gemacht werden, nämlich die Blockade eines ATP-abhängigen Kaliumkanals (Noma et al. 1985, Ashcroft 1990).

1983 wurde von Akinori Noma ein Kaliumkanal in der Kardiomyozytenmembran beschrieben, der sich durch Erhöhung des intrazellulären ATP-Spiegels schließen ließ (Noma et al. 1983). In den folgenden Jahren konnte dieser ATP-abhängige Kaliumkanal in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, daß der Zustand des K^+_{ATP} -Kanals nicht nur durch den ATP-Spiegel der Zelle beeinflusst wird, sondern auch eine Vielzahl weiterer intrazellulärer Parameter einer komplexen Regulation unterliegt (Ashcroft et al. 1990, Nichols et al. 1991). Die Funktion des K^+_{ATP} -Kanals scheint jedoch immer eine ähnliche zu sein: Eine Kopplung von elektrischer Aktivität einer Zelle mit deren bioenergetischem Zellmetabolismus.

Durch Öffnung kardiomyozytärer K^+_{ATP} -Kanäle des Sarkolemms kommt es zu einer Verkürzung der Plateauphase des Aktionspotentials. Dies vermindert die Kontraktilität des Myokards und führt damit zu einem geringeren ATP-Verbrauch (Noma et al. 1983). Unter ischaemischen Bedingungen kann sich dieser geringere ATP-Verbrauch günstig auswirken. Zentrale Bedeutung hat die Funktion des K^+_{ATP} -Kanals auch im Rahmen des sogenannten

Ischämischen Präkonditionierung des Myokards. Dies bezeichnet die Eigenschaft eines Gewebes, nach vorausgegangene leichte ischämische Perioden eine folgende schwere Ischämie mit geringerem Schaden zu überstehen. Die Ischämische Präkonditionierung wurde erstmals von Murry et al. 1986 beschrieben. Diese untersuchten beim Hund Modelle der experimentellen Koronarligatur des Ramus circumflexus der linken Herzkranzarterie. Bei einem Teil der Versuchstiere wurde vor einer 40minütigen Koronarokklusion iermak nacheinander kurzfristig der Ramus circumflexus unterbunden. In ieser Gruppe ließ sich, verglichen mit den icht präkonditionierten Kontrolltieren, eine mehr als 75%ige Verringerung des Infarktareals zeigen. Die Ischämische Präkonditionierung unterliegt dem Einfluß vomyokardialen, euronalen sowie vaskulären Faktoren (Losano 1997). Zu den myokardialen Faktoren zählt am ad Öffnen der K^+ _{ATP}-Kanäle, uter anderem durch einen erniedrigten intrazellulären ATP-Spiegel. Die Ischämische Präkonditionierung kann rch den Einsatz von K^+ _{ATP}-Öffnern imitiert sowie durch dn Einsatz von K^+ _{ATP}-Kanalblockern, zu denen auch die Sulfonylharnstoffe gehören ist, gehemmt werden.

1996 wurde in Deutschland die Substanz Glimperid (HOE490 - Amaryl[®]) ür die Indikation des Diabetes mellitus zugelassen. Mit dieser Substanz steht neuerdings ein Sulfonylharnstoffderivat zur Verfügung, as im Vergleich mit anderen Sulfonylharnstoffderivaten über ein günstigeres kardiovaskuläres Nebenwirkungsprofil ifiermodell verfügt. Obwohl Glimperid im Vergleich zu älteren Sulfonylharnstoffderivaten en Blutzuckerspiegel deutlicher senkt (Geisen et al. 1988), hat es geringere Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System. Koronarer Blutfluß, koronarer Gefäßwiderstand undmyokardialer Energieverbrauch werden urch Glimperid geringer beeinflusst als durch Glibenclamid (Ballagi-Pordány et al. 1992, Geisen et al. 1996). Die unterschiedlichen Wirkungen ieser Sulfonylharnstoffderivate auf das kardiovaskuläre System wurden der geringeren Hemmung des K^+ _{ATP}-Kanals durch Glimperid zugeschrieben (Geisen et al. 1996).

Bisherige Studien versuchten ed Einfluß vo K^+ _{ATP}-Kanal-Öffnern auf die Kontraktilität isolierter tierischer Herzmuskelzellen. Es konnte gezeigt werden, daßLevcromakalim, ein K^+ _{ATP}-Kanal-öffnendes Benzopyranderivat, traktilitätsmindernd wirkt. Dieser Effekt konnte durch Glibenclamid aufgehoben werden (Jiang et al. 1994). In welchem Ausmaß et Effekt eines K^+ _{ATP}-Kanal-Öffners auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten rch Glimperid gehemmt wird, ist bisher unbekannt. Ungeklärt st auch ie Frage, iob d

Beeinflussung der Kontraktilität von Herzmuskelzellen durch K_{ATP}^+ -Kanal-Öffner und Sulfonylharnstoffderivate Auswirkungen auf deren Vitalität hat.

1.1 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand von Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten folgende Fragestellungen bearbeitet :

Inwieweit beeinflusst der K_{ATP}^+ -Kanalöffner Rilmakalim die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten ?

- Inwieweit beeinflussen Glibenclamid und Glimepirid die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten ?
- Welche Wirkungen haben Glibenclamid und Glimepirid auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten in Anwesenheit des K_{ATP}^+ -Kanalöffners Rilmakalim ?
- Welche Wirkungen haben Glibenclamid, Glimepirid und Rilmakalim auf die Vitalität von Kardiomyozyten ?

Das in-vitro-Modell der isolierten Kardiomyozyten, welches zur Bearbeitung der aufgeführten Fragestellungen verwandt wurde, bietet die Möglichkeit, die Wirkung von Substanzen auf das Myokard zu studieren, ohne vaskuläre, neurale und hormonale Einflüsse berücksichtigen zu müssen. Die Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf K_{ATP}^+ -Kanäle über Bestimmung der Kontraktilität an isolierten Kardiomyozyten durchzuführen, ist insofern sinnvoll, als durch die Beeinflussung des K_{ATP}^+ -Kanals eine Änderung der Membranpolarisation der Zelle erreicht wird. Diese führt zu Veränderungen des intrazellulären Calcium-Haushaltes, welcher wiederum entscheidend für die Zellkontraktion ist.

Als K_{ATP}^+ -Kanalöffner wurde neben dem jeweiligen Sulfonylharnstoff Rilmakalim (HOE234) eingesetzt, um feststellen zu können, in welchem Maße Glibenclamid und Glimepirid in verschiedenen Konzentrationen die durch Rilmakalim hervorgerufenen Änderungen der d

Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinflussen. Die Wirkung von Rilmakalim (HOE234) auf die Kontraktilität der Zellen wurde anhand einer Dosiswirkungskurve bestimmt.

Rilmakalim ist ein K^+ _{ATP}-Kanalöffner der Benzopyran-Gruppe und ähnelt in seiner Struktur den gut untersuchten K^+ _{ATP}-Kanal öffnenden Substanzen Cromakalim bzw. Levromakalim (Jiang et al. 1994).

Zur Bestimmung des Einflusses der jeweiligen Substanzen auf die Vitalität der Kardiomyozyten wurde nach einer definierten Stimulationszeit aus einer Zellsuspension mit einer festgelegten Anzahl von Zellen die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen, um den Einfluß der jeweiligen Substanz auf das Überleben der Kardiomyozyten zu erfassen. Laktatdehydrogenase ist ein bewährter Marker zur quantitativen Bestimmung des Zelltodes in Zellkulturen (Kretzmer et al. 1992).

2 Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Zur Durchführung der beschriebenen Methoden wurden folgende Lösungen, Substanzen, Geräte und Bauteile verwendet.

2.1.1 Lösungen

KREBS-RINGER-HEPES-PUFFER (KRH)

Glucose	5,5	µmol
HEPES-Puffer	10	µmol
Kaliumchlorid	2,6	µmol
Kaliumdihydrogenphosphat	1,2	µmol
Magnesiumsulfat	1,2	mmol
Natriumchlorid	125	mmol
Pyruvat	5	µmol

KOLLAGENASELÖSUNG

BSA (RIA-Grade)	0,1	%	(bovines Serumalbumin)
Calciumchlorid	25	µmol	
Kollagenase	0,06	%	

gelöst in KRH-Puffer

CALCIUM-STANDARDLÖSUNG (1 MMOL)

Calciumchlorid	1	mmol
----------------	---	------

gelöst in KRH-Puffer und eingestellt auf pH 7,4

CALCIUM-STAMMLÖSUNG (25 MMOL)

Calciumchlorid	25	mmol
----------------	----	------

gelöst in KRH-Puffer

ZENTRIFUGENLÖSUNG

Calciumchlorid	25	µmol
----------------	----	------

gelöst in KRH-Puffer

BSA-1 Lösung

BSA	1	%
-----	---	---

gelöst in Kollagenaselösung

BSA-2 Lösung

BSA	1	%
Calciumchlorid	50	µmol

gelöst in KRH-Puffer

Glibenclamid-Stammlösung

Glibenclamid	1	mmol
--------------	---	------

gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Glimepirid-Stammlösung

Glimepirid	1	mmol
------------	---	------

gelöst in DMSO

Rilmakalim-Stammlösung

Rilmakalim	1	mmol
------------	---	------

gelöst in DMSO

Außer den aufgeführten Stammlösungen wurden alle Lösungen zu Beginn eines Versuchstages frisch angesetzt.

Die jeweiligen Stammlösungen der Substanzen Glibenclamid, Glimepirid und Rilmakalim wurden mit Calcium-Standardlösung verdünnt, so daß die gewünschte Konzentration (0,01 µmol - 9 µmol) entsprechend der Versuchsreihe erreicht wurde.

2.1.2 Substanzen

Folgende Substanzen wurden zum Ansetzen der Lösungen verwendet:

BSA	Serva, 69115 Heidelberg
BSA (RIA-grade)	Sigma, 82041 Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, 64271 Darmstadt
DMSO	Fluka Chemie, CH-9470 Buchs
Glucose	Merck, 64271 Darmstadt
HEPES-Puffer	Sigma, 82041 Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, 64271 Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, 64271 Darmstadt
Kollagenase	Waco Chemicals GmbH, 41468 Neuss
Magnesiumsulfat	Merck, 64271 Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, 64271 Darmstadt
Pyruvat	Sigma, 82041 Deisenhofen
Glibenclamid	Hoechst AG, 65931 Frankfurt a. M.
Glimepirid	Hoechst AG, 65931 Frankfurt a. M.
Rilmakalim	Hoechst AG, 65931 Frankfurt a. M.

2.1.3 Geräte

Folgende Geräte wurden zur Durchführung der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Absaugpumpe	Ismatec MS4 Reglo 6-100, CH-8152 Glattbrugg
Analysenautomat	BM/Hitachi 917, 68259 Mannheim
Bildanalysesystem	Quantimet 520, Cambridge Instruments, Cambridge, UK
Bildverarbeitungskarte	ITX-VS100-AT, Imaging Technologies, Woburn, USA
Heizspannungsquelle	Voltcraft Labornetzgerät TNG30, Conrad Elektronik, 92240 Hirschau
Mikroskop	Nikon-Diaphot TMD Inverted Microscope Instruments S.A., 85630 Grasbrunn
Objektiv	Nikon Fluor 10 Ph1 DI Instruments S.A., 85630 Grasbrunn
Petrischalen	35/10 Greiner, 72636 Frickenhausen
pH-Meter	Schott CG 825, Fischer oHG, 60487 Frankfurt
Schlauchpumpe	RCT E-25, Reichelt Chemie Technik, 69126 Heidelberg
Stimulator	Stimulator II HSE, Hugo Sachs Elektronik, 79232 March
Thermometer	YSI Yellow Springs Instruments Mod. 49TA Dr. Schlag, 51429 Bergisch Gladbach
Videokamera	Philips Netherlands
Wasserbad	Thermomix 1440, Braun AG, 34212 Melsungen
Zentrifuge	Heraeus Christ Minifuge GL, 63457 Hanau
Zentrifugenröhrchen	16-100 PS, Greiner, 72636 Frickenhausen
Silikonschläuche	Labokron, Fischer oHG, 60487 Frankfurt

2.2 Tierpräparation, Herzisolation

Die Untersuchungen wurden an isolierten Herzmuskelzellen von adulten Meerschweinchen (Gewicht ca. 300) männlichen Geschlechts durchgeführt. Die Tiere wurden vor der Präparation mit Äther narkotisiert. Um einen frühzeitigen Atemstillstand aufgrund der atemdepressiven Wirkung des Äthers rechtzeitig erkennen zu können, wurden die Tiere überwacht. Nach Eintritt der Narkose wurde mittels Schmerzprobe am Ohr des Tieres die ausreichende Narkosetiefe überprüft.

Anschließend erfolgte das Durchtrennen von Karotiden, Halswirbelsäule und Rückenmark sowie die Fixation auf einem Sektionstisch. Es wurde nun mit einem Schnitt entlang der Rektusscheide das Abdomen bis zum Processus xyphoideus des Sternums eröffnet. Es folgte die Eröffnung des Brustkorbes durch einen horizontalen Einschnitt an der Diaphragma, das Durchtrennen der Rippen in der hinteren Axillarlinie und schließlich das Entfernen der Thoraxwand einschließlich des Sternums. Das nun frei zugängliche Herz-Lungenpaket wurde aus dem Thorax gelöst und sofort mit eiskalter Krebs-Ringer-Lösung umspült.

Im Anschluß erfolgte das Entfernen der Lungen vom Herzen sowie die Darstellung der hinter dem Thymus gelegenen Aorta. Letztere wurde tangential in der ascendierenden Part durchtrennt und mit Hilfe eines Kunststoffadapters kanüliert. Dabei war zu beachten, daß die Spitze des Adapters sich oberhalb der Aortenklappe befand, um eine Perfusion des Myokards über die Koronararterien zu gewährleisten.

Das kanülierte Herz wurde nun über die Koronararterien manuell mit einer heparinisierten Krebs-Ringer-HEPES-Pufferlösung gespült, um eine Entblutung der Koronargefäße zu erreichen. Auf diese Weise wurde die Bildung von intrakoronaren Thromben verhindert, und die Lage des Perfusionsadapters verifiziert. Seine korrekte Lage zeigte sich durch ein Ablassen der Koronarien.

2.3 Zellisolierung

Die Technik der Zellisolierung beruht auf einem enzymatischen Digestionsvorgang, in dessen Verlauf die bindegewebigen Strukturen des Interstitiums aufgelöst werden.

Die Isolierung der Kardiomyozyten erfolgte mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsapparatur, an die das katheterisierte Herz angeschlossen wurde. Das Herz wurde zunächst über fünf Minuten mit 37°C warmer Pufferlösung in freiem Kreislauf perfundiert. Daraufhin wurde die Pufferlösung durch eine Kollagenase-Lösung ersetzt und der Perfusionskreislauf geschlossen. Das Herz wurde nun über einen Zeitraum von 25 Minuten perfundiert, wobei jeweils nach 10 Minuten je 15 µl Calcium-Stammlösung (25 mmolar) zugegeben wurden. Es folgte die Zerkleinerung des Herzens mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells in einer Petrischale.

Das so gewonnene Material wurde in ein Becherglas mit BSA-1-Lösung/Kollagenase-Lösung überführt und der Trennungsvorgang des Gewebes durch Verwirbelung mit Sauerstoff gefördert. Im Anschluß wurde die Zellsuspension durch ein Nylonsieb in Zentrifugenröhrchen gefiltert und mit Zentrifugenlösung versetzt. Nach zweifacher Zentrifugation der Zellen für 90 Sekunden bei 25 g (400 rpm) und Austausch des Überstandes durchlief die Zellsuspension ein Trennmedium (BSA2), um intakte und geschädigte Zellen voneinander zu trennen. Bei diesem Trennungsvorgang sedimentierten intakte stabchenförmige Myozyten aufgrund ihrer höheren Dichte rascher auf den Boden als geschädigte aufgerundete Zellen. Die hieraus erhaltene Zellsuspension wurde noch einmal in Pufferlösung versetzt und für 90 Sekunden zentrifugiert. Anschließend konnten die Zellen für die jeweiligen Versuche auf entsprechende Petrischalen bzw. Titrierplatten verteilt werden.

2.4 Durchführung der kardiomyozytären Kontraktilitätsbestimmung

Die zur Kontraktilitätsbestimmung vorgesehenen Zellen wurden auf mit Pufferlösung gefüllte Petrischälchen aufgetragen. Sie wurden für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Haften der Kardiomyozyten am Schälchenboden zu ermöglichen. Das Haften der Kardiomyozyten gewährleistet, daß kriechende Zellen ihren Standort nicht ändern, was für die Bestimmung der Kontraktilität als Bildanalyse-System wesentlich ist. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in das Petrischälchen eine Stimulationselektrode eingebracht, die mit einem Stimulator verbunden wurde.

Um eine konstante Versuchstemperatur zu erreichen wurde ein Heizring, bestehend aus ca. 50 Windungen eines 300 µm dicken lackierten Kupferdrahtes konstruiert, der in eine Plastikhülle eingebettet wurde. Der Durchmesser des Heizringes wurde so bemessen, daß ein direkter Kontakt mit der Wandung des Petrischälchens gewährleistet war.

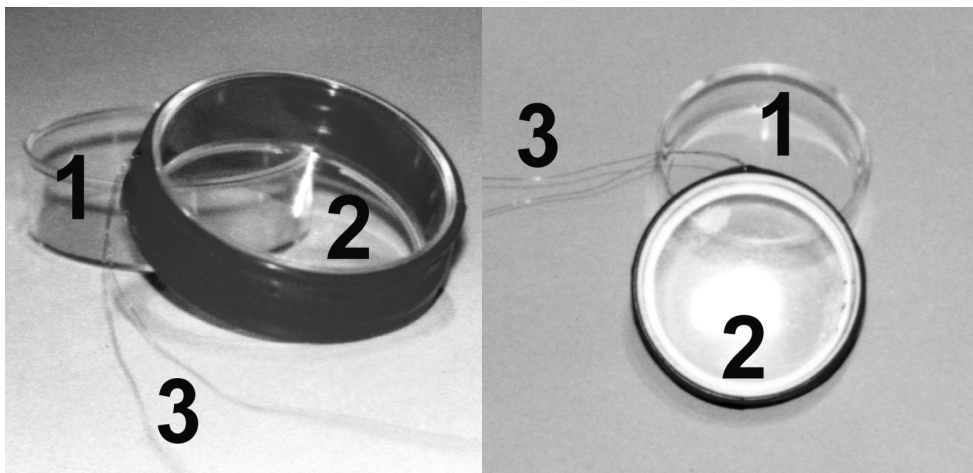


Abb. 1 : Heizspule, die um ein Petrischälchen herum angebracht wurde. Nach Beendigung des Versuches konnte die Heizspule problemlos entfernt und um das folgende Versuchsschälchen herum angebracht werden. Petrischälchen ohne Heizspule (1), Heizspule an Petrischälchen anliegend (2), Anschlußdrähte der Heizspule an ein Netzgerät (3)

Mit Hilfe eines regelbaren Netzgerätes wurde der Heizring mit Strom versorgt. Durch kontinuierliche Temperaturüberwachung mit einem Digitalthermometer konnte eine konstante Versuchstemperatur von 35°C eingehalten werden.

