

Aus der Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm

Endogene Aktivierung mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle schützt menschliches insuffizientes Myokard vor Sauerstoffradikal-induzierter kontraktiler Dysfunktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von

Ewtim Rainer Dabew

geboren am 15.03.1978 in Mönchengladbach

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	4
1.1 Zusammenfassung (deutsch)	4
1.2 Summary (english)	6
2 Einleitung	8
2.1 Herzinsuffizienz.....	8
2.2 Definition Herzinsuffizienz	8
2.2.1 Einteilung der Herzinsuffizienz	8
2.2.2 Definition „Myocardial Stunning“	10
2.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies.....	10
2.2.4 Entstehung von ROS	11
2.2.5 ROS und Herzinsuffizienz	12
2.3 Ischämische Präkonditionierung.....	16
2.3.1 Definition	16
2.3.2 Die Signaltransduktion der Ischämischen Präkonditionierung	17
2.3.3 ATP – abhängige Kalium (K_{ATP}) Kanäle	20
2.3.4 Fragestellungen der Arbeit I.....	29
2.3.5 Fragestellung der Arbeit II	30
2.3.6 Fragestellungen der Arbeit III	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Materialien.....	31
3.1.1 Versuchsmaterial	31
3.1.2 Verwendete Substanzen / Gase	32
3.1.3 Geräte	35
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Messung der isometrischen Kontraktionskraft an menschlichen Herzmuskelpräparaten.....	36
3.2.2 Western-Blot-Analyse von linksventrikulärem Myokard terminal insuffizienter und gesunder Herzen auf die Protein-Expression von SUR1, SUR2, KIR6.1 und KIR6.2	41
3.3 Statistische Analyse	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Spezifität der K_{ATP} – Kanal Modulatoren.....	46
4.2 Der Einfluss von K_{ATP} - Modulatoren auf die kardiale Kontraktilität bei Hypoxie und Reoxygenierung.....	48
4.3 K_{ATP} - Modulatoren während Generierung von Sauerstoffradikalen	54
4.4 Western-Blot-Analyse von linksventrikulärem Myokard terminal insuffizienter und gesunder Herzen auf die Protein-Expression von SUR1, SUR2, KIR6.1 und KIR6.2	65
5 Diskussion	71
5.1 K_{ATP} -Modulatoren bei Ischämie und Reperfusion	72
5.2 Kaliumkanalmodulatoren während Hydroxylradikal – Exposition ($\bullet OH$).....	76
5.3 Regulation von sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen in menschlichem insuffizienten linksventrikulären Myokard	78
5.4 Die Rolle des mitochondrialen Kaliumkanales in menschlichen, linksventrikulären Myokard.....	80
6 Klinische Implikationen	82
7 Literaturverzeichnis.....	83
8 Publikationen / Dank	99
8.1 Originalarbeiten	99

8.2	Poster und Vorträge	100
8.3	Dank.....	102
9	Lebenslauf	103

Abkürzungsverzeichnis

5-HD	-	5 – Hydroxydecanoat
ADP	-	Adenosindiphosphat
AMP	-	Adenosinmonophosphat
APD	-	Aktionspotentialdauer
ATP	-	Adenosintriphosphat
DZ	-	Diazoxid
IPC	-	ischämische Präkonditionierung
F_{max}	-	maximal entwickelte Kontraktionskraft
$F_{max}Ca$	-	maximal entwickelte Kontraktionskraft nach Applikation von Calciumchlorid
$F_{max}Iso$	-	maximal entwickelte Kontraktionskraft nach Applikation von Isoprenalin
FOC	-	Kontraktionskraft (force of contraction)
H/R	-	Hypoxie / Reoxygenierung
K_{ATP}	-	ATP - abhängiger Kaliumkanal
mito K_{ATP}	-	mitochondrialer ATP – abhängiger Kaliumkanal
sarc K_{ATP}	-	sarkolemmaler ATP – abhängiger Kaliumkanal
mPTP	-	mitochondrial permeability transition pore
•OH	-	Hydroxylradikal
PKC	-	Proteinkinase C
PMA	-	4-beta-phorbol 12-myristat 13 Azetat
PLC	-	Phospholipase C
ROS	-	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	-	Superoxiddismutase
SR	-	sarkoplasmatische Retikulum
SUR	-	Sulfonylharnstoffrezeptor
XO	-	Xanthinoxidase

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (deutsch)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und insbesondere Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$), entstehen bei der Reperfusion ischämischen Myokards und sind verantwortlich für eine reversible kontraktile Dysfunktion, die als „myokardiales Stunning“ bezeichnet wird. Größere Mengen an ROS können darüber hinaus zu programmiertem Zelltod (Apoptose) und Nekrose, insbesondere durch die Aktivierung des mitochondrialen permeability transition pore (mPTP) führen, was zu irreversiblen Untergang von Myokard und in der Folge maladaptivem ventrikulären „Remodeling“ mit der Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie führen kann.

1986 wurde das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung entdeckt. Hierbei verringern kurze Phasen von Ischämie/Reperfusion vor einer längeren Ischämie mit Reperfusion die Infarktgröße. Obwohl die genauen Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung noch nicht vollständig geklärt sind, so weist eine Vielzahl von Studien auf die Bedeutung ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) hin. Die Identität kardialer sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle ($\text{sarc}K_{\text{ATP}}$) ist geklärt (Kir6.2 und SUR2A), wohingegen die molekulare Identität mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle noch nicht bekannt ist, ihre Existenz aber auf der Basis von Patch-Clamp Studien und dem Ansprechen auf pharmakologische Inhibitoren und Aktivatoren weitgehend (aber nicht uneingeschränkt) akzeptiert ist. Während die Aktivierung sarkolemmaler K_{ATP} Kanäle zu einer Verkürzung des Aktionspotenzials und somit einer Verringerung des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle führt, verringert die Aktivierung mitochondrialer K_{ATP} Kanäle das mitochondriale Membranpotenzial, was den Einstrom von Ca^{2+} in Mitochondrien bei z.B. cytosolischer Ca^{2+} -Überladung im Rahmen einer Ischämie/Reperfusion und somit die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des mPTP und das Auftreten von Apoptose und Nekrose reduziert.

Die Exposition von isolierten Herzmuskeltrabekeln an ROS simuliert die Prozesse des myokardialen Stunnings, welches sich durch einen Anstieg der diastolischen Spannung und einer Reduktion der entwickelten Kraft niederschlägt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Maack et al. wurde die überraschende Beobachtung gemacht, dass linksventrikuläres (LV) Myokard von Patienten mit chronischer (terminaler) Herzinsuffizienz – im Gegensatz zu nicht-insuffizientem Myokard – resistent gegenüber ROS-induziertem Stunning ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Ursachen für diese Resistenz zu untersuchen. Die Experimente wurden hierfür an atrialem und LV Myokard von Patienten mit und ohne

Herzinsuffizienz durchgeführt. In einem Protokoll mit 30 min Hypoxie und 90 min Reoxygenierung in atrialen nicht-insuffizienten Herzmuskeltrabekeln verbesserte die Aktivierung mitochondrialer, aber nicht sarkolemmaler K_{ATP} Kanäle, die kontraktile Funktion während der Reoxygenierung. Während weder die Aktivierung sarkolemmaler noch mitochondrialer K_{ATP} Kanäle das myokardiale Stunning während der Exposition an ROS in nicht-insuffizienten Trabekeln verbesserte, führte ihre Aktivierung jedoch zu einer Verbesserung der Ca^{2+} -induzierten maximalen Kontraktilität nach Auswaschen der ROS.

Um zu ergründen, ob eine erhöhte Aktivierung sarkolemmaler oder mitochondrialer K_{ATP} Kanäle für die endogene Protektion insuffizienten Myokard verantwortlich ist, wurde die Proteinexpression der sarc K_{ATP} Kanal Untereinheiten Kir6.2 und SUR2 mittels Western Blot in LV Myokard analysiert und eine etwa 2-fache Heraufregulation beider Untereinheiten in insuffizientem Myokard beobachtet. Allerdings beeinflusste die pharmakologische Blockade des sarc K_{ATP} Kanals mit HMR-1098 nicht die Resistenz insuffizienten Myokards gegenüber ROS-induziertem Stunning. Im Gegensatz dazu führte die Blockade mitochondrialer K_{ATP} Kanäle durch 5-HD jedoch zu einer Resensibilisierung gegenüber ROS-induziertem Stunning in insuffizienten LV Trabekeln. Dies legt nahe, dass in insuffizientem LV Myokard eine endogene Aktivierung mitochondrialer K_{ATP} Kanäle zu der beobachteten Resistenz gegenüber ROS-induzierter kontraktile Dysfunktion führt. Interessanterweise sind bei chronischer Herzinsuffizienz viele Komponenten der Signalkaskaden, die für die ischämische Präkonditionierung verantwortlich gemacht werden und welche in der Aktivierung mitochondrialer K_{ATP} Kanäle münden, bereits heraufreguliert bzw. aktiviert.

Die Daten dieser Untersuchung haben klinische Implikationen, da z.B. Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoffderivat, welches häufig bei der Therapie von Patienten mit Typ II Diabetes mellitus eingesetzt wird, sowohl sarkolemmale als auch mitochondriale K_{ATP} Kanäle blockiert. In der Tat zeigten Daten klinischer Studien, dass Patienten mit Herzinsuffizienz und Diabetes, die mit Glibenclamid behandelt wurden, ein schlechteres outcome (hinsichtlich Sterblichkeit und Arrhythmien) nach Myokardinfarkt hatten als Insulin-behandelte Patienten. Es sollten daher eher Sulfonylharnstoffderivate mit höherer Selektivität für pankreatische K_{ATP} -Kanäle gegenüber mito K_{ATP} Kanälen bei diesen Patienten eingesetzt werden (z.B. Glimepirid).

Kernteile dieser Arbeit wurden 2009 im Journal *Circulation Research* publiziert (Maack et al., 2009).

1.2 Summary (English)

During the reperfusion of ischemic myocardium, a burst of reactive oxygen species (ROS), and in particular, hydroxyl radicals (OH), induce reversible contractile dysfunction, a phenomenon coined “myocardial stunning”. High amounts of ROS can even induce programmed cell death (apoptosis) and necrosis through activation of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). This can induce irreversible loss of myocardium and the development of maladaptive left ventricular (LV) remodelling and ischemic cardiomyopathy.

In 1986, the phenomenon of ischemic preconditioning was discovered, based on the finding that repetitive brief periods of ischemia with subsequent reperfusion can reduce infarct size after a subsequent longer ischemia with reperfusion. Although the mechanisms of ischemic preconditioning are not fully resolved yet, it is evident that ATP-dependent potassium channels (K_{ATP} channels) play a key role. The identity of cardiac sarcolemmal K_{ATP} channels (sarco K_{ATP}) is resolved (Kir6.2 and SUR2A), while the molecular identity of mitochondrial K_{ATP} channels is still unclear, their existence however supported by patch-clamp based studies and the responsiveness to pharmacological activators and inhibitors. While the activation of sarco K_{ATP} channels shortens action potential duration and reduces cytosolic Ca^{2+} influx, activation of mito K_{ATP} channels reduces the mitochondrial membrane potential and thus, reduces mitochondrial Ca^{2+} uptake during ischemia/reperfusion-induced cytosolic Ca^{2+} overload. Reducing mitochondrial Ca^{2+} overload prevents activation of the mPTP and thus, the induction of cell death via apoptosis or necrosis.

Exposing isolated cardiac trabeculae to ROS reproduces the phenomena of myocardial stunning, characterized by an increase of diastolic tension and a reduction of developed force. In previous work of Maack et al. we made the unexpected observation that human failing LV myocardium was resistant to ROS-induced stunning, in contrast to nonfailing LV myocardium. The aim of this project was to elucidate the mechanism behind this phenomenon. Experiments were performed on isolated atrial and LV trabeculae from patients with or without heart failure. In a protocol of 30 min of hypoxia and 90 min of reoxygenation in atrial nonfailing trabeculae, activation of mito K_{ATP} , but not sarco K_{ATP} channels improved recovery of force generation upon reoxygenation. While neither the activation of mito K_{ATP} nor sarco K_{ATP} improved contractility during ROS-induced stunning, the recovery from it (after wash-out of ROS) and the maximal force induced by high external Ca^{2+} concentrations were improved by either sarco K_{ATP} or mito K_{ATP} channel activation during ROS-induced stunning.

To elucidate whether in failing myocardium, differential regulation of K_{ATP} channels might explain its resistance against ROS-induced stunning, protein expression of sarc K_{ATP} channel components (Kir6.2 and SUR2) was determined. In fact, expression of both Kir6.2 and SUR2 were upregulated ~2-fold in human failing versus nonfailing myocardium. Pharmacological inhibition of sarc K_{ATP} channels with HMR-1098, however, did not affect the resistance of failing myocardium against ROS-induced stunning. In contrast, inhibition of mito K_{ATP} channels with 5-HD during ROS-exposure induced systolic and diastolic dysfunction, restoring the “nonfailing phenotype” of myocardial stunning. These data imply that in human failing myocardium, endogenous activation of mito K_{ATP} channels protects from ROS-induced contractile dysfunction.

The findings of this study have clinical implications, since glibenclamide, a sulfonylurea used in patients with type II diabetes, is a non-selective K_{ATP} channel inhibitor and blocks also mito K_{ATP} channels, which might aggravate contractile dysfunction after myocardial ischemia/reperfusion. In fact, clinical data suggest that patients with heart failure and diabetes treated with glibenclamide have a more adverse outcome after myocardial infarction in terms of mortality and arrhythmias compared to insulin-treated patients. Thus, in patients with heart failure and diabetes, glibenclamide should be avoided and instead, sulfonylureas that are more selective for pancreatic K_{ATP} channels (i.e., glimepirid) should be used.

Parts of this thesis have been published in *Circulation Research* (Maack et al., 2009).

2 Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz

2.2 Definition Herzinsuffizienz

Gemäß den Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz aus dem Jahre 2001 wird die Herzinsuffizienz folgendermaßen nach pathophysiologischen Kriterien definiert:

Bei einer Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, das Gewebe mit genügend Blut und damit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel in Ruhe oder unter Belastung zu gewährleisten (Hoppe et al., 2001).

Des Weiteren wird die Herzinsuffizienz klinisch definiert, wenn typische Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit oder Flüssigkeitsretention bestehen, die auf eine kardiale Funktionsstörung zurückzuführen sind (Hoppe et al., 2001).

2.2.1 Einteilung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird gemäß dem American College of Cardiology sowie der American Heart Association nach strukturellen Veränderungen sowie Muskelschäden in 4 Kategorien und nach der New York Heart Association nach Schweregrad der klinischen Symptome und physischer Aktivität ebenfalls in 4 Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 1).

ACC / AHA Klasse		NYHA – Stadien	
A	Risiken zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Keine strukturellen oder funktionellen Schäden. Asymptomatisch.	I	Keine Einschränkung körperlicher Aktivitäten. Keine Ermüdung, Palpitationen oder Luftnot unter normaler körperlicher Belastung
B	Strukturelle Herzerkrankung, welche mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert ist. Asymptomatisch.	II	Geringe Einschränkung bei körperlicher Belastung. Keine Ruhebeschwerden. Normale Alltagsbelastungen führen zu übermäßiger Ermüdung, Palpitationen und Luftnot
C	Symptomatische Herzinsuffizienz mit zugrundeliegender struktureller Herzerkrankung	III	Deutliche Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Ruhebeschwerden. Geringe Belastungen führen zu übermäßiger Ermüdung, Palpitationen und Luftnot.
D	Fortgeschrittene strukturelle Herzerkrankung mit symptomatischer Herzinsuffizienz und Ruhebeschwerden trotz maximaler medikamentöser Therapie	IV	Jegliche körperliche Anstrengung führt zu Beschwerden. Ruhebeschwerden mit Zunahme unter Belastung.

Abbildung 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach ACC / AHA und NYHA (modifiziert nach Dickstein et al., 2008; McMurray et al., 2012)

Es existieren viele Ursachen für die Entwicklung einer (chronischen) Herzinsuffizienz. Bereits in der Framingham Studie wurde die koronare Herzkrankheit sowie die arterielle Hypertonie mit den Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Ventrikelaneurysma und hypertensive Herzkrankheit in 90% der Fälle als ursächlich angesehen (Lip et al., 2000). Andere Ursachen wie (nichtischämische) Kardiomyopathien, Erkrankungen der Herzklappen, angeborene Herzfehler oder Arrhythmien sind deutlich seltener. Eine Übersicht über verschiedene Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

- **Koronare Herzerkrankung**
 - Herzinfarkt
 - Ischämie
- **Arterielle Hypertonie, hypertensive Herzerkrankung**
- Kardiomyopathie (nicht ischämisch)
 - Dilatative CM (z.B. familiär, infektiös, Kollagenosen)
 - Hypertrophe / Obstruktive CM (z.B. familiär)
 - Restriktive CM (z.B. Amyloidose, Sarkoidose, Hämochromatose)
 - Obliterative CM
- Arrhythmien
 - Tachykardie
 - Bradykardie
 - Vorhofflimmern
- Erworbene & angeborene Klappenfehler sowie andere angeborene Herzfehler
 - Aortenvitien, Mitralklappenfehler (z.B. rheumatischer Genese)
 - Vorhofseptumdefekt, Ventrikelseptumdefekt u.a.
- Perikarderkrankungen
 - Perikarditis constrictiva
 - Perikarderguss
- High Output Failure
 - Hyperthyreose
 - Anämie
 - Links – Rechts Shunts (z.B. arteriovenöse Fistel)
- Primäre Rechtsherzinsuffizienz
 - pulmonale Hypertonie (z.B. Lungenarterienembolie, Cor pulmonale)
 - Trikuspidalvitien

Abbildung 2: Ursachen der Herzinsuffizienz (modifiziert nach Lip et al., 2000)

Die wichtigsten Ursachen der Herzinsuffizienz sind hervorgehoben. CM: Kardiomyopathie

Die koronare Herzkrankheit (Synonym: ischämische Herzkrankheit) ist nicht nur bei den systolischen Ventrikelfunktionsstörungen ein wichtiger ätiologischer Faktor. Allein an einem Herzinfarkt verstarben in Deutschland im Jahr 2006 64.796 Menschen bei 358 953 Verstorbenen an Krankheiten des Herz- / Kreislaufsystems insgesamt (Statistisches Bundesamt, 2007).

2.2.2 Definition „Myocardial Stunning“

Mit dem Thema der kardialen Dysfunktion und Herzinsuffizienz ist zwangsläufig das Phänomen des „myocardial stunning“ verknüpft. Es beschreibt das Persistieren einer kardialen Dysfunktion nach einer Ischämie, ohne dass die Ischämie persistiert, Zelltod im Sinne eines Infarktes oder andere Schäden aufgetreten sind. Es verbleibt also nach einer Ischämie eine mechanische Einschränkung, ohne dass ein irreversibler Schaden aufgetreten ist bei wieder normalisierter / oder fast normalisierter Durchblutung (Bolli et al., 1986). Die entscheidenden Punkte an der Definition sind, dass zum einen das myocardial stunning vollständig reversibel ist und zum anderen kein primäres Problem einer myokardialen Perfusionsstörung vorliegt (Bolli et al., 1982). Die Ursachen des myocardial stunning sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden sowohl ein vermehrtes Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als auch eine Störung der Calcium – Homöostase mit einer transienten Calcium - Überladung, aktivierten Calcium –abhängigen Proteasen, Myofilament-Proteolysen und /oder einer verminderten Reagibilität der Myofilamente auf Calcium diskutiert (Bolli et al., 1999). Da ROS ebenfalls Einflüsse auf den Calciumhaushalt haben (siehe unten) schließen sich beide Theorien nicht aus, sondern könnten sich gegenseitig verstärken. Beim myocardial stunning korreliert sowohl im Tierversuch (Braunwald et al., 1982) als auch beim Menschen (Bolli et al., 1999) die Dauer der Hypoperfusion mit dem Auftreten von ROS und ebenfalls mit der Dauer des stunning und dem erniedrigten kardialen Index.

2.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies, oder auch ROS, ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Molekülen und Radikalen (Stoffe mit einem ungepaarten Elektron), welchen gemeinsam ist, dass sie von molekularem Sauerstoff O_2 abstammen. Die Vorstufe der meisten ROS ist das Superoxid-Anion O_2^- , welches dann entweder spontan oder enzymatisch in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. H_2O_2 kann nun zu Wasser oder partiell zu einem Hydroxylradikal reduziert werden ($\bullet OH$), einem der stärksten Oxidantien in der Natur.

2.2.4 Entstehung von ROS

Das Herz des Säugetiers ist ein Organ, welches aufgrund seines Energieverbrauches von der aeroben Energiegewinnung abhängig ist. Unter Ruhebedingungen liegt der Sauerstoffverbrauch des Myokards bei 7-10ml O₂/min/100g Gewebe, steigerbar bis 40ml O₂/min/100g unter Belastung. Der Sauerstoffverbrauch des Gehirns liegt zum Vergleich bei 3-4ml O₂/min/100g (Schmidt et al., 2007).

Sauerstoffradikale entstehen im menschlichen Herz auf verschiedenste Art und Weise. Zum einen entstehen ROS als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium, ferner werden ROS durch die Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase sowie das Cytochrom P450-System produziert. Außerdem entstehen Sauerstoffradikale bei der Autooxidation von Katecholaminen und beim Entkoppeln der NO-Synthase (NOS). Im Herzen entstehen ROS ebenfalls durch die Aktion zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren. Zum Beispiel aktivieren Angiotensin II, PDGF und TNF-alpha die NADPH-Oxidase und führen so zur Produktion von ROS.

Es existieren zahlreiche Enzyme, die ROS entgiften können (sog. anti-oxidative Enzyme). O₂⁻ wird durch Superoxiddismutasen (SOD) zu H₂O₂ dismutiert. Es sind verschiedene Isoformen der SOD bekannt. Die SOD 1 (oder CuZnSOD) ist ein wichtiger Radikalfänger im Cytoplasma, im Intermembranraum der Mitochondrien, im Nukleus und den Lysosomen. Die SOD 2 (oder MnSOD) ist in der mitochondrialen Matrix und die SOD3 in der extrazellulären Matrix lokalisiert (daher auch ecSOD genannt; Trachootham et al.; 2008). H₂O₂ wird im Cytosol insbesondere durch Katalase, in Mitochondrien vor allem durch Glutathion Peroxidase (GPX) und Peroxiredoxin zu H₂O entgiftet. Eine Übersicht über Produktion und Elimination der ROS findet sich in Abbildung 3.

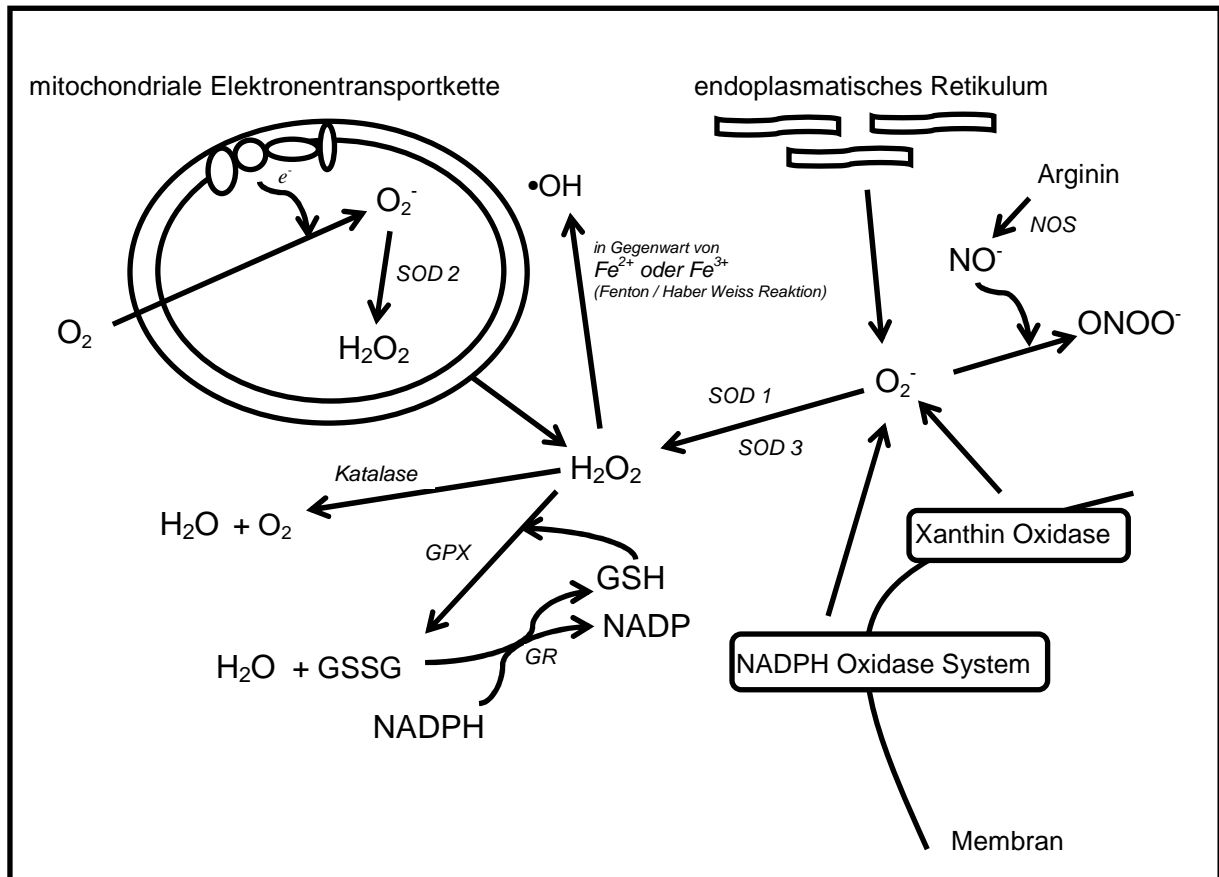


Abbildung 3: Produktion und Elimination von ROS (modifiziert Trachootham et al., 2008)

e^- , Elektron aus Komplex I und III der Elektronentransportkette; GPX, Glutathion Peroxidase; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; GR, Glutathion Reduktase; NADP, oxidiertes Nicotinamid Adenin; NADPH, reduziertes Nicotinamid Adenin; NOS, NO – Synthase; $\bullet\text{OH}$, Hydroxylradikal; SOD, Superoxiddismutase

Neben nützlichen Funktionen wie bei zellulären Signaltransduktionsvorgängen oder bei der Immunabwehr (Phagozytose, Modulation des Immunsystems) sind ROS bei überschießender Produktion bei Überlastung des antioxidativen Systems schädlich durch direkte Reaktion mit Lipiden und Proteinen und führen zu Zellschäden (z.B. Zellwandschäden der Organellen, Mutationen der DNA, Purin-Oxidation, cross-link-Reaktionen der DNA) und Zelltod.

