

**Untersuchung von potenziellen Arzneistoffen
mit Wirkung auf die ATP-sensitiven Kaliumkanäle
in isoliert perfundierten Herzen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Astrid Weyermann
aus Herford

Frankfurt am Main 2004

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dr. E. Mutschler und Prof. Dr. A.E. Busch

Datum der Disputation: 05.05.2004

Abkürzungen

5-HD	Natrium-5-hydroxydecanoat
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
bpm	Schläge pro Minute (engl. beats per minute), Einheit für die Herzfrequenz
CK	Kreatin-Kinase (engl. creatin kinase)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt+	Kontraktilität
IC ₅₀	halbmaximale Wirkkonzentration eines Hemmstoffes
IPC	Ischämische Präkonditionierung (engl. ischemic preconditioning)
K _{ir}	einwärts gleichrichtender (engl. inward rectifying) Kaliumkanal
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KH-Puffer	modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LVP	linksventrikulärer Druck (engl. left ventricular pressure)
LVDP	linksventrikuläre Druckdifferenz (engl. left ventricular developed pressure)
LVP _{max}	maximaler linksventrikulärer Druck
LVP _{min}	minimaler linksventrikulärer Druck
MAP	monophasisches Aktionspotential
MAPD ₉₀	Dauer des monophasischen Aktionspotentials bei 90% Repolarisation
MgADP	Magnesium-Adenosindiphosphat
n	Anzahl der Experimente
NO	Stickstoffmonoxid
PKC	Protein-Kinase C
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of the mean)
SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor (engl. sulphonylurea receptor)
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

I	EINLEITUNG.....	1
I.A	Aktionspotential von Herzmuskelzellen.....	2
I.B	ATP-abhängige Kaliumkanäle.....	5
I.B.1	Struktur des K_{ATP} -Kanals	5
I.B.2	Gewebeverteilung des K_{ATP} -Kanals	7
I.B.3	Regulation und Funktion des K_{ATP} -Kanals	8
I.B.4	Pharmakologische Beeinflussung des K_{ATP} -Kanals.....	14
I.C	Herzrhythmusstörungen und deren medikamentöse Therapie.....	16
I.C.1	Formen von Herzrhythmusstörungen.....	16
I.C.2	Klassen der Antiarrhythmika	17
I.C.3	Vorteile von K_{ATP} -Blockern.....	18
I.D	Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
II	MATERIAL UND METHODEN.....	21
II.A	Das isoliert-perfundierte Herz nach Langendorff.....	21
II.A.1	Langendorff-Apparatur	21
II.A.2	Instrumentierung des Herzens.....	23
II.B	Versuchsdurchführung.....	26
II.B.1	Tierspezies.....	26
II.B.2	Präparation der Herzen.....	26
II.B.3	Pufferlösungen	27
II.B.4	Substanzen.....	28
II.C	Versuchsprotokolle.....	29
II.C.1	Meerschweinchenherzen	29
II.C.2	Rattenherzen.....	30
II.D	Datenauswertung und Statistik.....	32
II.D.1	Datenauswertung.....	32
II.D.2	Statistik.....	32
III	ERGEBNISSE.....	34
III.A	Kontrollversuche	34
III.A.1	Wirkung von DMSO in Normoxie.....	34
III.A.2	Wirkung von DMSO in Hypoxie	35
III.A.3	Ischämie	36
III.A.4	Tabellen.....	39
III.B	Vergleichende Testung der K_{ATP}-Blocker.....	41
III.B.1	Glibenclamid und Meglitinid	41
III.B.2	Glibenclamid und S 94 1638.....	51
III.B.3	S 92 0707 und HMR 1098	55
III.B.4	S 92 0707 und S 95 1957	61
III.B.5	HMR 1098 und HMR 1372.....	65

III.B.6	HMR 1098 und HMR 1402.....	69
III.B.7	HMR 1402 und S 0000 405	73
III.B.8	Meglitinid und Repaglinid	77
III.B.9	Wirkung von Antiarrhythmika	81
III.C	Charakterisierung des K_{ATP}-Öffners S1526	84
III.C.1	Ischämische Präkonditionierung	84
III.C.2	Inhibition der IPC durch Natrium-5-hydroxydecanoat	86
III.C.3	Protektion durch Diazoxid	88
III.C.4	Wirkung von S1526 und Diazoxid auf den Koronarfluss	89
III.C.5	Wirkung von S1526 auf die Infarktgröße	90
III.C.6	Kombination von S1526 mit K_{ATP} -Blockern	91
IV	DISKUSSION	93
IV.A	Langendorff-Herz.....	93
IV.A.1	Langendorff-Herzen als Arrhythmie-Modell	93
IV.A.2	Koronarfluss-Messungen	94
IV.A.3	Aktionspotential-Messungen.....	96
IV.B	Wirkungen der K_{ATP}-Blocker	98
IV.B.1	Substanzwirkungen auf die Herzfunktion	98
IV.B.2	Substanzwirkungen auf den Koronarfluss	99
IV.B.3	Substanzwirkungen auf das Aktionspotential	101
IV.B.4	Zusammenfassung der Substanzwirkungen	106
IV.C	Öffner des mitochondrialen K_{ATP}-Kanals.....	108
IV.C.1	Substanzwirkungen auf den Koronarfluss	108
IV.C.2	Substanzwirkungen auf die Infarktgröße	109
IV.D	Bedeutung für die therapeutische Anwendung.....	111
IV.D.1	Inhibitoren von sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen als antiarrhythmische Substanzen	111
IV.D.2	Aktivatoren von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen bei koronaren Herzerkrankungen	113
V	ZUSAMMENFASSUNG	114
VI	LITERATURVERZEICHNIS	116
VII	CURRICULUM VITAE.....	136
VIII	VERÖFFENTLICHUNGEN	137
IX	DANKSAGUNG	138

I Einleitung

Ionenkanäle bilden die Grundlage für die elektrische Erregbarkeit von Herzmuskelzellen. Sie sind hydrophile Poren mit unterschiedlicher, teils sehr hoher Selektivität für die Ionen des Extra- und Intrazellularraums. Der Leitwert von Ionenkanälen wird durch die Konzentration von Ionen auf der intra- und extrazellulären Seite bestimmt. Die Funktion der Ionenkanäle wird über ihre Offenwahrscheinlichkeit gesteuert. Die Regulation kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine große Gruppe wird durch Änderungen der Spannung beeinflusst. Andere werden durch die Bindung eines Transmitters oder Liganden aktiviert. Auch das Zellvolumen und mechanische Reize können Ionenkanäle regulieren (Carmeliet 1999; Thews et al. 1999; Ashcroft 2000).

Unter Ruhebedingungen kann das Membranpotential jeder Zelle als elektrochemisches Gleichgewichtspotential betrachtet werden. Für dessen Betrag sind sowohl die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen als auch die Permeabilität der Zellmembran für diese Ionen bestimmend. Durch das Öffnen von Ionenkanälen wird die Permeabilität verändert, so dass sich ein neues Gleichgewichtspotential einstellen kann. Aufgrund der bestehenden elektrochemischen Triebkraft kommt es zu Ionenströmen durch die geöffneten Kanäle (Thews et al. 1999, Berg et al. 2003).

Die physiologische Relevanz von Ionenkanälen wird durch Erkrankungen unterstrichen, welche auf Mutationen von Kanälen beruhen. Krankheiten wie Herzrhythmusstörungen, Muskelsteifigkeit und Lähmungen, Epilepsie und zystische Fibrose können mittlerweile durch die Fehlfunktion von Ionenkanälen erklärt werden. Umgekehrt haben diese Krankheiten zum Verständnis der physiologischen Funktionen der entsprechenden Ionenkanäle beigetragen (Spooner et al. 1994; Ackerman, Clapham 1997; Ashcroft 2000; Shieh et al. 2000).

I.A Aktionspotential von Herzmuskelzellen

Das Aktionspotential von Herzmuskelzellen wird von den Schrittmacherzellen des Sinusknotens getriggert, indem durch Hyperpolarisation der Zellmembran Ionenkanäle geöffnet werden, die für Natrium- und Kaliumionen permeabel sind. Die daraus resultierende langsame Depolarisation führt bei Erreichen eines Schwellenpotentials zur Öffnung von spannungsabhängigen Natriumkanälen. Dieser Natriumeinstrom (I_{Na}) ist für den raschen Aufstrich des Aktionspotentials verantwortlich (Phase 0). Die Frequenz der Depolarisation des Sinusknotens als primärem Schrittmacherzentrum kann durch nervale Einflüsse variiert werden. So wird durch Freisetzung von Acetylcholin aus parasymphatischen Nervenendigungen über muskarinische (M_2) Rezeptoren ein Kaliumkanal (K_{ACh}) aktiviert, der die Zellmembran hyperpolarisiert und der langsamen Depolarisation entgegenwirkt (Brown 1990; Mutschler et al. 1995; Dascal 1997).

Die Ausbreitung des Aktionspotentials auf den gesamten Herzmuskel erfolgt über das Reizleitungssystem von Atrioventrikular(AV)-knoten, Hisbündel, Kammerschenkeln und Purkinjefasern. Letztere gehen an vielen Stellen in das Myokard über, so dass danach die Weiterleitung zu benachbarten Herzmuskelzellen erfolgen kann und das Herz dadurch synchron erregt wird (Thews et al. 1999).

Im Myokard folgt auf die rasche Depolarisation zunächst eine geringe Repolarisation durch einen kurzen vorübergehenden Kaliumauswärtsstrom (I_{to} „transient outward“; Phase 1). In der Plateauphase (Phase 2) des Aktionspotentials befindet sich der Einstrom von Kalziumionen durch T-Typ- und L-Typ-Kalziumkanäle mit dem Kaliumionenausstrom im Gleichgewicht, so dass die Zellmembran depolarisiert bleibt (Anumonwo et al. 1991; Spooner et al. 1994).

Die elektromechanische Kopplung bewirkt eine Kontraktion des Myokards: Der Kalzium-einstrom während der Plateauphase führt zur Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Das Kalzium schafft durch Bindung an kontraktile Myofilamente die Möglichkeit, mittels ATP-Hydrolyse die Herzmuskelzelle zu kontrahieren.

Der Ausstrom von Kalium erfolgt über eine Vielzahl von Kaliumkanaltypen, die unterschiedlich rasch und lange durch die Depolarisation aktiviert werden (I_{Kur} „ultra rapid“, I_{Kr} „rapid“, I_{Ks} „slow“). Das Aktionspotential wird nach dem Schließen der Kalziumkanäle durch Kaliumströme terminiert (I_{Kr} , I_{Ks} ; Phase 3). Das Ruhemembranpotential (Phase 4) wird dann von der Kaliumpermeabilität bestimmt, bis das nächste Aktionspotential beginnt (Snyders

1999; Nerbonne et al. 2001). Die folgende Abbildung I.1 stellt das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle schematisch dar.

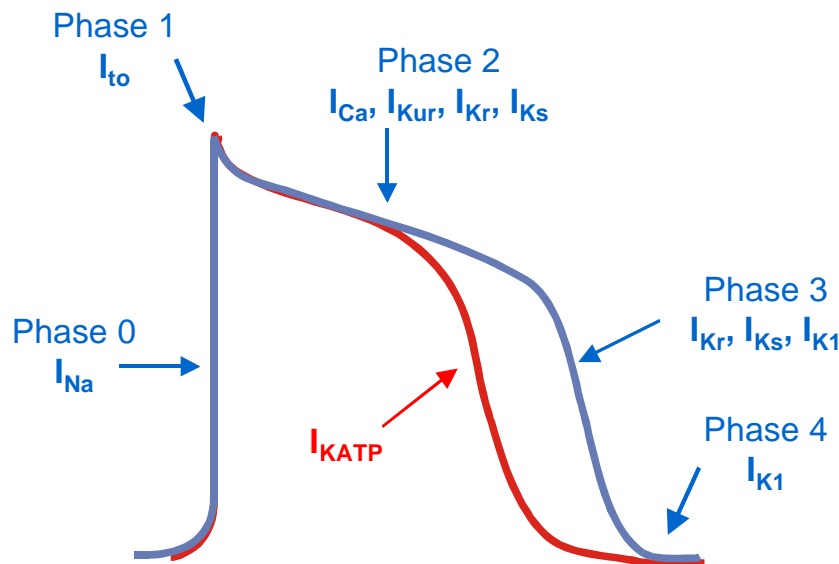


Abbildung I.1: Ventrikuläres Aktionspotential und die daran beteiligten Ionenkanäle (nach Snyders 1999); I_{Na} Natriumeinwärtsstrom, I_{Ca} Kalziumeinwärtsstrom, I_{to} Kaliumauswärtsstrom „transient outward“, I_{Ks} langsam aktivierender Kaliumauswärtsstrom „slow“, I_{Kr} schnell aktivierender Kaliumauswärtsstrom „rapid“, I_{Kur} sehr schnell aktivierender Kaliumauswärtsstrom „ultra rapid“, I_{K1} einwärtsrektifizierender Kaliumstrom, I_{KATP} durch Ischämie aktivierter, ATP-abhängiger Kaliumkanal

Neben den beschriebenen Ionenbewegungen, die beim Aktionspotential unter normalen Bedingungen auftreten, hat man bei Ischämie einen weiteren Kaliumkanal beobachtet, der durch intrazelluläres ATP reguliert wird. Die Öffnung dieses Kanals führt zu einer deutlichen Verkürzung und Verformung des Aktionspotentials, die schematisch in Abbildung I.1 skizziert ist. Wie in späteren Abschnitten noch ausführlich beschrieben wird, bestehen überzeugende tierexperimentelle Befunde, die zeigen, dass die Aktivierung von ATP-sensitiven K^+ Kanälen in der sarkolemmalen Membran von ventrikulären Herzmuskelzellen unter hypoxischen oder ischämischen Bedingungen die Entstehung kreisender Erregungen im Herzen fördert (Janse, Wit 1989). Beim Menschen kann dies zum Kammerflimmern und somit zum plötzlichen Herztod führen.

Aus diesem Grunde besitzen die sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen im Herzen eine große pathophysiologische Bedeutung. Sie stehen daher im Fokus für eine neue Therapie gegen lebensbedrohliche Arrhythmien. Es kann angenommen werden, dass Inhibitoren der sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle unter ischämischen Bedingungen die Verkürzung der Aktionspotentialdauer vermindern und daher ein geeignetes Mittel gegen den plötzlichen Herztod darstellen. Da Inhibitoren von K_{ATP} -Kanälen das Thema dieser Arbeit bilden, wird in den folgenden Abschnitten deren Aufbau, Regulation und Funktion näher beschrieben.

I.B ATP-abhängige Kaliumkanäle

I.B.1 Struktur des K_{ATP} -Kanals

ATP-abhängige Kaliumkanäle bestehen aus einem Heterooktamer aus vier porenbildenden Untereinheiten vom Typ Kir 6.x und vier Sulfonylharnstoffrezeptor- (SUR-) Untereinheiten (Clement et al. 1997; Fujita, Kurachi 2000; siehe Abbildung I.2).

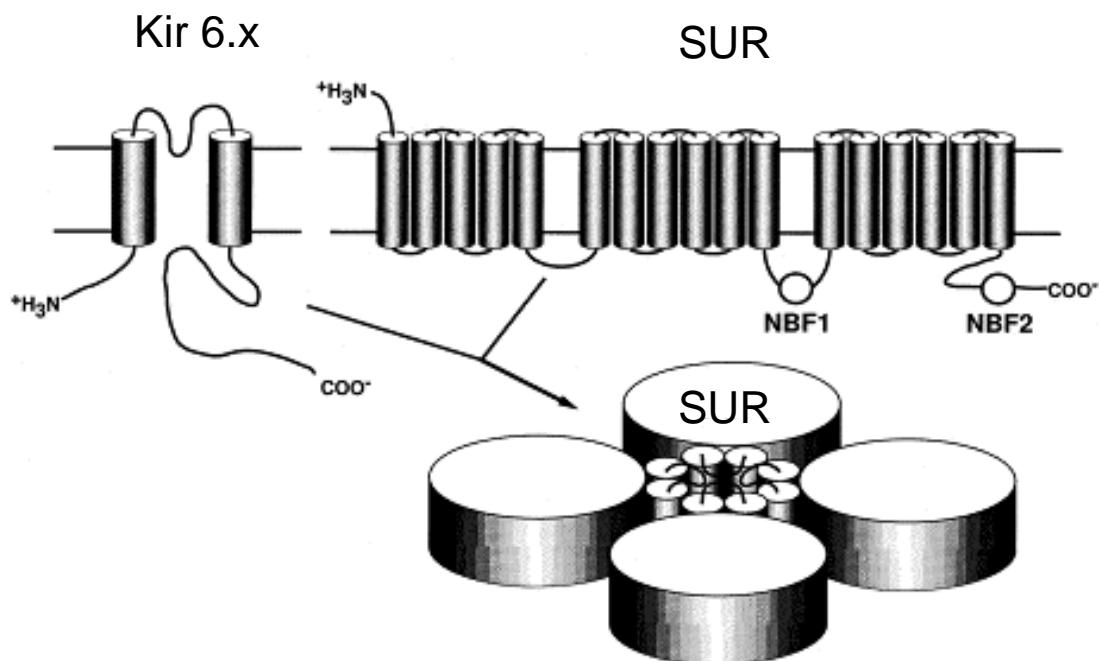


Abbildung I.2: Topologie des ATP-abhängigen Kaliumkanals (Fujita, Kurachi 2000)

Die Kir 6.x-Untereinheit

Die porenbildende Kir 6.x-Untereinheit gehört zur Gruppe der einwärts rektifizierenden Kaliumkanäle. Eine Kir-Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) und einer Poren-Schleife (H5). Der N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. In der Poren-Schleife der bekannten kaliumselektiven Kanäle befindet sich die Tripeptid-Sequenz Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG). Bei der Kir 6.x-Untereinheit ist dieses Motiv zu Glycin-Phenylalanin-Glycin (GFG) abgewandelt, wobei die Selektivität der Pore erhalten bleibt.

Bei Untereinheiten aus der Kir-Familie werden Kalium-Auswärtsströme durch Blockade der Pore von innen mit Magnesiumionen und mit natürlich vorkommenden Polyaminen wie Spermin und Spermidin („intrinsic gating“) erschwert (Ficker et al. 1994). Bei Kir 6.x-Untereinheiten ist jedoch die Einwärts-Rektifizierung nur schwach ausgeprägt.

Es sind bisher die Untereinheiten Kir 6.1 und Kir 6.2 gefunden worden. Die Kir 6.1-Untereinheit wird auf Chromosom 12p11.23 codiert (Inagaki et al. 1996). Das Gen hat drei Exons, das resultierende Protein besteht aus 424 Aminosäuren (Aguilar-Bryan et al. 1998). Die Kir 6.2-Untereinheit wird von einem intronlosen Gen auf Chromosom 11p15.1 codiert (Inagaki et al. 1995). Das Kir 6.2-Protein besteht aus 390 Aminosäuren (Aguilar-Bryan et al. 1998). Die Kir 6.1- und Kir 6.2-Proteine sind zu ungefähr 70% identisch (Sakura et al. 1995). Die Kir 6.1-Untereinheit enthaltende Kanäle haben einen geringeren Leitwert als Kanäle, die die Kir 6.2-Untereinheit enthalten (Babenko et al. 1998). Bei der Kir 6.2-Untereinheit ist bekannt, dass sie an Threonin 224 und Serin 372 durch Proteinkinase A sowie an Threonin 180 durch Proteinkinase C phosphoryliert werden kann (Fujita, Kurachi 2000).

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR)

SUR wird nach seiner Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe benannt. Die SUR-Untereinheit bewirkt die Sensitivität des K_{ATP} -Kanals für Sulfonylharnstoffe und andere Blocker (beispielsweise Repaglinid und Meglitinid) sowie Kaliumkanalöffner.

SUR gehört zur großen ATP-Bindungs-Cassette- (ABC-) Transporter-Familie, die mit den Multi-Drug-Resistance-Proteinen nahe verwandt ist (Babenko et al. 1998). SUR 1 wird von einem Gen auf Chromosom 11p15.1 mit 39 Exons (Aguilar-Bryan et al. 1995), SUR 2 von einem Gen auf Chromosom 12p12.12 mit 38 Exons codiert (Chutkow et al. 1996). Das Exon 18 von SUR 1, welches für einen Teil der ersten Nukleotidbindungsfalte codiert, fehlt bei SUR 2 (Aguilar-Bryan et al. 1998). Bei SUR 2 findet alternatives Spleißen bei Exon 38 statt, es resultieren die Spleißvarianten SUR 2A (Exon 38a) und SUR 2B (Exon 38b).

Die resultierenden Proteine sind 1581 (SUR 1) beziehungsweise 1549 (SUR 2A und SUR 2B) Aminosäuren lang (Aguilar-Bryan et al. 1998). Die SUR 2-Proteine sind zu ungefähr 67% identisch mit SUR 1, SUR 2A ist zu 97% identisch mit SUR 2B. Die letzten 42 Aminosäuren des C-Terminus von SUR 2B sind allerdings hoch homolog zu dem C-Terminus von SUR 1 (Fujita, Kurachi 2000). Der Amino-Terminus liegt extrazellulär, der Carboxy-Terminus intrazellulär. SUR hat vermutlich 17 Transmembrandomänen. Zwischen der elften und zwölften Transmembrandomäne sowie am Carboxylende liegen zwei Nukleotid-Bindungs-Falten mit

den so genannten Walker-A- und Walker-B-Motiven. Diese sind an der Aktivierung des Kanals durch ATP/MgADP beteiligt. SUR 1 kann an Serin 1571 durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden (Fujita, Kurachi 2000).

I.B.2 Gewebeverteilung des K_{ATP} -Kanals

Der ATP-sensitive Kaliumkanal wurde in ventrikulären und atrialen Herzzellen entdeckt (Noma 1983). Danach wurde er auch im Pankreas, im Skelettmuskel, in Neuronen und in glatten Muskelzellen nachgewiesen (Cook, Hales 1984; Spruce et al. 1985; Ashford et al. 1988; Standen et al. 1989; Nichols, Lederer 1991). Des weiteren wird postuliert, dass in den Mitochondrien ATP-sensitive Kaliumkanäle vorhanden sind (Inoue et al. 1991).

Die Expression der beiden Kir-Untereinheiten mit den drei möglichen SUR-Untereinheiten führt zu K_{ATP} -Kanälen mit verschiedenen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften. Diese Eigenschaften können mit denen der nativen Kanäle verglichen werden. Außerdem konnte der Nachweis der Kanäle aus Gewebe mittels molekularbiologischer Methoden erfolgen. Die Kir 6.1-Untereinheit wird ubiquitär exprimiert, die Untereinheit Kir 6.2 vor allem in pankreatischen β -Zellen, im Gehirn, im Herzen und im Skelettmuskel (Inagaki et al. 1995; Inagaki et al. 1996). Durch Kir 6.2-Knockout-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Kir 6.2-Untereinheit die porenbildende Untereinheit bei pankreatischen und kardialen, jedoch nicht bei vaskulären und mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen darstellt (Miki et al. 1998a; Suzuki et al. 2001; Suzuki et al. 2002). Bei Mäusen, in denen die Untereinheit Kir 6.1 fehlt, ist die Regulation des Gefäßtonus gestört, insbesondere in den Koronararterien (Miki et al. 2002).

Die Expression von SUR 1 findet in den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn statt (Aguilar-Bryan et al. 1995; Thomas et al. 1995). SUR 2 wurde zunächst im Herzen, im Skelettmuskel und im Gehirn gefunden (Chutkow et al. 1996). SUR 2A scheint beschränkt auf Herz- und Skelettmuskeln exprimiert zu werden, während SUR 2B nahezu in jedem Gewebe vorkommt (Davis-Taber et al. 2000).

Die Kombination von Kir 6.2-Untereinheiten und SUR 1 befindet sich vor allem in den pankreatischen β -Zellen (Inagaki et al. 1995), aber auch in Neuronen. Im Myokard und im Skelettmuskel setzt sich der K_{ATP} -Kanal aus der Kir 6.2-Untereinheit und SUR 2A zusammen. Der K_{ATP} -Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen besteht aus Kir 6.1-Untereinheiten und SUR 2B (Aguilar-Bryan et al. 1998; Fujita, Kurachi 2000). Der Aufbau der mitochondrialen ATP-sensitiven Kaliumkanäle ist noch nicht aufgeklärt: Kir 6.1- sowie Kir 6.2-Untereinheiten und

SUR 2A sind potenzielle Untereinheiten (Hu et al. 1999b; Seharaseyon et al. 2000; Terzic et al. 2000; Liu et al. 2001b; Singh et al. 2003).

I.B.3 Regulation und Funktion des K_{ATP} -Kanals

ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) koppeln das Membranpotential der Zelle an deren metabolischen Status (Noma 1983). Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen führt zu einer Erhöhung der Kaliumpermeabilität, wodurch sich das Membranpotential dem Kaliumgleichgewichtspotential von ca. -90 mV annähert. Diese Änderung der Kaliumpermeabilität ruft in den einzelnen Geweben unterschiedliche Wirkungen hervor.

K_{ATP} -Kanäle in β -Zellen des Pankreas

In den β -Zellen des endokrinen Pankreas koppelt der K_{ATP} -Kanal den Blutglucosespiegel an die Insulinfreisetzung. Bei hoher Glucosekonzentration wird in den β -Zellen des Pankreas ATP gebildet. Dieses bewirkt durch Schließen der Kanäle eine Depolarisation der β -Zelle. Hierdurch kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und damit zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kalzium bildet das Signal für die exozytotische Freisetzung von Insulin ins Blut. Dadurch wird Glucose in Zellen aufgenommen und der Blutglucosespiegel sinkt. Ein niedriger Blutzuckerspiegel führt in den β -Zellen zu einer Abnahme der ATP-Konzentration, so dass K_{ATP} -Kanäle geöffnet werden und die β -Zellmembran hyperpolarisiert. Die K_{ATP} -Kanäle in den β -Zellen des Pankreas sind also unter physiologischen Bedingungen offen oder geschlossen, abhängig von der intrazellulären ATP- bzw. der extrazellulären Glucose-Konzentration (Yokoshiki et al. 1998).

K_{ATP} -Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen

Die K_{ATP} -Kanäle in glatten Gefäßmuskeln sind an der Aufrechterhaltung des basalen Tonus beteiligt (Nelson, Quayle 1995; Farouque et al. 2002). Wichtig sind sie insbesondere bei der Vasodilatation als Reaktion auf Hypoxie oder Ischämie (Daut et al. 1990; Kingsbury et al. 2001). Durch intrazellulären ATP-Mangel, der unter diesen Bedingungen eintritt, werden die Kanäle aktiviert und die Zellmembran wird hyperpolarisiert. Durch spannungsabhängige Kalziumkanäle gelangt nun weniger Kalzium in die Zellen, was zu einer Relaxation des Gefäßmuskels führt. Diese Vasodilatation bewirkt dann eine bessere Sauerstoffversorgung.

K_{ATP}-Kanäle in der sarkolemmalen Membran von Herzmuskelzellen

Es ist seit längerem bekannt, dass Hypoxie und metabolische Inhibierung einen zeitunabhängigen elektrischen Strom in Herzmuskelzellen hervorruft (Isenberg et al. 1983; Vleugels et al. 1980). Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gelang es Trube und Hescheler (Trube, Hescheler 1983) erstmals, einzelne K_{ATP}-Kanäle in isolierten Herzmuskelzellen nachzuweisen. Danach konnte gezeigt werden, dass diese Kanäle durch metabolische Inhibition von Herzmuskelzellen durch Cyanid oder Dinitrophenol aktiviert werden können (Noma 1983; Trube, Hescheler 1984).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass der K_{ATP}-Kanal durch intrazelluläres ATP inhibiert und durch MgADP geöffnet wird (Noma 1983; Nichols, Lederer 1991; Quayle et al. 1997). Die IC₅₀-Werte für ATP wurden in Patch-clamp-Experimenten („excised patch“) auf Werte zwischen 10 µM und 100 µM geschätzt, so dass die Kanäle bei physiologischen ATP-Konzentrationen stets geschlossen bleiben müssten (Babenko et al. 1998). Unter pathophysiologischen Bedingungen in den Herzzellen öffnen K_{ATP}-Kanäle jedoch bereits bei intrazellulären ATP-Konzentration von wenigen mM, die nur geringfügig unterhalb der physiologischen ATP-Konzentration liegen (Nichols, Lederer 1992; Yokoshiki et al. 1998). Daraus folgt, dass es außer ATP weitere Regulatoren des ATP-abhängigen Kaliumkanals geben muss.

Das Verhältnis von ATP zu ADP ist bei der Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle sehr wichtig (Dunne, Petersen 1986; Kakei et al. 1986). In Abwesenheit von ATP ist sogar ADP allein in der Lage, K_{ATP}-Kanäle zu inhibieren, während es bei Anwesenheit von ATP die Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Findlay 1988). Während einer Ischämie oder Hypoxie sinkt der Quotient der Konzentrationen von ATP und ADP schneller als die ATP-Konzentration. Diese Veränderung reicht für eine deutliche Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle aus (Weiss, Venkatesh 1993). Auch Protonen und Laktat, wie sie bei Sauerstoffmangel und metabolischem Stress entstehen, erhöhen die Empfindlichkeit des Kanals für ATP (Koyano et al. 1991; Keung, Li 1991). Membranphospholipide, insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), können die physiologische Nukleotidempfindlichkeit der K_{ATP}-Kanäle ebenfalls modulieren, indem sie die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen (Shyng, Nichols 1998; Baukrowitz et al. 1998). Coenzym-A-Ester langkettiger Fettsäuren wie Palmitoleinsäure und Ölsäure führen zu einer höheren Offenwahrscheinlichkeit bei konstanter ATP-Konzentration, die unveresterten langkettigen Fettsäuren haben die gegenteilige Wirkung (Liu et al. 2001a).

Wie schon erwähnt, sind in der sarkolemmalen Membran von Herzmuskelzellen die K_{ATP}-Kanäle unter physiologischen Bedingungen geschlossen. Erst bei starkem ATP-Mangel während einer Ischämie werden diese Kanäle geöffnet. Diese Erhöhung der

Kaliumpermeabilität verkürzt das Aktionspotential deutlich. Dadurch wird der Kalziueinstrom während der Plateauphase und infolgedessen die ischämische Kalziumüberladung der Zelle verringert. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration wird unter Ischämie deutlich erhöht, was zu einer Abnahme des Ruhemembranpotentials und der Leitungsgeschwindigkeit führt (Janse, Wit 1989; Kantor et al. 1990; Gwilt et al. 1992). Unter Berücksichtigung der sehr hohen Kanaldichte in der Membran der Myozyten wird angenommen, dass zur Aktionspotentialverkürzung bereits die Aktivierung weniger Kanäle (<1%) ausreicht, was bei einer ATP-Verminderung um 30% denkbar wäre (Faivre, Findlay 1990; Nichols et al. 1991; Weiss et al. 1992).

Bedeutung des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals – Ischämische Prækonditionierung

Prækonditionierung ist ein endogener Schutzmechanismus, bei dem eine oder mehrere kurze Ischämiephasen einen Schutz vor Schädigungen durch eine folgende langandauernde Ischämie, gefolgt von Reperfusion, bewirken (Murry et al. 1986). Die Protektion bezieht sich auf alle Auswirkungen von Ischämie auf das Herz, sowohl auf die Infarktgröße als auch auf Herzfunktion und Arrhythmieinzidenz (Murry et al. 1986; Ytrehus 2000). Im einzelnen wurden eine verminderte Kalzium-Überladung der Zellen, ein erhöhter ATP-Gehalt, eine geringere Azidose, die verringerte Freisetzung von Kreatinkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH) und Laktat sowie eine verringerte ST-Hebung im EKG beobachtet (Reimer et al. 1986; Yellon et al. 1998; Holmuhamedov et al. 1999). Sowohl die ischämiebedingte Nekrose als auch die vorwiegend während der Reperfusion auftretende Apoptose werden verringert (Zhao, Vinten-Johansen 2002).

Alle untersuchten Spezies, darunter Hunde, Ratten, Kaninchen und Schweine, wurden mittels ischämischer Prækonditionierung (IPC) vor der Schädigung durch Ischämie geschützt (Murry et al. 1986; Schulz et al. 1994; Munch-Ellingsen et al. 2000). Auch beim Menschen tritt dieses Phänomen auf: In atrialem Gewebe *in vitro* wird die ischämische Zellschädigung durch Prækonditionierung verringert. Ebenso wurde beobachtet, dass eine zweite koronare Ballonangioplastie weniger Ischämiesymptome hervorruft als die erste. Zudem verbessert ein Angina-pectoris-Anfall vor einem Herzinfarkt die Prognose zumindest während des Krankenhausaufenthaltes (Airaksinen, Huikuri 1997; Ghosh et al. 2000; Yellon, Dana 2000).

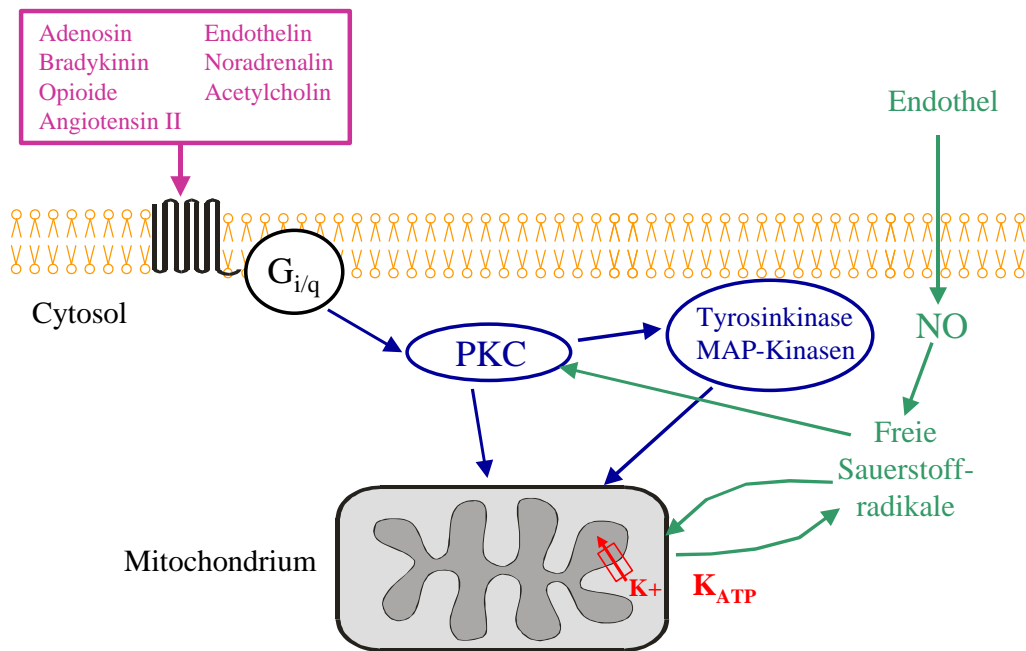


Abbildung I.3: Schematische Darstellung der Signalwege der ischämischen Präkonditionierung; PKC Protein-Kinase C, MAP-Kinase Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, NO Stickstoffmonoxid, G_{i/q} G_i- und G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren, nach Gross, Fryer 1999, Oldenburg et al. 2002 und Lebuffe et al. 2003

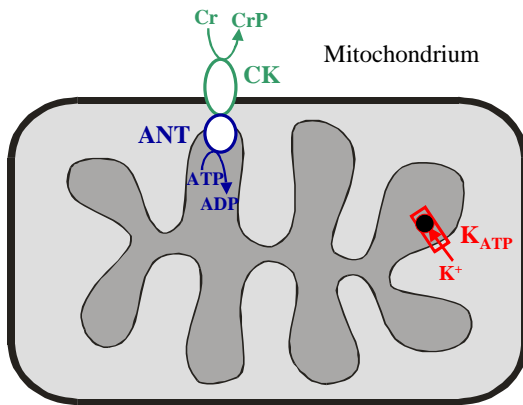
Wie in Abbildung I.3 dargestellt, kann Präkonditionierung durch viele verschiedene Mediatoren hervorgerufen werden (Gross, Fryer 1999). Diese werden durch Ischämie freigesetzt, beispielsweise Adenosin, Bradykinin oder Noradrenalin. Sie aktivieren über ihre Bindung an G_i- oder G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Signaltransduktionskaskaden von PKC, Tyrosinkinase und MAP-Kinasen. Die Aktivierung dieser Kinasen führt zur Öffnung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle (Dana, Yellon 1998; Yellon et al. 1998; Baines et al. 1999; Chilian, Gross 1999; Yellon, Baxter 2000; Schulz et al. 2001; Bolli 2001). Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel kann mit Sauerstoff zu freien Radikalen reagieren, die direkt und durch Aktivierung von PKC zur Öffnung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle führen (Ockaili et al. 1999; Patel, Gross 2001; Lebuffe et al. 2003). Die ischämischen Veränderungen in den Mitochondrien bewirken wiederum einen Anstieg der Produktion von freien Sauerstoffradikalen und von NO (Garlid 2000; Pain et al. 2000; Forbes et al. 2001; Lebuffe et al. 2003).

Der eigentliche Mechanismus, der den Schutz der Zellen bewirkt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass die Öffnung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle sowohl bei der Initiierung der IPC eine Hauptrolle spielt (in der Literatur als „Trigger“ bezeichnet), als auch am Ende der Signalkaskade direkt am Protektionsmechanismus beteiligt ist (Oldenburg et al. 2002).

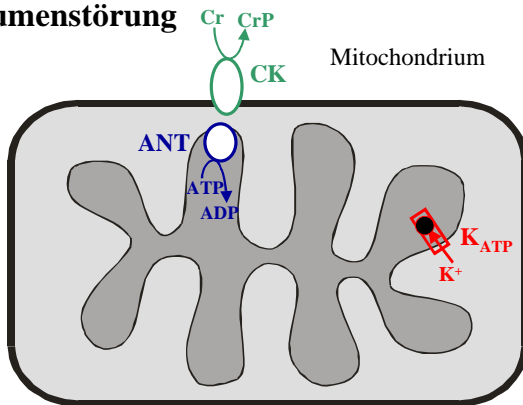
Eine interessante, von experimentellen Daten gestützte Hypothese, beschreibt eine direkte Beteiligung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen an der Kardioprotektion (Garlid 2000; Laclau et al. 2001; Dos Santos et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass ein Kaliumeinstrom durch geöffnete K_{ATP} -Kanäle in der inneren Membran von Mitochondrien zu einem Anstieg des Volumens der mitochondrialen Matrix führt, wodurch deren ischämiebedingte Volumenkontraktion verhindert wird (Garlid 2000; Kowaltowski et al. 2000). In der inneren Mitochondrienmembran liegt die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) und in der äußeren die mitochondriale Kreatin-Kinase (CK), die zusammen das energiereiche Phosphat von ATP auf Kreatin übertragen. Die funktionelle Kopplung dieser beiden Enzyme zum Energietransport aus den Mitochondrien ins Zytosol erfordert jedoch die Beibehaltung der räumlichen Strukturen (Laclau et al. 2001; Dos Santos et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen diese Kopplung von ANT und CK bei Ischämie/Reperfusion aufrechterhält und somit kardioprotektiv wirkt. Zur Verdeutlichung ist dies in Abbildung I.4 schematisch dargestellt.

Andere Arbeiten heben die wichtige Rolle der freien Sauerstoffradikale hervor, die durch die Öffnung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen gebildet werden. Die Sauerstoffradikale aktivieren Kinasen wie beispielsweise der p38-MAP-Kinase und bewirken auf bislang ungeklärte Weise die beobachtete Protektion (Oldenburg et al. 2002; Yue et al. 2002).

A normal – mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geschlossen



B Ischämie – mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geschlossen
Volumenstörung



C nach IPC – mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geöffnet
Volumen reguliert

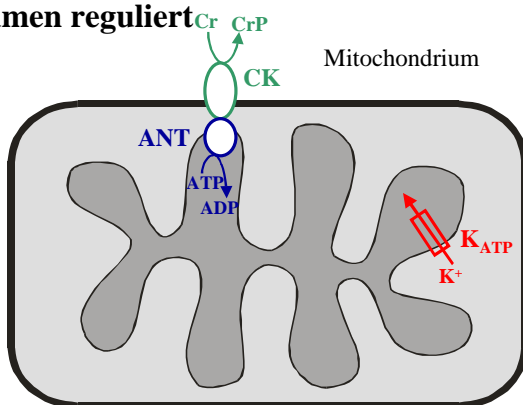


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des funktionellen Zusammenhangs zwischen ANT und der mitochondrialen CK; A Normal: mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geschlossen; B Ischämie: mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geschlossen, Volumenstörung; C nach IPC: mitochondriale K_{ATP} -Kanäle geöffnet, Volumen reguliert; ANT Adenin-Nukleotid-Translokase, CK Kreatin-Kinase, Cr Kreatin, CrP Kreatinphosphat, ADP Adenosindiphosphat, ATP Adenosintriphosphat

I.B.4 **Pharmakologische Beeinflussung des K_{ATP} -Kanals**

Blocker des K_{ATP} -Kanals

K_{ATP} -Kanäle werden geschlossen durch Sulfonylharnstoffe, deren bekanntester Vertreter das Glibenclamid ist, durch Benzoessäurederivate wie Repaglinid und Nateglinid, aber auch durch Natrium-5-hydroxydecanoat (5-HD) (Coghlan et al. 2001). Die Wirkungen werden durch Bindung der Substanzen an die SUR-Untereinheit hervorgerufen.

Das Antidiabetikum Glibenclamid wirkt mit hoher Affinität auf die K_{ATP} -Kanäle im Pankreas und in Herzmuskelzellen (Krause et al. 1995; Gögelein 2001; Gribble et al. 1998), außerdem sind Wirkungen auf die Koronardurchblutung nachgewiesen worden (Daut et al. 1994a; Daut et al. 1994b). Zudem wurde gezeigt, dass die protektive Wirkung von ischämischer Präkonditionierung auf die Infarktgröße von Ratten, Kaninchen und Hunden durch Glibenclamid inhibiert wird (Mocanu et al. 2001; Wang et al. 2001a; Schultz et al. 1997a; Linz et al. 1998; Jung et al. 2000; Sanada et al. 2001).

Ebenso ist bekannt, dass weitere K_{ATP} -Kanalblocker, die als Antidiabetika im Handel sind, außer der Blockade von pankreatischen K_{ATP} -Kanälen auch K_{ATP} -Kanäle in anderen Geweben inhibieren. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Benzoessäurederivate Meglitinid (Gribble et al. 1998) und Repaglinid (Dabrowski et al. 2001) neben dem pankreatischen auch den kardialen K_{ATP} -Kanal potent blockieren.

Substanzen, die hauptsächlich den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal blockieren, werden bei der Firma Aventis gegen ventrikuläre Arrhythmien entwickelt (Gögelein 2001). Der erste Vertreter ist der Sulfonylthioharnstoff HMR 1098. Diese Substanz blockiert den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal in Herzmuskelzellen etwa 10fach potenter als den K_{ATP} -Kanal in den β -Zellen des Pankreas und zeigt nur sehr geringe Wirkung auf K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur der Koronargefäße (Gögelein et al. 1998).

5-Hydroxydecanoat (5-HD) wird als ein selektiver Inhibitor für mitochondriale K_{ATP} -Kanäle angesehen (Schultz et al. 1997b; Gross, Fryer 1999; Munch-Ellingsen et al. 2000; Fryer et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass 5-HD die ischämische Präkonditionierung in Ratten (*in vitro* und *in vivo*) und Kaninchen verhindert (Schultz et al. 1997b; Munch-Ellingsen et al. 2000). Dabei muss 5-HD nicht notwendigerweise vor der Präkonditionierung appliziert werden: eine 5-HD-Gabe ist auch während der Präkonditionierung und kurz vor Ende der Indexischämie wirksam (Fryer et al. 2001). Die monophasische Aktionspotentialdauer in Kaninchen wird dabei jedoch

nicht beeinflusst, ebensowenig Blutdruck und Herzfunktion *in vivo* bei Ratten und Kaninchen (Munch-Ellingsen et al. 2000; Fryer et al. 2001).

Öffner des K_{ATP} -Kanals

K_{ATP} -Kanäle werden durch Substanzen unterschiedlicher Strukturklassen geöffnet, darunter Diazoxid, Minoxidilsulfat, Pinacidil und sein Analogon P1075 sowie Benzopyranderivate wie Cromakalim.

Diazoxid zeigt Affinität zu pankreatischen, vaskulären und mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen, nicht aber zu sarkolemmalen (Gross, Fryer 1999; Liu et al. 1999; Gross 2000; Grover, Garlid 2000; Sato, Marbán 2000). P1075 wirkt nicht auf den mitochondrialen Kanal. Pinacidil und Chromakalim aktivieren die sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle.

Öffner des K_{ATP} -Kanals wurden zunächst gegen Bluthochdruck entwickelt, weitere potenzielle Indikationen sind myokardiale Ischämie, Angina pectoris und Raynaud-Syndrom sowie Asthma, Hyperaktivität der Harnblase und Haarausfall (Coghlan et al. 2001). Die Vielzahl möglicher Indikationen weist jedoch bereits darauf hin, dass an die Selektivität therapeutisch einsetzbarer Substanzen besondere Anforderungen zu stellen sind.

I.C Herzrhythmusstörungen und deren medikamentöse Therapie

I.C.1 Formen von Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen lassen sich in Störungen der Erregungsbildung und in solche der Erregungsleitung unterteilen. Man unterscheidet bradykarde Störungen mit weniger als 60 Herzschlägen pro Minute, tachykarde mit mehr als 100 Schlägen pro Minute, jeweils in Ruhe, und solche mit unregelmäßigem, arrhythmischem Herzschlag. Diese Arrhythmien umfassen von einzelnen Extrasystolen über Salven, Flattern bis Flimmern eine Reihe unterschiedlich schwerwiegender Krankheitsbilder (Mutschler et al. 2001).

Vorhofflimmern ist die verbreitetste Arrhythmieform und nimmt mit dem Alter an Häufigkeit zu. Da in den Vorhöfen das Blut nicht mehr gepumpt wird, kann es dort zur Bildung von Blutgerinnseln kommen. Diese können losreißen und dann eine Embolie, beispielsweise in der Lunge oder im Gehirn, hervorrufen (Mutschler et al. 2001).

Ventrikuläre Arrhythmien können zu kreisender Erregung führen und in Kammerflimmern übergehen. Kammerflattern und Kammerflimmern sind Hauptursache des plötzlichen Herztodes. Der Blutkreislauf ist dabei durch die hohen Frequenzen nicht gewährleistet, so dass der entstehende Sauerstoffmangel rasch zu Organschäden führt. Die Grundlage für plötzlichen Herztod liegt in einer Vorschädigung des Herzens durch Nekrose (Infarkt), Fibrose sowie Hypertrophie und daraus resultierenden Störungen bei der Weiterleitung des Aktionspotentials (Myerburg et al. 1992). Auslösende Ereignisse für Arrhythmien können dann eine akute Ischämie, neuroendokrine oder hämodynamische Einflüsse, Elektrolytstörungen, aber auch Nebenwirkungen eines Arzneimittels sein (Myerburg et al. 1992; Zipes, Wellens 1998). Atherosklerotische Plaques, die bei den meisten Patienten mit plötzlichem Herztod gefunden werden, weisen auf die besondere Gefährdung durch regionale Ischämie hin (Farb et al. 2001). Kammerflimmern kann durch gestörte Automatie von Schrittmacherzellen, getriggerte Aktivität mit Nachpotentialen oder kreisende Erregungen initiiert und aufrechterhalten werden (Zipes, Wellens 1998; Jalife 2000).