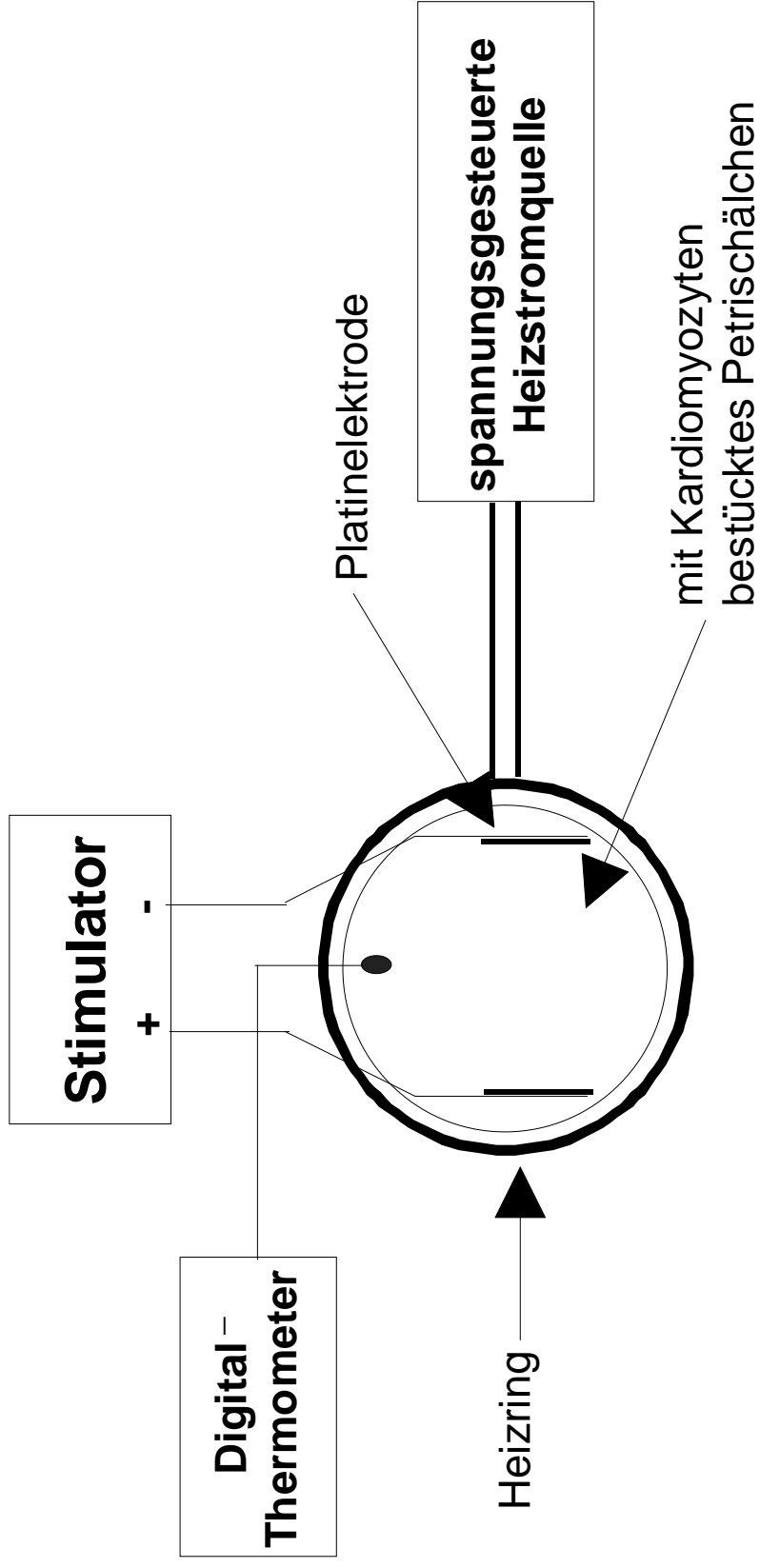


Abb. 2: Schematische Skizzierung des Versuchsaufbaus unter dem Mikroskop zur Bestimmung der Kontraktibilität der Kardiomyozyten unter Konstanzhaltung der Temperatur

Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop wurde eine morphologisch intakt erscheinende Zelle fokussiert, die nun über den Zeitraum von drei Minuten mit einer Frequenz von 100,5 Hz stimuliert wurde. Als morphologisch intakt galten stäbchenförmige Zellen, deren Querstreifung deutlich zu erkennen war. Die Konturen der Zellen dürfen nicht abgerundet erscheinen - dies hätte auf ein intrazelluläres Ödem hingedeutet - und ein Ansprechen der Zelle auf eine Probe-Stimulation mußte gegeben sein.

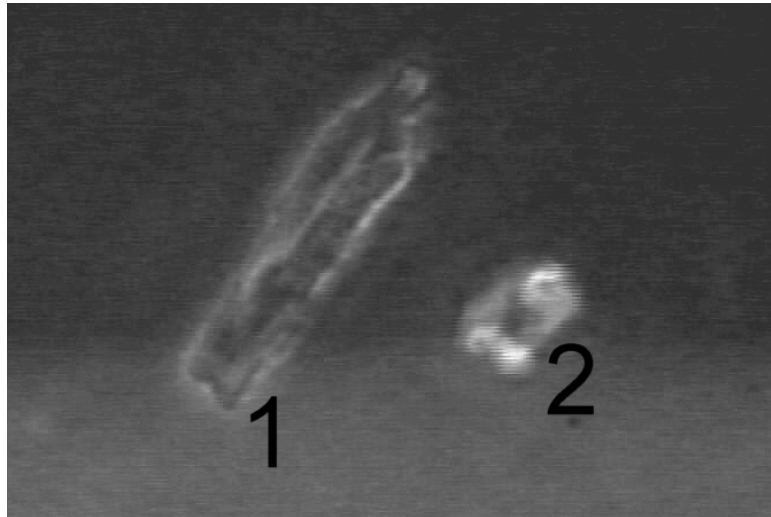


Abb. 3: Standbild der Videoaufzeichnung zur Bestimmung der kardialen Kontraktilität. Vitaler Kardiomyozyt, geeignet zur Kontraktilitätsbestimmung (1); avitaler, aufgerundeter Kardiomyozyt, der auf Elektrostimulation nicht reagiert (2)

Zur Bestimmung der kardiomyozytären Kontraktilität wurde das Phasenkontrastbild der einzelnen kontrahierenden Zelle mit Hilfe einer an das Mikroskop gekoppelten Videokamera über den Zeitraum von drei Minuten ab Stimulationsbeginn mit einem VHS-Videorecorder aufgezeichnet. Am Ende dieser Stimulationsphase wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten die Pufferlösung gegen versuchsspezifische Substratmedium ersetzt. Um den Lösungswechsel möglichst vollständig durchzuführen, wurde das Petrischälchen, welches ein Volumen von 2 ml hatte, mit ca. 10 ml Versuchsmedium gespült. Wichtig war es, während des Spülvorganges einen gewissen Flüssigkeitspegel im Schälchen nicht zu überschreiten, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Sämtliche Versuchslösungen wurden vor ihrem Einsatz in einem Wasserbad auf 35° C erwärmt, um Temperaturschwankungen vorzubeugen. Dem Spülvorgang mit dem Versuchsmedium folgend wurde derselbe Kardiomyozyt erneut für drei Minuten stimuliert und dessen Kontraktionen aufgezeichnet.

Es folgte wiederum ein Spülvorgang, diesmal die Pufferlösung, um das Substrat herauszuwaschen. Hier wurde großzügig mit ca. 20l gespült. Es folgte erneut eine dreiminütige Stimulation und Aufzeichnung der Zelle.

2.4.1 Analyse der kardiomyozytären Kontraktilität

Die Videoaufzeichnung des kontrahierenden Kardiomyozyten wurde über eine Bildverarbeitungskarte mit 6 Bit (64 Graustufen) Tiefe digitalisiert. Von einem in der Phase der Relaxation gespeicherten Bild wurden alle folgenden Bilder in Echtzeit (Videofrequenz - 25 Hz) subtrahiert. Das so gewonnene Bild zeigte die Differenz zwischen dem aktuellen und dem zuvor in relaxiertem Zustand gespeicherten Bild, d.h. an Stellen, an denen sich die Grauwerte im aktuellen relativ zum gespeicherten Bild änderten, erschienen im sonst schwarzen Differenzbild helle Bereiche. Die Änderungen der Graustufen während der Kontraktion entstanden sowohl durch Flächenänderungen der Zelloberfläche, als auch durch Änderungen der Zelldicke. Helle Bereiche im Differenzbild korrelierten mit der Zellbewegung und wurden als Maß für letztere verwendet.

Um die kardiomyozytäre Kontraktilität einer Zeitachse zuordnen zu können, wurde das Differenzbild analog in das Bildanalysesystem Quantimet 520 transferiert und dort wiederum digitalisiert (8 Bit, 256 Graustufen). Mit diesem Bildanalysesystem war es möglich, alle Bildpunkte, deren Graustufe über einem vorher festgelegten Grenzwert lagen, in ein Binärbild zu übertragen. Die Pixel dieses Binärbildes konnten mit einer Frequenz von 8,4Hz bestimmt und somit der Zeit zugeordnet werden. Die Pixelwerte gegen die Zeit aufgetragen ergaben eine Kontraktionskurve, die der kardiomyozytären Kontraktilität entsprach. Um Hintergrundschwankungen zu eliminieren, die durch das Bandrauschen der minimalen Veränderungen des Fokus verursacht werden konnten, wurde ein gleitendes Minimum über sieben benachbarte Werte gebildet und dieses von den Originalwerten abgezogen. Es zeigte sich, daß die mathematische Elimination der Hintergrundschwankungen keinen Einfluß auf die Kontraktionsamplitude hatte.

Um nun jeder Messung einen absoluten Wert der Kontraktilität zuordnen zu können, wurden die jeweils fünf höchsten Kontraktionsamplituden gemittelt. Der gemittelte Wert dieser fünf

höchsten Amplituden stellte die Kontraktilität einer Messung in μm dar. Die Bestimmung der Kontraktilität über das Mittel der fünf maximale Kontraktionsamplituden war sinnvoll und notwendig, da aufgrund der Meßfrequenz von 800 Hz jede Zellkontraktion in ihrem Kontraktionsmaximum bestimmt werden konnte. Es ergab sich eine periodische Amplitudenschwankung. Wurde jedoch aus den maximalen Kontraktionsamplituden ein Mittelwert gebildet, so korrespondiert diese Größe „Kontraktilität“ die Meßpunkte zugeordnet werden, die der maximalen Zellkontraktion entsprachen.

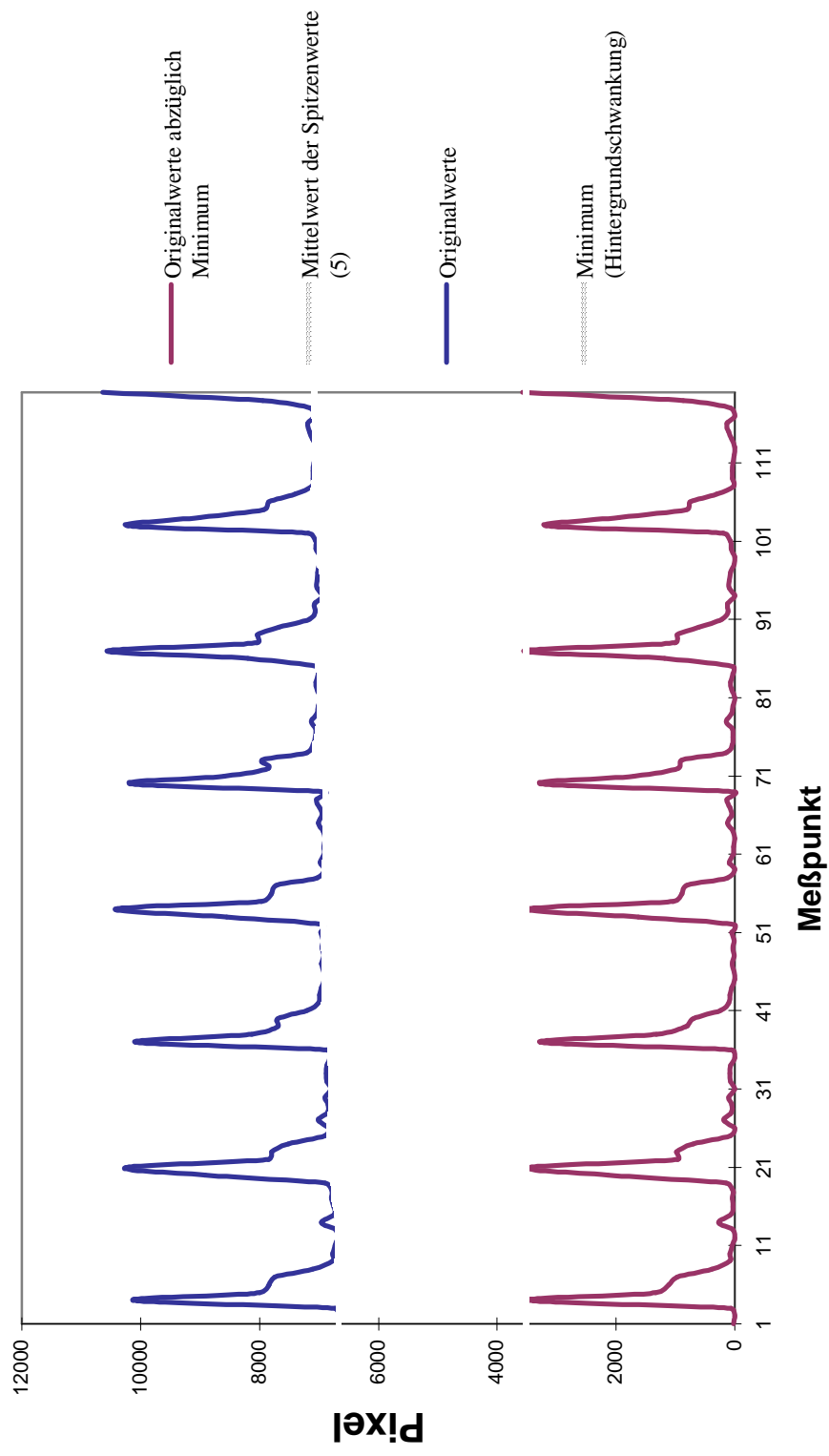


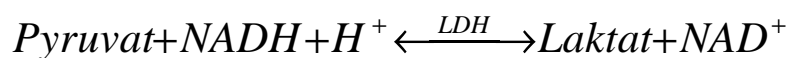
Abb.4: Darstellung mittels der beschriebenen (s. Text) computergestützten Bildanalyse gewonnenen Kontraktionskurve sowie Darstellung der Kontraktionskurve nach Abzug des gleitenden Minimums (Hintergrundschwanken).

2.5 Bestimmung der Wirkung von Glibenclamid und Glimperid auf die Vitalität von Kardiomyozyten

Zur Bestimmung der Vitalität der Herzmuskelzellen wurde das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Überstand einer Zellsuspension bestimmt, die vor Zentrifugation eine definierte Kardiomyozytenmenge enthielt. Die Kardiomyozytenmenge wurde durch Zellzählung in einer volumendefinierten „Neubauerschen“ Zählkammer bestimmt.

Die Kardiomyozyten in den Zellsuspensionen wurden über zwei Stunden mit einer Frequenz von 0,5 Hz bei 37° C in einem Brutkasten stimuliert. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden jeweils vor und nach der Stimulation Proben aus dem Überstand der Zellsuspension entnommen. Ein Teil der Zellsuspension wurde zur Bildung einer Positivkontrolle bei -20° C eingefroren und wieder aufgetaut. Diese maximal geschädigte Zellsuspension wurde dann ebenfalls über zwei Stunden unter den oben aufgeführten Bedingungen stimuliert. Die von dieser maximal geschädigten Zellsuspension gewonnenen Proben, beziehungsweise deren LDH-Aktivitäten vor und nach Stimulation, gaben zum einen Aufschluß über die erreichbare LDH-Aktivität bei größtmöglicher Zellschädigung, zum anderen konnten sie aufzeigen, daß es durch die Stimulation unter den Bedingungen nicht zu einem Abfall der LDH-Aktivität kommt. Dieser hätte die Beobachtung eines Anstieges der LDH-Aktivität als Zeichen einer Zellschädigung unter Stimulation verhindern können.

Die LDH-Bestimmungen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Frankfurt am Main durchgeführt. Sie wurden dort nach der „optimierten Standard-Methode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie durchgeführt, welche folgendes Testprinzip beinhaltet:



Zur LDH-Bestimmung wurden der zur bestimmenden Probe ein Phosphat-Puffer (68 mmol/l, pH 7,5) und Pyruvat (0,73 mmol/l) hinzugefügt. Als Startreagenz der Reaktion dient reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid (NADH, 1,1 mmol/l).

Das Reaktionsgleichgewicht der oben aufgeführten Reaktion liegt auf Seiten der Endprodukte Laktat und Nicotinamidadenindinucleotid (NAD⁺). Dies führt nach Zugabe der Startsubstanz NADH zu einem Anstieg des NAD⁺ und einem Abfall des NADH, welcher photometrisch über den Extinktionsabfall bei 340 nm bestimmt wird. Der Extinktionsabfall pro Zeit korreliert mit der vorliegenden LDH-Enzymaktivität.

Die LDH-Bestimmung wurde mit Hilfe eines BMEHitachi 917 Analysenautomaten durchgeführt.