2.2.5 ROS und Herzinsuffizienz

Die ROS sind ein entscheidender Faktor bei Reperfusionsschäden am menschlichen Herzen. Während der Ischämie kommt es zu einer zunehmenden Depletion von antioxidativem Glutathion, was bei der Reperfusion zu einer überschießenden ROS Produktion führt. Es ist derzeit umstritten, ob bereits während der Ischämie ROS vermehrt

produziert werden. Einerseits ist für die Produktion von O_2^- -Radikalen die Verfügbarkeit von O_2 Voraussetzung, was während einer Ischämie nicht gegeben ist; auf der anderen Seite suggerieren Daten mit Fluoreszenzfarbstoffen eine bedeutsame Freisetzung von ROS bereits während der Hypoxie (Vanden Hoek et al., 1997 und 1998). Als gesichert gilt jedoch, dass insbesondere bei der Reperfusion die größten Mengen an ROS produziert werden. Arbeiten, die durch transgene Techniken selektiv die cytosolische oder mitochondriale Isoform der SOD (1 bzw. 2) reduzierten, zeigen eine größere kontraktile Dysfunktion nach Reduktion der mitochondrialen Isoform, aber nicht der cytosolischen Isoform, was deutlich für Mitochondrien als Hauptquelle toxischer ROS bei Ischämie/Reperfusion spricht (Asimakis et al., 2002).

Des Weiteren entsteht durch den Abbau von ATP zunächst AMP und schließlich über IMP Hypoxanthin, welches akkumuliert. Gleichzeitig kommt es zu einer Umwandlung der Xanthin-Dehydrogenase in die Xanthin-Oxidase, welche in der Reperfusion / Reoxygenierung das angefallene Hypoxanthin in Xanthin umwandelt, als weiteren Abbauschritt zur Harnsäure. Bei der Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin entstehen auch Superoxidradikale. Darüber hinaus werden während der Ischämie auch inflammatorische Mediatoren, wie z.B. die Eicosanide, freigesetzt, Insbesondere bei der Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine und Leukotriene wird die Bildung freier Radikale initiiert.

Insgesamt kommt es so in den ersten Minuten der Reperfusion von ischämischem Myokard zu einem explosionsartigen Anstieg der ROS (Zweier et al., 1989 und 2006; Bolli et al., 1999). Der Mechanismus der Zellschädigung und damit die Entstehung einer Herzinsuffizienz, aber auch des myocardial stunning durch die Ischämie / Reperfusion ist letztlich nicht vollständig geklärt. Nach einer führenden Hypothese führen die ROS über eine Hemmung der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Flesch et al., 1999) und über eine Aktivierung des „reverse-mode“ Na^+ / Ca^{2+} - Austauschers zu einer cytosolischen Calcium-Überladung (Zeitlitz et al., 2002), welches ebenfalls zu einer erhöhten Calcium-Konzentration im Mitochondrium führt. Die Folge ist ein Absinken des mitochondrialen Membranpotentials mit Induktion einer mitochondrialen Schwellung, welche über Öffnung der mPTP (mitochondrial permeability transition pore) zur Apoptose und bei irreversibler Öffnung der mPTP auch zur Nekrose führen kann (Halestrap et al., 2005). Das Auftreten von Apoptose ist mit dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz verbunden. Dieses wurde experimentell (Wencker et al., 2003) als auch am menschlichen Herz (Narula et al., 1996) nachgewiesen. Klinisch konnte beobachtet werden, dass das Vorhandensein von Hydroxylradikalen im Plasma von Patienten nach einem Herzinfarkt mit dem Auftreten einer Herzinsuffizienz assoziiert war (Valgimigli et al., 2004).

Dass oxidativer Stress eine besondere Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz – und zwar nicht nur der ischämischen Kardiomyopathie, sondern der Herzinsuffizienz allgemein – haben, lässt sich aus Experimenten schließen, in welchen die Enzymaktivität von Aconitase (Marker für oxidativen Stress) gemessen wurde. Dabei zeigte sich sowohl bei der ischämischen Kardiomyopathie als auch bei der dilatativen Kardiomyopathie eine deutliche Reduktion im Vergleich zu gesunden Herzen beim Menschen (Maack et al., 2003).

Bei der Herzinsuffizienz werden vom menschlichen Körper neuroendokrine Mechanismen aktiviert, um die Auswirkungen der kontraktilen Dysfunktion auf den Blutdruck zu kompensieren. Zu diesen Mechanismen zählt unter anderem das Renin-Angiotensin-Aldosteron System als auch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass in der Herzinsuffizienz erhöhte Katecholamin-Spiegel und erhöhte Angiotensin-II-Plasmaspiegel gefunden werden. In mehreren Studien konnte aber zudem ein erhöhtes Auftreten von Sauerstoffradikalen, genauer gesagt von Malondialdehyden, nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um ein Produkt aus der Lipidperoxidation, welche durch ROS ausgelöst wird (Belch et al., 1999; Diaz-Velez et al., 1996). Die Konzentration der Malondialdehyde korrelierte dabei invers mit der linksventrikulären Funktion. Auch Patientengruppen mit erhöhten Risikofaktoren für eine Herzinsuffizienz (z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie) wiesen erhöhten oxidativen Stress im Plasma auf. Eine Korrelation zwischen der Plasma-H₂O₂ Konzentration und einer arteriellen Hypertonie konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Lacy et al., 1998).

Auch tierexperimentielle Daten zeigen, dass nach einem Herzinfarkt der zunehmende Radikalschaden zur Ausbildung einer kardialen Dysfunktion führt, welche schließlich zu einer Herzinsuffizienz beiträgt (Hill et al., 1996). Auch entwickeln Mäuse, bei denen die (mitochondriale) SOD2 zur Elimination von Superoxid fehlt, eine dilatative Kardiomyopathie (Li et al., 1995). Diese Daten suggerieren, dass ROS eine kausale Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zukommen.

Während die Effekte von ROS auf nicht-insuffizientes Myokard vom Menschen bereits untersucht wurden (Flesch et al., 1999), liegen für insuffizientes Myokard nur tierexperimentelle Daten vor. So zeigten Versuche mit isolierten Herzmuskelzellen von Hunden (Tsutsui et al., 2001) oder Kaninchen (Wagner et al., 2003) eine eher höhere Vulnerabilität der insuffizienten Kardiomyozyten gegenüber Hydroxylradikalen im Vergleich zu normalen Kontroll-Kardiomyozyten. Die Experimente wurden jedoch jeweils an nicht

schlagenden Kardiomyozyten durchgeführt, was keine Aussagen über die Auswirkungen auf die tatsächliche Kontraktilität zulässt. Passend zu dieser Beobachtung sind jedoch die Ergebnisse von anderen Studien, welche im insuffizienten Myokard eine erniedrigte Anti-Oxidative-Kapazität nachwiesen, welche eine erhöhte Empfindlichkeit für ROS nahelegen würde (Bäumer et al., 2000; Sam et al., 2005).

Bei Experimenten an isolierten, elektrisch stimulierten Herzmuskelstreifen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz machte unsere Arbeitsgruppe jedoch eine interessante Beobachtung: insuffizientes Myokard war hier im Gegensatz zu Trabekeln von nicht-insuffizienten Herzen resistent gegenüber exogen zugeführten Hydroxylradikalen. In Abbildung 4 ist ein Original – Mechanogramm der ventrikulären Herztrabekel aus der Versuchsreihe von Maack et al. (2009) abgebildet. Es ist gut zu erkennen, dass das myokardiale Stunning, welches sich in insuffizientem Myokard (Abbildung 4A) durch einen Anstieg der diastolischen Spannung (Anstieg der Kurve in Richtung der x – Achse) und eine Reduktion der entwickelten Kraft (Verringerung der Amplitude) äußert, in insuffizientem Myokard deutlich abgeschwächt ist (Abbildung 4B). In der Gesamtanalyse war die entwickelte Kraft nach Hydroxylradikalexposition nicht signifikant reduziert (Maack et al., 2009).

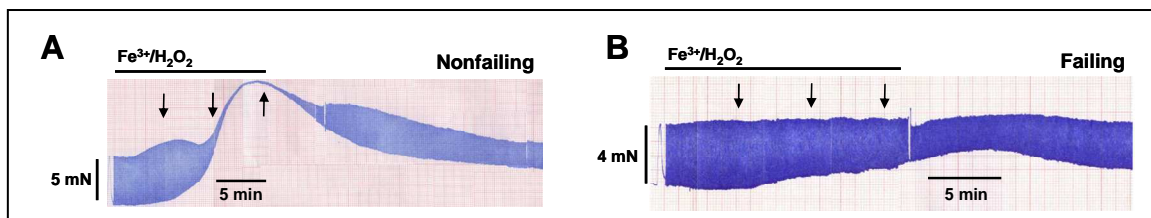


Abbildung 4: Original – Mechanogramme der Versuche von Maack et al. (2009). Erklärung siehe Text.

Die Ergebnisse dieses Versuches stellen die Ausgangsbeobachtung für die vorliegende Promotionsarbeit dar. Diese beobachtet Resistenz wird in dieser Arbeit mit dem Phänomen der ischämischen Präkonditionierung in Verbindung gebracht, so dass zunächst eine Einführung in das Themengebiet der Präkonditionierung erfolgt.

2.3 Ischämische Präkonditionierung

2.3.1 Definition

Die Ischämische Präkonditionierung (IPC) ist ein endogener, zellulärer Schutzmechanismus, welcher im Myokard (O'Rourke et al., 2000; O'Rourke et al., 2004) und anderen Geweben wie Skelettmuskel (Badhwar et al., 2004; Pang et al. 1995; Pang et al. 1997), Gehirn, Leber (Jaeschke et al., 2003) oder Niere (Cochrane et al., 1999) nachgewiesen wurde. Durch eine oder mehrere kurze Ischämiephasen (ca. 5 Minuten), beispielsweise der temporäre Verschluss einer Herzkranzarterie, jeweils gefolgt von einer Reperfusionsphase, kommt es anschließend bei einer nachfolgenden langen Ischämiephase (z.B. 90 Minuten) und Reperfusion zu einer Protektion des Gewebes im Sinne einer Reduktion der Infarktgröße gegenüber Herzen, die keine vorgeschaltete Ischämiephasen durchlaufen haben. (Murry et al., 1986; Cohen et al., 2000; Simkhovich et al., 1998). Die Verringerung von Reperfusionsarrhythmien wird kontrovers diskutiert. Eine Protektion kann nur nachgewiesen werden, wenn die lange Ischämiephase weniger als 3 Stunden beträgt (Murry et al., 1986). Die ischämische Präkonditionierung verlängert also das Überleben des betroffenen Gewebes für einen bestimmten Zeitraum, die Schadenstoleranz wird erhöht.

Man unterscheidet eine frühe, akute Phase der IPC, auch klassische Präkonditionierung genannt, welche nach der Präkonditionierung einsetzt mit einem Protektionsfenster von 1-2 Stunden, von einer späten, verzögerten Phase der Präkonditionierung, welche 24h bis 72h nach der Präkonditionierung einsetzt, weniger effektiv ist als die akute Phase und mehrere Präkonditionierungszyklen benötigt (Yellon et al., 2003; Bolli et al., 2000). Die Versuche und Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich allein auf die klassische, ischämische Präkonditionierung. Aus diesem Grund wird auf eine genauere Darstellung der verzögerten Phase verzichtet.

Seit der Entdeckung der ischämischen Präkonditionierung durch Murry et al. 1986 ist dieses Themengebiet Gegenstand zahlreicher Studien. So wurden zahlreiche Substanzen entdeckt, durch welche eine Präkonditionierung ausgelöst werden kann. Da dieser Effekt nicht mehr durch eine Ischämie sondern durch Pharmaka ausgelöst wird, wird in diesem Zusammenhang auch von der pharmakologischen Präkonditionierung (PPC) gesprochen.

2.3.2 Die Signaltransduktion der Ischämischen Präkonditionierung

Die Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. Sicher erscheint jedoch, dass mehrere verschiedene Signalkaskaden existieren und diese teilweise untereinander kreuzvernetzt sind und je nach Status des zytosolischen und mitochondrialen Energiemetabolismus und der elektrischen Aktivität der Zelle agieren.

So konnte gezeigt werden, dass der Adenosin A1 Rezeptor als ein Trigger der ischämischen Präkonditionierung fungiert, und dass eine Blockade des Adenosin-Rezeptors eine ischämische Präkonditionierung aufheben kann, wenn sie vor der Ischämiephase verabreicht wird (Thornton et al., 1993; Sommerschild et al., 2000; Liu et al., 1991). Heute weiß man, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren die ischämische Präkonditionierung triggern und dass mehrere Rezeptoren parallel den präkonditionierenden Stimulus unterstützen. Die Präkonditionierung konnte dabei in Tierversuchen durch Blockade des inhibitorischen G-Proteins (G_i) mit Pertussistoxin vollständig inhibiert werden. Während der kurzen Ischämiephase setzt das Herz Adenosin (Sakamoto et al., 1995), Bradykinin (Goto et al., 1995), Noradrenalin und Opioide (Miki et al., 1998; Mitchell et al., 1995) frei. Diese Substanzen aktivieren über ihre entsprechenden Rezeptoren und die damit verbundene Aktivierung des G-Proteins die Phospholipase C. Ferner erhöhen einige, aber nicht alle dieser Substanzen (Bradykinin, Norepinephrin und Opioide), die Bildung von ROS (Cohen et al., 2001).

Die Aktivierung des G-Proteins katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) sowie Diacylglycerol (DAG), was letztlich zu einer erhöhten Translokation der Proteinkinase C (PKC) vom Cytosol zur Außenmembran und in die Mitochondrien sowie zur Aktivierung der PKC führt (Liu et al., 1994; Ping et al., 1997; Ytrehus et al., 1994). Hierbei ist anzumerken, dass die Ischämie und nicht die Reperfusion in einem Hasenmodell zu der erhöhten Translokation der PKC führte (Ping et al., 1997; Bolli et al., 1990). Der erhebliche Einfluss der PKC zeigte sich auch in PKC-knock-out Mäusen, die im Gegensatz zu heterozygoten Vergleichstieren keine Reduktion der Infarktgröße nach ischämischer Präkonditionierung zeigten (Saurin et al., 2002). Ferner scheinen die verschiedenen Isoformen der PKC (insbesondere $PKC\epsilon$ und die $PKC\delta$) unterschiedliche Funktionen in der Präkonditionierung zu steuern. So konnte beispielsweise in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass der $PKC\epsilon$ -Aktivator ψ (epsilon)RACK und der $PKC\delta$ -Inhibitor δ V1-1 jeder für sich eine protektive Funktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten hat und dass sich diese Effekte in Kombination summieren (Inagaki et al., 2003). So führte die Aktivierung der $PKC\epsilon$ vor der

Ischämie und Reperfusion und die Hemmung der PKC δ während der Reperfusion zur Protektion. Insgesamt ist die PKC somit ein zentraler Mediator innerhalb der ischämischen Präkonditionierung. Direkte Aktivatoren der PKC, wie OAG (1-oleyl-2-acetyl glycerol) oder PMA (4-beta-phorbol 12-myristate 13 acetate), bewirken eine pharmakologische Präkonditionierung, eine Blockade der PKC beispielsweise mit Staurosporine oder Polymyxin B hebt die ischämische und pharmakologische Präkonditionierung wieder auf (Ytrehus et al., 1994).

Die PKC ist Bestandteil einer Kinase-Kaskade ist, welche mindestens eine Tyrosinkinase enthält und schließlich zu einer Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) p38 führt (Baines et al., 1999). Diese könnte dann über weitere Phosphorylierungsschritte zur Öffnung von ATP - abhängigen Kaliumkanälen (K_{ATP} -Kanäle) führen (Sato et al., 1998). Die gleichen Kanäle werden sowohl für die Präkonditionierung in Kaninchen durch den Succinatdehydrogenase-Blocker 3-Nitropropionic-Säure verantwortlich gemacht (Ockaili et al., 2001), als auch für die Präkonditionierung durch Blockade des Na^+ - H^+ -Austauschers durch Cariporide und Ethylisopropyl-Amilorid (Miura et al., 2001). Des Weiteren wurde die Existenz eines Calcium - abhängigen, mitochondrialen Kaliumkanals beschrieben, durch dessen Öffnung ebenfalls eine Präkonditionierung ausgelöst werden kann (Xu et al., 2002). Die ATP - abhängigen Kaliumkanäle werden detailliert im nächsten Kapitel behandelt. Wie viele andere Einzelschritte in der ischämischen bzw. pharmakologischen Präkonditionierung wird auch die Kinase-Kaskade mit Aktivierung der MAP-Kinase kontrovers diskutiert. So konnte die Arbeitsgruppe um Behrends et al. keine Korrelation bezüglich klassischer Präkonditionierung und MAPK-Phosphorylierung in Schweinen dokumentieren (Behrends et al., 2000).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ROS auf verschiedene Weise Einfluss auf die Ischämische Präkonditionierung haben und diese auch auslösen können (Tritto et al., 1997). In einer Versuchsreihe an Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie während der Präkonditionierung die mitochondriale ROS-Produktion steigert und dies die Protektion auslöse (Vanden Hoek et al., 1998). ROS führen zu einer Aktivierung von mehreren Kinasen, einschließlich der PKC und lösen dadurch eine Protektion aus. Es wurde auch nachgewiesen, dass präkonditionierende Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, Bradykinin, Opioide und Phenylephrin oder auch Diazoxid, aber nicht Adenosin die Entstehung von ROS triggern (Cohen et al., 2001). Es wurde diesbezüglich auch dokumentiert, dass Radikalfänger die ischämische Präkonditionierung blockieren können (Pain et al., 2000).

Weiterführend gibt es Berichte von Derek et al. an einem Rattenmodell, dass der mPTP (mitochondrial permeability transition pore) Bestandteil der Präkonditionierung sei. Diesbezüglich wurde von einer Verringerung der mPTP – Öffnung bis zu einer vollständigen Hemmung der mPTP – Öffnung berichtet, jeweils mit Steigerung der ROS – Produktion (Hausenloy et al., 2003 und 2004).

Auch von inhalativen Anästhetika ist bekannt, dass sie eine pharmakologische Präkonditionierung auslösen können (Riess et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass während einer Bypassoperation die postoperative Ausschüttung von Troponin und CK durch eine 5 minütige Exposition des Patienten mit Isofluran 10 Minuten vor kardioplegischem Herzstillstand und Klemmung der Aorta signifikant reduziert werden konnte (Belhomme et al., 1999). Auch der Einsatz von Sevofluran bei Operationen am Herzen reduzierte in einer retrospektiven Beobachtung von van der Linden et al. die Ausschüttung von Troponin T als auch die Anzahl von aufgetretenen low-output –Komplikationen (van der Linden et al., 2003). Bei den inhalativen Anästhetika handelt es sich um lipophile Substanzen, welche gut durch Membranen diffundieren können. Es kommt durch diese Substanzen zu Interaktionen mit lipophilen Aminosäuren, wodurch Konformationsänderungen in Membranen, Kanälen und Enzymen auftreten können (Eckenhoff et al., 1997). Dabei wurden auch Änderungen des mitochondrialen Elektronentransportes mit erhöhtem Leckstrom und gesteigerter Bildung von ROS beschrieben (Kissin et al., 1983; Kevin et al., 2003; Mullenheim et al., 2002), welche schließlich über die Aktivierung der PKC (Riess et al., 2003; Zaugg et al., 2002) zu einer Öffnung von K_{ATP} führt (Patel et al., 2002). Ferner wurde in diesem Zusammenhang an einem Kaninchenmodell eine Desfluran-induzierte Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des mPTP nach Calcium-Exposition gefunden. Diese Verringerung war wiederum durch einen K_{ATP} - Blocker inhibierbar (Piriou et al., 2004).

Auch eine kurzzeitige, präischämische Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führte über eine Inhibition der Rho-Kinase sowie eine Deaktivierung des Aktins während der Ischämie zu einer PKC-unabhängigen Präkonditionierung in einem Tiermodell mit Hunden (Sanada et al., 2004). Auch in Rattenherzen wurde in einem Protokoll mit Ischämie und Reperfusion ebenfalls eine erhöhte Aktivität der PKA dokumentiert. Darüber hinaus konnten steigende cAMP-Spiegel bei Durchführung mehrerer Präkonditionierungszyklen gemessen werden sowie Daten erhoben werden, die eine Triggerung der Präkonditionierung durch beta-adrenerge Stimulation zeigen (Lochner et al., 1999).

Eine schematische Darstellung der Signalwege bei ischämischer Präkonditionierung findet sich in Abbildung 5.

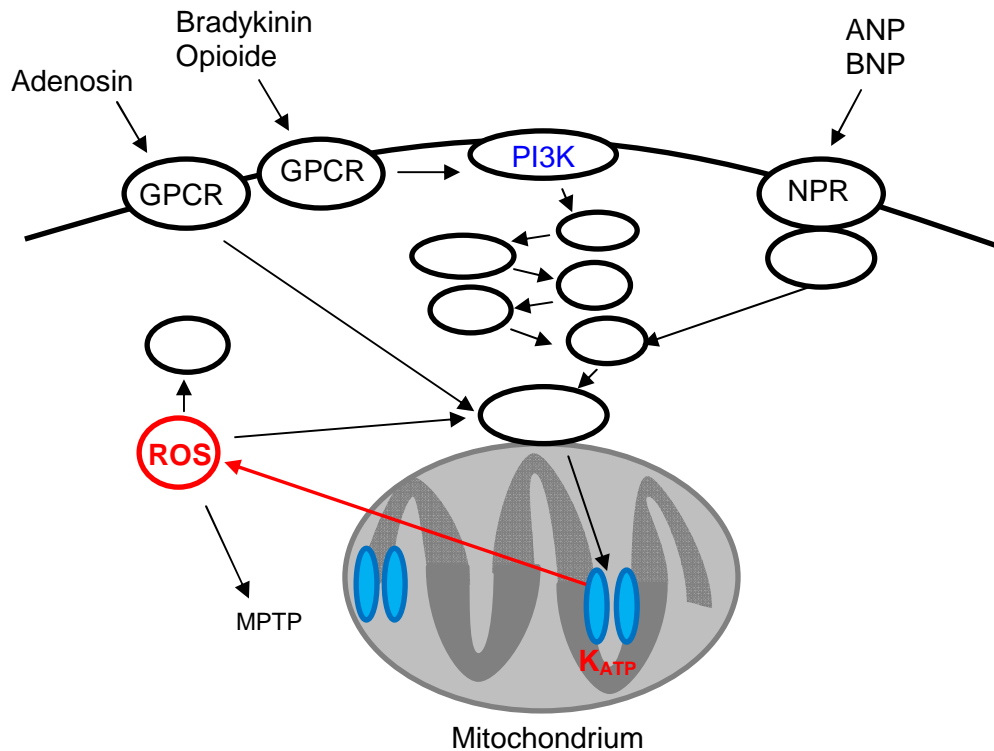


Abbildung 5: Signaltransduktion der ischämischen Präkonditionierung (modifiziert nach Heusch et al., 2008).

ANP, atrial natriuretisches Peptid; BNP, brain natriuretisches Peptid; NPR, natriuretischer Peptid Rezeptor; pGC, partikuläre Guanylylzyklase; sGC lösliche Guanylylzyklase; eNOS, endotheliale NO-Synthase; p38, p38 mitogen aktivierte Protein Kinase; PKC, Protein Kinase C; PKG, Protein Kinase G; GPCR, G-Protein gekoppelter Rezeptor; PI3K, Phosphoinositol 3 Phosphat Kinase; MPTP, mitochondrial permeability transition pore.

2.3.3 ATP – abhängige Kalium (K_{ATP}) Kanäle

K_{ATP} Kanäle kommen im menschlichen Körper in verschiedenen Geweben vor. Ihre bekannteste Funktion ist die Steuerung der Insulinfreisetzung aus den beta-Zellen des Pankreas durch Modulation des Membranruhepotentials der insulinfreisetzenden Zelle (Aguilar-Bryan et al., 1995). Ein anderer bekannter Mechanismus ist die Regulation des Membranpotentials von glatten Muskelzellen, durch welches die Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle und letztlich der arterielle Diameter bzw. der periphere Gefäßwiderstand reguliert wird (Quayle et al., 1997). Öffner des K_{ATP} werden als Antihyperglykämika (Proglidem©) und Reserve-Antihypertonika verwendet.

Im Myokard wurden K_{ATP} Kanäle erstmals 1983 im Sarkolemma der Myozyten von Noma et al nachgewiesen (Noma et al., 1983). Die Arbeitsgruppe um Inoue et al. konnte 1991 mittels patch-clamp Experimente einen Kanal mit geringer Leitfähigkeit (9,7 pS) und hoher Selektivität für Kalium in der inneren Membran von Mitochondrien aus der Leber von Mäusen nachweisen. Dieser Kanal wurde reversibel durch die Applikation von ATP auf der Matrix-

Seite ebenso gehemmt wie pharmakologisch durch 4-Aminopyridin und Glibenclamid (Inoue et al., 1991). Während die Struktur des sarcK_{ATP} aufgeschlüsselt werden konnte und die Existenz damit bewiesen wurde, ist die Struktur des mitoK_{ATP} bis heute unbekannt und seine Existenz insgesamt noch umstritten.

K_{ATP} Kanäle werden durch hohe Spiegel von ATP inhibiert und durch niedrige Spiegel aktiviert. Die Kaliumkanäle und deren Modulation durch verschiedene Pharmaka sind daher von den äußeren Bedingungen, wie beispielsweise ADP und ATP – Konzentration, aber auch pH-Wert und der eingesetzten Konzentration des Pharmakon abhängig. Ebenfalls zeigen sich Unterschiede, ob mit vollständigen Zellen oder isolierten Zellorganellen, z.B. isolierten Mitochondrien, gearbeitet wird.

Seit bekannt wurde, dass die K_{ATP} Kanäle Einfluss auf die Ischämische Präkonditionierung haben, wurden sie immer wieder als Mediatoren oder mögliche Endeffektoren der ischämischen bzw. pharmakologischen Präkonditionierung diskutiert. So bewirken K_{ATP}-Kanal Öffner wie Cromakalim (Tan et al., 1993), Bimakalim, RP 52891 oder Pinacidil (Cole et al., 1991) eine Präkonditionierung des Myokards. Im Umkehrschluss können K_{ATP} - Blocker wie Glibenclamid den protektiven Effekt einer ischämischen (und häufig auch der pharmakologischen) Präkonditionierung aufheben (Gross et al., 1992). Die verschiedenen Kaliumkanäle, die Spezifität der verwendeten Kanal-Modulatoren sowie Theorien über die Wirkungsweise der Kaliumkanäle sollen nun im Folgenden erläutert werden.

2.3.3.1 Der sarkolemmale K_{ATP} – Kanal (sarcK_{ATP})

Der sarcK_{ATP} Kanal besteht aus einem Tetramer aus gleichgerichteten Kaliumkanälen (KIR 6.x), welche von 4 Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) umgeben sind (Shyng et al., 1997) und somit insgesamt ein Oktamer bilden. Es existieren 3 SUR- Isoformen (SUR1 und die Splice Varianten SUR2a und SUR2b) sowie mehrere KIR6.x Untereinheiten. Nach den Ergebnissen von Inagaki und Mitarbeitern mittels Isolation von cDNA ist die prädominante pankreatische Form des Kaliumkanals aus SUR1 und Kir6.2 zusammengesetzt (Inagaki et al., 1995), besitzt eine Leitfähigkeit von 76 nS und ist sensibel auf Diazoxid (Inagaki et al., 1995). Die sarkolemmale, myokardiale Isoform wurde hingegen als SUR2a kombiniert mit KIR6.2 identifiziert ohne Nachweis einer Reaktion auf Diazoxid (Inagaki et al., 1996). Bei Mäusen hingegen konnten Flagg et al. (2008) nachweisen, dass im Vorhofmyokard der sarcK_{ATP} Kanal aus SUR1 und KIR6.2 zusammengesetzt ist. An KIR6.1 defizienten Mäusen zeigte sich keine Vasodilatation auf den K_{ATP}-Kanal Öffner Pinacidil, sowie ein gehäuft vorkommender plötzlicher Herztod der Versuchstiere mit ST-Hebungen. Dies deutet auf eine Beteiligung von KIR6.1 in den glatten Muskelzellen der Gefäße von Mäusen hin (Miki et al., 2002). In Tierversuchen mit Meerschweinchen mit patch-clamp konnte gezeigt werden, dass

eine regionale oder globale Verringerung des ATP-Spiegels, beispielsweise durch metabolischen Stress (O'Rourke et al., 1994), zur Öffnung der $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanals führt. Die Leitfähigkeit des Kanals wurde mit 195 nS angegeben (Nichols et al., 1991).