I.C.2 Klassen der Antiarrhythmika

Antiarrhythmika gegen tachykarde Störungen und Extrasystolen werden aufgrund ihres Wirkprinzips in vier Klassen eingeteilt (Vaughan-Williams-Klassifizierung):

Klasse-I-Antiarrhythmika sind Natriumkanal-Blocker, welche die Geschwindigkeit der Depolarisation (Phase 0) und somit auch die der Weiterleitung des Aktionspotentials verringern. Die Auslösung eines Aktionspotentials wird dadurch erschwert. Die Dauer des Aktionspotentials kann zunehmen (Klasse IA), abnehmen (IB) oder gleich bleiben (IC), da auch andere Kanalproteine unspezifisch blockiert werden können. Klasse-I-Antiarrhythmika sind beispielsweise Chinidin (Klasse IA), Lidocain (IB) und Flecainid (IC). Für Encainid, Flecainid und Moricizin (Klasse IC) wurde allerdings gezeigt, dass sie die Mortalität der Patienten erhöhen, obwohl die Rhythmusstörung effektiv unterdrückt wurde [Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators 1989; Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II (CAST II) Investigators 1992].

β -Blocker werden als Klasse-II-Antiarrhythmika bezeichnet. Aufgrund ihrer antiadrenergen Wirkung eignen sie sich für tachykarde Rhythmusstörungen. Mehrere Studien konnten nach Herzinfarkt eine Reduktion der Mortalität und der plötzlichen Herztode zeigen (Norwegian Multicenter Study Group 1981; ISIS-1 Collaborative Group 1986; Pitt 1992; Hjalmarson 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass β -Blocker eine Verbesserung in der Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz bewirken (Lechat et al. 2001; Singh 2001).

Kalium-Kanal-Blocker führen zur Verlängerung des Aktionspotentials aufgrund ihrer Verzögerung der Repolarisation (Phase 3). Zu diesen Klasse-III-Antiarrhythmika gehören Amiodaron und Sotalol. Von Sotalol wird das Razemat eingesetzt, das zudem β -Adrenorezeptoren blockiert. Es liegt ein gutes Wirksamkeits- und Sicherheitsprofil vor (MacNeil et al. 1993; Hohnloser 1997). D-Sotalol, das ausschließlich als Hemmstoff des schnellen, verzögerten Kaliumstromes (I_{Kr}) wirkt und daher als reines Klasse-III-Antiarrhythmikum klassifiziert wird, konnte die Mortalität nach Herzinfarkt wegen seiner proarrhythmischen Wirkung jedoch nicht verringern (Waldo et al. 1996). Amiodaron wirkt auf viele Ionenkanäle sowie etliche Rezeptoren und zeigt eine komplexe Pharmakokinetik. Während akut keine konsistente Wirkung auf die Aktionspotentialdauer beobachtet werden kann, erfolgt langfristig eine Aktionspotentialverlängerung (Kodama et al. 1999). Die Wirksamkeit von Amiodaron und die Sicherheit bezüglich der kardialen Wirkung wurde in mehreren Studien überzeugend gezeigt (Cairns et al. 1997; Julian et al. 1997; Connolly 1999; Elizari et al. 2000). Trotz einer signifikanten Verringerung der Todesfälle durch Arrhythmien ist

jedoch der Einfluss von Amiodaron auf die Gesamtmortalität der Patienten widersprüchlich: Julian et al. (1997) konnten im Gegensatz zu Cairns et al. (1997) keine Reduktion zeigen. Nach akutem Herzinfarkt erhöhten hohe Dosen Amiodaron die Mortalität, so dass die Dosis für den weiteren Verlauf der Studie halbiert wurde (Elizari et al. 2000). Schwerwiegende Nebenwirkungen auf Schilddrüse, Lunge und Leber und eine schlechte Steuerbarkeit durch die extrem lange Halbwertszeit sind Nachteile, die die Suche nach sicheren und effektiven Antiarrhythmika notwendig machen.

Klasse-IV-Antiarrhythmika sind Substanzen wie Verapamil und Diltiazem, die durch Hemmung des L-Typ-Kalziumkanals die atrioventrikuläre Überleitung und die effektive Refraktärzeit verlängern. Durch Kalzium-Überladung können Nachpotentiale und Automtizität von Schrittmacherzellen induziert sowie die Weiterleitung von Aktionspotentialen verhindert werden, Kalziumkanal-Blocker wirken dem entgegen (Opie 1991).

I.C.3 Vorteile von K_{ATP} -Blockern

Selektive Inhibitoren sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle haben den einzigartigen Vorteil, dass sie bei ausreichender Sauerstoff- und Energieversorgung des Myokards keinen Einfluss auf die Herzfunktion ausüben, da diese Kanäle unter physiologischen Bedingungen geschlossen sind. Eine proarrhythmische Wirkung durch Verlängerung der normalen Aktionspotentialdauer kann daher ausgeschlossen werden. In Hinblick auf die Arzneysicherheit wären daher selektiv sarkolemmale K_{ATP} -Kanalblocker allen anderen bekannten Antiarrhythmika sehr wahrscheinlich überlegen.

Erst unter den pathophysiologischen Umständen einer myokardialen Ischämie werden die K_{ATP} -Kanäle geöffnet. Die Aktionspotentialverkürzung führt zur Heterogenität der Refraktärzeit innerhalb des ischämischen Myokards und zwischen ischämischen und gesunden Arealen, so dass die Entstehung von Arrhythmien ermöglicht wird (Picard et al. 1999). Unter Sauerstoffmangelbedingungen können daher K_{ATP} -Blocker die Inzidenz von Kammertachykardien und Kammerflimmern verringern. Diese Verringerung der Arrhythmiehäufigkeit wurde in Tiermodellen mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid gezeigt (Bril et al. 1992; Tosaki et al. 1993; Billman 1994).

Bei Typ-2-Diabetikern mit koronarer Herzkrankheit und Arrhythmien, die mit Sulfonylharnstoffen behandelt wurden, wird eine geringere Inzidenz ventrikulärer Arrhythmien beobachtet als bei mit anderen Antidiabetika behandelten Patienten (Schotborgh, Wilde 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Glibenclamid im Vergleich zu Metformin die Häufigkeit von

ischämiebedingten Arrhythmien reduziert. Die Häufigkeit von ischämischen Episoden wurde dabei nicht verringert, ebensowenig wie die Anzahl von ischämieunabhängigen Arrhythmien (Cacciapuoti et al. 1991). Nach Myokardinfarkt ist bei Glibenclamid-behandelten Diabetikern die Arrhythmieinzidenz (Kammertachykardien und Kammerflimmern) und die Mortalität im Krankenhaus signifikant geringer als bei Patienten ohne Diabetes und Diabetikern ohne Glibenclamid-Behandlung (Lomuscio, Fiorentini 1996). Die retrospektive Auswertung von Patienten mit akutem Myokardinfarkten in Perth zeigte, dass die Arrhythmiehäufigkeit von Diabetikern, die mit Glibenclamid behandelt wurden, vergleichbar zu der von nicht-diabetischen Patienten war, jedoch signifikant geringer als die von Diabetikern, die mit Insulin behandelt wurden (Davis et al. 1998).

Aufgrund seiner Wirkung auf die β -Zellen des Pankreas ist Glibenclamid als Arzneimittel gegen lebensbedrohliche Rhythmusstörungen in einer breiten Bevölkerungsschicht nicht geeignet. Ein neues Antiarrhythmikum müsste den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal selektiv inhibieren. Deshalb besteht ein großer Bedarf an der Entwicklung weiterer sarkolemmaler K_{ATP} -Kanalblocker gegen den ischämiebedingten plötzlichen Herztod.

I.D Zielsetzung dieser Arbeit

- ?? Etablierung eines prädiktiven Versuchsmodells, um die Wirksamkeit verschiedener Blocker des ATP-sensitiven Kaliumkanals (K_{ATP}) unter ischämischen Bedingungen am Herzen zu untersuchen. Hierzu wurde das isoliert-perfundierte Meerschweinchenherz nach Langendorff gewählt.
- ?? Etablierung eines Globalischämie-modells und eines Protokolls zur ischämischen Präkonditionierung (IPC) bei isoliert perfundierten Rattenherzen
- ?? Standardisierung der Versuchsbedingungen für optimale Reproduzierbarkeit, Perfektionierung im Hinblick auf Temperaturkonstanz als äußerst kritischem Parameter insbesondere bei Ischämieversuchen
- ?? Charakterisierung der Referenzwirkstoffe
- ?? Erstellen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen für K_{ATP} -Kanal-Blocker bei Aktionspotentialverkürzung und Koronarflussverringern, Identifizierung von Strukturelementen für eine selektive Wirkung
- ?? Vergleich der Selektivität von strukturell abgewandelten Hemmstoffen des ATP-sensitiven Kaliumkanals
- ?? Suche nach einem Antagonisten als potenziellem antiarrhythmischen Arzneistoff, der die ischämische Aktionspotentialverkürzung aufhebt, ohne den Koronarfluss zu beeinträchtigen
- ?? Charakterisierung des mitochondrialen K_{ATP} -Öffners S1526 anhand der Beeinflussung der Infarktgröße im Globalischämie-modell

II Material und Methoden

II.A Das isoliert-perfundierte Herz nach Langendorff

Das isoliert-perfundierte Herz nach Langendorff ist ein lange bekanntes, bewährtes *in-vitro*-Versuchsmodell, mit dem eine Vielzahl von Messparametern technisch relativ einfach zugänglich ist, die umfassende Informationen über den Zustand des Myokards und der Koronargefäße ermöglichen.

II.A.1 Langendorff-Apparatur

Ein wichtiges Element der Langendorff-Apparatur ist der Kugel-Oxygenator (Abbildung II.1 A), in dem die Perfusionslösung mittels einer Schleuderscheibe als dünner Film an die Gefäßwand gedrückt wird und dort herabläuft. Durch ein Thermostat-Wasserbad (Abbildung II.1 D, C12 LAUDA / CS), das auch den Außenmantel des Oxygenators und das Wasserbad (Abbildung II.1 B) versorgt, wird der Perfusatfilm im Oxygenator auf 37°C erwärmt. Im Oxygenator wird die Pufferlösung mit Carbogen (Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) begast. Der Sauerstoffpartialdruck des Puffers vor dem Herzen liegt eigenen Stichproben zufolge (Blutgasanalysegerät Radiometer ABL 700 Serie) bei 550 mm Hg, das Eluat hat noch einen Sauerstoffpartialdruck von 216 mm Hg, so dass von einer genügenden Sauerstoffversorgung des Herzens ausgegangen werden kann. Der pH-Wert wird durch den Kohlendioxidanteil des Gasgemisches auf 7,39 ± 0,02 (Knick pH-Meter 766 Calimatic) eingestellt. Das Gas wird aus dem Oxygenator in ein wassergefülltes Steigrohr geleitet (Abbildung II.1 J), um einen Perfusionsdruck von 55 mm Hg bei den Versuchen mit Meerschweinchenherzen bzw. von 70 mm Hg bei den Rattenherz-Versuchen zu erreichen (druckkonstante Perfusion).

Im Oxygenator befindet sich ein Fühler für den Füllzustand (LLC Liquid Level Controller, Plugsys Type 661, Hugo Sachs Elektronik), der bei zu geringer Leitfähigkeit die Schlauchquetschpumpe (Abbildung II.1 G, Ismatec MV-GE) anschaltet, die daraufhin Perfusionslösung nachpumpt. Bei den Rattenversuchen wurde die Lösung bei Ansaugen aus dem Vorratsgefäß (Abbildung II.1 F) durch einen Millex-AP₅₀-Prefilter (Millipore, Porengröße 1,5 µm) gefiltert. Im Wasserbad zwischen Oxygenator und Herz befindet sich eine Blasenfalle, da kleine Gasblasen Luftembolien im Herzen verursachen könnten.

Das Herz hängt in einer feuchten Kammer (Abbildung II.1 C, Feinmechanik- und Elektronik-Werkstatt, Aventis, Frankfurt), in die alle benötigten Messfühler eingebaut sind, so dass diese Kammer im Versuch geschlossen bleiben kann. Die Kammer ist an drei Seiten doppelwandig und wird in diesem Zwischenraum mit temperiertem Wasser durchströmt, um eine konstante Temperatur in der Kammer halten zu können (Temperatur-Regler Abbildung II.1 E). Mit einem Temperaturfühler in der Kammer wird die jeweils aktuelle Temperatur angezeigt, sie muss während jedes Versuchs 37,0°C betragen.

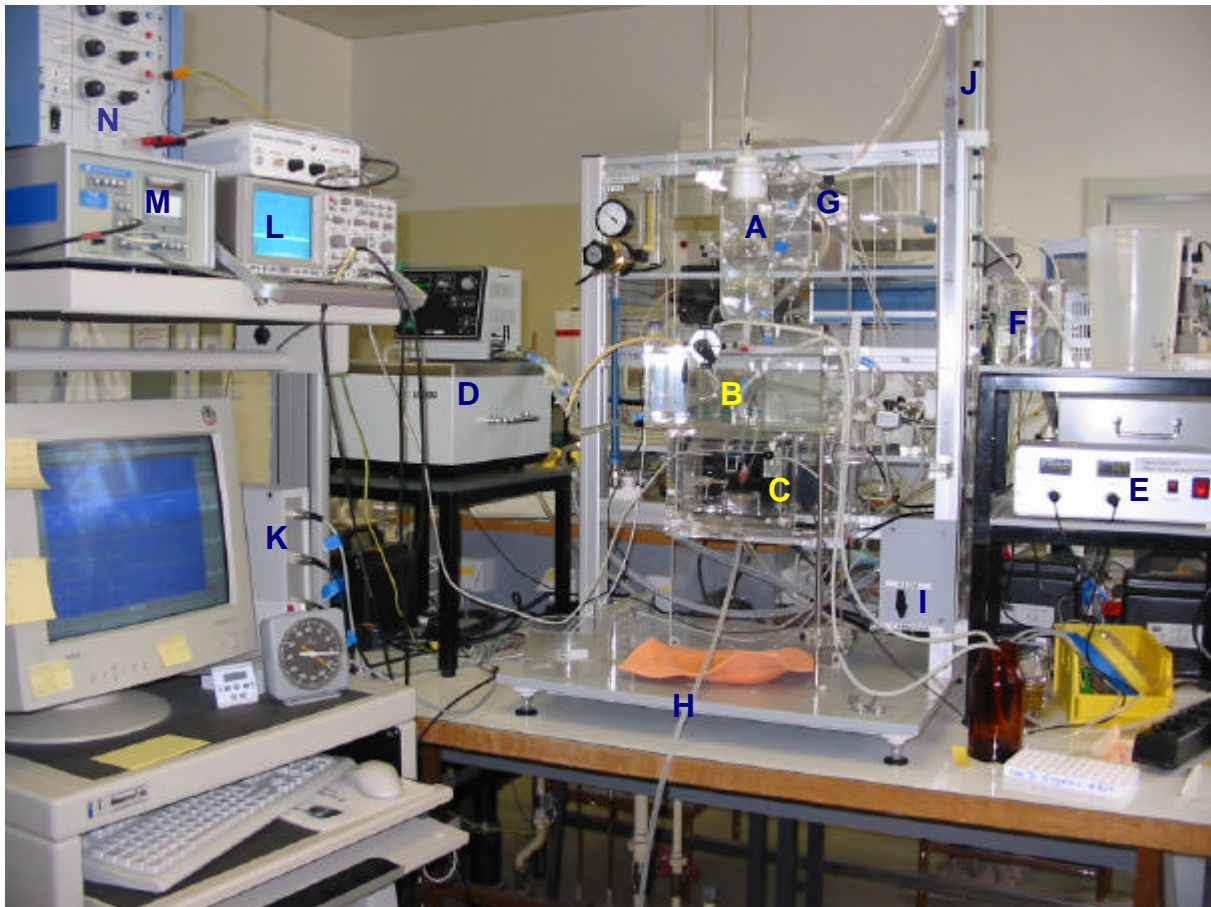


Abbildung II.1: Langendorff-Apparatur; A Oxygenator, B Wasserbad, C feuchte Kammer, D Thermostat-Wasserbad, E Temperatur-Regler für die feuchte Kammer, F Puffervoratsgefäß, G Rollenquetschpumpe für Puffer, H Schlauch zum „Abfall“-Gefäß für Puffer, I Umschalhahn zwischen den Gasen für Normoxie (Carbogen) und Hypoxie (20% Sauerstoff), J wassergefülltes Steigrohr für konstanten Perfusionsdruck, K Verstärker für Messsignale, L Oszilloskop, M Messgerät für den Koronarfluss (Flowmeter), N Steuerung für die Stimulationselektrode

Kritisch ist die Umgebungstemperatur des Herzens insbesondere in der Ischämie, da ansonsten die Versorgung mit warmer Pufferlösung die Temperatur des Herzens bestimmt. Die Aktionspotentialdauer des Herzens ist von der Temperatur abhängig (Trautwein, Dudel 1954; Tweedie et al. 1993), durch die feuchte Kammer kann aber eine Temperaturkonstanz bei 37,0°C sichergestellt werden, so dass eine Aktionspotentialverlängerung durch Temperaturabfall ausgeschlossen ist. Ein Absinken der Temperatur verlangsamt zudem die Entstehung von Infarkten (Schwartz et al. 1997; Miki et al 1998b; Hale, Kloner 1998; Hale, Kloner 2002).

Über einen Dreiwegehahn unterhalb des Oxygenators kann von druckkonstanter Perfusion auf flusskonstante Perfusion umgeschaltet werden. Dazu wird zunächst die Pufferlösung in einem Becherglas mit dem entsprechenden Gasgemisch durchperlt. Anschließend wird sie aus einer Spritze mittels einer Dauerinfusionspumpe (TSE) über gasdichte Schläuche zum Herzen gepumpt. Die Infusionspumpe drückt die Lösung pulsationsfrei durch das Herz. Die Temperierung der Lösung auf 37°C erfolgt, indem die Lösung durch Glaswendel im Wasserbad (Abbildung II.1 B) gepumpt wird. Mit dem oben genannten Dreiwegehahn kann die Perfusion auch völlig unterbrochen werden, so dass das Herz einer globalen Ischämie ausgesetzt ist.

II.A.2 Instrumentierung des Herzens

Alle während des Versuchs gemessenen Parameter wurden in einem Computer vom Programm IBJ-BeMon32 V2.6 (Ingenieurbüro Jäckel) gespeichert und graphisch dargestellt. Die Ausgabe der Daten erfolgte graphisch und tabellarisch vom Programm IBJ-Amon32 V2.6.

Während der Versuche wurde die linksventrikuläre Druckkurve gemessen, aus der die Parameter LVP_{\min} und LVP_{\max} als Minimum und Maximum, die Kontraktilität $dP/dt+$ und $dP/dt-$ als erste Ableitung der Druckkurve sowie die Herzfrequenz errechnet wurden. LVP steht dabei für den linksventrikulären Druck. Zur Druckmessung wurde durch einen Schnitt in das linke Atrium ein wassergefüllter Latexballon (Hugo Sachs; Größe 5 = 0,1 ml) über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser Ballon war über einen druckfesten Schlauch mit einem Druckaufnehmer (Isotec Pressure Transducer) verbunden. Auf die richtige Position und eine angemessene Größe des Ballons wurde geachtet, da dieser für eine korrekte Messung dem Endokard lückenlos anliegen muss. Das wassergefüllte Ballon-Schlauch-System muss luftblasenfrei und absolut dicht sein. Der minimale Druck kann durch eine ebenfalls wassergefüllte Spindelspritze über die Wassermenge im System eingestellt werden, er lag im physiologischen Bereich von 5 bis 10 mm Hg.

Im Wasserbad oberhalb der Blasenfalle befindet sich der Messkopf (In-Line-Flowprobe 2N) für die Messung des Koronarflusses mittels Ultraschall. Bei retrograder Perfusion ist der Durchfluss durch die Aorta identisch mit dem Koronarfluss, da sich die Taschenklappen zum linken Ventrikel durch den Perfusionsdruck schließen und die Pufferlösung in die Koronararterien gedrückt wird.

Zur bipolaren Ableitung eines Elektrogramms wurden noch zwei chlorierte Silberdrähte, die an der Spitze zur Kugel rundgeschmolzen sind, angelegt. Das Elektrogramm wurde auf einem Oszilloskop (HM 408, Hameg) angezeigt und im Rechner gespeichert.

Die Elektrode für das monophasische Aktionspotential (MAP) (Langendorff-Probe, Boston Scientific / EP Technologies Inc.) wurde bei den Meerschweinchen-Ischämieversuchen an die Herzspitze angedrückt. Das Signal wurde vor der Anzeige auf dem Oszilloskop und der Aufzeichnung im Computer verstärkt (EP Technologies Inc.). Die MAP-Elektrode besteht aus Silber/Silberchlorid (Franz 1999). Die Dauer des monophasischen Aktionspotentials wird üblicherweise als Dauer bei 90% Repolarisation ($MAPD_{90}$) angegeben.

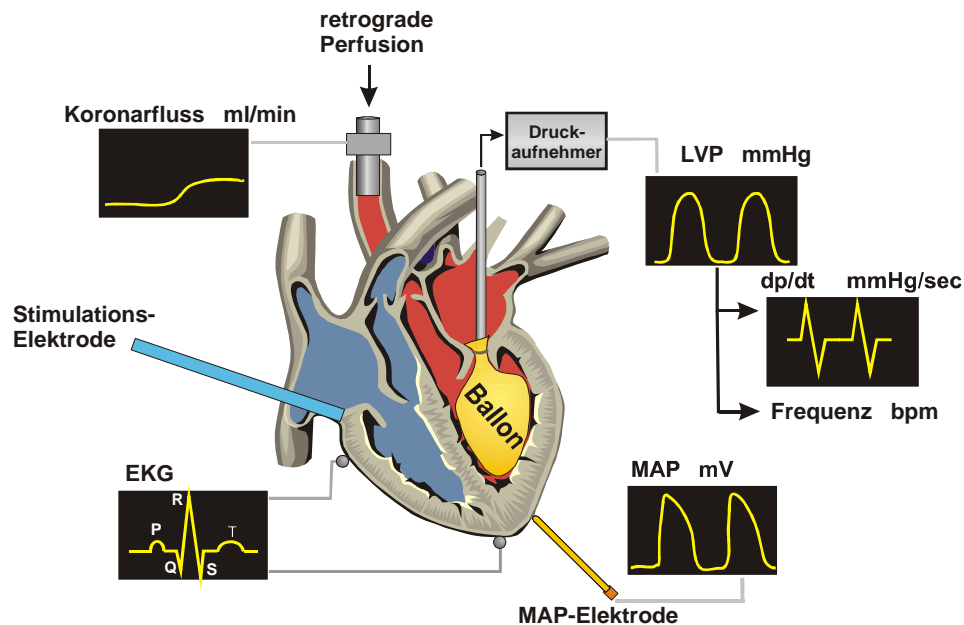


Abbildung II.2: Schematische Zeichnung eines isoliert-perfundierten Herzens nach Langendorff

Bei Ischämieversuchen wurde außerdem noch eine Koaxialstimulationselektrode (Hugo Sachs Elektronik Stimulator P) unter das rechte Herzohr angebracht. Damit wurde das Herz zu einer konstanten Frequenz von 300 Schlägen pro Minute (5 Hz) stimuliert. Die Stimulierung wurde mit einem Rechteckpuls von 2 Millisekunden Dauer und 5-50 Volt, abhängig von der Empfindlichkeit des Herzens, erzeugt. Die unterschiedlichen Spannungen sind mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der verschiedenen Herzen zu begründen, da jeweils erst bei einem bestimmten Schwellenpotential die Herzfrequenz durch die Stimulationsfrequenz bestimmt wird. Spannungen größer als 10 Volt mussten jedoch nur unter Ischämie verwendet werden. Die Reizelektrode besteht aus einem inneren Metallstift (+), der gegen das außen liegende Metallrohr (-) aus gleichem Material isoliert ist (bipolare Elektrode), so dass die elektrischen Feldlinien des Stimulationspulses sich auf die dem Herzen im Bereich des Sinusknotens aufliegende Fläche der Elektrode beschränken und der elektrische Puls nur durch das physiologische Erregungsleitungssystem des Herzens weitergeleitet wird.

II.B Versuchsdurchführung

II.B.1 Tierspezies

Versuchstiere waren bei der Charakterisierung der K_{ATP} -Blocker männliche Meerschweinchen vom Stamm Dunkin Hartley Pirbright White (CrI:HA) vom Züchter und Lieferanten Charles River, die am Versuchstag zwischen 250 und 350 Gramm wogen. Meerschweinchen wurden Ratten vorgezogen, da ihr Aktionspotential dem des Menschen ähnlicher ist.

Die Globalischämieversuche wurden mit Ratten vom Stamm Wistar durchgeführt. Die Tiere hatten ein Gewicht von 300 bis 400 Gramm. Züchter und Lieferant war Harlan Winkelmann.

Die Haltung und Tötung der Tiere erfolgten entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen.

II.B.2 Präparation der Herzen

Die Meerschweinchen wurden durch einen kurzen Genickschlag betäubt und dann mit einem Kehlschnitt, der auch die Wirbelsäule durchtrennte, getötet. Nach dem raschen Entbluten wurde der Thorax des Tieres geöffnet, der Herzbeutel aufgeschnitten und das Herz mit einem möglichst langen Aortenstück entnommen. Das Herz wurde sofort in eisgekühltem Puffer von Blut sowie Fett und Lungengewebe befreit. Die Aorta wurde kanüliert und die Kanüle sorgfältig befestigt. Daraufhin wurde das Herz in die Langendorff-Apparatur überführt. Die Gesamtdauer der Präparation betrug etwa drei Minuten. Neben der möglichst raschen Durchführung ist die Präparation des Herzen auf Eis und in eiskalter Lösung besonders wichtig, um die unvermeidbare Beeinträchtigung des Herzens so gering und so vorübergehend wie möglich zu halten.

Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Narcoren®; 160 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Gleichzeitig wurde Heparin (Liquemin N® 5000; 5000 I.U.) appliziert, um die Blutgerinnung im Herzen aufzuheben. Die Präparation erfolgte ansonsten analog zu der der Meerschweinchen.

Nach Perfusionsbeginn wurden mit den ersten Kontraktionen die letzten Blutreste aus den Koronarien herausgespült. Sobald der Koronarfluss wieder abnahm, der zu Beginn als

Reaktion auf die Ischämie während der Präparation erhöht war, wurde mit der Instrumentierung des Herzens begonnen.

II.B.3 Pufferlösungen

Verwendet wurden modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer), die täglich frisch in destilliertem Wasser angesetzt wurden (Tabelle II.1 und Tabelle II.2).

Tabelle II.1: Krebs-Henseleit-Puffer für die Versuche mit Meerschweinchen

Substanz	mM	Hersteller / Nummer
Kalziumchlorid-2-hydrat	2,5	Riedel-de Haen / 31307
Natriumchlorid	118	Merck / 1.06400.
Kaliumchlorid	4,7	Riedel-de Haen / 31249
Natriumhydrogencarbonat	25	Riedel-de Haen / 31437
Magnesiumsulfat-6-hydrat	1,2	Riedel-de Haen / 31420
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1,2	Merck / 1.06346.
D(+)-Glucose-Monohydrat	5	Merck / 1.08342.
Natriumpyruvat	2	Merck / 1.06619.

Abweichend von den Angaben in Tabelle II.1 wurde bei den Ischämieversuchen der Meerschweinchen die Glucosekonzentration auf 11 mM erhöht (Khandoudi et al. 1996; Owen et al. 1990; King et al. 1995).

Tabelle II.2: Krebs-Henseleit-Puffer für die Versuche mit Ratten (modifiziert nach Iwai et al. 2000)

Substanz	mM	Hersteller / Nummer
Kalziumchlorid-2-hydrat	2,5	Riedel-de Haen / 31307
Natriumchlorid	120	Merck / 1.06400.
Kaliumchlorid	4,8	Riedel-de Haen / 31249
Natriumhydrogencarbonat	25	Riedel-de Haen / 31437
Magnesiumsulfat-6-hydrat	1,2	Riedel-de Haen / 31420
D(+)-Glucose-Monohydrat	11	Merck / 1.08342.
Kaliumdihydrogenphosphat	1,2	Riedel-de Haen / 04243

Der pH-Wert der Lösung ohne Begasung lag bei $7,51 \pm 0,04$. Durch Begasung mit Carbogen (oder einem anderen Gas mit 5% Kohlendioxid) wurde die Lösung auf $7,39 \pm 0,02$ gepuffert (Carbonat-Puffer).

II.B.4 Substanzen

Von Amiodaron, Glibenclamid, S 92 0707, S 95 1957, S 94 1638, Meglitinid und Repaglinid wurden 10-mM-Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) und von Diazoxid und S1526 100-mM-Stammlösungen in DMSO hergestellt. Von Sotalol, HMR 1372, HMR 1098, HMR 1402 und S 0000 405 wurden 10-mM-Stammlösungen und von Natrium-5-hydroxydecanoat eine 100-mM-Stammlösung in KH-Puffer angesetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Stammlösungen in KH-Puffer entsprechend der gewünschten Endkonzentration verdünnt.

Sotalol, Diazoxid und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wurden von Sigma und Natrium-5-hydroxydecanoat von ICN bezogen, die anderen Substanzen wurden bei Aventis synthetisiert.

II.C Versuchsprotokolle

II.C.1 Meerschweinchenherzen

Vor Beginn jeden Versuchs wurden 30 min bis 70 min Einschlagphase benötigt, bis alle gemessenen Parameter konstant blieben. Danach begann eine 10minütige Kontrollphase, in der die Ausgangswerte des Herzens aufgezeichnet wurden. Herzen, deren Ausgangswerte nicht den Sollvorgaben entsprachen, mussten vom Versuch ausgeschlossen werden. Diese Sollvorgaben sehen vor, dass die Meerschweinchenherzen bei einer Herzfrequenz von 180 bis 280 Schlägen pro Minute (bpm) eine Druckdifferenz (LVDP) von mindestens 60 mm Hg aufbringen, wobei der Koronarfluss zwischen 6 und 14 ml/min liegen muss.

Sofern eine Substanz getestet wurde, erfolgte deren Applikation im Anschluss an die Kontrollphase für den gesamten weiteren Versuchsverlauf.

Normoxie

Im Anschluss an die Kontrollphase mit Carbogen-begastem KH-Puffer wurden für jeweils 15 Minuten steigende Konzentrationen der zu testenden Substanz gegeben. Danach wurde wieder mit KH-Puffer perfundiert, um zu testen, inwiefern die Wirkung reversibel war.

Hypoxie

Nach der Kontrollphase wurde die Begasung von Carbogen auf ein Gasgemisch mit nur noch 20% Sauerstoff (5% Kohlendioxid, 75% Stickstoff) umgestellt, worauf das Herz innerhalb der nächsten 5 Minuten mit einem deutlichen Anstieg des Koronarflusses reagierte, um das verminderte Sauerstoffangebot teilweise zu kompensieren. Betrag der Koronarflussanstieg weniger als 40% des Kontrollwertes, wurde das Herz vom Versuch ausgeschlossen. Nach zehnmütiger Hypoxie wurden für jeweils zehn Minuten ansteigende Substanzkonzentrationen appliziert.

Ischämie

Nach der Kontrollphase wurde das Herz mit 5 Hz stimuliert. Die Ischämie begann nach 15 Minuten: die Perfusion erfolgte mit KH-Puffer, der mit einem sauerstofffreien Gasgemisch (5% Kohlendioxid, 95% Stickstoff) auf den physiologischen pH-Wert eingestellt wurde. Zudem

wurde mit einem niedrigen Koronarfluss von 1,2 ml/min flusskonstant perfundiert, worauf wegen fehlenden Sauerstoff- und unzureichenden Substratangebotes sofort eine nahezu vollständige Abnahme der Kontraktionskraft eintrat. Das Aktionspotential verlängerte sich während der ersten Minute der Ischämie geringfügig und verkürzte sich danach deutlich. Bereits nach fünf Minuten wurde nahezu die maximale Verkürzung der MAPD₉₀ erreicht. Bei Einsetzen von Kammerflimmern oder nach 15 Minuten wurde mit der fünfzehnminütigen Reperfusion begonnen, bei der das Herz druckkonstant mit sauerstoffgesättigter Lösung perfundiert und weiterhin die Herzfrequenz konstant gehalten wurde.

II.C.2 Rattenherzen

Nach 15 min bis 40 min Einschlagphase, in der sich alle Parameter stabilisierten, begann eine 10minütige Kontrollphase, in der diese Ausgangswerte aufgezeichnet wurden. Diese Werte sollten bei Rattenherzen einen Koronarfluss von 6 bis 14 ml/min, eine Herzfrequenz von 250 bis 350 bpm und eine Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck von mindestens 80 mm Hg aufweisen.

Globalischämie

Nach 15 min Kontrollphase folgte eine Behandlungsphase. Danach wurde das Herz einer 40minütigen Globalischämie und 30 min Reperfusion ausgesetzt (modifiziert nach Iwai et al. 2000).

Für die Behandlungsphase gab es Protokolle zur Aufhebung und zur Nachahmung der ischämischen Präkonditionierung (IPC). Die IPC wurde nach Laclau et al. (2001) mit dreimal je fünf Minuten Globalischämie und fünf Minuten Reperfusion herbeigeführt. Um die IPC aufzuheben, wurde 10 min vor der Präkonditionierung und in den drei Reperfusionsphasen ein K_{ATP}-Blocker gegeben. Zur Nachahmung der IPC wurde 10 min vor der Globalischämie ein K_{ATP}-Öffner appliziert. Ein weiteres Behandlungsprotokoll bestand aus zehnminütiger Gabe eines K_{ATP}-Blockers, gefolgt von 10 min Applikation einer Kombination aus Blocker und Öffner.

Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurde das Herz mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) - Lösung gefärbt. TTC setzte sich mit NADH zu einem roten Formazan und NAD⁺ um. Diese Reaktion findet nur in metabolisch aktiven Zellen statt. Das Infarktgebiet mit dem geschädigten Gewebe blieb daher weiß. TTC wurde 1,5%ig in einer Mischung aus 10% Phosphatpuffer

(Puffer pH 7,00 , Riedel-de Haen 33546) und 90% isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius) gelöst. Die TTC-Lösung wurde auf 37°C erwärmt.

Nach Versuchsende wurde das Herz an der Glaskanüle, die in die Aorta eingebunden wurde, aus der Langendorff-Apparatur entnommen. Über diese Glaskanüle wurde das Herz mittels einer Spritze langsam mit 20 ml TTC-Lösung durchspült. Die Reaktion wurde beendet, indem das Herz mit 10 ml eiskalter KH-Pufferlösung perfundiert wurde. Darauf wurde das Herz in 5 bis 6 gleichmäßige Scheiben geschnitten, die Herzspitze und die Herzbasis mit dem Aortenrest wurden verworfen. Die Herzscheiben wurden dann zwischen der Ober- und Unterseite einer Plastikpetrischale luftblasenfrei und ohne überschüssige Flüssigkeit gelegt. Die Herzscheiben wurden einzeln von jeder Seite fotografiert (Programm Leica Qwin) und danach gewogen.

II.D Datenauswertung und Statistik

II.D.1 Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot2001. In den Abbildungen werden die Ergebnisse der im jeweiligen Versuchsprotokoll wichtigsten Wirkung dargestellt. Während der Normoxie und Hypoxie wurde hauptsächlich der Koronarfluss untersucht, bei den Ischämieversuchen war es die Aktionspotentialdauer. Bei den Hypoxie- und Ischämieversuchen werden die Ergebnisse prozentual auf den jeweiligen Ausgangswert bezogen (Hypoxie: Kontrolle = Puffer mit Carbogen begast; Ischämie: präischämischer Kontrollwert = carbogenbegaster Puffer mit Substanz und Stimulation des Herzens mit 5 Hz). Die jeweiligen Mittelwerte aller gemessenen Parameter sind in Tabellen zusammengefasst.

II.D.2 Statistik

Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM). Die Anzahl der Experimente ist mit „n“ angegeben. Die Ergebnisse wurden mit dem gepaarten beziehungsweise ungepaarten Student t-Test mit a-priori-Ordnung auf Signifikanz geprüft ($p < 0,05$). Signifikanz wird im folgenden mit einem Sternchen * oder Kreuz + gekennzeichnet. Die Signifikanz bezieht sich bei der Normoxie auf die Kontrolle und in den Hypoxieversuchen auf die Hypoxie, jeweils vor Substanzgabe. Bei den Ischämieversuchen sind die Werte nach 5 min Ischämie bei unterschiedlichen Substanzkonzentrationen auf den entsprechenden Wert ohne Substanz (Puffer) bezogen. Zusätzlich ist die $MAPD_{90}$ des präischämischen Kontrollwertes angegeben, um die $MAPD_{90}$ -Verkürzung unter Ischämie oder deren Blockade durch die Substanz zu verdeutlichen.

Aus den Wirkungen der verschiedenen Konzentrationen auf den normoxischen und hypoxischen Koronarfluss und die ischämische Aktionspotentialdauer wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven errechnet. Die IC_{50} -Werte und der sigmoide Kurvenverlauf wurden durch das Programm SigmaPlot 2001 nach folgender Formel berechnet:

$$y - y_0 = \frac{(y_{100} - y_0) * c^H}{IC_{50}^H + c^H}$$

dabei sind y die Inhibition bei der Substanzkonzentration $[c]$, y_0 die minimale Inhibition, y_{100} die maximale Inhibition, IC_{50} Konzentration für die halbmaximale Inhibition und H der Hill-Koeffizient.

Die Infarktfläche wurde mit Hilfe des Auswerteprogramms QUIPS im Vergleich zur Gesamtfläche jeder Seite der Herzscheibe bestimmt. Das prozentuale Infarktgewicht bezogen auf das Gesamtgewicht des Herzens wurde dann folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Infarktgewicht} = \left(\frac{\sum \text{Mittelwert Infarktfläche} \cdot \text{Gewicht Herzscheibe}}{\sum \text{Mittelwert Gesamtfläche} \cdot \text{Gewicht Herzscheibe}} \right) * 100\%$$

Die Mittelwerte der Flächen errechneten sich aus den Flächen der Oberseite und der Unterseite jeder Herzscheibe. Im Zähler der obigen Formel stand dabei die Summe der Infarktgewichte jeder Herzscheibe. Dadurch wurden die unterschiedlichen Gewichte der Scheiben berücksichtigt. Das prozentuale Infarktgewicht bezog sich auf das ganze Herz, da durch die Globalischämie das gesamte Herz einem Infarktisiko ausgesetzt war.

III Ergebnisse

III.A Kontrollversuche

Die Kontrollversuche dienten der Ermittlung der Normalwerte und der Erstellung von Vergleichsdaten in den drei verschiedenen Versuchsbedingungen Normoxie, Hypoxie und Ischämie ohne Anwesenheit von Substanzen. Da die meisten Substanzen nicht wasserlöslich sind, wurden konzentrierte Lösungen in DMSO hergestellt. Bei der Verdünnung in die Perfusionslösung hatte eine 1-, 10- bzw. 30-mikromolare Lösung einen DMSO-Anteil von 0,01%, 0,1% bzw. 0,3%. Um mögliche Wirkungen von DMSO auszuschließen, wurde zunächst DMSO allein unter den drei Versuchsbedingungen untersucht.

III.A.1 Wirkung von DMSO in Normoxie

In den Normoxie-Versuchen wurde von den in DMSO gelösten Substanzen maximal eine Konzentration von 30 μM verwendet. Durch den DMSO-Gehalt der verwendeten Stammlösungen konnten Konzentrationen bis zu 0,3% DMSO auftreten. Aus Abbildung III.1 wird ersichtlich, dass diese DMSO-Konzentration in jeweils 15 min Einwirkzeit keine signifikante Wirkung auf den Koronarfluss besitzt.

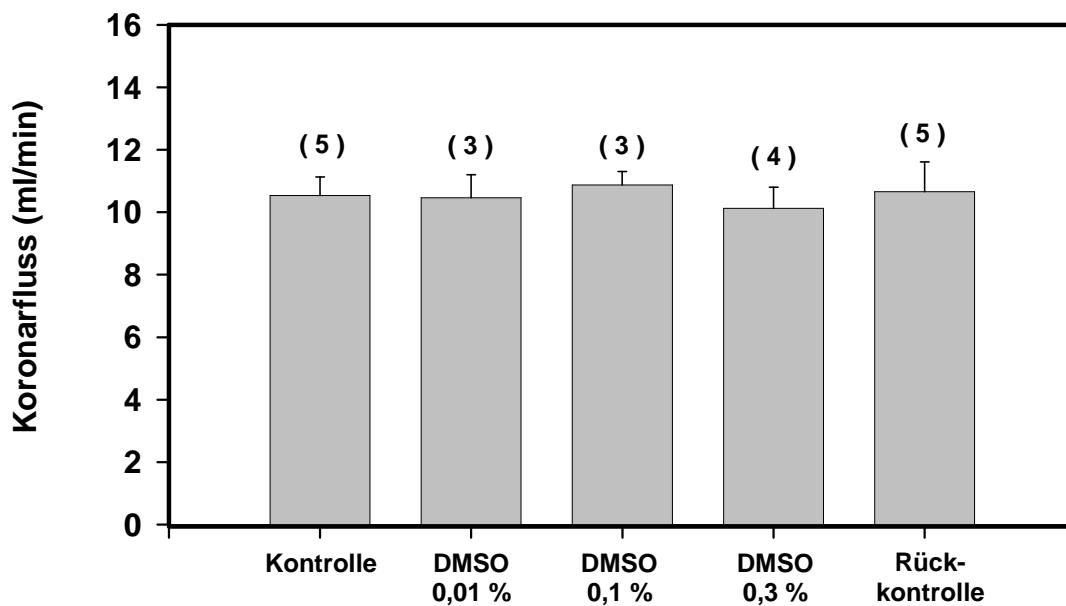


Abbildung III.1: Wirkung von DMSO auf den Koronarfluss während Normoxie

Die fehlende Wirkung des Lösungsmittels DMSO auf alle gemessenen Herzparameter ist in Tabelle III.1 zusammengefasst (zur besseren Übersichtlichkeit in Kapitel III.A.4).

DMSO kann demnach unter normoxischen Bedingungen als Lösungsmittel eingesetzt werden, ohne dass dadurch die gemessenen Parameter beeinflusst werden.

III.A.2 Wirkung von DMSO in Hypoxie

In Hypoxie-Versuchen wurden DMSO-Konzentrationen bis zu 1% getestet. Aus Abbildung III.2 wird ersichtlich, dass dadurch keine signifikante Wirkung auf den Koronarfluss erfolgte. Substanzkonzentrationen bis 100 µM konnten daher während der Hypoxie getestet werden, ohne unerwünschte Wirkungen des Lösungsmittels befürchten zu müssen.

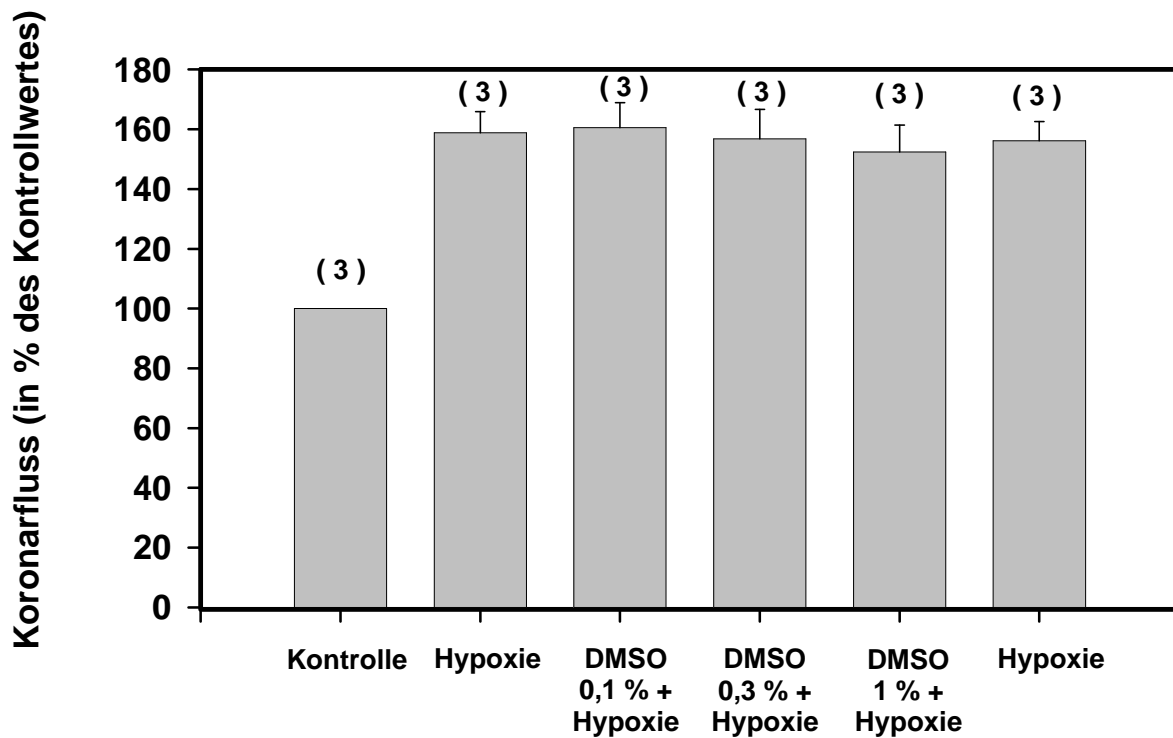


Abbildung III.2: Wirkung von DMSO auf den Koronarfluss während Hypoxie

Tabelle III.2 in Kapitel III.A.4 zeigt die Messwerte der Herzfunktionen unter Hypoxie bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.

III.A.3 Ischämie

Vor der Untersuchung der Wirkung von DMSO bei Ischämie wurde das Verhalten der Herzen unter Ischämie-Bedingungen untersucht.

Kontrollexperimente unter Ischämie

In Abbildung III.3 ist der Zeitverlauf der Verkürzung der MAPD₉₀ bei Ischämie dargestellt. Es handelte sich um ein Kontrollexperiment mit Krebs-Henseleit-Puffer, der sauerstofffrei begast wurde. Da sich unter ischämischen Bedingungen die Herzfrequenz vermindert, wurden in allen Ischämieversuchen die Herzen mit einer Elektrode über den Sinusknoten mit einer Frequenz von 5 Hz stimuliert. Die MAPD₉₀ wurde auf den präischämischen Kontrollwert, bei dem das Herz bereits mit 5 Hz stimuliert wurde, normiert, um die Streuung der Ausgangswerte auszugleichen und ausschließlich die Aktionspotentialsverkürzung zu betrachten.

Die Verkürzung der MAPD₉₀ erreichte bereits nach 5 Minuten Ischämie einen Plateauwert, der sich danach nur noch geringfügig verringerte. Zudem traten zu diesem Zeitpunkt noch keine Rhythmusstörungen auf. Daher wurde die MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie ausgewählt, um die Wirkungen von verschiedenen Substanzen und Substanzkonzentrationen zu vergleichen.