Die LDH-Aktivitäten der einzelnen Messungen wurden unter Verwendung eines „cell injury index“ standardisiert (Legrand et al. 1992).

$$\text{Cell injury Index} = \frac{(\text{LDH nach Stimulation}) - (\text{LDH vor Stimulation})}{(\text{LDH nach Lyse aller Zellen}) - (\text{LDH vor Stimulation})} \times 100$$

Der „cell injury index“ gibt den prozentualen Anteil der Zellschädigung in Bezug auf die LDH-Aktivität bei maximaler Zellschädigung an.

2.5.1 Entwicklung einer Stimulationskammer

Um möglichst viele Versuche gleichzeitig unter gleichen Bedingungen mit den Zellen eines Tieres durchführen zu können, wurde eine Stimulationskammer entwickelt, die es ermöglichte, gleichzeitig 24 Proben zu stimulieren. Die Stimulationskammer bestand aus einer Zellkultur-Platte mit 24 Feldern, die alle über die Abdeckung der Platte mit jeweils zwei Platinelektroden bestückt wurden. Sie enthielt weiterhin eine Steuerelektronik, die mit Hilfe zweier Schieberegister (Multiplexer) in der Lage war, einen Impuls von zwei Stimulatoren auf jeweils 4 Reihen zu je 3 Schälchen zu erteilen (Abb. 5). Dies war nötig, da die Ausgangsleistung des verwendeten Stimulators begrenzt und in jeder nicht in der Lage war, mehr als drei Felder gleichzeitig zu stimulieren.

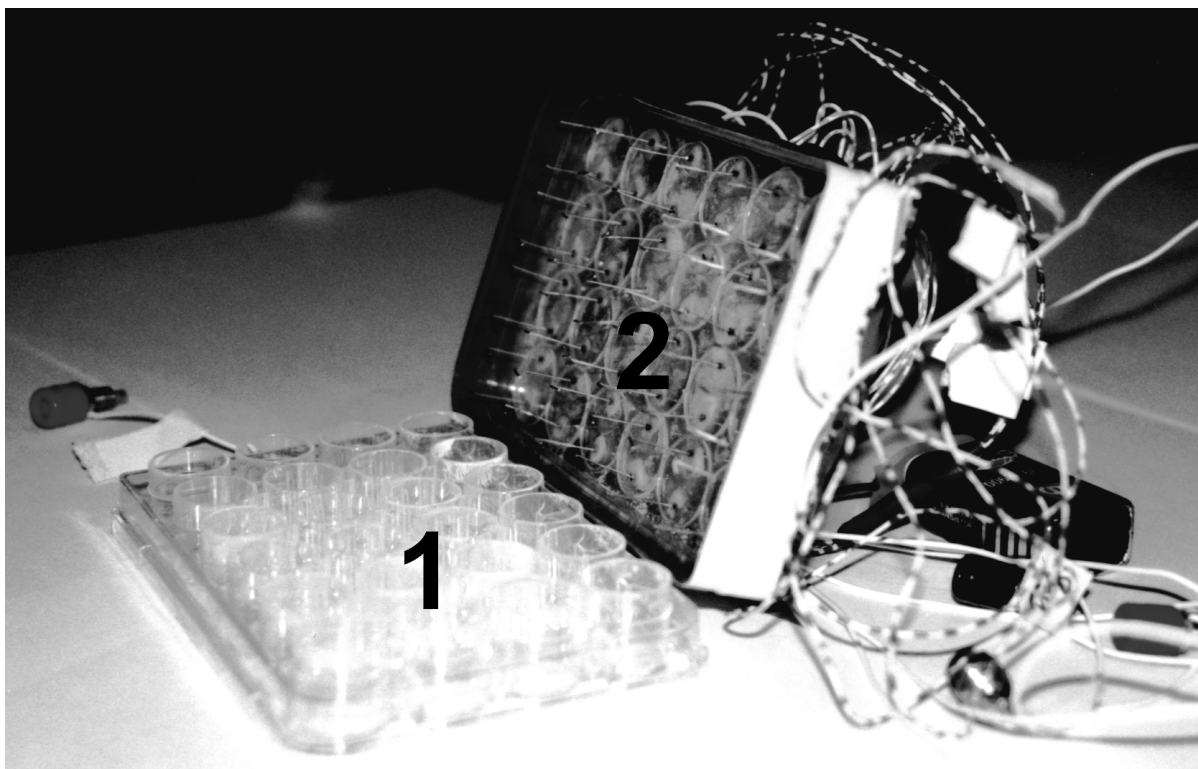


Abb.5: Blick auf die eröffnete Stimulationskammer: Zellkulturplatte (1), x 2 24
Stimulationselektroden (2)

Um eine zur Stimulatorfrequenz synchrone Verteilung der Impulse zu gewährleisten, wurde das Umschalten der Steuerelektronik auf die jeweils nächste Plattenreihe durch ein Signal des Stimulators getriggert, welches der Frequenz des Stimulators entsprach. Die Steuerelektronik paßte sich so der Frequenz des Stimulators an. Dies stellte eine fehlerfreie Verteilung und Übertragung der Impulse durch die Steuerelektronik sicher.

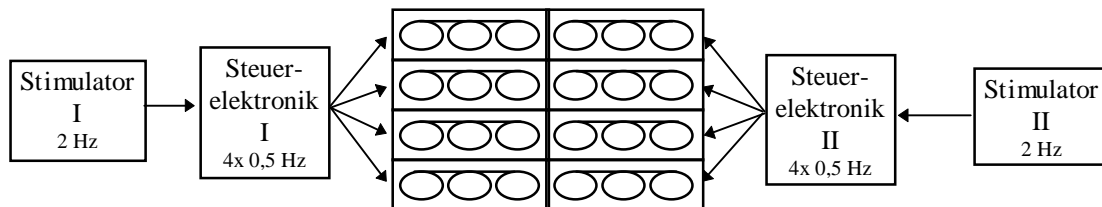


Abb.6: Schematischer Aufbau der Stimulationskammer.

Das Herzstück der Steuerelektronik war ein 4-Bit-Schieberegister, das über das Triggersignal des Stimulators getaktet wurde. Angesteuert wurden Schalttransistoren, die den Stimulationsimpuls von 80 Volt auf die jeweilige Plattenreihe schalten konnten. Vier Leuchtdioden, die ebenfalls mit den Ausgängen des Schieberegisters verbunden waren, dienten der optischen Kontrolle der Impulsverteilung. Mit Hilfe eines Tasters konnte manuell der Ausgangszustand des Schieberegisters wiederhergestellt werden. Die beiden Steuerelektroniken wurden über ein gemeinsames spannungsstabilisiertes Netzteil, das aus einer 9Volt-Blockbatterie gespeist wurde, betrieben.

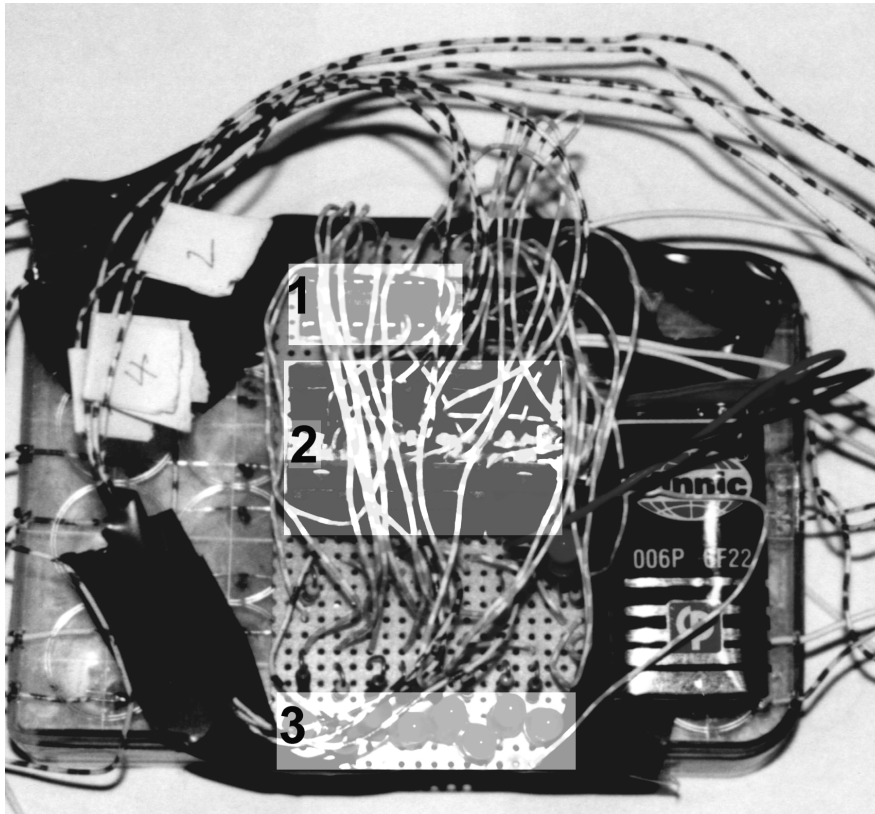


Abb.7: Blick auf die Stimulationselektrode. Markiert sind folgende Bauteile: ~~u~~plexer-Chip (1), Schalttransistoren (2), Kontroll-Leuchtdioden (3)

2.6 Statistik

Sowohl zur Bestimmung der Kontraktilität als auch zur LDH-Bestimmung wurden an n Kardiomyozyten jedes Tieres drei Messungen durchgeführt. Der Mittelwert dieser drei Messungen wurde der kardiomyozytären Kontraktilität bzw. dem LDH Wert des jeweiligen Tieres (n) zugeordnet.

Die Ergebnisse einer Versuchsreihe (Stichprobe) wurden nach David et al. (1954 - zitiert nach Sachs 1992) auf Nichtnormalität getestet. Normalverteilte Stichproben wurden zur Verwendung des zweiseitigen t-Test auf Signifikanz überprüft. Ansonsten wurde zur Ermittlung des Signifikanzniveaus der zweiseitige U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney, der dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben mit unbekannter Verteilung dient, angewandt (Sachs 1992).

Weiterhin wurde der Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) berechnet. Er wird nach folgenden Formeln bestimmt :

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Zellausbeute

Durch das beschriebene Isolierungsverfahren konnten Tiere zwischen 700.000 und 1.400.000 Kardiomyozyten gewonnen werden. Der Anteil der vitalen Zellen in Bezug auf die Gesamtzellausbeute variierte zwischen 5% - 20%. Es bestand ein Zusammenhang zwischen Präparationszeit des Herzens und dem Anteil vitaler Zellen, d.h. kürzere Präparationszeiten führten zu einem größeren Anteil vitaler Zellen.

3.2 Ergebnisse der Kontraktilitätsbestimmungen

3.2.1 Beeinflussung der Kontraktilität durch Rilmakalim

Zu Beginn der Kontraktilitätsbestimmungen wurde eine Dosiswirkungskurve für den K^+ ATP-Kanalöffner Rilmakalim erstellt, um eine geeignete Konzentration zur Kontraktionsreduzierung festlegen zu können. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Tab. 1 sowie Abb. 8 dargestellt.

*Tab.1: Tabellarische Darstellung der Dosiswirkungskurve von Rilmakalim (RK) \pm EM. Die Kontraktilitätswerte sind relativ zu den denselben Zellen durchgeführten substratfreien Leerkontrollen (Calcium-Standardlösung). Als weitere Kontrolle wurde die Kontraktilität einer 12 μ molaren Dimethylsulfoxid (DMSO) Lösung als Lösungsmittelkontrolle angegeben. Diese unterschied sich nichtsignifikant von den Leerkontrollen. * $p < 0,01$ vs. Lösungsmittelkontrolle, ** $p < 0,001$ vs. Lösungsmittelkontrolle*

	DMSO (12 μ mol)	RK (0,1 μ mol)	RK (0,3 μ mol)	RK (1 μ mol)	RK (3 μ mol)
Versuchstiere (n)	6	6	6	6	7
Kontraktilität (%)	101 \pm 5,2	70,5 \pm 3,7**	62 \pm 7,6*	52,4 \pm 7,3**	9 \pm 6,5**

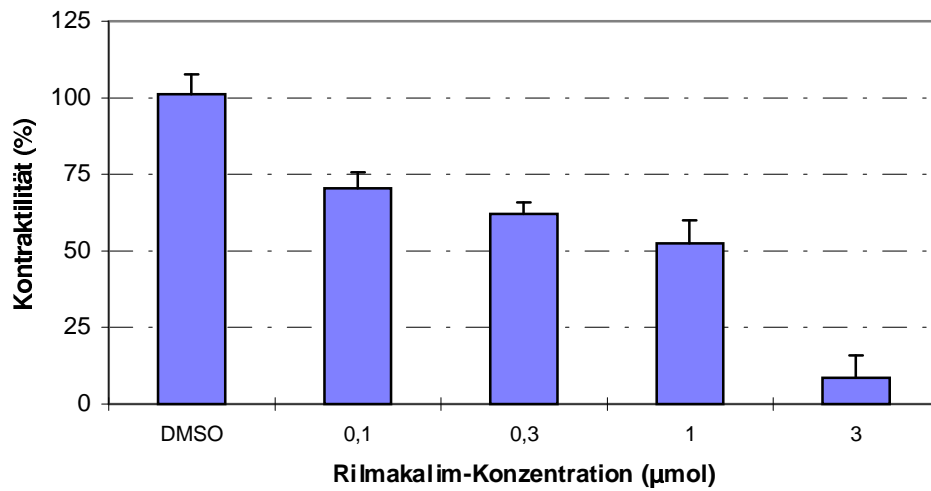


Abb. : Größphische Darstellung er Rilmakalim-Dosiswirkungsbeziehung uf dia Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten

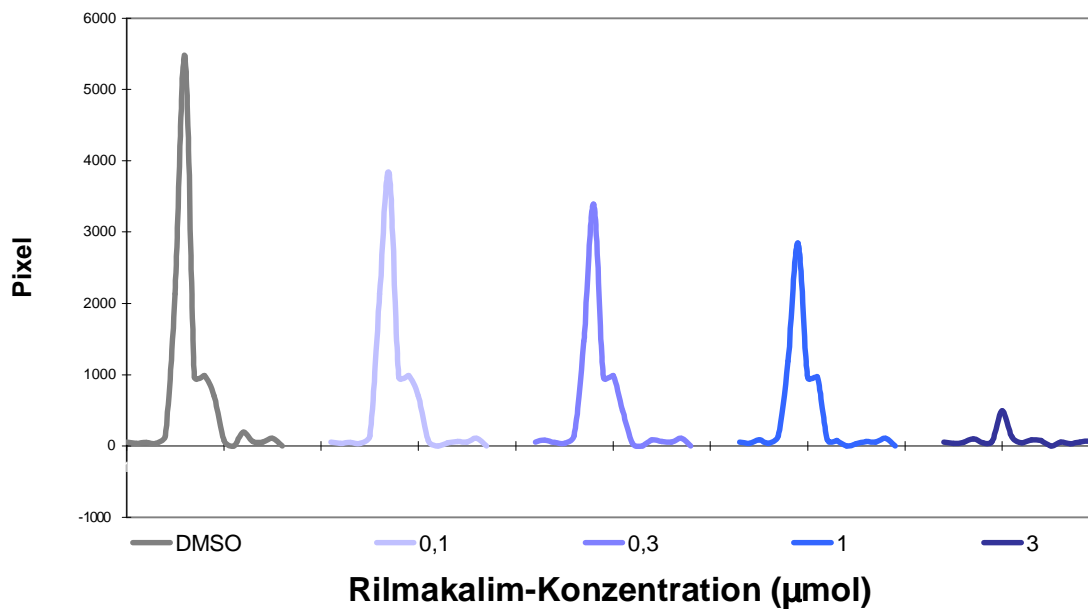


Abb. 9: Beispielhafte Darstellung von Kontraktionskurven unter dem Einfluß von Rilmakalim, die die Dosiswirkungsbeziehung der Substanz auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten widerspiegeln

Die Versuchsreihen zur Bestimmung der Beeinflussung der kardiomyozytären Kontraktilität durch Rilimakalim ergaben eine dosisabhängige Abnahme der Kontraktilität, die bei 0,1 μmol Rilimakalim 70,5% des Wertes der Lösungsmittelkontrolle betrug. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{mol}$ zeigte sich eine Halbierung der Kontraktionsamplituden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Rilimakalim bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol}$ ergab im Mittel nur noch eine Restkontraktilität von 10%. Bei dieser Konzentration zeigte sich in Messungen einzelner Kardiomyozyten bereits eine völlige Aufhebung der Kontraktilität, die jedoch immer reversibel war.

Pilotuntersuchungen (n=2 Präparationen) zeigten bei Rilimakalimkonzentrationen über $3 \mu\text{mol}$ ($4 \mu\text{mol}$, $8 \mu\text{mol}$, hier nicht dargestellt) eine vollständige Aufhebung der Kontraktionsfähigkeit, die in einzelnen Versuchen irreversibel war.