Der $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanal besitzt eine hohe ATP-Sensitivität *in vitro* mit einer IC_{50} von 10-50 μM . Die ATP-Sensitivität wird unter anderem durch ADP, Phosphatidylisoinitol-Phosphat, und acyl-CoA-Ester gesenkt, so dass *in vivo* solche Sensitivitätswerte nicht erreicht werden. Das wichtigste Nukleotid für die Beeinflussung des $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanals ist ADP (Weiss et al., 1993). So wird bei inhibitorischen ATP-Konzentrationen durch Binden von Mg-ADP oder Mg-GDP an die zweite Nukleotidbindungsstelle der Kanal geöffnet (Nichols et al., 1996; Shyng et al., 1997). Die Bindung von ATP an der zweiten Nukleotidbindungsstelle führt zur Hydrolyse des ATP (Bienengraeber et al., 2000) mit konsekutiver Konformationsänderung des Kanals (Zingman et al., 2002).

Die Öffnung des $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanals im Myokard führt zu einer Hyperpolarisation der Membran, wodurch die Phase 3 des kardialen Aktionspotentials (Repolarisation) beschleunigt wird und damit die Aktionspotentialdauer (APD) abnimmt oder die Zelle sogar unerregbar wird (Noma et al., 1983). Durch eine stärkere Repolarisation kommt es zu einer Hemmung des intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms durch L-Typ-Kanäle und damit zu einem Schutz vor einer Ca^{2+} -Überladung in der Ischämie (Noma et al., 1983). Es ist bekannt, dass während Ischämie / Reperfusion durch einen Anstieg der cytosolischen Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) der sarkomere $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher bevorzugt im rückwärts gerichteten Modus (sog. „reverse-mode“) fungiert, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom führt. Da der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher durch Transport von 3 Na^+ Ionen gegen 1 Ca^{2+} Ion elektrogen ist, verringert eine K_{ATP} -induzierte Hyperpolarisation der Zellmembran einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher-vermittelten Ca^{2+} Einstrom (Baczko et al., 2004 und 2005).

Während eines Präkonditionierungszyklus kommt es zu einer Hebung der ST-Strecke im EKG. Werden mehrere Präkonditionierungszyklen durchgeführt, so kann eine schrittweise Verringerung der ST-Hebung beobachtet werden. In Tierversuchen mit Kaninchen konnte diese Reduktion durch den $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanal Blocker HMR aufgehoben werden, ohne den Präkonditionierungseffekt zu blockieren. Dies deutet darauf hin, dass die EKG-Veränderungen zwar durch den $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ ausgelöst werden, dies aber ein von der Präkonditionierung unabhängiger Effekt ist (Birincioglu et al., 1999).

2.3.3.2 Der mitochondriale K_{ATP} -Kanal (mito K_{ATP})

Der mito K_{ATP} Kanal wurde im Jahre 1991 von Inoue et al. erstmals beschrieben (Inoue et al., 1991), allerdings ist die Struktur des Kanales bis heute nicht bekannt. Inoue konnte mittels patch clamp in Mitochondrien aus Rattenmyozyten einen hochselektiven und ATP sensitiven Kaliumkanal nachweisen, welcher eine Leitfähigkeit von 9,7 pS besaß.

Pharmakologisch zeigt der mito K_{ATP} ähnliche Eigenschaften wie der sarkomale Kanal, was vermuten ließ, dass der mito K_{ATP} ebenfalls aus KIR und SUR Einheiten bestehe. Insbesondere eine *in vitro* Kanal-Rekonstruktion bestehend aus KIR6.1 und SUR1 zeigte hier eine deutliche Übereinstimmung der pharmakologischen Eigenschaften (Liu et al., 2001). Unterstützend wurde in einer Studie von Suzuki bereits 1997 mit Hilfe eines Antikörpers gegen Kir6.1 (12 Aminosäuren) dieses Protein in Mitochondrien lokalisiert (Suzuki et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Singh wies sowohl KIR6.1, KIR6.2 als auch SUR2a in Ratten-Mitochondrien nach (Singh et al., 2003). Bestärkt wurde diese Theorie dadurch, dass man im Mitochondrium ein 63 kDa großes Sulfonylharnstoff-Protein identifizieren konnte sowie passend dazu eine mögliche kanalformende Untereinheit mit einer Größe von 55kDa (Grover et al., 2000). Dieser von Paucek untersuchte Kanal zeigte differierend zu Inoue eine Leitfähigkeit von 30pS und war durch ATP und ADP inhibierbar, aber nur in der Gegenwart von Mg^{2+} oder Ca^{2+} (Paucek et al., 1992). Die Arbeitsgruppe um Zhang arbeitete mit Gewebe aus Rindern und isolierte ebenfalls einen K_{ATP} aus Mitochondrien, der allerdings eine Leitfähigkeit von 56 pS hatte (Zhang et al., 2001). Von Ardehali gibt es hingegen Ergebnisse aus dem Jahr 2004, welche den mito K_{ATP} Kanal als Bestandteil eines makromolekularen Proteinkomplexes mit Einbeziehung der Succinatdehydrogenase beschreiben (Ardehali et al., 2004). Des Weiteren wurde auch ein kaliumselektiver, spannungsabhängiger und Ca^{2+} aktivierter Kaliumkanal vom BK-Typ im Mitochondrium nachgewiesen, welcher auch myokardiale Protektion vermitteln kann (Siemen et al., 1999; Xu et al., 2002). Im Gegensatz dazu beobachteten andere, dass weder KIR6.1 noch KIR6.2 Bestandteil des mito K_{ATP} sind. Seharaseyon et al. beobachteten, dass mittels Virusinfektion mit dominant-negativen KIR6.1 und KIR6.2 Kanaluntereinheiten nur der sarco K_{ATP} , nicht aber des mito K_{ATP} beeinträchtigt wurde (Seharaseyon et al., 2000; Suzuki et al., 2000).

In Immunoblot-Analysen konnte in kardialen Mitochondrien KIR6.1 (Suzuki et al., 1997; Singh et al., 2003; Cuong et al., 2005; Lacza et al., 2003), aber nicht SUR1 nachgewiesen werden. In einer Kontroll-Untersuchung von Foster et al., in welcher die mittels Immunoblot detektierten Proteine weiter untersucht und analysiert wurden, stellten sich die putativen

KIR6.1 – Einheiten als NADH-Dehydrogenase Flavoprotein 1 bzw. als eine Isocitrat – Dehydrogenase heraus, so dass die Spezifität dieser Antikörper angezweifelt werden muss (Foster et al., 2008). Da ferner in KIR6.1 knockout – Mäusen eine Öffnung des mitoK_{ATP} Kanals durch Diazoxid nachgewiesen wurde (Miki et al., 2002), ist insgesamt eine Zusammensetzung des mitochondrialen Kaliumkanales aus KIR6.1 und SUR 1 extrem unwahrscheinlich.

Der mitoK_{ATP} Kanal wird durch ATP, ADP, Palmitoyl-CoA und Oleyl-CoA (Paucek et al., 1996) kompetitiv inhibiert und diese Hemmung wird durch GTP und GDP antagonisiert (Garlid et al., 1996; Paucek et al., 1992). Superoxid-Radikale führen zu einer Öffnung des mitoK_{ATP} Kanals (Zhang et al., 2001). Die Öffnung des mitoK_{ATP} Kanals führt zu einem Einstrom von Kalium in das Mitochondrium. Mittels einer patch clamp Untersuchung mit gleichzeitiger Messung der Lichtbrechung an Mitochondrien aus einer Rattenleber konnte von Szewczyk et al. nachgewiesen werden, dass der Kaliumfluss mit einem Anstieg des mitochondrialen Matrixvolumens korreliert, welches sich an einer Änderung der Lichtbrechung zeigte (Szewczyk et al., 1993). Durch den Kaliumstrom wird der K⁺ - H⁺ - Antiporter, eine wichtige Komponente in der Volumen-Homöostase des Mitochondriums (Brierley et al., 1977; Garlid et al., 2003) überlastet, was zu einem Anstieg des Matrixvolumens führt. Durch den K⁺ - H⁺ - Antiporter wird die Atmungskette teilweise entkoppelt, da der durch den Citratzyklus gewonnene H⁺-Gradient nicht zur Synthese von ATP verwendet wird, sondern zum Transport der Kaliumionen. Es kommt hierdurch zu einem Absinken des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) (Garlid et al., 2000) und zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, sowie zu einer Abnahme des zellulären ATP-Spiegels. Der NADH Verbrauch übersteigt schließlich die NADH Produktion und es kommt zu einer Oxidation von Flavoproteinen, welche mittels Fluoreszenz gemessen werden kann (Liu et al., 1998). Diese Methode diente in mehreren Versuchen als indirekter Nachweis eines mitochondrialen KaliumEinstroms. Der KaliumEinstrom in die Mitochondrien führt wiederum zu einer erhöhten Produktion von ROS (Krenz et al., 2002; Oldenburg et al., 2003), vermutlich über eine Oxidation des NADPH pools, welcher zur Entgiftung von ROS benötigt wird (Kohlhaas et al., 2010; Maack et al., 2011).

2.3.3.3 Diazoxid – mitoK_{ATP}-Kanal Öffner

Diazoxid wird als spezifischer Öffner des mitoK_{ATP} Kanals verwendet. Garlid et al. (1996) zeigten an Mitochondrien aus Rattenleber eine 1000- bis 2000-fache Selektivität von Diazoxid für den mitoK_{ATP} gegenüber dem sarcK_{ATP} Kanal. Ferner zeigten sie, dass die oben beschriebenen Effekte der Öffnung des mitoK_{ATP} Kanals inklusive der Protektion bei Ischämie/Reperfusion durch Diazoxid auslösbar sind (Kowaltowski et al., 2001). Paucek et al.

zeigte darüber hinaus, dass die durch Palmitoyl und Oleoyl hervorgerufene Hemmung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals durch Diazoxid aufgehoben werden kann (Paucek et al., 1996). Liu et al. wiesen an ventrikulären Kaninchen-Myozyten mittels Flavoprotein-Oxidation eine Wirkung von Diazoxid am mitochondrialen und nicht am sarkolemmalen Kaliumkanal nach sowie eine Protektion bei simulierter Ischämie (Liu et al., 1998). Die Konzentration für den halbmaximalen Effekt betrug in der Versuchsreihe von Garlid an rekonstituierten K_{ATP} Kanälen beim $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 0,5-0,8 $\mu\text{mol/l}$ vs. 840 $\mu\text{mol/l}$ für den $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanal (Garlid et al., 1997). Eine Aktivierung des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ wurde von D'Hahan nur bei hohen Dosen von Diazoxid und hohen Spiegeln von ADP nachgewiesen (D'Hahan et al., 1999).

Für Diazoxid wurden in verschiedenen Studien auch K_{ATP} -unabhängige Effekte beschrieben. Ein solcher scheint die Blockade der Succinatdehydrogenase zu sein (Lim et al., 2002). Es konnte eine dosisabhängige Blockade der Succinatdehydrogenase ohne Effekt auf die NADH-Oxidation (wie bei K_{ATP} -Kanal Öffnung) gezeigt werden (Hanley et al., 2002). Die Arbeitsgruppe um Ovide-Bordeaux zeigte, dass ein Diazoxid-Effekt auf die Kinase-Aktivität des Mitochondriums (Ratte) nur nachweisbar war, wenn Succinat als Substrat gegeben wurde, implizierend dass die protektive Wirkung von Diazoxid eventuell ausschließlich von der Succinat-Dehydrogenase-Hemmung abhängt (Ovide-Bordeaux et al., 2000). Des Weiteren konnten Holmuhamedov et al. unter kaliumfreien Bedingungen zeigen, dass Diazoxid den transmembranösen Protonentransport durch die Phospholipid-Membran erleichtert und so als direkter Protonenpumpenentkoppler agieren kann (Holmuhamedov et al., 2004). Zuletzt wurde auch eine Beeinträchtigung der ATP-Synthase durch Diazoxid beschrieben. Dabei bindet Diazoxid an die β -Untereinheit der IF1 der F₀F₁-ATPsynthase, was letztlich zu einer Hemmung der ATP-Synthase führt (Contessi et al., 2004).

2.3.3.4 P1075 – $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ -Öffner

Ein $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ -Kanal Inhibitor ist P1075, ein Pinacidil-Derivat. Die Substanz bindet mit hoher Affinität an SUR2A und SUR2B in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP (Hambrock et al., 1999). Die Selektivität wurde unter anderem in isolierten Kardiomyozyten aus Kaninchen (Sato et al., 2000) und aus Mäusen nachgewiesen (Suzuki et al., 2000). Der Kaliumfluss des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ wurde hierbei mittels patch clamp direkt gemessen, die Flavoproteinoxidation als Marker für mitochondriale Aktivität zeigte keine Änderungen. Abweichend davon beobachtet die Arbeitsgruppe um Jilkina in mehreren Versuchsreihen in Langendorff-perfundierten Rattenherzen eine P1075-induzierte Entkopplung der Atmungskette, vergleichbar mit Dinitrophenol, einem mitochondrialen Protonenpumpenblocker und führte dies auf eine Aktivierung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals zurück (Jilkina et al., 2002 und 2003). Oldenburg et al. rekonstruierte mitochondriale Proteine aus den Herzen von Kaninchen und Ratten in

Liposomen und wies eine erhöhte ROS-Produktion durch P1075 nach und schloss auf eine Aktivierung des mitoK_{ATP} Kanals (Oldenburg et al., 2003).

2.3.3.5 5-Hydroxydecanoat (5-HD) – mitoK_{ATP}-Kanal Blocker

5-Hydroxydecanoat wiederum gilt als spezifischer Blocker des mitoK_{ATP} und blockt die Diazoxid-induzierte Öffnung des Kanals mit einer K_i von 45-85 µmol/l. In zahlreichen Studien, unter anderem an Hunden *in vivo* (Auchampach et al., 1992), an isolierten Rattenmitochondrien (Jaburek et al., 1998) und an Kaninchenmyozyten *in vitro* (Liu et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass 5-HD die Effekte von Diazoxid inhibiert (Garlid et al., 1997). Die Wirksamkeit von 5-HD auf den Kaliumkanal ist dabei von der ATP Konzentration abhängig. So ist bei Abwesenheit von ATP und Mg²⁺ eine Hemmung des Kaliumkanales durch 5-HD nicht möglich (Jaburek et al., 1998). Ferner führt eine Applikation von cAMP oder cAMP-abhängiger PKA zur Reaktivierung des mit 5-HD-geblockten Kanals. Proteinkinase-Inhibitoren erhöhen die Wirkung von 5-HD und ATP (Notsu et al., 1992). Eine Beeinflussung des sarcK_{ATP} Kanals durch 5-HD ist bei niedrigen pH-Werten (pH 6,6) oder bei sarkolemmaler Kanalaktivierung aufgrund hoher Spiegel von ADP beschrieben.

Auch für 5-HD wurden K_{ATP} Kanal unabhängige Wirkungen beschrieben. In einer Studie von Lim und Mitarbeitern wurde an isolierten Mitochondrien aus Rattenherzen ein Anstieg des Matrixvolumens (ähnlich wie bei Diazoxid) beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass 5-HD durch die Acyl-CoA-Synthetase in 5-HD-CoA umgewandelt wurde und so als Substrat für den Citratzyklus dient (Lim et al., 2002). Diese Umwandlung von 5-HD wurde durch die Arbeitsgruppe von Hanley et al. bestätigt (Hanley et al., 2002).

2.3.3.6 HMR 1098 (1883) – sarcK_{ATP}-Blocker

HMR 1098 ist das Salz von HMR 1883. Beide Substanzen werden gleichermaßen als sarcK_{ATP} – Kanal Blocker eingesetzt. Sato und Mitarbeiter (2000) fanden keine mitochondriale Aktivität bezüglich HMR 1098 bei Tierversuchen mit Kaninchen. Die Selektivität für den sarcK_{ATP} Kanal wurde in verschiedenen Studien divergierend beschrieben. So blockierte HMR 1883 eine pharmakologisch durch Diazoxid ausgelöste Präkonditionierung bei Kaninchen (Birincioglu et al., 1999), aber in der gleichen Versuchsreihe wurde eine klassische ischämische Präkonditionierung mit mehreren Indexischämien nicht durch HMR 1883 beeinflusst. Eine Hemmung des mitoK_{ATP} wurde in isolierten Kaninchenmyozyten ausgeschlossen, jedoch wird auch hier eine hemmende

Wirkung des Diazoxid induzierten Effektes divergierend beschrieben, was wiederum auf eine Beeinflussung des mitoK_{ATP} schließen lassen würde.

2.3.3.7 Effekte der K_{ATP} – Kanal Öffnung auf die Protektion des Herzens

Es ist unbestritten, dass durch die Öffnung von K_{ATP} Kanälen die Effekte der ischämischen Präkonditionierung imitiert werden können. Keine Einigkeit besteht jedoch darin, welcher Kaliumkanal, der sarcK_{ATP} oder der mitoK_{ATP} Kanal, für die Protektion verantwortlich ist.

Noma und Mitarbeiter zeigten bereits 1983, dass eine Öffnung der sarcK_{ATP} Kanäle einen protektiven Effekt auf Zellen hat (Noma et al., 1983). Diese Protektion beruhte nicht auf einer sekundären Wirkung der Kaliumkanal-Öffner. Jovanovic zeigte, dass in K_{ATP}-Kanal defizienten Zellen keine Protektion möglich war und nach Cotransfection mit KIR6.2/ SUR2a, den Komponenten des sarcK_{ATP}, eine Protektion möglich wurde (Jovanovic et al., 1998). Ferner konnte Budas in Meerschweinchen Myozyten eine Protektion durch Öffnung des sarcK_{ATP} Kanals nachweisen. Außerdem zeigte sich mittels Immunoblot und konfokaler Lasermikroskopie eine Heraufregulation von sarcK_{ATP} Kanal Komponenten nach Ischämie und Reperfusion (Budas et al., 2004).

Die Verkürzung der APD, welche durch Öffnung des sarcK_{ATP} Kanals inklusive der Auswirkungen auf die Calcium abhängigen Systeme hervorgerufen wird, ist immer wieder als Effektor der ischämischen bzw. pharmakologischen Präkonditionierung diskutiert worden. Die hierzu durchgeführten Versuche zeigen divergierende Ergebnisse. Yao und Gross zeigten an einem Tiermodell mit anästhesierten Hunden, dass die Öffnung des sarcK_{ATP} Kanals die ischämische Präkonditionierung unterstützt und dass dieser Effekt auf die APD-Verkürzung zurückzuführen sein könnte (Yao et al., 1994). Dies wird unterstützt von den Versuchen von Schulz et al. an Schweinen. Dort wurde nachgewiesen, dass sowohl die Aktionspotentialverkürzung als auch der protektive Effekt gleichermaßen durch den unspezifischen Kaliumkanalblocker Glibenclamid aufgehoben wurde (Schulz et al., 1994). Ferner konnte gezeigt werden, dass Digoxin die ischämische Präkonditionierung durch Inhibition des sarcK_{ATP} Kanals blockiert (Haruna et al., 1998).

Dem gegenüber steht eine Reihe von Versuchen, deren Ergebnisse den mitoK_{ATP} als den ursächlichen der Präkonditionierung sehen. So wurde in einem Versuchprotokoll mit ischämischer Präkonditionierung und Ischämie / Reperfusion der Einfluss von HMR 1883 sowie Glibenclamid an Kaninchen untersucht. Beide Substanzen verhinderten die durch den sarcK_{ATP} Kanal hervorgerufene Aktionspotentialverkürzung, aber nur Glibenclamid, das sowohl mitoK_{ATP} als auch sarcK_{ATP} Kanäle inhibiert, hob den protektiven Effekt der

ischämischen Präkonditionierung wieder auf und zeigte dadurch keine Verbindung von APD-Verkürzung und Präkonditionierung (Jung et al., 2000). Zum gleichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe um Grover mit dem Klasse III-Antiarrhythmikum Dofetilid, welches in Hunden die APD-Verkürzung verhinderte, den protektiven Effekt einer Präkonditionierung aber nicht blockierte (Grover et al., 1996). Garlid zeigte 1997, dass eine Behandlung mit Diazoxid oder mit dem unspezifischen Kaliumkanalöffner Cromakalim eine äquipotente Protektion vor kardialer Kontraktur bei Langendorff-perfundierten Rattenherzen bewirkt, wobei Diazoxid eine signifikant geringere APD-Verkürzung verursacht und diese Effekte sowohl durch 5-HD als auch Glibenclamid aufgehoben werden können. Es wurde daraus geschlossen, dass der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal für die Protektion verantwortlich sei (Garlid et al., 1997). Auchampach et al. kamen zu dem gleichen Ergebnis, als sie mit 5-HD protektive Effekte von Cromakalim inhibierten, die APD-Verkürzung aber unverändert fortbestand (Auchampach et al., 1992). Auch in anderen Studien wurde keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der APD-Verkürzung und der Reduktion der Infarktgröße nachgewiesen (Grover et al., 1995 und 1996).

Die Diskussion um die mitochondrialen und sarkolemmlen Kaliumkanäle wurde durch Experimente von Suzuki et al. mit KIR6.2 knock out (KO) Mäusen neu entfacht. Eine ischämische Präkonditionierung schützte Wildtyp Mäuse, aber nicht die KIR6.2 KO-Mäuse während der langen Ischämiephase und der folgenden Reperfusion trotz erhaltener Funktion des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals. Des Weiteren schützte der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Öffner Diazoxid die Wildtyp-Mäuse, aber nicht die KIR6.2 KO Mäuse durch Aktivierung des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ und signifikanter Verkürzung der APD während der Ischämie (Suzuki et al., 2003). Die Herzfrequenz bei Mäusen ist ungefähr 10-fach höher als im Menschen und auch im Vergleich zu anderen Nagern zwei- bis dreifach erhöht. Dies führt in der Ischämiephase vermutlich zu einem schnelleren Abfall der ATP-Konzentration als in anderen Tieren oder im Menschen. Da Diazoxid in Gegenwart hoher Konzentrationen von ADP und AMP auch den $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ öffnet, könnte die Öffnung des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanals darauf zurückzuführen sein, was jedoch nicht die fehlende Protektion in den KO-Tieren erklärt. Die Ergebnisse könnten auch auf spezies-abhängige Unterschiede im Bezug auf den Einfluss der K_{ATP} Kanäle bei der Präkonditionierung oder auf Wirkungsunterschiede der verschiedenen Pharmaka in den verschiedenen Spezies hinweisen.

Insgesamt lässt sich resümieren, dass sowohl die genauen Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung, insbesondere hinsichtlich der möglicherweise beteiligten K_{ATP} Kanäle, als auch die Spezifität der K_{ATP} -Kanal Aktivatoren oder Inhibitoren unvollständig geklärt und sogar umstritten ist. Ein wichtiger Aspekt der Kontroverse ist, dass viele der durchgeführten

Studien nicht an arbeitendem Myokard durchgeführt worden sind oder an einzelnen Zellorganellen, und dass oftmals nicht selektive K_{ATP} -Kanal Öffner und –Blocker verwendet wurden mit eingeschränkter Aussagekraft. Nicht zuletzt durch die Arbeit von Suzuki et al. mit KIR6.2 KO Mäusen ist der Verdacht aufgekommen, dass es in der ischämischen Präkonditionierung Spezies-spezifische Unterschiede in der ischämischen Präkonditionierung gibt und / oder unterschiedliche pharmakologischen Eigenschaften der verwendeten Substanzen existieren, welche die Übertragbarkeit auf den Menschen beeinträchtigen oder gar unmöglich machen könnten.

2.3.4 Fragestellungen der Arbeit I

Aus den angegebenen Gründen stellen sich daher die Fragen

- (1) der Spezifität der K_{ATP} - Öffner Diazoxid bzw. P1075 und der entsprechenden Blocker 5-HD und HMR 1098 im menschlichen Myokard. Hierfür wurden Experimente an isolierten, elektrisch stimulierten, rechtsatrialen Trabekeln durchgeführt
- (2) der jeweiligen Wirkungen der K_{ATP} Kanal Modulatoren auf die durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufene kontraktile Dysfunktion am schlagenden menschlichen Myokard. Für diese Experimente wurden ebenfalls isolierte, elektrisch stimulierte, rechtsatriale Trabekel verwendet.

Eine weitere Interpretationsmöglichkeit der Daten zeigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Light et al. bei einem Modell mit chemisch induzierter Ischämie an Rattenmyozyten. Hier konnte zum einen ein Einfluss von 5-HD auf den $sarck_{ATP}$ Kanal ausgeschlossen werden und ferner gezeigt werden, dass HMR ausschließlich auf den $sarck_{ATP}$ Kanal wirkt. Aber in Bezug auf den protektiven Effekt zeigten sich verschiedene Einflüsse der Modulatoren. Gemessen wurde die Calcium-Überladung während chemisch induzierter Ischämie und während der Reoxygenierung. Der protektive Status wurde durch den PKC Aktivator PMA induziert. Es zeigte sich, dass 5-HD die Protektion während der Ischämiephase vermindert, aber während der Reoxygenierung keinen Einfluss hat. HMR 1098 hingegen hatte auf die Protektion während der Ischämie keinen Einfluss, führte aber zu einer Calcium-Überladung in der Reoxygenierung. Insgesamt reduzierte jeder Blocker für sich die Protektion zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt und damit den Endfaktor Zellüberleben. Das Ausmaß der Protektion war unterschiedlich und zeigte in diesem Modell einen größeren Effekt des $sarck_{ATP}$ Kanals. Erwähnenswert ist auf jeden Fall die Tatsache, dass die kombinierte Blockade von $sarck_{ATP}$ und $mitoK_{ATP}$ ein schlechteres Outcome hatte als die nicht vorbehandelte Gruppe (Light et al., 2001). In einer 1994 durchgeführten Studie hatte Yao in einer Studie mit dem K_{ATP} Kanal Öffner Bimakalim vermutet, dass es zwei

Protektionsmechanismen gäbe, wobei der in einer APD-Verkürzung besteht und der andere unabhängig davon wirkt (Yao et al., 1994).

Die Theorie, dass beide Kanäle unterschiedliche Protektionsmechanismen haben, beschrieb auch Toyoda et al. Er beschrieb in einem Ischämie / Reperusionsmodell einen „Infarkt-reduzierenden“ Effekt durch den $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal während der Ischämiephase und einen „Funktion-wiederherstellenden“ Effekt während Ischämie und Reperfusion durch den $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanal (Toyoda et al., 2000).

2.3.5 Fragestellung der Arbeit II

Es stellte sich daher ferner die Frage

- (3) ob die sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} Modulatoren in der Reperusionsphase, in welcher vermehrt ROS freigesetzt werden, einen von der Ischämiephase abgrenzbaren protektiven Effekt am schlagenden, menschlichen Myokard haben. Hierfür wurden Experimente an isolierten, elektrisch stimulierten rechtsatrialen Trabekeln durchgeführt. Zur Herstellung der Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) diene Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Verbindung mit dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}).