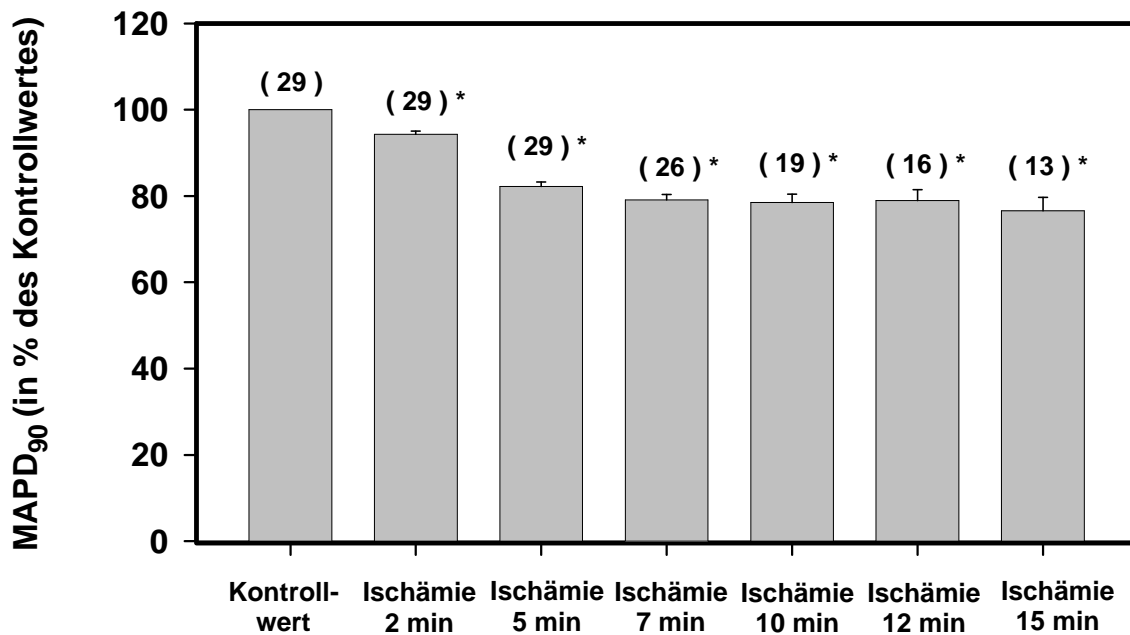


Abbildung III.3: Ischämische Verkürzung der monophasischen Aktionspotentialdauer ohne Substanzgabe; * p<0,05 vs. Kontrollwert

Zur besseren Verdeutlichung der Aktionspotentialverkürzung im Ischämieprotokoll zeigt Abbildung III.4 Originalaufzeichnungen der monophasischen Aktionspotentiale von einem repräsentativen Versuch.

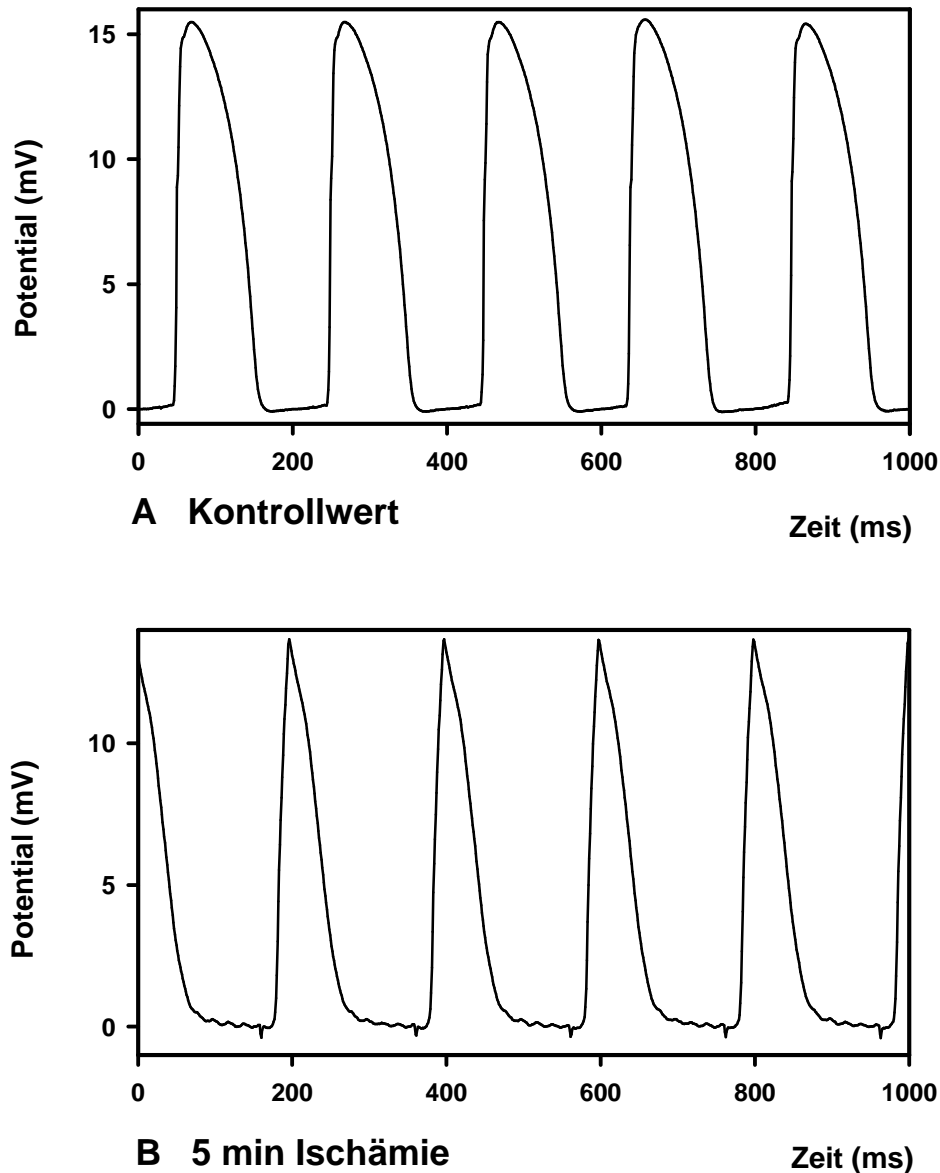


Abbildung III.4: Originalaufzeichnung des MAP ohne Substanzgabe, A Kontrollwert vor der Ischämie, B MAP nach 5 min Ischämie

Die Ischämie hatte nicht nur Auswirkungen auf das MAP, auch die mechanischen Parameter der Herzfunktion wurden signifikant beeinträchtigt. Die Herzfrequenz betrug stets 300 bpm, da die Herzen mit 5 Hz stimuliert wurden. Der Koronarfluss wurde während der Ischämie protokollgemäß bei 1,2 ml/min konstant-gehalten. Der Kontrollwert des Koronarflusses betrug $11,5 \pm 0,3$ ml/min. Es erfolgte also eine Reduktion des Koronarflusses während der Ischämie

auf 10% des Ausgangswertes („low flow ischemia“). Die Verkürzung der MAPD₉₀ von 121 ± 2 ms auf 99 ± 2 ms entspricht einer Verminderung auf 82,2 ± 1,0 % des Ausgangswertes.

In Tabelle III.3 (Kapitel III.A.4) sind alle Parameter zusammengefasst.

DMSO

In den Ischämieversuchen gelangte DMSO in einer Konzentration bis zu 0,3% in die Perfusionslösung, was einer Substanzkonzentration von 30 µM entspricht. Abbildung III.5 zeigt analog zu Abbildung III.3 den Zeitverlauf der Aktionspotentialverkürzung bei Zugabe von 0,3% DMSO während der Ischämie.

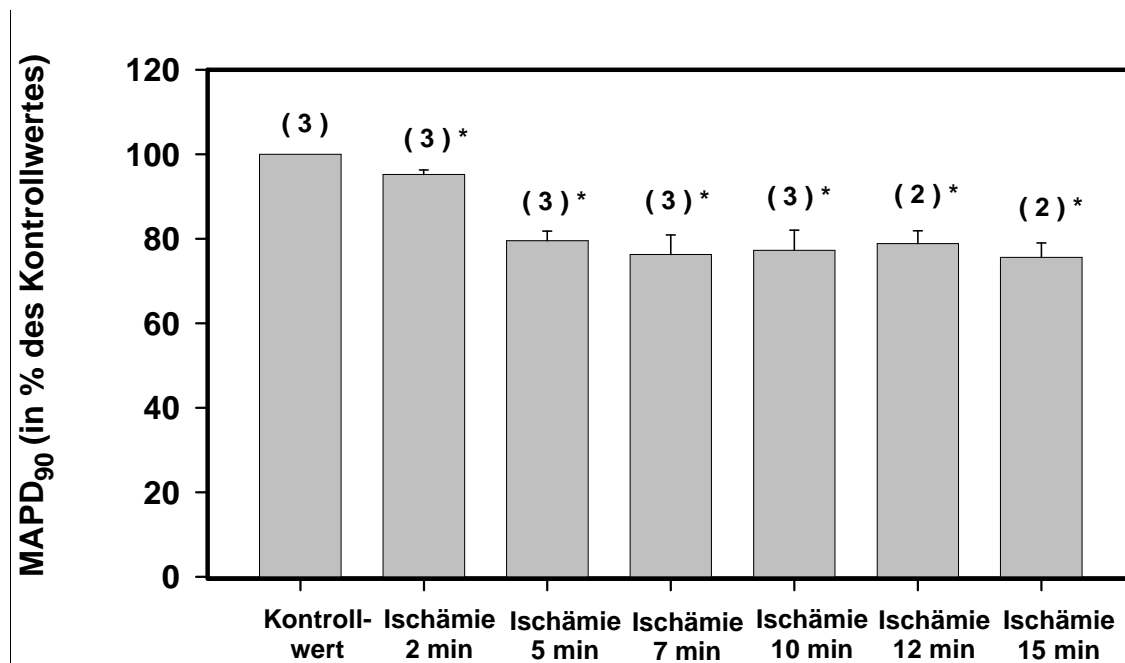


Abbildung III.5: Ischämische Verkürzung der MAPD₉₀ mit 0,3% DMSO (graue Balken) im Vergleich zur ischämischen MAPD₉₀-Verkürzung ohne DMSO (schraffierte Balken; siehe auch Abbildung III.3); die jeweilige Versuchsanzahl in Klammern und die Angaben zur Signifikanz beziehen sich auf die Versuche mit 0,3% DMSO; * p<0,05 vs. Kontrollwert

In der Tabelle III.4 (Kapitel III.A.4) sind die Messwerte von Versuchen mit 0,3% DMSO nach 5 min Ischämie zusammengefasst. DMSO hatte demnach keine signifikante Wirkung auf das MAP und die Herzfunktion während der Ischämie.

III.A.4 Tabellen

Die fehlende Wirkung des Lösungsmittels DMSO ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle III.1: Wirkung von DMSO während Normoxie; keine signifikanten Unterschiede vs. Kontrolle

DMSO in Normoxie

	Kontrolle	0,01% DMSO	0,1% DMSO	0,3% DMSO
n	5	3	3	4
LVP max [mm Hg]	120 ? 7	106 ? 5	118 ? 11	113 ? 11
LVP _{min} [mm Hg]	6,2 ? 0,5	5,0 ? 1,0	4,0 ? 0,6	4,8 ? 0,5
Herzfrequenz [bpm]	237 ? 11	227 ? 13	246 ? 17	245 ? 11
dP/dt+ [mm Hg/s]	2021 ? 208	1657 ? 160	2047 ? 339	1916 ? 311
Koronarfluss [ml/min]	10,5 ? 0,6	10,5 ? 0,7	10,9 ? 0,4	10,1 ? 0,7
MAPD ₉₀ [ms]	117 ? 3	121 ? 2	115 ? 5	114 ? 4

Tabelle III. 2: Wirkung von DMSO während Hypoxie; * p<0,05 vs. Hypoxie

DMSO in Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie + 0,1% DMSO	Hypoxie + 0,3% DMSO	Hypoxie + 1% DMSO
n	3	3	3	3	3
LVP max [mm Hg]	126 ? 5	101 ? 15	100 ? 12	95 ? 12	91 ? 9
LVP _{min} [mm Hg]	6,0 ? 1,0	17,3 ? 9,4	13,7 ? 6,3	16,0 ? 8,3	18,0 ? 8,5
Herzfrequenz [bpm]	242 ? 6	237 ? 1	240 ? 5	240 ? 9	237 ? 4
dP/dt+ [mm Hg/s]	2134 ? 106	1505 ? 361	1486 ? 292	1411 ? 281	1299 ? 258
Koronarfluss [ml/min]	9,9 ? 0,2	15,7 ? 0,9	15,9 ? 1,0	15,5 ? 1,2	15,1 ? 1,0

Ergebnisse

Tabelle III.3: Wirkung der Ischämie; * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert

Kontrollversuche in Ischämie

	Kontrollwert	Ischämie 2 min	Ischämie 5 min	Ischämie 7min	Ischämie 10min	Ischämie 12 min	Ischämie 15 min
n	29	29	29	26	19	16	13
LVP _{max} [mm Hg]	96 ? 3	13 * ? 1	10 * ? 1	9 * ? 1	8 * ? 1	8 * ? 1	7 * ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	5,4 ? 0,9	2,1 * ? 0,7	2,2 * ? 0,8	2,2 * ? 0,9	2,1 * ? 1,1	1,9 * ? 1,3	1,4 * ? 1,5
dP/dt+ [mm Hg/s]	1746 ? 53	289 * ? 9	231 * ? 10	214 * ? 10	191 * ? 10	185 * ? 10	178 * ? 12
MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	114 * ? 2	99 * ? 2	96 * ? 2	95 * ? 2	95 * ? 3	91 * ? 4

Tabelle III.4: Wirkung von DMSO nach 5 min Ischämie; + $p < 0,05$ vs. präischämischer Kontrollwert

DMSO in Ischämie

	0,3 % DMSO
n	3
LVP _{max} [mm Hg]	12 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,7 ? 0,7
dP/dt+ [mm Hg/s]	265 ? 13
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	83 + ? 4
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	105 ? 2

DMSO ist demzufolge ein geeignetes Lösungsmittel für wasserunlösliche Substanzen, die im isoliert-perfundierten Herzen nach Langendorff getestet werden, weil es in den verwendeten Konzentrationen die Herzfunktion nicht beeinflusst.

III.B Vergleichende Testung der K_{ATP} -Blocker

Im diesem Kapitel werden die Wirkungen von strukturell geringgradig abgewandelten K_{ATP} -Blockern miteinander verglichen, um dadurch eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufstellen zu können. Je zwei Substanzen werden einander gegenübergestellt, sowohl hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Vasokonstriktion in Normoxie und Hypoxie als auch bezüglich der Aufhebung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung.

III.B.1 Glibenclamid und Meglitinid

Abbildung III.6 zeigt die Strukturformeln von Glibenclamid und Meglitinid. Glibenclamid ist seit 1969 als Euglucon® (Hoechst, jetzt Aventis) zur Behandlung von Typ-II-Diabetes im Handel. Es ist der erste Vertreter der „2. Generation – Sulfonylharnstoffe“, da es im Gegensatz zum Vorgänger Tolbutamid bereits bei nanomolaren Konzentrationen pankreatische K_{ATP} -Kanäle blockiert. Glibenclamid bewirkt eine langsam einsetzende und lang anhaltende Insulinfreisetzung aus dem Pankreas. Bei Meglitinid ist im Vergleich zu Glibenclamid der Cyclohexylsulfonylharnstoff-Rest durch eine Carbonsäurefunktion ersetzt. Meglitinid ist der Namensgeber für eine Familie von Benzoessäurederivaten, die den K_{ATP} -Kanal blockieren.

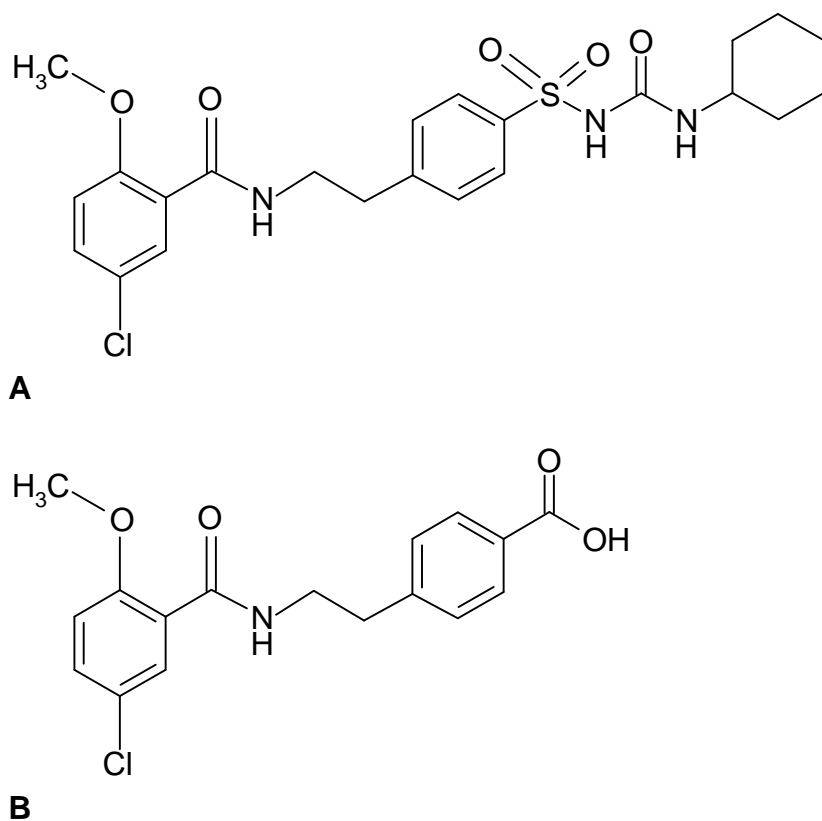


Abbildung III.6: Strukturformeln von A Glibenclamid und B Meglitinid

Zur besseren Verdeutlichung der Versuche werden in den folgenden Abbildungen Originalaufzeichnungen von einzelnen Versuchen mit Glibenclamid dargestellt.

Abbildung III.7 zeigt den Verlauf des Koronarflusses bei Applikation von steigenden Substanzkonzentrationen. Das stufenförmige Absinken des Koronarflusses nach Gabe einer höheren Glibenclamid-Konzentration ist deutlich zu erkennen. Durch Perfusion mit substanzfreier Pufferlösung ließ sich der Koronarfluss wieder steigern, die Wirkung von Glibenclamid war daher reversibel. Allerdings wurde der Ausgangswert nicht wieder erreicht.

Die Originalaufzeichnungen des hypoxischen Koronarflusses und die Wirkung von Glibenclamid zeigt Abbildung III.8. Der Koronarfluss-Anstieg durch hypoxische Begasung der Pufferlösung ist gut zu erkennen. Die Gabe von 10 nM Glibenclamid hatte nahezu keine Wirkung, 100 nM bewirkten eine deutliche Abnahme des hypoxischen Koronarflusses, die durch 1 μ M Glibenclamid nochmals gesteigert werden konnte.

Orinalaufzeichnung des Koronarflusses unter Normoxie

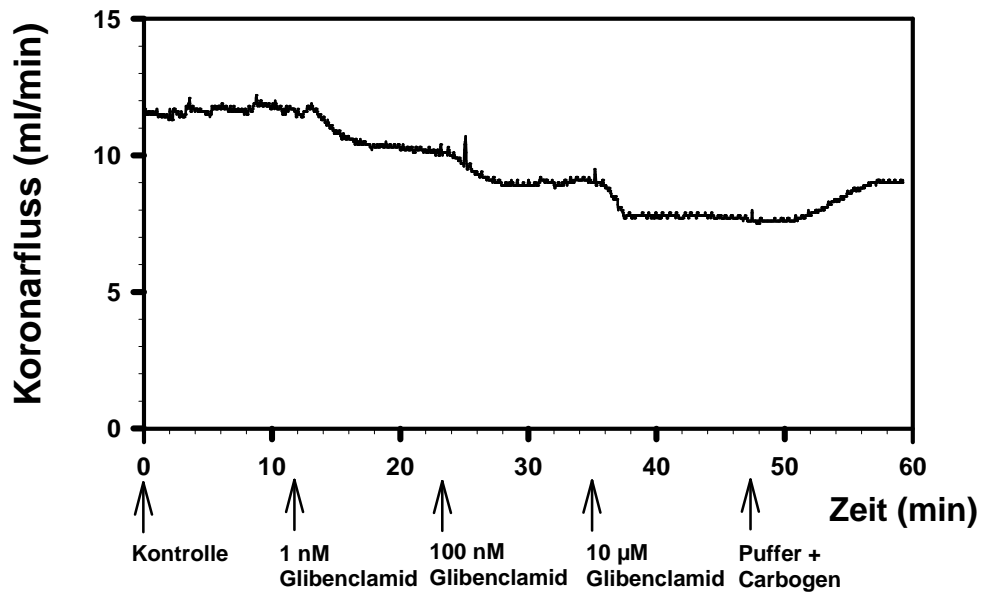


Abbildung III.7: Originalaufzeichnung vom Koronarfluss eines normoxischen Versuchs mit Applikation von Glibenclamid

Orinalaufzeichnung des Koronarflusses unter Hypoxie

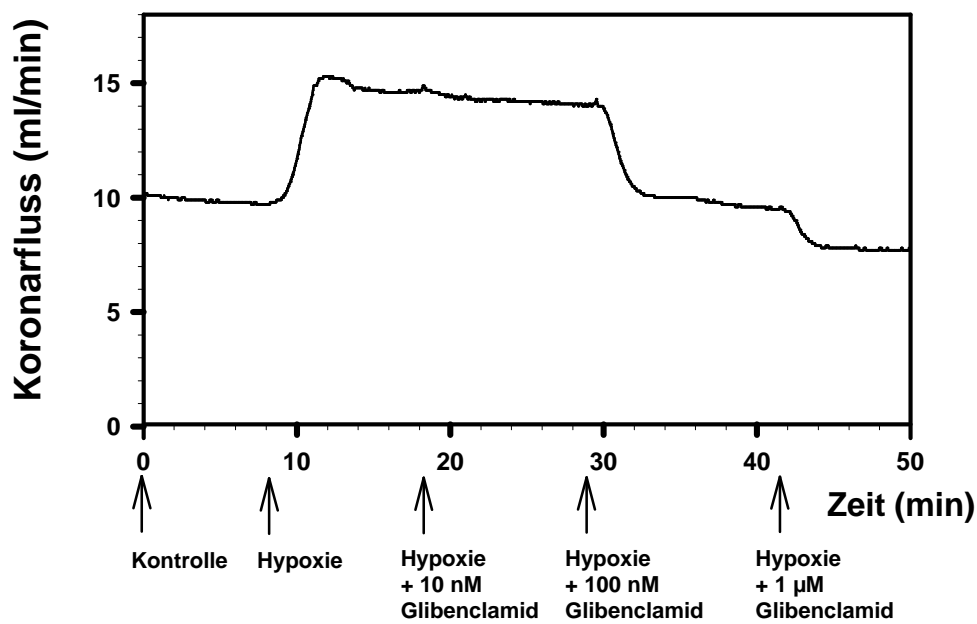


Abbildung III.8: Originalaufzeichnung vom Koronarfluss unter Hypoxie und Wirkung von Glibenclamid

In den Abbildungen III.9 und III.10 sind Originalaufzeichnungen des monophasischen Aktionspotentials dargestellt. Glibenclamid war in der angegebenen Konzentration sowohl beim präischämischen Kontrollwert als auch nach 5 min Ischämie in der Pufferlösung vorhanden. 30 nM Glibenclamid hatten keinen Einfluss auf die MAPD_{90} -Verkürzung durch die Ischämie, 3 μM Glibenclamid hoben diese Verkürzung dagegen vollständig auf.

Originalaufzeichnungen des monophasischen Aktionspotentials

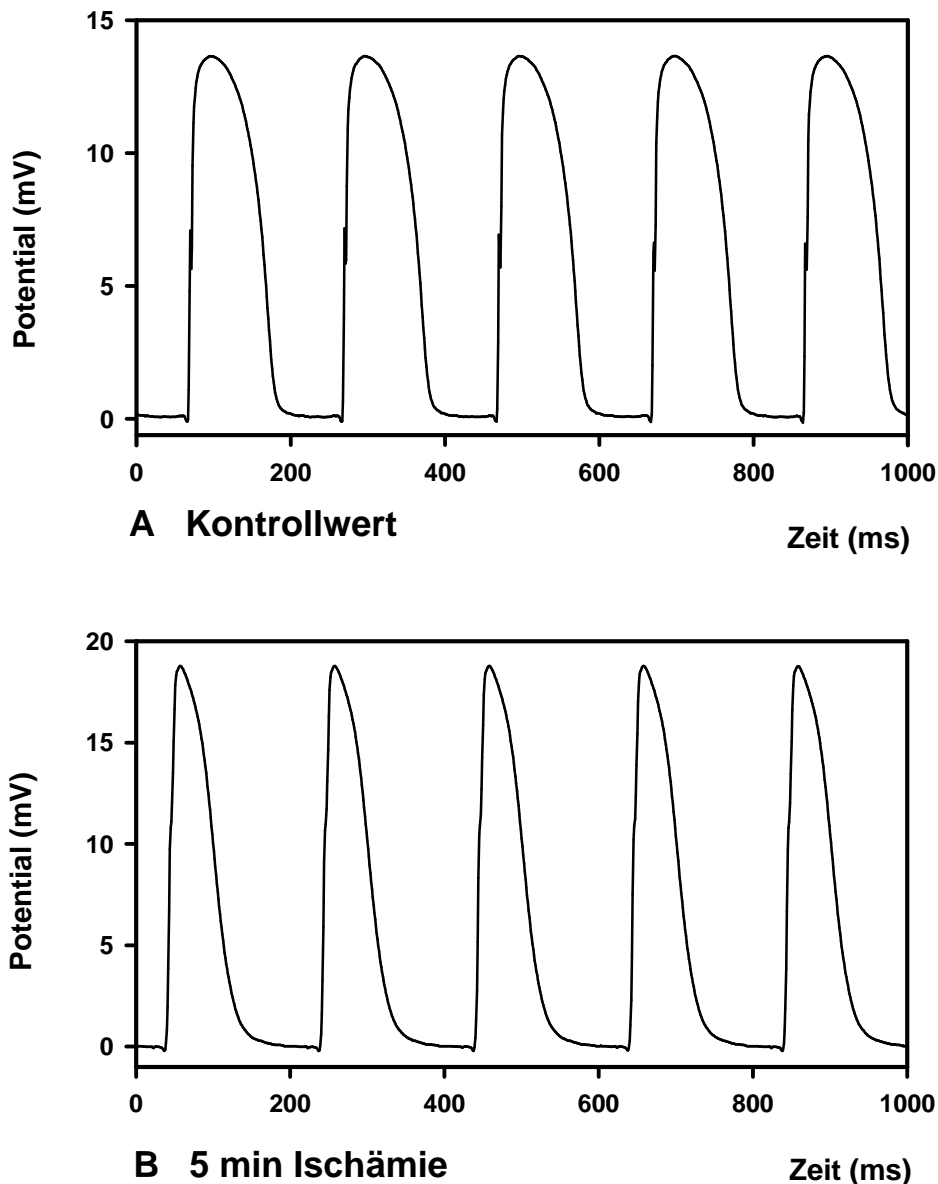


Abbildung III.9: Originalaufzeichnungen des MAP bei Anwesenheit von 30 nM Glibenclamid, A Kontrollwert vor der Ischämie, B MAP nach 5 min Ischämie

Originalaufzeichnungen des monophasischen Aktionspotentials

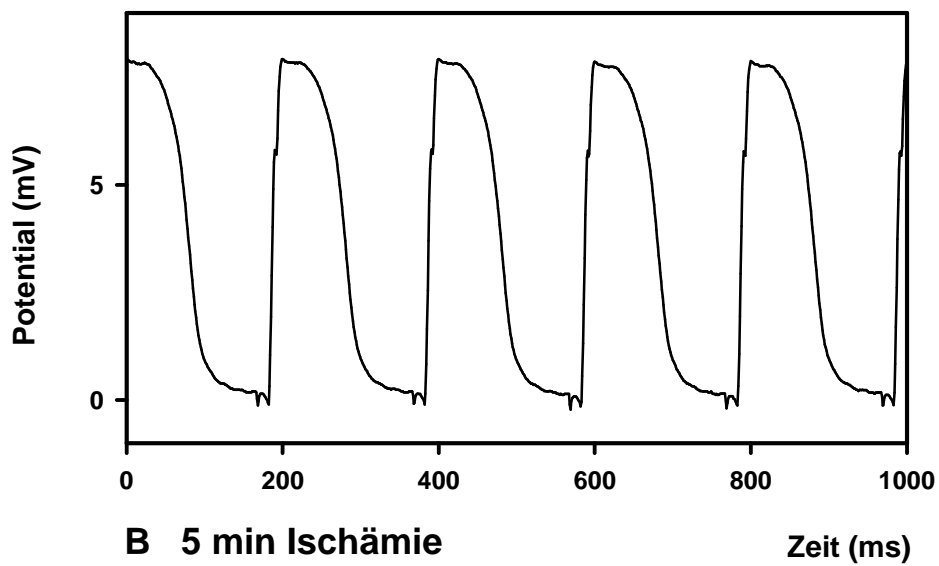
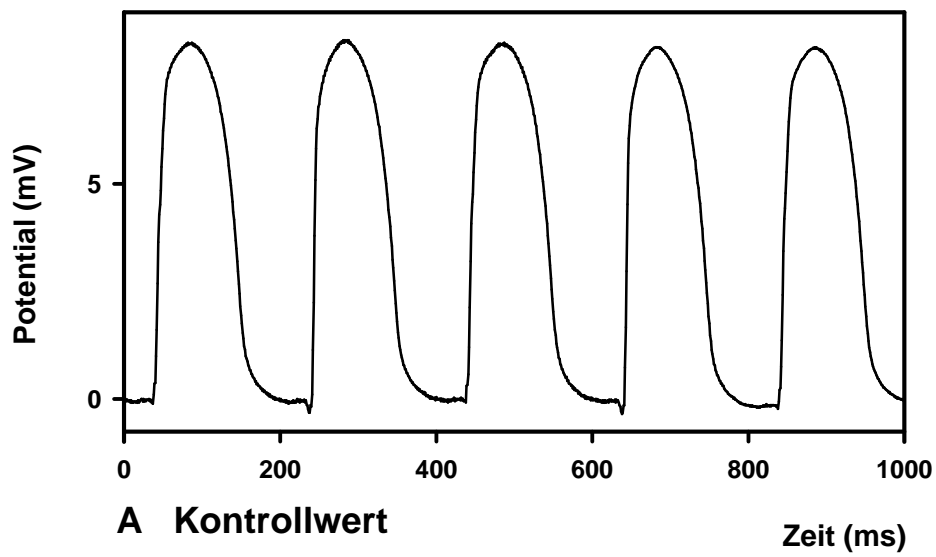


Abbildung III.10: Originalaufzeichnungen des MAP bei Anwesenheit von 3 μM Glibenclamid, A Kontrollwert vor der Ischämie, B MAP nach 5 min Ischämie

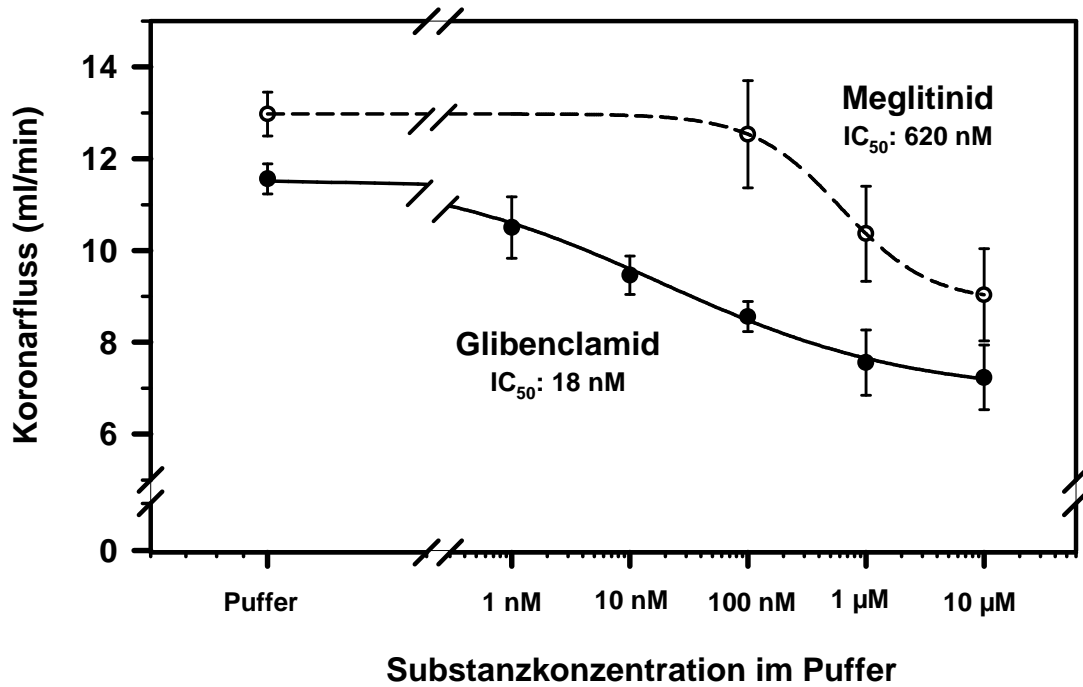
In den folgenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven werden die Ergebnisse dieser Versuchsserien mit Glibenclamid und Meglitinid zusammengefasst und einander gegenübergestellt.

Die Werte der Kontrolle bei den normoxischen Versuchen sind hinsichtlich des Koronarflusses deutlich unterschiedlich (Abbildung III.11 A). Diese Differenz von 1,4 ml/min liegt jedoch im Rahmen der biologischen Streuung verschiedener Versuchsserien. Für die Senkung des normoxischen und hypoxischen Koronarflusses betragen die IC_{50} -Werte 18 nM und 25 nM für Glibenclamid sowie 620 nM und 600 nM für Meglitinid. Meglitinid wirkte an den glatten Gefäßmuskeln also 24- bis 34-mal schwächer als Glibenclamid. Die Wirkung von Meglitinid auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung war bei gleicher Konzentration ebenfalls schwächer als die von Glibenclamid, was aus Abbildung III.11 C ersichtlich wird. Der IC_{50} -Wert für Glibenclamid bzw. Meglitinid betragen 95 nM bzw. 400 nM für die $MAPD_{90}$ nach 5 min Ischämie, was einer Verschiebung um den Faktor 4 entspricht.

Die weiteren Wirkungen von Glibenclamid sind in den Tabellen III.5 dargestellt. Unter normoxischen Bedingungen wurde das Aktionspotential erwartungsgemäß nicht beeinflusst. Allerdings fiel auf, dass das MAP relativ lang war, was aber durch die niedrige Herzfrequenz und biologische Streuung erklärbar ist. Neben einer Verringerung des Koronarflusses wurde eine Senkung der linksventrikulären systolischen Druckentwicklung (LVP_{max}) und der Kontraktilität ($dP/dt+$) beobachtet, die aber erst bei höheren Konzentrationen auftrat. In der Hypoxie wurde neben dem Koronarfluss ab 300 nM auch die Kontraktilität signifikant gesenkt. Während der Ischämie war die Verlängerung der Aktionspotentialdauer im Vergleich zu puffer-perfundierten Herzen bei Konzentrationen ab 100 nM signifikant, ansonsten bestand kein Unterschied zu den unbehandelten Herzen. Zudem waren die Konzentrationen ab 500 nM Glibenclamid nicht mehr signifikant verschieden von den dazugehörigen präischämischen Kontrollwerten, so dass ab dieser Konzentration eine deutliche Wirkung auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal zu beobachten ist.

Die Wirkung von Meglitinid ist in Tabelle III.6 zusammengefasst. Meglitinid beeinflusste die Herzfunktion kaum, erst bei einer Konzentration von 10 μ M waren in den normoxischen Versuchen eine Verringerung von LVP_{max} , LVP_{min} und Koronarfluss signifikant.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

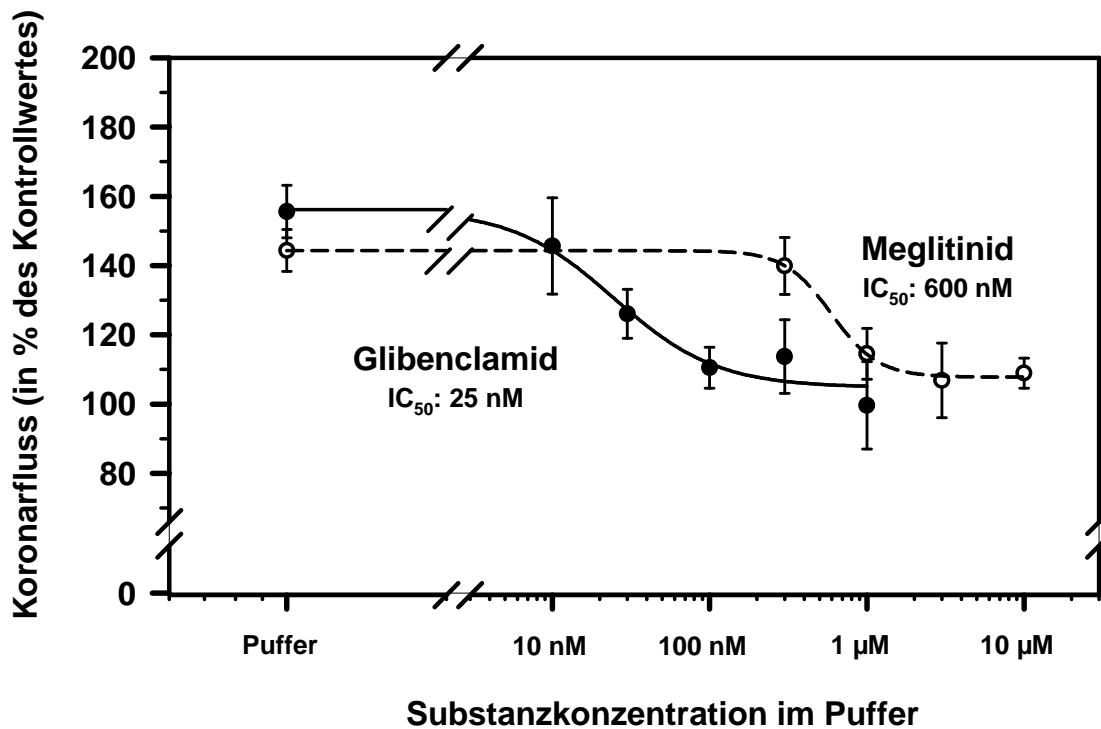


Abbildung III.11 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glibenclamid und Meglitinid, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

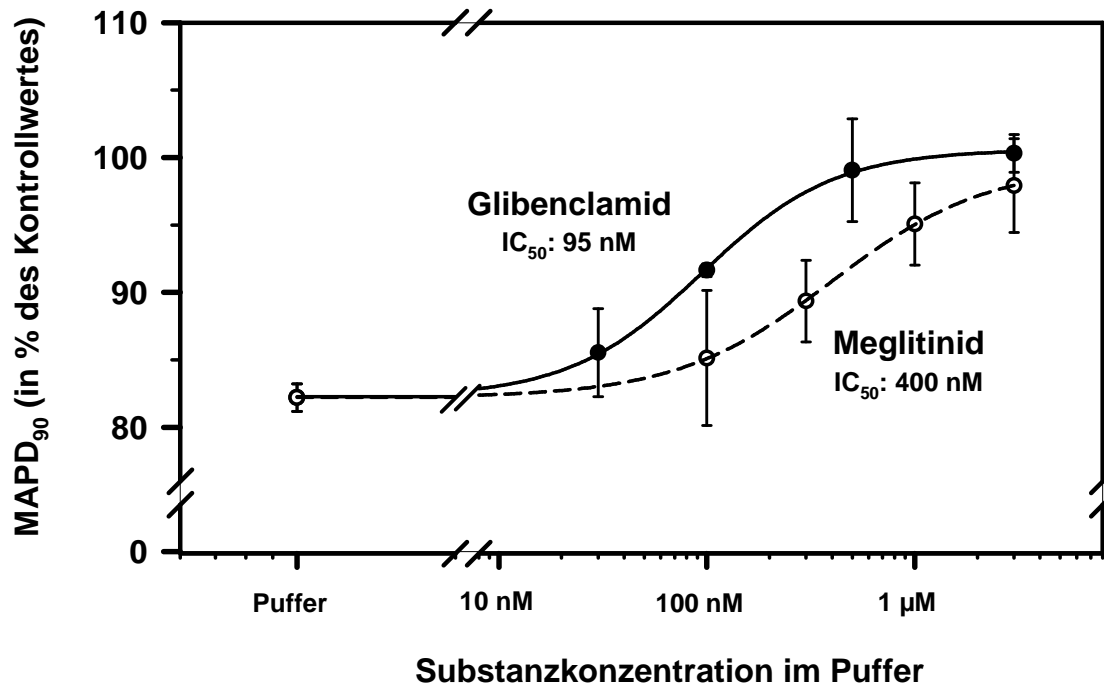
C MAPD₉₀ unter Ischämie

Abbildung III.11 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glibenclamid und Meglitinid, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Den in diesem Abschnitt vorgestellten Versuchen zufolge wirkte Glibenclamid stärker auf K_{ATP}-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur als auf die des Myokards. Bei unseren Versuchen zeigte Meglitinid ungefähr gleiche Effektivität bezüglich der Wirkung auf den vaskulären und myokardialen Kanal. Für eine differenzierte Wirkung auf SUR 2A, ohne eine Beeinflussung von SUR 2B, schien demnach die bei Meglitinid fehlende Sulfonylharnstoff bzw. Sulfonylthioharnstoffgruppe wichtig zu sein. Zudem erwies sich Meglitinid im Vergleich zu Glibenclamid als deutlich schwächer wirksam.

Ergebnisse

Tabelle III.5: Wirkung von Glibenclamid, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie * p<0,05 vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, † p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

Glibenclamid

A Normoxie

	Kontrolle	1 nM Glibenclamid	10 nM Glibenclamid	100 nM Glibenclamid	1 µM Glibenclamid	10 µM Glibenclamid
n	10	4	5	5	5	3
LVP _{max} [mm Hg]	116 ? 3	106 ? 7	101 * ? 5	90 * ? 2	71 * ? 3	76 * ? 8
LVP _{min} [mm Hg]	5,2 ? 0,7	2,0 ? 1,1	-0,6 ? 1,2	4,0 ? 4,4	-2,8 * ? 1,5	-5,0 * ? 2,6
Herzfrequenz [bpm]	221 ? 6	236 ? 15	209 ? 10	209 ? 8	224 ? 8	190 * ? 13
dP/dt+ [mm Hg/s]	1817 ? 75	1731 ? 107	1594 ? 81	1361 * ? 42	1166 * ? 87	1231 * ? 208
Koronarfluss [ml/min]	11,6 ? 0,3	10,5 ? 0,7	9,5 * ? 0,4	8,6 * ? 0,3	7,6 * ? 0,7	7,2 * ? 0,7
MAPD ₉₀ [ms]	146 ? 3	141 ? 1	150 ? 7	152 ? 7	146 ? 5	153 ? 12

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +10 nM Glibenclamid	Hypoxie +30 nM Glibenclamid	Hypoxie +100 nM Glibenclamid	Hypoxie +300 nM Glibenclamid	Hypoxie +1 µM Glibenclamid
n	8	8	5	6	8	5	3
LVP _{max} [mm Hg]	104 ? 5	61 ? 3	59 ? 7	63 ? 3	56 ? 4	54 ? 7	50 ? 14
LVP _{min} [mm Hg]	3,0 ? 0,9	16,5 ? 5,5	12,4 ? 4,2	21,3 ? 7,2	18,1 ? 6,5	26,8 ? 10,6	30,3 ? 17,9
Herzfrequenz [bpm]	233 ? 7	225 ? 14	229 ? 10	201 ? 20	201 ? 15	200 ? 22	268 ? 45
dP/dt+ [mm Hg/s]	1720 ? 98	886 ? 70	917 ? 56	654 ? 112	674 ? 81	442 * ? 117	365 * ? 129
Koronarfluss [ml/min]	10,9 ? 0,8	16,6 ? 0,8	15,6 ? 0,7	14,1 ? 1,3	11,9 * ? 1,0	11,8 * ? 1,0	11,1 * ? 1,3

C Ischämie

	Puffer	30 nM Glibenclamid	100 nM Glibenclamid	500 nM Glibenclamid	3 µM Glibenclamid
n	29	3	3	5	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	8 ? 1	8 ? 3	9 ? 1	13 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	-1,7 ? 0,3	-1,0 ? 1,7	0,2 ? 1,2	1,3 ? 1,2
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	240 ? 43	259 ? 20	226 ? 14	284 ? 22
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 † ? 2	111 † ? 2	117 * † ? 1	120 * ? 3	127 * ? 1
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	130 ? 4	128 ? 1	121 ? 2	126 ? 2

Ergebnisse

Tabelle III.6: Wirkung von Meglitinid, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie - keine signifikanten Unterschiede vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie – keine signifikanten Unterschiede vs. Puffer (ungepaarter t-test), + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

Meglitinid

A Normoxie

	Kontrolle	100 nM Meglitinid	1 µM Meglitinid	10 µM Meglitinid
n	4	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	141 ? 6	136 ? 7	119 ? 5	113 * ? 8
LVP _{min} [mm Hg]	6,5 ? 0,6	3,3 ? 1,2	1,3 ? 2,3	-1,0 * ? 2,5
Herzfrequenz [bpm]	216 ? 9	215 ? 14	216 ? 11	223 ? 24
dP/dt+ [mm Hg/s]	2086 ? 105	2022 ? 96	1791 ? 30	1716 ? 86
Koronarfluss [ml/min]	13,0 ? 0,5	12,5 ? 1,2	10,4 ? 1,0	9,0 * ? 1,0
MAPD ₉₀ [ms]	128 ? 2	127 ? 4	126 ? 1	129 ? 2

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +300 nM Meglitinid	Hypoxie +1 µM Meglitinid	Hypoxie +3 µM Meglitinid	Hypoxie +10 µM Meglitinid
n	7	7	3	5	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	97 ? 9	69 ? 5	70 ? 3	69 ? 4	72 ? 2	57 ? 5
LVP _{min} [mm Hg]	5,7 ? 1,4	21,7 ? 4,5	29,7 ? 8,7	21,6 ? 7,5	15,7 ? 1,7	21,0 ? 11,9
Herzfrequenz [bpm]	257 ? 11	222 ? 23	184 ? 37	192 ? 26	138 ? 35	192 ? 32
dP/dt+ [mm Hg/s]	1629 ? 123	841 ? 93	608 ? 154	765 ? 148	823 ? 81	602 ? 211
Koronarfluss [ml/min]	12,8 ? 1,3	18,7 ? 2,4	18,0 ? 4,2	15,7 ? 2,8	13,8 ? 0,5	15,8 ? 2,2

C Ischämie

	Puffer	100 nM Meglitinid	300 nM Meglitinid	1 µM Meglitinid	3 µM Meglitinid
n	29	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	11 ? 2	9 ? 5	11 ? 2	11 ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	2,3 ? 2,4	-1,3 ? 5,0	2,7 ? 1,8	1,3 ? 1,7
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	224 ? 22	265 ? 27	206 ? 28	243 ? 5
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	98 ? 7	99 ? 4	112 ? 1	111 ? 2
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	115 ? 4	110 ? 1	118 ? 3	114 ? 5

III.B.2 Glibenclamid und S 94 1638

Die Substanz S 94 1638 in Abbildung III.12 unterscheidet sich von Glibenclamid (Abbildung III.6 A) durch das Schwefelatom, das den Sulfonylharnstoff Glibenclamid zu einem Sulfonylthioharnstoff macht.