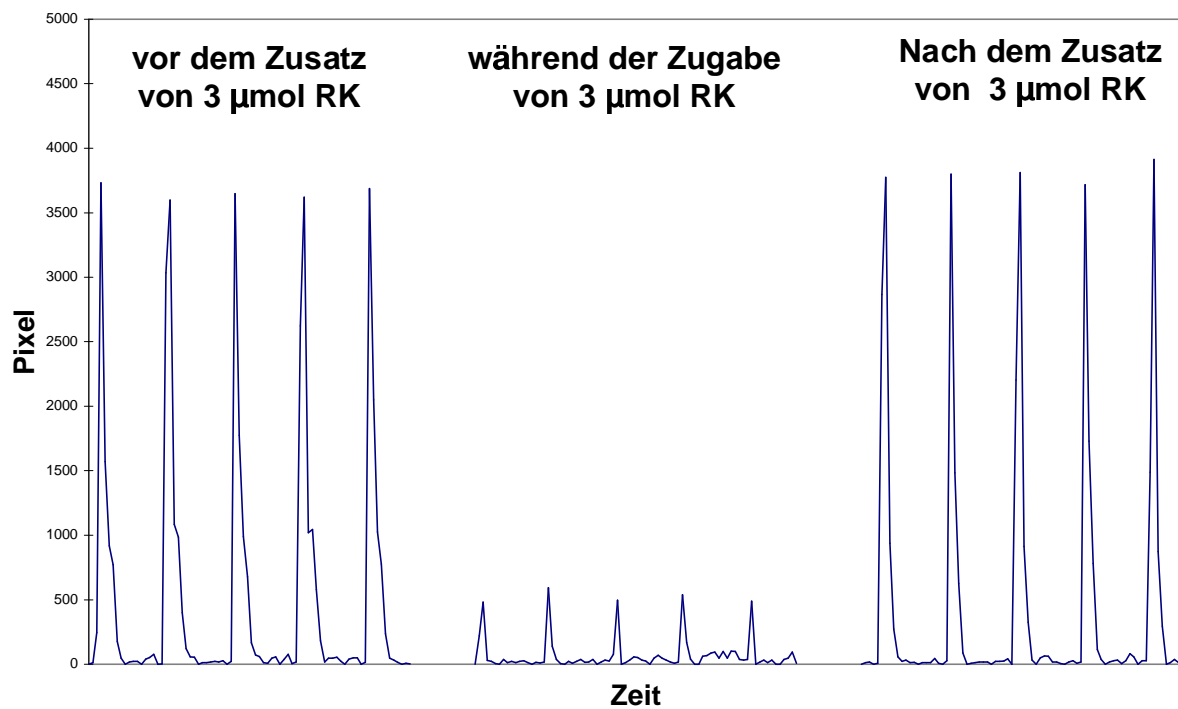


Abb. 10: Originalkurven einer Kontraktilitätsbestimmung unter dem Einfluß von $3 \mu\text{mol}$ Rilimakalim

3.2.2 Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid bzw. Glimepirid in Kombination mit Rilmakalim

Zur Untersuchung des Einflusses von Glibenclamid sowie Glimepirid auf die durch Rilmakalim herbeigeführte Kontraktilitätsminderung wurden zu verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Sulfonylharnstoffs 3 µmol Rilmakalim hinzugegeben. Es ergaben sich die in Tab. 2 dargestellten Werte. Abb. 11 faßt die Versuchsergebnisse graphisch zusammen. Beide Sulfonylharnstoffderivate zeigten bereits in der niedrigsten Konzentration von 0,03 µmol eine deutliche Abschwächung der Rilmakalim-bedingten Kontraktilitätsminderung, wobei Glibenclamid bereits in jeder Konzentration die Wirkung von Rilmakalim stärker aufhob als Glimepirid. Auch bei allen weiteren eingesetzten Konzentrationen zeigte sich, daß Glibenclamid die Wirkung von Rilmakalim stärker aufhob als Glimepirid, wobei jedoch mit beiden Substanzen auch bei einer Konzentration von 3 µmol der Ausgangswert der Kontraktilität der Lösungsmittelkontrolle nicht erreicht wurde. Diese Differenz zur Lösungsmittelkontrolle bei einer Sulfonylharnstoffkonzentration von 3 µmol war jedoch für beide Substanzen statistisch nicht signifikant.

Tab. 2 : Kontraktilität der Kardiomyozyten unter dem Einfluß von 3 µmol Rilmakalim und dem jeweiligen Sulfonylharnstoff (GC=Glibenclamid, GP=Glimepirid) in verschiedenen Konzentrationen. Die Kontraktilitätswerte beziehen sich auf an aenselnd Zellen urchgeführte substratfreie Leerkontrollen (Calcium-Standardlösung = 100%). (n) = Anzahl der separaten Präparationen. **p<0,05 +p<0,01 ++p<0,001 vs. Lösungsmittelkontrolle.

	Sulfonylharnstoff plus 3 µmol Rilmakalim					
Konz. Sulfonylhst.	0,03 µmol	0,1 µmol	0,3 µmol	1 µmol	3 µmol	9 µmol
(n) GC/GP	6/6	7/5	7/7	7/7	7/7	-/6
Kontrakt. (%) GC	42,8 ± 6,8 ⁺	75,4 ± 8,3 ^{**}	85 ± 5,5	88,6 ± 1,3	97,3 ± 4,3	-
Kontrakt. (%) GP	30,6 ± 6,8 ⁺⁺	40,3 ± 8,3 ⁺⁺	72,2 ± 6,2 ⁺	79,5 ± 2,8 ⁺	80,1 ± 4,7 ^{**}	91,9 ± 8,8
Differenz GC-GP	12,2	35,1 ⁺	12,8	9,1 ^{**}	17,2 ^{**}	-

Es zeigte sich bei allen untersuchten Konzentrationen, daß Glimepirid die durch Rilmakalim induzierte Kontraktilitätsminderung in geringerem Ausmaß abschwächte als Glibenclamid. In den Konzentrationen 0,03 µmol, 0,1 µmol und 0,3 µmol erreichten diese Unterschiede das Signifikanzniveau.

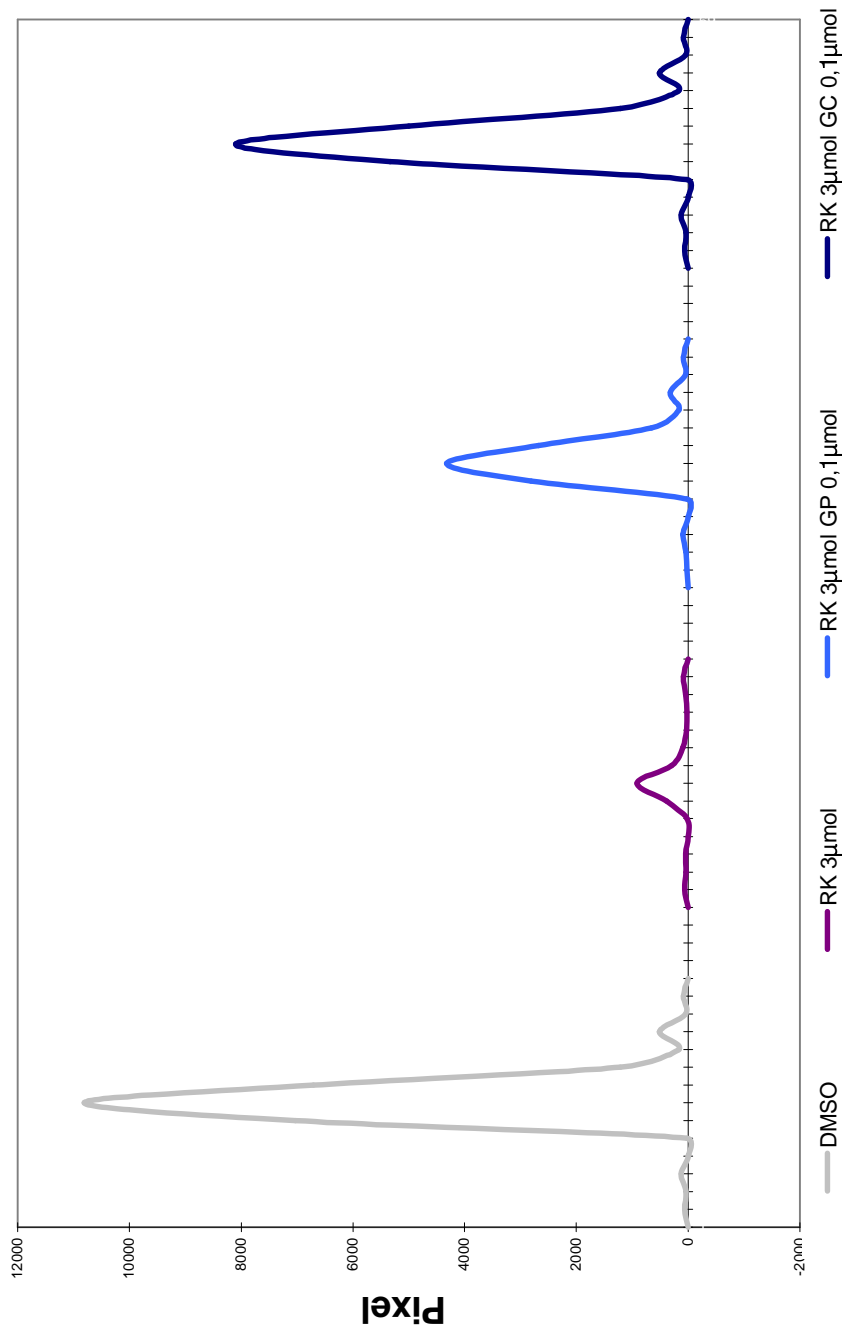


Abb. 11: Beispielhafte Darstellung von Kontraktionskurven, welche den unterschiedlich ausgeprägten Effekt von Glimpirid und Glibenclamid in Kombination mit Rilmakalim auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten widerspiegelt

3.2.3 Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid bzw. Glimepirid

Zusätzlich zu den oben dargestellten Untersuchungen wurde die jeweils höchste Konzentration der Sulfonylharnstoffe ohne Zusatz von Rilimakalim Hinblick auf eine Beeinflussung der Kontraktilität untersucht.

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der Kontraktilität unter dem Einfluß von Glibenclamid (GC) und Glimepirid. (GP). Die Kontraktilitätswerte sind relativ zu den in denselben Zellen durchgeführten substratfreien Leerkontrollen (Calcium-Standardlösung = 100%). Als weitere Kontrolle wurde die Kontraktilität einer 12 µmolaren Dimethylsulfoxid (DMSO) Lösung als Lösungsmittelkontrolle angegeben, welche sich nicht signifikant von Leerkontrolle unterschied. Weder Glibenclamid als auch Glimepirid waren in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant unterschiedlich.

	DMSO 12µmol	GC 3µmol	GP 9µmol
Versuchstiere (n)	6	6	6
Kontraktilität (%)	101,08± 5,2	104,5 ± 6,4	97,6 ± 3,2

Dabei zeigte sich, daß weder das Lösungsmittel DMSO noch in beiden Sulfonylharnstoffe die Kontraktilität der Kardiomyozyten im Vergleich zu den nur mit Kontrollpuffer (Calcium-Standardlösung) inkubierten Zellen beeinflussen.

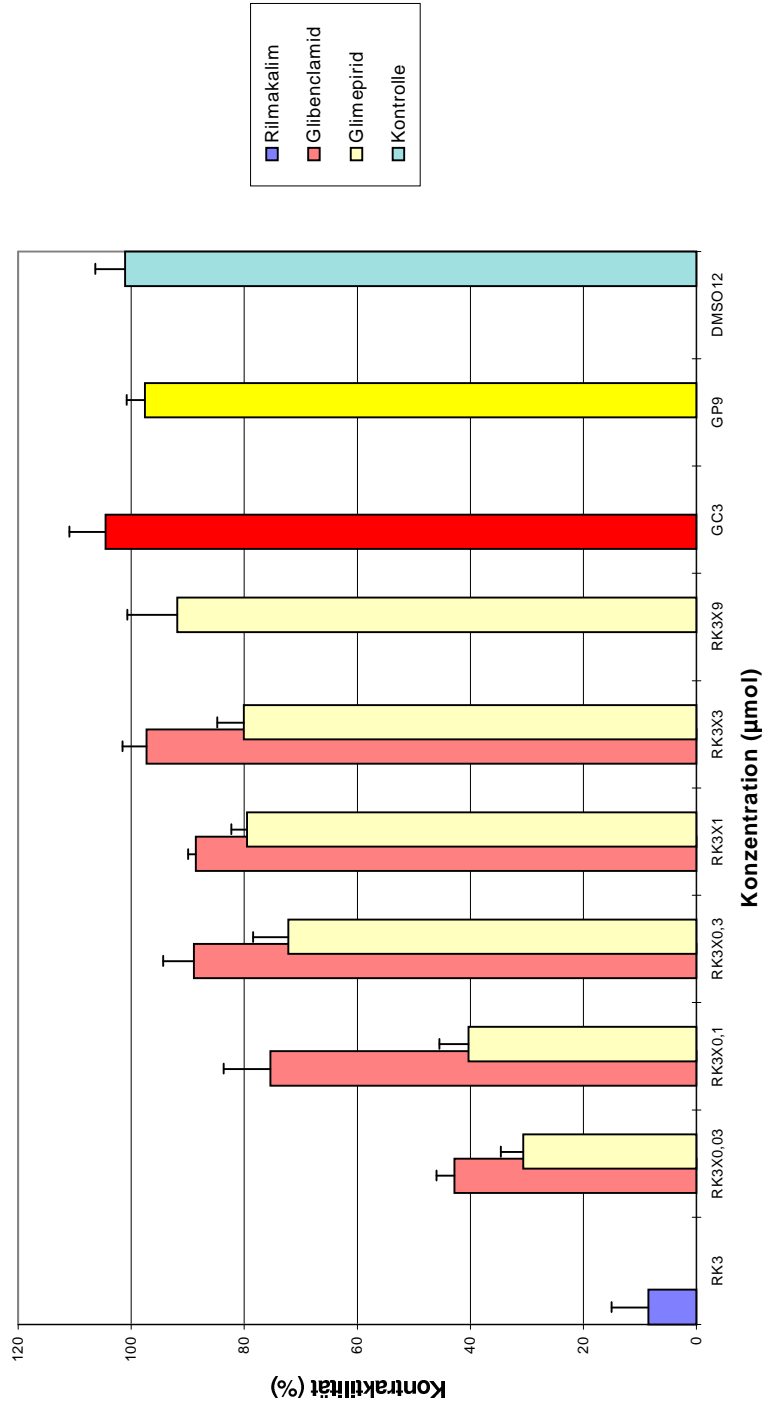
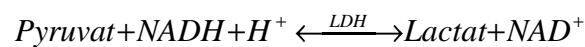


Abb. 12: Graphische Darstellung der Tabellen 2 und 3 unter Hinzunahme der Kontraktilitätswerte von Rilmakalim (RK) 3 μmol sowie der Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid 12 μmol . Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Alle Kontraktilitätsminderungen waren durch Spülen mit Pufferlösung (Calciumstandardlösung) reversibel. RK = Rilmakalim, GC = Glibenclamid, GP = Glimpepid; Zahlenwerte in μmol

3.3 Effekt der Sulfonylharnstoffe und Rilimakalim auf die Zellvitalität

Neben der Bedeutung der LDH-Bestimmung in der klinischen Chemie kann diese Methode dazu dienen, Aussagen über die Vitalität von Zellkulturen zu gewinnen (Racher et al 1990). Durch Steigerung der Membranpermeabilität bzw. Zellyse bei terminal geschädigten Zellen gelangt die physiologischerweise intrazellulär gelegene LDH in das extrazelluläre Medium. Aus diesem kann die Aktivität des Enzyms bestimmt werden.

Die Laktatdehydrogenase katalysiert reversibel die Reaktion :



Aufgrund der zentralen Bedeutung dieser Reaktion, des letzten Schrittes der Glykolyse, kommt dieses Enzym ubiquitär in den Zellen des menschlichen tierischen Organismus vor. In Herzmuskelzellen, die einen herausragenden Energieumsatz haben, findet man eine besonders hohe Aktivität. Untersucht wurden Zellsuspensionen, denen jeweils Glibenclamid, Glimepirid sowie Rilimakalim zugesetzt worden war. Die Substanzen wurden in den Konzentrationen zugesetzt, die den maximalen Testkonzentrationen während der Kontraktilitätsbestimmungen entsprachen. Zur Quantifizierung eines Zellschadens wurde der „cell injury index“ verwendet (Byler et al 1994). Dieser wird nach folgender Formel bestimmt :

$$\text{Cell injury Index} = \frac{(\text{LDH nach Stimulation}) - (\text{LDH vor Stimulation})}{(\text{LDH nach Lyse aller Zellen}) - (\text{LDH vor Stimulation})} \times 100$$

Er gibt die Zellschädigung in Prozent zum maximal möglichen Schaden an.

Nach zweistündiger elektrischer Stimulation stieg unter keiner der getesteten Substanzen der absolute LDH-Gehalt in den Zellsuspensionen an. Es zeigte sich weiterhin kein Unterschied zum Kontrollmedium. Somit konnte für keine der untersuchten Substanzen (Glibenclamid, Glimepirid und Rilmakalim) eine zellschädigende Wirkung nachgewiesen werden.

Auf eine Überprüfung von Substanzkombinationen wurde aufgrund der fehlenden zellschädigenden Wirkung der Einzelsubstanzen verzichtet.

Tab. 4: Absolutwerte der LDH-Bestimmungen vor sowie nach zweistündiger elektrischer Stimulation in den jeweiligen Substanzlösungen Rilmakalim (RK), Glibenclamid (GC), Glimepirid (GP). Als Kontrolle diente eine Lösung der maximal vorkommenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO 12 µmol). Der 100%-Wert gibt die LDH-Konzentration bei maximaler Schädigung der Zellen durch Einfrieren an. Die Werte beziehen sich auf 10.000 Zellen pro ml

	DMSO (12µmol)	RK (3µmol)	GC (3µmol)	GP (9µmol)	100%
Versuchstiere (n)	5	5	5	5	5
LDH vor Stimulation	106,5 ± 27,2	96,4 ± 24,1	109,4 ± 27,4	95,9 ± 25,5	174,3 ± 40,2
LDH nach Stimulation	92,7 ± 24,3	100,9 ± 25,2	103,6 ± 24,2	100,1 ± 25,3	175,5 ± 38,6

Tab. 5: cell injury index nach zweistündiger Kardiozyten-Stimulation in den jeweiligen Substanzlösungen Rilmakalim (RK), Glibenclamid (GC), Glimepirid (GP). Keine der Substanzen führte zu signifikantem Zelltod. Als Kontrolle diente eine Lösung der maximal vorkommenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO 12µmol).