Betrachtet man nun die Effekte der ischämischen Präkonditionierung im Vergleich mit der initialen Ausgangsbeobachtung der Resistenz von herzinsuffizientem Gewebe gegenüber ROS, so kommen wir zu weiteren Fragestellungen dieser Arbeit.

2.3.6 Fragestellungen der Arbeit III

Es stellt sich daher die Frage, ob die diese Resistenz von menschlichem, insuffizientem Myokard auf einer chronischen Präkonditionierung des Myokards durch erhöhte Spiegel von ROS beruhen könnte, also auf eine dauerhafte ischämische Präkonditionierung. Es sollte daher zusätzlich untersucht werden,

- (4) ob K_{ATP} Kanal Blocker Einfluss auf die Resistenz gegenüber Radikalen von insuffizientem, linksventrikulären, menschlichen Myokard haben. Für diese wurde ventrikuläres Myokard von terminal herzinsuffizienten Patienten verwendet, welche sich einer Herztransplantation unterziehen mussten.
- (5) ob der Mechanismus dieser Resistenz in einer Heraufregulation der K_{ATP} im insuffizienten Myokard besteht. Zu diesem Zweck wurde linksventrikuläres, menschliches Myokard von terminal herzinsuffizienten Patienten (ischämische Kardiomyopathie und dilatative Kardiomyopathie) und von gesunden Herzen mittels Western-Blot-Analyse auf die potentiellen Bestandteile der Kaliumkanäle (KIR6.1, KIR 6.2, SUR1, SUR2) untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchsmaterial

3.1.1.1 Rechtsatriales Myokard

Die Arbeit wurde durch die lokale Ethik Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (Nummer 131/00) genehmigt. Alle Patienten wurden informiert und erteilten ihre Zustimmung. In der vorliegenden Arbeit wurde rechtsatriales Myokard von insgesamt 111 Patienten (84 männlich (75,7%), 27 weiblich (24,3%)) untersucht. Das Durchschnittsalter betrug 63.3 ± 1.5 Jahre (Angaben jeweils $MW \pm SEM$). 52% unterzogen sich einer aortokoronaren Bypassoperation, 21,6% einem operativen Aorten- bzw. Mitralklappenersatz, 17,1% einem kombinierten Eingriff aus Bypassversorgung und Klappenkorrektur und 9% sonstigen Eingriffen. Die medikamentöse Therapie bestand aus β -Adrenozeptor-Antagonisten (65,8%), ACE-Hemmstoffen bzw. Angiotensin - Rezeptorantagonisten (60,1%), Diuretika (40,5%), Nitraten (37,8%), Calcium-Antagonisten (16,2%) und Digitalis (5,4%). Keiner der Patienten erhielt Katecholamine oder Sulfonylharnstoffe. Die durchschnittliche Pumpfunktion aller Patienten betrug $61 \pm 1\%$. Die Anästhesie wurde mit Fentanyl und Propofol mit Isofluran oder Enfluran durchgeführt. Patienten mit Vorhofflimmern (chronisch oder intermittierend) wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.1.1.2 Linksventrikuläres Myokard nicht-insuffizienter und terminal insuffizienter Herzen

Das linksventrikuläre Myokard schwerstgradig insuffizienter Herzen stammte von insgesamt 16 Patienten, die sich wegen einer medikamentös nicht beherrschbaren terminalen Herzinsuffizienz (NYHA IV) aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM, n=8) oder einer ischämischen Kardiomyopathie (ICM, n=8) einer orthotopen Herztransplantation unterziehen mussten. Die klinischen Parameter und Medikation können Tabelle 1 entnommen werden. Nicht-insuffizientes Myokard stammte von 8 Spenderherzen, die aus technischen Gründen nicht für eine Transplantation nutzbar waren. Die Anamnese der Organspender wies keine Herzerkrankungen auf, die linksventrikuläre Pumpfunktion war echokardiographisch normal.

Tabelle 1: Biographische und klinische Angaben der Patienten mit Herzinsuffizienz (ICM und DCM) sowie der Organspender (NF).

	NF	ICM	DCM
Anzahl Patienten (n)	15	16	15
Geschlecht (m/w)	9/6	13/3	7/8
Alter (Jahre)	49 ± 5	55 ± 3	54 ± 4
Größe (cm)	172 ± 2 (12)	181 ± 2 (14)	170 ± 3 (12)
Gewicht (kg)	73 ± 3 (12)	83 ± 3 (14)	75 ± 4 (12)
Klinische Angaben			
NYHA – Klasse	-	3,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2
LVEF (%)	-	23 ± 2 (10)	14 ± 2 (11)
PCWP (mm Hg)	-	25 ± 2 (12)	22 ± 3 (12)
CI (mL/min*m ²)	-	2,2 ± 0,2 (12)	1,9 ± 0,3 (12)
LVEDD (mm)	-	69 ± 3 (6)	74 ± 5 (5)
FS (%)	-	15 ± 1 (6)	12 ± 1 (5)
Medikation			
ACE-I; AT1-Ant	-	75%	67%
β-Blocker	-	63%	47%
Aldosteron – Ant.	-	50%	47%
Digitalis	-	56%	53%
Diuretika	-	88%	100%
Inotropika	-	16%	40%
Nitrate	-	38%	0%
Statine	-	69%	0%

Die in Klammern (n) gesetzten Zahlen entsprechen der Anzahl der Patienten, deren Daten verfügbar waren. NYHA – Klasse, Herzinsuffizienz Einteilung der New York Heart Association; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion; PCWP, pulmonalkapillärer Verschlussdruck (Wedge-Druck); CI, kardialer Index; LVEDD, linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; FS, linksventrikuläre Durchmesserverkürzung /fractional shortening; ACE-I, Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE); AT1-Ant, AT1-Rezeptor-Antagonisten; Aldosteron-Ant., Aldosteron-Antagonisten.

3.1.2 Verwendete Substanzen / Gase

3.1.2.1 Substanzen zur Herstellung freier Sauerstoffradikale

- Eisenchlorid (FeCl₃ x 6 H₂O), MG 270, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- Hydrogenperoxid (H₂O₂), MG 34, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- Nitritotriessigsäure (NTA), MG 191, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

3.1.2.2 Substanzen / Verbrauchsmaterialien zur Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln und linksventrikulären Papillarmuskelstreifen

- 5-HD, MG 210.2, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- Cholinchlorid, MG 139.6, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- D (+)-Glukose, MG 180, Merck, Darmstadt
- Diazoxid, MG 230.7, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- EDTA, MG 292.2, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- HMR 1098, MG 494, Hoechst / Aventis, Deutschland
- Isoproterenol, MG 247.7, SIGMA-Aldrich, Germany
- Kaliumchlorid (KCl), MG 75, Merck, Darmstadt
- Kalziumchlorid (CaCl_2), MG 181, Merck, Darmstadt
- L (+)-Ascorbinsäure, MG 176, Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), MG 203, Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid (NaCl), MG 58, Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), MG 84, Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4) MG 138, Merck, Darmstadt
- P1075, MG 231, LEO Pharmaceutical Products, USA
- Salzsäure (HCl), 37%, MG 36, Merck, Darmstadt
- St. Thomas Cardioplegic Solution (Na^+ 117 mmol/l, K^+ 16 mmol/l, Ca^{2+} mmol/l, H_2PO_4 1 mmol/l, HCO_3^- 3 mmol/l, SO_4^{2-} 1 mmol/l, Prokain-HCl 1 mmol/l), Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
- Carbogen (95% O_2 , 5 % CO_2 , Messer Griesheim, Messer Group GmbH Deutschland
- Stickstoff Gasgemisch aus 95% N_2 , 5% CO_2 , Messer Griesheim, Messer Group GmbH Deutschland

3.1.2.3 Substanzen für Membranpräparation und Mitochondrien-Isolation

- Aprotinin, MG 6511.44, Sigma Steinheim Deutschland
- DTT (DL-Dithiothreitol), MG154.24, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- EDTA, MG 292.24, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- EGTA, MG 380.35, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-2-ethan-sulfonsäure), MG 238.3, Serva Heidelberg Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl), MG 75, Merck, Darmstadt
- Leupeptin, MG 475.59, Sigma, Steinheim Deutschland
- Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2 \times 6 H_2O$), MG 203, Merck, Darmstadt
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), MG 174.19, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
- Salzsäure (HCl), 37%, MG 36, Merck, Darmstadt
- Sucrose (Saccharose), MG 342.30, Merck, Darmstadt Deutschland
- Tris-HCl base, MG 157.60, Roth, Karlsruhe Deutschland

3.1.2.4 Substanzen und Verbrauchsmaterialien für Western Blot

- 6-Aminohexansäure, MG 131.18 Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
- Acrylamid, MG 71.08, Sigma, Deutschland
- Ampuwa, MG Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
- APS (Amoniumpersulfat), MG 228.20, Serva, Heidelberg, Deutschland
- Bromphenolblau, MG 669.96, Sigma, Steinheim Deutschland
- Glycerol, MG 92.09, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Glycin, MG 75.06, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid, MG 75, Merck, Darmstadt Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat, MG 136.08, Merck, Darmstadt Deutschland
- Methanol, MG 32.04, Roth, Karlsruhe
- Natriumchlorid, MG 58, Roth, Karlsruhe Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat, MG 138, Merck, Darmstadt Deutschland
- Novablot Elektrodenpapier, Amersham, Buckinghamshire
- Ponceau Rot, MG 760.61, Serva, Heidelberg
- Protran (Nitrocellulosemembran), Schleicher und Schüell, Dassel
- Salzsäure (HCl), 37%, MG 36, Merck, Darmstadt
- SDS 20% Lösung (Sodiumdodecylsulfat), Serva, Heidelberg
- β -Mercapto-Ethanol, MG 78.1, Serva, Heidelberg, Deutschland

- TEMED (Tetramethylethyldiamine), MG 116.21, Serva, Heidelberg, Deutschland
- Tris HCl base, MG 157.60, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tween (Polyethylene-Sorbitan-Monolaurate), Lösung 10%, Sigma, Steinheim Deutschland
- Western-Blotting Detecting Reagents (ECL), Amersham, Buckinghamshire
- Western-Blotting Reagent, Roche, Mannheim Deutschland

3.1.3 Geräte

- 2 Apparaturen zur Messung der isometrischen Kontraktionskraft mit jeweils 4 Organbädern mit 50 ml bzw. 75 ml Fassungsvermögen mit getrenntem Wärmekreislauf, separat steuerbarer Begasung der Bäder und Messung der Kontraktionskraft über Kraftaufnehmer:
 - HAAKE C10 Thermostat (2x)
 - Kraftaufnehmer Typ G11, HBM Hottinger Baldwin Messtechnik (4x)
 - Kraftaufnehmer TF6V50 W-Fleck, Mainz (4x)
 - Steuerungseinheit zum Befüllen von Organbädern. IOA 5330, FMI GmbH Seeheim
 - STI-08 Current Stimulator IBJ CST -08, FMI GmbH Seeheim
 - Stimulator Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
 - TF-Messverstärker KWS 504 D, HBM Hottinger Baldwin Messtechnik
 - 75ml Organbad: VWR International, Köln (4x)
 - 50ml Organbad: FMI GmbH, Seeheim (4x)
- Agfa Curix 60 (Entwickler)
- Gelkammer: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Inkubator: Innova 4000, New Brunswick Scientific, Nürtingen
- neo Lab vortex mixer 7 -2020
- Ofen: Shake´N´Stack, Hybaid, Heidelberg
- Biophotometer Eppendorf
- Potter: B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Blotkammer: Semiphor Hoefer Semidry transfer unit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Waagen:
 - 770 (Feinwaage) Kern, Balingen-Frommern
 - EW, Kern
- Zentrifugen:
 - Centrikon T2060 (Ultrazentrifuge), Kendro, Langenselbold

- Biofuge fresco, Haraeus Instruments, Fellbach
- Labofuge 400R, Haraeus Instruments Fellbacg
- Napco 2019R, Axon, Leipzig
- Sigma 1K15, Sigma. Osterode am Harz

3.2 Methoden

3.2.1 Messung der isometrischen Kontraktionskraft an menschlichen Herzmuskelpräparaten

3.2.1.1 Präparation rechtsatrialer Trabekel und linksventrikulärer Papillarmuskelstreifen

Tyrodelösung:

- 119,78 mmol/l NaCl
- 5,36 mmol/l KCl
- 1,05 mmol/l MgCl₂
- 1,8 mmol/l CaCl₂
- 22,6 mmol/l NaHCO₃
- 0,42 mmol/l NaH₂PO₄
- 5,55 mmol/l Glukose
- 0,28 mmol/l Ascorbinsäure
- 0,06 mmol/l EDTA
- pH 7.4

Das Herzmuskelgewebe wurde unmittelbar nach intraoperativer Entnahme in eisgekühlter, St.Thomas Kardioplegie - Lösung in das Labor transportiert. Die Präparation erfolgte in eisgekühlter und mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begaster Tyrodelösung. Es wurde ausschließlich demineralisiertes und bidestilliertes Wasser zur Herstellung der Tyrodelösung verwendet. Die rechtsatrialen Trabekel wurden mittels atraumatischer Pinzette und Präparierschere aus dem umgebenden Myokard herauspräpariert und von anhaftendem Bindegewebe befreit. Sie wurden dabei weder verletzt noch unter Zug gesetzt. Für die funktionellen Experimente wurden nur Trabekel mit einer Länge von 4-6 mm und einem Durchmesser von 1-2 mm verwendet. Aus den Papillarmuskeln des linken Ventrikels wurden 7-9 mm lange und 1-2 mm dicke Streifen parallel zur Faserrichtung präpariert. Bei der Präparation wurde nur makroskopisch intaktes Myokardgewebe verwendet.

3.2.1.2 Versuchsdurchführung

Die Vorhoftrabekel bzw. die linksventrikulären Papillarmuskelstreifen wurden zur Messung der isometrischen Kontraktionskraft in zweikammerige Organbäder eingebracht und dort an zwei Haken befestigt. Die innere Kammer enthielt 50 ml bzw. 75 ml konstant mit Carbogen begaster Tyrodelösung mit einem pH von 7.4. Die Temperatur wurde über die äußere Kammer mittels Heizthermostate konstant bei 37°C gehalten. Zu Beginn des Experimentes wurden die Präparate vorgespannt, bis die entwickelte Kraft maximal war. Die elektrische Stimulation erfolgte über zwei Platinelektroden, als Reizgeräte dienten sowohl ein Hugo Sachs Elektronik Stimulator 7806 (Fa. Hugo Sachs, Hugstetten), als auch ein computergesteuerter STI-08 Current Stimulator (IBJ CST-08, Fa. Föhr, Seeheim). Es wurden Rechteckimpulse mit einer Reizdauer von 5 ms bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz verwendet mit Ausnahme in den Ischämiephasen (siehe unten) und bei der Ermittlung der Kraft-Frequenz-Beziehung. Die von den Herzmuskelpräparaten entwickelte isometrische Kontraktionskraft wurde über induktive Kraftaufnehmer gemessen und computertechnisch registriert. Die ersten Experimente wurden vor Umstellung auf ein computergestütztes System der Fa. Föhr mit einem Schreiber (Gould 2400 4-Kanal-Schreiber, Fa. FMI, Seeheim, Deutschland) registriert. Die Äquilibrationszeit bis zur vollständigen mechanischen Stabilisierung betrug 60-90 Minuten, in dieser Zeit wurde die Tyrodelösung zum Auswaschen einmal gewechselt. Bei den Versuchen mit Ischämie und Reperfusion wurde in der 90-minütigen Ischämiephase auf eine glucosefreie Tyrodelösung gewechselt, die Begasung von Carbogen auf ein Gemisch von Stickstoff (95%) und CO₂ (5%) umgestellt sowie die Stimulationsfrequenz auf 3 Hz erhöht.

3.2.1.3 Experimentelles Protokoll I: Spezifität der Kaliumkanalmodulatoren

Um die Spezifität der K_{ATP} – Kanal Modulatoren Diazoxid, P1075, 5-Hydroxdecanoat und HMR 1098 zu überprüfen, wurde zunächst der solitäre Einfluss der Medikamente auf die Kontraktionskraft und die diastolische Spannung überprüft. Nach mechanischer Stabilisierung der präparierten und stimulierten Muskeltrabekel wurden die zu untersuchenden Substanzen den Muskeln in steigender Konzentration von 10⁻⁷ bis 10⁻⁴ mmol/l zugegeben und die Kontraktionskraft sowie diastolische Spannung kontinuierlich registriert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung von Konzentrationen von 10⁻⁷ bis 10⁻⁴ mmol/l von P1075 in Gegenwart von 100 µmol/l 5-HD, 0,1 mmol/l Diazoxid und 0,1 mmol/l HMR 1098 durchgeführt. Hierbei wurden die jeweiligen Substanzen 15 Minuten vor der ersten P1075 Dosierung von 10⁻⁷ mmol/l in das Organbad pipettiert.

Die dritte Versuchsreihe zu dieser Fragestellung war eine Konzentrations-Wirkungskurve von HMR 1098 in Gegenwart von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ P1075. Wiederum erfolgte die Gabe von P1075 15 Minuten vor der ersten Gabe von HMR1098.

3.2.1.4 Experimentelles Protokoll II: Kaliumkanalmodulatoren bei Hypoxie und Reoxygenierung

Glucosefreie Tyrodelösung:

- 119,78 mmol/l NaCl
- 5,36 mmol/l KCl
- 1,05 mmol/l MgCl_2
- 1,8 mmol/l CaCl_2
- 22,6 mmol/l NaHCO_3
- 0,42 mmol/l NaH_2PO_4
- 1,94 mmol/l Cholin-Chlorid
- 0,28 mmol/l Ascorbinsäure
- 0,06 mmol/l EDTA

Für die Untersuchung der Einflüsse der K_{ATP} Kanal Modulatoren während der Hypoxie und Reoxygenierung sowie in der Folge wurde folgendes Versuchprotokoll verwendet. Nach mechanischer Stabilisierung der Muskeltrabekel mit konstanter Kraft sowie konstanter diastolischer Spannung erfolgte die Gabe der jeweiligen Modulatoren (bei der Gabe mehrerer Substanzen wurde ein zeitlicher Abstand von 5 Minuten zwischen dem Hinzugeben eingehalten). Nach einer Einwirkungszeit von 15 Minuten (bei Gabe mehrerer Substanzen zählte die Gabe der letzten Substanz) begann die Ischämiephase von 90 Minuten. Hierzu erfolgte nach einem Protokoll von Speechly-Dick et al. (Speechly-Dick et al., 1995) der Austausch der Tyrodeflüssigkeit gegen eine glucosefreie Lösung (die Osmolarität wurde durch Austausch der Glucose durch Cholinchlorid konstant gehalten), die erneute Hinzugabe der Substanzen, die Umstellung der Begasung von Carbogen (95% CO_2 + 5% O_2) auf ein Gemisch von 95% Stickstoff und 5% CO_2 sowie die Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 3Hz. In der normoxischen Kontrolle erfolgte ein Wechsel der Tyrode (mit glucosehaltiger Tyrode) und die Stimulationsfrequenz von 1Hz wurde unverändert fortgeführt. Nach 90 Minuten Ischämie erfolgte der Wechsel auf die glucosehaltige Normaltyrode, die Reduktion der Herzfrequenz auf 1 Hz sowie der Wechsel auf die sauerstoffhaltige Begasung. Es erfolgte keine erneute Gabe der Substanzen. Die Beobachtungsdauer der Reoxygenierung betrug 120 Minuten. Anschließend wurde die Kraft-Frequenz-Beziehung bestimmt, indem die systolische und diastolische Kraftentwicklung bei Frequenzen von 0,5 bis 3 Hz für jeweils 5-6 Minuten gemessen wurde. Zum Abschluss wurde die maximale Kraftentwicklung auf

Calciumchlorid bzw. Isoprenalin bestimmt. Hierfür wurden zunächst die Calciumwirkung von 3,2 bis 15 mmol/l in aufsteigenden Konzentrationen getestet und nach zweimaligem Tyrodewechsel (wash out) die maximale Reaktion auf Isoprenalin in aufsteigenden Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} mmol/l überprüft.

Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet:

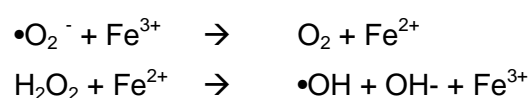
- 1.) Normoxische Kontrolle (Wechsel der Tyrodenlösungen zeitgleich mit den anderen Gruppen ohne Einsatz der glucosefreien Lösung)
- 2.) Hypoxie (H, 90 Minuten) und Reoxygenierung (R, 120 Minuten)
- 3.) H/R + Diazoxide (100 $\mu\text{mol/l}$)
- 4.) H/R + HMR (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 5.) H/R + 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$)
- 6.) H/R + P1075 (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 7.) H/R + P1075 (3 $\mu\text{mol/l}$)
- 8.) H/R + Diazoxide (100 $\mu\text{mol/l}$) + HMR (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 9.) H/R + Diazoxid (100 $\mu\text{mol/l}$) + 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$)
- 10.) H/R + P1075 (30 $\mu\text{mol/l}$) + HMR 1098 (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 11.) H/R + P1075 (3 $\mu\text{mol/l}$) + HMR 1098 (30 $\mu\text{mol/l}$)

3.2.1.5 Experimentelles Protokoll III: K_{ATP} Kanal Modulatoren während der Generierung von Hydroxylradikalen

Fe³⁺-NTA:

- 10 mM FeCl₃ x 6H₂O
- 20 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- PH 4,5-5

Die Generierung von Hydroxylradikalen wurde nach der bereits jahrelang etablierten Fenton und Haber-Weiss-Reaktion durchgeführt, bei welcher durch die Gegenwart von transientem Metall aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und $\bullet\text{O}_2^-$ vermehrt Hydroxylradikale durch folgende Reaktionen entstehen (Corretti et al., 1991; Gao et al., 1996):



Zusammenfassend: $\bullet\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

Die Präparation der Muskeltrabekel sowie die Applikation der Substanzen erfolgten analog zu der Versuchsreihe mit Ischämie und Reperfusion. Nach 15 minütiger Einwirkungszeit erfolgte die Gabe von Fe^{3+} -NTA (Badkonzentration: 0,1 mmol/l) und nach 5 Minuten die Gabe von H_2O_2 (Badkonzentrationen zwischen 1mmol/l und 10mmol/l). Die Reaktion der einzelnen Muskeltrabekel wurde 15 Minuten lang aufgezeichnet. Anschließend wurde die Tyrodelösung in den Bädern zweimal ausgetauscht. Nach erneuter mechanischer Stabilisierung erfolgten die Überprüfung der Inotropie auf Calcium und Isoprenalin gemäß dem Schema der Versuchsreihe „Ischämie und Reperfusion“.

Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet:

Versuche mit rechtsatrialem Myokard:

- 1.) Null-Kontrolle (nur Fe^{3+} -NTA, kein H_2O_2)
- 2.) Fe^{3+} -NTA & Radikale ($\bullet\text{OH}$, 1 mmol/l H_2O_2)
- 3.) Fe^{3+} -NTA & Radikale ($\bullet\text{OH}$, 3 mmol/l H_2O_2)
- 4.) Fe^{3+} -NTA & Radikale ($\bullet\text{OH}$, 10 mmol/l H_2O_2)
- 5.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + Diazoxide (100 $\mu\text{mol/l}$)
- 6.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + DMSO (1mmol/l)
- 7.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + HMR (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 8.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$)
- 9.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + P1075 (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 10.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + P1075 (3 $\mu\text{mol/l}$)
- 11.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + Diazoxid (100 $\mu\text{mol/l}$) + 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$)
- 12.) $\bullet\text{OH}$ (3 mmol/l) + P1075 (3 $\mu\text{mol/l}$) + HMR 1098 (30 $\mu\text{mol/l}$)

Versuche mit linksventrikulärem Myokard:

- 13.) $\bullet\text{OH}$ (1 mmol/l)
- 14.) $\bullet\text{OH}$ (1 mmol/l) + HMR (30 $\mu\text{mol/l}$)
- 15.) $\bullet\text{OH}$ (1 mmol/l) + 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$)

3.2.2 Western-Blot-Analyse von linksventrikulärem Myokard terminal insuffizienter und gesunder Herzen auf die Protein-Expression von SUR1, SUR2, KIR6.1 und KIR6.2

Die Protein-Expression der Kalium-Kanal-Untereinheiten wurde mit Hilfe der Western Blot Analyse bestimmt. Hierzu wurden durch Ultrazentrifugation die Gesamt-Proteine in membranöse, zytosolische und mitochondriale Protein-Fractionen aufgetrennt.

Für den Western Blot wurden die Proteine mittels Elektrophorese der Größe nach separiert. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotting) wurden gegen SUR1, SUR2, KIR6.1 und KIR6.2 gerichtete Antikörper (Antikörper I) aufgebracht. Mittels eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Antikörper II), welcher an Antikörper I bindet, und einem Chemolumineszenzreagenz wurden die gewünschten Proteine durch Belichtung eines Röntgenfilmes dargestellt.

3.2.2.1 Isolation der Proteine und Auftrennung in membranöse, cytosolische und mitochondriale Fraktionen.

Lysepuffer:

- 5 mmol/l Tris (pH 8,0)
- 1 mmol/l EDTA
- 5 mmol/l Magnesiumchlorid
- 5 µg/ml Leupeptin *
- 5 µg/ml Aprotinin *

* Zugabe der Protease – Inhibitoren erfolgte separat bei jedem Versuch

Pufferlösung für Mitochondrien:

- 20 mmol/l HEPES
- 10 mmol/l KCl
- 1,5 mmol/l MgCl₂
- 1 mmol/l EDTA
- 1 mmol/l EGTA
- 1 mmol/l DTT
- 0,1 mmol/l PMSF
- 250 mmol/l Sucrose

Inkubationspuffer:

- 25 mmol/l Tris (pH 8,0)
- 1 mmol/l EDTA
- 10 mmol/l Magnesiumchlorid

Für die Versuchsreihe wurde das linksventrikuläre Myokard von insgesamt 16 terminal herzinsuffizienten Patienten, welche sich einer Herztransplantation unterzogen, verwendet sowie das Gewebe 8 gesunder Spenderherzen, welche aus technischen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Es wurde ausschließlich linksventrikuläres Myokard verwendet. Es wurden jeweils ca. 90mg linksventrikuläres Myokard auf Trockeneis präpariert. Das präparierte Gewebe wurde mit 1ml Lysepuffer für 3-4 Minuten auf Eis homogenisiert. Es erfolgte die 10-minütige Zentrifugation bei 3300 U/min bei 4°C sowie anschließend die Zentrifugation des Überstandes bei 12.000 U/min für 15 Minuten zum Auftrennen in die verschiedenen Fraktionen (mitochondrial, zytosolisch, membranös). Das Pellet (mitochondriale Fraktion) wurde in 100µl Pufferlösung für Mitochondrien resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Der Überstand (Zytosol + Membran Fraktion) wurde mittels Ultrazentrifugation mit 35.700 U/min bei 4°C für die Dauer von 60 Minuten weiter aufgetrennt. Der Überstand (Zytosol-Fraktion) wurde bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -80°C eingefroren. Das Pellet (Membran-Fraktion) wurde in 100 µl Inkubationspuffer resuspendiert und idem zu den anderen Proben tiefgefroren.