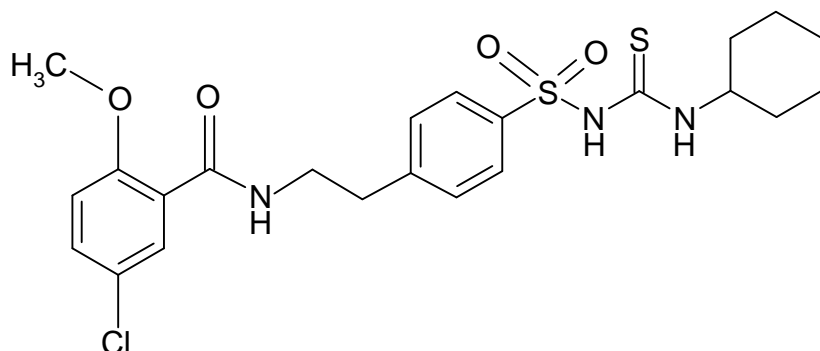
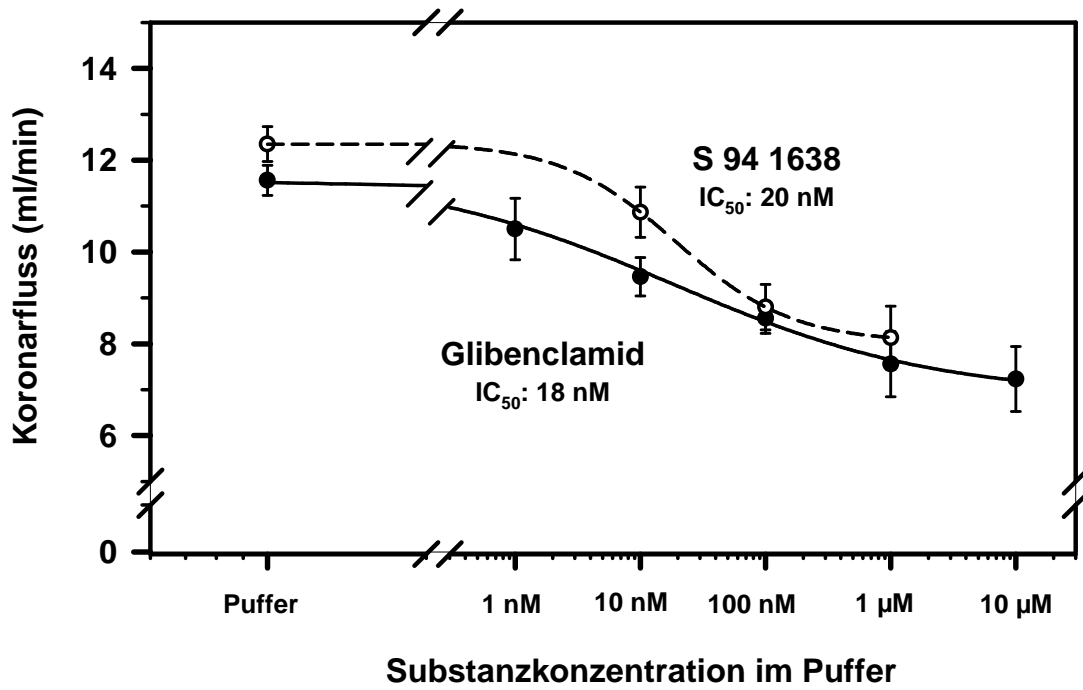


Abbildung III.12: Strukturformel von S 94 1638

Aus Abbildung III.13 lässt sich leicht der positive Einfluss dieser Strukturvariation erkennen. Die Wirkungen auf den normoxischen und hypoxischen Koronarfluss waren gleich bzw. sogar um den Faktor 5 geringer als bei Glibenclamid. Die dazugehörigen IC_{50} -Werte waren 20 nM und 130 nM. Dagegen war die erwünschte Wirkung auf die $MAPD_{90}$ nach 5 min Ischämie um den Faktor 10 nach rechts verschoben, der IC_{50} -Wert von S 94 1638 betrug 8,8 nM.

Die in Tabelle III.5 dargestellte Wirkung des Glibenclamids auf die Herzfunktion wies das Thioderivat S 94 1638 in deutlich geringerem Maße auf. In Tabelle III.7 wird gezeigt, dass die unter normoxischen Versuchsbedingungen erfolgende Senkung von LVP_{max} und Kontraktilität erst bei 1 μ M signifikant wurde. Bereits mit 3 nM S 94 1638 war dagegen die ischämische Aktionspotentialverkürzung nicht mehr signifikant verschieden vom präischämischen Wert.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

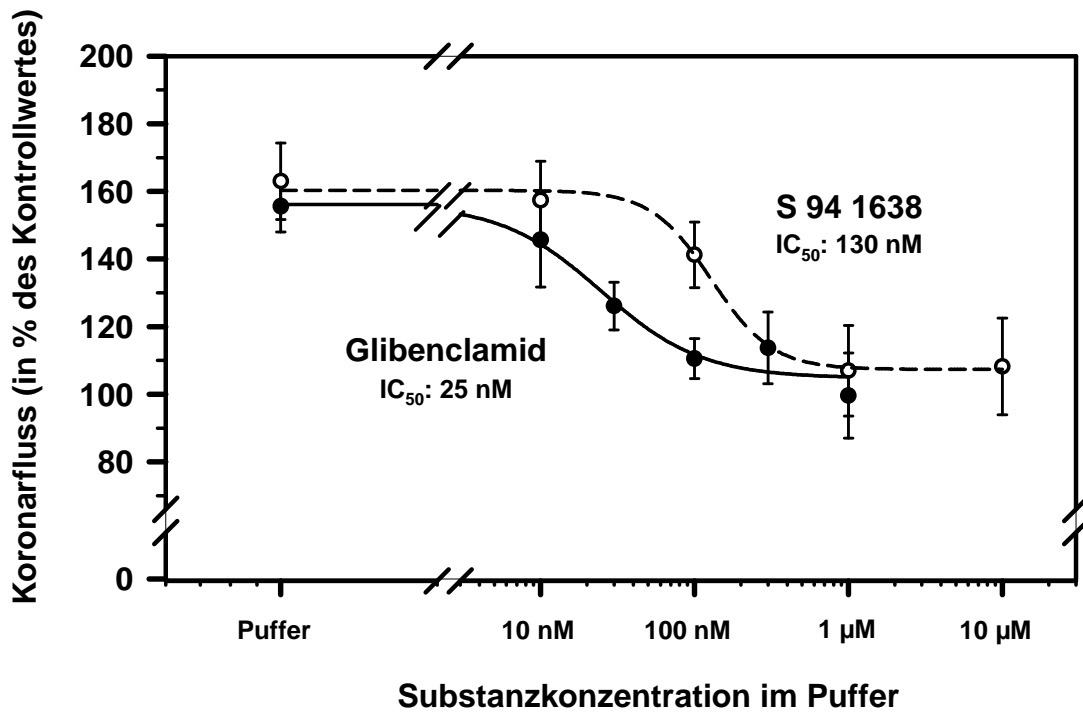


Abbildung III.13 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glibenclamid und S 94 1638, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

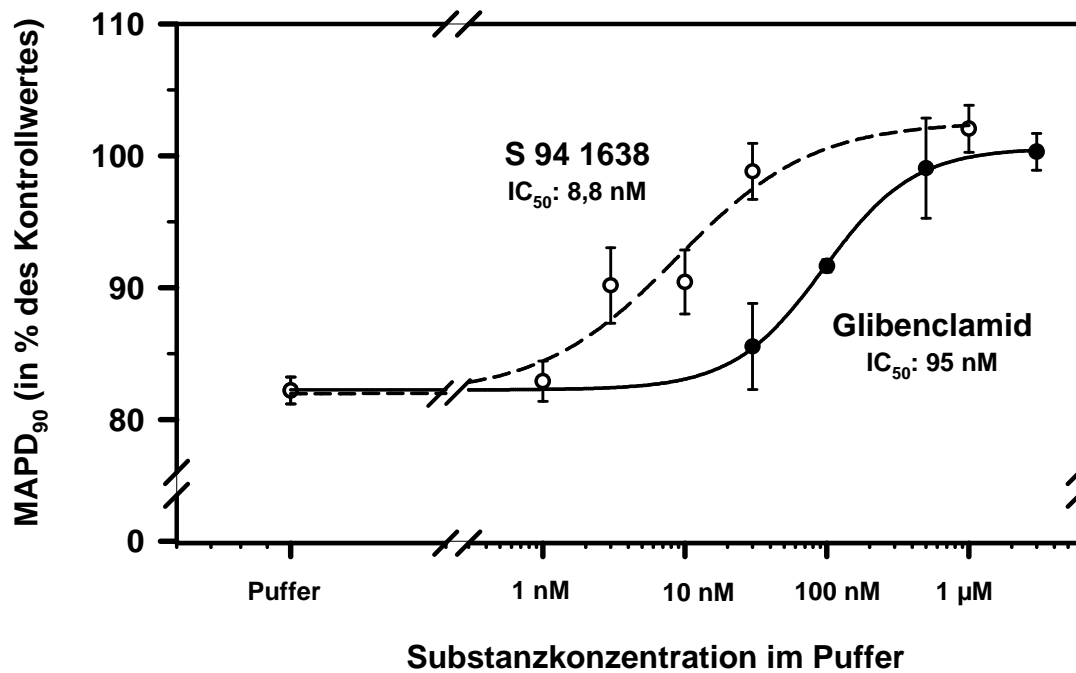
C MAPD₉₀ unter Ischämie

Abbildung III.13 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Glibenclamid und S 94 1638, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Im Vergleich mit Glibenclamid wies dessen Thioderivat S 94 1638 die erwünschten Verschiebungen in der kardialen Selektivität auf: nach rechts bei der Wirkung auf vaskuläre Kanäle und nach links bei der Beeinflussung der ischämischen Aktionspotentialdauer. Für die Anwendung als Antiarrhythmikum wäre eine noch spezifischere Wirkung auf den sarkolemmalen K_{ATP}-Kanal wünschenswert.

Ergebnisse

Tabelle III.7: Wirkung von S 94 1638, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie - keine signifikanten Unterschiede vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

S94 1638

A Normoxie

	Kontrolle	10 nM S94 1638	100 nM S94 1638	1 µM S94 1638
n	4	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	125 ? 5	114 ? 4	110 ? 6	88 * ? 6
LVP _{min} [mm Hg]	6,3 ? 1,4	3,3 ? 1,3	2,3 ? 2,3	2,7 ? 2,4
Herzfrequenz [bpm]	232 ? 14	244 ? 18	236 ? 23	245 ? 23
dP/dt+ [mm Hg/s]	1965 ? 82	1835 ? 72	1735 ? 58	1330 * ? 41
Koronarfluss [ml/min]	12,4 ? 0,4	10,9 ? 0,6	8,8 * ? 0,5	8,1 * ? 0,7
MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 4	118 ? 4	120 ? 6	118 ? 6

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +10 nM S94 1638	Hypoxie +100 nM S9416382	Hypoxie +1 µM S94 1638	Hypoxie +10 µM S94 1638
n	4	4	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	119 ? 4	85 ? 12	81 ? 17	88 ? 17	55 ? 9	74 ? 10
LVP _{min} [mm Hg]	5,8 ? 0,6	21,3 ? 6,6	21,3 ? 5,9	14,0 ? 1,0	21,0 ? 12,0	28,7 ? 13,0
Herzfrequenz [bpm]	218 ? 7	221 ? 7	222 ? 2	213 ? 7	215 ? 13	184 ? 19
dP/dt+ [mm Hg/s]	1834 ? 85	1084 ? 210	1025 ? 264	1165 ? 259	642 ? 93	764 ? 171
Koronarfluss [ml/min]	9,7 ? 0,5	15,8 ? 1,6	15,9 ? 1,1	13,7 ? 1,5	10,1 ? 1,6	10,3 ? 1,6

C Ischämie

	Puffer	1 nM S94 1638	3 nM S94 1638	10 nM S94 1638	30 nM S94 1638	1 µM S94 1638
n	29	3	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	10 ? 2	10 ? 1	9 ? 1	13 ? 1	14 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	-0,7 ? 1,5	0,0 ? 1,0	0,0 ? 1,0	3,0 ? 0,0	1,3 ? 0,3
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	265 ? 31	265 ? 14	249 ? 15	271 ? 32	318 * ? 16
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	90 ⁺ ? 1	96 ? 5	100 ? 1	109 ? 2	105 ? 2
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	109 ? 2	106 ? 2	110 ? 2	111 ? 1	103 ? 3

III.B.3 S 92 0707 und HMR 1098

Die eben gezeigte erwünschte Wirkungsverschiebung von einem Sulfonylharnstoff zu einem Sulfonylthioharnstoff wurde mit einem weiteren Substanzpaar bestätigt.

Die Strukturformeln der Substanzen S 92 0707 und HMR 1098, welches das Natriumsalz des Thioderivats von S 92 0707 ist, werden in Abbildung III.14 gezeigt. Der Benzamidteil der Moleküle hat sich im Vergleich mit Glibenclamid nicht verändert. Der Sulfonylharnstoff bzw. Sulfonylthioharnstoff befindet sich hier in meta-, nicht wie bei Glibenclamid in para-Position zum Benzamid. In para-Position befindet sich stattdessen eine Methoxygruppe. Der Cyclohexylrest am Sulfonylharnstoff wurde durch einen weniger lipophilen Methylrest ersetzt.

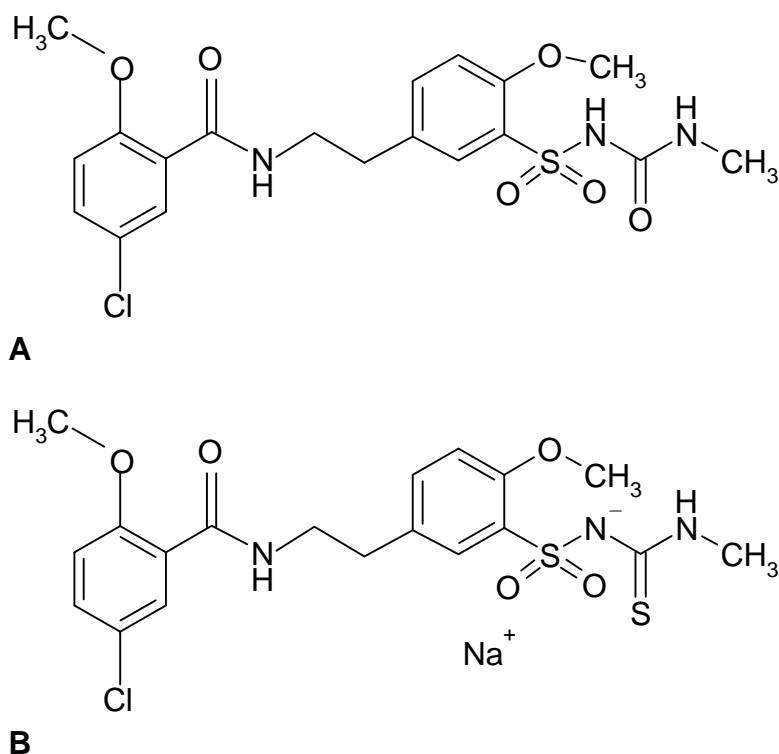


Abbildung III.14: Strukturformeln von S 92 0707 (A) und HMR 1098 (B)

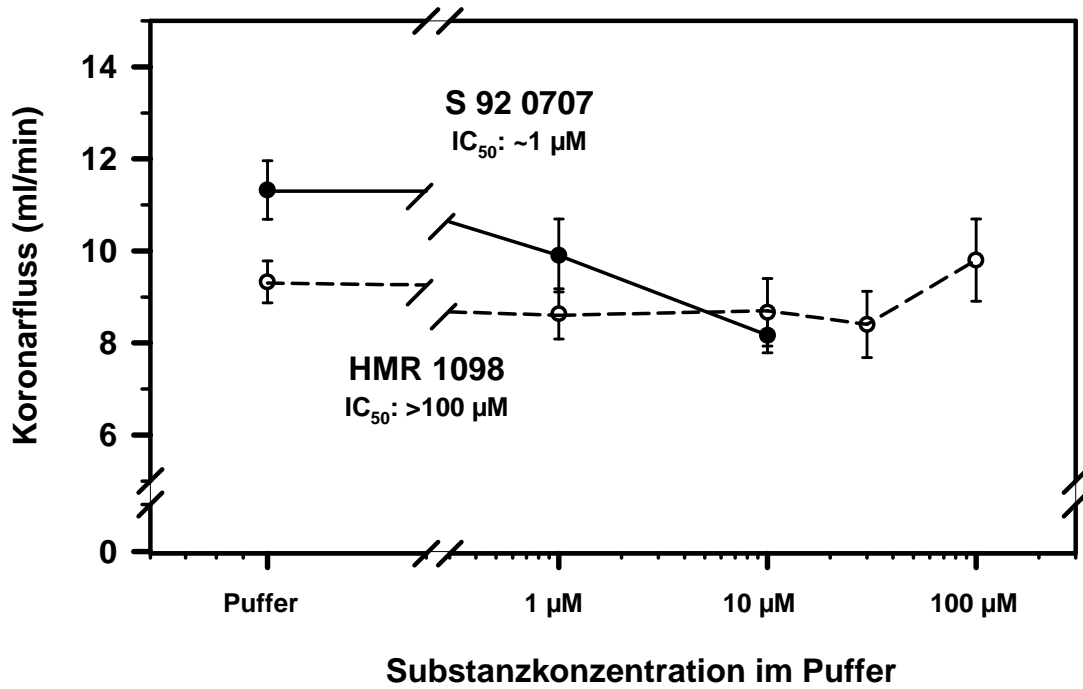
Abbildung III.15 stellt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beiden Substanzen in den drei Versuchsprotokollen gegenüber. Der Koronarfluss wurde durch HMR 1098 nicht bzw. kaum beeinflusst, die IC_{50} -Werte waren größer als $100 \mu\text{M}$. Bei S 92 0707 betragen sie $\sim 1 \mu\text{M}$ für die Senkung des normoxischen und $\sim 5 \mu\text{M}$ beim hypoxischen Koronarfluss. In Abbildung III.15 C wird eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve des Thioderivates um den Faktor 40 veranschaulicht. Die jeweiligen IC_{50} -Werte betragen $\sim 20 \mu\text{M}$ für S 94 1638 und 550 nM für HMR 1098.

Bei S 92 0707 wurde keine höhere Konzentration als 10 μM getestet. Erfahrungswerte aus anderen Versuchsreihen zeigten jedoch, dass durch K_{ATP} -Blocker unter Normoxie der Koronarfluss auf maximal 60-70% des Ausgangswertes gesenkt wurde. Mit 10 μM S 92 0707 trat eine Verringerung des Koronarflusses auf 72% auf, was die nahezu maximale Wirkung war und eine Abschätzung der IC_{50} erlaubte.

Die unterschiedlichen Steigerungen des hypoxischen Koronarflusses ohne Substanzgabe sind auf unterschiedliche Reaktivität der K_{ATP} -Kanäle zurückzuführen. Mit 30 μM HMR 1098 wurde bereits eine ebenso große Wirkung auf den Koronarfluss erreicht wie mit 100 μM . Diese Wirkung war jedoch nur eine weniger als halbmaximale Aufhebung der hypoxischen Steigerung des Koronarflusses, was auf die schwache Wirksamkeit von HMR 1098 auf K_{ATP} -Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur hindeutet. Bei den hypoxischen Versuchen ließ sich der IC_{50} -Wert zuverlässig bestimmen, da die maximale Inhibition der hypoxischen Vasodilatation einem Abfall des Koronarflusses auf den prähypoxischen Ausgangswert entspricht.

In analoger Weise bewirkte die maximale Inhibition sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle unter Ischämie eine MAPD_{90} wie beim präischämischen Kontrollwert. Auch wenn durch 30 μM S 92 0707 keine maximale Wirkung auf die Aktionspotentialdauer erreicht wurde, kann somit der IC_{50} -Wert gut auf ~ 20 μM geschätzt werden.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

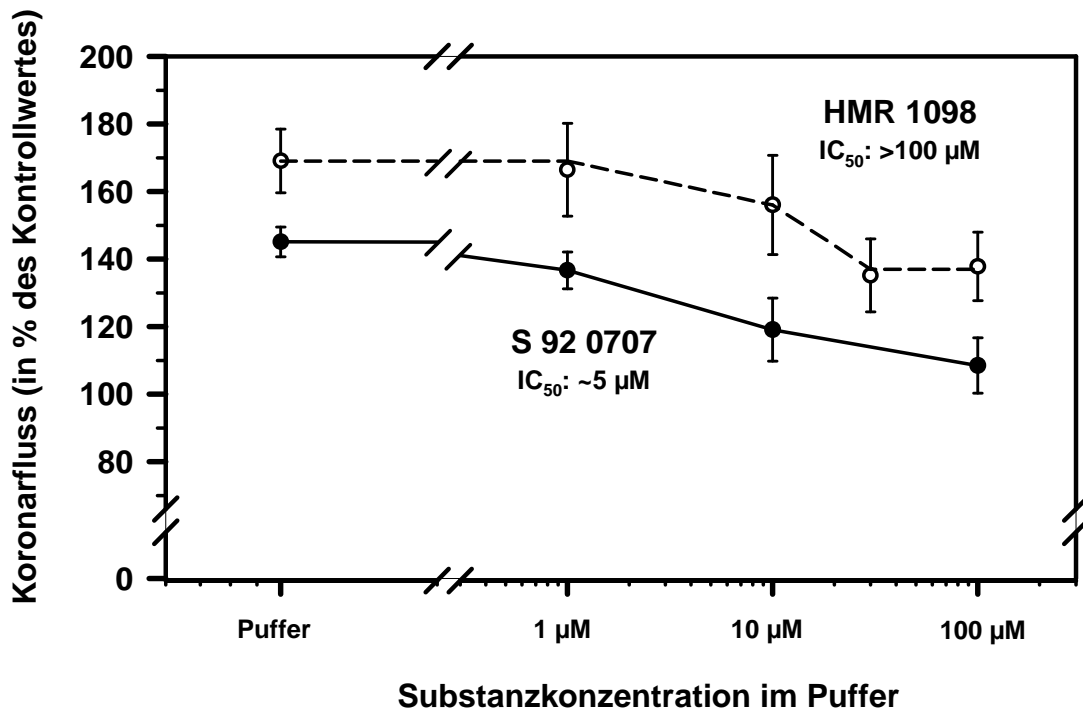
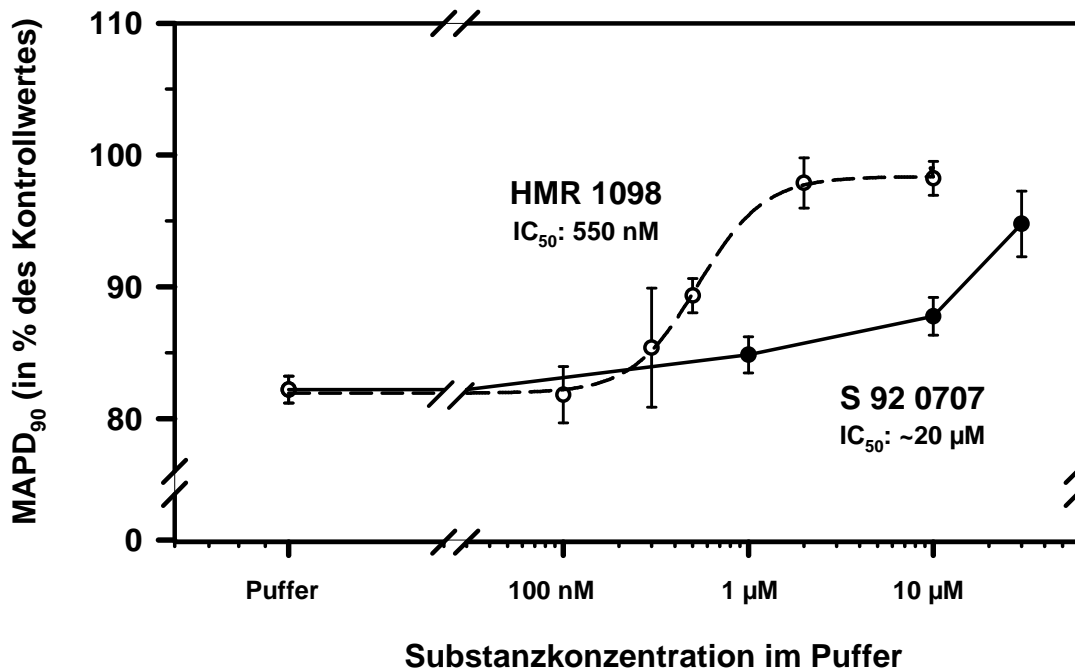


Abbildung III.15 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von S 92 0707 und HMR 1098, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

C MAPD₉₀ unter IschämieAbbildung III.15 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von S 92 0707 und HMR 1098, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

S 92 0707 zeigte erst bei der Konzentration 100 µM, die nur bei den Hypoxieversuchen verwendet wurde, signifikante Wirkungen auf LVP_{max} und die Kontraktilität. Der Koronarfluss wurde dagegen schon ab 10 µM signifikant verringert. Erst 30 µM S 92 0707 zeigten keine signifikante Aktionspotentialverkürzung durch Ischämie, niedrigere Konzentrationen waren nicht wirksam. Die Zahlenwerte sind in Tabelle III.8 wiedergegeben.

Die Daten zu HMR 1098 werden in Tabelle III.9 gezeigt. In Normoxie wurde bei allen Konzentrationen eine geringfügige, aber signifikante Verringerung des diastolischen Druckes LVP_{min} beobachtet. Während der Hypoxie bewirkte HMR 1098 keine signifikanten Veränderungen. In der Ischämie war bei 2 µM HMR 1098 die ischämische Aktionspotentialverkürzung nicht mehr signifikant.

Der Vergleich von S 92 0707 und HMR 1098 zeigte, dass die Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel zum Sulfonylthioharnstoff die Selektivität der K_{ATP}-Blocker zu der bevorzugten Hemmung der sarkolemmalen Kanäle verschob. Der Sulfonylharnstoff S 92 0707 wirkte effektiver auf den Koronarfluss als auf das Aktionspotential des isolierten Meerschweinchenherzens. Insgesamt war die Wirkung von S 92 0707 relativ schwach. Die ausgeprägteste Wirkung fand auf den Koronarfluss statt. Dagegen wies HMR 1098 die erwünschte Blockade

Ergebnisse

der sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle auf, ohne eine Vasokonstriktion hervorzurufen. Diese Substanz ist nach diesen Ergebnissen als Antiarrhythmikum sehr gut geeignet.

Tabelle III.8: Wirkung von S 92 0707, Kontrolle, A in Normoxie * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, B während Hypoxie * $p < 0,05$ vs. Hypoxie C nach 5 min Ischämie – keine signifikanten Unterschiede vs. Puffer, + $p < 0,05$ vs. präischämischer Kontrollwert

S92 0707

A Normoxie

	Kontrolle	1 μ M S92 0707	10 μ M S92 0707
n	4	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	115 ? 5	104 ? 4	103 ? 9
LVP _{min} [mm Hg]	6,0 ? 2,3	2,7 ? 3,2	-0,7 ? 2,8
Herzfrequenz [bpm]	213 ? 4	211 ? 5	211 ? 6
dP/dt+ [mm Hg/s]	1629 ? 101	1458 ? 61	1511 ? 146
Koronarfluss [ml/min]	11,3 ? 0,6	9,9 ? 0,8	8,2 * ? 0,4
MAPD ₉₀ [ms]	126 ? 2	127 ? 4	125 ? 4

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +1 μ M S92 0707	Hypoxie +10 μ M S92 0707	Hypoxie +100 μ M S92 0707
n	7	7	4	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	114 ? 5	60 ? 3	65 ? 5	65 ? 6	52 * ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	5,3 ? 0,4	14,9 ? 1,5	15,3 ? 2,4	15,3 ? 2,6	15,7 ? 1,9
Herzfrequenz [bpm]	234 ? 7	232 ? 7	187 ? 25	172 ? 25	222 ? 9
dP/dt+ [mm Hg/s]	1845 ? 105	901 ? 41	867 ? 50	847 ? 50	713 * ? 28
Koronarfluss [ml/min]	10,6 ? 0,3	15,4 ? 0,6	14,0 ? 0,7	12,5 * ? 1,3	12,1 * ? 1,2

C Ischämie

	Puffer	1 μ M S92 0707	10 μ M S92 0707	30 μ M S92 0707
n	29	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	10 ? 1	19 ? 1	10 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	1,7 ? 0,9	5,0 ? 2,1	0,3 ? 0,7
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	234 ? 11	305 ? 55	265 ? 19
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 + ? 2	93 + ? 3	98 + ? 1	105 ? 5
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	110 ? 3	111 ? 1	111 ? 3

Ergebnisse

Tabelle III.9: Wirkung von HMR 1098, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie – keine signifikanten Unterschiede vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

HMR 1098

A Normoxie

	Kontrolle	1 µM HMR 1098	10 µM HMR 1098	30 µM HMR 1098	100 µM HMR 1098
n	4	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	125 ? 8	114 ? 9	112 ? 11	102 ? 9	106 ? 7
LVP _{min} [mm Hg]	4,0 ? 0,4	0,7 * ? 0,3	-0,7 * ? 0,9	-2,0 * ? 0,6	-0,3 * ? 0,9
Herzfrequenz [bpm]	247 ? 3	251 ? 3	241 ? 3	242 ? 6	236 ? 5
dP/dt+ [mm Hg/s]	2250 ? 115	2082 ? 129	1942 ? 242	1878 ? 192	1925 ? 71
Koronarfluss [ml/min]	9,3 ? 0,5	8,6 ? 0,6	8,7 ? 0,7	8,4 ? 0,7	9,8 ? 0,9
MAPD ₉₀ [ms]	104 ? 2	104 ? 3	107 ? 3	104 ? 3	101 ? 2

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +1 µM HMR 1098	Hypoxie +10 µM HMR 1098	Hypoxie + 30 µM HMR 1098	Hypoxie +100 µM HMR 1098
n	4	4	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	108 ? 5	67 ? 5	65 ? 2	62 ? 5	55 ? 3	56 ? 6
LVP _{min} [mm Hg]	4,8 ? 0,5	31,5 ? 5,1	29,0 ? 5,0	25,3 ? 4,1	31,3 ? 3,3	29,0 ? 3,1
Herzfrequenz [bpm]	261 ? 16	256 ? 14	241 ? 4	246 ? 31	262 ? 19	253 ? 28
dP/dt+ [mm Hg/s]	1925 ? 135	796 ? 115	796 ? 112	773 ? 60	610 ? 25	579 ? 72
Koronarfluss [ml/min]	7,9 ? 1,0	13,4 ? 1,8	13,8 ? 2,2	13,3 ? 1,8	10,4 ? 1,4	9,7 ? 1,2

C Ischämie

	Puffer	100 nM HMR 1098	300 nM HMR 1098	500 nM HMR 1098	2 µM HMR 1098	10 µM HMR 1098
n	29	3	3	5	3	6
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	12 ? 1	9 ? 3	12 ? 1	16 ? 3	12 ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	4,0 ? 1,0	0,0 ? 1,7	3,8 ? 1,1	6,7 ? 2,6	6,5 ? 2,5
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	212 ? 23	224 ? 19	257 ? 29	265 ? 17	238 ? 21
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	96 ⁺ ? 2	106 ⁺ ? 5	101 ⁺ ? 4	121 [*] ? 3	112 [*] ? 4
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	117 ? 2	124 ? 3	113 ? 5	124 ? 4	113 ? 3

III.B.4 S 92 0707 und S 95 1957

Die Substanz S 95 1957 enthält ein Chromangrundgerüst, das die freie Beweglichkeit des Benzamids einschränkt und ein Chiralitätszentrum einführt (Abbildung III.16). Die Substitution entspricht aber ansonsten der bereits vorgestellten Substanz S 92 0707. Auch der Abstand von zwei Kohlenstoffatomen zwischen dem Stickstoff des Benzamids und dem zweiten Aromaten bleibt erhalten.

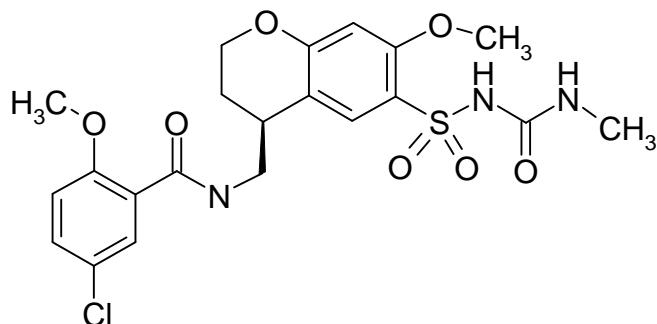
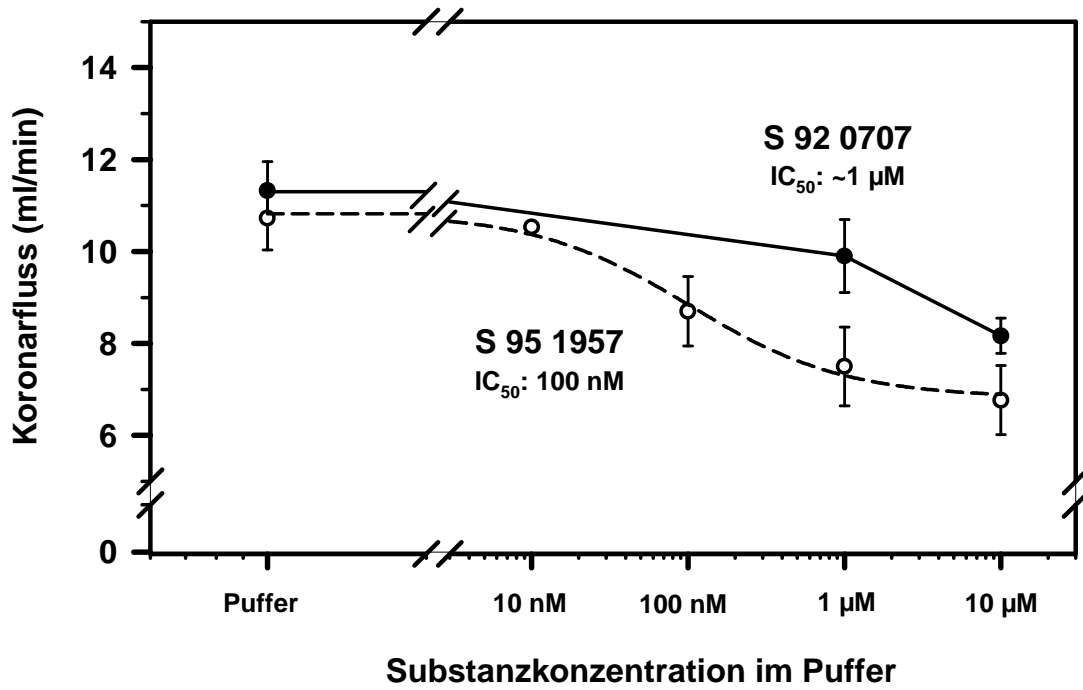


Abbildung III.16: Strukturformel von S 95 1957

Aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abbildung III.17 ist ersichtlich, dass diese Fixierung der aromatischen Ringe zueinander in S 95 1957 die Kurven nach rechts verschiebt. Die Kurven in Normoxie und Hypoxie für die Vasokonstriktion waren um den Faktor 13 bzw. 4 gegenüber S 92 0707 verschoben, die IC_{50} -Werte von S 95 1957 betragen 100 nM und $\sim 1 \mu\text{M}$ (Normoxie / Hypoxie). Diese Wirkungsverstärkung war jedoch bei der ischämischen $MAPD_{90}$ besonders ausgeprägt. Der IC_{50} -Wert betrug 62 nM und war damit um den Faktor 350 kleiner als der entsprechende Wert von S 92 0707.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

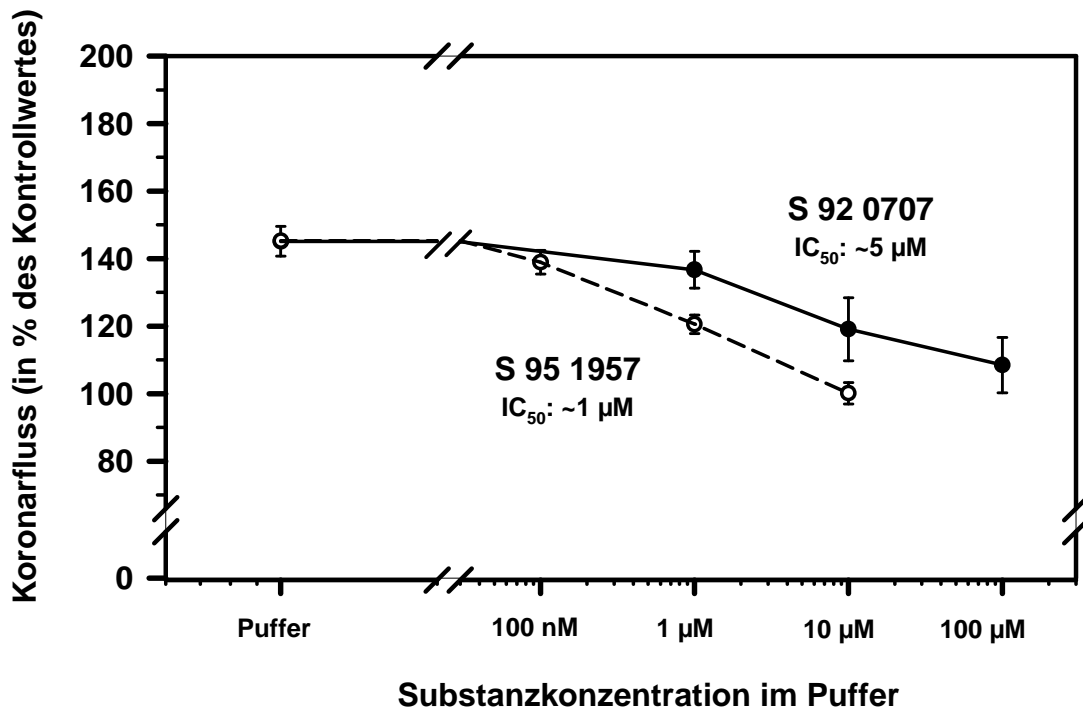
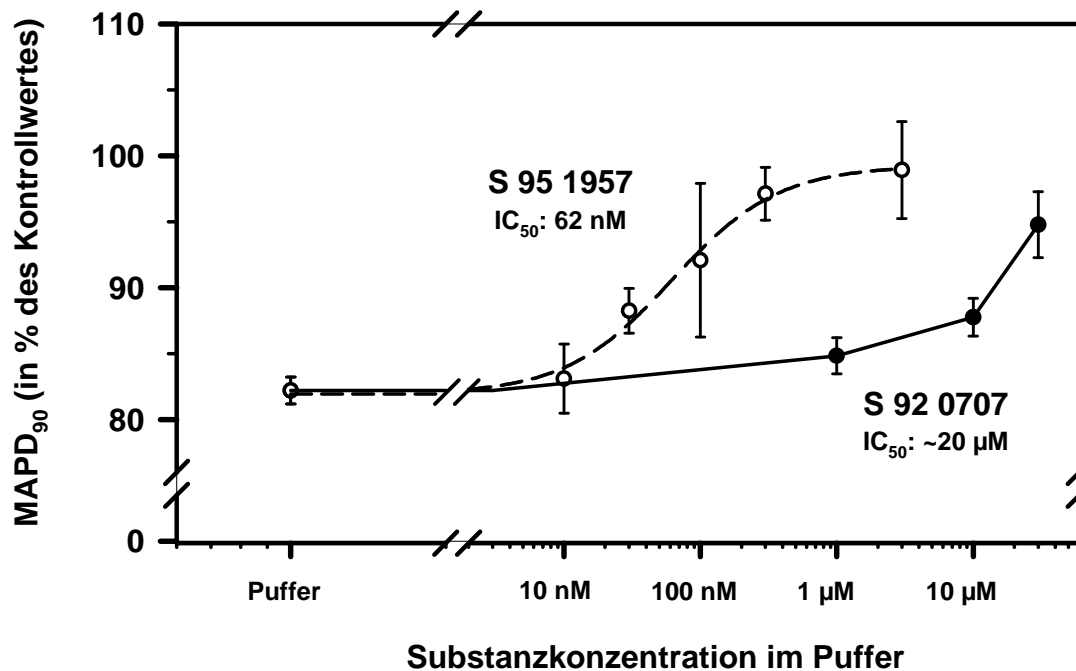


Abbildung III.17 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von S 92 0707 und S 95 1957, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

C MAPD₉₀ unter IschämieAbbildung III.17 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von S 92 0707 und S 95 1957, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Die weiteren Wirkungen von S 92 0707 wurden bereits in Tabelle III.8 gezeigt, für S 95 1957 sind sie in Tabelle III.10 zu sehen. In der Normoxie konnten eine signifikante Verringerung der Kontraktilität ($dP/dt+$) sowie der systolischen (LVP_{max}) und der diastolischen (LVP_{min}) Druckentwicklung ab 1 μ M beobachtet werden. Die normoxische und hypoxische Koronarfluss-Verringerung waren bei mikromolaren Konzentrationen signifikant. In den Ischämieversuchen war bei 3 μ M die ischämische MAPD₉₀ signifikant verschieden im Vergleich zu dem Puffer-Wert, verglichen mit dem präischämischen Kontrollwert war die Aktionspotentialdauer jedoch nur bei niedrigen Konzentrationen bis 30 nM signifikant verkürzt.

Das Chromanderivat S 95 1957 wirkte etwa gleich stark auf sarkolemmale und vaskuläre K_{ATP} -Kanäle, mit einer geringfügigen Präferenz für die sarkolemmalen. Die Rigidisierung des Moleküls durch den Chromanring rief eine Wirkungsverstärkung hervor. Einer ausgeprägten Verbesserung der Wirksamkeit bei der ischämischen MAPD₉₀-Verkürzung um den Faktor 350 stand eine geringere Effektivität (Faktor 13 bei Normoxie, Faktor 4 bei Hypoxie) bei der Beeinflussung des Koronarflusses entgegen. Die strukturell nah verwandte Substanz S 92 0707 wirkte jedoch eher auf vaskuläre Kanäle, so dass die Verschiebung des Wirkprofils insgesamt positiv ist, auch wenn S 95 1957 trotz der erfolgten Verbesserung keine optimale Selektivität zeigte.

Ergebnisse

Tabelle III.10: Wirkung von S95 1957, A in Normoxie * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, B während Hypoxie * $p < 0,05$ vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * $p < 0,05$ vs. Puffer, + $p < 0,05$ vs. präischämischer Kontrollwert

S95 1957

A Normoxie

	Kontrolle	10 nM S95 1957	100 nM S95 1957	1 μ M S95 1957	10 μ M S95 1957
n	4	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	134 ? 5	125 ? 2	126 ? 5	113 * ? 3	102 * ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	8,8 ? 0,5	7,7 ? 0,7	7,0 ? 0,6	6,0 * ? 0,0	4,3 * ? 0,3
Herzfrequenz [bpm]	228 ? 15	234 ? 17	220 ? 22	210 ? 16	229 ? 22
dP/dt+ [mm Hg/s]	2199 ? 104	2087 ? 92	2075 ? 95	1707 * ? 8	1548 * ? 76
Koronarfluss [ml/min]	10,7 ? 0,7	10,5 ? 0,1	8,7 ? 0,8	7,5 * ? 0,9	6,8 * ? 0,8
MAPD ₉₀ [ms]	119 ? 2	117 ? 2	119 ? 4	121 ? 4	119 ? 4

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +100 nM S95 1957	Hypoxie +1 μ M S95 1957	Hypoxie +10 μ M S95 1957
n	4	4	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	130 ? 9	77 ? 4	69 ? 4	69 ? 4,	63 ? 6
LVP _{min} [mm Hg]	6,0 ? 0,0	30,8 ? 7,1	25,3 ? 8,4	36,7 ? 10,3	31,3 ? 14,8
Herzfrequenz [bpm]	215 ? 7	216 ? 9	211 ? 11	219 ? 14	202 ? 14
dP/dt+ [mm Hg/s]	1942 ? 122	848 ? 100	795 ? 87	670 ? 35	567 ? 169
Koronarfluss [ml/min]	10,3 ? 0,7	15,0 ? 1,0	15,0 ? 0,5	12,1 ? 0,8	10,5 * ? 1,0

C Ischämie

	Puffer	10 nM S95 1957	30 nM S95 1957	100 nM S95 1957	300 nM S95 1957	3 μ M S95 1957
n	29	3	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	12 ? 1	15 ? 3	11 ? 2	13 ? 2	15 ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	2,7 ? 0,9	0,7 ? 1,2	0,3 ? 0,9	2,0 ? 1,0	4,0 ? 1,0
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	249 ? 13	296 ? 20	262 ? 14	284 ? 17	271 ? 19
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	97 ⁺ ? 4	97 ⁺ ? 3	106 ? 8	112 ? 2	123 * ? 2
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	117 ? 1	110 ? 3	115 ? 2	116 ? 0	125 ? 5

III.B.5 HMR 1098 und HMR 1372

HMR 1098 wurde bereits in Abbildung III.14B gezeigt, HMR 1372 ist in Abbildung III.18 dargestellt. Der einzige Unterschied befindet sich im Benzamidteil der Moleküle, wo der Chlor-substituent im HMR 1098 durch eine tertiäre Butylgruppe in HMR 1372 ersetzt wurde. Das Molekül wird dadurch amphiphil.