	DMSO (12µmol)	RK (3µmol)	GC (3µmol)	GP (9µmol)
Versuchstiere (n)	5	5	5	5
cell injury index	2,6 ± 4,1	6,4 ± 1,5	2,5 ± 2,7	2,4 ± 2,5

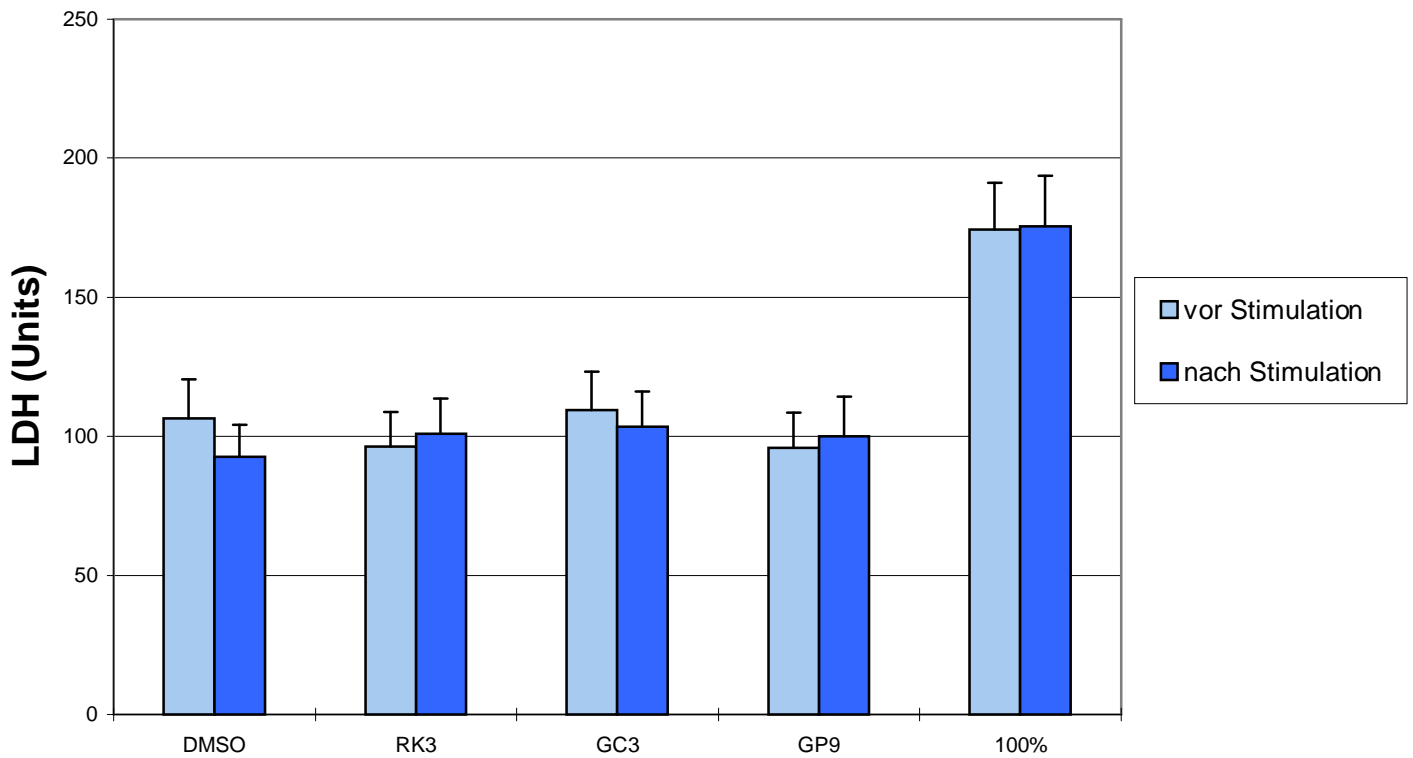


Abb. 13 Graphische Darstellung der Tabelle 4. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der absoluten LDH Konzentrationen im Überstand von Zellsuspensionen dar, die den gegebenen Substanzen gesetzt waren. Zusätzlich aufgeführt sind die Daten für maximal geschädigte Zellen (100%). RK3 = 3 μ mol Rilmakalim, GC3 = 3 μ mol Glibenclamid, GP9 = 9 μ mol Glimepirid

4 Diskussion

Bezogen auf die in der Einleitung formulierten Fragestellungen abh die durchgeführten Untersuchungen folgende Ergebnisse erbracht :

Während elektrischer Stimulation wirkte Rilmakalim eine konzentrationsabhängige Minderung der Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten. Sowohl Glibenclamid als auch Glimepirid waren in der Lage, die durch Rilmakalim induzierte Kontraktionsminderung konzentrationsabhängig zu antagonisieren. Allerdings zeigte sich in dieser Hinsicht Glimepirid deutlich schwächer wirksam als Glibenclamid, d.h. durch Rilmakalim induzierte Kontraktionsminderung wurde durch Glimepirid weniger stark antagonisiert als durch Glibenclamid. Als Einzelsubstanzen zeigten beide Sulfonylharnstoffe keinen Einfluß auf die Kontraktilität der Zellen.

Die Vitalität der Kardiomyozyten wurde durch eine der hier untersuchten Substanzen beeinträchtigt.

Die Wahl der isolierten Kardiomyozyten als Versuchmodell im Gegensatz zu einem Ganzherzmodell erschien sinnvoll, da so Wirkungen der Substanzen auf kardiovaskuläre Elemente, welche ihrerseits Einfluß auf die Kontraktilität des Herzmuskels sowie deren Vitalität haben könnten, ausgeschlossen werden können. Es war möglich, mit den Kardiomyozyten eines Tieres eine Vielzahl von Versuchen durchzuführen. Dadurch konnten interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren innerhalb einer Versuchsreihe vermieden werden. Zum anderen konnten Untersuchungen im Vergleich zu Ganzherzmodellen an wesentlich weniger Versuchstieren durchgeführt werden. Die Nachteile isolierter Kardiomyozyten als Versuchsmodell liegen sicher in ihrer aufwendigen Isolierung, die nicht bei jedem Tier zum Erfolg führt. Weiterhin ist die Übertragung der Versuchsergebnisse auf den kompletten Organismus nur bedingt möglich, da viele Faktoren, wie beispielsweise vaskuläre oder nervale Einflüsse, hier nicht berücksichtigt werden.

4.1 Diskussion der Kontraktilitätsergebnisse

Grundsätzlich existieren zwei unterschiedliche Verfahren, um die kontraktile Aktivität isolierter Kardiomyozyten zu analysieren. Das ist zum einen die direkte Messung der ausgeübten Kräfte mittels Kraft/Weg-Aufnehmern (Copelas et al., 1987 und Shepherd et al., 1990) und zum anderen die indirekte, opto-elektronische Analyse der Bewegung. Methodische Probleme der direkten Kraftmessung ergeben sich vor allem aus der Befestigung des Kraft/Weg-Aufnehmer an der Zellmembran, deren Integrität durch die notwendige Präparation leicht zerstört wird. Die indirekte, opto-elektronische Messung der Kontraktilität beruht im Prinzip auf Helligkeitsänderungen im mikroskopischen Bild, hervorgerufen durch die Bewegung der Kardiomyozyten. Ein wesentlicher Vorteil der opto-elektronischen Methoden ist, daß sie berührungsfrei und ohne besondere Präparation zu realisieren sind. Die Helligkeitsänderungen lassen sich auf verschiedene Weise erfassen :

1. Durch über einer Kante einer kontrahierenden Zelle positionierte Photodioden (Sinclair et al., 1970, Meyer et al., 1987, Barry et al., 1985, Werdan & Erdmann 1991).
2. durch Lichtbeugung (Rohr 1990).
3. durch bildanalytische Methoden wie z.B. Echtzeit-Kantendetektion (Staedmann et al., 1988), Einzelbildanalyse (Rose et al., 1991) oder die hier verwendete Methode (Riehle und Bereiter-Hahn, 1994).

Mit der beschriebenen bildanalytischen Methode ist es prinzipiell möglich, Zellgruppen, einzelne Zellen sowie subzelluläre Bereiche auf ihre Kontraktilität hin zu untersuchen (Riehle und Bereiter-Hahn, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich einzelne Zellen analysiert.

Gegenüber den anderen zitierten bildanalytischen Methoden liegt der Vorteil der hier angewandten Methode in der Nutzung von Echtzeitverfahren, die außerdem, die Bilder der Kardiomyozyten zwecks Analyse zu speichern. Es war möglich, das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten sofort graphisch anzustellen. Allerdings erlaubte die hier verwendete Apparatur nur eine geringe zeitliche Auflösung von 8 Hz, was eine maximale Kontraktionsfrequenz von ca. 120/min erlaubte.

Da sämtliche Untersuchungen mit einer Kontraktionsfrequenz von $1/30$ also $10/5$ durchgeführt wurden, stellte die geringe zeitliche Auflösung jedoch einen limitierenden Faktor dar.

4.1.1 Beeinflussung der kardiomyozytären Kontraktilität durch Rilmakalim

Substanzen wie Rilmakalim, welche den K^+ _{ATP}-Kanal öffnen, sind eine strukturell heterogene Gruppe, deren typische Vertreter Cromakalim, Levcromakalim, Nicorandil und Pinacidil sind. Ihre K^+ _{ATP}-Kanal öffnende Potenz üben sie vor allem an glatter Muskulatur aus (Weston und Edwards, 1993). Sie besitzen ein hohes therapeutisches Potential, als antihypertensive, antiasthmatische, lasierend-relaxierende und antianginöse Eigenschaften besitzen (Duty und Weston, 1994). Rilmakalim ist ein K^+ -Kanal öffnendes Benzopyran-Derivat der zweiten Generation. Es ähnelt strukturell Levcromakalim, unterscheidet sich jedoch dadurch, daß es in Position sechs des Benzopyran-Kerns einen Phenylsulphonyl-Substituenten besitzt.

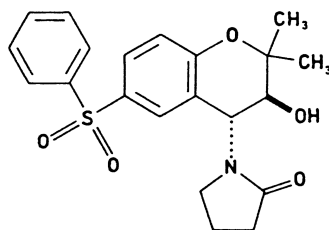


Abb. 4.1 : Strukturformel des Benzopyranderivates Rilmakalim, welches K^+ _{ATP}-Kanal-öffnende Eigenschaften besitzt.

Es zeigte sich, daß dieser Phenylsulphonyl-Substituent verantwortlich ist für die im Gegensatz zu anderen Benzopyran-Derivaten höhere Wirkstärke des Wirkstoffes, die Bronchialmuskulatur zu relaxieren (Englert et al., 1992; Weston und Edwards, 1993). Es wurde auch nachgewiesen, daß Rilmakalim wie andere K^+ _{ATP}-Kanal-Öffner generell relaxierend auf glatte Muskulatur wirkt und so einen antihypertensiven Effekt besitzt (Klaus et al., 1994). Dieser antihypertensive Effekt konnte durch den K^+ _{ATP}-Kanal-Blocker Glibenclamid antagonisiert werden (Klaus et al., 1994). Der direkte Nachweis der Aktivierung kardialer K^+ _{ATP}-Kanäle durch Rilmakalim erbrachten Tiele et al. an isolierten Kardiomyozyten des Meerschweinchens.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Rilmakalim eine dosisabhängige Kontraktilitätsminderung von Kardiomyozyten bewirkt. Bereits in einer Dosierung von 0,1 µmol führte Rilmakalim zu einer signifikanten Herabsetzung der kardiomyozytären Kontraktilität. Eine Dosis von 1 µmol führte nahezu zu einer Halbierung der Kontraktilität. Konzentrationen über 3 µmol bewirkten meist eine kompletten Hemmung der Kontraktilität, die jedoch reversibel war. Die kontraktilitätsmindernde Wirkung von Rilmakalim konnte sowohl durch Glibenclamid (3 µmol), als auch durch Glimpirid - wenn auch erst in einer höheren Konzentration (9 µmol) aufgehoben werden. Da diese beiden Substanzen einen K^+ _{ATP}-Kanal-schließenden Effekt haben, kann angenommen werden, daß der kontraktilitätsmindernde Effekt von Rilmakalim Zusammenhang mit dessen öffnender Wirkung auf den K^+ _{ATP}-Kanal steht. Der kontraktilitätsmindernde Effekt von Rilmakalim-
verwandten K^+ _{ATP}-Kanal-Öffnern wie Levromakalim und anderen ist bereits mehrfach untersucht worden (u.a. Jiang et al., 1994). Die K^+ _{ATP}-Kanal aktivierende Funktion von Rilmakalim wurde bereits in „whole-cell-“ und „single-channel-“ Untersuchungen beschrieben (Terzic et al., 1994; Krause et al., 1995). Im Vergleich zu anderen K^+ _{ATP}-Kanal öffnenden Substanzen scheint Rilmakalim in Bezug auf die Kontraktilitätsminderung von Kardiomyozyten eine deutlich höhere Potenz zu besitzen. So zeigten Jiang et al. (1994) für Levromakalim, einen dem Rilmakalim strukturell nahestehenden K^+ _{ATP}-Kanalöffner, eine kontraktilitätshalbierende Wirkung erst bei einer Konzentration von 30 µmol. Die Rilmakalimkonzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit kontraktilitätsmindernd wirkten, lagen in dem gleichen Konzentrationsbereich, für den Terzic et al. (1994) eine Öffnung der kardialen K^+ _{ATP}-Kanäle beschrieb. Die in der vorliegenden Untersuchung bestimmte Rilmakalimkonzentration, die eine halbmaximale Kontraktilitätsminderung verursachte (EC₅₀ ca. 1 µmol) und die von Terzic et al. mittels Patch-clamp-Untersuchungen ermittelte EC₅₀ (auch ca. 1 µmol) für eine halbmaximale K^+ _{ATP}-Kanal-Öffnung, stimmen überein.

Die kontraktilitätsmindernde Wirkung von Rilmakalim erklärt sich somit eindeutig durch seine öffnende Wirkung auf den K^+ _{ATP}-Kanal. Der K^+ _{ATP}-Kanal öffnende Effekt des Rilmakalim führt über eine Hyperpolarisation der Zelle aufgrund eines K^+ -Ionen-Ausstromes zu einer Verkürzung der Plateau-Phase des Aktionspotentials. Dies vermindert den Einstrom von Ca^{2+} .

Da sich die sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Speicher unter dem direkten Einfluß von einströmendem Ca^{2+} während der Systole entleeren, führt ein verminderter Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle auch zu einer verminderten Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des sarkoplasmatischen Retikulums in den intrazellulären Raum. Freies intrazelluläres Ca^{2+} ist Voraussetzung für die Bindung von Myosinfilamenten an Aktinfilamente, welche zur Zellkontraktion führt. Der Mechanismus, über den intrazelluläres Ca^{2+} zur Bindung von Myosinfilamenten an Aktinfilamente führt, beruht auf einer Inhibition des in Aktinfilamenten enthaltenen Tropomyosins, welches in Abwesenheit von Ca^{2+} eine Myosinfilament-Aktinfilament-Bindung verhindert. Die Verknüpfung von Ca^{2+} -Ionenkonzentration Tropomyosin-Inhibition erfolgt über molekulare Veränderungen in den ebenfalls beteiligten Troponin-C- und Troponin-I-Molekülen. Eine Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Öffnen von K^+ _{ATP}-Kanälen führt demnach zu einer Kontraktionsminderung.

Die Wirkung einer Öffnung kardiomyozytärer K^+ _{ATP}-Kanäle zeigt die physiologische Bedeutung des K^+ _{ATP}-Ionenkanals des Herzens auf. Durch K^+ _{ATP}-Kanal-induzierten Kalium-Auswärtsstrom kommt es über eine Kontraktionsminderung der Zellen zu einem reduzierten Energieverbrauch. Betrachtet man diese Bedingungen, unter denen sich der Kanal öffnet, nämlich einen Abfall des intrazellulären ATP-Gehaltes als Ausdruck eines Energiemangels, ist die durch Kanalöffnung angestrebte Energieeinsparung äußerst sinnvoll. So wird verhindert, daß der Energiegehalt der Kardiomyozyten weiter absinkt und es aufgrund des Energiemangels zu irreversiblen Schädigungen zellulärer Strukturen kommt. Im Rahmen der Ischämischen Präkonditionierung spielt die Funktion des K^+ _{ATP}-Kanals eine wichtige Rolle. Als myokardialer Faktor senkt er über die bereits erwähnten Mechanismen den Energieverbrauch der Kardiomyozyten und erhöht damit ihre Überlebenswahrscheinlichkeit. So wurde gezeigt, daß die Aktivierung des K^+ _{ATP}-Kanals bei Koronararterienokklusion im Rahmen der Ischämischen Präkonditionierung zu einer Verringerung der Infarktgröße führte (Grover et al 1989). Nachteilig kann sich jedoch auswirken, daß die Verkürzung des Aktionspotentials durch K^+ _{ATP}-Kanal-Aktivierung auch zu einer Verkürzung der Refraktärperiode führt. Dies kann zu Arrhythmien, wie sie häufig im

Rahmen eines Myokardinfarktes auftreten, führen. Untersuchungen mit einem kardioselektiven K^+ _{ATP}-Kanal-Blocker von Billman et al. (1998) konnten das an Hunden nach artefizielltem Myokardinfarkt belegen. Riccioppo et al. (1997) zeigten jedoch auch an isolierten Purkinje-Zellen des Kaninchens, daß es bei Öffnung des K^+ _{ATP}-Kanals durch Rilmakalim zu einer Hyperpolarisation der Purkinje-Fasern kommt und so eine antiarrhythmische Wirkung erzielt werden kann.

4.1.2 Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid und Glimepirid

Glibenclamid und Glimepirid gehören zu den Antidiabetika vom Sulfonylharnstofftyp. Die blutzuckersenkende Wirkung eines Sulfonamid-Derivats wurde 1942 zufällig von Janbon et al. entdeckt, die beobachteten, daß manche Sulfonamide in Tierversuchen zu Hypoglykämien führten. Die Untersuchung dieses Phänomens wurde ausgeweitet und führte zum klinischen Einsatz des ersten Sulfonylharnstoffderivates 1-Butyl-3-Sulfonylharnstoff (Carbutamid). Carbutamid wurde später wegen gravierender Nebenwirkungen, wie z.B. einer ausgeprägten Knochenmarksdepression, vom Markt genommen, führte aber zur Entwicklung einer ganzen Gruppe antidiabetogener Sulfonylharnstoffderivate.

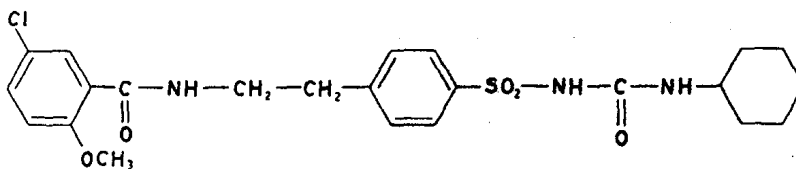


Abb. 15 : Strukturformel des Sulfonylharnstoffderivates Glibenclamid

Der ersten Generation der Sulfonylharnstoffe gehören Wirkstoffe wie Tolbutamid, Azetohexamid und Chlorpropamid an. Glibenclamid zählt wie Glibizide und Gliclazide zu den Wirkstoffen der zweiten Generation. Glimepirid ist der neueste Vertreter dieser zweiten Sulfonylharnstoffgeneration.