3.2.2.2 Gelelektrophorese und Blotten der Proteine

Trenngel:

- -10 % Acrylamid
- 0,375 mmol/l Tris-HCl (pH 8,8)
- 0,1 % SDS
- 0,05 % APS
- 10 µl TEMED

Sammelgel:

- 6 % Acrylamid
- 0,125 mmol/l Tris-HCl (pH 6,8)
- 0,1 % SDS
- 0,05 % APS
- 10 µl TEMED

Elektrophoresepuffer (10 fach konzentriert):

- 1,92 mol/l Glycin
- 0,25 mol/l Tris (pH 8,8)
- 1 % SDS

Anodenlösung I:

- 0,3 mol/l Tris
- 20 % Methanol

Anodenlösung II:

- 25 mmol/l Tris
- 20 % Methanol

Kathodenlösung:

- 40 mmol/l 6-Aminohexansäure
- 0,01 % SDS
- 20 % Methanol

10xPBS (pH 7,4):

- 1,37 mol/l Natriumchlorid
- 0,03 mol/l Kaliumchlorid
- 0,02 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat
- 0,1 mol/l Natriumhydrogenphosphat

PBS-Tween:

- 1x PBS (Phosphate Buffer Saline)
- 0,05% Tween (Polyethylene-Sorbitan-Monolaurate)

Probenpuffer:

- 2,0 ml Glycerol
- 2% SDS
- 0,04 mmol/l Bromphenolblau
- 2,5 ml Stacking Gel Puffer (0,5 M Tris; 0,4% SDS [pH 6,8])
- 5 µl β-Mercaptoethanol pro 100µl Probenpuffer (unmittelbar vor Verwendung)

Nach dem Auftauen der Proben und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie wurden ca. 20 µg Protein mit 20 µl Ladepuffer gevortext. Das vorher hergestellte

Gel bestehend aus Sammel- und Laufphase wurde mit Elektrophoresepuffer gespült und die Slots aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Gel-Schlitze geladen. Bei jedem Gel wurde ein Slot mit einem Markerprotein beladen, um die Größe der Proteine später zuordnen zu können. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in Sammelphase mit 25 mA und in der Laufphase mit 35 mA.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Es erfolgte das Blotting des Laufgels in einer Semi-Dry-Blot-Kammer mit folgendem Aufbau: 6 Blatt Blotpapier in Anodenlösung 1, darüber 3 Blatt Blotpapier in Anodenlösung 2, gefolgt von der Nitrozellulose Membran und dem Laufgel. Abschliessend 9 Blatt Blotpapier in Kathodenlösung. Das Gel wurde mit einem angelegten Strom von 90 mA über Nacht geblottet. Anschließend wurde die Membran zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung mit Panceau-Rot eine Minute lang gefärbt.

3.2.2.3 Hybridisierung

Antikörper 1:

- KIR6.1 (R-14): sc-1124, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- KIR6.2 (N-18): sc-11226, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- SUR.1 (C-16): sc-5789, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- SUR-2B (C-15) : sc-5793, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- Calsequestrin 2 (H-60) sc-28275, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
- Cytochrom c (C-20) sc-8385, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Antikörper 2:

- Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) HRP Conjugate, 172 1034,
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate, 172-1019,
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Sonstige:

- ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2106,
GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Zuerst wurde die Membran mit einer 10% Western Blocking Solution (5ml Western Blocking Reagent, 45ml PBS (1-fach)) für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal 10 Minuten in PBS Tween und einmal 10 Minuten lang in PBS gewaschen. Es folgte die

Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 4°C über Nacht. Nach der ersten Inkubation wurde die Membran wieder wie oben beschrieben gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper gefolgt von den oben angegebenen 3 Waschschrinen. Um die spezifischen Banden sichtbar zu machen, wurde die Membran für 1 Minute in ECL (Western Blotting Detection Reagent) getränkt und anschließend für einige Minuten ein Röntgenfilm aufgelegt. Bei zu starkem oder zu schwachem Signal wurde entsprechend kürzer oder länger exponiert. Die spezifische Färbung des Filmes wurde densitometrisch ausgewertet. Zum Ablösen der Antikörper wurde die Membran 30 Minuten bei 57°C mit Entfärber-Puffer inkubiert und danach zweimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen. Bis zur nächsten Verwendung wurde die Membran in 1xPBS bei 4°C gelagert.

3.3 Statistische Analyse

Die Analyse der Kontraktionskraftmessungen und die statistische Analyse (ANOVA) wurden mit GraphPAD Prism (Version 3.00 für Windows, GraphPad Software; San Diego California, USA) durchgeführt. Die Densitometrie und Analyse der Western-Blots wurde mit ImageQuant TM Software (ImageQuant, Molecular Dynamics Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Daten werden als Mittelwerte mit Standard Fehler (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz lag mit einem $p < 0.05$ vor.

4 Ergebnisse

4.1 Spezifität der K_{ATP} – Kanal Modulatoren

Die Aktivierung von sarcK_{ATP} Kanälen verkürzt die kardiale Aktionspotentialdauer (APD), was die kardiale Erregbarkeit und Kontraktionskraft reduziert. Um die Effekte der K_{ATP} Kanal Öffner P1075 und Diazoxide auf die Kontraktionskraft zu testen, wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven durchgeführt. P-1075 reduzierte die Kontraktionskraft um $95\pm 2\%$ mit einer pEC_{50} von $6,5\pm 0,2$ mol/l und einem Steigungsfaktor (Hill-Koeffizient) von $2,5\pm 0,5$. Im Gegensatz dazu reduzierten weder Diazoxide noch die K_{ATP} -Blocker HMR 1098 oder 5-HD die Kontraktionskraft (Abbildung 6). Keine der verwendeten Substanzen hatte Einfluss auf die diastolische Spannung.

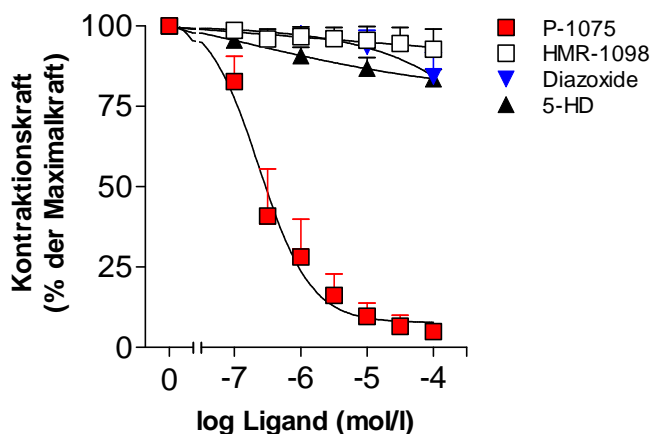


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Effekte des sarcK_{ATP} Kanal Aktivators P-1075 (n=8), des sarcK_{ATP} Kanal Blockers HMR-1098 (n=8), des mitoK_{ATP} Kanal Aktivators Diazoxid (n=8) sowie des mitoK_{ATP} Kanal Blockers 5-HD (n=9) auf die kardiale Kontraktionskraft an isolierten, humanen atrialen Trabekeln.

In der Gegenwart von HMR1098 (0,1 mmol/l) zeigte die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von P-1075 eine Rechtsverschiebung (pEC_{50} $4,8\pm 0,1$; $p < 0.0001$ vs. P1075 alleine; Abbildung 7). Der Steigungsfaktor blieb hierbei unverändert. Im Gegensatz dazu zeigte weder die Anwesenheit von 5-HD (0,1 mmol/l) noch von Diazoxide (0,1 mmol/l) einen Effekt auf die EC_{50} von P1075 (Abbildung 7).

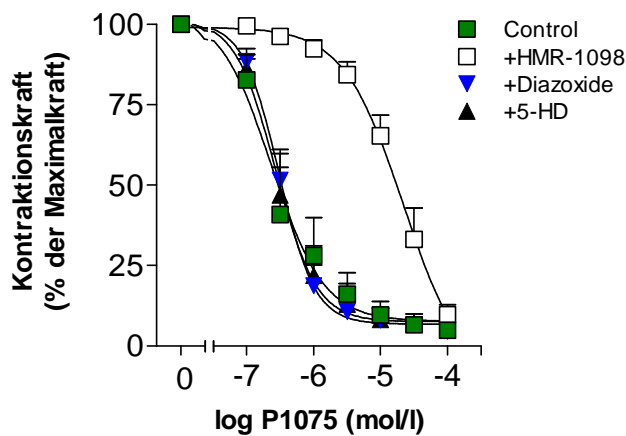


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Abnahme der kardialen Kontraktionskraft durch den $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ Kanal-Öffner P-1075 in der Abwesenheit (Kontrolle, n=8) und Gegenwart von HMR-1098 (100 $\mu\text{mol/l}$; n=5), Diazoxid (100 $\mu\text{mol/l}$; n=4) oder 5-HD (500 $\mu\text{mol/l}$; n=5) in humanen atrialen Trabekeln.

Um zu testen, ob die P-1075-induzierte Öffnung von $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ reversibel ist, wurden zunächst kumulative Konzentrationen von P-1075 bis 0,3 $\mu\text{mol/l}$ appliziert, was zu einer Reduktion der entwickelten Kraft um $95 \pm 1\%$ führte. Anschließend wurden kumulative Konzentrationen von HMR-1098 in der fortgesetzten Gegenwart von P-1075 ins Organbad hinzugegeben. Dies bewirkte die vollständige Wiederherstellung der entwickelten Kraft mit einer pEC_{50} von HMR-1098 von 5.4 ± 0.4 mol/l (Abbildung 8).

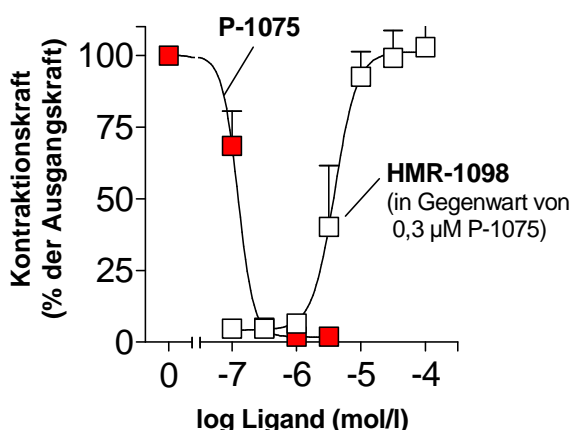


Abbildung 8: Nachweis der Reversibilität der durch den sarkolemmlen Kaliumkanalöffners P1075 induzierten Abnahme der Kontraktionskraft durch steigende Konzentration des sarkolemmlen Kaliumkanalblockers HMR 1098 (n=4).

4.2 Der Einfluss von K_{ATP} -Modulatoren auf die kardiale Kontraktilität bei Hypoxie und Reoxygenierung

Die Effekte der selektiven Öffnung und Blockade der sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} Kanäle während Hypoxie und Reoxygenierung wurden entsprechend einem Protokoll von Speechly-Dick et al. durchgeführt (Speechly-Dick et al., 1995). Die basale Kontraktionskraft (Tabelle 2) und die diastolische Spannung (nicht gezeigt) unterschieden sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen. Die 90 Minuten dauernde Hypoxie reduzierte die Kontraktionskraft auf $3,2 \pm 0,7\%$ der Ausgangskraft (Abbildung 9 oben). Die diastolische Spannung erhöhte sich im Vergleich zum Ausgangswert um $27 \pm 6\%$. In der 120 Minuten dauernden Reoxygenierung erholte sich die systolische Kraft auf $25,5 \pm 6,2\%$ des Ausgangswertes, die diastolische Spannung erreichte innerhalb der ersten 10 Minuten der Reoxygenierung ihren Ausgangswert (Abbildung 9 unten).

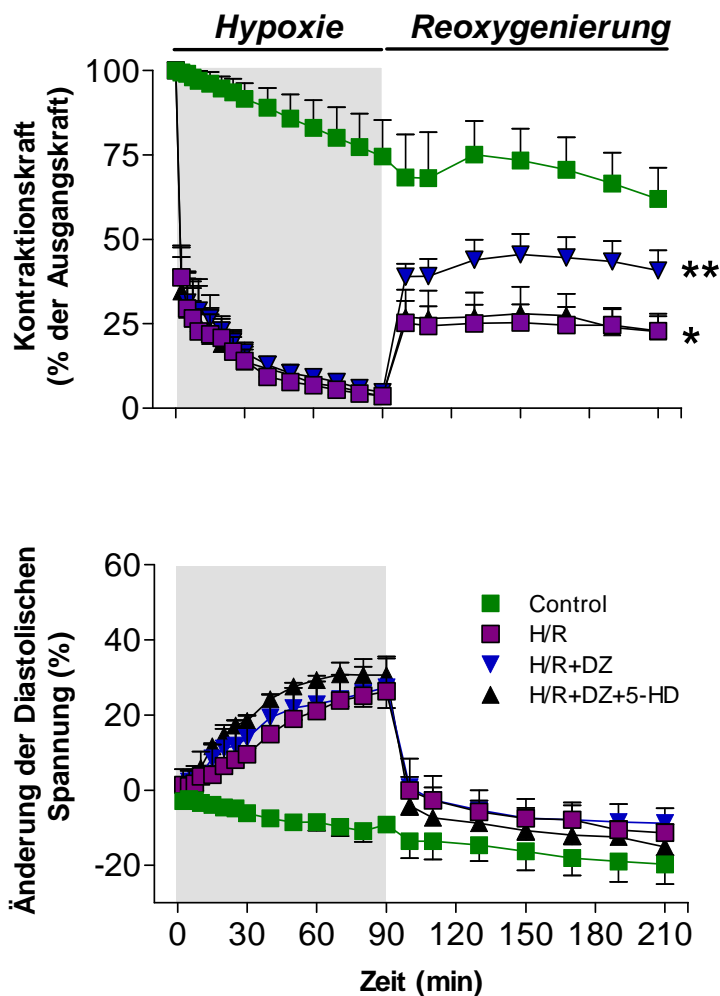


Abbildung 9: Änderung der Kontraktionskraft und der distolischen Spannung während 90 Minuten Hypoxie (H) und 120 Minuten Reperfusion (R) von menschlichen artrialen Trabekeln ohne Vorbehandlung (n=10) sowie nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalöffner Diazoxid (100 µmol/l, n=10) und kombinierter Vorbehandlung mit Diazoxid und dem mitochondrialen Kaliumkanalblocker 5-HD (500 µmol/l, n=8) im Vergleich zu einer Nullkontrolle (n=8). * p < 0,05 Diazoxid vs H/R; ** p < 0,05 Diazoxid vs Diazoxid + 5-HD

Die Vorbehandlung mit Diazoxid (100µmol/l) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktionskraft während der Hypoxiephase ($4,3 \pm 0,6\%$), verbesserte aber die Kraftentwicklung in der Reoxygenierung auf $42 \pm 9\%$ der Ausgangswerte (90 Minuten Hypoxie: H/R vs. DZ, $p=0,034$). Der protektive Effekt von Diazoxid wurde durch Co-Inkubation mit 5-HD (500 µmol/l) vollständig inhibiert (Abbildung 9 oben). Im Gegensatz dazu verbesserte die Vorbehandlung mit dem sarkolemmlen Kaliumkanal-Öffner P1075 (0,3 µmol/l und 30 µmol/l) weder die Kraftentwicklung während der Hypoxie ($1,82\% \pm 0,4$) noch bei der Reoxygenierung ($20,7\% \pm 6,6$).

Nach 120 Minuten Reoxygenierung wurde das maximale inotrope Ansprechen der Trabekel auf Calcium ($F_{\max/\text{Ca}}$) bestimmt. Die maximale Kraftentwicklung auf Calcium war nach Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen signifikant reduziert ($F_{\max/\text{Ca}}$: Kontrolle, $8,2 \pm 1,4$ mN; H/R, $5,0 \pm 0,8$ mN; $p=0,048$; Abbildung 10). Die Vorbehandlung mit Diazoxid, aber nicht mit P1075 verbesserte die maximale inotrope Reaktion auf Calcium (Abbildung 10). Der Effekt von Diazoxid wurde durch Co-Inkubation mit 5-HD, aber nicht mit HMR-1098 blockiert. Weder 5-HD noch HMR-1098 alleine beeinflussten die $F_{\max/\text{Ca}}$ nach H/R. Die EC_{50} -Werte für Calcium waren in allen Gruppen gleich.

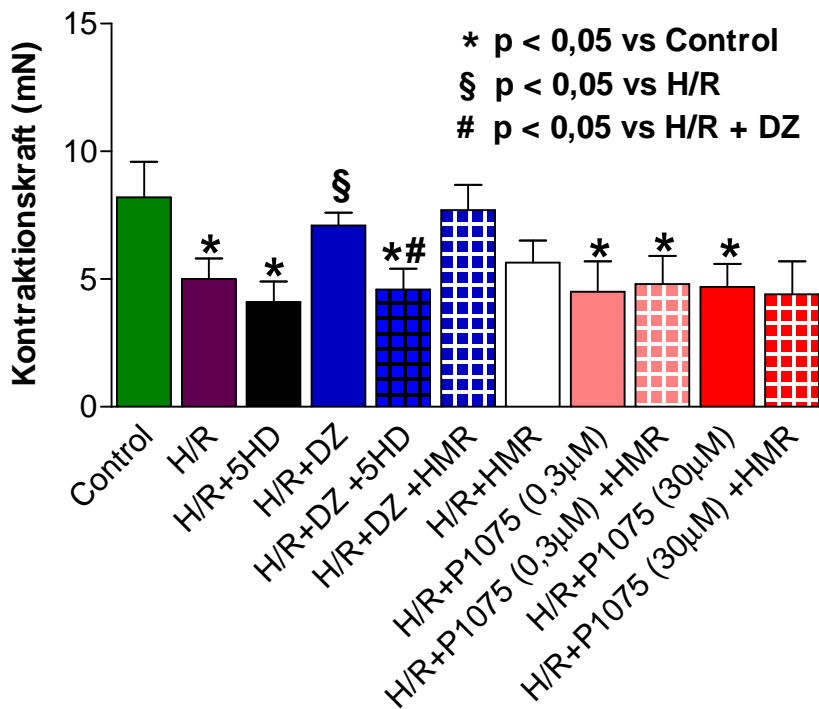


Abbildung 10: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung durch Calcium in den verschiedenen Versuchsgruppen nach 90 Minuten Hypoxie und 120 Minuten Reoxygenierung

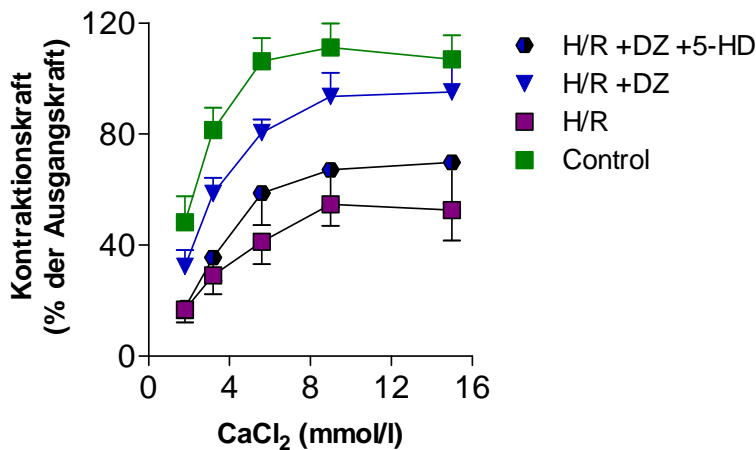


Abbildung 11: Verbesserte Kraftentwicklung unter steigender Konzentration Calcium nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalöffner Diazoxid (n=10) sowie die Blockbarkeit dieses Effektes durch den mitochondrialen Kaliumkanalöffner 5-HD Kraftentwicklung (n=8) nach Hypoxie und Reoxygenierung im Vergleich mit unbehandelten atrialen Muskeltrabekeln (n=10) sowie einer Nullkontrolle (n=8).

Nach dem Auswaschen von Calcium wurde der inotrope Effekt kumulativer Konzentrationen von Isoprenalin getestet. Während die F_{max}/Ca nach H/R gegenüber den normoxischen Kontrollen noch signifikant reduziert waren (Abbildung 10 und 11), war die maximale Kraftentwicklung nach Isoprenalin in der H/R Gruppe zwar tendenziell, jedoch nicht mehr signifikant reduziert gegenüber den normoxischen Kontrollen (Abbildung 12 und 13). Auch die Potenz von Isoprenalin war in allen Gruppen gleich (Abbildung 13 und Tabelle 2).

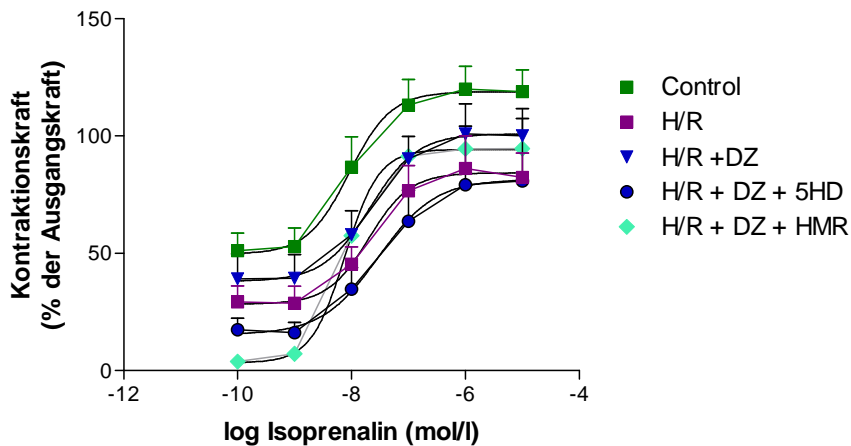


Abbildung 12: Maximale Kraftentwicklung unter steigender Konzentration von Isoprenalin nach 90 Minuten Hypoxie und 120 Minuten Reoxygenierung. Im Unterschied zu der maximalen Kraftentwicklung nach Calcium zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

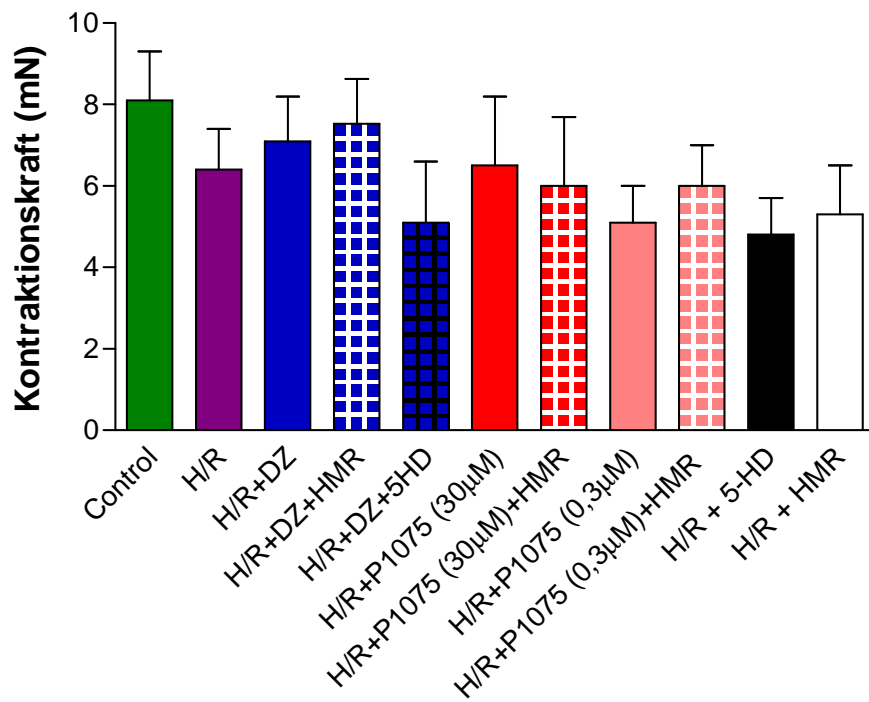


Abbildung 13: Kein Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich der maximalen Kraftentwicklung durch Isoprenaline in den verschiedenen Versuchsgruppen nach 90 Minuten Hypoxie und 120 Minuten Reoxygenierung. Tendenzielle Besserung nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalöffner Diazoxid.

Tabelle 2: Systolische Kraftentwicklung vor, während und nach Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) sowie maximales inotropes Ansprechen auf Calcium ($F_{\max}\text{Ca}$) bzw. Isoprenalin ($F_{\max}\text{Iso}$) und Potenz von Isoprenalin ($p\text{EC}_{50}$).

	n	Basal [mN]	90 min H [mN]	120 min R [mN]	$F_{\max}\text{Ca}$ [mN]	$F_{\max}\text{Iso}$ [mN]	$p\text{EC}_{50}\text{ (Iso)}$ [mol/l]
Kontrolle (Normoxie)	8	7.3±1.6	5.5±1.7	4.9±1.8	8.2±1.4	8.1±1.2	8.1±0.2
H/R	10	7.2±0.8	0.2±0.1	1.8±0.5	5.0±0.8	6.4±1.0	7.8±0.2
H/R +DZ	10	7.0±0.7	0.3±0.0	3.0±0.7	7.1±0.5	7.1±1.1	8.0±0.2
H/R +DZ +5-HD	8	7.0±0.6	0.3±0.1	1.5±0.4	4.6±0.8	5.1±1.5	7.8±0.3
H/R +DZ +HMR	10	7.9±1.2	0.2±0.1	1.8±0.7	7.13±1.0	7.53±1.2	8.0±0.1
H/R +P-1075 (30 µmol/l)	7	9.3±2.1	0.2±0.0	1.9±0.6	4.7±0.9	6.5±1.7	7.6±0.2
H/R +P-1075 (30 µmol/l) +HMR-1098	7	8.9±1.8	0.2±0.0	1.9±0.7	4.4±1.3	6.0±1.7	7.9±0.1
H/R +P-1075 (0,3 µmol/l)	10	7.2±1.4	0.2±0.0	0.8±0.2	4.5±1.2	5.1±0.9	7,7±0,2
H/R +P-1075 (0,3 µmol/l) +HMR-1098	11	7.2±1.2	0.4±0.2	1.0±0.3	4.8±1.1	6.0±1.0	7,6±0,2
H/R +HMR	8	6.8±1.8	0.3±0.2	1.5±0.6	5.4±1,4	5.9±1.7	7,8±0.3
H/R +5-HD	6	6.3±1.2	0.1±0.0	1.3±0.6	3.8±0.7	4.8±0.9	8.0±0.2

H/R, Hypoxie/Reoxygenierung; DZ, Diazoxid (100 µmol/l); 5-HD, 5-Hydroxydecanoat (500 µmol/l); HMR-1098 (30 µmol/l); Basal, Ausgangskraft der Muskeltrabekel.

4.3 K_{ATP} - Modulatoren während Generierung von Sauerstoffradikalen

Insbesondere bei der Reperfusion ischämischen Myokards kommt es zu einer schubartigen Freisetzung von ROS, insbesondere Hydroxylradikale ($\bullet OH$) (Zweier et al., 2006; Bolli et al., 1999). Um den Effekt von $\bullet OH$ auf die kardiale Kontraktilität zu testen, wurden diese durch die kombinierte Applikation von H_2O_2 mit Fe^{3+} -NTA im Organbad erzeugt. Bei gleichbleibender Fe^{3+} -NTA Konzentration (100 $\mu mol/l$) wurden zunächst die konzentrationsabhängigen Effekte von H_2O_2 getestet (1, 3 und 10 $mmol/l$; Abbildung 14).