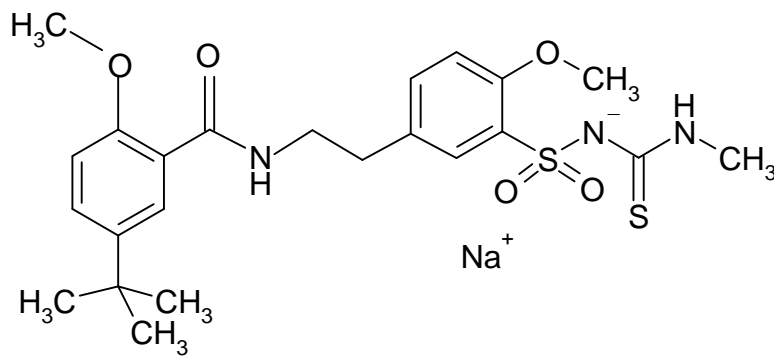
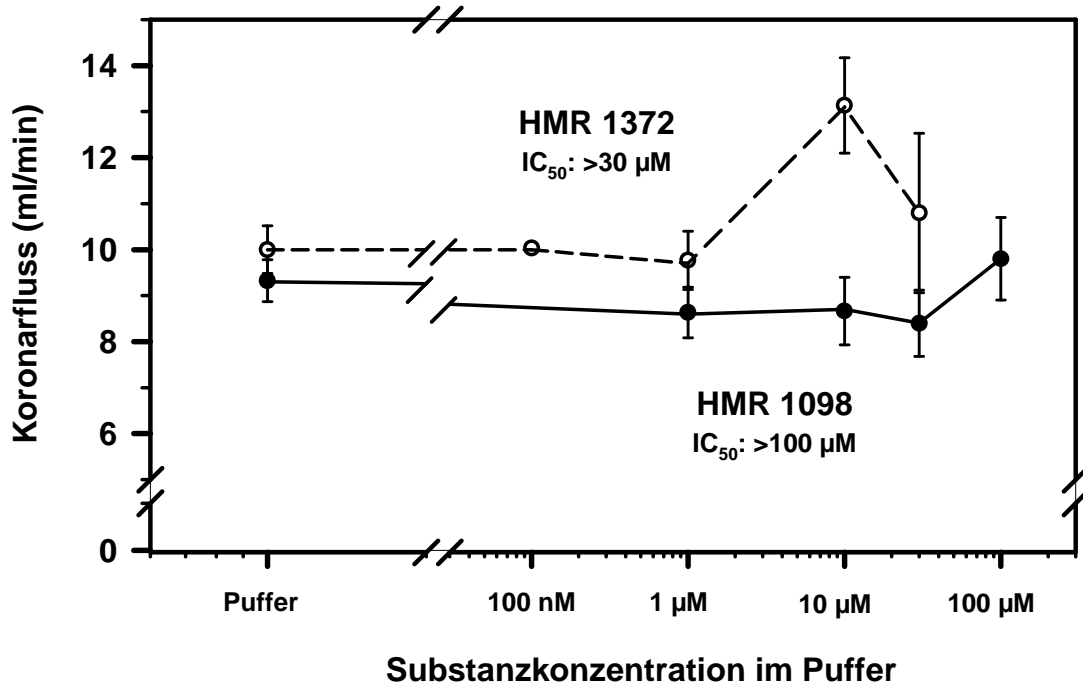


Abbildung III.18: Strukturformel von HMR 1372

Die Wirkungen von HMR 1098 und HMR 1372 sind in Abbildung III.19 einander gegenübergestellt. Beide zeigten keine bzw. nur eine geringe Wirkung auf den normoxischen und hypoxischen Koronarfluss. HMR 1372 wurde allerdings nur bis zu einer Konzentration von 30 μM getestet. Da die Hypoxie-bedingte Zunahme des Koronarflusses mit 30 μM HMR 1372 nur um 35 % vermindert wurde, muss die Substanzkonzentration bei halbmaximaler Wirkung größer sein. Die Wirkungen auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung waren ebenfalls vergleichbar, der IC_{50} -Wert von HMR 1372 war 970 nM.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

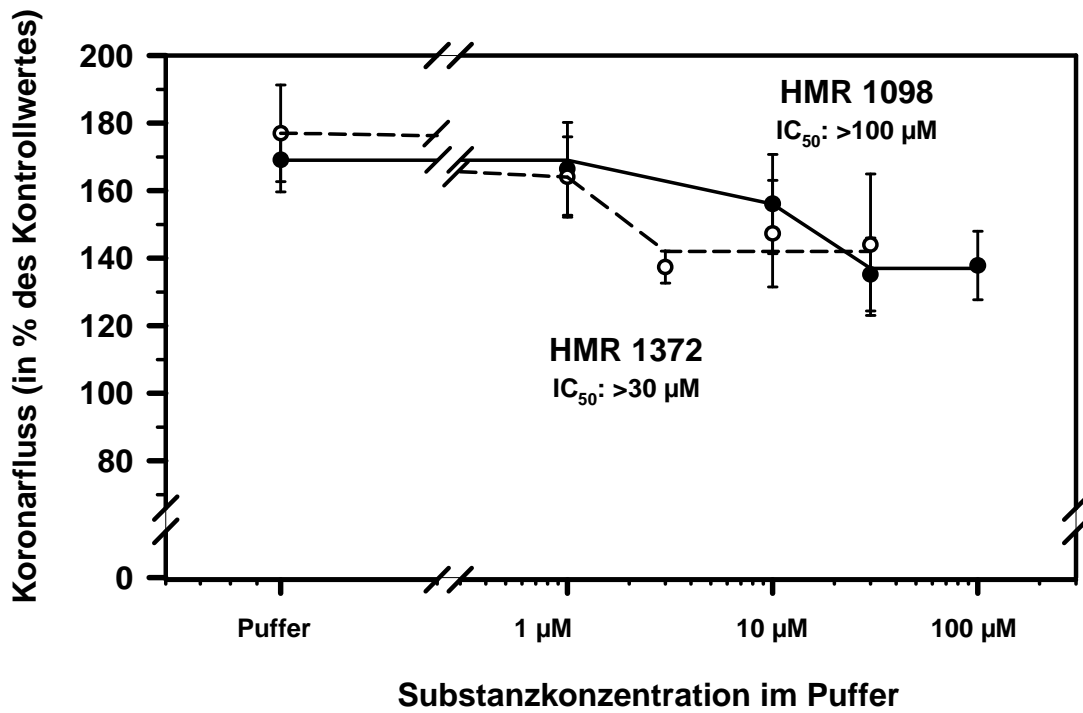


Abbildung III.19 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1098 und HMR 1372, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

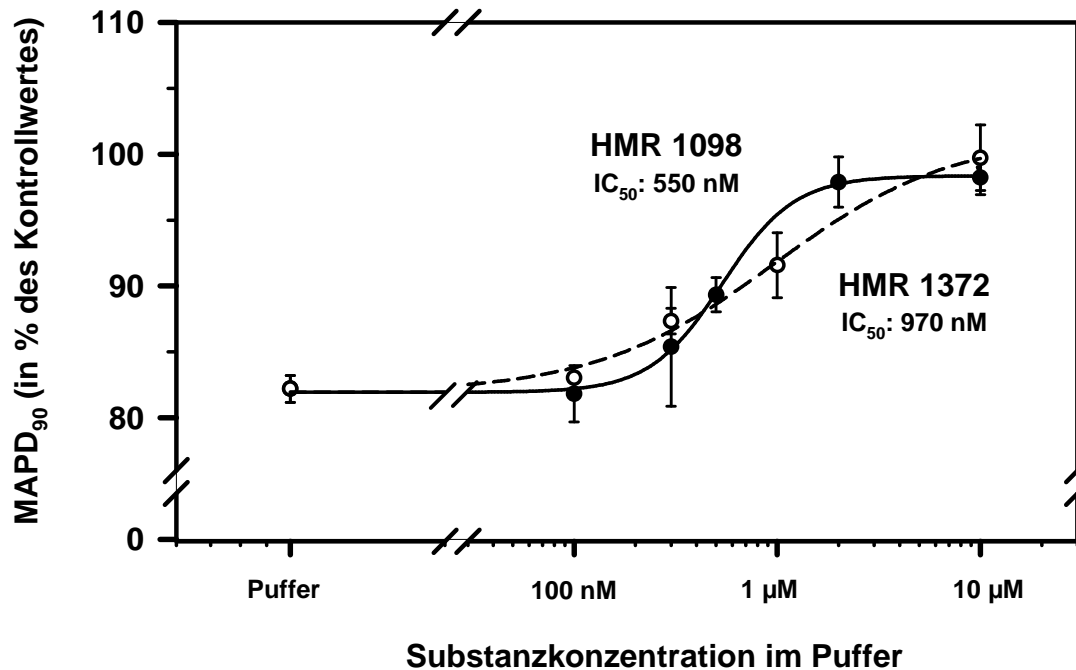
C MAPD₉₀ unter Ischämie

Abbildung III.19 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1098 und HMR 1372, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Die Werte für HMR 1098 wurden bereits in Tabelle III.9 zusammengefasst. HMR 1372 zeigte ab 30 µM eine signifikante Verringerung der Kontraktilität, ansonsten wurden die weiteren Parameter nicht verändert (Tabelle III.11). Auffällig war die fehlende Signifikanz hinsichtlich der Beeinflussung der MAPD₉₀-Werte in der Ischämie. Bezogen auf die unterschiedlichen präischämischen Kontrollwerte war die ischämische MAPD₉₀-Verkürzung jedoch bei niedrigen Konzentrationen bis 300 nM signifikant.

HMR 1372, ein naher lipophilerer Strukturverwandter von HMR 1098, wirkte wie dieses in den hier vorgestellten Versuchen auf den sarkolemmlen K_{ATP}-Kanal selektiv, war aber etwas schwächer wirksam.

Ergebnisse

Tabelle III.11: Wirkung von HMR 1372, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie * p<0,05 vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie - keine signifikanten Unterschiede vs. Puffer, + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

HMR 1372

A Normoxie

	Kontrolle	100 nM HMR 1372	1 µM HMR 1372	10 µM HMR 1372	30 µM HMR 1372
n	3	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	109 ? 8	98 ? 1	99 ? 0	101 ? 2	93 ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	8,3 ? 0,3	8,0 ? 1,2	8,7 ? 1,8	7,7 ? 2,2	12,3 ? 3,5
Herzfrequenz [bpm]	241 ? 9	230 ? 8	221 ? 8	219 ? 10	221 ? 16
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	1699 ? 67	1508 ? 68	1503 ? 50	1485 ? 66	1279 * ? 21
Koronarfluss [ml/min]	10,0 ? 0,5	10,0 ? 0,1	9,8 ? 0,6	13,1 ? 1,0	10,8 ? 1,7
MAPD ₉₀ [ms]	113 ? 6	116 ? 7	116 ? 7	122 ? 5	121 ? 8

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +1 µM HMR 1372	Hypoxie +3 µM HMR 1372	Hypoxie +10 µM HMR 1372	Hypoxie +30 µM HMR 1372
n	10	10	7	4	7	5
LVP _{max} [mm Hg]	72 ? 2	40 ? 2	41 ? 2	35 ? 3	35 ? 2	33 ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	-2,0 ? 1,6	12,4 ? 2,6	15,1 ? 2,9	11,7 ? 1,5	14,8 ? 2,2	15,4 ? 3,5
Herzfrequenz [bpm]	231 ? 9	219 ? 7,3	207 ? 13	223 ? 14	209 ? 8	209 ? 10
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	1076 ? 63	476 ? 42	426 ? 31	377 ? 34	357 ? 37	333 * ? 31
Koronarfluss [ml/min]	8,7 ? 0,8	15,3 ? 1,6	13,5 ? 1,3	11,9 ? 1,4	13,3 ? 1,7	13,0 ? 2,8

C Ischämie

	Puffer	100 nM HMR 1372	300 nM HMR 1372	1 µM HMR 1372	10 µM HMR 1372
n	29	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	11 ? 2	10 ? 1	10 ? 0	13 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	3,3 ? 0,9	1,7 ? 1,2	2,7 ? 0,3	4,3 ? 0,3
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	231 ? 10	209 ? 22	218 ? 30	206 ? 11	224 ? 5
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	96 ⁺ ? 1	97 ⁺ ? 2	106 ? 4	109 ? 3
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	116 ? 1	111 ? 1	115 ? 1	109 ? 2

III.B.6 HMR 1098 und HMR 1402

Bei HMR 1402 (Abbildung III.20) ist im Vergleich zu HMR 1098 (Abbildung III.14 B) der Methoxyrest in ortho-Position zum Sulfonylthioharnstoff durch eine Methoxyethoxygruppe substituiert.

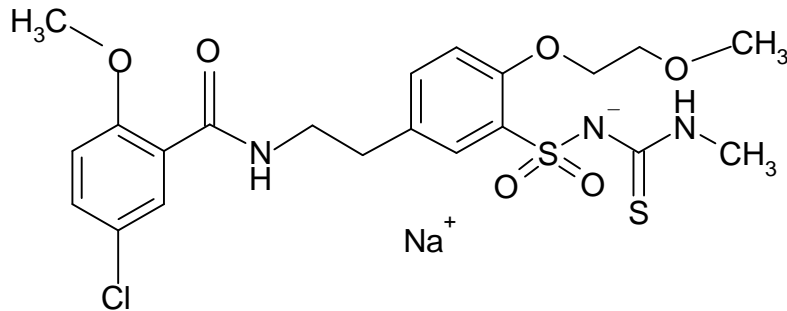
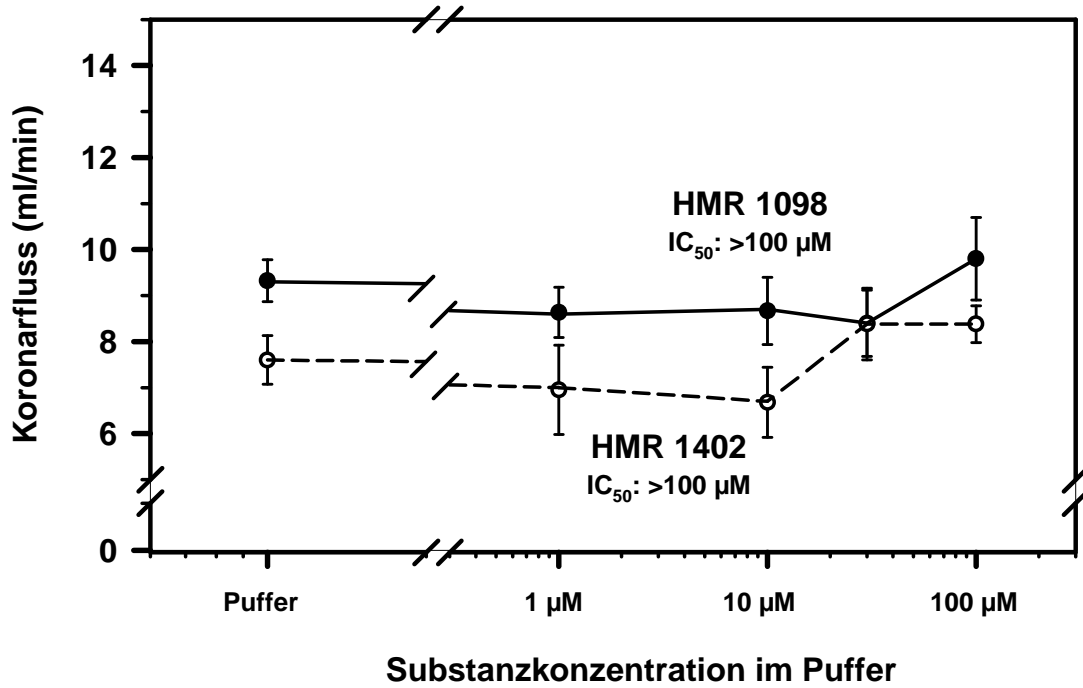


Abbildung III.20: Strukturformel von HMR 1402

Abbildung III.21 zeigt, dass HMR 1402 bei Konzentrationen bis 10 μM keine Wirkung auf den normoxischen Koronarfluss hatte. Bei höheren Konzentrationen wurde eine Zunahme des Koronarflusses beobachtet, was auf einen zusätzlichen Wirkmechanismus schließen lässt, der nicht weiter untersucht wurde. Die Zunahme des Koronarflusses unter Hypoxie wurde durch 30 μM der Substanz vollständig aufgehoben. Auf Grund der zusätzlichen Nebenwirkung wurden keine höheren Konzentrationen getestet. Es wurde daher keine Kurvenanpassung mit der sigmoiden Funktion durchgeführt, sondern der Wert der halbmaximalen Wirkung aus dem Kurvenverlauf in Abbildung III.21 zu 9 μM geschätzt. Die Strukturabwandlung führte zu einer Verstärkung der Wirkung auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung um den Faktor 5, der IC_{50} -Wert betrug 110 nM. Somit ist die Selektivität von HMR 1402 für den sarkolemmlen K_{ATP} -Kanal um den Faktor 90 größer als für den vaskulären.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

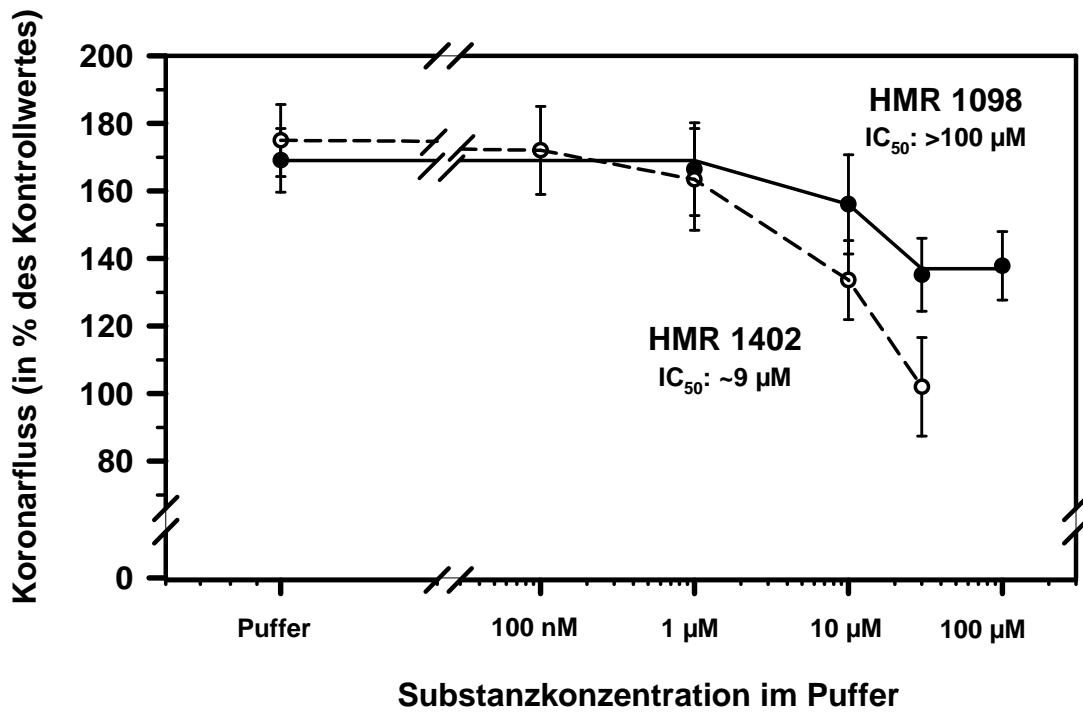


Abbildung III.21 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1098 und HMR 1402, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

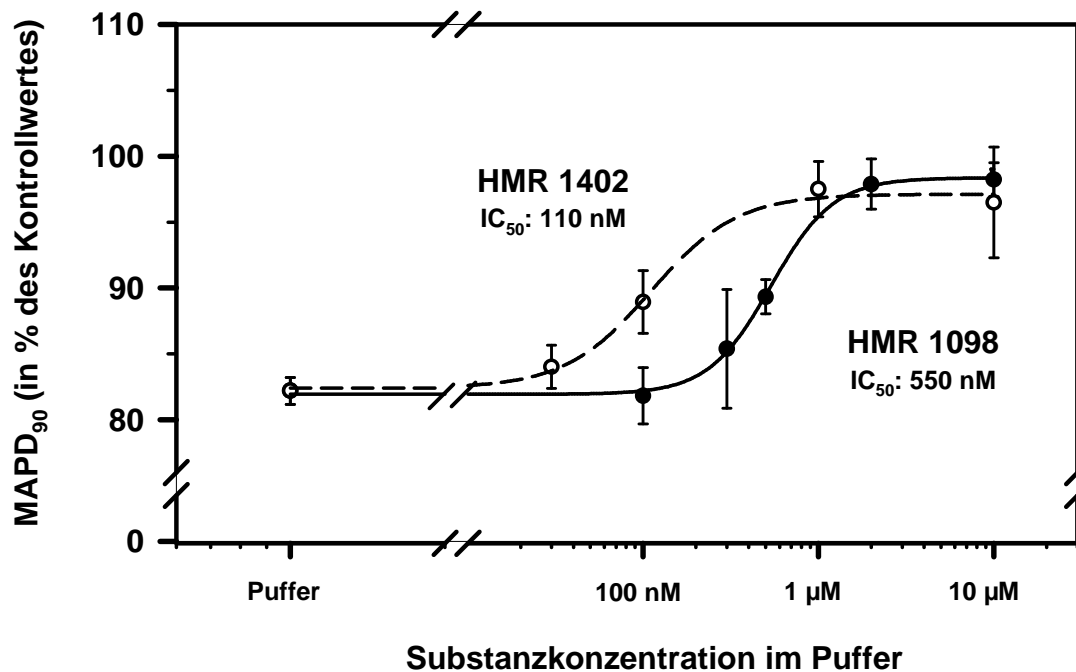
C MAPD₉₀ unter Ischämie

Abbildung III.21 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1098 und HMR 1402, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Die weiteren Wirkungen von HMR 1402 auf die Herzfunktion sind in Tabelle III.12 zusammengefasst, die Wirkungen von HMR 1098 wurden bereits in Tabelle III.9 behandelt. Die Kontraktilität in den Normoxieversuchen wurde bei 100 µM signifikant verringert. Bei 100 µM HMR 1402 wurde außerdem LVP_{min} geringfügig erhöht. Die Aktionspotentialdauer der Normoxieversuche war bereits bei der Kontrolle auffällig lang und wurde durch HMR 1402 nicht beeinflusst. Die Hypoxieversuche zeigten eine signifikante Verringerung von systolischer Druckentwicklung (LVP_{max}) und Koronarfluss ab 10 µM. Bei den Ischämieversuchen war die Kontraktilität bei 10 µM signifikant höher und die MAPD₉₀ ab 1 µM verglichen mit Puffer signifikant verlängert. Die signifikante ischämische MAPD₉₀-Verkürzung wurde durch HMR 1402-Konzentrationen ab 100 nM aufgehoben.

Durch die Einfügung der Methoxyethoxygruppe bei HMR 1402 statt des Methoxyrestes in HMR 1098 wurde die Wirksamkeit auf den sarkolemmalen K_{ATP}-Kanal etwas besser, der Koronarfluss jedoch nicht oder erst bei deutlich höheren Konzentrationen beeinflusst. Daher kann HMR 1402 als besonders vorteilhafter Kandidat für die Entwicklung eines Arzneimittels gelten.

Ergebnisse

Tabelle III.12: Wirkung von HMR 1402, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie * p<0,05 vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, † p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

HMR 1402

A Normoxie

	Kontrolle	1 µM HMR 1402	10 µM HMR 1402	30 µM HMR 1402	100 µM HMR 1402
n	7	4	5	4	6
LVP _{max} [mm Hg]	89 ? 6	95 ? 5	73 ? 7	73 ? 8	75 ? 4
LVP _{min} [mm Hg]	-0,3 ? 0,5	-1,0 ? 0,4	-0,5 ? 0,3	1,3 ? 0,3	4,0 * ? 1,6
Herzfrequenz [bpm]	218 ? 4	206 ? 7	206 ? 7	205 ? 11	214 ? 10
dP/dt+ [mm Hg/s]	1307 ? 92	1274 ? 107	1034 ? 55	1027 ? 73	1028 * ? 32
Koronarfluss [ml/min]	7,6 ? 0,5	7,0 ? 1,0	6,7 ? 0,8	8,4 ? 0,8	8,4 ? 0,4
MAPD ₉₀ [ms]	154 ? 7	167 ? 9	160 ? 8	155 ? 11	149 ? 5

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +100 nM HMR 1402	Hypoxie +1 µM HMR 1402	Hypoxie +10 µM HMR 1402	Hypoxie +30 µM HMR 1402
n	6	6	3	3	5	3
LVP _{max} [mm Hg]	83 ? 8	41 ? 1	41 ? 1	40 ? 2	35* ? 1	30 * ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	-4,3 ? 0,6	0,5 ? 2,7	1,0 ? 5,0	2,7 ? 3,2	-0,6 ? 1,9	0,3 ? 1,8
Herzfrequenz [bpm]	222 ? 9	213 ? 10	214, ? 12	206 ? 8	199 ? 14	186 ? 23
dP/dt+ [mm Hg/s]	1261 ? 148	708 ? 65	698 ? 132	648 ? 110	592 ? 44	482 ? 38
Koronarfluss [ml/min]	10,4 ? 0,4	18,0 ? 0,7	16,4 ? 0,6	15,9 ? 0,8	14,0 * ? 1,0	11,1* ? 1,1

C Ischämie

	Puffer	30 nM HMR 1402	100 nM HMR 1402	1 µM HMR 1402	10 µM HMR 1402
n	29	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	9 ? 0	11 ? 0	13 ? 2	15 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	-2,0 ? 1,2	1,0 ? 1,5	2,7 ? 0,9	2,3 ? 0,9
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	262 ? 19	262 ? 41	280 ? 34	299 * ? 27
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 † ? 2	99 † ? 6	95 ? 2	122 * ? 2	116 * ? 5
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	118 ? 5	107 ? 4	126 ? 5	120 ? 4

III.B.7 HMR 1402 und S 0000 405

Bei der Substanz S 0000 405 befindet sich ein Zimtsäureamid an der Stelle, an der sich bei HMR 1402 der 5-Chlor-2-methoxybenzamid-Rest befindet. Die Strukturformel von S 0000 405 wird in Abbildung III.22 gezeigt, die von HMR 1402 in Abbildung III.20.

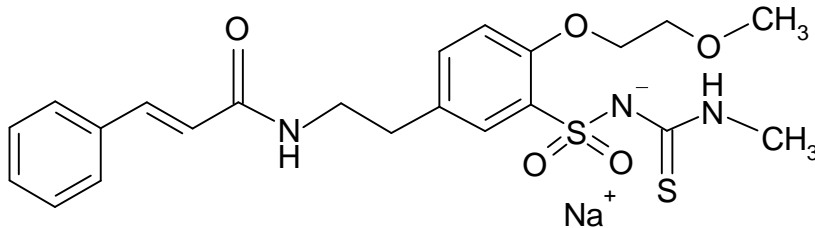
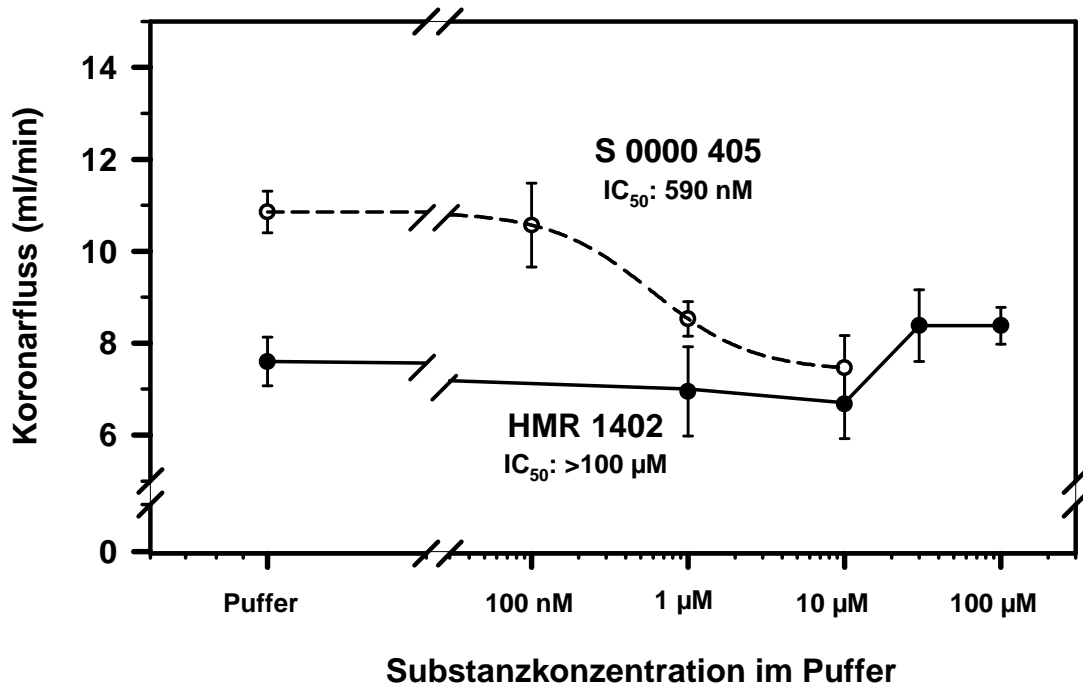


Abbildung III.22: Strukturformel von S 0000 405

Der Koronarfluss wurde von S 0000 405 unter normoxischen Versuchsbedingungen mit einer IC_{50} von 590 nM gesenkt, der entsprechende Wert für den hypoxischen Fluss betrug $\sim 3 \mu\text{M}$, er war somit nur geringfügig kleiner als der Wert von HMR 1402. Die Blockade der ischämischen $MAPD_{90}$ -Verkürzung war durch S 0000 405 leicht nach links verschoben (Abbildung III.23), der IC_{50} -Wert betrug 710 nM.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

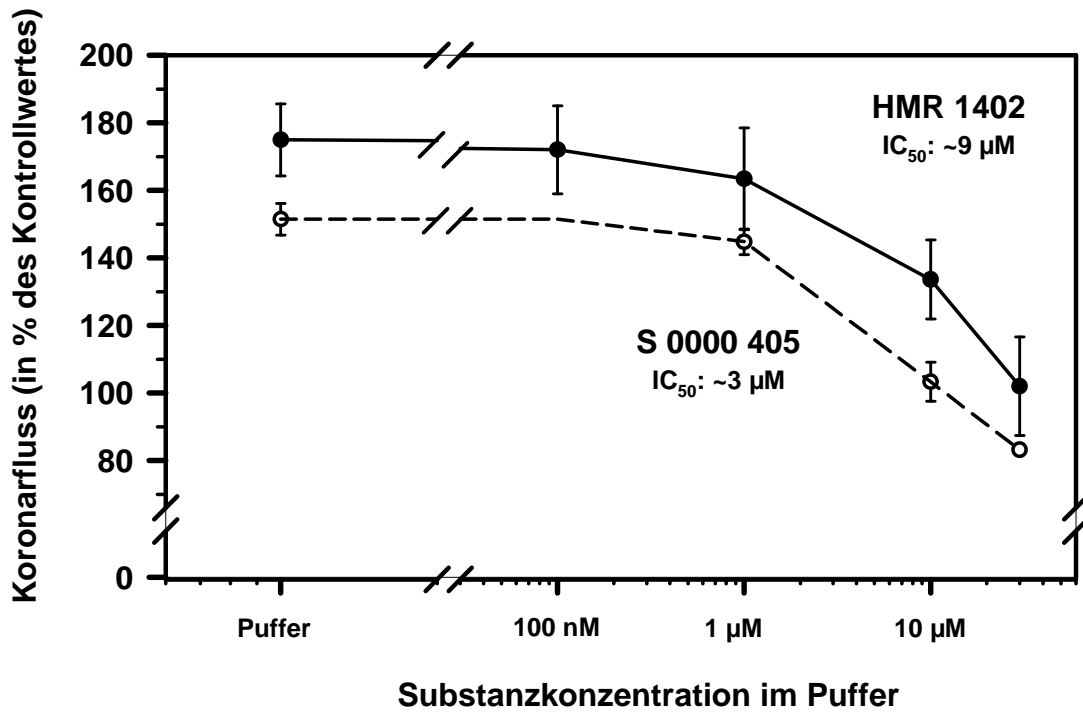


Abbildung III.23 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1402 und S 0000 405, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

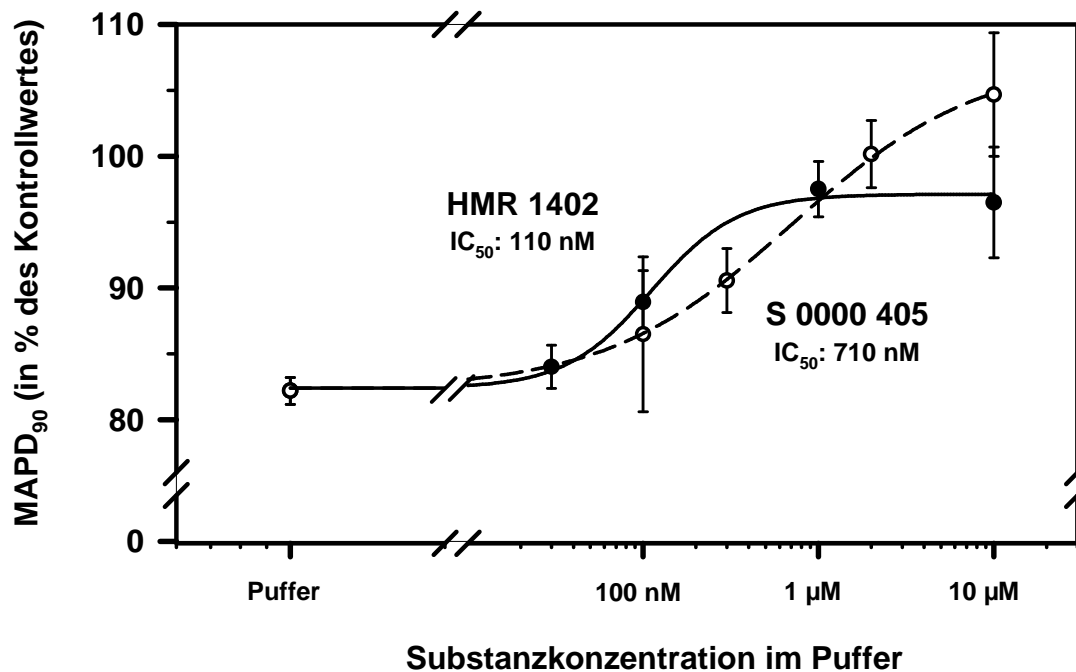
C MAPD₉₀ unter Ischämie

Abbildung III.23 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von HMR 1402 und S 0000 405, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Tabelle III.13 listet die gesamten Messparameter für S 0000 405 auf, von HMR 1402 wurden diese bereits in Tabelle III.12 gezeigt. Der normoxische Koronarfluss wurde ab 1 µM, der hypoxische ab 10 µM signifikant gesenkt. Bei denselben Konzentrationen fand auch ein Abfall der Kontraktilität und von LVP_{max} statt. Die MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie war bereits bei 300 nM S 0000 405 signifikant länger als mit Puffer. Bei allen getesteten S 0000 405-Konzentrationen war die MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie nicht signifikant kürzer als die präischämischen Kontrollwerte.

Die Substitution der bisherigen Benzamidstruktur durch ein Zimtsäureamid führte zu einer geringeren Selektivität der Substanz S 0000 405 bezüglich des sarkolemmalen und des vaskulären K_{ATP}-Kanals. S 0000 405 war mit einem IC₅₀-Wert von 710 nM schwächer wirksam hinsichtlich der MAPD₉₀ als HMR 1402 (IC₅₀: 110 nM).

Ergebnisse

Tabelle III.13: Wirkung von S 0000 405, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie * p<0,05 vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, † p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

S 0000 405

A Normoxie

	Kontrolle	100 nM S 0000 405	1 µM S 0000 405	10 µM S 0000 405
n	22	6	18	8
LVP _{max} [mm Hg]	93 ? 4	95 ? 7	79 * ? 4	66 * ? 4
LVP _{min} [mm Hg]	-0,7 ? 0,9	3,3 ? 1,2	-1,9 ? 0,9	3,7 ? 5,7
Herzfrequenz [bpm]	226 ? 4	235 ? 15	220 ? 5	214 ? 16
dP/dt+ [mm Hg/s]	1489 ? 74	1499 ? 129	1208 * ? 68	928 * ? 105
Koronarfluss [ml/min]	10,9 ? 0,5	10,6 ? 0,9	8,5 * ? 0,4	7,5 * ? 0,7
MAPD ₉₀ [ms]	135 ? 3	133 ? 4	136 ? 4	137 ? 9

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +1 µM S 0000 405	Hypoxie +10 µM S 0000 405	Hypoxie +30 µM S 0000 405
n	9	9	9	8	6
LVP _{max} [mm Hg]	95 ? 5	46 ? 2	49 ? 2	40 ? 3	35 * ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	4,6 ? 1,2	12,8 ? 2,1	11,9 ? 2,4	10,4 ? 2,8	11,5 ? 2,6
Herzfrequenz [bpm]	239 ? 5	225 ? 10	221 ? 15	218 ? 17	238 ? 3
dP/dt+ [mm Hg/s]	1474 ? 61	677 ? 27	701 ? 16	594 * ? 28	541 * ? 23
Koronarfluss [ml/min]	11,2 ? 0,4	16,8 ? 0,5	16,1 ? 0,7	11,5 * ? 0,9	9,6 * ? 0,5

C Ischämie

	Puffer	100 nM S 0000 405	300 nM S 0000 405	2 µM S 0000 405	10 µM S 0000 405
n	29	5	3	6	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	11 ? 2	13 ? 1	12 ? 2	6 ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	2,0 ? 1,1	3,3 ? 1,2	2,7 ? 0,9	-2,3 ? 3,2
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	232 ? 16	259 ? 8	256 ? 39	237 ? 39
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 [†] ? 2	106 ? 7	113 * ? 6	121 * ? 3	127 * ? 6
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	122 ? 2	125 ? 3	121 ? 3	121 ? 1

III.B.8 Meglitinid und Repaglinid

Das in Abbildung III.24 dargestellte Repaglinid ist seit Oktober 1998 unter dem Handelsnamen NovoNorm[®] als Antidiabetikum in Deutschland erhältlich. Es wird auch als prandialer Glucoseregulator bezeichnet, da seine rasche Kinetik eine Senkung der postprandialen Blutzuckerspitzen ohne anschließende Hypoglykämie ermöglicht (Quast 2001). Repaglinid leitet sich aus der Meglitinidfamilie ab. Wie Meglitinid (Abbildung III.6 A) ist es ein Benzoesäurederivat mit einer Amidstruktur und einem zweiten aromatischen Ring.

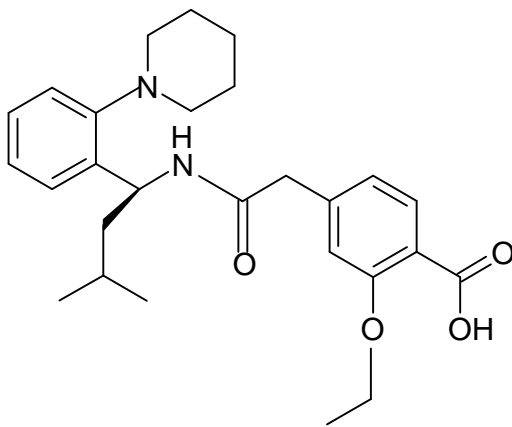
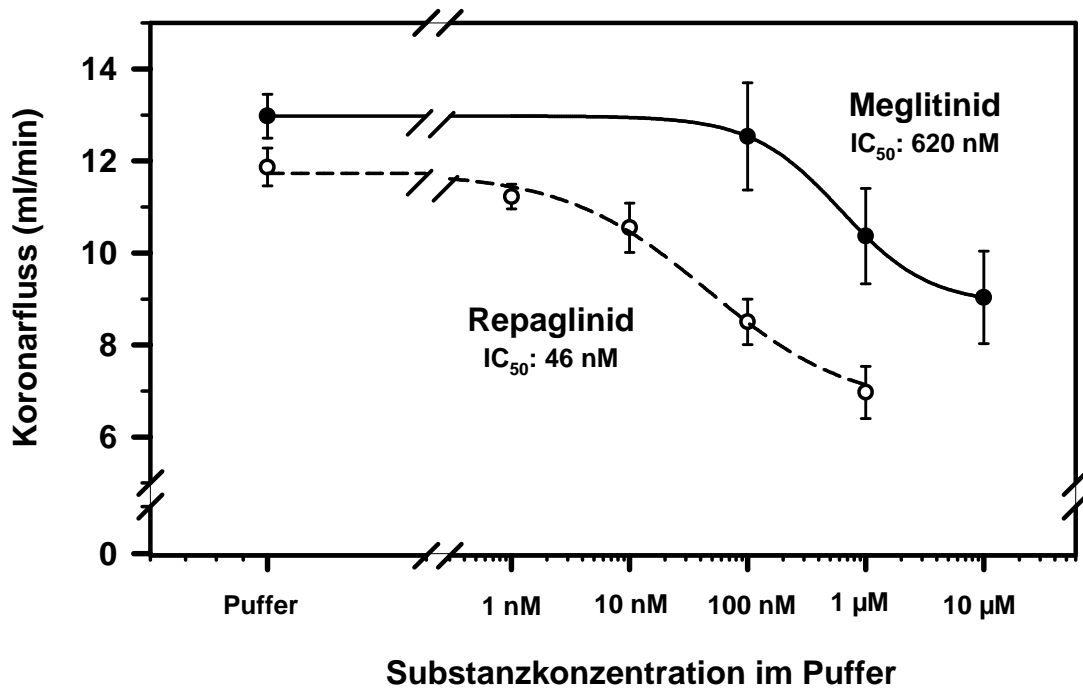


Abbildung III.24: Strukturformel von Repaglinid

Repaglinid wirkte unselektiv auf die kardialen K_{ATP} -Kanäle (siehe Abbildung III.25). Es war allerdings etwas wirksamer als Meglitinid, die IC_{50} -Werte waren 46 nM und ~200 nM für den normoxischen und hypoxischen Koronarfluss sowie 74 nM für die Inhibition der ischämischen Aktionspotential-Verkürzung.

A Koronarfluss unter Normoxie



B Koronarfluss unter Hypoxie

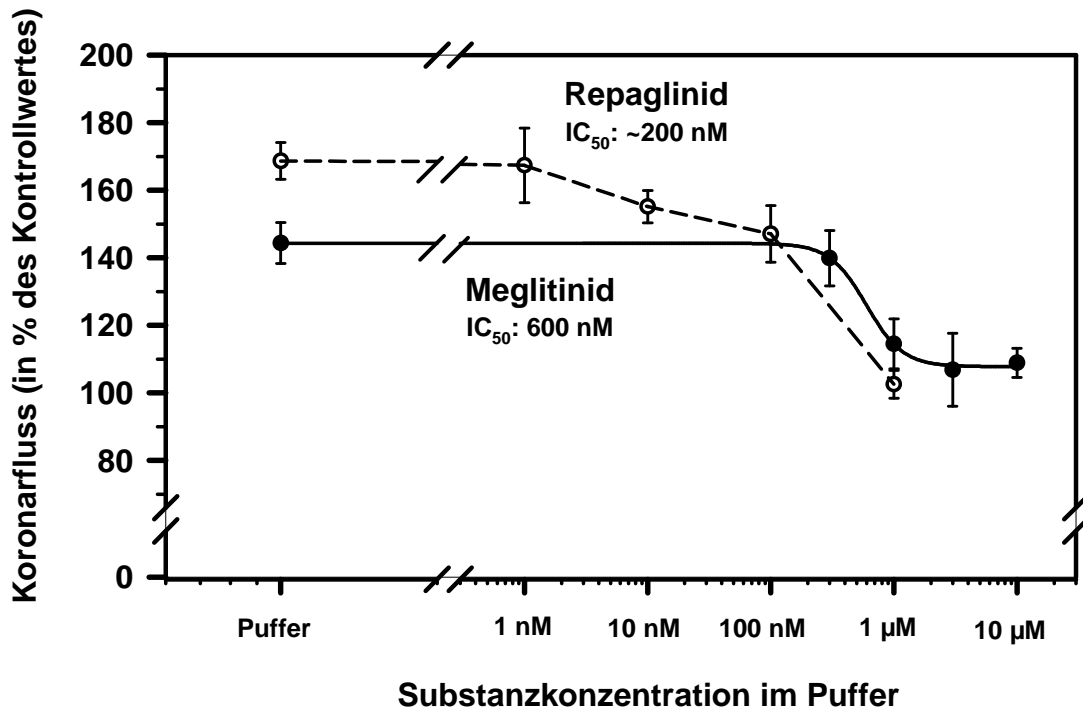
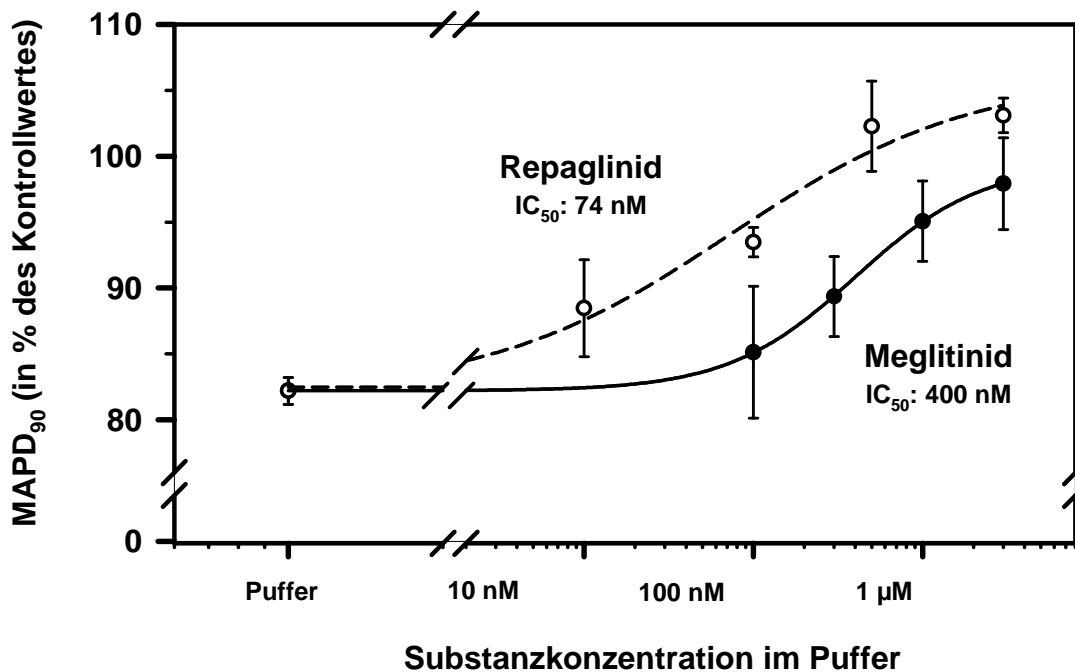


Abbildung III.25 A,B: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Meglitinid und Repaglinid, A Koronarfluss in Normoxie, B Koronarfluss während Hypoxie

C MAPD₉₀ unter IschämieAbbildung III.25 C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Meglitinid und Repaglinid, C MAPD₉₀ nach 5 min Ischämie

Die Wirkungen von Repaglinid zeigt Tabelle III.14 als Übersicht (Meglitinid: Tabelle III.6). Bei Normoxie wie Hypoxie wurde der Koronarfluss ab 100 nM signifikant gesenkt, ab 1 µM auch der systolische Druck (LVP_{max}) und die Kontraktilität (dP/dt+). In den Ischämieversuchen wies Repaglinid ab 500 nM eine signifikante Aktionspotentialverlängerung im Vergleich zu Puffer, bei 3 µM eine Erhöhung der Kontraktilität auf. Die Aktionspotentialverkürzung durch Ischämie im Vergleich zum präischämischen Kontrollwert war bei Konzentrationen bis 100 nM signifikant.

Der Vergleich von Meglitinid mit dem Antidiabetikum Repaglinid zeigt, dass für eine Blockade der ATP-abhängigen Kaliumkanäle auch von Sulfonylharnstoffen strukturell deutlich unterschiedliche Moleküle geeignet sind. Repaglinid war stärker wirksam als Meglitinid, aber ebenfalls unselektiv für sarkolemmale und vaskuläre K_{ATP}-Kanäle. Beide Substanzen sind Benzoessäurederivate, bei denen der Stickstoff eines Amids zwei Kohlenstoffatome von der para-Position des Aromaten entfernt ist. Außerdem besitzen beide Substanzen einen zusätzlichen aromatischen Ring.