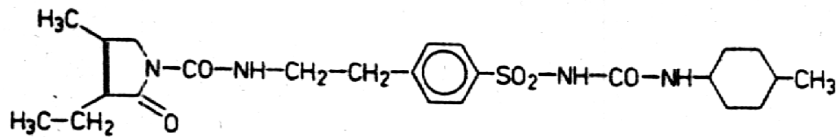


Abb. 16 : Strukturformel des Sulfonylharnstoffderivates Glimperid

Glimperid hat die gleiche sekretorische Wirkung auf die pankreatische β -Zelle wie Glibenclamid, ~~wohl~~ Glimperid an einem anderen Protein ~~es~~ Sulfonylharnstoffrezeptors bindet wie Glibenclamid (Müller et al. 1994). Die Gefahr der Hypoglykämie, ~~ist~~ mit einer relativ ~~hoh~~ Inzidenz während einer antidiabetischen Therapie mit Glibenclamid auftreten kann, wird für Glimperid ~~er~~inger ~~ge~~ingeschätzt (Draeger 1995). Im Gegensatz ~~u~~ z Glibenclamid ~~bes~~itzen Metabolite von Glimperid eine nur schwach ausgeprägte Wirkung auf den Serum-Glucosespiegel. Dies wurde durch eine klinische Studie gestützt, in ~~deren~~ Rahmen es ~~et~~ener zu Hypoglykämien ~~un~~ter Glimperid-Gabe ~~is~~ unter Glibenclamid-Therapie kam (Draeger et al. 1994). HbA_{1c}-Spiegel und Nüchtern-Glucose-Werte im Serum, als Ausdruck der metabolischen Einstellung der Patienten, waren ~~ter~~ ~~un~~den Medikamenten ~~icht~~ n signifikant unterschiedlich. Pharmakokinetisch zeichnet sich Glimperid ~~sch~~ durch eine ~~u~~ verlängerte Halbwertszeit aus, welche ~~ist~~ eine ~~ein~~malige Tagesdosierung ermöglicht. Weiterhin zeigte sich ~~in~~ ~~den~~ experimentellen Studien an Ratten, ~~da~~ß Glimperid einen präventiven Effekt bezüglich des Auftretens eines Diabets mellitus Typ 1 hat (Cheta et al. 1995).

Ihre blutzuckersenkende Wirkung lösen ~~ist~~ Sulfonylharnstoffe durch Blockade ~~des~~ K^+ _{ATP}-Kanals aus, der in der Membran der insulinproduzierenden, pankreatischen β -Zellen zu finden ist. In einem euglykämischen Milieu sind ~~die~~ K^+ _{ATP}-Kanäle der pankreatischen β -Zellen geöffnet, was über einen Kaliumionenausstrom zu einer ~~relativen~~ Hyperpolarisation ~~der~~ Zelle führt. Eine Hyperglykämie bewirkt ~~in~~ ~~der~~ β -Zelle des Pankreas einen Anstieg des intrazellulären ATP's bzw. einer Verschiebung des ATP/ADP-Verhältnisses in Richtung ATP. Diese Gleichgewichtsverschiebung führt zum Schluß ~~des~~ K^+ _{ATP}-Kanals und ~~er~~ d Kaliumionenausstrom ~~sistiert~~. Dadurch sinkt das ~~membranpot~~ential der Zelle, ~~ie~~ d Zellmembran ~~epolarisiert~~ ~~eilweise~~. Diese Teildepolarisation führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calciumionenkanäle, welche durch Steigerung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration eine Insulinsekretion der Zelle auslöst.

Zur Überprüfung des Einflusses der Sulfonylharnstoffe ~~uf~~ die Kontraktilität von Kardiomyozyten wurden jeweils die Konzentrationen eingesetzt, ~~die~~ der maximalen Sulfonyl-

harnstoff-Konzentration in den Kombinationsuntersuchungen mit Rilmakalim entsprachen. Diese Konzentrationen betragen für Glibenclamid μmol und für Glimepirid μmol . In diesen Konzentrationen trat sowohl für Glibenclamid als auch für Glimepirid ein signifikanter Einfluß auf die Kardiomyozytenkontraktilität nachgewiesen werden. Dementsprechend war auch ein signifikanter unterschiedlicher Einfluß der beiden Substanzen zu erkennen. Das Ausbleiben einer Wirkung der K^+ _{ATP}-Kanal-schließenden Sulfonylharnstoffe auf die Kardiomyozytenkontraktilität ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß bereits vor Beginn des Versuches die K^+ _{ATP}-Kanäle der Kardiomyozyten annähernd vollständig geschlossen waren. Dies läßt sich dadurch erklären, daß zu dem Versuchsbeginn und während des Versuches die Energieversorgung der Zellen durch das glucosehaltige Versuchsmedium gesichert war. Da die Öffnung der K^+ _{ATP}-Kanäle erst bei intrazellulärem Energiemangel ausgelöst wird, waren wohl kaum offene K^+ _{ATP}-Kanäle vorhanden, die durch den jeweiligen Sulfonylharnstoff hätten verschlossen werden können. In Bezug auf die kontraktilitätsbeeinflussende Wirkung des Rilmakalims bedeutet dies, daß anzunehmen ist, daß auch vor Gabe des Rilmakalims die K^+ _{ATP}-Kanäle der Kardiomyozyten geschlossen waren. Dies läßt weiterhin den Schluß zu, daß die oben beschriebene Kontraktilitätsabnahme durch Rilmakalim, die durch Öffnen der vorher geschlossenen K^+ _{ATP}-Kanäle erreicht wird, durch eine Wirkung auf nahezu alle K^+ _{ATP}-Kanäle des Kardiomyozyten bedingt ist (Terzic et al. 1994). Die Rilmakalimkonzentration von μmol , die in der vorliegenden Untersuchung zu einer halbmaximalen Kontraktilitätshemmung geführt hat, entspricht demnach der Rilmakalim-Konzentration, die die halbmaximale Öffnung der K^+ _{ATP}-Kanäle bewirkte. Diese Vorstellung wird unterstützt durch die von Terzic et al. e nachgewiesene Rilmakalimkonzentration welche in patch-clamp-Untersuchungen zu einer halbmaximalen Hemmung von K^+ _{ATP}-Kanälen geführt hat. Diese Rilmakalimkonzentration korreliert mit dieser Arbeit nachgewiesenen Konzentration, welche zu einer halbmaximalen Kontraktilitätshemmung führte.

4.1.3 Beeinflussung der Kontraktilität durch Glibenclamid und Glimepirid in Verbindung mit Rilmakalim

Die Versuchsergebnisse zeigten eine konzentrationsabhängige Aufhebung des kontraktilitätsmindernden Effektes von Rilmakalim durch beide Sulfonylharnstoffderivate. Bereits im nanomolaren Bereich waren beide Sulfonylharnstoffderivate in der Lage, die Wirkung von Rilmakalim zu ableiten. Es ist davon auszugehen, daß die Inhibition des Rilmakalim-Effektes durch die verwendeten Sulfonylharnstoffderivate auf einer Inhibition des K^+ _{ATP}-Kanals beruht, der von Rilmakalim aktiviert wird. Diese Inhibition des K^+ _{ATP}-Kanals ist für Glibenclamid bereits mehrfach beschrieben worden (Findley et al. 1992, Jiang et al. 1994). Die spezielle Inhibition der K^+ _{ATP}-Kanal öffnenden Wirkung von Rilmakalim durch Glibenclamid ist bereits untersucht worden (Terzic et al. 1994a). Die K^+ _{ATP}-Kanal-Inhibition wird über einen sogenannten Sulfonylharnstoffrezeptor am K^+ _{ATP}-Kanal vermittelt (Abb. 17). Findley et al. vermuteten 1992, daß sich der Sulfonylharnstoffrezeptor in der Lipidphase des Sarkolemms befindet.

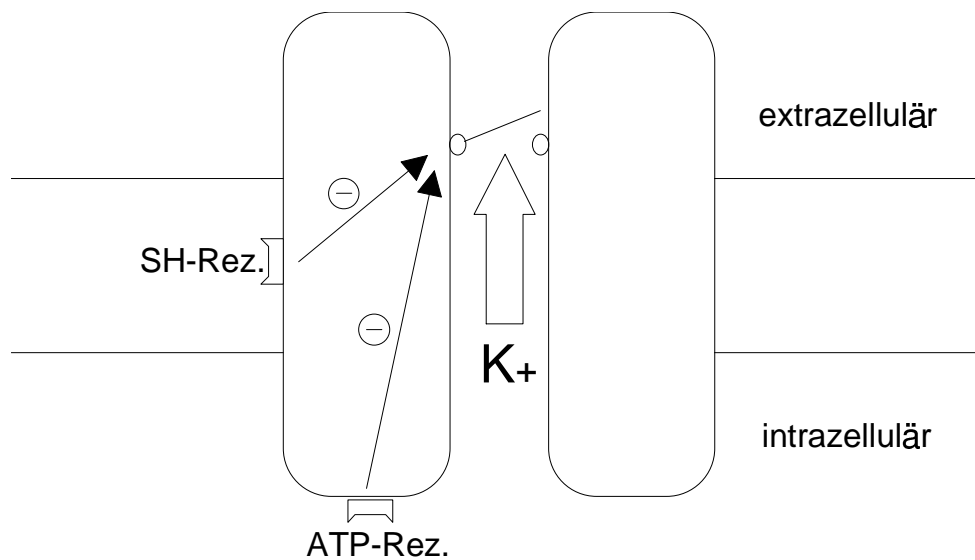


Abb. 17: Aufbau des ATP-abhängigen Kaliumkanals. In Anwesenheit eines Sulfonylharnstoffes wie Glibenclamid kommt es zu einem Schluß des Kanals. Ebenso ist der Kanal bei intrazellulären physiologischen ATP-Konzentrationen geschlossen. Kommt es zu einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration, löst sich ATP von dem ATP-Rezeptor des K^+ _{ATP}-Kanal, was zu einer Kanalöffnung führt.

Endogene Liganden dieses Sulfonylharnstoffrezeptors, „Endosulfine“, sind bereits nachgewiesen worden (Virsolvy-Vergine et al. 1992).

Kramer et al. zeigten 1995, daß der Sulfonylharnstoff-Rezeptor zwei Untereinheiten besitzt, welche unterschiedliche Sulfonylharnstoffderivate mit unterschiedlichen Affinitäten und kinetischen Parametern binden.

Bei allen hier untersuchten Konzentrationen zeigte sich, daß Glibenclamid die Rilimakalimwirkung stärker inhibiert als Glimepirid. Signifikant war dies vor allem bei einer Sulfonylharnstoffkonzentration von 10^{-6} mol/l. Aber auch bei höheren Konzentrationen erreichte die Inhibition durch Glimepirid nicht den Grad, der durch Glibenclamid erreicht wurde. Dies legt den Schluß nahe, daß Glimepirid zum einen eine geringere Rezeptor-Affinität aufweist. Das zeigt sich darin, daß die Glimepirid-Konzentration, die zu einer annähernd halbmaximalen Rilimakalim-Inhibition führt, höher ist als die äquipotente Glibenclamidkonzentration. Zum anderen scheint der maximale Effekt von Glimepirid unter dem des Glibenclamids zu liegen. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Geisen et al. (1996), die die Inhibition von Rilimakalim aktivierten K^+ _{ATP}-Kanälen durch Glibenclamid und Glimepirid untersuchten. Glimepirid zeigte auch eine geringere Inhibition des Rilimakalim Effektes, die maximale Inhibition lag unter der von Glibenclamid.

Die unterschiedliche Inhibition der Kontraktilitätshemmung der Sulfonylharnstoffe ließ sich nach dem hypothetischen Modell des Sulfonylharnstoffrezeptors der β -Zelle des Pankreas nach Kramer et al. (1995) jedoch auch in dem Sinne interpretieren, daß Glimepirid und Glibenclamid an unterschiedliche Untereinheiten des Rezeptors binden. Diese würden wiederum unterschiedlich den Zustand des K^+ _{ATP}-Kanals beeinflussen. Die Expression dieser Untereinheiten sowie deren kinetische Einflüsse auf den Ionen-Kanal können von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein. Durch Koexpression der entsprechenden Kanalproteine mit Sulfonylharnstoff-bindenden Proteinen (Untereinheiten) ließen sich deren Wechselwirkungen im jeweiligen Gewebe näher definieren.

Kürzlich untersuchten Klepzig et al. (1999) in einer klinischen Studie die Wirkung von Glibenclamid und Glimepirid auf die ischaemische Präkonditionierung des Herzmuskels. Zu diesem Zweck wurden ST-Streckenveränderungen während percutaner Angioplastie von Patienten, die mit Glibenclamid, Glimepirid oder Placebo durchgeföhrt wurden, verglichen. Klepzig et al. (1999) konnten zeigen, daß Glibenclamid die ischaemische Präkonditionierung hemmt, während sie von Glimepirid unbeeinflusst bleibt (Klepzig et al. 1999). Dies deutet ebenso wie die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen unterschiedlichen Effekt der beiden Sulfonylharnstoffe auf den kardialen K^+_{ATP} -Kanal hin, da sowohl die Kontraktilität *in vitro* als auch die ischaemische Präkonditionierung *in vivo* von diesem Kanal beeinflusst werden. Auffällig ist jedoch der quantitative Unterschied zwischen beiden Untersuchungen. Ist der Effekt von Glimepirid auf die Rilmakalim induzierte Kontraktilitätsminderung in der vorliegenden Untersuchung zwar signifikant niedriger als der von Glibenclamid, so schwächt Glimepirid diese Kontraktilitätsminderung dennoch deutlich ab. In den Untersuchungen von Klepzig et al. war jedoch der Effekt von Glimepirid vergleichbar mit Placebo, d. h. die durch die sequentiellen Ballonentfaltungen induzierte ischaemische Präkonditionierung wurde durch Glimepirid nicht beeinträchtigt. Die quantitativ unterschiedlichen Effekte von Glimepirid auf die durch den K^+_{ATP} -Kanal beeinflussten Prozesse Kontraktilität und ischaemische Präkonditionierung könnten zum einen durch die Spezies-Unterschiede zwischen Meerschweinchen und Mensch erklärt werden. Ein weiterer Erklärungsansatz ergibt sich aus der neuen Erkenntnis, daß sich innerhalb des Kardiomyozyten K^+_{ATP} -Kanäle an unterschiedlicher Stelle befinden, welche unterschiedliche Effekte auslösen können. So ist kürzlich neben dem bekannten sarkolemmlen K^+_{ATP} -Kanal ein mitochondrialer K^+_{ATP} -Kanal beschrieben worden, der hauptverantwortlich für die ischaemische Präkonditionierung sein soll. Die Funktion dieses K^+_{ATP} -Kanals soll wie auch die Funktion des sarkolemmlen Kanals über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Proteinkinase C beeinflussbar sein (Holmuhamedov et al. 1998, Liu et al. 1998, Gross et al. 1999, Wang et al. 1999).

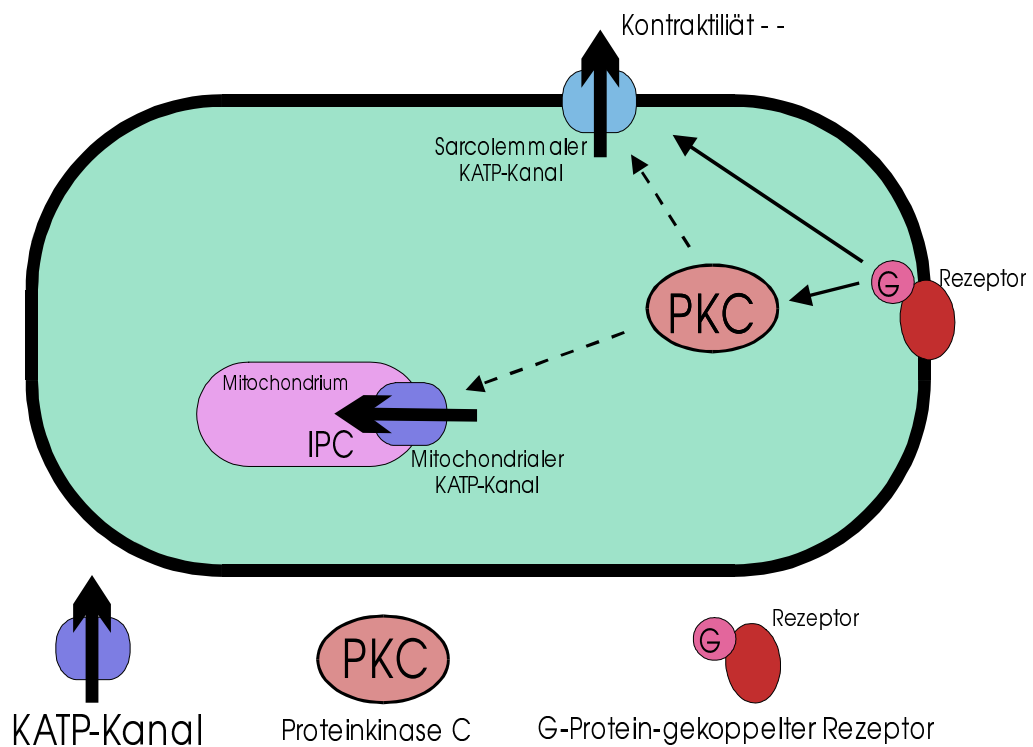


Abb. 18: Verteilung unterschiedlicher K^+_{ATP} -Kanaltypen innerhalb des Kardiomyozyten. Neben dem sarcolemmalen K^+_{ATP} -Kanal, der eine Kontraktilitätsminderung vermitteln kann, gibt es einen mitochondrialen K^+_{ATP} -Kanal, welcher in Verbindung mit der ischämischen Präkonditionierung (IPC) gesehen wird. Die Funktion beider Kanäle kann G-Protein-vermittelt durch Proteinkinase C beeinflusst werden.

Nimmt man an, daß Glibenclamid und Glimepirid eine unterschiedlich ausgeprägte Wirkung auf den sarcolemmalen zw. mitochondrialen K^+_{ATP} -Kanal haben, könnte dies den unterschiedlich starken Effekt der Substanzen auf Kontraktilität und Ischämische Präkonditionierung erklären.

4.2 Effekt der Sulfonylharnstoffe und Rilmakalim auf die Zellvitalität

Die zur Bestimmung der Wirkung von Glibenclamid, Glimepirid und Rilmakalim durchgeführten LDH-Messungen ergaben einen kennenswerten Zelltod während der zweistündigen Stimulationszeit. Keine der Substanzen erzielte in den ermittelten Konzentrationen eine toxische Potenz gegenüber Kardiomyozyten.