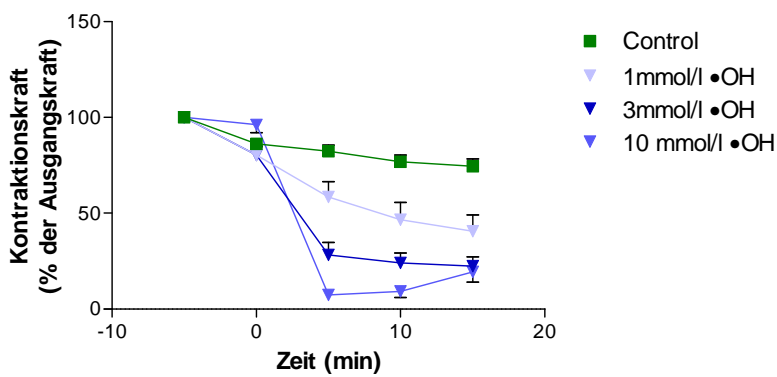


Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktionskraft unter Generierung von Hydroxylradikalen mittels Wasserstoffperoxid mit Konzentrationen von 1 $mmol/l$, 3 $mmol/l$ und 10 $mmol/l$ und Fe -NTA.

Während die alleinige Gegenwart von Fe^{3+} -NTA die entwickelte Kraft und diastolische Spannung nicht beeinträchtigte, kam es durch H_2O_2 zu einer konzentrations-abhängigen Abnahme der entwickelten Kraft und einem Anstieg der diastolischen Spannung (Abbildung 15).

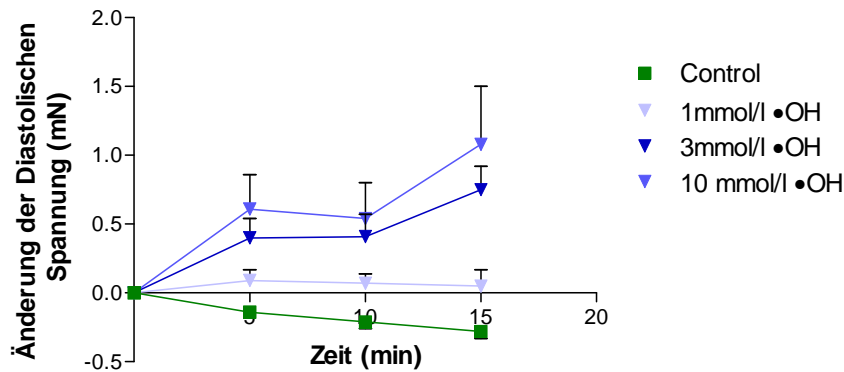


Abbildung 15: Konzentrationsabhängiger diastolischer Spannungsanstieg unter Generierung von Hydroxylradikalen mittels Wasserstoffperoxid mit Konzentrationen von 1 mmol/l, 3 mmol /l und 10 mmol /l und Fe-NTA.

Um die Effekte von K_{ATP} -Kanal Modulatoren auf die $\bullet OH$ -induzierte kontraktile Dysfunktion zu überprüfen, wurden Experimente mit einer Konzentration von 3 mmol/l H_2O_2 durchgeführt. Vor Zugabe der K_{ATP} -Kanal Modulatoren bzw. des $\bullet OH$ -generierenden Systems waren die Kontraktionskraft (Tabelle 3) und die diastolische Spannung (nicht gezeigt) nicht unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen. In Abbildung 16 sind repräsentative Originalmechanogramme aus nichtinsuffizientem linksventrikulären (LV) und rechtsatrialem (RA) Myokard dargestellt. Sowohl in linksventrikulärem als auch rechtsatrialem Myokard führten $\bullet OH$ zu einer Abnahme der entwickelten Kraft und zu einer Zunahme der diastolischen Spannung (Abbildung 16).

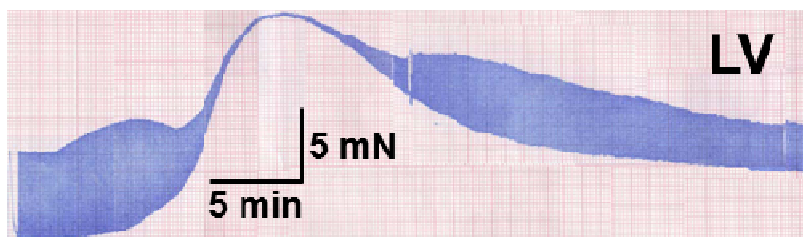
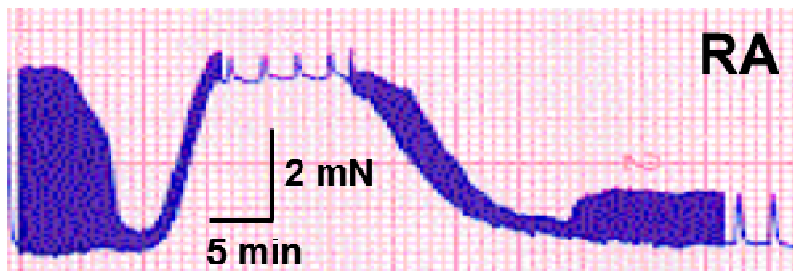


Abbildung 16: Abnahme der Kontraktionskraft (Amplitude) und Anstieg der diastolischen Spannung (Verschiebung der Kurvenbasis in y – Richtung) in den Mechanogrammen von rechtatrialem Myokard (oben) und linksventrikulärem Myokard (unten) und während der Radikalexposition sowie der Verlauf nach dem Auswaschen.

Nach Auswaschen von $\bullet\text{OH}$ kam es bei rechtsatrialem Myokard zu einer weitgehenden Normalisierung der diastolischen Spannung, während sich die systolische Kraftentwicklung zwar partiell erholte, jedoch deutlich abgeschwächt blieb (Abbildung 16 und 18).

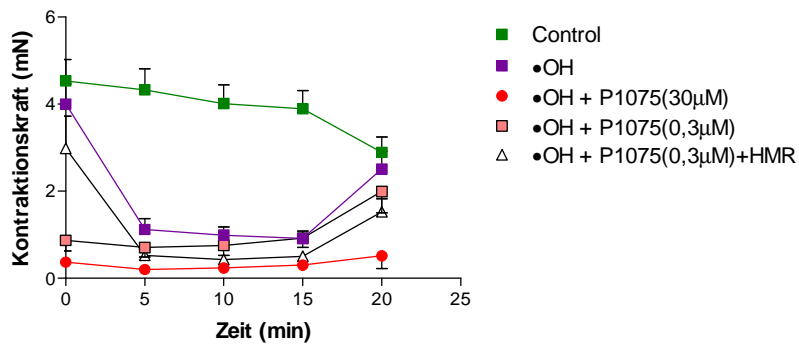
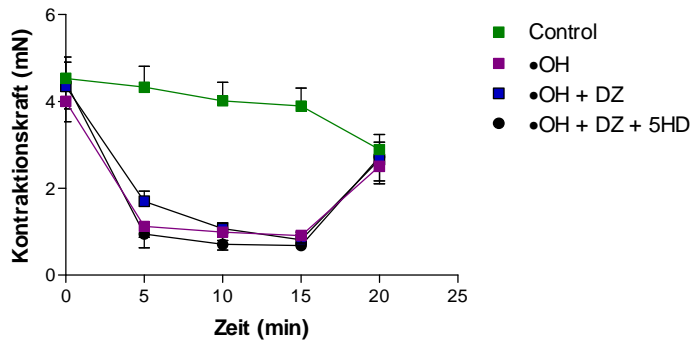
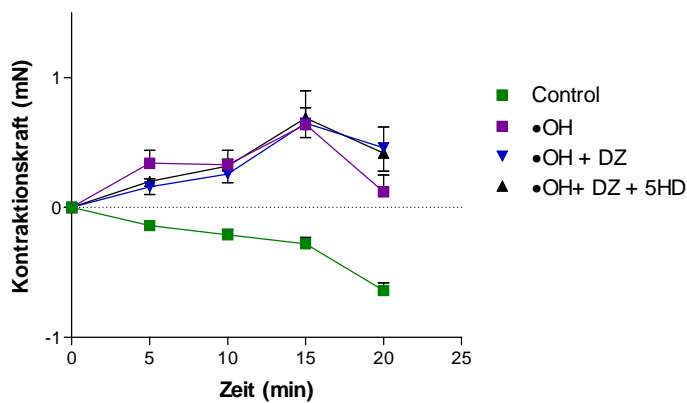


Abbildung 17: Kein Nachweis eines signifikanten Unterschieds in der Kraftentwicklung unter Radikalexposition (Zeit bis 15 Minuten) und unmittelbar nach Auswaschen der Radikale nach Vorbehandlung mit mitochondrialen (oben) oder sarkolemmlen Kaliumkanalmodulatoren (unten). •OH n=16; DZ n=14; DZ + 5-HD n=10; P-1075 (30 µmol/l) n = 8; P-1075 (3 µmol/l) n=9; ; P-1075 (3 µmol/l) + HMR n=10



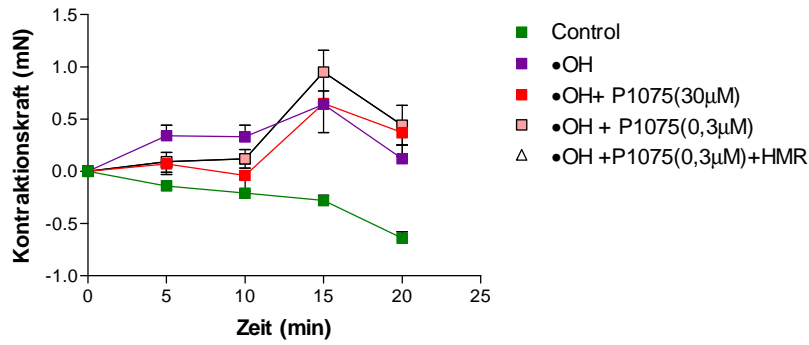


Abbildung 18: Verbesserung der Kraftentwicklung nach Auswaschen der Radikale nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalöffner Diazoxid (oben) sowie dem sarkolemmele Kaliumkanalöffner P1075 (unten). •OH n=16; DZ n=14; DZ+5-HD n=10; P-1075 (30 µmol/l) n = 8; P-1075 (3 µmol/l) n=9; ; P-1075 (3 µmol/l)+HMR n=10

Auch das maximale inotrope Ansprechen auf Ca^{2+} blieb nach Radikalexposition reduziert (Abbildung 19), während die F_{max}^{Iso} gegenüber der F_{max}^{Ca} sich tendenziell erholte (Tabelle 3).

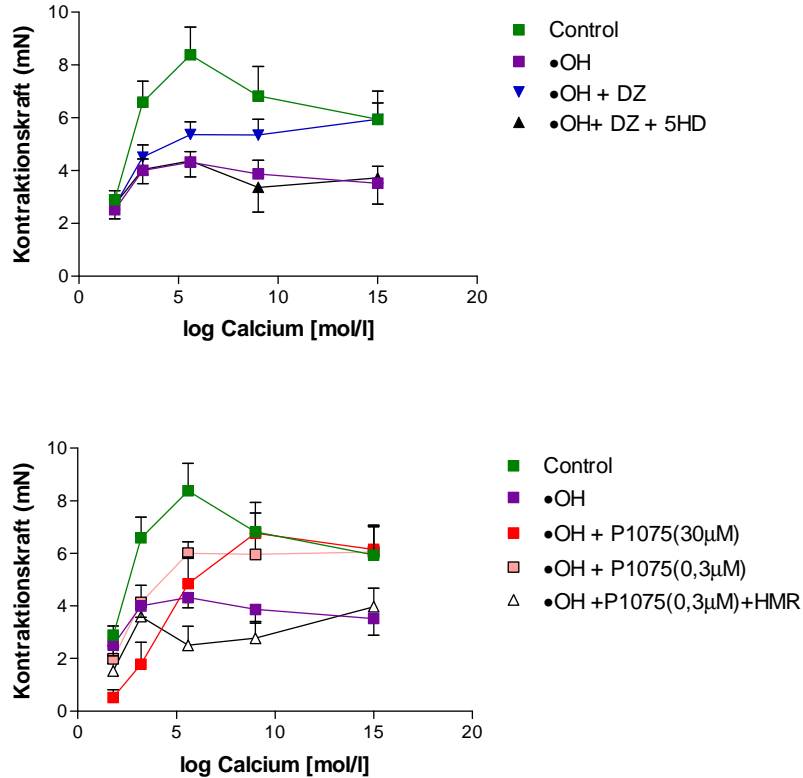


Abbildung 19: Verbesserung der Kontraktionskraft nach Hydroxylradikalexposition und Auswaschen der Radikale unter steigender Konzentration von Calcium nach Vorbehandlung mit

dem mitochondrialen Kaliumkanalöffner Diazoxid (oben) und dem sarkolemmlen Kaliumkanalöffner P1075 (unten) sowie die Blockbarkeit dieses Effektes durch die jeweiligen Kaliumkanalblocker 5-HD und HMR. •OH n=16; DZ n=14; DZ+5-HD n=10; P-1075 (30 µmol/l) n = 8; P-1075 (3 µmol/l) n=9; ; P-1075 (3 µmol/l)+HMR n=10.

Die Gegenwart von Diazoxid (100 µmol/l) oder P-1075 (3 oder 30 µmol/l) führte weder während der •OH - Applikation (Abbildung 17) noch nach dem Auswaschen zu einer Verbesserung der systolischen Kraftentwicklung (Abbildung 18), verzögerte jedoch tendenziell den Anstieg der diastolischen Spannung, wobei die Werte kein Signifikanzniveau erreichten (Abbildung 20).

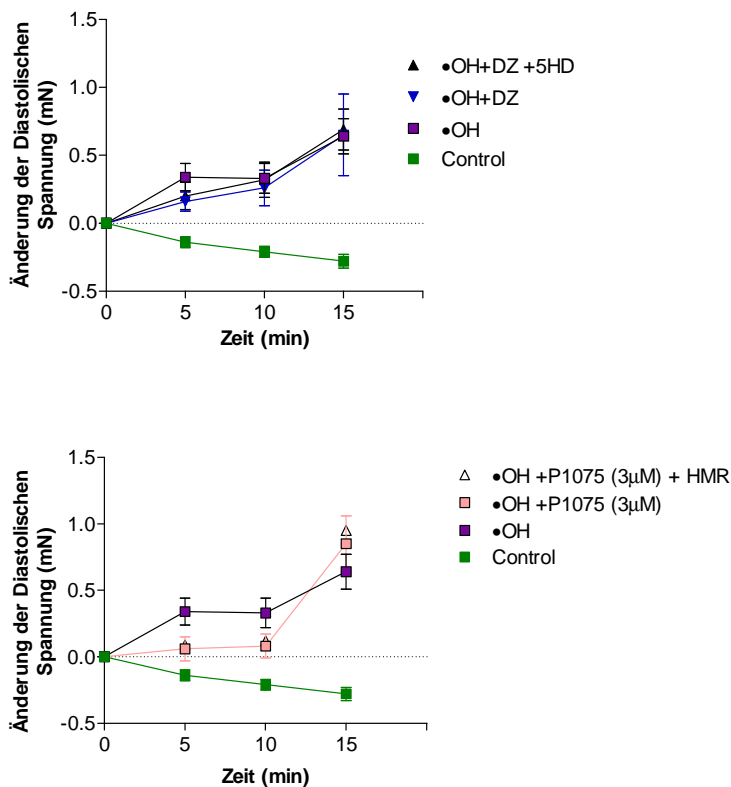


Abbildung 20: Keine signifikante Änderung der diastolischen Spannung während Hydroxylradikalexposition nach Vorbehandlung mit mitochondrialen (oben) und sarkolemmlen (unten) Kaliumkanalmodulatoren.

Die $F_{max}Ca$ nach Auswaschen von •OH wurde sowohl durch Diazoxid als auch P-1075 verbessert (Abbildung 19 und 21). Die Koinkubation mit den K_{ATP} -Kanal Blockern 5-HD bzw. HMR-1098 schwächte die protektiven Effekte von Diazoxid bzw. P-1075 wieder ab, während die Blocker alleine keinen Effekt auf die durch •OH reduzierte $F_{max}Ca$ hatten (Abbildung 21). Die EC_{50} Werte für Ca^{2+} waren in allen Experimenten vergleichbar (nicht gezeigt). Diese

Daten suggerieren, dass die Aktivierung von sowohl sarcK_{ATP} als auch mitoK_{ATP} Kanälen während •OH zu einer Verbesserung der Kraftentwicklung nach Auswaschen von •OH führen.

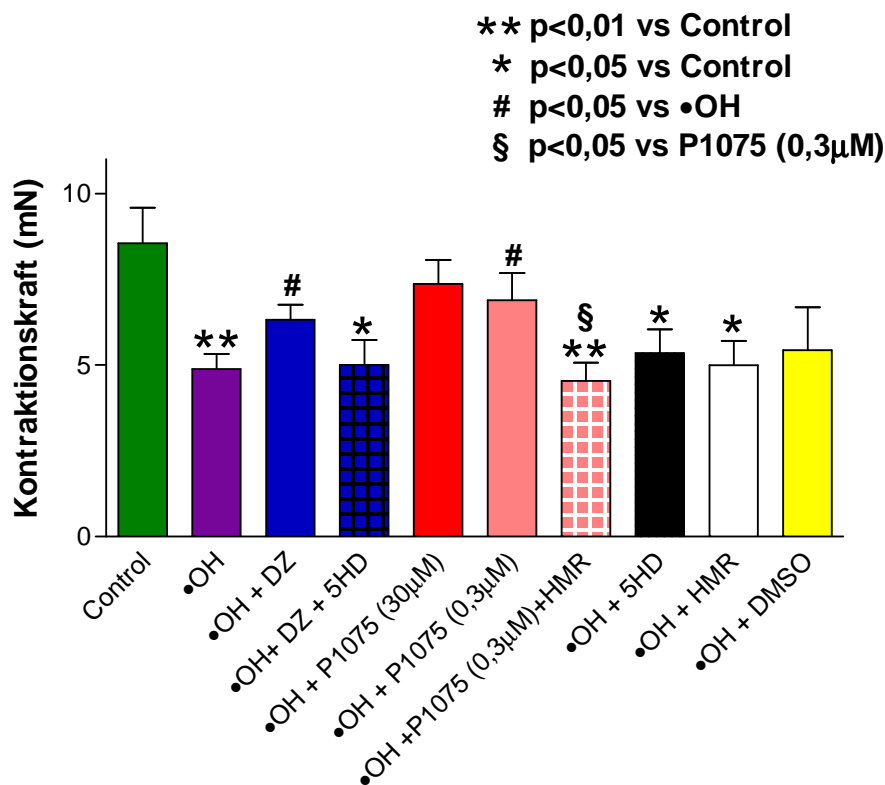


Abbildung 21: Der mitochondriale und der sarkolemmale Kaliumkanalöffner Diazoxid bzw. P1075 verbessert die maximale Kraftentwicklung durch Calcium im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen nach Hydroxylradikalexposition und Auswaschen der Radikale. Diese Effekte lassen sich durch die jeweiligen Kaliumkanalblocker 5-HD und HMR inhibieren.

Nach dem Wash-Out von Calcium folgte die Testung der inotropen Reaktion auf Isoproterenol in aufsteigender Konzentration (Abbildung 22). Hierbei zeigte eine signifikant verringerte Isoprenalin-Response der unbehandelten Hydroxylradikal-Gruppe sowie der mit 5-HD vorbehandelten Gruppe. P1075 in der höheren Dosierung von 30 µmol/l verbesserte signifikant die maximale Kraft auf Isoprenalin während sich in der niedrigeren Dosierung von P1075 sowie in der Diazoxid vorbehandelten Gruppe zwar höhere Durchschnittswerte von 6,91mN bzw. 6,69mN im Vergleich mit der Hydroxylradikalgruppe (5,96mN) zeigten, welche die Signifikanzgrenze jedoch nicht erreichten (Abbildung 23).

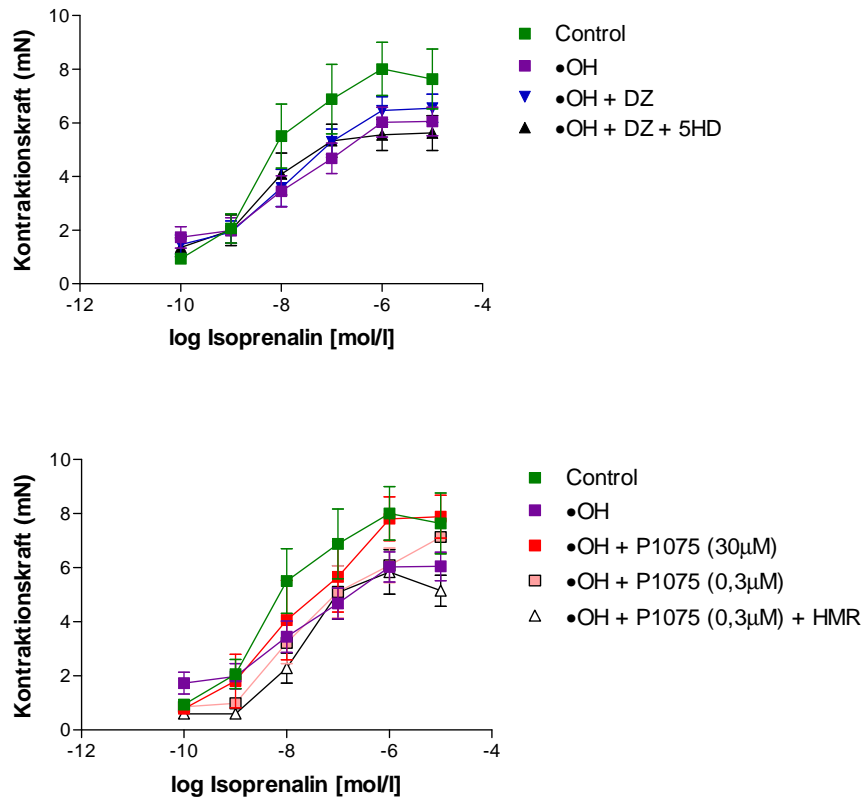


Abbildung 22: Signifikante Verbesserung der Kraftentwicklung nach Vorbehandlung mit P1075 (30µM) sowie tendenzielle Verbesserung unter P1075 (0,3µM) sowie Diazoxid unter steigender Konzentration von Isoprenalin nach Hydroxylradikalexposition und Auswachen der Radikale

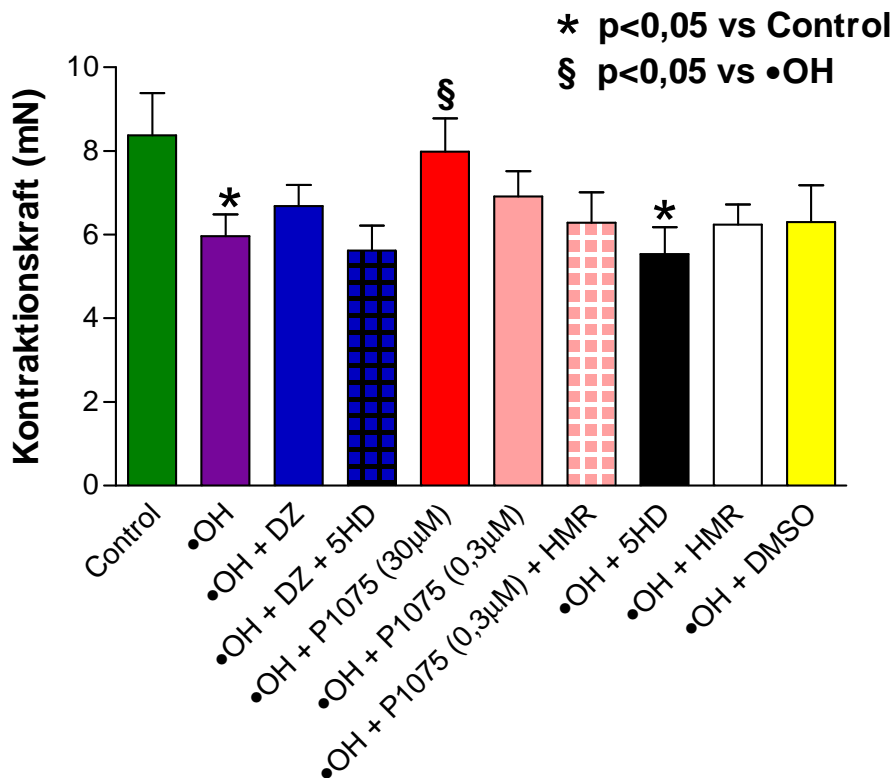


Abbildung 23: Signifikante Verbesserung der Kraftentwicklung nach Vorbehandlung mit P1075 (30µM) sowie tendenzielle Verbesserung unter P1075 (0,3µM) sowie Diazoxid im Vergleich mit den anderen Versuchsgruppen unter steigender Konzentration von Isoprenalin nach Hydroxylradikalexposition und Auswachen der Radikale

Die zur Kontrolle zusätzlich durchgeführten Versuchsgruppen mit alleiniger Behandlung von HMR und DMSO zeigten im Versuchsablauf keine signifikante oder tendenziell andere Reaktion als die unbehandelte Gruppe mit Hypoxie und Reoxygenierung.

Die Messwerte dieser Versuchsreihe entnehmen Sie bitte der Tabelle 3.

Tabelle 3: Messwerte der Versuchsreihe Kaliumkanalmodulatoren unter Generierung von Sauerstoffradikalen

	n	Basal [mN]	vor •OH [mN]	nach •OH [mN]	nach w/o [mN]	F _{max} Ca [mN]	F _{max} Iso [mN]	pEC ₅₀ (Iso) [mmol/l]
Kontrolle	14	5.2±0.5	4.5±0.5	3.9±0.4	2.9±0.4	8.6±1.0	8.4±1.0	7.9±0.3
•OH	16	4.7±0.5	4.0±0.5	0.9±0.2	2.5±0.4	4.9±0.4	6.0±0.5	7.7±0.2
•OH +DZ	14	5.2±0.5	4.4±0.6	0.8±0.2	2.7±0.4	6.3±0.4	6.7±0.5	7.9±0.2
•OH +DZ +5HD	10	5.1±0.6	4.4±0.6	0.7±0.1	2.7±0.6	5.0±0.7	5.6±0.6	8.3±0.2
•OH +5HD	10	5.2±1.3	4.9±1.2	0.7±0.2	2.1±0.7	5.4±0.7	5.5±0.6	8.3±0.2
•OH +P1075 (30 µmol/l)	8	5.1±0.7	0.4±0.1	0.3±0.0	0.5±0.3	7.4±0.7	8.0±0.8	7.7±0.3
•OH +P1075 (3µmol/l)	9	5.2±0.6	0.9±0.2	0.9±0.2	2.0±0.5	6.9±0.8	6.9±0.6	7.3±0.4
•OH +P1075(30 µmol/l) +HMR	10	4.9±0.7	3.0±0.7	0.5±0.1	1.5±0.3	4.5±0.5	6.3±0.7	7.4±0.4
•OH + HMR	10	5.2±0.5	4.5±0.5	0.8±0.3	1.6±0.4	5.0±0.7	6.2±0.5	7.8±0.2
•OH +DMSO	5	5.4±0.7	4.9±0.8	1.0±0.4	2.3±0.8	5.4±1.3	6.3±0.9	7.3±0.6

•OH, Exposition mit Hydroxylradikalen (Fe-NTA + H₂O₂ 1 mmol/l); DZ, Diazoxid (100 µmol/l); 5-HD, 5-Hydroxydecanoat (500 µmol/l); HMR-1098 (30 µmol/l); Basal, Ausgangskraft der Muskeltrabekel; w/o, Auswaschen (wash / out).