Ergebnisse

Tabelle III.14: Wirkung von Repaglinid, A in Normoxie * p<0,05 vs. Kontrolle, B während Hypoxie * p<0,05 vs. Hypoxie, C nach 5 min Ischämie * p<0,05 vs. Puffer, + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

Repaglinid

A Normoxie

	Kontrolle	1 nM Repaglinid	10 nM Repaglinid	100 nM Repaglinid	1 µM Repaglinid
n	12	4	4	5	7
LVP _{max} [mm Hg]	127 ? 8	133 ? 8	117 ? 5	114 ? 5	67 * ? 8
LVP _{min} [mm Hg]	3,0 ? 1,4	3,5 ? 1,3	3,3 ? 1,1	1,4 ? 1,1	-0,4 ? 1,7
Herzfrequenz [bpm]	230 ? 6	234 ? 9	239 ? 14	237 ? 13	239 ? 10
dP/dt+ [mm Hg/s]	2025 ? 126	2147 ? 109	1850 ? 106	1766 ? 109	1091 * ? 104
Koronarfluss [ml/min]	11,9 ? 0,4	11,2 ? 0,3	10,6 ? 0,5	8,5 * ? 0,5	7,0 * ? 0,6
MAPD ₉₀ [ms]	141 ? 4	145 ? 2	143 ? 9	136 ? 7	131 ? 4

B Hypoxie

	Kontrolle	Hypoxie	Hypoxie +1 nM Repaglinid	Hypoxie +10 nM Repaglinid	Hypoxie +100 nM Repaglinid	Hypoxie +1 µM Repaglinid
n	11	11	5	6	6	6
LVP _{max} [mm Hg]	129 ? 5	68 ? 2	67 ? 3	68 ? 3	63 ? 3	52 * ? 3
LVP _{min} [mm Hg]	5,7 ? 0,8	9,8 ? 1,6	9,2 ? 3,0	12,5 ? 2,3	7,7 ? 2,9	10,7 ? 3,3
Herzfrequenz [bpm]	232 ? 8	232 ? 9	237 ? 11	223 ? 5	225 ? 14	235 ? 8
dP/dt+ [mm Hg/s]	2054 ? 89	1053 ? 25	1050 ? 13	1023 ? 39	96 ? 26	871 * ? 11
Koronarfluss [ml/min]	11,3 ? 1,9	19,0 ? 0,5	18,6 ? 0,9	17,9 ? 0,6	16,2 * ? 0,6	11,9 * ? 0,5

C Ischämie

	Puffer	10 nM Repaglinid	100 nM Repaglinid	500 nM Repaglinid	3 µM Repaglinid
n	29	3	3	5	3
LVP _{max} [mm Hg]	10 ? 1	13 ? 2	11 ? 2	6 ? 2	12 ? 1
LVP _{min} [mm Hg]	2,2 ? 0,8	2,7 ? 0,7	1,3 ? 0,9	-2,6 ? 1,9	-2,0 ? 0,6
dP/dt+ [mm Hg/s]	231 ? 10	252 ? 19	237 ? 16	232 ? 23	327 * ? 9
ischämische MAPD ₉₀ [ms]	99 ⁺ ? 2	109 ⁺ ? 5	111 ⁺ ? 6	118 * ? 3	119 * ? 5
präischämischer Kontrollwert MAPD ₉₀ [ms]	121 ? 2	124 ? 2	118 ? 5	116 ? 2	116 ? 4

III.B.9 Wirkung von Antiarrhythmika

Die bekannten Antiarrhythmika Sotalol (Sotalex[®]), Amiodaron (Cordarex[®]) und der Hemmstoff des langsamen, verzögerten K⁺-Kanals (I_{Ks}) HMR 1556 (Bosch et al. 2001) (Abbildung III.26) wurden auf ihren Einfluss auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung untersucht (Abbildung III.27). Die gewählten Konzentrationen sind aus der Literatur als antiarrhythmisch effektiv bekannt (Padrini et al. 1997; Kodama et al. 1997; Gerlach 2001).

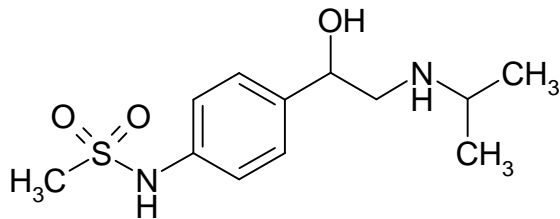
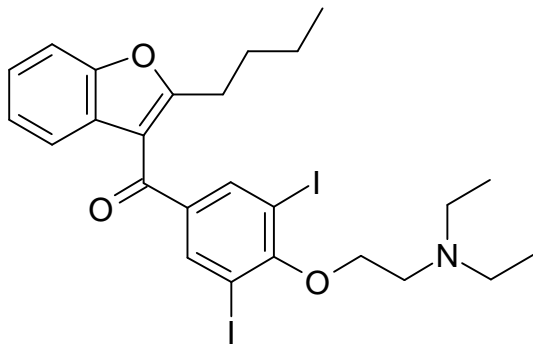
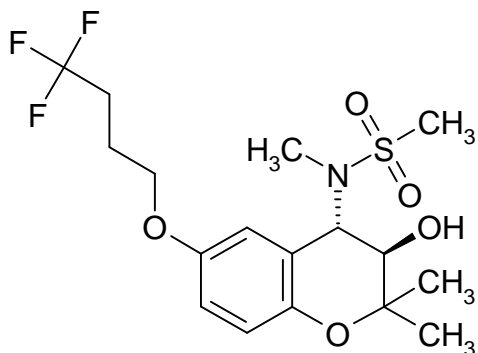
**A****B****C**

Abbildung III.26: A – C Strukturformeln von bekannten Antiarrhythmika: A Sotalol, B Amiodaron, C HMR 1556

Abbildung III.27 verdeutlicht, dass die Aktionspotentialverkürzung nach 5 min Ischämie durch die Antiarrhythmika Sotalol, Amiodaron und HMR 1556 nicht beeinflusst wird.

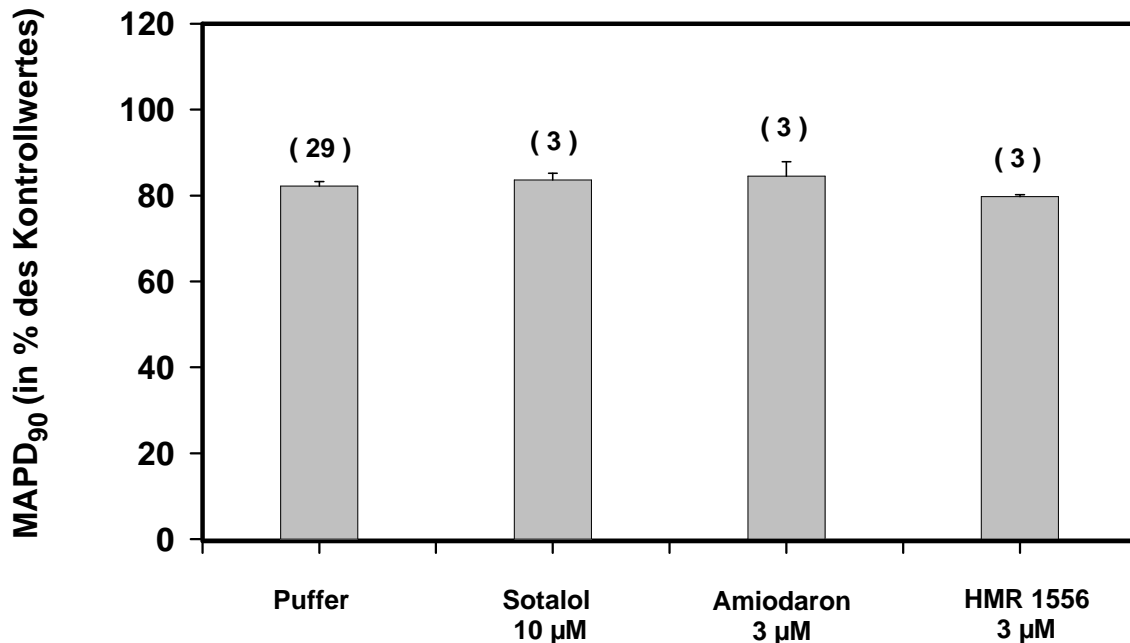


Abbildung III.27: Einfluss der Antiarrhythmika auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung nach 5 min Ischämie

Tabelle III.15 zeigt die Wirkung der genannten Antiarrhythmika in Normoxie und Ischämie. 10 µM Sotalol bewirkten unter normoxischen Kontrollbedingungen eine signifikante Verringerung der Herzfrequenz und des Koronarflusses sowie eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentiale. Keinerlei signifikante Veränderungen konnten mit 3 µM Amiodaron beobachtet werden. 3 µM HMR 1556 führten zu einer signifikanten Senkung von Herzfrequenz, LVP_{max} , Kontraktilität und Koronarfluss sowie einer signifikanten Verlängerung der Aktionspotentiale. Welcher Anteil der MAPD₉₀-Verlängerung auf die bradykarde Wirkung von Sotalol und HMR 1556 zurückzuführen war, wurde nicht untersucht.

Der Vergleich der Werte nach 5 min Ischämie zwischen Substanzgabe und Kontrollexperimenten ergab keine signifikanten Unterschiede, außer bei der MAPD₉₀ nach Gabe von Sotalol. Dies kann durch die aktionspotentialverlängernde Wirkung von Sotalol erklärt werden, denn die prozentuale MAPD₉₀-Verkürzung durch Ischämie betrug 82,2% bei den Kontrollen und 83,6% mit 10 µM Sotalol.

Ergebnisse

Tabelle III.15 A Wirkung von Sotalol, B Wirkung von Amiodaron, C Wirkung von HMR 1556; * p<0,05 vs. Kontrolle ;
 + p<0,05 vs. präischämischer Kontrollwert

A Sotalol

	Kontrolle	+ 10 μ M Sotalol	10 μ M Sotalol +5 Hz Stimulierung (präischämischer Kontrollwert)	10 μ M Sotalol + Ischämie 5min
n	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	128 ? 4	123 ? 0	111 ? 2	11 ⁺ ? 0
LVP _{min} [mm Hg]	7,7 ? 1,2	6,0 ? 2,0	6,7 ? 1,8	1,0 ? 0,0
Herzfrequenz [bpm]	240 ? 0	222 [*] ? 1	300	300
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	2118 ? 122	1950 ? 46	1931 ? 83	277 ⁺ ? 6
Koronarfluss [ml/min]	10,9 ? 0,0	9,6 [*] ? 0,2	10,5 ? 0,3	1,2 ⁺
MAPD ₉₀ [ms]	115 ? 3	129 [*] ? 2	116 ? 2	97 ⁺ ? 0

B Amiodaron

	Kontrolle	+ 3 μ M Amiodaron	3 μ M Amiodaron +5 Hz Stimulierung (präischämischer Kontrollwert)	3 μ M Amiodaron + Ischämie 5min
n	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	125 ? 8	120 ? 9	105 ? 8	8 ⁺ ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	6,0 ? 1,2	3,7 ? 2,7	4,3 ? 4,4	1,3 ? 2,0
Herzfrequenz [bpm]	273 ? 5	271 ? 7	300	300
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	2233 ? 179	2182 ? 224	1964 ? 244	196 ⁺ ? 11
Koronarfluss [ml/min]	9,5 ? 0,9	10,4 ? 1,2	10,1 ? 1,0	1,2 ⁺
MAPD ₉₀ [ms]	103 ? 4	100 ? 3	98 ? 4	83 ⁺ ? 6

C HMR 1556

	Kontrolle	+ 3 μ M HMR 1556	3 μ M HMR 1556 +5 Hz Stimulierung (präischämischer Kontrollwert)	3 μ M HMR 1556 + Ischämie 5min
n	3	3	3	3
LVP _{max} [mm Hg]	132 ? 5	122 [*] ? 6	107 ? 9	9 ⁺ ? 2
LVP _{min} [mm Hg]	5,3 ? 0,3	3,7 ? 2,3	2,7 ? 3,2	2,0 ? 2,0
Herzfrequenz [bpm]	260 ? 7	224 [*] ? 9	300	300
dP/dt ₊ [mm Hg/s]	2401 ? 160	2093 [*] ? 203	1936 ? 292	174 ⁺ ? 37
Koronarfluss [ml/min]	10,2 ? 0,4	9,2 [*] ? 0,6	9,8 ? 0,2	1,2 ⁺
MAPD ₉₀ [ms]	104 ? 3	120 [*] ? 5	100 ? 1	92 ⁺ ? 5

III.C Charakterisierung des K_{ATP} -Öffners S1526

In dieser Versuchsserie sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Substanz S1526 die Eigenschaften eines Öffners von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen aufweist und demnach als Leitstruktur für neuartige Substanzen zur Kardioprotektion dienen kann.

III.C.1 Ischämische Präkonditionierung

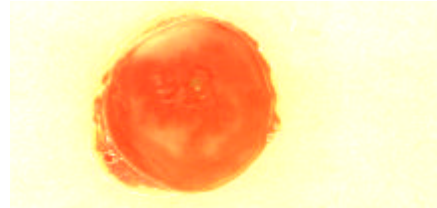
Es gilt als gesichert, dass die kardioprotektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung (IPC) auf der Aktivierung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen beruht und dass eine Aktivierung des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals durch Diazoxid ähnliche schützende Wirkungen aufweist wie die ischämische Präkonditionierung (Iwai et al. 2000; O'Rourke 2000; Patel, Gross 2001; Wang et al. 2001b). Daher wurde zunächst ein Modell etabliert, das die Untersuchung der IPC und von Aktivatoren des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals ermöglicht. Es wurde das isolierte nach Langendorff perfundierte Rattenherz gewählt, wobei nach einer Globalischämie von 40 min und darauf folgender Reperfusion von 30 min die Infarktgröße durch rotes Anfärben des Gewebes mit TTC bestimmt wurde. Das IPC-Protokoll bestand aus dreimal je fünf Minuten Globalischämie und fünf Minuten Reperfusion vor der Indexischämie von 40 min und der 30minütigen Reperfusion.

Abbildung III.28 zeigt Originalaufnahmen der Oberseiten von je fünf Scheiben von Rattenherzen, die die protektive Wirkung der IPC veranschaulichen. Es ist zu erkennen, dass die Infarktgebiete nach IPC (B) deutlich geringer sind als unter Kontrollbedingungen (A).

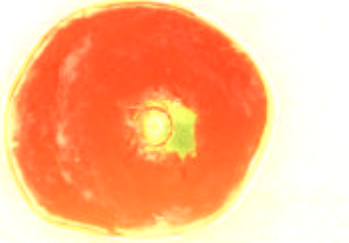
A.1



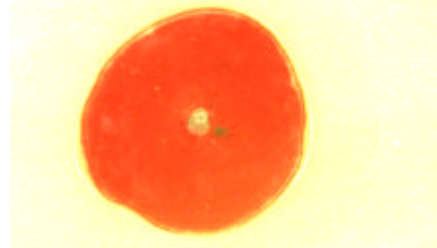
B.1



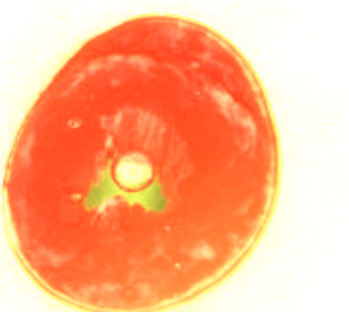
A.2



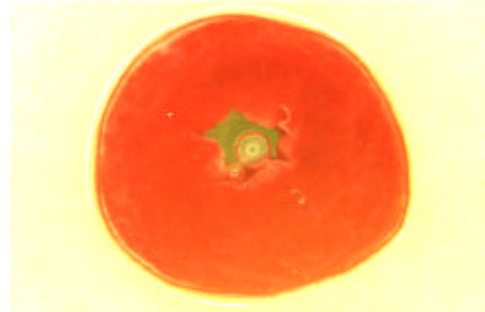
B.2



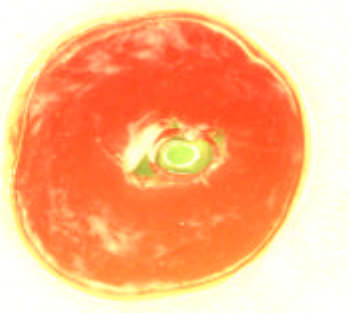
A.3



B.3



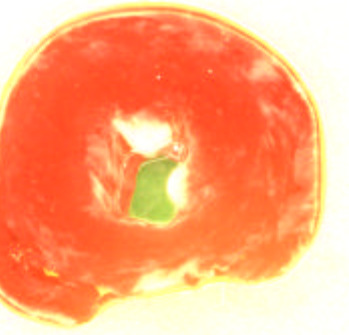
A.4



B.4



A.5



B.5

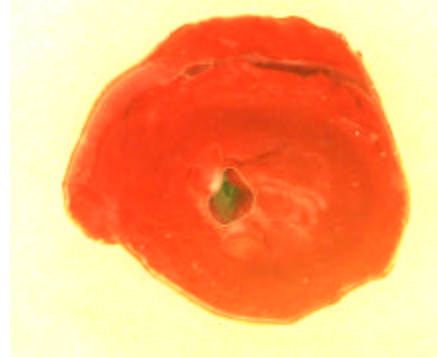


Abbildung III.28: Aufnahmen von TTC-gefärbten Ratten-Herzscheiben nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion; A Kontrollversuch; B nach Ischämischer Präkonditionierung

Abbildung III.29 stellt die Ergebnisse der Versuchsserie zusammengefasst dar. Durch das gewählte Protokoll der ischämischen Präkonditionierung wurde die Infarktgröße im Vergleich zum unbehandelten Kontrollversuch signifikant verringert.

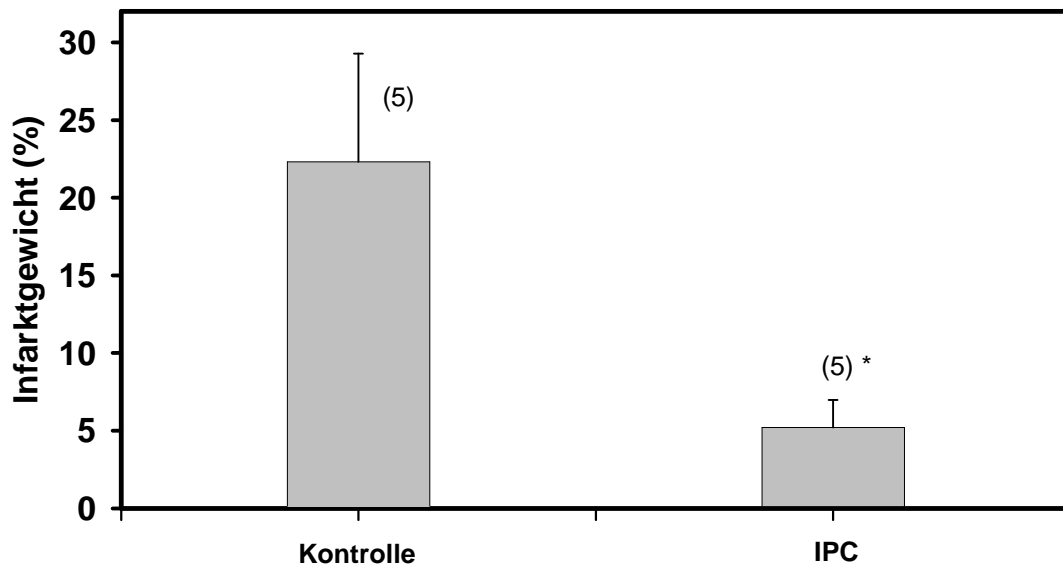


Abbildung III.29: Einfluss von ischämischer Präkonditionierung (IPC) auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion in isoliert perfundierten Rattenherzen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

III.C.2 Inhibition der IPC durch Natrium-5-hydroxydecanoat

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Ergebnissen, die zeigen, dass Natrium-5-hydroxydecanoat (5-HD, Abbildung III.30) einen Inhibitor des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals darstellt, ohne wesentliche Wirkungen auf andere K_{ATP} -Kanäle auszuüben (Gross, Fryer 1999; Sato, Marban 2000). Kalium-Fluss-Messungen in Proteoliposomen mit rekonstituierten mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen aus Rattenherzen zeigen für 5-HD einen $K_{1/2}$ -Wert von 83 μM (Grover et al. 2001). Die Wirkung in diesem Versuchsmodell lässt auf eine direkte Wirkung von 5-HD am mitochondrialen Kanal schließen. Es ist außerdem bekannt, dass 5-HD die kardioprotektive Wirkungen der IPC und von Diazoxid antagonisiert (Munch-Ellingsen et al. 2000; Fryer et al. 2001). Zur weiteren Validierung des verwendeten Modells wurden daher Versuche mit 5-HD durchgeführt.

Wie Abbildung III.31 demonstriert, hatten 500 μM 5-HD allein keinen Einfluss auf die Infarktgröße nach 40 min Globalischämie. Wurde 5-HD jedoch während des IPC-Protokolls appliziert, war dessen protektive Wirkung aufgehoben.

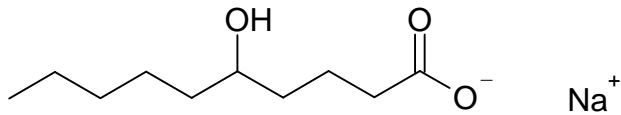


Abbildung III.30: Strukturformel von Natrium-5-hydroxydecanoat (5-HD)

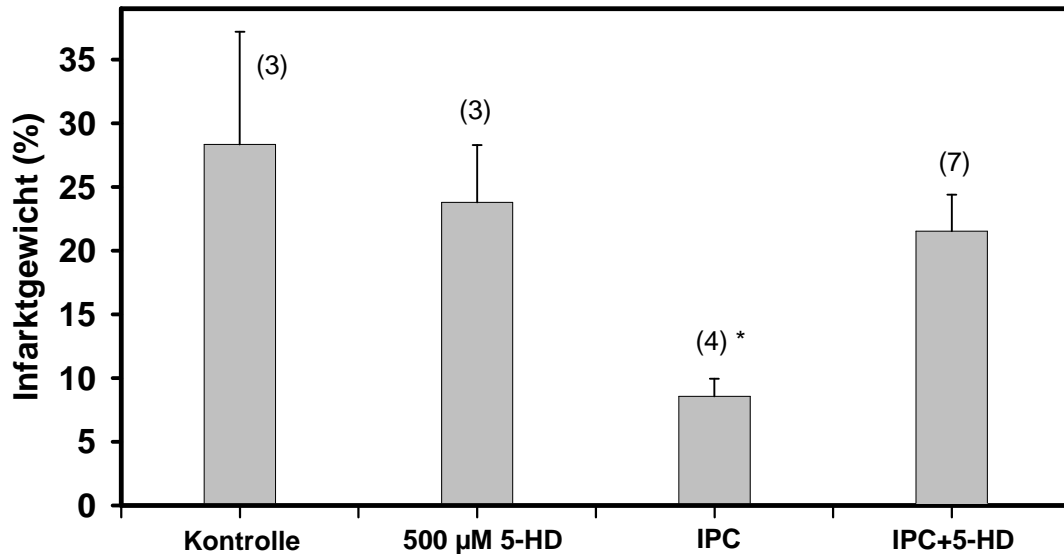


Abbildung III.31: Einfluss von 500 µM 5-HD auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion mit und ohne IPC in isoliert perfundierten Rattenherzen; * <0,05 vs. Kontrolle

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Versuchen anderer Arbeitsgruppen (Schultz et al. 1997; Gross 2000). Die Eignung der gewählten Versuchsdurchführung zur Testung von Substanzen, welche die Wirkung der ischämischen Präkonditionierung nachahmen, konnte so gezeigt werden.

III.C.3 Protektion durch Diazoxid

In diesem Abschnitt werden Versuche besprochen, in denen eine kardioprotektive Wirkung durch die Substanz Diazoxid hervorgerufen wird. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass Diazoxid-Applikation vor der Indexischämie zu einer Verringerung des Infarktgebietes und zu einer Verbesserung der Herzfunktion führt (Iwai et al. 2000; Pain et al. 2000; Forbes et al. 2001; Wang et al. 2001b).

Die Strukturformel von Diazoxid wird in Abbildung III.32 dargestellt. Aus Abbildung III.33 wird ersichtlich, dass 30 μM Diazoxid die prozentuale Infarktgröße im Vergleich zur parallel durchgeführten Kontrollgruppe signifikant reduzierte. Ein Vergleich mit Abbildung III.30 zeigt, dass die kardioprotektiven Wirkungen der IPC und die der Vorbehandlung mit Diazoxid ähnlich sind.

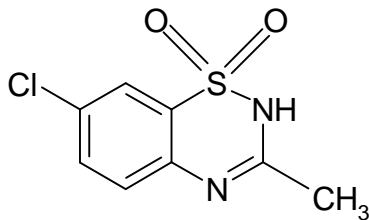


Abbildung 32: Strukturformel von Diazoxid

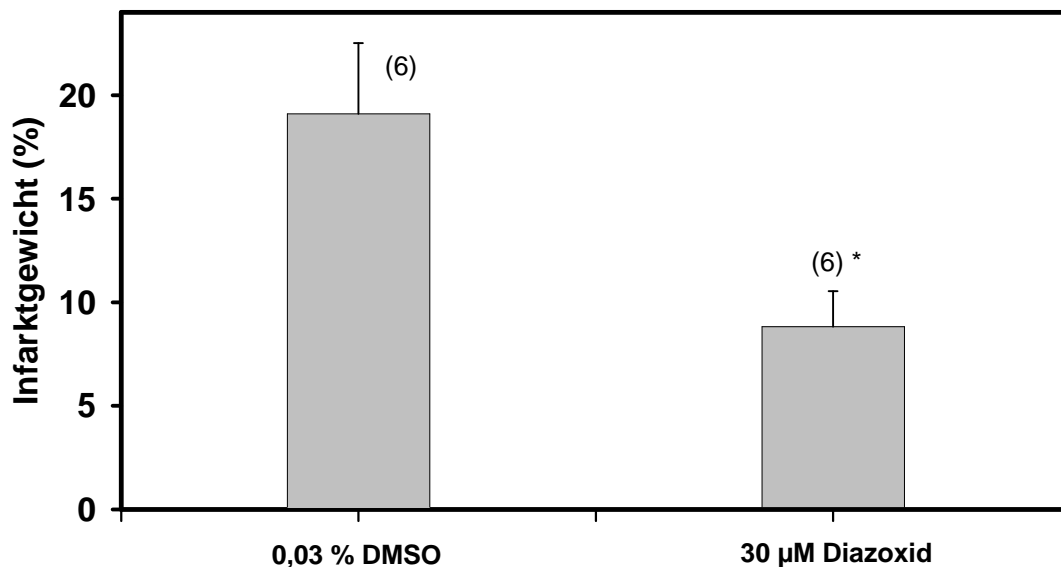


Abbildung III.33: Einfluss von 30 μM Diazoxid auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion in isoliert perfundierten Rattenherzen; * $p < 0,05$ vs. 0,03% DMSO

III.C.4 Wirkung von S1526 und Diazoxid auf den Koronarfluss

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die gewählte Versuchsdurchführung zur Testung von Substanzen, welche die Wirkung der ischämischen Präkonditionierung nachahmen, gut geeignet ist. Da Diazoxid neben der beschriebenen kardioprotektiven Wirkung auch ein Aktivator von K_{ATP} -Kanälen in β -Zellen des Pankreas und in glatten Muskelzellen darstellt, ist diese Substanz für einen klinischen Einsatz als Herzmittel nicht geeignet. Es wurde daher die neue Substanz S1526 zunächst auf ihre Wirkung auf den Koronarfluss untersucht, der empfindlich auf die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in der glatten Muskelschicht der Koronargefäße reagiert.

Wie Abbildung III.34 demonstriert, wurde mit 1 μ M S1526 sogar eine leichte Abnahme des Koronarflusses auf 89% des Kontrollwertes beobachtet. 30 μ M S1526 steigerte dagegen den Koronarfluss in Rattenherzen signifikant um 25% im Bezug auf den vorher gemessenen Kontrollwert, wohingegen 30 μ M Diazoxid zu einer Zunahme des Koronarflusses auf 209% führten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Substanz S1526 demnach deutlich weniger auf vasculäre K_{ATP} -Kanäle wirkt als der bekannte K_{ATP} -Öffner Diazoxid.

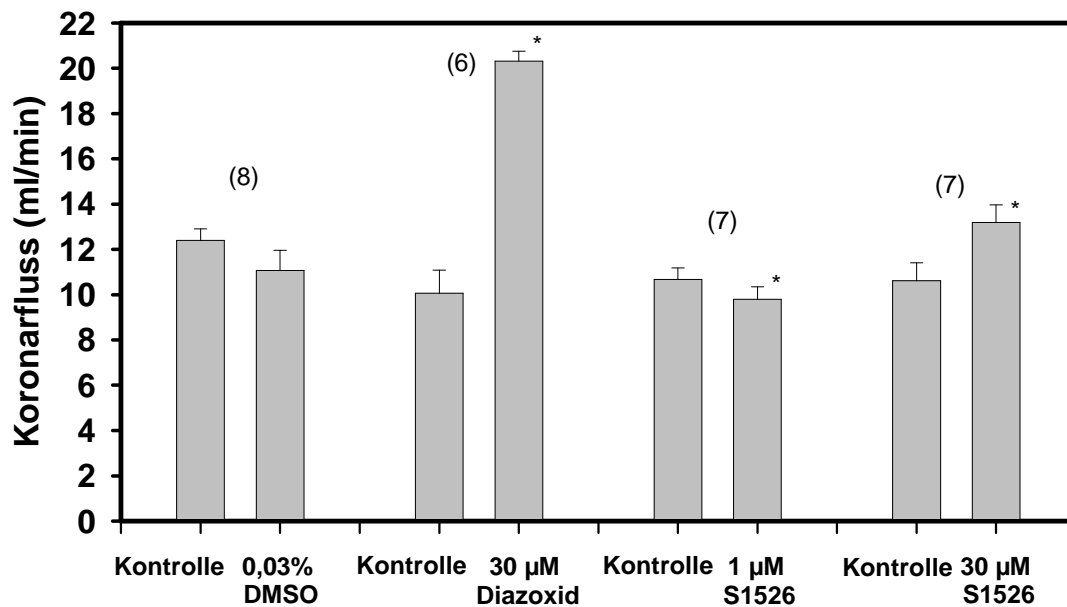


Abbildung III.34: Einfluss von Diazoxid und S1526 auf den Koronarfluss in isoliert perfundierten Rattenherzen;
* $p < 0,01$ vs. entsprechende vorangegangene Kontrolle

III.C.5 Wirkung von S1526 auf die Infarktgröße

Als nächstes wurde untersucht, ob die Gabe von S1526 vor und während der Indexischämie eine kardioprotektive Wirkung besitzt.

Abbildung III.35 zeigt, dass die Gabe von 1 μM und 30 μM S1526 im Vergleich zu den DMSO-Kontrollversuchen eine signifikante Verringerung der Infarktgröße bewirkte. Die Wirkung von 30 μM S1526 war von der Infarktgrößenreduktion durch 1 μM S1526 nicht statistisch signifikant verschieden. Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits 1 μM S1526 eine vergleichbare protektive Wirkung erzielt wie die ischämische Präkonditionierung oder 30 μM des K_{ATP} -Kanal-Öffners Diazoxid.

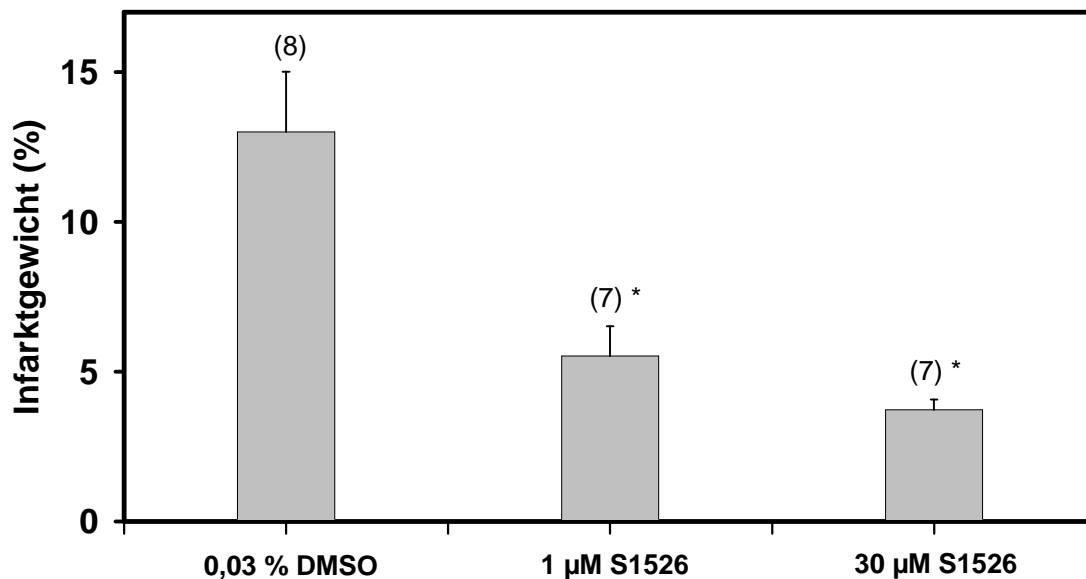


Abbildung III.35: Einfluss von 1 μM und 30 μM S1526 auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion in isoliert perfundierten Rattenherzen; * $p < 0,01$ vs. 0,03% DMSO

III.C.6 Kombination von S1526 mit K_{ATP} -Blockern

Um die Wirkung von S1526 weiter zu charakterisieren, wurde die Substanz in Kombination mit den K_{ATP} -Blockern 5-HD oder HMR 1098 getestet. 5-HD wird als selektiv mitochondrial, HMR 1098 als selektiv sarkolemmal beschrieben (Gross, Fryer 1999; Gross 2000; Sato, Marbán 2000).

Wie auch bei der ischämischen Präkonditionierung hob 5-HD die Wirkung von S1526 bezüglich der Verringerung der Infarktgröße vollständig auf (Abbildung III.36).

Im Gegensatz hierzu wurde die protektive Wirkung von 30 μ M S1526 durch 3 μ M HMR 1098 nicht verringert. HMR 1098 alleine hatte keine Wirkung auf die Infarktgröße. Da HMR 1098 einen Inhibitor des sarkolemmalen K_{ATP} -Kanals darstellt, zeigen diese Ergebnisse, dass die Wirkung von S1526 nicht auf der Beeinflussung von sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen beruhen kann.

Mit S1526 steht nach den Ergebnissen dieser Versuche eine Substanz zur Verfügung, die eine deutliche Überlegenheit zu Diazoxid aufweist. Denn bei einer Konzentration von 1 μ M S1526 trat bereits eine starke Kardioprotektion auf, ohne dass eine Wirkung auf den Koronarfluss zu beobachten war.

Ergebnisse

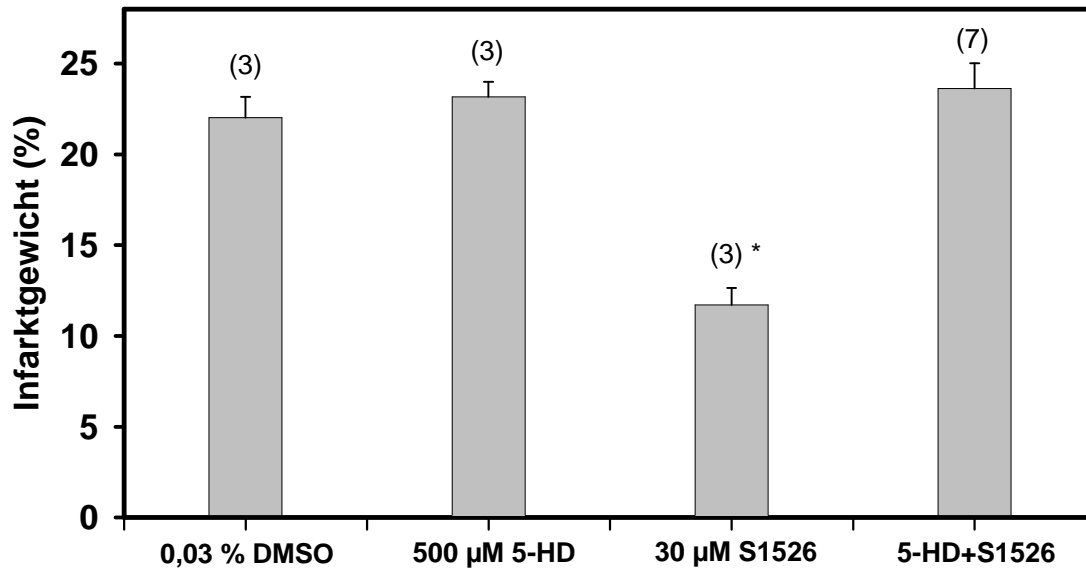


Abbildung III.36: Einfluss von 30 µM S1526 in der Kombination mit 500 µM Natrium-5-hydroxydecanoat (5-HD) auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion in isoliert perfundierten Rattenherzen; * p<0,01 vs. 0,03% DMSO

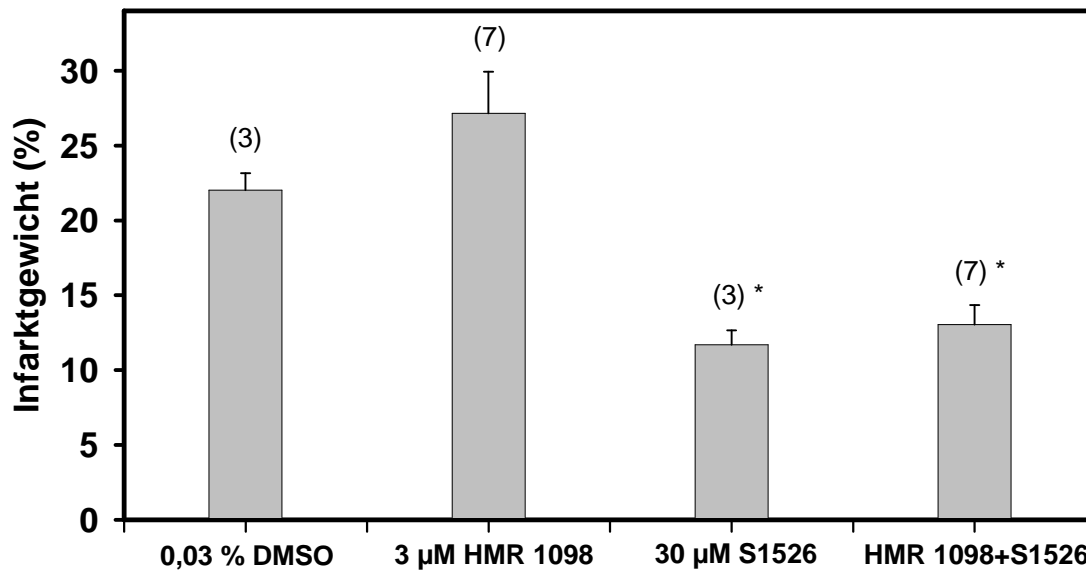


Abbildung III.37: Einfluss von 30 µM S1526 in der Kombination mit 3 µM HMR 1098 auf das prozentuale Infarktgewicht nach 40 min Globalischämie und 30 min Reperfusion in isoliert perfundierten Rattenherzen; * p<0,01 vs. 0,03% DMSO

IV Diskussion

IV.A Langendorff-Herz

Die experimentelle Verwendung von isolierten Langendorff-perfundierten Herzen kleiner Säugetiere ist gut geeignet, um die pharmakologische Wirkung potenzieller Arzneistoffe auf die kontraktile, vaskuläre und elektrische Aktivität eines intakten Herzens zu bestimmen.

Die Langendorff-Präparation ist relativ einfach durchzuführen, die Versuchsbedingungen sind leicht zu standardisieren. Zudem wird der Einfluss des Nervensystems auf die Herzfunktion ausgeschlossen, so dass mögliche Gegenregulationen entfallen (Ytrehus 2000). Die Stabilität der isolierten Herzen beträgt bei ausreichender Sauerstoffversorgung, geeigneter Zusammensetzung der Pufferlösung und physiologischer Temperatur mehrere Stunden (Sutherland, Hearse 2000).

Experimente an isolierten Herzen ermöglichen allerdings nur einen relativ geringen Durchsatz an Testsubstanzen, so dass sie nicht geeignet sind, um potenzielle Arzneistoffe aus großen Substanzbibliotheken herauszufinden. Es können jedoch ausgewählte Substanzen auf ihre Wirkung hinsichtlich verschiedener Parameter der Herzfunktion untersucht werden.

Gegenüber anderen *in-vitro*-Methoden, wie z.B. dem isolierten Papillarmuskel, hat die Langendorff-Methode den Vorteil, dass Substanzen über das koronare Gefäßsystem an ihren Wirkort gelangen. Aufgrund der Perfusion mit Pufferlösung kann aber keine Aussage über die Plasmaeiweißbindung und andere pharmakokinetische Eigenschaften der Substanzen getroffen werden.

IV.A.1 Langendorff-Herzen als Arrhythmie-Modell

Meerschweinchenherzen besitzen viele kollaterale Blutgefäße. Das Abbinden der linken Koronararterie als übliches Modell für eine regionale Ischämie hat demzufolge keinen Einfluss auf die Versorgung des Myokards. Eine solche Ischämie kann deswegen bei Meerschweinchen nicht durchgeführt werden (Rösen et al. 1984; Schaper 1986; Maxwell et al. 1987).

Die Häufigkeit und die zugrundeliegenden Mechanismen bei Rhythmusstörungen in Herzen mit globaler Ischämie unterscheiden sich von denen in regional ischämischen Herzen. Denn bei globaler Ischämie fehlen die Grenzzonen zwischen ischämischem und normal perfundiertem Myokard, die bei der Entstehung von ischämisch bedingten Arrhythmien eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Janse, Wit 1989; Picard et al. 1999). Die hier vorgestellten Versuche an isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen sind daher nicht darauf ausgelegt, die Häufigkeit von Arrhythmien in Ischämie und Reperfusion zu untersuchen.

Eine Ischämie ist gekennzeichnet durch eine unzureichende Versorgung mit Substraten wie Sauerstoff und Glucose bei gleichzeitiger inadäquater Entfernung von Metaboliten, vor allem Laktat, Protonen und Kaliumionen (Allen, Orchard 1986). Experimentelle Modelle für Ischämie erreichen diese Kriterien durch eine regionale oder globale Reduktion des Koronarflusses. Die koronare Perfusion und die Sauerstoffversorgung können verringert oder völlig unterbunden werden.

Für die myokardiale Ischämie in unseren Meerschweinchen-Versuchen wurde daher eine sauerstofffreie Perfusion mit reduziertem Koronarfluss gewählt. Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde dazu mit einem Gasgemisch aus 5% Kohlendioxid in Stickstoff begast, was für einen physiologischen pH-Wert sorgte und eventuell gelösten Luftsauerstoff eliminierte (Ruiz Petrich et al. 1992). Eine Perfusion mit konstant verringertem Koronarfluss von 10% des Ausgangswertes kann als Simulation einer Region mit akutem Myokardinfarkt dienen (Cave et al. 1999).

Die vorgestellte Arbeit an isolierten Meerschweinchenherzen erfasst die erwünschten und unerwünschten Wirkungen des therapeutischen Einsatzes von Antagonisten des ATP-sensitiven Kaliumkanals. Diese Wirkungen können reproduzierbar in einem nahezu physiologischen Umfeld untersucht werden. Die erhaltenen Daten liefern daher wichtige Informationen für die Entwicklung von selektiven Arzneistoffen gegen den plötzlichen Herztod.

IV.A.2 Koronarfluss-Messungen

Die Regulation der Koronardurchblutung bei Normoxie hängt sowohl von der Endothelfunktion als auch von der glatten Gefäßmuskulatur ab. Das Membranpotential dieser Zellen ist ein äußerst wichtiger Faktor auf den koronaren Blutfluss (Daut et al. 1994b). Das Endothel kann verschiedene vasodilatierende Botenstoffe wie Stickstoffmonoxid, Prostacyclin und Adenosin, aber auch Vasokonstriktoren, beispielsweise Endothelin-1, Angiotensin II und Sauerstoffradikale, freisetzen (Nilius, Droogmans 2001). Noradrenalin aus sympathischen Nerven-

endigungen führt an der Gefäßmuskulatur ebenso zu einer Konstriktion wie eine intravasale Druckerhöhung. ATP-sensitive Kaliumkanäle sind in glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls an der Regulation des Tonus unter basalen normoxischen Bedingungen beteiligt (Imamura et al. 1992; Daut et al. 1994b; Brayden 2002). Die vasodilatierende Wirkung von Adenosin kann zum Teil durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen erklärt werden (Randall 1995). Vasodilatoren können über die Aktivierung von Adenylatcyclase und Proteinkinase A den K_{ATP} -Kanal aktivieren, vasokonstringierende Faktoren mittels Phospholipase C und Proteinkinase C den Kanal blockieren (Standen, Quayle 1998; Brayden 2002).

Das Absinken des Sauerstoffpartialdrucks während einer Hypoxie führt zu einer Vasodilatation als physiologischer Gegenregulation, wodurch das Sauerstoffdefizit zumindest partiell ausgeglichen werden kann. Die hypoxische Koronarflusserhöhung kann durch Blockade des vaskulären ATP-sensitiven Kaliumkanals verhindert werden (Park et al. 1992; Brown et al. 1993; Liu, Flavahan 1997; Kamekura et al. 1999). Die Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase und der Cyclooxygenase sowie die Blockade von Adenosinrezeptoren verringern ebenfalls die hypoxiebedingte Vasodilatation (Park et al. 1992; Brown et al. 1993; Kamekura et al. 1999). Es existieren jedoch auch widersprechende Studien, die keine Beteiligung von NO, Prostacyclin und Adenosin zeigen (Beckerath et al. 1991; Liu, Flavahan 1997).

Der Koronarfluss bei isolierten Herzen ist vielfach höher als *in vivo* (Opie 1965; Sutherland, Hearse 2000). Die Höhe des Koronarflusses, aber auch die Herzfunktion korrelierten mit der Größe des Perfusionsdrucks, mit dem die begaste Pufferlösung durch das Herz gedrückt wird (Opie 1965). Der Perfusionsdruck betrug bei den durchgeführten Meerschweinchenexperimenten 55 mm Hg, das entspricht 75 cm Wassersäule (Brown et al. 1993). Dieser Perfusionsdruck wurde gewählt, da hierbei eine gute Herzfunktion vorhanden war und der Koronarfluss einen vertretbaren Wert behielt.

Die koronare Perfusion wird jedoch trotz dieser methodisch bedingten Erhöhung weiterhin physiologisch reguliert. Durch Hypoxie kann der Koronarfluss bis auf das Doppelte des vorherigen Wertes gesteigert werden, eine Vasodilatation ist also möglich. Für eine hypoxische Begasung hat sich ein Sauerstoffgehalt von 20% bewährt (Brown et al. 1993; Decking et al. 1995; Reffelmann et al. 2001). Bei weniger Sauerstoff ist zwar die Koronarflusserhöhung maximal, aber die Herzfrequenz wird unregelmäßig (Brown et al. 1993), so dass dieses Modell für die Testung von Substanzen weniger geeignet ist. Durch K_{ATP} -Blocker wurde eine maximale Verringerung des Koronarflusses um etwas mehr als ein Drittel hervorgerufen. Die vasokonstriktorische Wirkung der getesteten Substanzen kann demnach in Normoxie und Hypoxie untersucht werden.

IV.A.3 Aktionspotential-Messungen

Als Parameter für die antiarrhythmische Wirkung von K_{ATP} -Kanal-Blockern wurde die Dauer des monophasischen Aktionspotentials (MAP) verwendet. Dessen Verkürzung während einer Ischämie korreliert mit der Entstehung von Arrhythmien. Die Heterogenität zwischen ischämischem und perfundiertem Myokard kann zu kreisenden Erregungen führen (Wilde, Janse 1994).

Das MAP wird extrazellulär an epikardialen Zellen. Die MAP-Elektrode muss dazu fest an das Herz gepresst werden, um die darunterliegenden Zellen zu depolarisieren. Die Messelektrode misst die Potentialveränderung der Umgebung (Franz 1999). Die Aktionspotentialmessungen mit Kontaktelektroden geben zuverlässig den Verlauf der zellulären Depolarisation und Repolarisation wieder, sowohl im Labor als auch in der Klinik (Ino et al. 1988; Franz 1999).