Vorstellbar wäre ein günstiger Einfluß von Rilmakalim auf das Überleben der Kardiomyozyten gewesen, da dieses über einen negativ inotropen Effekt zur Senkung des zellulären Energieverbrauchs führen kann. Ein Überlebensvorteil für Kardiomyozyten, die in einer Rilmakalim enthaltenden Lösung über zwei Stunden stimuliert wurden, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte die insgesamt geringe Schädigung der Kardiomyozyten sein, die es unmöglich machte, geringe Überlebensvorteile darzustellen.

Die hier dargestellten Resultate bezüglich Glimepirid stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Schollmeier et al. (1993) und Donaubauer et al. (1993), die in Tierversuchen weder akute noch chronische Toxizität von Glimepirid nachweisen konnten.

Die Sensitivität der Zellschädigung könnte im Vergleich zu den durchgeführten Untersuchungen gesteigert werden, indem man zur Bestimmung des „cell injury index“ Zellsuspensionen einsetzt, die nur aus vitalen Zellen bestehen. Dies war in den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der verwendeten Methode zur Zellisolierung nicht möglich.

Um einen eventuellen protektiven Effekt von Rilmakalim nachzuweisen, müßte man die Kardiomyozyten zusätzlich einem schädigendem Agens, beziehungsweise einer schädigenden Umgebung (sauerstoffarmen Nährlösung) aussetzen. Ein in diese Richtung ehendiger Versuchsaufbau wurde von Siegmund et al. (1992) beschrieben, die Kardiomyozyten mittels Stickstoffatmosphäre unter ischämischen Bedingungen untersuchten.

4.3 Schlußfolgerungen

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das neu entwickelte orale Antidiabetikum Glimpirid (Amaryl®) eine durch den K_{ATP}^+ -Kanal Öffner Rilmakalim hervorgerufene Kontraktilitätsminderung isolierter Kardiomyozyten des Meerschweinchens geringer aufhebt als sein Vorgänger Glibenclamid. Dies deutet darauf hin, daß Glimpirid im Vergleich zu Glibenclamid eine geringere blockierende Wirkung auf den kardialen K_{ATP}^+ -Kanal hat. Da der Effekt der Sulfonylharnstoffe auf den kardialen K_{ATP}^+ -Kanal mit möglichen kardiovaskulären Nebenwirkungen in Verbindung gebracht wird (Garratt et al. 1999) und die untersuchten Glimpiridkonzentrationen den therapeutischen Serumspiegel von Glimpirid einschließen (Ratheiser et al 1993), unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, daß unter Glimpiridtherapie diese Nebenwirkungen geringer sind.

Bezüglich des Einflusses der Substanzen Rilmakalim, Glibenclamid und Glimpirid auf die Vitalität isolierter Kardiomyozyten des Meerschweinchens unter Stimulation konnten in den vorliegenden Untersuchungen für keine der Substanzen ein negativer Effekt nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Das orale Antidiabetikum Glibenclamid ist ein **potenter** Inhibitor des K^+ _{ATP}-Kanals. Die Funktion dieses Kanals ist entscheidend für die ischämische Präkonditionierung, die Myokardschäden unter Sauerstoffmangel vermindern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid in Kombination mit Rilmakalim auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten des Meerschweinchens mittels digitaler Bildanalyse untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß dieser Substanzen auf die Vitalität isolierter Kardiomyozyten des Meerschweinchens unter elektrischer Stimulation durch LDH-Bestimmungen bestimmt.

Rilmakalim verminderte die Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten konzentrationsabhängig. Die Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid zeigten in den untersuchten Konzentrationen keinen Einfluß auf die kardiomyozytäre Kontraktilität. In Kombination mit Rilmakalim konnte gezeigt werden, daß Glimepirid in den untersuchten Konzentrationen (0,03 µmol – 9 µmol) den kontraktilitätsmindernden Effekt von Rilmakalim geringer hemmt als Glibenclamid. Ein Einfluß auf die Vitalität der Kardiomyozyten unter elektrischer Stimulation konnte bei keiner Substanz in den untersuchten Konzentration nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß der Einfluß der Sulfonylharnstoffe auf kardiale K^+ _{ATP}-Kanäle unterschiedlich ausgeprägt ist. Glimepirid scheint im Vergleich zu Glibenclamid in geringerem Ausmaß den sarkolemmalen K^+ _{ATP}-Kanal zu blockieren. Dies läßt vermuten, daß auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen, die über den Einfluß auf den K^+ _{ATP}-Kanal vermittelt werden, unter einer Glimepiridtherapie geringer ausgeprägt sind. Inwieweit diese Annahme zutrifft, muß durch Untersuchungen an humanen Kardiomyozyten und weiteren klinischen Studien verifiziert werden. Neuere Erkenntnisse über unterschiedliche K^+ _{ATP}-Kanaltypen innerhalb des Kardiomyozyten machen es erforderlich, die Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf diese Kanalsubtypen näher zu untersuchen.

6 Literatur

Folgende Literatur wurde zur Erstellung der vorliegenden Arbeit verwandt.

Anderson K. E.: Clinical Pharmacology of Potassium Channel Opener. *Pharmacol Toxicol* **70**, 244-254 (1992)

Ashcroft S. J., F. M. Ashcroft: Properties and Functions of ATP-Sensitive K-Channels. *Cell Signal* **2**, 197-214 (1990)

Ballagi-Pordány G., M. Németh, Z. Aranyi, E. Kékesi, M. Z. Koltai, G. Papp, G. Pogátsa: Effect of Glimpiride in the Electrical Activity of Isolated Rabbit Heart Muscle. *Arzneimittelforschung* **42 (I)**, 111-113 (1992)

Bernadi H. N., Bidard, M. Fosset, M. Hugues, C. Mourre, H. Rehm, G. Romey, H. Schmid-Antomarchi, H. Schweitz, J.R. de Welle, M. Lazdunski: Molecular Properties of Potassium Channels. *Arzneimittelforschung* **39 (I)**, 159-163 (1989)

Billmann G.E., H. C. Englert, B. A. Scholkens: HMR1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Effects on susceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **286 (3)**, 1465-1473 (1998)

Byler R. M., N. A. Sherman, J.S. Warner, L. D. Horwitz: Hydrogen peroxide cytotoxicity in cultured cardiac myocytes is iron dependent. *Am J Physiol* **266 (Heart Circ. Physiol. 35)**, H121-H127 (1994)

Cheta D. M., Lim, E. K. Chan, T. Kunakorn, M. A. Charles: Glimpiride-induced prevention of diabetes and autoimmune events in the BB rat. *Life Sci* **57**, 2281-2290 (1995)

Copelas L., M. Briggs, W. Grossmann, J. Morgan: A method for recording isometric tension development by isolated cardiac myocytes: transducer attachment with fibrin glue. *Pflügers Arch* **408**, 315-317, (1987)

de Weille J. R., M. Fosset, C. Mourre, H. Schid-Antomarchi, H. Bernadi, M. Lazdunski: Pharmacology and regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch* **414 (Suppl 1)**, S80-S87 (1989)

Decker T., M. L. Lohmann-Matthes: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* **15**, 61-69 (1988)

Donaubauer H. H., D. Mayer: Subchronic and chronic Toxicity of the New Sulfonylurea Glimpiride in Rats. *Arzneimittelforschung*. **43 (I)**, 547-549 (1993)

Draeger K.E., H.-J. Lomp, R. Rosskamp: Multicentre clinical trial to study the effects of glimepiride during long-term treatment of type II diabetic patients. *15th Int. Diabetes Congress Kobe Abstr 10A5*, 1051 (1994)

Draeger K. E.: Clinical profile of glimepiride. *Diab Res clin Pract* **28 Suppl.**, S139-S146, (1995)

Duty S., A. H. Weston: Potassium channel openers: Pharmacological effects and future use. *Drugs* **40**, 785-791 (1990)

Englert H. C., K. Mih, D. Gehring: Airway pharmacology of the potassium channel opener, HOE 234, in guinea pigs: in vitro and in vivo studies. *Eur J Pharmacol* **210**, 695 (1992)

Faivre J. F., I. Findlay: Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1029**, 1672 (1990)

Findlay I., J. Faivre: ATP-sensitive K channels in heart muscle. *FEBS lett* **279**, 957 (1991)

Findlay I., E. Deroubaix, P. Guiraudou, E. Coraboeuf: Effects of activation of ATP-sensitive K⁺ channels in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol* **257 (Heart Circ. Physiol. 26)**, H1551-H1559 (1989)

Findlay I.: Inhibition of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cardiac Muscle by the Sulphonylurea Glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **261**, 540-545 (1992)

Findlay I.: Interactive Regulation of the ATP-Sensitive Potassium Channel of Cardiac Muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* **24 (Suppl. 4)**, S6-S11 (1994)

Gaines K. L., S. Hamilton, A. E. Boyd III: Characterization of the Sulfonylurea Receptor on Beta Cell Membranes. *J Biol Chem* **263**, 2589-2592 (1988)

Gavin J. R., Dual Actions of sulfonylureas and Glyburide. *Am J Med* **79 (Suppl. 3)**, 3442 (1985)

Garrat K. N.: Sulfonylurea Drugs Increase Early Mortality in Patients With Diabetes Mellitus After Direct Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **33**, 119-124 (1999)

Geisen K.: Special Pharmacology of the New Sulfonylurea Glimepiride. *Arzneimittelforschung* **38 (II)**, 1120-1130 (1992)

Geisen K., A. Vegh, E. Krause, G.JPapp: Cardiovascular effects of conventional sulfonylureas and glimepiride. *Horm Metab Res* **28**, 496-507 (1996)

Gross G. J.R. M. Fryer: Sarcolemmal Versus Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels and Myocardial Preconditioning. *Circ Res* **84**, 973-979 (1999)

Grover G. : Protective Effects of ATP-Sensitive Potassium-Channel Openers in Experimental Myocardial Ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* **24 (Suppl. 4)**, S18-S27 (1994)

Haffner S. M., S. Lehto, T. Rönnemaa, K. Pyörälä, M. Laakso: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J med* **229**, 229-234 (1998)

Hansen P. R., G. Stawski: Neutrophil mediated damage to isolated myocytes after anoxia and reoxygenation. *Cardiovasc Res* **28**, 565-569 (1994)

Hardman J. G., Limbird L. E. (eds): Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill ninth edition **1996**

Headrick J. P.: Ischemic Preconditioning: Bioenergetic and Metabolic Changes and the Role of Endogenous Adenosine. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1227-1240 (1996)

Hearse D. : Activation of ATP-sensitive potassium channels: a novel pharmacological approach to myocardial protection? *Cardiovasc Res* **30**, 1-17 (1995)

Heath B. M., D. A. Terrar: Effect of glibenclamide, forskolin, and isoprenaline on the parallel activation of K^+_{ATP} and reduction of I_K by cromakalim in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **28**, 818-822 (1994)

Hiraoka M., Z. Fan: Activation of ATP-Sensitive Outward K^+ Current by Nicorandil (2-Nicotinamidoethyl Nitrate) in Isolated Ventricular Myocytes. *Am J physiol* **250**, ~~288~~ (1989)

Holmuhamedov E. L., S. Jovanovic, P. P. Dzeja, A. Jovanovic, A. Terzic: Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol* **275** (Heart Circ. Physiol. **44**), H1567-H1576 (1998)

Horie M., H. Irisawa, A. Noma: Voltage-Dependent Magnesium Block of Adenosine-Triphosphate-Sensitive Potassium Channel in Guinea-Pig Ventricular Cells. *J Physiol* **387**, 251-272 (1987)

Horwitz L. D., J.A. Leff: Catalase and Hydrogen Peroxide Cytotoxicity in Cultured Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **27**, 909-915 (1995)

Imamura Y., H. Tomoike, T. Narishige, T. Takahashi, H. Kasuya, A. Takeshita: Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am J Physiol* **263** (Heart Circ Physiol **32**), H399-H404 (1992)

Jiang C., S. Mochizuki, P. A. Poole-Wilson, S. E. Harding, K. T. MacLeod: Effect of lemakalim on action potentials, intracellular calcium, and contraction in guinea pig and human cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **28**, 851-857 (1994)

Kannel W. B., D. L. McGee: Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham Study. *Diab Care* **2**, 120-126 (1979)

Klepzig H., G. Kober, C. Matter, H. Luus, H. Schneider, K. H. Boedeker, W. Kiowski, F. W. Amann, D. Gruber, S. Harris, W. Burger: Sulfonylureas and ischemic preconditioning. *Eur Heart J* **20**, 439-446 (1999)

Koyano T., M. Kakei, H. Nakashima, M. Yoshinaga, T. Matsuoka, H. Tanaka: ATP-Regulated Channels are modulated by Intracellular H⁺ in Guinea-Pig Ventricular Cells. *J. Physiol.* **463**, 747-766, (1993)

Kramer W, G. Müller, F. Girbig, U. Gutjahr, S. Kowaleswki, D. Hartz, H. Stumm: The molecular interaction of Sulfonylureas with β -cell ATP-sensitive K⁺-channels. *Diab Res clin Pract* **28 Suppl.**, S67-S80 (1995)

Krause E., H. Englert, H. Gögelein: Adenosine triphosphate-dependent K currents activated by metabolic inhibition in rat ventricular myocytes differ from those elicited by the channel opener rilmakalim. *Eur J Physiol* **429**, 625-635 (1995)

Lazdunski M.: ATP-Sensitive Potassium Channels: An Overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **24** (Suppl. 4), S1-S5 (1994)

Lebrun P., M. H. Antoine, A. Herchuelz: K⁺ Channel Openers and Insulin Release. *Life Sci* **51**, 795-806 (1992)

Leclercq-Meyer V., A. G. Akkan, J. Marchand, W. J. Malaisse: Effects of glimepiride and glibenclamide on insulin and glucagon secretion by the perfused rat pancreas. *Biochem Pharmacol* **42**, 1634-1637 (1991)

Leclercq-Meyer V., W. Malaisse: Enhancement by Succinic Acid Dimethyl Ester of Insulin Release Evoked by D-Glucose and Glimepiride in the Perfused Pancreas of Normoglycemic and Hyperglycemic Rats. *Biochem Pharmacol* **47**, 1519-1524 (1994)

Legrand C., J.M. Bour, C. Jæob, J.Capiaumont, A. Martial, A. Marc, M. Widtkke, G. Kretzmer, C. Demangel, D. Duval, J.Hache: Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Biotechnol* **25**, 231-243 (1992)

Leitch SP., H. F. Brown: Effect of Raised Extracellular Calcium on Characteristics of the Guinea-pig Ventricular Action Potential. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 541-551 (1996)

Linz W., E. Klaus, U. Albus, R. Becker, D. Mania, H. C. Englert, B. A. Schölkens: Cardiovascular Effects of the Novel Potassium Channel Opener (3S,4R)-3-Hydroxy-2,2-dimethyl-4-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)-6-phenylsulfonylethylchromane Hemihydrate. *Arzneimittelforschung* **42 (II)**, 1180-1185 (1992)

Liu Y., T. Sato, B. O'Rourke, E. Marban: Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels. *Circulation* **97**, 2463-2469 (1998)

Losano G., D. Gattullo, P. Pagliaro: Myocardial, Neural and Vascular Aspects of Ischemic Preconditioning. *Life Sci* **59**, 1185-1192 (1996)

Lynch J. M., C. Sanguinetti, S. Kimura, A. L. Bassett: Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. *FASEB J* **92**, 2952-2960 (1992)

Mei D. A., G. Gross: Evidence for the involvement of the ATP-sensitive potassium channel in a novel model of hypoxic preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res* **30**, 222-230 (1995)

Mellemkjaer S., F. Nielsen Kudsk: Dynamic Effects and Pharmacokinetics of Lemakalim in the Isolated Guinea-Pig Heart. *Pharmacol Toxicol* **73**, 96-102 (1993)

Müller G., D. Hartz, J.Pünter, R. Ökonomopulus, W.Kramer: Differential interaction of glimepiride and glibenclamide with the β -cell sulfonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* **1191**, 267-277 (1994)

Müller G., A. Korndörfer, U. Kornak, W. Malaisse: Porin Proteins in Mitochondria from Rat Pancreatic Islet Cells and White Adipocytes: Identification and Regulation of Hexokinase Binding by the Sulfonylurea Glimepiride. *Arch Biochem Biophys* , **308**3 (1994)

Müller G., E. A. Dearey, A. Korndörfer, B.Widlow: Stimulation of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-specific Phospholipase by Insulin and the Sulfonylurea, Glimepiride, in Rat Adipocytes Depends on Increased Glucose Transport. *J Cell Biol* **126**, 1267-1276 (1994)

Müller G., S. Wed, E. M. Wetekam, A. Crecelius, A. Unkelbach, J.Pünter: Stimulation of Glucose Utilization in 3T3 Adipocytes and Rat Diaphragm in Vitro by the Sulphonylureas, Glimepiride and Glibenclamide, is correlated with Modulations of the AMP Regulatory Cascade. *Biochem Pharm* **48**, 985-996 (1994)

Müller G., S. Widl: The Sulfonylurea Drug, Glimepiride, Stimulates Glucose Transport, Glucose Transporter Translocation, and Dephosphorylation In Insulin-Resistant Rat Adipocytes In Vitro. *Diabetes* **42**, 1852-1867 (1993)

Mutschler E.: Arzneimittelwirkungen, WVG 7. Auflage **1996**

Nakayama K., Z. Fan, F. Marumo, M. Hiraoka: Interrelation Between Pinacidil and Intracellular ATP Concentrations on Activation of the ATP-Sensitive K^+ Current in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Circ Res* **67**, 1124-1133 (1990)

Nichols C. G., W. Lederer: Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* **261** (Heart Circ. Physiol. **30**), H1675-H1686 (1991)

Nichols C. G., A. N. Lopatin: Trypsin and α -chymotrypsin treatment abolishes glibenclamide sensitivity of K^+_{ATP} channels in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **422**, 617-619 (1993)

Noma A. : ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-150 (1983)

Noma A., Shibasaki T.: Membrane current through adenosin-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* **363**, 463-480 (1985)

Olbrich H.G., H. Geerts, U. Wmman, E. Mutschler, L. Ver Donck, G. Kober, M. Kaltenbach: The Effect of Cyclosporine on Electrically Paced Isolated Rat Cardiomyocytes. *Transplantation* **51**, 972-976 (1991)

Opie L. H.: Regulation of Myocardial Contractility. *J Cardiovasc Pharm* **26(Suppl.)**, S1-S9 (1995)

Pan J., E. K. Chan, D. Cheta, V. Schranz, M. A. Charles: The Effects of Nicotinamide and Glimpiride on Diabetes Prevention in BB Rats. *Life Sci* **57**, 1525-1532 (1995)