Bei den Versuchen mit linksventrikulärem Myokard zeigte sich in der mit 5-HD behandelten Gruppe eine statistisch signifikant größere Verminderung der Kontraktionskraft als in der Kontrollgruppe mit Hydroxylradikalen ($p < 0,05$) (Abbildung 24 oben). Darüberhinaus konnte ein tendenziell größerer Anstieg der diastolischen Spannung in der mit 5-HD behandelten Gruppe als in den beiden anderen Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 24 unten). Aufgrund der niedrigen Versuchszahlen war dies nicht statistisch signifikant.

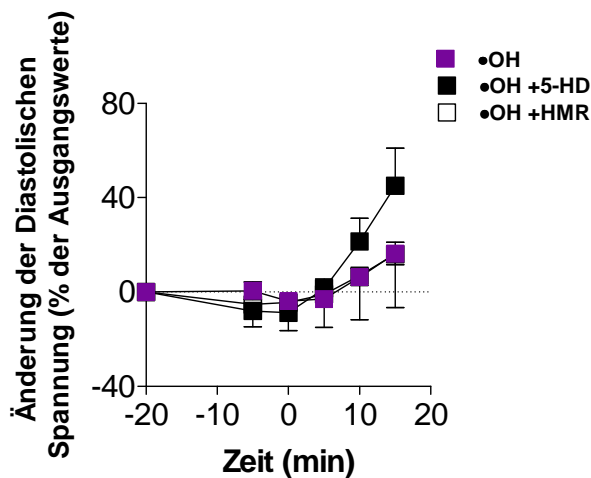
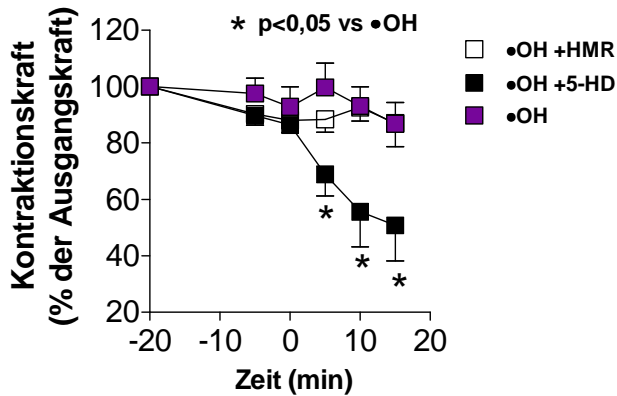


Abbildung 24: Signifikante Reduktion der Kontraktionskraft der linksventrikulären Muskeltrabekel während Radikalexposition nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalblocker 5-HD (oben) sowie nicht signifikanter, aber vergrößerter mehrerer diastolischer Spannungsanstieg der mit 5-HD vorbehandelten Gruppe (unten). (-20 min: Gabe von 5-HD bzw. HMR; -5 min: Gabe von Fe-NTA; 0: Gabe von H₂O₂ = Hydroxylradikalexposition). Es wurden 19 Trabekel von 5 Patienten ausgewertet (n=5).

Die Behandlung mit HMR hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Kontraktionskraft oder die diastolische Spannung im Vergleich mit der Hydroxylradikalgruppe. In der maximalen Reaktion auf Calcium fand sich wiederum eine statistisch signifikant kleinere maximale Kraftentwicklung in der mit 5-HD behandelten Gruppe als zu der Kontrollgruppe mit Hydroxylradikalen ($p < 0,05$) (Abbildung 25).

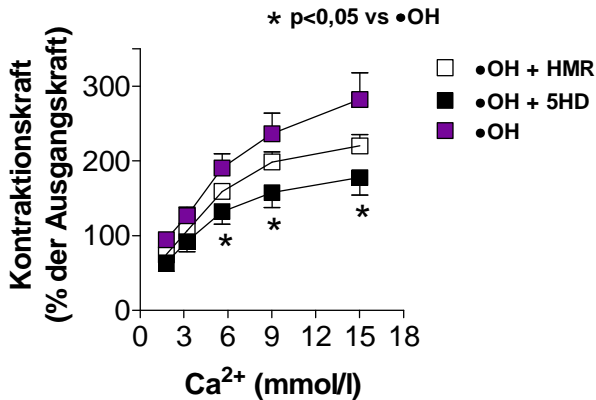


Abbildung 25: Signifikant reduzierte Kontraktionskraft der linksventrikulären Muskeltrabekel nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Kaliumkanalblocker 5-HD auf steigende Konzentrationen von Calcium nach Auswaschen der Radikale im Vergleich zur Vorbehandlung mit dem sarkolemmlen Kaliumkanalblocker HMR bzw. einer unbehandelten Gruppe. Es wurden 19 Trabekel von 5 Patienten ausgewertet (n=5).

4.4 Western-Blot-Analyse von linksventrikulärem Myokard terminal insuffizienter und gesunder Herzen auf die Protein-Expression von SUR1, SUR2, KIR6.1 und KIR6.2

Um zu untersuchen, ob es in insuffizientem Myokard zu einer unterschiedlichen Protein-Expression der K_{ATP} -Untereinheiten KIR6.x und SURx kommt, wurden Western-Blot-Analysen an linksventrikulären menschlichen Myokard von terminal herzinsuffizienten Patienten (jeweils 8 Patienten mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie) sowie in Gewebe von 8 herzgesunden Patienten durchgeführt. Um eine Unterscheidung zwischen mitochondrialer und sarkolemmler Proteinexpression treffen zu können, wurde die Gesamtproteinfraktion durch differenzielle Zentrifugation in eine mitochondrial, eine zytosolisch und eine membranös angereicherte Proteinfraktion aufgeteilt.

Durch differenzielle Zentrifugation kam es zu einer Anreicherung des mitochondrialen Proteins Cytochrom C, aber auch von Calsequestrin, einem im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisierten Protein, in der mitochondrialen Fraktion (Abb. 26 und 27). Dies ist Ausdruck der engen Beziehung zwischen Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum (Garcia-Perez et al., 2008; Clarke et al., 2008).

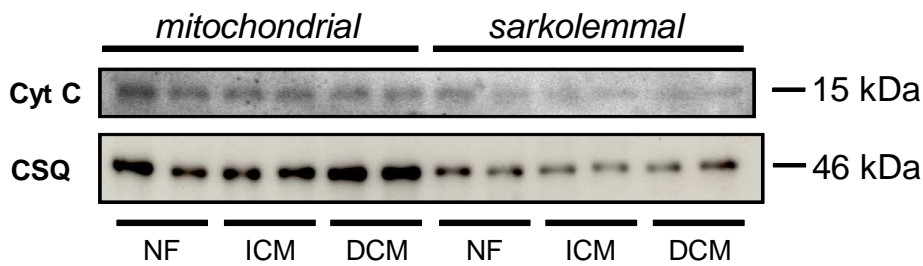


Abbildung 26: Banden im WesternBlot bei einer Proteingröße von 15 kDa und 46 kDa nach Antikörperexposition gegen Cytochrom C (Cyt C) und Calsequestrin (CSQ) in mitochondrial und sarcolemmal angereicherten Proteinfractionen von gesunden Herzen (NF) und Herzen mit ischämischer (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM).

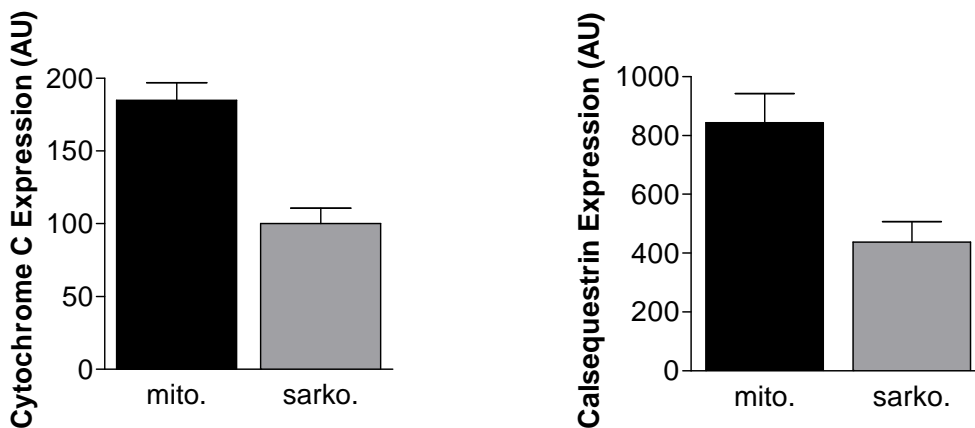


Abbildung 27: Verringerte Cytochrom C und Calsequestrin – Expression in der sarcolemmal abgereicherten Proteinfraction gegenüber der mitochondrial angereicherten Fraktion in der Densitometrie der WesternBlots (Ergebnisse jeweils statistisch signifikant $p < 0,05$).

Ferner zeigte sich eine signifikante Reduktion von Cytochrom C in der mitochondrialen Fraktion in insuffizienten gegenüber nicht-insuffizienten Herzen ohne Unterschiede zwischen Patienten mit ICM oder DCM (Abb. 28 und 29). Die reduzierte mitochondriale Expression von Cytochrom C korrelierte dabei mit einer verringerten Aktivität des mitochondrialen Enzyms Aconitase, welches durch oxidativen Stress inaktiviert wird (Abb.).

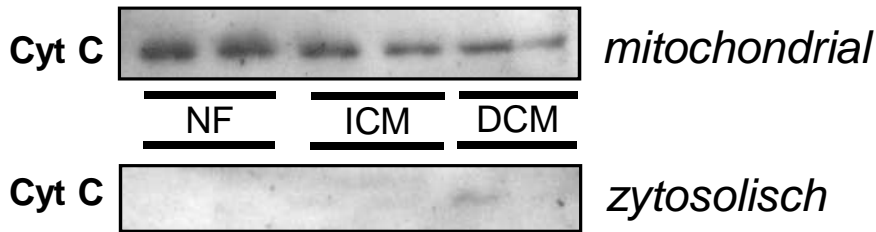


Abbildung 28: Western Blot – Banden nach Antikörperexposition gegen Cytochrom C (Cyt C) in mitochondrialen und cytosolisch angereicherten Proteinfractionen von gesunden Herzen (NF) und Herzen mit ischämischer (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM).

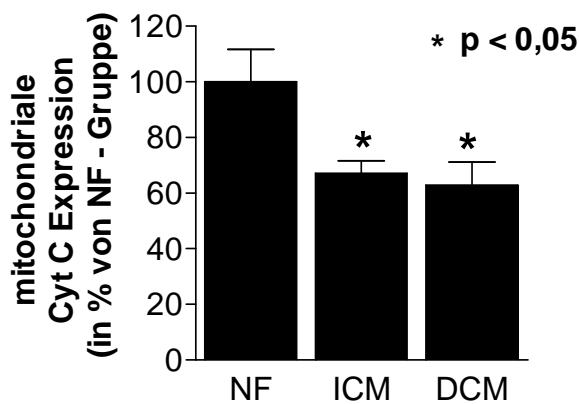


Abbildung 29: Verringerte Cytochrom C (Cyt C) Expression in der Densitometrie der Western in der mitochondrial angereicherten Proteinfraction von Herzen mit ischämischer (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) im Vergleich zu gesunden Herzen (NF). (Ergebnisse jeweils statistisch signifikant $p < 0,05$).

Es wurden Western Blots mit Antikörpern gegen KIR6.1, KIR6.2 sowie SUR1 und SUR2 durchgeführt (Abbildung 30 und 31).

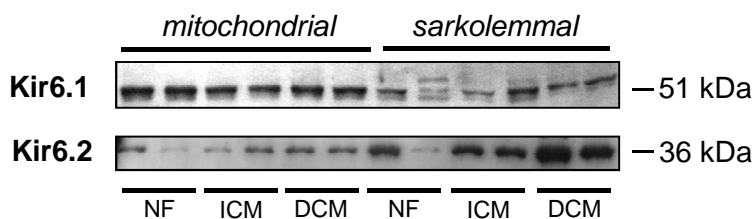


Abbildung 30: Repräsentativer Immunblot der KIR6.1 und KIR6.2 Western-Blots in den mitochondrial und sarcolemmal angereicherten Proteinfractionen in gesunden Herzen (NF) und insuffizienten Herzen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie (ICM bzw. DCM).

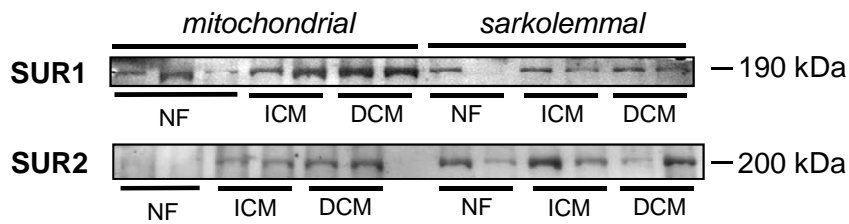


Abbildung 31: Repräsentativer Immunblot der SUR1 und SUR2 Western-Blots in den mitochondrial und sarcolemmal angereicherten Proteinfractionen in gesunden Herzen (NF) und insuffizienten Herzen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie (ICM bzw. DCM).

Hierbei zeigte sich eine insgesamt signifikant erhöhte Proteinexpression von KIR6.1 in der mitochondrial angereicherten Proteinfraction gegenüber der sarcolemmalen ($p < 0,05$ Mito vs Sarcol; Abbildung 32 links). Die Expression von Kir6.1 in der mitochondrialen Fraction war in insuffizienten Herzen nicht verändert gegenüber nicht-insuffizienten Herzen (Abbildung 32 rechts).

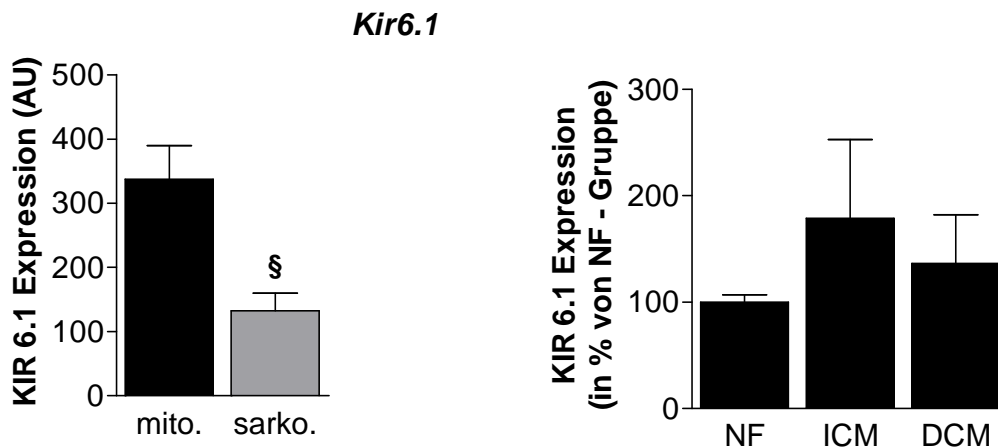


Abbildung 32: Links: Verringerte Proteinexpression von KIR6.1 in der sarcolemmal angereicherten Proteinfraction in der Quantifikation. §= $p < 0,05$ vs. mito Rechts: Tendenziell erhöhte Proteinexpression von KIR 6.1 Herzen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie (ICM bzw. DCM) gegenüber gesunden Herzen (NF).

Bei der Expression von KIR6.2 zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Die Expression von KIR6.2 war in der sarcolemmal angereicherten Phase signifikant gegenüber der mitochondrialen erhöht ($p < 0,01$ Sarcol vs Mito; Abbildung 33 links). Darüber hinaus zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Kir6.2 in insuffizienten gegenüber nicht-insuffizienten Herzen (Abbildung 33 rechts).

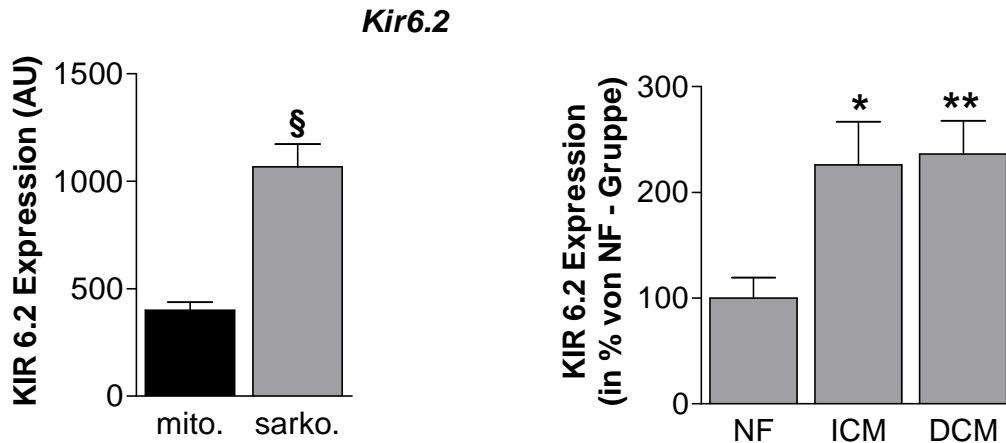


Abbildung 33: Links: Erhöhte Proteinexpression von KIR 6.2 in der sarkolemmal angereicherten Proteinfraktion gegenüber der mitochondrial angereicherten Fraktion in der Quantifikation. § = $p < 0,01$ vs. mito

Rechts: Signifikant erhöhte Proteinexpression von KIR 6.2 in Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) in der sarkolemmalen Proteinfraktion gegenüber gesunden Herzen (NF). * = $p < 0,05$ bzw. ** = $p < 0,01$ vs. NF

Die Expression von SUR1 war in der mitochondrial angereicherten Proteinfraktion gegenüber der sarkolemmalen erhöht ($p < 0,01$ sarko. vs mito.; Abbildung 34 links). Hierbei war in der mitochondrialen Fraktion die Expression von SUR1 in insuffizientem gegenüber nicht-insuffizientem Myokard erhöht (Abbildung 34 rechts).

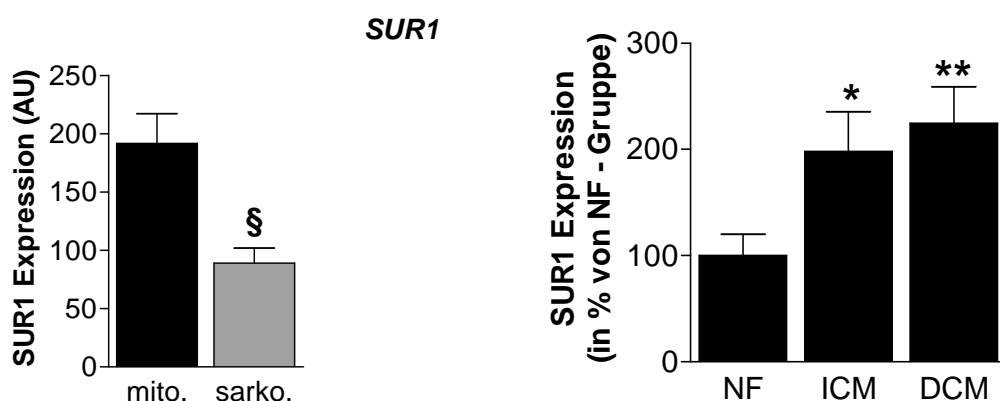


Abbildung 34: Links: Signifikant erniedrigte Proteinexpression von SUR1 in der sarkolemmal angereicherten Proteinfraktion gegenüber der mitochondrial angereicherten Fraktion in der Quantifikation. § = $p < 0,01$ vs. mito

Rechts: Signifikant erhöhte Proteinexpression von SUR 1 in Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) in der mitochondrialen

Proteinfraktion gegenüber gesunden Herzen (NF). * = $p < 0,05$ bzw. ** = $p < 0,01$ ICM bzw. DCM vs. NF

Die Expression von SUR2 war in den mitochondrial und sarkolemmal angereicherten Proteinfraktionen ähnlich stark ausgeprägt (Abb. 35 links). Die Gesamt-Expression von SUR2 (mitochondrial und sarkolemmal) war in insuffizientem gegenüber nicht-insuffizientem Myokard erhöht (Abb. 35 rechts). Die Heraufregulation von SUR2 korrelierte hierbei linear mit der Heraufregulation von Kir6.2 ($r=0.69$; $P<0.001$; nicht gezeigt).

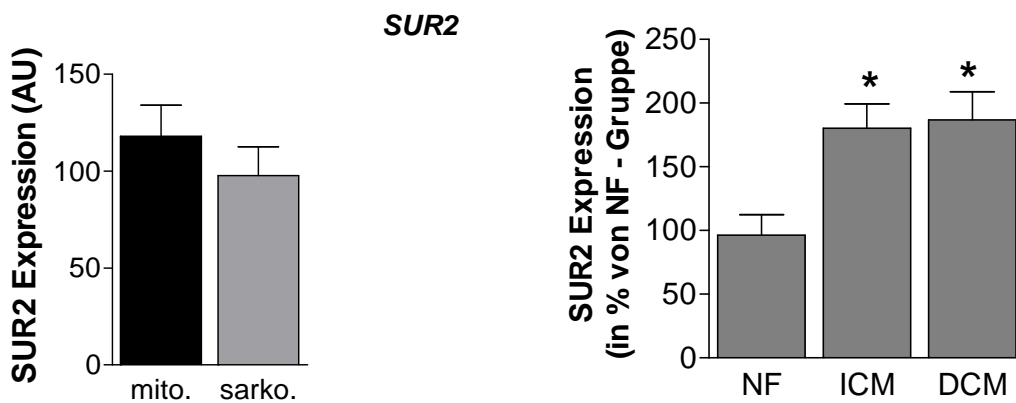


Abbildung 35: Links: Quantifikation der Proteinexpression von SUR2 in der mitochondrial und sarkolemmal angereicherten Proteinfraktion (mito bzw. sarko) ohne signifikante Unterschiede. Rechts: Signifikant erhöhte Proteinexpression von SUR2 in der gesamten Proteinfraktion in Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) gegenüber gesunden Herzen (NF). * = $p < 0,05$ ICM bzw. DCM vs. NF.

5 Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten sind:

- 1.) In nicht-insuffizientem menschlichen Myokard führt die pharmakologische Aktivierung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, aber nicht $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ während Hypoxie zu einer Verbesserung der kardialen Kontraktilität bei Reoxygenierung.
- 2.) Die pharmakologische Aktivierung von sowohl $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ als auch $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ verringert eine durch Hydroxylradikale induzierte kontraktile Dysfunktion (myokardiales Stunning).
- 3.) Bei chronischer Herzinsuffizienz ist in linksventrikulärem Myokard die Proteinexpression des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ heraufreguliert, was allerdings nicht zu einer erhöhten endogenen Aktivität dieser Kanäle führt.
- 4.) Eine endogene Aktivierung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ verringert in insuffizientem LV Myokard die $\bullet\text{OH}$ -induzierte kontraktile Dysfunktion.

$\bullet\text{OH}$ treten schubartig in hoher Konzentration insbesondere bei der Reperfusion ischämischen Myokards auf und tragen zur kontraktile Dysfunktion *in vitro* und im Menschen *in vivo* bei. $\bullet\text{OH}$ -induzierte kontraktile Dysfunktion ist zum einen auf eine Inhibition der sarkoplasmatischen Retikulum (SR) Ca^{2+} ATPase (Zweier et al., 2006; Flesch et al., 1999; Xu et al., 1997) und zum anderen eine Aktivierung des rückwärts gerichteten Modus (reverse-mode) des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers (NCX) zurückzuführen. Dies führt zu einem Anstieg der diastolischen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), jedoch einer reduzierten Ca^{2+} -Beladung des SRs. Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an atrialem Myokard (diese Arbeit) sowie an nicht-insuffizientem ventrikulären Myokard (Maack et al., 2009), in denen ein Anstieg der diastolischen Spannung, eine Verlangsamung der Relaxation und eine Abnahme der entwickelten Kraft in der Gegenwart von $\bullet\text{OH}$ beobachtet wurde.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass insuffizientes LV Myokard weitgehend resistent gegenüber $\bullet\text{OH}$ -induziertem myokardialen Stunning war (Maack et al., 2009). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Beobachtungen an isolierten Kardiomyozyten von Hunden, in denen durch tachykardes Pacing eine Herzinsuffizienz induziert wurde. In diesen Zellen führten $\bullet\text{OH}$ zu einer früheren Kontraktur der Zellen als in nicht-insuffizienten Kontroll-Myozyten (Tsutsui et al., 2001). Allerdings waren diese Myozyten

quieszent (nicht-schlagend), und es wurden 10-fach höhere •OH Konzentrationen eingesetzt als in unseren Studien an ventrikulärem Myokard (hier und Maack et al., 2009). Da es in menschlichem insuffizientem Myokard eher zu einer reduzierten denn zu einer verbesserten antioxidativen Kapazität kommt (Bäumer et al., 2000; Sam et al., 2005), war es das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, den Mechanismus für diese endogene Resistenz gegenüber •OH-induziertem Stunning in menschlichem insuffizientem Myokard zu ergründen.

Seit 1986 ist das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC) bekannt, bei dem durch vorangehende kurze Phasen von Ischämie und Reperfusion die Infarktgröße bei einer darauf folgenden längeren Ischämie mit Reperfusion verringert werden kann (Murry et al., 1986). Die genauen Mechanismen der IPC sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere die Beteiligung von K_{ATP} Kanälen, deren Lokalisation (sarkolemmal versus mitochondrial) sowie deren pharmakologische Beeinflussung geben bis heute Anlass zur Diskussion (Heusch et al., 2008; Flagg et al., 2005; Kane et al., 2005; Ardehali et al., 2005; O'Rourke et al., 2004; Hausenloy et al., 2006). Wir spekulierten in unseren Arbeiten, dass insuffizientes Myokard durch Aktivierung von Signalkaskaden, die sowohl bei chronischer Herzinsuffizienz als auch bei der IPC aktiviert sind, vor •OH-induziertem Stunning geschützt ist. Da K_{ATP} Kanäle vermutlich wichtige und weit downstream gelegene Effektoren dieser Signalkaskaden sind, untersuchten wir die Rolle von $sarck_{ATP}$ und $mitoK_{ATP}$ Kanälen bei durch Hypoxie/Reoxygenierung bzw. •OH-induzierter kontraktiler Dysfunktion.