Bei dieser Art der Aktionspotentialmessung sind jedoch nur epikardiale Zellen zugänglich, deren Aktionspotential sich von endokardialen Zellen unterscheidet (Sekiya et al. 1983; Sekiya et al. 1984; Kimura et al. 1990). Epikardiale Aktionspotentiale von Katzen und Meerschweinchen haben eine geringere Amplitude als endokardiale (Watanabe et al. 1985; Kimura et al. 1990). Die Aktionspotentialverkürzung während einer Ischämie tritt jedoch bei endo- wie epikardialen Myozyten auf (Kimura et al. 1990). Die epikardialen Aktionspotentiale weisen bei Meerschweinchen nur sehr geringe Unterschiede zwischen Herzbasis und Herzspitze auf, so dass geringfügige Unterschiede in der Platzierung der Elektrode nicht relevant sind (Watanabe et al. 1985).

Die Aktionspotentialdauer wurde wie in der Literatur üblich als $MAPD_{90}$ bei 90%iger Repolarisation angegeben. Die Aktionspotentialdauer ist abhängig von der Herzfrequenz: je höher die Frequenz, desto kürzer das MAP (Boyett, Jewell 1980; Kimura et al. 1990; Tweedie et al. 1993). Um die Vergleichbarkeit zu sichern, wurde bei den Ischämieversuchen die Herzfrequenz durch elektrische Stimulation konstantgehalten. Ohne Stimulation werden die Herzen bei den gewählten Ischämiebedingungen extrem bradykard, so dass eine vergleichende Aktionspotentialmessung nicht mehr möglich wäre.

Die Messung der Aktionspotentialdauer unter ischämischen Bedingungen im Langendorffherz hat deutliche Vorteile gegenüber anderen *in-vitro*-Methoden. Für die Messung von Aktionspotentialen ist es wichtig, dass die Herzmuskelzellen sich im Gewebeverband befinden, da die Aktionspotentialdauer bei gegebener Stimulationsfrequenz in isolierten Myozyten sehr viel stärker schwankt (Watanabe et al. 1985). Patch-clamp Experimente an einzelnen

Herzmuskelzellen haben daher nur eine begrenzte Aussagekraft. In isolierten Papillarmuskeln ist die ischämische Aktionspotentialverkürzung deutlich ausgeprägter und erreicht 15% bis 30% des Kontrollwertes (MacKenzie et al. 1993; Gögelein et al. 1998). Der Papillarmuskel wird in den Versuchen lediglich von Pufferlösung umspült, so dass Substanzen nur über Diffusion durch mehrere Membranen an ihren Wirkort gelangen können. Dagegen wird in isolierten Herzen die Pufferlösung mit dem Wirkstoff durch das physiologische Gefäßsystem effektiv zu den Zellen transportiert. Im intakten Herzen *in vitro* und *in vivo* tritt dagegen keine stärkere Verkürzung als auf ungefähr 80% des Kontrollwertes auf (Schulz et al. 1994; Wirth et al. 2000). Dies stimmt mit den Ergebnissen der hier gezeigten Versuche überein.

IV.B Wirkungen der K_{ATP} -Blocker

IV.B.1 Substanzwirkungen auf die Herzfunktion

Die Kontraktilität $dP/dt+$ und der systolische Druck LVP_{max} werden bei normoxischen Versuchsbedingungen durch die höchsten eingesetzten Konzentrationen von Glibenclamid, Meglitinid, S 94 1638, S 95 1957, S 0000 405 und Repaglinid signifikant gesenkt (Tabellen III.5/6/7/10/12/14 A). Im jeweils selben Konzentrationsbereich findet jedoch auch eine signifikante Verringerung des Koronarflusses statt. Diese kann als Ursache für die Beeinträchtigung der Herzfunktion angesehen werden, da die Sauerstoff- und Substratversorgung abnimmt. 30 μ M HMR 1372 und 100 μ M HMR 1402 (Tabellen III.11/12 A) rufen eine signifikante Verringerung der Kontraktilität ohne gleichzeitige Beeinflussung des Koronarflusses hervor. Bei diesen hohen Konzentrationen, die weit über denen für die Blockade des sarkolemmalen K_{ATP} -Kanals liegen, kann von einer unspezifischen Wirkung ausgegangen werden.

Unter Hypoxie wird die Kontraktilität durch den Sauerstoffmangel ungefähr halbiert. Wird der kompensatorische Koronarflussanstieg blockiert, nimmt auch die Kontraktilität signifikant ab. Dies gilt bei wirksamen Konzentrationen von Glibenclamid, S 92 0707, HMR 1402, S 0000 405 und Repaglinid (Tabellen III.5/8/12/13/14 B). 30 μ M HMR 1372 bewirken ebenso wie unter normoxischen Versuchsbedingungen eine signifikante Verringerung der Kontraktilität ohne Senkung des Koronarflusses (Tabelle III.11 B).

Die Wirkung der Substanzen auf die Herzfunktion kann unter ischämischen Bedingungen nur schwer beobachtet werden, da diese sofort nach Beginn der Ischämie stark beeinträchtigt wird (Allen, Orchard 1986). Die Kontraktilität sinkt auf ungefähr 10-20% des Ausgangswertes. Bei S 94 1638, HMR 1402 und Repaglinid ist bei der höchsten, während der Ischämie getesteten Konzentration eine geringe, aber signifikante Erhöhung des systolischen Drucks bzw. der Kontraktilität zu beobachten (Tabellen III.7/12/14 C). 1 μ M S 94 1638 bewirkt unter Normoxie eine Senkung und in der Ischämie eine Steigerung der Kontraktilität. Dagegen sind 10 μ M unter Hypoxie auf die Kontraktilität ohne Einfluss. Bei Repaglinid senken 1 μ M die Kontraktilität bei normoxischen und hypoxischen Bedingungen, während 3 μ M in der Ischämie diese signifikant erhöhen. Diese entgegengesetzten Wirkungen sind möglicherweise mit der gleichzeitigen Aktionspotentialverlängerung und dem dadurch erhöhten Kalziumeinstrom während der Plateauphase zu erklären.

Ein antiarrhythmischer Arzneistoff sollte keine Beeinträchtigung der Herzfunktion verursachen. Bei den getesteten Substanzen verringert sich die systolische Druckentwicklung und die Kontraktilität jedoch erst als Folge einer Senkung des Koronarflusses, welche der verschlechterten Herzfunktion zeitlich vorangeht. Keine der Substanzen wirkt per se negativ inotrop.

IV.B.2 Substanzwirkungen auf den Koronarfluss

Die untersuchten K_{ATP} -Blocker lassen sich in ihrer Wirkung auf den Koronarfluss anhand der ermittelten IC_{50} -Werte wie folgt einordnen: Glibenclamid < S 94 1638 < Repaglinid < S 95 1957 < Meglitinid < S 0000 405 < S 92 0707 < HMR 1402 < HMR 1372 < HMR 1098 (siehe auch Tabelle IV.1 im Kapitel IV.B.4).

Die Einteilung wird jedoch dadurch erschwert, dass nur bei Glibenclamid, S 94 1638, Meglitinid und HMR 1098 für Normoxie und Hypoxie ähnliche IC_{50} -Werte bestimmt wurden. Bei HMR 1402 ist unter normoxischen Versuchsbedingungen mit Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M nur eine geringe Verringerung des Koronarflusses zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen (30 μ M und 100 μ M) tritt hingegen eine Zunahme des Koronarflusses auf. Diese paradoxe Wirkung kann nur durch zusätzliche, noch unbekannte Mechanismen erklärt werden, die eine Vasodilatation hervorrufen. Unter Hypoxie wird der Koronarfluss durch 10 μ M HMR 1402 signifikant gesenkt (Abbildung III.21 A+B, Tabelle III.12 A+B). Diese stärkere Wirkung der Substanz auf den Koronarfluss unter Hypoxie verglichen zur Wirkung unter Normoxie beruht wahrscheinlich auf dem vasodilatatorischen Zusatzeffekt, der unter Normoxie stärker zur Geltung kommt als unter Hypoxie.

Bei der Hälfte der Substanzen sind die IC_{50} -Werte für die Verringerung des normoxischen Koronarflusses kleiner als für die des hypoxischen. Bei S 92 0707, Repaglinid, S 94 1638, S 95 1957 und S 0000 405 besteht ein Unterschied um den Faktor 4 bis 12 (Tabelle IV.1 im Kapitel IV.B.4). Obwohl die Öffnungswahrscheinlichkeit der vaskulären K_{ATP} -Kanäle bei ausreichender Sauerstoffversorgung deutlich geringer ist als in der Hypoxie, sind doch genügend Kanäle aktiviert, um durch K_{ATP} -Blocker eine signifikante Verringerung des Koronarflusses beobachten zu können. Die maximal beobachtbare Wirkung führt zu einer Senkung auf ungefähr 60-70% des Ausgangswertes.

Glibenclamid

Rekombinante vaskuläre K_{ATP} -Kanäle (Untereinheiten Kir 6.1 und SUR 2B) bzw. (Untereinheiten Kir 6.2 und SUR 2B) werden von Glibenclamid mit einem IC_{50} -Wert von 43 nM bzw. 26 nM inhibiert (Russ et al. 2001a; Russ et al. 2001b).

Einige Arbeitsgruppen konnten bei normoxischen Versuchen für 1 μ M Glibenclamid in isolierten Meerschweinchen- und Rattenherzen keine signifikanten Verringerungen des Koronarflusses beobachten (Kantor et al. 1990; Decking et al. 1995; Reffemann et al. 2001). Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen verschiedener anderer Arbeitsgruppen, die in isolierten Meerschweinchen- und Rattenherzen für Konzentrationen ab 0,6 μ M Glibenclamid eine signifikante Senkung des Koronarflusses im Vergleich zum Ausgangswert gezeigt haben (Bril et al. 1992; Randall 1995; Maczewski, Beresewicz 1998; Gögelein et al. 2001). In den eigenen Versuchen bewirkt 1 μ M Glibenclamid eine signifikante Verringerung des normoxischen Koronarflusses auf 66% des Kontrollwertes.

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass 1 μ M Glibenclamid die hypoxische Koronarflusserhöhung in Langendorff-perfundierten Meerschweinchenherzen vollständig aufhebt, eine Verdopplung der Konzentration hat keine weitere Wirkung (Decking et al. 1995). Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit den hier gezeigten Beobachtungen, auch hier hat 1 μ M Glibenclamid die maximale Wirkung.

HMR 1098

HMR 1098 inhibiert rekombinante vaskuläre K_{ATP} -Kanäle aus den Untereinheiten Kir 6.1/SUR 2B bzw. Kir 6.2/SUR 2B in Patch-clamp Versuchen mit einem IC_{50} -Wert von 5,3 μ M bzw. 1,2 μ M (Russ et al. 2001a; Russ et al. 2001b). Diese Werte sind deutlich kleiner als die im isolierten Meerschweinchenherzen gefundenen Werte für die Beeinflussung des Koronarflusses (>100 μ M). Rekombinante Kanäle haben jedoch andere pharmakologische Eigenschaften als K_{ATP} -Kanäle im Gewebe, da intrazelluläre Modulatoren, beispielsweise Phosphatidylinositoldiphosphat, nicht oder in anderen Konzentrationen vorliegen (Krauter et al. 2001).

Für die hypoxische Koronarflusserhöhung wurde bereits gezeigt, dass sie bis zu der hohen Konzentration von 100 μ M HMR 1098 nicht beeinflusst wird (Gögelein et al. 1998).

Die Hämodynamik und Herzfunktion von Ratten, Schweinen, Hunden und sogar herzinsuffizienten Hunden wird durch HMR 1098 nicht beeinträchtigt (Gögelein et al. 2001; Wirth et al. 1999b; Billman et al. 1998; Saavedra et al. 2002). Eine Beeinflussung von vaskulären Kanälen bei therapeutischer Anwendung kann daher ziemlich sicher ausgeschlossen werden.

Repaglinid

Repaglinid wurde in verschiedenen *in-vitro*-Modellen auf seine Effektivität an K_{ATP} -Kanälen der glatten Gefäßmuskulatur untersucht. In *Xenopus*-Froscheiern exprimierte humane K_{ATP} -Kanäle aus den Untereinheiten Kir 6.2 und SUR 2B werden von Repaglinid mit einem IC_{50} -Wert von 10 nM inhibiert. Physiologische Konzentrationen von 100 μ M MgADP haben eine geringfügig verstärkende Wirkung (Dabrowski et al. 2001). In Zellen aus Rattenaorta und Schweinekoronararterien inhibieren 80 nM Repaglinid die K_{ATP} -Kanäle halbmaximal (Hu et al. 1999a). Die bei den hier gezeigten Versuchen in isolierten Meerschweinchenherzen ermittelten IC_{50} -Werte betragen 46 nM bzw. 220 nM (Normoxie / Hypoxie), was mit den in Gefäßmuskelzellen ermittelten Werten tendenziell übereinstimmt.

IV.B.3 Substanzwirkungen auf das Aktionspotential

Zur Bestimmung der Wirkung der K_{ATP} -Blocker wird als Modell eine Ischämie durch verringerte Perfusion mit sauerstofffreiem Puffer verwendet. Die Herzfrequenz wird dabei durch konstante Stimulation mit 5 Hz aufrechterhalten. Unter diesen Bedingungen sinkt die Aktionspotentialdauer nach 5 min Ischämie auf circa 80% des Vergleichswertes vor der Ischämie, nach 15 min Ischämie ist sie noch etwas geringer mit ungefähr 75% des präischämischen Wertes (Abbildung III.3 C, Tabelle III.3 C). Allerdings zeigen bereits nach 7 min Ischämie die ersten Herzen Kammerflimmern, weshalb dieser und spätere Zeitpunkte für eine Auswertung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung nicht geeignet sind.

Die ischämische Verkürzung der $MAPD_{90}$ nach 5 min ist bei allen Versuchen ohne wirksame Konzentration eines K_{ATP} -Blockers reproduzierbar. Zu diesen Versuchen zählen die Kontrollexperimente, die Testung von DMSO und der Klasse-III-Antiarrhythmika Sotalol, Amiodaron und HMR 1556 sowie die Experimente mit geringen Konzentrationen der getesteten K_{ATP} -Blocker. Bei der Testung der Hemmstoffe steht damit ein enger Bereich von 80-100% der präischämischen Aktionspotentialdauer für die Beobachtung von Wirkungen zur Verfügung, der jedoch aufgrund der hervorragenden Reproduzierbarkeit für verlässliche Aussagen ausreicht.

Die errechneten IC_{50} -Werte der untersuchten K_{ATP} -Blocker für die Verhinderung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung steigen in der folgenden Reihenfolge an: S 94 1638 < S 95 1957 < Repaglinid < Glibenclamid < HMR 1402 < Meglitinid < HMR 1098 < S 0000 405 < HMR 1372 < S 92 0707 (siehe auch Tabelle IV.1 im Kapitel IV.B.4).

S 92 0707, das Sauerstoff-Derivat von HMR 1098, liegt mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 20 \mu M$ deutlich über den anderen Werten, die ansonsten alle kleiner als $1 \mu M$ sind. Bei diesem Substanzpaar bewirkte die Substitution des Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom eine Wirkungsverbesserung um den Faktor 40. Bei Glibenclamid (IC_{50} : 95 nM) und der wirksamsten Substanz S 94 1638 (IC_{50} : 8,8 nM) findet „nur“ eine Verbesserung um den Faktor 10 statt. Zudem wirken diese Thioderivate (HMR 1098 und S 94 1638) im Gegensatz zu den zugrundeliegenden Oxoverbindungen besser auf das ischämische Aktionspotential als auf den Koronarfluss.

Befindet sich die Sulfonylthioharnstoffgruppe in meta-Position zur Benzamidfunktion, wie dies bei HMR 1098, HMR 1372 und HMR 1402 der Fall ist, haben die Substanzen eine gute Wirksamkeit auf die sarkolemmalen und eine sehr geringe auf die vaskulären K_{ATP} -Kanäle.

Die Rigidisierung des Moleküls durch einen Chromanring wie bei S 95 1957 scheint ebenfalls positiv zu wirken. Die Wirksamkeit auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal ist sehr stark verbessert. Allerdings ist die „Ausgangsverbindung“ S 92 0707 diesbezüglich auch die schlechteste der getesteten Substanzen. Eine Überprüfung des Ergebnisses mit einem anderen Chromanderivat, am besten abgeleitet von HMR 1098, wäre erforderlich, um den Einfluss dieser Strukturvariation experimentell abzusichern.

Bei einem geeigneten Antiarrhythmikum sollte der IC_{50} -Wert für die Blockade sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle möglichst niedrig sein. Andererseits ist eine möglichst geringe Wirkung auf vaskuläre Kanäle anzustreben. HMR 1402 ist am effektivsten, HMR 1098 ist schwächer wirksam und HMR 1372 hat einen IC_{50} -Wert von knapp $1 \mu M$. Bei der Beurteilung der Substanzen ist neben einer guten Wirksamkeit auch eine selektive Wirkung auf K_{ATP} -Kanäle im Myokard wichtig. Die Suche nach einer Substanz, die Selektivität mit einer besseren Wirksamkeit auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal vereint, sollte fortgeführt werden, um die Effektivität bei der Verhinderung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung weiter zu verbessern.

Glibenclamid

Glibenclamid inhibiert rekombinante kardiale K_{ATP} -Kanäle (Untereinheiten Kir 6.2 und SUR 2A) mit einem IC_{50} -Wert von 27 nM. 100 μ M MgADP verringern diese Hemmung deutlich (Gribble et al. 1998). Eine andere Arbeitsgruppe gibt mit 26 nM beinahe den identischen Wert an (Russ et al. 2001a; Russ et al. 2001b). 50 nM Glibenclamid heben in Versuchen mit isolierten Meerschweinchenherzzellen die durch eine geringe intrazelluläre ATP-Konzentration von 1 μ M hervorgerufene Aktionspotentialverkürzung vollständig auf (Fosset et al. 1988).

In Meerschweinchenpapillarmuskeln war die Wirkung von 10 μ M Glibenclamid auf eine hypoxische Aktionspotentialverkürzung nicht vollständig. Allerdings wurde Glibenclamid erst nach Beginn der Hypoxie und maximaler Aktionspotentialverkürzung appliziert (MacKenzie et al. 1993). Die Verkürzung durch den Öffner Rilimakalim kann jedoch durch eine Konzentration zwischen 20 nM und 200 nM halbmaximal gehemmt werden (Englert et al. 2001).

3 μ M Glibenclamid verhindern in isolierten Meerschweinchenherzen mit ähnlichem Versuchsprotokoll die ischämische Verkürzung der Refraktärzeit (Tweedie et al. 1993) und können die Inzidenz von Kammerflimmern signifikant senken (Gwilt et al. 1992). Auch in isolierten Rattenherzen verhindert Glibenclamid ab einer Konzentration von 1 μ M das Auftreten von irreversiblen Kammerflimmern während globaler Ischämie vollständig (Kantor et al. 1990). Andere Konzentrationen wurden leider nicht publiziert, so dass über eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung keinerlei Aussagen getroffen werden können.

In den vorgestellten Versuchen sind für eine vollständige Hemmung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung 1 μ M Glibenclamid notwendig, eine halbmaximale Inhibition wird durch 95 nM erreicht.

Meglitinid

In klonierten K_{ATP} -Kanälen in Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* inhibiert Meglitinid den Strom durch sarkolemmale Kanäle aus den Untereinheiten Maus-Kir 6.2/Ratten-SUR 2A mit einem IC_{50} -Wert von 480 nM (Gribble et al. 1998). Der IC_{50} -Wert für die Inhibition korreliert sehr gut mit dem Wert für die Inhibition der ischämischen Aktionspotentialverkürzung (400 nM).

S 92 0707

Die für halbmaximale Hemmung von sarkolemmalen Rilmakalim-geöffneten Kanälen des Meerschweinchenpapillarmuskels benötigte Konzentration liegt zwischen 2 und 20 μM (Englert et al. 2001). Der IC_{50} -Wert für die Inhibition der ischämischen Aktionspotentialverkürzung im isolierten Herzen liegt bei circa 20 μM , die Substanz wirkt hier demnach etwas schwächer.

HMR 1098

In Patch-clamp-Experimenten wurden für die Hemmung rekombinanter kardialer K_{ATP} -Kanäle (Untereinheiten Kir 6.2 und SUR 2A) durch HMR 1098 IC_{50} -Werte von 380 nM und 2,1 μM gefunden (Russ et al. 2001a; Russ et al. 2001b; Manning Fox et al. 2002). In isolierten Ratten-Herzmuskelzellen (ebenfalls Patch-clamp-Experimente) inhibiert HMR 1098 die K_{ATP} -Kanäle mit einem IC_{50} -Wert von 880 nM (Manning Fox et al. 2002). Diese Werte liegen in einer vergleichbaren Größenordnung wie die im isolierten Herzen gemessenen Werte für die Inhibition der ischämischen Aktionspotentialverkürzung.

In isolierten Meerschweinchen-Herzzellen, deren Aktionspotential durch Rilmakalim verkürzt wurde, betragen die IC_{50} -Werte 400 nM und 3 μM bei extrazellulären pH-Werten von 6,5 und 7,4 (Gögelein et al. 1998). Der pH-Wert von 6,5 wurde zur Simulation von hypoxisch bedingter Azidose gewählt. Auch in Papillarmuskeln von Meerschweinchen kann diese pH-Abhängigkeit der IC_{50} -Werte gezeigt werden: 0,6 μM bei pH 6,0 und 1,8 μM bei pH 7,4 (Gögelein et al. 1998). Wird das Aktionspotential nicht durch Rilmakalim, sondern durch Hypoxie verkürzt, ist die halbmaximale Wirkung bei etwas weniger als 2 μM erreicht (pH: 6,5). Um die Effektivität eines K_{ATP} -Blockers realistisch beurteilen zu können, muss demnach der pH-Wert am Wirkort den physiologischen bzw. pathophysiologischen Gegebenheiten entsprechen.

In isolierten Meerschweinchenherzen wurde in einem Ischämiemodell, das bis auf die Stimulation mit 4 Hz identisch mit dem in dieser Arbeit durchgeführten ist, durch 3 μM HMR 1098 eine vollständige Aufhebung der ischämischen Aktionspotentialverkürzung erreicht (Gögelein et al. 2000). Auch in den vorgestellten Versuchen wird mit 3 μM eine maximale Wirkung beobachtet.

Die Wirkung von HMR 1098 auf die Häufigkeit von Arrhythmien wurde in verschiedenen Modellen erfolgreich getestet. Regionale Ischämie in isolierten Kaninchenherzen führt zu inhomogener Aktionspotentialdauer und Kammerflimmern. 3 μM HMR 1098 verringern diese Inhomogenität und wirken antiarrhythmisch (Dhein et al. 2000). In Ratten, Schweinen und

Hunden verringert HMR 1098 die Inzidenz von Kammerflimmern und plötzlichem Herztod bei Ischämieversuchen (Wirth et al. 1999a; Wirth et al. 1999b; Billman et al. 1998). In den Versuchen mit wachen Hunden, die einen zweiten Infarkt erlitten, während sie auf einem Laufband laufen (Billman et al. 1998), wurde das hierdurch entstehende Kammerflimmern durch Vorbehandlung mit HMR 1098 verhindert, wobei ein EC_{50} -Wert von etwa 3 mg/l abgeschätzt werden konnte (Aventis, interner Bericht). Dieser Wert liegt höher als der hier erhaltene Wert für halbmaximale Inhibition der $MAPD_{90}$ -Verkürzung von 0,55 μ mol/l (Abbildung III.15 C und Tabelle IV.1 im Kapitel IV.B.4). Der Unterschied könnte in der Bindung von HMR 1098 an Plasmaeiweiße liegen, die bei *in-vivo*-Versuchen zu berücksichtigen ist.

S 95 1957

Mit 200 nM S 95 1957 wird der Rilmakalim-aktivierte sarkolemmale Kanal des Papillarmuskels vollständig, mit 20 nM bereits deutlich gehemmt (Englert et al. 2001). Letztere Daten stimmen gut mit der Wirkung auf die ischämische Aktionspotentialdauer im isolierten Herzen überein.

HMR 1402

Am Meerschweinchen-Papillarmuskel inhibiert HMR 1402 die Wirkung des Öffners Rilmakalim effektiver als HMR 1098, was in Übereinstimmung mit den Versuchen am isolierten Herzen steht (Englert et al. 2001).

HMR 1402 ist nach diesen Ergebnissen dem bereits besser charakterisierten HMR 1098 überlegen. Die Substanz weist im Menschen aber nur eine Halbwertszeit von 30 min auf.

Repaglinid

Klonierte sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle werden von Repaglinid halbmaximal mit 9 nM blockiert. Die Anwesenheit von MgADP beeinflusst die Inhibition nicht (Dabrowski et al. 2001). In Rattenkardiomyozyten wird der K_{ATP} -Kanal durch 10 nM Repaglinid zu 66% inhibiert (Hu et al. 1999a). Der IC_{50} -Wert für die Blockade der ischämischen Aktionspotentialverkürzung in isolierten Meerschweinchenherzen liegt etwas höher bei 74 nM (Tabelle IV.1 im Kapitel IV.B.4). Repaglinid ist bezüglich der Blockade sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle in einer vergleichbaren Konzentration so wirksam wie der Sulfonylharnstoff Glibenclamid.

IV.B.4 Zusammenfassung der Substanzwirkungen

Vergleich der Wirksamkeiten

Für einen besseren Gesamtüberblick sind in der folgenden Tabelle alle Werte für die halbmaximale Inhibition in den drei beschriebenen Modellen des isoliert-perfundierten Herzens einander gegenübergestellt.

Tabelle IV.1: Halbmaximale Konzentration für die inhibitorische Wirkung aller getesteten Substanzen in den drei verwendeten Versuchsmodellen, geordnet nach der besten Wirkung auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung

Substanz	normoxischer Koronarfluss	hypoxischer Koronarfluss	ischämische MAPD ₉₀ -Verkürzung
S 94 1638	20 nM	130 nM	8,8 nM
S 95 1957	100 nM	~1 µM	62 nM
Repaglinid	46 nM	~200 nM	74 nM
Glibenclamid	18 nM	25 nM	95 nM
HMR 1402	> 100 µM	~9 µM	110 nM
Meglitinid	620 nM	600 nM	400 nM
HMR 1098	> 100 µM	>100 µM	550 nM
S 0000 405	590 nM	~3 µM	710 nM
HMR 1372	> 30 µM	> 30 µM	970 nM
S 92 0707	~1 µM	~5 µM	~20 µM

Substanzen

Gesucht wurde eine Substanz, die effektiv die sarkolemmalen K_{ATP}-Kanäle des Herzens blockiert, die aber eine möglichst geringe vasokonstriktorische Wirkung bei Normoxie und Hypoxie hat.

S 92 0707 und Glibenclamid wirkten stärker auf die glatte Gefäßmuskulatur als auf das Myokard. Eine in etwa gleiche Wirkung auf Gefäß- und Herzmuskelzellen zeigten Repaglinid, S 95 1957, Meglitinid und S 0000 405. Diese Substanzen sind daher für einen therapeutischen Einsatz gegen den plötzlichen Herztod bei Ischämie weniger geeignet.

S 94 1638, das Thioderivat des Glibenclamids, war bezüglich der Wirkung auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung die effektivste der getesteten Substanzen. Der IC₅₀-Wert für die normoxische Koronarflussverringerng war aber nur doppelt so hoch wie derjenige für die

gewünschte Wirkung. Diese geringe Selektivität reichte nicht aus, da bei einer wirksamen Dosis von 300 nM auch der Koronarfluss nahezu maximal gesenkt wurde.

HMR 1402 zeigte eine gute Wirksamkeit auf das MAP nach 5 min Ischämie. Mit 1 μ M HMR 1402 konnte eine ischämische Aktionspotentialverkürzung ohne Beeinflussung des hypoxischen Koronarflusses erreicht werden. Letzterer wurde erst bei zehnfach höherer Dosierung merklich beeinflusst, der normoxische Koronarfluss reagierte nur geringfügig.

HMR 1098 ist von getesteten Substanzen am besten für den therapeutischen Einsatz als Antiarrhythmikum geeignet. Die Effektivität in der Ischämie ist zwar geringer als bei HMR 1402, aber dafür können Wirkungen auf den Koronarfluss mit noch größerer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Strukturvariationen

Als positiv hat sich die Einführung eines Schwefels zum Sulfonylthioharnstoff herausgestellt, wie bei der Abwandlung von Glibenclamid zu S 94 1638 und bei S 92 0707 zu HMR 1098. Die Wirkung auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal wurde verbessert, die auf die Gefäßmuskulatur blieb unbeeinflusst oder wurde sogar stark abgeschwächt. Die Selektivität war insbesondere besser, wenn der Sulfonylthioharnstoff sich in meta- statt in para-Position zur Benzamidstruktur befand, als Beispiele dienen HMR 1098, HMR 1372 und HMR 1402.

Die Rigidisierung der beiden Molekülhälften durch einen Chromanring wie bei S 92 0707 zu S 95 1957 hatte eine sehr deutliche Verbesserung der Wirkung auf das ischämische Aktionspotential zur Folge. Die Wirkungen auf den Koronarfluss wurden dagegen nur wenig verstärkt.

Des Weiteren resultierte die Substitution der Methoxygruppe von HMR 1098 durch einen Methoxyethoxyrest in HMR 1402 in einer Verbesserung der Wirkung auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal. Der Koronarfluss wurde dadurch jedoch ebenfalls beeinflusst, so dass diese Variation nicht eindeutig positiv war.

IV.C Öffner des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals

Aus publizierten Versuchen von verschiedenen Laboratorien ist bekannt, dass bei der kardioprotektiven Wirkung der ischämischen Präkonditionierung die Aktivierung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen eine bedeutende Rolle spielt (Gross, Fryer 1999; Downey, Cohen 2000; Sato, Marban 2000; Yellon, Baxter 2000; Schulz et al. 2001; Oldenburg et al. 2002). Diese kardioprotektive Wirkung kann auch durch Aktivierung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen hervorgerufen werden. In der Literatur wurde hierzu hauptsächlich Diazoxid verwendet (Liu et al. 1998; Iwai et al. 2000; Pain et al. 2000; Wang et al. 2001b). Diese Substanz beeinflusst jedoch noch andere K_{ATP} -Kanäle, wie die des endokrinen Pankreas und der glatten Muskelzellen. In dieser Arbeit wurde der Koronarfluss des Langendorff-perfundierten Rattenherzens benutzt, um die Wirkungen der untersuchten Substanzen auf den K_{ATP} -Kanal in glatten Muskelzellen zu untersuchen.

IV.C.1 Substanzwirkungen auf den Koronarfluss

Diazoxid

Die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellen und dadurch die Reduktion der Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. 10 μ M Diazoxid steigerten den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen um 55%, 30 μ M sogar um 70% (Iwai et al. 2000). In isolierten Kaninchenherzen bewirkten 100 μ M Diazoxid eine signifikante Koronarflusssteigerung auf 160% des Kontrollwertes (Wang et al. 2001b). Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen steigerten 30 μ M Diazoxid den Koronarfluss auf mehr als das Doppelte. Dies zeigt, dass die hier gefundene Steigerung des Koronarflusses mit den Literaturwerten vergleichbar ist.

S1526

Aufgrund der von Diazoxid bekannten Wirkung auf den Koronarfluss wurde dieser auch mit der Substanz S1526 untersucht. Wie im Kapitel III.C.4 gezeigt wurde, bewirkt 1 μ M S1526 eine leichte Verringerung des Koronarflusses, der jedoch durch das vorhandene Lösungsmittel DMSO erklärt werden kann. Nach Gabe von 30 μ M S1526 wurde eine moderate Steigerung des Koronarflusses beobachtet, die auf eine Blockade von K_{ATP} -Kanälen in der glatten Muskulatur der Koronargefäße (Untereinheiten Kir 6.1 und SUR2B) zurückzuführen ist. S1526 hat demnach einen deutlich geringeren Einfluss auf die glatte Gefäßmuskulatur als Diazoxid.

IV.C.2 Substanzwirkungen auf die Infarktgröße

Diazoxid

Die Öffnung von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen soll ebenso wie ischämische Präkonditionierung eine Aufrechterhaltung des Volumens der Mitochondrienmatrix bewirken, so dass die Struktur zwischen innerer und äußerer Membran bei einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion intakt bleibt. In vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass 10 μ M bzw. 100 μ M Diazoxid die Infarktgröße nach regionaler Ischämie in isolierten Kaninchenherzen verringern (Pain et al. 2000; Wang et al. 2001b). Zusätzlich erfolgte eine Verbesserung der Herzfunktion mit 100 μ M Diazoxid (Wang et al. 2001b). 100 μ M Diazoxid verringerten in isolierten Rattenherzen den Anstieg des diastolischen Drucks und somit die Entwicklung einer ischämischen Kontraktur (Dos Santos et al. 2002). Mit 30 bis 100 μ M Diazoxid konnte in Ratten die Herzfunktion verbessert werden (Iwai et al. 2000; Forbes et al. 2001). Die Freisetzung von Kreatinkinase wurde verringert, der intrazelluläre pH-Wert dem physiologischen Wert wieder angenähert und die Kreatinphosphatkonzentration nach der Ischämie erhöht. Damit konnten sowohl die Normalisierung des durch Hypoxie gesenkten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (30 μ M Diazoxid), als auch die Erhöhung der Produktion von freien Radikalen in Rattenmyozyten (50 μ M Diazoxid) korreliert werden (Iwai et al. 2000; Forbes et al. 2001). In den hier durchgeführten Versuchen bewirkten 30 μ M Diazoxid eine signifikante Infarktgrößenverringern nach 40 min Globalischämie in Rattenherzen. In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte somit bestätigt werden, dass Diazoxid die Wirkung von IPC nachahmt. Aufgrund der vasodilatierenden Wirkung kann jedoch eine verbesserte Perfusion des Gewebes als Ursache für die protektive Wirkung nicht ausgeschlossen werden.

S1526

Die Wirkung von S1526 auf mitochondriale K_{ATP} -Kanäle wurde in verschiedenen Ischämie modellen untersucht. 50 μ M S1526 verhindern in isolierten Rattenherzen eine ischämische Kontraktur und verringern die Freisetzung von Laktatdehydrogenase, Kreatinkinase und Laktat (Laclau, unveröffentlichte Daten). Die eigenen Daten belegen eine signifikante Senkung der Infarktgröße durch 30 μ M S1526. Diese Ergebnisse zeigen, dass S1526 eine potente kardioprotektive Wirkung bei einer Konzentration entfaltet, die noch keine Wirkung auf den Koronarfluss zeigt.

Der wichtigste Hinweis auf den Wirkmechanismus von S1526 folgt aus den Kombinationsversuchen mit 5-HD und HMR 1098. Es existiert eine Vielzahl von Publikationen,

die berichten, dass 5-HD einen Inhibitor von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen darstellt. Aussagekräftige Versuche hierzu wurden an rekonstituierten mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen durchgeführt. Es wurde gefunden, dass 5-HD die Wirkung von 10 μ M Diazoxid mit einem $K_{1/2}$ -Wert von 45 μ M antagonisiert (Jaburek et al. 1998). Dieses Ergebnis macht die Annahme sehr wahrscheinlich, dass 5-HD eine direkte blockierende Wirkung auf mitochondriale K_{ATP} -Kanäle ausübt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass 500 μ M 5-HD bei regionaler Ischämie in isolierten Rattenherzen die Protektion durch ischämische Prädonditionierung blockieren (Munch-Ellingsen et al. 2000, Schultz et al. 1997; Fryer et al. 2001). In den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen mit globaler Ischämie konnte bestätigt werden, dass 500 μ M 5-HD die Infarktgröße allein nicht beeinflussten, aber die Reduktion der Infarktgröße durch IPC und durch den K_{ATP} -Öffner S1526 verhinderten.

Diese vollständige Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung von S1526 durch 5-HD ist somit ein starker Hinweis, dass S1526 einen Öffner des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals darstellt.

Als weiterer K_{ATP} -Blocker in Kombination mit S1526 wurde HMR 1098 verwendet. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die protektive Wirkung von ischämischer Prädonditionierung auf die Infarktgröße von Ratten und Kaninchen durch HMR 1098 nicht inhibiert wird (Fryer et al. 2000; Linz et al. 1998; Jung et al. 2000). Die Erhöhung der mitochondrialen ATP-Synthese in Ratten (*in vivo*) und die verbesserte Struktur der Mitochondrien von Kaninchen (*in vitro*) nach Prädonditionierung wird ebenfalls nicht beeinflusst (Fryer et al. 2000; Sato et al. 2000). HMR 1098 interagiert auch nicht mit der Verringerung der ischämischen Zellschädigung in humanen Vorhoftrabekeln nach Prädonditionierung (Ghosh et al. 2000). Auf Grund der Abwesenheit von Wirkungen auf pankreatische und vaskuläre K_{ATP} -Kanäle wird HMR 1098 daher als selektiv sarkolemmaler K_{ATP} -Antagonist betrachtet (Gross, Fryer 1999; Sato, Marbán 2000; O'Rourke 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HMR 1098 in Kombination mit S1526 die Infarktgrößenverringern nicht inhibiert.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle an der kardioprotektiven Wirkung von S1526 nicht beteiligt sind. Die Annahme, dass S1526 durch Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle kardioprotektiv wirkt, wird damit bestätigt.

IV.D Bedeutung für die therapeutische Anwendung

IV.D.1 Inhibitoren von sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen als antiarrhythmische Substanzen

Es wurde in zahlreichen Tiermodellen gezeigt, dass kardiale Ischämie zur Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in der sarkoplasmatischen Membran von Herzmuskelzellen führt, wodurch eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer in einem regionalen Gebiet hervorgerufen wird (Gögelein 2001). Hierdurch wird das Auftreten von kreisenden elektrischen Erregungen gefördert, was zum Kammerflimmern und plötzlichem Herztod führen kann. In einem Hundemodell zum plötzlichen Herztod konnte gezeigt werden, dass die Blockade von sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen durch den Sulfonylharnstoff Glibenclamid und den Thiosulfonylharnstoff HMR 1098 die Tiere vor Kammerflimmern sehr effizient schützt (Billman 1994; Billman et al. 1998). Dieses Wirkprinzip hat den großen Vorteil, dass unter normalen Bedingungen keine Beeinflussung der Herzfunktion und der QT_c -Zeit auftritt, da die sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle unter normoxischen Bedingungen vollständig geschlossen sind. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil gegenüber den Klasse-III-antiarrhythmischen Substanzen dar, die als Nebenwirkung Arrhythmien von Typ Torsade de Pointes hervorrufen können.

Es bestanden jedoch Bedenken gegen den Einsatz von Sulfonylharnstoffen bei herzinsuffizienten Patienten. Die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität von Diabetes-II-Patienten mit Sulfonylharnstofftherapie wurde daher in der UKPDS-Studie untersucht (United Kingdom Prospective Diabetes Study Group 1998). In dieser großen Studie konnten keine unerwünschten kardiovaskulären Ereignisse aufgrund der eingesetzten Therapie beobachtet werden, was Bedenken bezüglich der Sicherheit der Therapie mit Sulfonylharnstoffen entkräften konnte. Möglicherweise wird die vaskuläre Wirkung von Glibenclamid durch die protektive antiarrhythmische Wirkung antagonisiert (Engler, Yellon 1996; Brady, Terzic 1998; Betteridge, Close 2000).

Veränderungen der ATP-sensitiven Kaliumkanäle durch Erkrankungen wurden sowohl bei diabetischen als auch bei herzinsuffizienten Patienten gezeigt. In den Plazenten von Typ-I-Diabetikerinnen konnte eine verringerte vasodilatierende Aktivität von K_{ATP} -Kanälen gezeigt werden, was auf eine bestehende endotheliale Dysfunktion des fötalen Gefäßbettes hinweist (Bisseling et al. 2002). Zellen des rechten Vorhofs von Patienten mit Herzinsuffizienz enthalten ATP-sensitive Kaliumkanäle, die weniger empfindlich für die Blockade durch ATP sind. Die IC_{50} -Werte für die Inhibition durch ATP betragen $131 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $26 \mu\text{M}$ in

gesunden Herzzellen. Die Aktionspotentiale werden daher durch metabolische Blockade signifikant stärker verkürzt, obwohl unter Kontrollbedingungen die Aktionspotentiale sogar signifikant länger sind. Die Blockade durch Glibenclamid ist jedoch nicht beeinträchtigt (Koumi et al. 1997). Solche pathophysiologischen Veränderungen der Kanäle können möglicherweise die Effektivität von K_{ATP} -Blockern verändern, so dass Experimente in jungen und gesunden Versuchstieren nicht nur aufgrund von Speziesunterschieden lediglich eine vorläufige Einschätzung über die therapeutische Effektivität liefern können.

Die neue Entwicklungssubstanz HMR 1098 ist bisher noch nicht zur Marktreife weiterentwickelt worden. Somit besteht weiterhin ein großer Bedarf an neuen Substanzen, die selektiv den kardialen sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal blockieren. Für die Entwicklung von neuen Substanzen ist ein Modell wichtig, das es erlaubt, deren Wirkung unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen und eine Aussage über die Wirkstärke ermöglicht. Das in dieser Arbeit entwickelte Modell ist in der Lage, durch Messung und Aufzeichnung der monophasischen Aktionspotentiale im isoliert-perfundierten Meerschweinchenherzen die Wirkstärke neuer Substanzen auf sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle unter ischämischen Bedingungen zu erfassen. Die Methode hat sich in der pharmakologischen Entwicklung neuartiger Antiarrhythmika bereits bewährt.

IV.D.2 Aktivatoren von mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen bei koronaren Herzerkrankungen

Der endogene Schutzmechanismus der ischämischen Präkonditionierung kann durch Aktivatoren des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals in Herzmuskelzellen nachgeahmt werden. Solche Substanzen eignen sich möglicherweise als neuartiges Prinzip für die Protektion von Herzen bei koronaren Herzerkrankungen. Die Wirkung der ischämischen Präkonditionierung wurde auch bei Menschen gezeigt. So verringert Präkonditionierung *in vitro* die ischämische Zellschädigung in humanen Vorhoftrabekeln, 10 μ M Glibenclamid hemmen diese Protektion (Ghosh et al. 2000). Auch bei Angina pectoris, perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PCTA), Bypassoperationen (CABG) und Herztransplantation konnte Protektion durch IPC gezeigt werden (Airaksinen, Huikuri 1997; Dana, Yellon 1998; Ghosh et al. 2000; Yellon, Dana 2000; Yellon, Baxter 2000).

Eine gezielte Entwicklung von Aktivatoren der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle ist derzeit schwierig, da das Gen dieses Ionenkanals noch nicht identifiziert wurde und daher keine einfachen zellulären Testsysteme zur Verfügung stehen. Die hier erstmals vorgestellte Substanz S1526 kann jedoch als Werkzeug dienen, das Wirkprinzip in Tiermodellen zu evaluieren und einer zukünftigen Entwicklung von Aktivatoren des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals den Weg zu bereiten.

V Zusammenfassung

Im Herzen kommen ATP-sensitive Kalium-Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) in drei verschiedenen Strukturen vor:

In der sarkolemmlen Zellmembran der Myozyten (sarkolemmaler K_{ATP} -Kanal, gebildet aus Kir 6.2-Untereinheiten und SUR 2A) wird der Kanal unter Ischämie aktiviert, woraufhin die Erhöhung der K^+ -Permeabilität zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer führt.

In den glatten Muskelzellen der Koronargefäße (vaskulärer K_{ATP} -Kanal, gebildet aus Kir 6.2-Untereinheiten und SUR 2B) bewirkt die Aktivierung unter Hypoxie eine Vasodilatation und somit eine Erhöhung der Koronardurchblutung.

In der inneren Mitochondrienmembran von Herzmuskelzellen (mitochondrialer K_{ATP} -Kanal, Struktur noch nicht bekannt) verursacht die Aktivierung unter ischämischen Bedingungen eine Präkonditionierung des Herzens, möglicherweise durch Volumenregulation der mitochondrialen Matrix.

Charakterisierung von Inhibitoren des sarkolemmlen K_{ATP} -Kanals

Die Aktivierung von sarkolemmlen K_{ATP} -Kanälen unter Ischämie führt zu einer Heterogenität der Aktionspotentialdauer zwischen normoxischen und ischämischen Gebieten, wodurch kreisende elektrische Erregungen und somit Kammerflimmern entstehen können. Daher stellen Inhibitoren des sarkolemmlen K_{ATP} -Kanals ein neues therapeutisches Prinzip gegen den plötzlichen Herztod dar.

Diese Inhibitoren sollen möglichst selektiv sein und weder den pankreatischen K_{ATP} -Kanal beeinflussen noch die oben beschriebenen K_{ATP} -Kanäle in glatten Gefäßmuskelzellen und in Mitochondrien.

In dieser Arbeit wurde das Modell des isolierten, perfundierten Herzens nach Langendorff so optimiert, dass Inhibitoren des sarkolemmlen K_{ATP} -Kanals unter ischämischen Bedingungen untersucht werden konnten. Hierzu wurden durch eine Verminderung des Koronarflusses und des Sauerstoffs ischämische Bedingungen geschaffen, die zur Verkürzung der Dauer des monophasischen Aktionspotentials (MAPD) führten. In Gegenwart von Inhibitoren des sarkolemmlen K_{ATP} -Kanals war diese MAPD-Verkürzung reduziert.

Außerdem wurde der Koronarfluss in separaten Experimenten durch Hypoxie erhöht. Es wurde untersucht, ob die Inhibitoren des sarkolemmlen K_{ATP} -Kanals als Nebenwirkung den Koronarfluss beeinträchtigen.

Ausgehend vom bereits therapeutisch eingesetzten Antidiabetikum Glibenclamid wurden verschiedene Strukturvarianten untersucht, um eine Selektivität für sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle des Myokards zu finden. Die wichtigsten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind folgende:

- ?? Der Sulfonylharnstoff Glibenclamid sowie die Benzoessäurederivate Meglitinid und Repaglinid sind unselektive Hemmstoffe der sarkolemmalen und vaskulären K_{ATP} -Kanäle.
- ?? Eine Schwefelsubstitution im Sulfonylharnstoff zum Sulfonylthioharnstoff (S 94 1638 und HMR 1098) bewirkt eine Verstärkung der Aktivität auf den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal sowie eine Verringerung der Effektivität auf den Koronarfluss.
- ?? Die meta- statt para-Positionierung der Sulfonylthioharnstoffgruppe führt ohne Beeinflussung des Gefäßtonus zu einer weiteren Verbesserung des Wirkprofils mit einer guten Wirksamkeit auf die ischämische Aktionspotentialverkürzung (HMR 1402 und HMR 1098).
- ?? Substitution der Benzamidfunktion von HMR 1402 durch eine Zimtsäuregruppe (S 0000 405) bewirkt eine zur Verringerung der Selektivität. Dies zeigt, dass neben der Sulfonylthioharnstoffgruppe auch die Benzamidfunktion die selektive Wirkung auf sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle im Herzen beeinflusst.

Untersuchung von Aktivatoren des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals

Öffner des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals können den endogenen Schutzmechanismus der ischämischen Präkonditionierung nachahmen.

Um den neuen mitochondrialen K_{ATP} -Öffner S1526 zu untersuchen, wurde an isolierten, perfundierten Rattenherzen eine Globalischämie mit Reperfusion durchgeführt und die Infarktgröße bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Vorbehandlung mit S1526 zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt. Diese Protektion wurde durch den mitochondrialen K_{ATP} -Kanalblocker Natrium-5-hydroxydecanoat, nicht aber durch den selektiven sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal-Blocker HMR 1098 aufgehoben. S1526 hat gegenüber Diazoxid, einem bekannten Öffner des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals, den Vorteil einer nur geringfügigen Beeinflussung vaskulärer K_{ATP} -Kanäle. Daher könnte S1526 als Ausgangspunkt für eine Entwicklung von Arzneistoffen, die eine Verringerung von Ischämieschäden im Herzen bewirken, betrachtet werden.