Pogátsa G.: Potassium channels in the cardiovascular system. *Diab Res clin Pract* **28 Suppl.**, S91-S98 (1995)

Racher A. D., Looby, B. Griffiths: Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* **3**, 301-307 (1990)

Ratheiser K., A. Korn, W. Idhau, M. Komjati, H. Vierhapper, M. Badian, V. Malerczyk: Dose Relationship of Stimulated Insulin Production Following Intravenous Application of Glimepiride in Healthy Man. *Arzneimittelforschung* **43 (II)**, 856-858 (1993)

Riccioppo N. F., O. Mesquita Junior G. B. Olivera: Antiarrhythmic and electrophysiological effects of the novel KATP channel opener, rilmakalim in rabbit cardiac cells. *Gen Pharmacol* **29 (2)**, 201-205 (1997)

Richer C., J. Pratz, P. Mulder, S. Mondot, J.F. Giudicelli, I. Caverio: Cardiovascular and Biological Effects of K⁺ Channel Openers, a Class of Drugs with Vasorelaxant and Cardioprotective Properties. *Life Sci* **47**, 1693-1705 (1990)

Riehle J., M. Breiter-Hahn: Ouabain and Digitoxin as Modulators of Chick Embryo Cardiomyocyte Energy Metabolism. *Arzneimittelforschung* **44 (II)**, 943-947 (1994)

Rose H., K. H. Strotmann, S. Pöpping, Y. Fischer, D. Kulsch, H. Kammermeier: Simultaneous measurement of contraction and oxygen consumption in cardiac myocytes. *Am J Physiol* **261 (Heart Circ. Physiol. 30)**, H1329-H1334 (1991)

Samaha F. F., H. Wemmann, C. Ince, Fleming, R. S. Balaban: ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am J Physiol* **262 (Cell Physiol. 31)**, C1220-C1227 (1992)

Schollmeier U., R. Brunk, D. Mayer: Subchronic and chronic Toxicity of the New Sulfonylurea Glimepiride in Dogs. *Arzneimittelforschung* **43 (II)**, 1068-1071 (1993)

Schwartz S., P. Raskin, V. Fonseca, F.J. Graveline: Effect of Troglitazone in insulin-treated patients with type II Diabetes mellitus. *N Engl J Med* **338**, 861-866 (1998)

Shepherd N., M. Vornanen, G. Isenberg: Force measurement from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* **258 (Heart Circ. Physiol. 27)**, H452-H459 (1990)

Siegmund B., R. Zude, H. M. Piper: Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *Am J Physiol* **263 (Heart Circ Physiol 32)**, H1262-H1269 (1992)

Stamler J., O. Vaccaro, J.D. Neaton, D. Wentworth: Diabetes, other risk factors, and 12 yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Intervention Trial. *Diabetes Care* **16**, 434-444 (1993)

Steenbergen C., M. E. Perlman, R. E. London, E. Murphy: Mechanism of Preconditioning. *Circulation* **72**, 112-125 (1993)

Takano M., D. Qin, A. Noma: ATP-dependent decay and recovery of K⁺ channels in guinea pig cardiac myocytes. *Am J Physiol* **258 (Heart Circ. Physiol. 27)**, H45-H50 (1990)

Terzic A., A. Langir, Y. Kurachi: HOE234, a Second Generation K⁺ Channel Opener Antagonizes the ATP-Dependent Gating of Cardiac ATP-Sensitive K⁺ Channels. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 818-825 (1994a)

Terzic A., R. T. Tung, A. Inanobe, T. Katada, Y. Kurachi: G Proteins Activate ATP-Sensitive K⁺ Channels by Antagonizing ATP-Dependent Gating. *Neuron* **12** 885-893 (1994b)

Tomai F., F. Crea, A. Gaspardone, F. Versaci, R. De Paulis, A. P. de Peppo, L. Chiariello, P. A. Gioffrè: Ischemic Preconditioning During Coronary Angioplasty Is Prevented by Glibenclamide, a Selective ATP-Sensitive K⁺ Channel Blocker. *Circulation* **90**, 700-705 (1994)

Tung R. T., Y. Kurachi: on the mechanism of nucleotide diphosphate activation of the ATP-sensitive K⁺ Channel in ventricular cell of guinea-pig. *J Physiol* **437**, 239-256 (1991)

University Group Diabetes Program: A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes: II. Mortality results. *Diabetes* **19**, 789-830 (1970)

Virsolvy-Vergine A., H. Leray, S. Kuroki, B. Lupo, M. Dufour, D. Bataille: Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: Purification and partial characterization from ovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6629-6633 (1992)

Wang Y., M. Ashraf: Role of Protein Kinase C in Mitochondrial K_{ATP} Channel-Mediated Protection Against Ca²⁺ Overload Injury in Rat Myocardium. *Circ Res* **84**, 1156-1165 (1999)

Weiss J. N., N. Venkatesh, S. T. Lamp: ATP-sensitive K⁺ Channels and cellular K⁺ loss in hypoxic and ischemic mammalian ventricle. *J Physiol* **447**, 649-673 (1992)

Weston A.H., G. Edwards: recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochem pharmacol* **43**, 47-54 (1992)

Weyer R., V. Hitzel: Acylureidoalkylphenylsulfonyleureas with good glucose lowering efficacy. *Arzneimittelforschung* **38 (II)**, 1079-1080 (1988)

Wolffenbittel B., M. Graal : New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. *Postgrad Med J* **72** , 657-662 (1996)

Yamazaki H., H. Tabata: Sex Difference in Pharmacokinetics of the Novel Sulfonylurea Antidiabetic Glimpiride in Rats. *Arzneimittelforschung* **43 (II)**, 1317-1321 (1993)

Zhenhai Y., G. Gross: The ATP-Dependent Potassium Channel: An Endogenous Cardioprotective Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* **24 (Suppl. 4)**, S28-S34 (1994)

7 Anhang

7.1 Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse

7.1.1 Kontraktilitätsbestimmung

7.1.1.1 Dosis-Wirkungskurve Rilimakalim (RK)

Tab. 6 Tabellarische Darstellung der Kardiomyozyten-Kontraktilität unter Rilimakalim-Einfluß. Jedes Versuchsergebniss entspricht dem Mittelwert aus drei separat gemessenen Zellen pro Tier.

Tier	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert
DMSO	89,5	123	107	89	98,5	99,5		101 ± 5,2
RK 0,1 µmol	64,3	84,7	70,5	61	77,5	64,5		70,5 ± 3,7**
RK 0,3 µmol	59,5	87,7	65	30,5	70,5	59		62 ± 7,6*
RK 1 µmol	37	45,5	50	43	52	87		52,4 ± 7,3**
RK 3 µmol	47	0	6,3	0	0	0	6,5	9 ± 6,5**

7.1.1.2 Sulfonylharnstoffe

Tab. 7 Tabellarische Darstellung der Kardiomyozyten-Kontraktilität unter Sulfonylharnstoff-Einfluß, Glibenclamid (GC) oder Glimepirid (GP). Jedes Versuchsergebniss entspricht dem Mittelwert aus drei separat gemessenen Zellen pro Tier.

Tier	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert
GC 3 µmol	102	95	131	107	107,5	84,5		104,5 ± 6,4
GP 9 µmol	107	98	97,5	105	92	86		97,6 ± 3,2

7.1.1.3 Sulfonylharnstoffe in Kombination mit Rilimakalim

Tab. 8 Tabellarische Darstellung der Kardiomyozyten-Kontraktilität unter Sulfonylharnstoff-Einfluß, Glibenclamid (GC) oder Glimpirid (GP) in Kombination mit 3 µmol Rilmakalim. Jedes Versuchsergebniss entspricht dem Mittelwert aus drei separat gemessenen Zellen pro Tier.

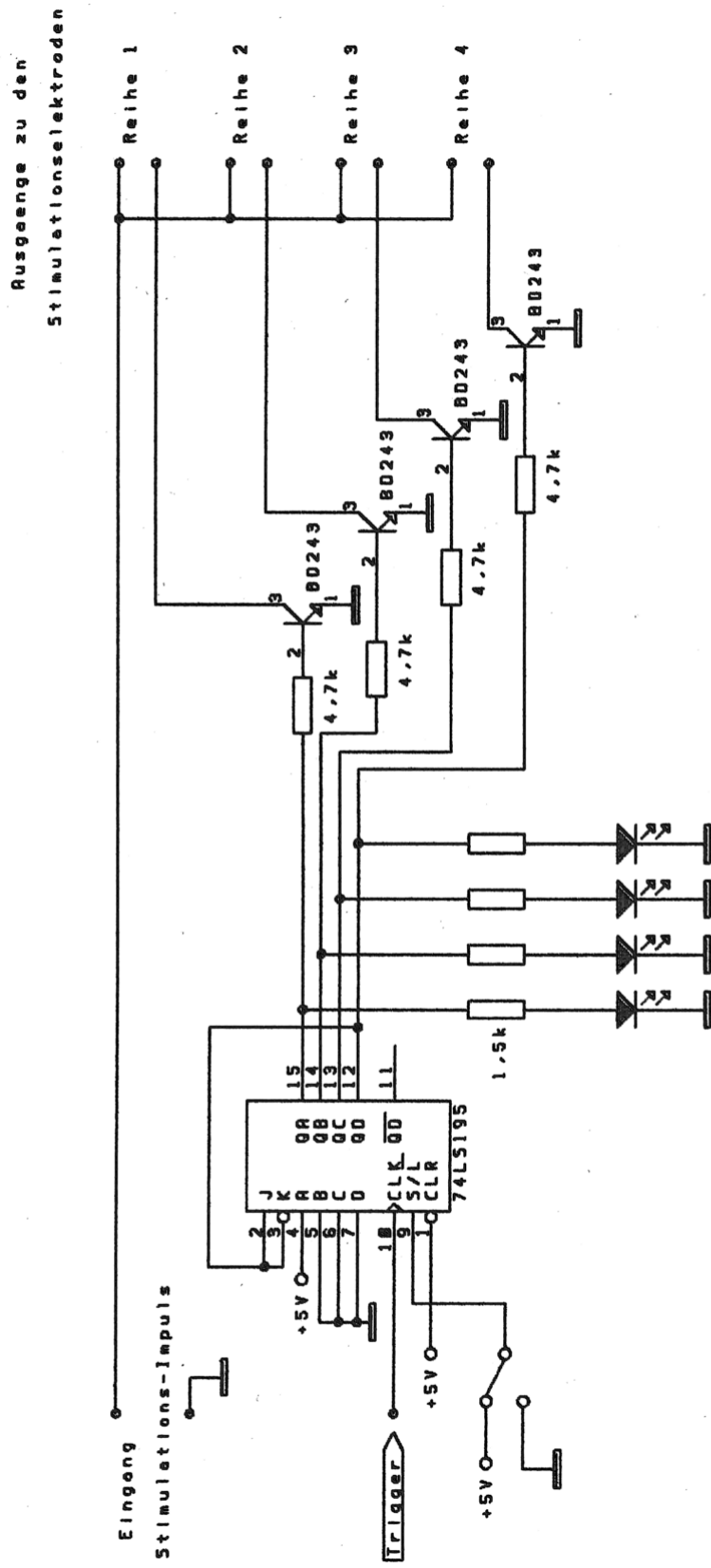
Tier	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert
GC 0,03 µmol	59,5	44	40	42,5	13	58		42,8 ± 6,8 ⁺
GP 0,03 µmol	33	30	19	23	31,5	47		30,6 ± 6,8 ⁺
GC 0,1 µmol	100,5	76	72	96,5	33	70,5	79	75,4 ± 8,3 ^{**}
GP 0,1 µmol	34	49	40,5	53,5	24,5			40,3 ± 8,3 ⁺
GC 0,3 µmol	67,5	103,5	87	87	98	64,5	87,5	85 ± 5,5 [*]
GP 0,3 µmol	81	56	76	45,5	81	94	72	72,2 ± 6,2 ^{**}
GC 1 µmol	93,5	91,5	83	89	87	87,5	89	88,6 ± 1,3 [*]
GP 1 µmol	82	73	84	89,5	73,5	84,5	70	79,5 ± 2,8 ^{**}
GC 3 µmol	109,5	90,5	116	90	83,5	96	95,5	97,3 ± 4,3
GP 3 µmol	80	81	89,5	76	101	63,5	70	80,1 ± 4,7 [*]
GP 9 µmol	98	116	57	96,5	107,5	76,5		91,9 ± 8,8

7.1.2 Cell-Injury-Index der LDH-Bestimmung

Tab. : Cellinjury index nach zweistündiger Kardiomyozyten-Stimulation in den jeweiligen Substanzlösungen Rilmakalim (RK), Glibenclamid (GC), Glimpirid (GP). Als Kontrolle (DMSO) diene eine Lösung mit der maximal vorkommenden Lösungsmittelkonzentration (12 µmol). Jeder Wert stellt den Mittelwert aus drei separaten LDH-Bestimmungen dar.

Tier	1	2	3	4	5	Mittelw.
DMSO	1,8	6,2	-4,5	-6,9	16,2	2,6 ± 4,1
RK3	4,7	4,7	2,8	8,3	11,3	6,4 ± 1,5
GC3	-2,7	-4,9	4,0	7,5	8,7	2,5 ± 2,7
GP9	-1,4	1,0	-2,9	4,3	11,0	2,4 ± 2,5

7.2 Schaltplan der Stimulationskammer-Steuerungselektronik



Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. H.-G. Olbrich und Herrn Prof Dr. Dr. E. Mutschler für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler Frankfurt und die Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Bettina Henke, möchte ich für die fortwährende Unterstützung danken.

Bei Herrn Dirk Mayer möchte ich mich für kritische Diskussionen und entscheidende Impulse bei der Entwicklung der Stimulationskammer bedanken. Vielen Dank auch an Frau Rosemarie Mützel für die exzellenten Fotografien der Heizspule und der Stimulationskammer.

Herzlichen Dank an Marcus Dippel, Nicole Mützel und meinen Vater Dr. Thomas Müller, die wesentliche Teile der Arbeit kritisch gelesen und mit mir diskutiert haben.

All denen, die bei der Fertigstellung meiner Arbeit geholfen haben,

danke ich herzlich,

im besonderen Nicole Mützel.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich in dem Fachbereich Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „**Einfluss von Glimepirid versus Glibenclamid – in Kombination mit dem Kaliumkanalöffner Rilmakalim – auf die Kontraktilität und Vitalität isolierter Herzmuskelzellen des Meerschweinchens**“ im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler und Betreuung durch Herrn PD Dr. H. G. Olbrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bad Homburg, den 5.12.1999

LEBENS LAUF

Persönliche Daten :

Name: Marcus Müller
Geburtstag: 15. Juni 1971
Geburtsort: Bad Homburg, Germany
Nationalität: deutsch

Schul Ausbildung :

1977-1981 Besuch der Grundschule in Bad Homburg
1981-1990 Besuch des Humboldt-Gymnasiums in Bad Homburg,
Fremdsprachen: Englisch, Französisch
Leistungsfächer: Chemie und Biologie
1990 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst :

1990-1991 Zivildienst im Mathias-Claudius Pflegeheim in Aschaffenburg und für das Malteser-Hilfswerk Bad Homburg

Hochschulausbildung :

1991 Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
1992-1998 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
1994 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Neuroanatomie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main für Prof. Dr. Th. Ohm & Prof. Dr. H. Braak.
1995 Amerikanisches Staatsexamen USMLE step1

- 1995-1998 Promotion: „Einfluss von Glimpirid versus Glibenclamid – in Kombination mit dem Kaliumkanalöffner Rilmakalim – auf die Kontraktilität und Vitalität isolierter Herzmuskelzellen des Meerschweinchens“ im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler und Betreuung durch Herrn PD Dr. H. G. Olbrich.
- 1996 Amerikanisches Staatsexamen USMLE step2
- 1997-1998 Praktisches Jahr im Nordwest-Krankenhaus, Frankfurt/Main (Chirurgie, Neurologie, Innere Medizin)
- Seit Juli 1998 Anstellung als Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Direktor: Prof. Dr. E. B. Ringelstein), dort Mitarbeit in der Neuroimmunologischen Arbeitsgruppe (Leiter: PD Dr. R. Kiefer)

Publikationen:

Artikel:

Olbrich H.G., **M. Müller**, S. Lindner, B. Henke, M. Zarse, M. Riehle, G. Oremek, E. Mutschler: Glimpiride (HOE490) inhibits the rilmakalime induced decrease in intracellular free calcium and contraction of isolated heart muscle cells from guinea pigs to lesser extent than glibenclamide. Int J Cardiol (in Druck)

Kongreß-Beiträge:

Zarse M., **M. Müller**, S. Lindner, E. Mutschler, M. Riehle, H. Klepzig, A. M. Zeiher, H. G. Olbrich: Einfluß durch Glibenclamid und Glimpirid (HOE490) auf die durch Rilmakalim-induzierte Kontraktilitätsminderung isolierter Kardiomyozyten. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung 1996

Olbrich H.G., **M. Müller**, S. Lindner, M. Zarse, E. Mutschler: Different actions of glibenclamide and glimepiride (Hoe490) on the effect of rilmakalim on intracellular Ca²⁺ and contraction in isolated cardiomyocytes. XIXth Congress of the European Society of Cardiology 1997, Eur J Cardiol 1997, 18, S. 607

Müller M., K. Wacker K., W. F. Hickey, E. B. Ringelstein, R. Kiefer: Identification of resident macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. Ninth Meeting of the European Neurological Society 1999, J Neurol 1999, 246 (S1), S. I/57

Müller M., K. Wacker, W. F. Hickey, E. B. Ringelstein, R. Kiefer: Eine neue Methode zum Nachweis und der Charakterisierung residenter Macrophagen im peripheren Nervensystem der Ratte. 72. Kongreß Deutsche Gesellschaft für Neurologie 1999

Müller M., K. Wacker, W. F. Hickey, E. B. Ringelstein, R. Kiefer: Combined in situ hybridization and immunohistochemistry on methacrylate embedded nervous tissue. A novel and highly sensitive method to characterize resident macrophages of the peripheral nervous system. Meeting of the German Society of Neuropathology and Neuroanatomy 1999

Müller M., K. Wacker, W. F. Hickey, E. B. Ringelstein, R. Kiefer
Colocalization of immunohistochemical and DNA in Situ hybridization signals in resin embedded tissue. A novel and highly sensitive method using methacrylate embedded serial sections. 29th annual meeting of the Society for Neuroscience 1999