VI Literaturverzeichnis

- Abbink, E.J., Wollersheim, H., Netten, P.M., Russel, F.G.M., Lutterman, J.A., Smits, P. (2002), Microcirculatory effects of K_{ATP} channel blockade by sulphonylurea derivatives in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **32** (3) : 163-171
- Ackerman, M.J., Clapham, D.E. (1997), Ion channels-basic science and clinical disease, *N. Engl. J. Med.* **336**:1575-1586
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement IV, J.P., Boyd III, A.E., Gonzales, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., Nelson, D.A. (1995), Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor : a regulator of insulin secretion. *Science* **268** : 423-426
- Aguilar-Bryan, L., Clement IV, J.P., Gonzales, G., Kunjilwar, K., Babenko, A., Bryan, J. (1998), Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* **78**: 227-245
- Airaksinen, K., Huikuri, H.V. (1997), Antiarrhythmic effect of repeated coronary occlusion during balloon angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**: 1035-1038
- Allen, D.G., Orchard, C.H. (1986), Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* **60**: 153-168
- Ashcroft, F.M. (2000), Ion channels and disease - channelopathies. Academic Press, San Diego, California, USA
- Ashford, M.L.J., Sturgess, N.C., Trout, N.J., Gardner, N.J., Hales, C.N. (1988), Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. *Pflügers Arch.* **412**: 297-304
- Anumonwo, J.M.B., Freeman, L.C., Kwok, W.M., Kass, R.S. (1991), Potassium channels in the heart: Electrophysiology and pharmacological regulation. *Cardiovasc. Drug. Rev.* **9**:299-316
- Babenko, A.P., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. (1998), A view of SUR/Kir6.x, K_{ATP} channels. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 667-687
- Baines, C.P., Cohen, M.V., Downey, J.M. (1999), Signal transduction in ischemic preconditioning : the role of kinases and mitochondrial K_{ATP} channels. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**: 741-754
- Bakkali-Nadi, A., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1994), Insulinotropic action of meglitinide analogs: Concentration-response relationship and nutrient dependency. *Diabetes Res.* **27**: 81-87

- Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S.J., Ruppersberg, J.P., Fakler, B. (1998), PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**: 1141-1144
- Beckerath, N. von, Cyrus, S., Dischner, A., Daut, J. (1991), Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: an analysis of the underlying mechanisms. *J. Physiol.* **442**: 297-319
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003), Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin
- Betteridge, D.J., Close, L. (2000), Diabetes, coronary heart disease and sulphonylureas – not the final word. *Eur. Heart J.* **21**: 790-792
- Bijlstra, P.J., Den Arend, J.A., Lutterman, J.A., Russel, F.G., Thien, T., Smits, P. (1996), Blockade on vascular ATP-sensitive potassium channels reduces the vasodilator response to ischaemia in humans. *Diabetologia* **39**: 1562-1568
- Billman, G.E. (1994), Role of ATP sensitive potassium channel in extracellular potassium accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischemia. *Cardiovasc. Res.* **28**: 762-769
- Billman, G.E., Englert, H.C., Schölkens, B.A. (1998), HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part II: Effects on susceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 1465-1473
- Bisseling, T.M., Steegers, E.A.P., Wouterse, A.C., Elving, L., Russel, F.G.M., Smits, P. (2002), Baseline function of placental vascular K_{ATP}-channels in healthy and diabetic woman. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **53** : 948P-949P
- Bolli, R. (2001), Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: 1897-1918
- Bosch, R.F., Csillag, S.H., Schneck, A.C., Rüb, N., Gerlach, U., Brendel, J., Mewis, C., Kühlkamp, V. (2001), The chromanol HMR 1556 selectively blocks the slow delayed rectifier potassium channel I_{Ks} in human and guinea pig atrial myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363** (suppl.): R75
- Boyett, M.R., Jewell, B.R. (1980), Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon electrical activity in the heart. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **36**: 1-52
- Brady, P.A., Terzic, A. (1998), The sulphonylurea controversy: more questions from the heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**: 950-956

- Brayden, J.E. (2002), Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin. Experm. Pharmacol. Physiol.* **29**: 312-316
- Bril, A., Laville, M.P., Gout, B. (1992), Effects of glibenclamide on ventricular arrhythmias and cardiac function in ischaemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* **26**: 1069-1076
- Brown, A.M. (1990), Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels, *Am. J. Physiol.* **259**: H1621-H1628
- Brown, I.P., Thompson, C.I., Belloni, F.L. (1993), Role of nitric oxide in hypoxic coronary vasodilatation in isolated perfused guinea pig heart. *Am. J. Physiol.* **264** (*Heart Circ. Physiol.* **33**): H821-H829
- Cacciapuoti, F., Spiezia, R., Bianchi, U., Lama, D., D'Avino, M., Varricchio, M. (1991), Effectiveness of glibenclamide on myocardial ischemic ventricular arrhythmias in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **67**: 843-847
- Cairns, J.A., Connolly, S.J., Roberts, R., Gent, M., for the Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators (1997), Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. *Lancet* **349**: 675-682
- Calderone, V., Martinotti, E. (2000), Potassium channels, K_{ATP} and BK_{Ca} in vascular smooth muscle. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**: 247-253
- Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators (1989), Preliminary report: Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **321**: 406-412
- Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II (Cast II) Investigators (1992), Effect of the antiarrhythmic agent moricizine on survival after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **327**: 227-233
- Carmeliet, E. (1999), Cardiac ionic currents and acute ischemia: From channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.* **79**: 917-1017
- Cave, A.C., Ingwall, J.S., Friedrich, J., Liao, R., Saupe, K.W., Apstein, C.S., Eberli, F.R. (2000), ATP synthesis during low-flow ischemia – Influence of increased glycolytic substrate. *Circulation* **101**: 2090-2096
- Chilian, W.M., Gross, G.J. (1999), Prologue : ischemic preconditioning in cardiac vascular muscle. *Am. J. Physiol.* **277**: H2416-H2417
- Chutkow, W.A., Simon, M.C., Le Beau, M.M., Burant, C.F. (1996), Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* **45**: 1439-1445

- Clement IV, J.P., Kunjilwar, K., Gonzales, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. (1997), Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* **18** (5): 827-838
- Coghlan, M.J., Carroll, W.A., Gopalakrishnan, M. (2001), Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade of progress. *J Med Chem* **44**: 1627-1653
- Connolly, S.J. (1999), Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation* **100**: 2025-2034
- Cook, D.L., Hales, C.N. (1984), Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**: 271-273
- Cyrus, S., Daut, J. (1994), The sensitivity of coronary vascular tone to glibenclamide: a study on the isolated perfused guinea pig heart. *Cardiovasc. Res.* **28**: 888-893
- Dabrowski, M., Wahl, P., Holmes, W.E., Ashcroft, F.M. (2001), Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* **44**: 747-756
- Dana, A., Yellon, D.M. (1998), Angina: Who needs is? Cardioprotection in the preconditioning era. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **12**: 515-528
- Dascal, N. (1997), Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal.* **9**:551-573
- Daut, J., Maier-Rudolph, W., Beckerath, N. von, Mehrke, G., Günther, K., Goedel-Meinen, L. (1990), Hypoxic dilatation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* **247**: 1341-1344
- Daut, J., Klieber, H.G., Cyrus, S., Noack, T. (1994a), K_{ATP} channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc. Res.* **28**: 811-817
- Daut, J., Standen, N.B., Nelson, M.T. (1994b), The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **5**: 154-181
- Davis, T.M.E., Parsons, R.W., Broadhurst, R.J., Hobbs, M.S.T., Jamrozik, K. (1998), Arrhythmias and mortality after myocardial infarction in diabetic patients. *Diabetes Care* **21**: 637-640
- Davis-Taber, R., Choi, W., Feng, J.L., Hoogenboom, L., McNally, T., Kroeger, P., Shieh, C.C., Simmer, R., Brioni, J.D., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M., Scott, V.E.S. (2000), Molecular characterisation of human SUR2-containing K_{ATP} channels. *Gene* **256**: 261-270

- Decking, U.K.M., Reffelmann, T., Schrader, J., Kammermeier, H. (1995), Hypoxia-induced activation of K_{ATP} channels limits energy depletion in the guinea pig heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **38**: H734-H742
- Dendorfer, A., Englert, H., Wirth, K., Tempel, K., Dominiak, P. (2001), HMR 1372, a putative inhibitor of ATP-sensitive K^+ -channels, reduces infarct size by a cholinergic mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363** (suppl.): R74
- Dhein, S., Pejman, P., Krüsemann, K. (2000), Effects of the $I_{K_{ATP}}$ blockers glibenclamide and HMR 1883 on cardiac electrophysiology during ischemia and reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* **398**: 273-284
- Dos Santos, P., Kowaltowski, A.J., Laclau, M.N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J.B., Tariosse, L., Garlid, K.D. (2002), Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**: H284-H295
- Downey, J.M., Cohen, M.V. (2000), Do mitochondrial K_{ATP} channels serve as triggers rather than end-effectors of ischemic preconditioning's protection? *Basic Res. Cardiol.* **95**: 272-274
- Duncker, D.J., Van Zon, N.S., Altman, J.D., Pavek, T.J., Bache, R.J. (1993), Role of K^+ ATP channels in coronary vasodilation during exercise. *Circulation* **88**: 1245-1253
- Dunne, M.J., Petersen, O.H. (1986), Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett.* **208**: 59-62
- Elizari, M.V., Martínez, J.M., Belziti, C., Ciruzzi, M., Pérez de la Hoz, R., Sinisi, A., Carbajales, J., Scapín, O., Garguichevich, J., Girotti, L., Cagide, A., on behalf of the GEMICA study investigators (2000), Morbidity and mortality following early administration of amiodarone in acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **21**: 198-205
- Engler, R.L., Yellon, D.M. (1996), Sulfonylurea K_{ATP} blockade in type II diabetes and preconditioning in cardiovascular disease – Time for reconsideration. *Circulation* **94**: 2297-2301
- Englert, H.C., Gerlach, U., Goegelein, H., Hartung, J., Heitsch, H., Mania, D., Scheidler, S. (2001), Cardioselective K_{ATP} channel blockers derived from a new series of *m*-anisamidoethylbenzenesulfonylthioureas. *J. Med. Chem.* **44**: 1085-1098
- Faivre, J.F., Findlay, I. (1990), Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1029**: 167-172
- Farb, A., Burke, A.P., Kolodgie, F.D., Virmani, R. (2001), New insights in the pathology of sudden coronary death. *Card. Electrophysiol. Rev.* **5**: 373-378

- Farouque, H.M.O., Worthley, S.G., Meredith, I.T., Skyrme-Jones, R.A.P., Zhang, M.J. (2002), Effect of ATP-sensitive potassium channel inhibition on resting coronary vascular responses in humans. *Circ. Res.* **90**: 231-236
- Ficker, E., Taglialatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M., Brown, A.M. (1994), Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**: 1068-1072
- Findlay, I. (1988), Effects of ADP upon the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular myocytes. *J. Membr. Biol.* **101**: 83-92
- Fishbein, M.C., Meerbaum, S., Rit, J., Lando, U., Kanmatsuse, K., Mercier, J.C., Cordier, E., Ganz, W. (1981), Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am. Heart J.* **101**: 593-600
- Forbes, R.A., Steenbergen, C., Murphy, E. (2001), Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ. Res.* **88**: 802-809
- Fosset, M., De Weille, J.R., Green, R.D., Schmid-Antomarchi, H., Lazdunski, M. (1988), Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **263**: 7933-7936
- Franz, M.R. (1999), Current status of monophasic action potential recordings: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc. Res.*, **41**: 25-40
- Fryer, R.M., Eells, J.T., Hsu, A.K., Henry, M.M., Gross, G.J. (2000), Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K_{ATP} channel in preservation of mitochondrial function. *Am. J. Physiol.* **278** (*Heart Circ. Physiol.* **47**): H305-H312
- Fryer, R.M., Hsu, A.K., Gross, G.J. (2001), Mitochondrial K_{ATP} channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditioned rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**: 831-834
- Fujita, A., Kurachi, Y. (2000), Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Ther* **85**: 39-53
- Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A., Grover, G.J. (1997), Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels – Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* **81**: 1072-1082
- Garlid, K.D. (2000), Opening mitochondrial K_{ATP} in the heart – what happens, and what does not happen. *Basic Res. Cardiol.* **95**: 275-279
- Gerlach, U. (2001), I_{Ks} channel blockers: potential antiarrhythmic agents. *Drugs of the Future* **26** (5): 473-484

- Gögelein, H., Hartung, J., Englert, H.C., Schölkens, B.A. (1998), HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part I: Effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic β -cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 1453-1464
- Gögelein, H., Hartung, J., Englert, H.C. (1999), Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac K_{ATP} channels. *Cell Physiol Biochem* **9**: 227-241
- Gögelein, H., Englert, H.C., Kotzan, A., Hack, R., Lehr, K.H., Seiz, W., Becker, R.H., Sultan, E., Schölkens, B.A., Busch, A.E. (2000), HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc. Drug Rev.* **18**: 157-174
- Gögelein, H. (2001), Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2**(1): 72-80
- Gögelein, H., Ruetten, H., Albus, U., Englert, H.C., Busch, A.E. (2001), Effects of the cardioselective K_{ATP} channel blocker HMR 1098 on cardiac function in isolated perfused working rat hearts and in anesthetized rats during ischemia and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 33-41
- Gosh, S., Standen, N.B., Galinanes, M. (2000), Evidence for mitochondrial K_{ATP} channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **45**: 934-940
- Gregg, D.E. (1963), Effect of coronary perfusion pressure or coronary flow on oxygen usage of the myocardium. *Circ. Res.* **13**: 497-500
- Gribble, F.M., Tucker, S.T., Seino, S., Ashcroft, F.M. (1998), Tissue specificity of sulfonylureas – Studies on cloned cardiac and β -cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**: 1412-1418
- Gross, J.G. (2000), The role of mitochondrial K_{ATP} channels in cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **95**: 280-284
- Gross, J.G., Fryer, R.M. (1999), Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.* **84**: 973-979
- Gross, J.G., Fryer, R.M. (2000), Mitochondrial K_{ATP} channels – Triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ. Res.* **87**: 431-433
- Grover, G.J., D'Alonzo, A.J., Garlid, K.D., Bajjar, R., Lodge, N.J., Sleph, P.G., Darbenzio, R.B., Hess, T.A., Smith, M.A., Paucek, P., Atwal, K.S. (2001), Pharmacologic characterization of BMS-191095, a mitochondrial K_{ATP} opener with no peripheral vasodilator or cardiac action potential shortening activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**: 1184-1192
- Grover, G.J., Garlid, K.D. (2000), ATP-sensitive potassium channels: A review of their cardioprotective pharmacology. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**: 677-695

- Gwilt, M., Henderson, C.G., Orme, J., Rourke, J.D. (1992), Effects of drugs on ventricular fibrillation and ischaemic K⁺ loss in a model of ischaemia in perfused guinea-pig hearts in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **220** : 231-236
- Hale, S.L., Kloner, R.A. (1998), Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovasc. Res.* **40**: 502-507
- Hale, S.L., Kloner, R.A. (2002), Elevated body temperature during myocardial ischemia/reperfusion exacerbates necrosis and worsens no-reflow. *Coronary Artery Disease* **13**: 177-181
- Hambrock, A., Russ, U., Piehl, A., Preisig-Müller, R., Hanley, P., Ray, J., Daut, J., Quast, U., Derst, C. (2002), Novel splice variants of sulfonylurea receptor SUR1. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365** (suppl. 1): R62
- Hearse, D.J., Sutherland, F.J. (2000), Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol. Res.* **41** (6): 597-603
- Hjalmarson, A. (1997), Effects of beta blockade on sudden cardiac death during acute myocardial infarction and the postinfarction period. *Am. J. Cardiol.* **80** (9B): 35J-39J
- Hohnloser, S.H. (1997), Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: Types, risks and management. *Am. J. Cardiol.* **80** (8A): 82G-89G
- Holmuhamedov, E.L., Wang, L., Terzic, A. (1999), ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J. Physiol.* **519.2**: 347-360
- Hu, S., Wang, S., Dunning, B.E. (1999a), Tissue selectivity on antidiabetic agent nateglinide: Study on cardiovascular and β -cell K_{ATP} channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**: 1372-1379
- Hu, H., Sato, T., Seharaseyon, J., Liu, Y., Johns, D.C., O'Rourke, B., Marbán, E. (1999b), Pharmacological and histochemical distinctions between molecular defined sarcolemmal K_{ATP} channels and native cardiac mitochondrial K_{ATP} channels. *Mol. Pharmacol.* **55**: 1000-1005
- Imamura, Y., Tomoike, H., Narishige, T., Takahashi, H., Takeshita, A. (1992), Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* **263** (*Heart Circ. Physiol.* **32**): H399-H404
- Inagaki, N., Gono, T., Clement IV, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. (1995), Reconstitution of I_{KATP}: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**: 1166-1170
- Inagaki, N., Gono, T., Clement IV, J.P., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Seino, S. (1996), A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16**: 1011-1017

- Ino, T., Karagueuzian, H.S., Hong, K., Meesmann, M., Mandel, W.J., Peter, T. (1988), Relation of monophasic action potential recorded with contact electrode to underlying transmembrane action potential properties in isolated cardiac tissues: a systematic microelectrode validation study. *Cardiovasc. Res.* **22**: 255-264
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., Higuti, T. (1991), ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**: 244-247
- Isenberg, G., Vereecke, J., van der Heyden, G., Carmeliet, E. (1983) The shortening of the action potential by DNP in guinea pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-independent K conductance. *Pflugers Arch.* **397**: 251-259
- ISIS-1 (First International Study of Infarct Survival) Collaborative Group (1986), Randomised trial of intravenous atenolol among 16027 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet II*: 57-66
- Iwai, T., Tanonaka, K., Koshimizu, M., Takeo, S (2000), Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischemia in the rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 1219-1227
- Jaburek, M., Yarov-Yarovoy, V., Paucek, P., Garlid, K.D. (1998), State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J. Biol. Chem.* **273** (22): 13578-13582
- Jalife, J. (2000), Ventricular fibrillation: Mechanisms of initiation and maintenance. *Annu. Rev. Physiol.* **62**: 25-50
- Janse, M.J., Wit, A.L. (1989), Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol. Rev.* **69**: 1049-1169
- Julian, D.G., Camm, A.J., Frangin, G., Janse, M.J., Munoz, A., Schwartz, P.J., Simon, P., for the European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators (1997), Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. *Lancet* **349**: 667-674
- Jung, O., Englert, H.C., Jung, W., Gögelein, H., Schölkens, B.A., Busch, A.E., Linz, W. (2000), The K_{ATP} channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**: 445-451
- Takei, M., Kelly, R.P., Ashcroft, S.J.H., Ashcroft, F.M. (1986), The ATP-sensitivity of K⁺ channels in rat pancreatic B-cells is modulated by ADP. *FEBS Lett.* **208**: 63-66
- Kamekura, I., Okumura, K., Matsui, H., Murase, K., Mokuno S., Toki, Y., Nakashima, Y., Ito, T. (1999), Mechanisms of hypoxic coronary vasodilatation in isolated perfused rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33**: 836-842

- Kammermeier, H. (1994), Isolated (Langendorff) hearts perfused with aqueous buffer (should) have excess oxygen availability. *Basic Res. Cardiol.* **89**: 545-548
- Kantor, P.F., Coetzee, W.A., Carmeliet, E.E., Dennis, S.C., Opie, L.H. (1990), Reduction of ischemic K⁺ loss and arrhythmias in rat hearts – Effect of glibenclamide, a sulfonylurea. *Circ. Res.* **66**: 478-485
- Keung, E.C., Li, Q. (1991), Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* **88**: 1772-1777
- Khandoudi, N. , Laville, M.-P. , Bril, A. (1996), Protective effect of the sodium/hydrogen exchange inhibitors during global low-flow ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**(4): 540-546
- Kilbinger, H., Krause, A., Mang, C.F., Englert, H., Wirth, K. (2001), Increase by the K_{ATP} channel blockers HMR 1883 and HMR 1372 of acetylcholine (ACh) release in guinea-pig isolated atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363** (suppl.): R74
- Kilbinger, H., Krause, A., Mang, C.F., Englert, H., Wirth, K. (2002), Effects of K_{ATP} channel modulators on acetylcholine release from guinea-pig isolated atria and small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365**: 371-377
- Kimura, S., Bassett, A.L., Furukawa, T., Cuevas, J., Myerburg, R.J. (1990), Electrophysiological properties and responses to simulated ischemia in cat ventricular myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circulation Research* **66**: 469-477
- King, L.M., Boucher, F., Opie, L.H. (1995), Coronary flow and glucose delivery as determinants of contracture in the ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**: 701-720
- Kingsbury, M.P., Robinson, H., Flores, N.A., Sheridan, D.J. (2001), Investigation of mechanisms that mediate reactive hyperaemia in guinea-pig hearts: role of K_{ATP} channels, adenosine, nitric oxide and prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* **132**: 1209-1216
- Klein, H.H., Puschmann, S., Schaper, J., Schaper, W. (1981), The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch (Pathol Anat)* **393**: 287-297
- Kodama, I., Kamiya, K., Toyama, J. (1997), Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc. Res.* **35**: 13-29
- Kodama, I., Kamiya, K., Toyama, J. (1999), Amiodarone: Ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *Am. J. Cardiol.* **84**: 20R-28R
- Kosmas, E.N., Levy, R.D., Hussain, S.N. (1995), Acute effects of glyburide on the regulation of peripheral blood flow in normal humans. *Eur. J. Pharmacol.* **274** : 193-199

- Koster, J.C., Marshall, B.A., Ensor, N., Corbett, J.A., Nichols, C.G. (2000), Targeted overactivity of β cell K_{ATP} channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* **100**: 645-654
- Koster, J.C., Knopp, A., Flagg, T.P., Markova, K.P., Sha, Q., Enkvetchakul, D., Betsuyaku, T., Yamada, K.A., Nichols, C.G. (2001), Tolerance for ATP-insensitive K_{ATP} channels in transgenic mice. *Circ. Res.* **89**: 1022-1029
- Koumi, S.I., Martin, R.L., Sato, R. (1997), Alterations in ATP-sensitive potassium channel sensitivity to ATP in failing human hearts. *Am. J. Physiol.* **272** (*Heart Circ. Physiol.* **41**): H1656-H1665
- Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P., Garlid, K.D. (2000), Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H649-H657
- Koyano, T., Kakei, M., Nakashima, H., Yoshinaga, M., Matsuoka, T., Tanaka, H. (1991), ATP-regulated K^+ channels are modulated by intracellular H^+ in guinea pig ventricular cells. *J. Physiol.* **463**: 747-766
- Krause, E., Englert, H., Gögelein, H. (1995), Adenosine triphosphate-dependent K currents activated by metabolic inhibition in rat ventricular myocytes differ from those elicited by the channel opener rilmakalim. *Pflugers Arch.* **429**: 625-635.
- Krauter, T., Ruppertsberg, J.P., Baukowitz, T. (2001) Phospholipids as modulators of K_{ATP} channels: Distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K^+ channel openers, and ATP. *Mol. Pharmacol.* **59**: 1086-1093
- Laclau, M. N., Boudina, S., Thambo, J. B., Tariosse, L., Gouverneur, G., Bonoron-Adèle, S., Saks, V. A., Garlid, K. D., Dos Santos, P. (2001), Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function on functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**: 947-956
- Laclau, M.N. (unveröffentlicht), Comparison of the protection afforded by several ATP-sensitive mitochondrial potassium channel openers against ischemia-reperfusion induced injuries – From the cytoprotection to the cardioprotection.
- Lebuffe, G., Schumacker, P.T., Shao, Z.H., Anderson, T., Iwase, H., Vanden Hoek, T.L. (2003), ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial K_{ATP} channel. *Am. J. Heart. Circ. Physiol.* **284**: H299-H308
- Lechat, P., Hulot, J.S., Escolano, S., Mallet, A., Leizorovicz, A., Werhlen-Grandjean, M., Pochmalicki, G., Dargie, H. (on behalf of the CIBISII investigators) (2001), Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II trial. *Circulation* **103**:1428-1433
- Linz, W., Jung, O., Jung, W., Schölkens, B.A., Englert, H.C. (1998), Different effects of K_{ATP} -channel blockers on ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: A18

- Liu, Q., Flavahan, N.A. (1997), Hypoxic dilatation of porcine small coronary arteries: role of endothelium and K_{ATP} -channels. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 728-734
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B., Marban, E. (1998), Mitochondrial ATP-dependent potassium channels – Novel effectors of cardioprotection? *Circulation* **97**: 2463-2469
- Liu, Y., Sato, T., Seharaseyon, J., Szewczyk, A., O'Rourke, B., Marbán, E. (1999), Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann. NY Acad. Sci.* **874**: 27-37
- Liu, G.X., Hanley, P.J., Ray, J., Daut, J. (2001a), Long-chain acyl-Coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K_{ATP} channels in the heart. *Circ. Res.* **88**: 918-924
- Liu, Y., Ren, G., O'Rourke, B., Marbán, E., Seharaseyon, J. (2001b), Pharmacological comparison of native mitochondrials K_{ATP} channels with molecular defined surface K_{ATP} channels. *Mol. Pharmacol.* **59**: 225-230
- Lomuscio, A., Fiorentini, C. (1996), Influence of oral antidiabetic treatment on electrocardiac alternations induced by myocardial infarction. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **31** (suppl): S21-S26
- Mackenzie, I., Saville, V.L., Waterfall, J.F. (1993), Differential class III and glibenclamide effects on action potential duration in guinea-pig papillary muscle during normoxia and hypoxia/ischemia. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 531-538
- MacNeil, D.J., Davies, R.O., Deitchman, D. (1993), Clinical safety profile of sotalol in the treatment of arrhythmias. *Am. J. Cardiol.* **72**: 44A-50A
- Maczewski, M., Beresewicz, A. (1998), The role of adenosine and ATP-sensitive potassium channels in the protection afforded by ischemic preconditioning against the post-ischemic endothelial dysfunction in guinea-pig hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**: 1735-1747
- Manning Fox, J.E., Kanji, H.D., French, R.J., Light, P.E. (2002), Cardioselectivity of the sulphonylurea HMR 1098: studies on native and recombinant cardiac and pancreatic K_{ATP} channels. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 480-488
- Maxwell, M.P., Hearse, D.J., Yellon, D.M. (1987), Species variation in the coronary collateral circulation during myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **21**: 737-746
- Mealy, N.E., Martín, L., Castaner, J. (2001), Clamikalant Sodium. *Drugs of the Future* **26**(10): 951-956
- Miki, T., Nagashima, K., Tashiro, F., Kotake, K., Yoshitomi, H., Tamamoto, A., Gono, T., Iwanaga, T., Miyazaki, J., Seino, S. (1998a), Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10402-10406

- Miki, T., Liu, G.S., Cohen, M.V., Downey, J.M. (1998b), Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: A practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res. Cardiol.* **93**: 372-383
- Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H., Seino, S. (2002), Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nature Med.* **8**: 466-472
- Mocanu, M.M., Maddock, H.L., Baxter, G.F., Lawrence, C.L., Standen, N.B., Yellon, D.M. (2001), Glimperide, a novel sulfonyleurea, does not abolish myocardial protection afforded by either ischemic preconditioning or diazoxide. *Circulation* **103**: 3111-3116
- Munch-Ellingsen, J., Lokebo, J.E., Bugge, E., Jonassen, A.K., Ravingerová, T., Ytrehus, K. (2000), 5-HD abolishes ischemic preconditioning independently of monophasic action potential duration in the heart. *Basic Res. Cardiol.* **95**: 228-234
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. (1986), Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74** (5): 1124-1136
- Mutschler, E., Moser, U., Wess, J., Lambrecht, G. (1995), Muscarinic receptor subtypes – pharmacological, molecular biological and therapeutic aspects. *Pharmaceutica Acta Hel.* **69**: 243258
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001), Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*
- Myerburg, R.J., Kessler, K.M., Castellanos, A. (1992), Sudden cardiac death – structure, function, and time dependence of risk. *Circulation* **85** (suppl I): I-2 – I-10
- Nelson, M.T., Quayle, J.M. (1995), Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268** (*Cell Physiol.* **37**): C799-822
- Nerbonne, J.M. (2000), Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J. Physiol.* **525.2**: 285-298
- Nerbonne, J.M., Nichols, C.G., Schwarz, T.L., Escande, D. (2001), Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice – What have we learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* **89**: 944-956
- Nichols, C.G., Lederer, W.J. (1991), Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.* **261** (*Heart Circ. Physiol.* **30**): H1675-H1686
- Nichols, C.G., Ripoll, C., Lederer, W.J. (1991), ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circulation* **68**: 280-287

- Nilius, B., Droogmans, G. (2001), Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**:1415-1459
- Noma, A. (1983), ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147-148
- Norwegian Multicenter Study Group (1981), Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction. *New Engl. J. Med.* **304**: 801-807
- Ockaili, R., Emani, V.R., Okubo, S., Brown, M., Krottapalli, K., Kukreja, R.C. (1999), Opening of mitochondrial K_{ATP} channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **277** (*Heart Circ. Physiol.* **46**): H2425-2434
- Oldenburg, O., Cohen, M.V., Yellon, D.M., Downey, J.M. (2002), Mitochondrial K_{ATP} channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **55**: 429-437
- Opie, L.H. (1965), Coronary flow rate and perfusion pressure as determinants of mechanical function and oxidative metabolism of isolated perfused rat heart. *J. Physiol.* **180**: 529-541
- Opie, L.H. (1984), Adequacy of oxygenation of isolated perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* **79**: 300-306
- Opie, L.H. (1991), Calcium antagonists post-infarction: The significance of experimental studies on potentially lethal early ischemic ventricular arrhythmias. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **5**: 671-676
- O'Rourke, B. (2000), Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circ. Res.* **87**: 845-855
- Owen, P., Dennis, S., Opie, L.H. (1990), Glucose flux rate regulates onset of ischemic contracture in globally underperfused rat hearts. *Circ. Res.* **66**: 344-354
- Padrini, R., Speranza, G., Nollo, G., Bova, S., Piovan, D., Antolini, R., Ferrari, M. (1997), Adaptation of the QT interval to heart rate changes in isolated perfused guinea pig heart: Influence of amiodarone and d-sotalol. *Pharmacol. Res.* **35**(5):409-416
- Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, Y., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M.V., Downey, J.M. (2000), Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* **87**: 460-466
- Patel, H.H., Gross, G.J. (2001), Diazoxide induced cardioprotection: what comes first, K_{ATP} channels or reactive oxygen species? *Cardiovasc. Res.* **51**: 633-636
- Park, K.H., Rubin, L.E., Gross, St.S., Levi, R. (1992), Nitric oxide is a mediator of hypoxic coronary vasodilatation – relation to adenosine and cyclooxygenase-derived metabolites. *Circ. Res.* **71**: 992-1001
- Penny, W.J., Sheridan, D.J. (1983), Arrhythmias and cellular electrophysiological changes during myocardial "ischemia" and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **17**: 363-372

- Picard, S., Rouet, R., Ducouret, P., Puddu, P.E., Flais, F., Criniti, A., Monti, F., Gérard, J.L. (1999), K_{ATP} channels and 'border zone' arrhythmias: role of the repolarisation dispersion between normal and ischaemic ventricular regions. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 1687-1695
- Pitt, B. (1992), The role of β -adrenergic blocking agents in preventing sudden cardiac death. *Circulation* **85** (suppl I): I-107 – I-111
- Poitry, S., van Bever, L., Coppex, F., Roatti, A., Baertschi, A.J. (2003), Differential sensitivity of atrial and ventricular K_{ATP} channels to metabolic inhibition. *Cardiovasc. Res.* **57**: 468-476
- Quast, U. (2001), Repaglinid. *Dtsch. Med. Wschr.* **126**: 559-560
- Quayle, J.M., Nelson, M.T., Standen, N.B. (1997), ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* **77**: 1165-1232
- Randall, M.D. (1995), The involvement of ATP-sensitive potassium channels and adenosine in the regulation of coronary flow in the isolated perfused rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 3068-3074
- Reffellmann, T., Skobel, E.C., Kammermeier, H., Hanrath, P., Schwarz, E.R. (2001), Activation of ATP-sensitive potassium channels in hypoxic cardiac failure is not mediated by adenosine-1 receptors in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* **6** (2): 189-200
- Reimer, K.A, Murry, C.E., Yamasawa, I., Hill, M.L., Jennings, R.B. (1986), Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am. J. Physiol.* **251**(6P2): H1306-H1315
- Ruiz Petrich, E., Leblanc, N., deLorenzi, F., Allard, Y., Schanne, O.F. (1992), Effects of K^+ channel blockers on the action potential of hypoxic rabbit myocardium. *Br. J. Pharmacol.* **106**: 924-930
- Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Quast, U. (2001a), Interaction of HMR 1883 and glibenclamide with K_{ATP} channels and sulphonylurea receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363** (suppl.): R73
- Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Quast, U. (2001b), Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1883 with sulphonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K^+ channels: Comparison with glibenclamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**: 1049-1055
- Rösen, R., Marsen, A., Klaus, W. (1984), Local myocardial perfusion and epicardial NADH-fluorescence after coronary artery ligation in the isolated guinea pig heart. *Basic Res. Cardiol.* **79**: 59-67
- Saavedra, W.F., Paolucci, N., Kass, D.A. (2002), Effects of cardioselective K_{ATP} channel antagonism on basal, stimulated, and ischaemic myocardial function in *in-vivo* failing canine heart. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 657-662

- Sakura, H., Ämmälä, C., Smith, P.A. Gribble, F.M, Ashcroft, F.M. (1995), Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **377**: 338-344
- Sakura, H., Trapp, S., Liss, B., Ashcroft, F.M. (1999), Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J. Physiol.* **521.2**: 337-350
- Sanada, S., Kitakaze, M., Asanuma, H., Harada, K., Ogita, H., Node, K., Takashima, S., Sakata, Y., Asakura, M., Shinozaki, Y., Mori, H., Kuzuya, T., Hori, M. (2001), Role of mitochondrial and sarcolemmal K_{ATP} channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H256-H263
- Sandritter, W., Jestaedt, R. (1958), Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh Dtsch Ges Pathol* **41**: 165-171
- Sato, T., Sasaki, N., Seharaseyon, J., O'Rourke, B., Marbán, E. (2000), Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K_{ATP} channels in ischemic cardioprotection. *Circulation* **101**: 2418-2423
- Sato, T., Marbán, E. (2000), The role of mitochondrial K_{ATP} channels in cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **95**: 285-289
- Schaper, W., Frenzel, H., Hort, W. (1979), Experimental coronary occlusion. I. Measurement of infarct size. *Basic Res. Cardiol.* **74**: 46-53
- Schaper, W. (1986), Die Pathophysiologie der Reperfusion. *Z. Kardiol.* **75**: Suppl. 5, 73-75
- Schipke, J.D., Frehen, D. (2001), Gregg-Phänomen und Gartenschlauch-Effekt. *Z. Kardiol.* **90**: 319-326
- Schotborgh, C.E., Wilde, A.A.M. (1997), Sulfonylurea derivatives in cardiovascular research an in cardiovascular patients. *Cardiovasc. Res.* **34**: 73-80
- Schultz, J.E.J., Yao, Z., Caverio, I., Gross, G.J. (1997a), Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **41**: H2607-H2615
- Schultz, J.E.J., Yong, Z.Q., Gross, G.J., Kukreja, R.C. (1997b), The ischemia-selective K_{ATP} channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**: 1055-1060
- Schulz, R., Rose, J., Heusch, G. (1994), Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **36**: H1341-H1352

- Schulz, R., Cohen, M.V., Behrends, M., Downey, J.M., Heusch, G. (2001), Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **52**: 181-198
- Schwartz, L.M., Verbinski, S.G., Vander Heide, R.S., Reimer, K.A. (1997), Epicardial temperature is a major predictor of myocardial infarct size in dogs. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**: 1577-1583
- Seharaseyon, J., Ohler, A., Sasaki, N., Fraser, H., Sato, T., Johns, D.C., O'Rourke, B., Marbán, E. (2000), Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**:1923-1930
- Sekiya, S., Ichikawa, S., Tsutsumi, T., Harumi, K. (1983), Nonuniform action potential durations at different sites in canine left ventricle. *Jpn. Heart J.* **24**: 935-945
- Sekiya, S., Ichikawa, S., Tsutsumi, T., Harumi, K. (1984), Distribution of action potential durations in the canine left ventricle. *Jpn. Heart J.* **25**: 181-195
- Shieh, C-C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., Gopalakrishnan, M. (2000), Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* **52**: 557-593
- Shyng, S.L., Ferrigni, T., Nichols, C.G. (1997), Control of rectification and gating of cloned K_{ATP} channels by the Kir6.2 subunit. *J. Gen. Physiol.* **110**: 141-153
- Shyng, S.L., Nichols, C.G. (1998), Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* **282**: 1138-1141
- Singh, B.N. (2001), CIBIS, MERIT-HF and COPERNICUS trial outcomes: Do they complete the chapter on β -adrenergic blockers as antiarrhythmic and antifibrillatory drugs? *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* **6**: 107-110
- Singh, H., Hudman, D., Lawrence, C.L., Rainbow, R.D., Lodwick, D., Norman, R.I. (2003) Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**: 445-459
- Smith, F.E. (1951), Tetrazolium salt. *Science* **113**: 751-754
- Snyders, D.J. (1999), Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **42**: 377-390
- Spooner, P.M., Brown, A.M., Catterall, W.A., Kaczorowski, G.J., Strauss, H.C. (1994) Ion channels in the cardiovascular system – function and dysfunction. Futura Publishing Company, Inc.
- Spruce, A.E., Standen, N.B., Stanfield, P.R. (1985), Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**: 736-738

- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davis, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., Nelson, M.T. (1989), Hyperpolarising vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**: 177-180
- Standen, N.B., Quayle, J.M. (1998), K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* **164**: 549-557
- Sunaga, Y., Gono, T., Shibasaki, T., Ichikawa, K., Kusama, H., Yano, H., Seino, S. (2001), The effects of mitiglinide (KAD-1229), a new anti-diabetic drug, on ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: Comparison with the sulfonylureas and nateglinide. *Eur. J. Pharmacol.* **431** : 119-125
- Sutherland, F.J., Hearse, D.J. (2000), The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* **41** (6): 613-627
- Suzuki, M., Li, R.A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marbán, E., Nakaya, H. (2001), Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ. Res.* **88**: 570-577
- Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Seino, S., Marbán, E., Nakaya, H. (2002), Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Clin. Invest.* **109**: 509-516
- Terzic, A., Dzeja, P.P., Holmuhamedov, E.L. (2000), Mitochondrial K_{ATP} channels: Probing molecular identity and pharmacology. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**:1911-1915
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (1999), Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohllk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F., Bryan, J. (1995), Mutation in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hypoglycemia of infancy. *Science* **268**: 426-429
- Tosaki, A., Szerdahelyi, P., Engelman, R.M., Das, D.K. (1993), Potassium channel openers and blockers: Do they possess proarrhythmic or antiarrhythmic activity in ischemic and reperfused rat hearts? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**: 1355-1362
- Trautwein, W., Dudel, J. (1954), Aktionspotential und Mechanogramm des Katzenpapillarmuskels als Funktion der Temperatur. *Pflügers Archiv* **104**: 104-115
- Trube, G., Hescheler, J. (1983), Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **322**: R 64
- Trube, G., Hescheler, J. (1984), Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Arch.* **401**: 178-184

- Tucker, S.J., Gribble, F.M., Zhao, C., Frapp, S., Ashcroft, F.M. (1997), Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**: 179-183
- Tweedie, D., Henderson, C., Kane, K. (1993), Glibenclamide, but not class III drugs, prevents ischaemic shortening of the refractory period in guinea-pig hearts. *Eur. J. Pharmacol.* **240**: 251-257
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998), Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**: 837-853
- Vleugels, A., Vereecke, J., Carmeliet, E. (1980) Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circ.Res.* **47**: 501-508
- Waldo, A.L., Camm, A.J., deRuyter, H., Friedman, P., MacNeil, D.J., Pauls, J.F., Pitt, B., Pratt, C.M., Schwartz, P.J., Veltri, E.P. for the SWORD investigators (1996), Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. *Lancet* **348**: 7-12
- Wang, G.Y., Wu, S., Pei, J.M., Yu, X.C., Wong, T.M. (2001a), β - but not d-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H384-H391
- Wang, S., Cone, J., Liu, Y. (2001b), Dual roles of mitochondrial K_{ATP} channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H246-H256
- Watanabe, T., Rautaharju, P.M., McDonald, T.F. (1985), Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of guinea pig. *Circ. Res.* **57**: 362-373
- Weiss, J.N., Lamp, S.T. (1987), Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* **238**: 67-69
- Weiss, J.N., Venkatesh, N., Lamp, S.T. (1992), ATP-sensitive K⁺ channels and cellular K⁺ loss in hypoxic and ischemic mammalian ventricle. *J. Physiol.* **447**: 649-673
- Weiss, J.N., Venkatesh, N. (1993), Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **7** (Suppl 3): 499-505
- Wilde, A.A.M., Janse, M.J. (1994), Electrophysiological effects of ATP sensitive potassium channel modulation: implications for arrhythmogenesis. *Cardiovasc. Res.* **28**: 16-24
- Wirth, K.J., Klaus, E., Englert, H.C., Schölkens, B.A., Linz, W. (1999a), HMR 1883, a cardioselective K_{ATP} channel blocker, inhibits ischaemia- and reperfusion-induced ventricular fibrillation in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **360**: 295-300

- Wirth, K.J., Rosenstein, B., Uhde, J., Englert, H.C., Busch, A.E., Schölkens, B.A. (1999b), ATP-sensitive potassium channel blocker HMR 1883 reduces mortality and ischemia-associated electrocardiographic changes in pigs with coronary occlusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**: 474-481
- Wirth, K.J., Uhde, J., Rosenstein, B., Englert, H.C., Gögelein, H., Schölkens, B.A., Busch, A.E. (2000), K_{ATP} channel blocker HMR 1883 reduces monophasic action potential shortening during coronary ischemia in anesthetised pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**: 155-160
- Wirth, K.J., Englert, H.C., Rosenstein, B., Busch, A.E. (2001), Atropine inhibits the antifibrillatory effect of HMR 1372, a putative blocker of cardiac vagal K_{ATP}-channels, in pigs with coronary ischemia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363** (suppl.): R75
- Yellon, D.M., Baxter, G.F., Garcia-Dorado, D., Heusch, G., Sumeray, M.S. (1998), Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc. Res.* **37**: 21-33
- Yellon, D.M., Dana, A. (2000), The preconditioning phenomenon – A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ. Res.* **87**: 543-550
- Yellon, D.M., Baxter, G.F. (2000), Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction : distant dream or near reality? *Heart* **83**: 381-387
- Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T., Sperelakis, N. (1998), ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **274** (*Cell Physiol* **43**): C25-C37
- Yue, Y., Qin, Q., Cohen, M.V., Downey, J.M., Critz, S. (2002), The relative order of mK_{ATP} channels, free radicals and p38 MAPK in preconditioning's protective pathway in the rat heart. *Cardiovasc. Res.* **55**: 681-689
- Ytrehus, K. (2000), The ischemic heart – experimental models. *Pharmacol. Res.* **42** (3): 193-203
- Zhao, Z.Q., Vinten-Johansen, J. (2002), Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **55**: 438-455
- Zipes, D.P., Wellens, H.J.J. (1998), Sudden cardiac death. *Circulation* **98**: 2334-2351

VII Curriculum vitae

Persönliche Angaben **Astrid Weyermann**
geb. Kotzan

geboren am 16. Juni 1974 in Herford

Anschrift: Albert-Blank-Str. 38

65931 Frankfurt

Tel. 069/37562198

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch



Schule

1980 - 1984	Paul-Gerhardt-Grundschule Rheinberg
1984 - 1993	Städtisches Stiftsgymnasium Xanten
1993	Abitur

Studium

10/1993 - 03/1994	Chemie in Bonn
04/1994 - 04/1998	Pharmazie in Bonn
Frühjahr 1996	erstes Staatsexamen
Frühjahr 1998	zweites Staatsexamen

Praktisches Jahr

05/1998 – 10/1998	St.-Hubertus-Apotheke in Bonn
11/1998 – 04/1999	Rhône-Poulenc in Köln
05/1999	drittes Staatsexamen
06/1999	Approbation als Apothekerin

Promotion

07/1999 – 09/2002	Herz-Kreislauf-Forschung – Abteilung Pharmakologie – Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt/M.
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

akademische Lehrer

A.E. Busch, K.-W. Glombitza, H. Gögelein, U. Holzgrabe, J. Lehmann, E. Leistner, K. Mohr, P. Nickel, K.-J. Steffens, R. Süverkrüp, B. Wiedemann

Berufstätigkeit

seit 10/2002	Regulatory Affairs Manager bei der Grünenthal GmbH in Aachen
--------------	-----------------------------------------------------------------

VIII Veröffentlichungen

Kongressbeiträge:

Weyermann, A., Bleich, M., Busch, A.E., Englert, H.C., Gögelein, H. (2002), Effects of K(ATP) channel blocker on monophasic action potential and coronary flow in Langendorff-perfused guinea pig hearts under hypoxia. *Eur. Heart J.* **23** (suppl): P379.

Artikel in Internationalen Zeitschriften:

Gögelein, H., Englert, H.C., **Kotzan, A.**, Hack, R., Lehr, K.-H., Seiz, W., Becker, R.H.A., Sultan, E., Schölkens, B.A, Busch, A.E. (2000), HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc. Drugs Rev.* **18**: 157-174.

Weyermann, A., Vollert, H., Busch, A.E., Bleich, M., Gögelein, H. (2004), Inhibitors of ATP-sensitive potassium channels in guinea pig isolated ischemic hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **369**: 374-381.

Elfeber, K, Stümpel, F., **Weyermann, A.**, Gorboulev, V., Mattig, S., Deußen, A., Kaissling, B., Koepsell, H., Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 is localized in capillaries of heart and skeletal muscle and participates in muscular D-glucose uptake. (in Vorbereitung)

IX Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit bei der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH in der Indikationsgruppe Cardiovascular Diseases angefertigt.

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Busch für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Umfeldes und des Themas meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. Dr. Mutschler von der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt für die Betreuung der Arbeit von seiten der Universität, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde.

Prof. Dr. Gögelein, der bei Aventis die praktische Durchführung der Experimente und die wissenschaftliche Bearbeitung des Themas sowie das Verfassen dieser Dissertation hilfreich betreut hat.

Dr. Englert für die Bereitstellung der Testsubstanzen und wertvolle Anregungen.

Dr. Bleich für die ausführlichen Gespräche über meine Arbeit.

Dr. Andrea Brüggemann, Dr. Alexander Bachmann, Dr. Constanze Scherer, Karen Menning, Sabine Roth und Kerstin Klämbt für interessante Diskussionen und Gespräche.

Frau Marion Kurjat für die geduldige und freundliche Einarbeitung in die Langendorff-Technik und die Unterstützung bei damit auftretenden Problemen. Vor allem ihr und Frau Sybill Meister, aber auch etlichen anderen Kollegen für die jederzeit bereitwillige Durchführung der Organentnahme. Herrn Roland Klein für seine kompetente Hilfe, insbesondere bei allen Fragen zu Computerprogrammen.

Allen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ötti Burghardt, Anne Pieck, Ulla Tammler, Julia Groß und Miren Kerkmann für ihre freundschaftliche Anteilnahme.

Meiner Familie für ihre Unterstützung.

Mein ganz spezieller und allerherzlichster Dank gilt meinem Mann Jörg.