5.1 K_{ATP} -Modulatoren bei Ischämie und Reperfusion

K_{ATP} Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Protektion vor Ischämie/Reperusionsbedingtem Myokardschaden. Es ist jedoch derzeit noch umstritten, ob $sarck_{ATP}$, $mitoK_{ATP}$ Kanäle oder beide diese protektiven Effekte ausüben. Die meisten in Tiermodellen und an menschlichem Myokard durchgeführten Studien beschreiben eine entscheidende Rolle von $mitoK_{ATP}$ Kanälen, allerdings beruht die Evidenz dieser Studien auf der Selektivität von pharmakologischen K_{ATP} Kanal Aktivatoren und Inhibitoren. Insbesondere die Selektivität des putativen $mitoK_{ATP}$ Kanal Aktivators Diazoxid ist jedoch nicht einheitlich in allen Spezies und Untersuchungsbedingungen vorzufinden. So zeigen Studien in Mäuse- und Kaninchenherzen, dass Diazoxid auch den $sarck_{ATP}$ Kanal aktivieren und die Aktionspotentialdauer während der Ischämie in Mäusen verkürzen kann (Suzuki et al., 2003; Birincioglu et al., 1999). Bei Meerschweinchen öffnete eine sehr hohe Konzentration von 300 $\mu\text{mol/l}$ Diazoxid den $sarck_{ATP}$ Kanal in der Gegenwart hoher ADP Konzentrationen. Dies zeigt an, dass Diazoxid in Situationen, in denen ADP stark ansteigt, also insbesondere während einer Ischämie, den $sarck_{ATP}$ Kanal öffnen kann (D'Hahan et al., 1999). Darüber

hinaus wurde kürzlich beobachtet, dass im Vorhofmyokard der Maus der sarcK_{ATP} Kanal aus den Untereinheiten KIR6.2 und SUR1 (anstatt SUR2 im Ventrikel) besteht, was die Aktivierung des sarcK_{ATP} Kanals durch Diazoxid sogar unter normoxischen Bedingungen ermöglichte (Flagg et al., 2008). Da ein großer Teil unserer Experimente in menschlichem Vorhofmyokard durchgeführt wurde, machte dies eine kritische Prüfung der Selektivitäten der verwendeten K_{ATP}-Kanal Aktivatoren bzw. Inhibitoren in menschlichem atrialen Myokard unabdingbar.

Die Aktivierung des sarcK_{ATP} Kanals verkürzt die Aktionspotentialdauer und reduziert die Kontraktilität (Picard et al., 1999; O'Rourke et al., 1994). Unter normoxischen Bedingungen reduzierte P1075, aber nicht Diazoxid die kardiale Kontraktilität. Die pEC₅₀ (-6.5 mol/l) war hierbei identisch mit Patch-Clamp Daten in HEK-293 Zellen, die rekonstituierte sarcK_{ATP} Kanäle aus KIR6.1/SUR1 exprimierten (Ng et al., 2008). Der Effekt von P-1075 wurde durch HMR 1098, aber nicht durch 5HD oder Diazoxid gehemmt. Darüber hinaus war die Reduktion der Kontraktilität durch P-1075 vollständig reversibel durch das Hinzufügen von HMR 1098 in der fortgesetzten Gegenwart von P-1075. Es kann daher geschlossen werden, dass unter normoxischen Bedingungen P-1075, aber nicht Diazoxid, den sarcK_{ATP} aktiviert.

Die Gegenwart von Diazoxid, aber nicht von P-1075, während Hypoxie führte zu einer Verbesserung der Kraftentwicklung während der anschließenden Reoxygenierung. Dieser Effekt wurde durch den mitoK_{ATP}-Kanal Blocker 5-HD, aber nicht den sarcK_{ATP}-Kanal Blocker HMR-1098 inhibiert. Dies zeigt an, dass Diazoxid die posthypoxische kontraktile Dysfunktion (myokardiales Stunning) durch Aktivierung von mitoK_{ATP}, aber nicht von sarcK_{ATP} verbessert. Obwohl diese Daten in Übereinstimmung mit den meisten früheren Ergebnissen an menschlichem Myokard sind, so schließen sie (durch Verwendung von Diazoxid in der Gegenwart von HMR-1098) dennoch erstmalig eine protektive Wirkung von Diazoxid am sarcK_{ATP} Kanal aus. Die einzige Studie, die tatsächlich Diazoxid zusammen mit 5-HD und HMR-1098 testete, wurde an *nicht-schlagendem* Myokard durchgeführt. Unter diesen Bedingungen muss damit gerechnet werden, dass ein möglicher protektiver Effekt durch sarcK_{ATP} Kanal Öffnung unterschätzt wird, da dieser in erster Linie über eine Verkürzung der APD den Ca²⁺ Einstrom in die Zellen verringert, was in nicht-schlagendem Myokard nicht hinreichend zum tragen käme.

Die hier erhobenen Daten an menschlichem Myokard stimmen darüber hinaus mit den Ergebnissen an isolierten Rattenherzen überein, in welchen eine durch Diazoxid induzierbare und durch 5-HD blockierbare Präkonditionierung beobachtet wurde (Fryer et al.,

2000). Garlid et al. (1997) machten vergleichbare Beobachtungen und beschrieben eine $K_{1/2}$ für den Diazoxid-Effekt auf $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanäle von $0,49 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$ für Diazoxid. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in nicht schlagenden Kaninchen Myozyten erhoben (Sato et al., 1998; Baines et al., 1999; Ockaili et al., 1999).

Die Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu Resultaten in Mäusen. In diesen blockte der $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanal Inhibitor HMR1098, aber nicht der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal Inhibitor 5-HD, die ischämische als auch Diazoxid-induzierte Präkonditionierung (Suzuki et al., 2002). Darüber hinaus war in KIR6.2 defizienten Mäusen keine Präkonditionierung mit Diazoxid mehr möglich (Suzuki et al., 2003). In einer Studie an Kaninchen zeigte sich jedoch keine Blockade der Diazoxid induzierten pharmakologischen Präkonditionierung durch HMR 1098, wohingegen die ischämische Präkonditionierung durch 5-HD, aber nicht HMR 1098 geblockt wurde (Sato et al., 2000).

Diese Daten legen nahe, dass es spezies-abhängige Unterschiede in der ischämischen bzw. pharmakologischen Präkonditionierung sowie der Spezifität der verwendeten K_{ATP} Kanalmodulatoren gibt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass im Vergleich zum menschlichen Herz das Mäuseherz aufgrund seiner hohen basalen Herzfrequenz (um 600/min) ein deutlich höheres Ausmaß an basaler Arbeit leistet und somit über eine geringere kardiale Reserve verfügt (Kass et al., 1998). In Nagetierherzen ist der $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanal bereits unter normoxischen Bedingungen essentiell für optimale Leistungsadaptation unter Stress bei Veränderung zellulärer ADP und Calcium-Konzentrationen (Flagg et al., 2005; Kane et al., 2005). Dies kann aus Experimenten geschlossen werden, in denen eine genetische Defizienz (KIR6.2 KO) oder die pharmakologische Blockade von $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ durch HMR-1098 in Mäusen die kontraktile Dysfunktion während Hypoxie und der nachfolgenden Reoxygenierung verschlechtern (Suzuki et al., 2002). Im Gegensatz dazu kommt es während $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanal Blockade in Ratten (Fryer et al., 2000) oder größeren Säugetieren (Saavedra et al., 2002; Billman et al., 1998) zu keiner Verschlechterung der kardialen Funktion während einer Ischämie. Angesichts der Beobachtung, dass Diazoxid bei hohen ADP Konzentrationen $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanäle aktivieren kann (D'Hahan et al., 1999; Matsuoka et al., 2000) lässt sich daher spekulieren, dass im Gegensatz zu anderen Säugetieren in Mäusen während einer Ischämie ein schnellerer und ausgeprägterer Anstieg von ADP eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Diazoxid-induzierte Aktivierung des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ -Kanals besteht. Dies könnte erklären, warum Diazoxid den sarkolemmlen K_{ATP} -Kanal während der Hypoxie oder Ischämie in Mäusen (Suzuki et al., 2003) öffnet, aber nicht im Menschen.

In der aktuellen Studie war Diazoxid 15 Minuten vor und während der Hypoxie anwesend. In einer vorausgegangenen Untersuchung von Pomerantz und Mitarbeitern schützte Diazoxid menschliches Myokard nur, wenn es vor der Hypoxie gegeben wurde, aber nicht während der Hypoxie zugegen war (Pomerantz et al., 2000). Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar. Möglicherweise könnten die unterschiedlichen Hypoxiezeiten (90 Minuten in dieser Studie, 30-45 Minuten bei Pomerantz et al.) zu den Differenzen beitragen.

Sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in intakten kardialen Myozyten, welche hohen Konzentrationen von Calcium ausgesetzt wurden, hemmte Diazoxid die exzessive Calcium-Überladung bei leichter Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials (Holmuhamedov et al., 1999; Korge et al., 2002). Demnach könnte Diazoxid in dieser Studie eine Verbesserung der posthypoxischen kontraktilen Funktion durch Konservieren zellulärer Energie während der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung bewirkt haben.

Das gegenwärtige Konzept über die Mechanismen der kontraktilen Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion (myokardiales „Stunning“) schließt die erhöhte Produktion von ROS und transiente Calcium-Überladung (Calcium-Hypothese) während der Reperfusion ein (Bolli et al., 1999). Viele Studien deuten darauf hin, dass in Nagetieren eine verminderte Calcium-Sensitivität der kontraktilen Filamente die kontraktile Dysfunktion bedingt (Bolli et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie mit Säugetieren (Schweine) keine Proteolyse von Troponin I (als Zeichen eines myokardialen Schadens, der verringerte Ca^{2+} -Sensitivität bedingt) nach 90 Minuten Ischämie mit einer Stunde Reperfusion *in vivo* (Kim et al., 2001). Dennoch reduzierten sich die Dichte des L-Typ Calcium-Kanal Stroms sowie die Amplitude cytosolischer Ca^{2+} -Transienten in den betroffenen Myokard-Regionen im Vergleich zu nicht-ischämischen Regionen dieser Herzen. Phospholamban, ein endogener Hemmer der SR Ca^{2+} -ATPase, wurde in den „gestunnten“ Regionen vollständig dephosphoryliert im Gegensatz zu den nicht-ischämischen Bereichen (Kim et al., 2001; Picard et al., 1999). Es wurde daher postuliert, dass der Mechanismus des Stunnings in Säugetieren unterschiedlich zu dem in Nagetieren sei, bei welchen keine Verringerung des Ca^{2+} -Transienten gefunden wurde (Bolli et al., 1999; Kim et al., 2001). Die Tatsache, dass in unseren Studien an humanem atrialen Myokard sowohl nach Hypoxie/Reoxygenierung als auch $\bullet OH$ -induziertem Stunning eine kontraktile Dysfunktion auftrat, die bei Applikation hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen fortbestand, durch β -adrenerge Stimulation jedoch (zumindest partiell) reversibel war, spricht gegen eine in diesem Zeitraum irreversible Schädigung der Kontraktilität durch Proteolyse von Troponin I (wie es in Nagern beobachtet wird). Die Beobachtungen stünden aber im Einklang mit der Beobachtung an größeren Säugetieren, dass eine Dephosphorylierung von Phospholamban (Kim et al., 2001) in

kausalem Zusammenhang mit der Verlangsamung der Relaxation und Verringerung der entwickelten Kraft stehen könnte, da durch β -adrenerge Stimulation (Isoprenalin) Phospholamban wieder rephosphoryliert werden könnte.

Vor diesem Hintergrund könnte spekuliert werden, dass Diazoxid die maximale Ca^{2+} -induzierte Kraftentwicklung durch Schutz vor mitochondrialer Calcium-Überladung und somit Konservierung der mitochondrialen Funktion (Holmuhamedov et al., 2001) während der Hypoxie verbessert, da hierdurch der zelluläre ATP Spiegel und somit ggf. die Phosphorylierung von Calcium-regulierenden Proteinen, z.B. Phospholamban (Kim et al., 2001), erhalten bliebe.

5.2 Kaliumkanalmodulatoren während Hydroxylradikal – Exposition ($\bullet\text{OH}$)

In der Versuchsreihe „Kaliumkanalmodulatoren bei Ischämie und Reperfusion“ waren die Kanalöffner und –blocker nur vor und während der Ischämie präsent. In den ersten Minuten der Reperfusion kommt es zu einer schubartigen und exzessiven Freisetzung von ROS, welche wichtige Mediatoren für kardiale Dysfunktion bzw. myokardiales stunning sind (Zweier et al., 2006). Da in den Hypoxie/Reoxygenierungs Experimenten die K_{ATP} -Kanal Modulatoren jedoch nicht anwesend waren, testeten wir in einer zweiten Serie von Experimenten die Effekte von K_{ATP} Kanal Modulatoren auf Hydroxylradikal-induziertes Stunning. Es zeigt sich, dass sowohl die mito K_{ATP} -Kanal Öffnung durch Diazoxid als auch die Öffnung des sarc K_{ATP} durch P1075 die maximale Kraftentwicklung auf Calcium signifikant verbesserte. Die Effekte von Diazoxid waren in dieser Versuchsreihe ebenso durch 5-HD blockbar wie die durch P-1075 hervorgerufene Protektion durch HMR 1098.

Wie oben bereits erwähnt, war die durch Isoprenalin maximal induzierte Kraftentwicklung nach $\bullet\text{OH}$ weniger stark kompromittiert als die durch Ca^{2+} induzierte maximale Kraftentwicklung, was auf eine partielle Regeneration des $\bullet\text{OH}$ -induzierten Schadens durch β -adrenerge Stimulation hinweist. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung aus anderen Studien, dass kontraktile Dysfunktion nach „Stunning“ durch β -adrenerge Stimulation wieder regeneriert werden konnte (Kloner et al., 2001; Przyklenk et al., 2001). In dieser Situation führte nur noch die Aktivierung von sarc K_{ATP} durch P-1075 während $\bullet\text{OH}$ -Exposition zu einer Verbesserung der Isoprenalin-induzierten Kraftentwicklung, was auf besonders protektive Effekte durch sarc K_{ATP} Aktivierung hinweist.

Unsere Ergebnisse beschreiben erstmals, dass sowohl Aktivierung von sarcK_{ATP} als auch mitoK_{ATP} Kanälen vor •OH-induziertem Stunning in menschlichem Myokard schützt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen an isolierten Rattenherzen (jedoch spezifischer als diese), in welchen eine H₂O₂ induzierte systolische und diastolische Dysfunktion und Verringerung von ATP, Kreatinphosphat und Glycogen gemessen wurde (Gan et al., 1998). In diesen Herzen verbesserte die *kombinierte* Aktivierung von sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} Kanälen durch den unspezifischen K_{ATP}-Kanal Öffner Cromakalim das H₂O₂ induzierte stunning und das Energiedefizit. Diese Effekte wurden durch den ebenfalls unspezifischen K_{ATP}-Kanal Blocker Glibenclamid wieder aufgehoben (Gan et al., 1998).

Oldenburg et al. berichteten, dass P-1075 mitoK_{ATP} Kanäle in rekonstituierten Liposomen öffnete, die mitochondriale ROS-Produktion in Kaninchen Myozyten steigerte und die Infarktgröße am Kaninchen-Herz reduzierte (Oldenburg et al., 2003). Die Effekte wurden durch 5-HD und Glibenclamid inhibiert, HMR 1098 jedoch wurde nicht getestet. In unserer Untersuchung wurde der protektive Effekt von P-1075 während der •OH-Exposition durch HMR 1098 komplett antagonisiert. Dies macht eine relevante Aktivierung des mitoK_{ATP} durch P-1075 unwahrscheinlich.

In normoxischen Rattenherzen entkoppelte P-1075 die oxidative Phosphorylierung und induzierte eine massive kardiale Kontraktur (Jilkina et al., 2002 und 2003). Diese Effekte wurden durch HMR 1098 und Glibenclamid, jedoch nicht durch 5HD inhibiert. Obwohl die Autoren schlossen, dass diese Effekte von P-1075 durch Aktivierung des mitoK_{ATP} Kanals vermittelt wurden, weist das Profil der Induktion und Inhibition dieser Effekte eher auf eine durch sarcK_{ATP} Kanal Aktivierung vermittelte Auswirkung auf die Zellatmung durch einen bisher unbekanntem Mechanismus hin. In unseren Arbeiten an humanem atrialen Myokard führte die Applikation von P-1075 auch bei höheren Konzentrationen bis 100 µmol/l zu keinem Anstieg der diastolischen Spannung. Obwohl wir nicht direkt bestimmt haben, ob P-1075 den mitoK_{ATP} Kanal aktiviert, deutet die Tatsache, dass Diazoxid, aber nicht P-1075, die posthypoxische kardiale Kontraktionskraft verbesserte und durch 5-HD inhibierbar war darauf hin, dass P-1075 im menschlichen Myokard eher die Öffnung des sarcK_{ATP} als des mitoK_{ATP} Kanals bewirkt, so wie bereits früher von Sato et al (Sato et al., 2000) in Kaninchen Myozyten beobachtet. Dies spricht außerdem gegen eine massive Entkopplung der Atmungskette durch P-1075 unter unseren experimentellen Bedingungen.

5.3 Regulation von sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen in menschlichem insuffizienten linksventrikulären Myokard

K_{ATP} Kanäle sind Oktamere bestehend aus einwärts-rektifizierenden Kaliumkanal- (Kir) und Sulfonylharnstoff-Rezeptor Untereinheiten (SUR). In den Herzen von Nagetieren sind KIR6.1, KIR6.2, SUR1 und SUR2a exprimiert (Flagg et al., 2005). Die Identität des sarc K_{ATP} Kanals ist weitgehend geklärt; er setzt sich in ventrikulären Kardiomyozyten aus KIR6.2 und SUR2a zusammen (Babenko et al., 1998), wobei auch ein Heteromultimer bestehend aus KIR6.1/KIR6.2 und/oder SUR2a/SUR1 kontrovers diskutiert wird (Flagg et al., 2005). In atrialen Myozyten der Maus ist die Zusammensetzung hingegen Kir6.2 und SUR1 (Flagg et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Protein-Expression der K_{ATP} Kanäle in menschlichem, linksventrikulären Myokard untersucht. Um Hinweise auf die primäre Lokalisation der Kir6.x und SURx Untereinheiten zu bekommen, führten wir eine differenzielle Zentrifugation durch, die eine Anreicherung in mitochondriale, sarkolemmale und cytosolische Fraktionen ermöglicht. Allerdings besteht insbesondere in der mitochondrialen Fraktion eine nicht ganz unerwartete Verunreinigung durch Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums, was den Nachweis des SR-lokaliserten Proteins Calsequestrin in dieser Fraktion erklärt. Diese Verunreinigung ist durch die enge Assoziation von Mitochondrien zum SR zu erklären, welche die Aufreinigung von mitochondrialen Proteinen, insbesondere in tiefgefrorenen Proben, erwartungsgemäß erschwert (Garcia-Perez et al., 2008; Clarke et al., 2008).

In insuffizientem Myokard war die mitochondriale Expression von Cytochrom C gegenüber nicht-insuffizientem Myokard reduziert. In menschlichem insuffizientem Myokard kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Apoptose (Narula et al., 1996). Der mitochondriale Signalweg der Apoptose geht in der Regel mit einer Freisetzung von Cytochrom C ins Cytosol einher (Halestrap et al., 2005), und in der Tat detektierten wir in unseren Studien vereinzelt Cytochrom C in der cytosolischen Proteinfraction, in Übereinstimmung mit Daten anderer Arbeitsgruppen (Scheubel et al., 2002). Der mitochondriale Apoptose-Signalweg ist häufig Folge erhöhten oxidativen Stress mit konsekutiver Öffnung des Permeability transition pore (mPTP) (Halestrap et al., 2005), was die Korrelation der mitochondrialen Cytochrom C Expression mit der Aktivität der Aconitase erklärt; die Aconitase ist ein mitochondriales Zitratzyklus-Enzym, welches durch ROS inaktiviert wird (Gardner et al., 1995).

In Übereinstimmung mit Untersuchungen an Ratten und Mäusen (Flagg et al., 2005 und 2008) konnten wir alle Subtypen in menschlichem linksventrikulären Myokard nachweisen.

Die Proteine KIR6.2 und SUR2A waren im insuffizienten Myokard etwa 2-fach stärker exprimiert als in nicht-insuffizientem Myokard. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen an menschlichen Vorhofmyozyten aus insuffizienten Herzen überein, in welchen die Stromdichte des ATP-abhängigen Kaliumstroms erhöht und die Sensibilität des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ (Aktionspotentialverkürzung) für eine metabolische Inhibierung mittels Cyanid und 2-Deoxyglucose gegenüber Myozyten aus nicht-insuffizienten Herzen erhöht war (Koumi et al., 1997). Dies weist auf eine direkte Aktivierung der $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanäle (Tokube et al., 1998) oder eine indirekte, durch eine Verschlechterung der oxidativen Phosphorylierung bedingte Aktivierung hin (Gardner et al., 1995; Zhang et al., 1990). Eine erhöhte Expression von $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanälen könnte somit (durch früher einsetzende APD-Verkürzung) eine Aggravation der akut negativ inotropen Effekte von $\bullet\text{OH}$ bewirken, wie in Experimenten an Mäusen mit SUR2A Überexpression beobachtet wurde (Du et al., 2006). In diesen Mäusen führte Hypoxie zu einer früheren Öffnung $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanäle und Verkürzung der APD mit einem konsekutiven Schutz vor Calcium Überladung und Zelltod (Du et al., 2006). In menschlichem, insuffizientem Myokard führte die $\bullet\text{OH}$ - Exposition jedoch zu gar keiner Verminderung der systolischen Kraftentwicklung, was gegen eine relevante Aktivierung von $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanälen unter diesen Bedingungen spricht. Auch die Inhibition des $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanals durch HMR 1098 hatte keinen inotropen Effekt in insuffizientem LV Myokard bei $\bullet\text{OH}$ - Exposition. Dieses Fehlen einer $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ -Kanal Aktivierung könnte sowohl durch eine Verringerung des $\bullet\text{OH}$ -induzierten mitochondrialen Energieverlustes und/oder eine gestörte metabolische Signalerzeugung und -übermittlung von den Mitochondrien zu den $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanälen über die Kreatinkinase erklärt sein (Hodgson et al., 2003). Diese Schlussfolgerung aus insuffizienten Mausmyozyten (Hodgson et al., 2003) würde allerdings den Beobachtungen an menschlichen insuffizienten Myozyten widersprechen, in welchen eine metabolische Inhibition zu einem früheren Auftreten eines Kaliumflusses als in nicht-insuffizienten Myozyten führte (Koumi et al., 1997).

Im Gegensatz zum $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ Kanal ist die molekulare Struktur des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals weiterhin ungeklärt (Ardehali et al., 2005). Es wurde initial angenommen, dass der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal ebenfalls aus KIR und SUR Untereinheiten bestehen würde (Mironova et al., 2004) und aufgrund der chemischen Eigenschaften wurde eine Kombination von KIR6.1 und SUR1 vermutet (Liu et al., 2001). Dies veranlasste uns, die Expression von Kir6.1 und SUR1, insbesondere in mitochondrial angereicherten Proteinfractionen, näher zu untersuchen.

Im Gegensatz zu KIR6.2 wurden die Proteine KIR6.1 und SUR1 tatsächlich überwiegend in der mitochondrial – angereicherten Proteinfraction exprimiert. Darüber hinaus fand sich eine Heraufregulation der mitochondrialen Expression von SUR1, während die mitochondriale

Expression von KIR6.1 nicht konsistent erhöht war. Die Interpretation dieser Daten hinsichtlich einer möglichen Heraufregulation des mitoK_{ATP} Kanals gestaltet sich jedoch ausserordentlich schwierig. Dies hat folgende Gründe:

- 1.) Die mitochondriale Proteinfaktion ist technisch bedingt (und weitgehend unvermeidbar) durch Komponenten des SR kontaminiert (Garcia-Perez et al., 2008). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass KIR6.1 und SUR1 im SR anstatt in Mitochondrien exprimiert wird.
- 2.) Der Antikörper gegen KIR6.1 detektierte in einer Untersuchung von Foster et al. NADH – Dehydrogenase - Flavoprotein 1, was die Spezifität des Antikörpers für KIR6.1 in Frage stellt (Foster et al., 2008).
- 3.) In KIR6.1-defizienten Mäusen ist eine Diazoxid-induzierte Flavoprotein Oxidation, Kennzeichen einer mitoK_{ATP} Aktivierung, unverändert erhalten (Miki et al., 2002). Dies spricht (zumindest in Mäusen) eindeutig gegen eine Beteiligung von Kir6.1 an mitoK_{ATP}.

Aus diesen Gründen erschien eine funktionelle Herangehensweise an die Frage, ob mitoK_{ATP} bei chronischer Herzinsuffizienz differenziell reguliert ist, als einzig sinnvolle Möglichkeit.

5.4 Die Rolle des mitochondrialen Kaliumkanales in menschlichen, linksventrikulären Myokard.

Während unbehandeltes insuffizientes LV Myokard keine relevante kontraktile Dysfunktion durch •OH-Exposition aufwies, führte die gleichzeitige Inhibition des mitoK_{ATP} Kanals mit 5-HD zu einer kontraktile Dysfunktion, die dem •OH-induzierten Effekt in nicht-insuffizientem Myokard entsprach (Maack et al., 2009). Im Gegensatz dazu vergrößerte 5-HD die kardiale Dysfunktion im rechtsatrialen, nicht-insuffizienten Vorhofgewebe weder bei der Ischämie / Reperfusion noch bei den Versuchen mit direkter Hydroxylradikal – Exposition. Diese Daten sprechen für eine endogene Aktivierung des mitochondrialen Kaliumkanales und eine dadurch ausgelöste Protektion des insuffizienten Myokard vor Hydroxylradikal-induzierter kontraktile Dysfunktion. In der Tat wurde in einem Hundemodell der chronischen Herzinsuffizienz beobachtet, dass die Infarktgröße nach Ischämie / Reperfusion nur etwa halb so groß wie in nicht-insuffizienten Kontrollherzen war (Hoskins et al., 1996). Damals wurde eine „chronische kardioprotektive Adaptation (z.B. Präkonditionierung)“ bei der Herzinsuffizienz als eine mögliche Erklärung diskutiert, der Mechanismus hierfür jedoch nicht weiter entschlüsselt. Die vorliegende Arbeit könnte somit einen wichtigen Hinweis für die zugrundeliegenden Mechanismen liefern.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben sind die Mechanismen, Mediatoren und Effektoren der Präkonditionierung komplex und bis heute nicht vollständig aufgeschlüsselt (Kane et al., 2005; Hanley et al., 2005; Ardehali et al., 2005; Halestrap et al., 2007; Costa et al., 2008). Dass die Stimulation von inhibitorischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beispielsweise durch Adenosin, Bradykinin und Opioide über diverse Signalkaskaden, unter anderem über die Phosphatidylinositol-3 Kinase, Aktin, die endotheliale NO-Synthase, Guanylatcyclase, die Proteinkinase G sowie die Aktivierung und Translokation von PKC zu einer Öffnung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanälen führt, ist mehrfach beschrieben und nachgewiesen worden (Costa et al., 2008). Die Öffnung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanälen triggert über eine geringe Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials die Produktion von ROS von Komplex I der Elektronentransportkette im Mitochondrium (Andrukhiv et al., 2006). ROS wiederum aktivieren eine weitere Form der PKC sowie eine redox-sensitive Mitogen-aktivierte Proteinkinase (beispielsweise p38, die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) 1 und 2 und Aktin), welche über die Glykogen-Synthase-Kinase- (GSK-) 3β die Öffnung des mPTP inhibiert (Costa et al., 2008). Die direkte Interaktion von PKC ϵ und GSK- 3β mit dem $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal scheinen dabei wichtige Stufen in der Verhinderung der mPTP-Aktivierung und damit von Zelltod zu sein (Costa et al., 2008).

Viele dieser Signal(kaskaden)komponenten sind bei chronischer Herzinsuffizienz aktiviert. Außerdem finden sich in insuffizientem Myokard erhöhte Spiegel von β -Endorphinen, Adenosin, eine erhöhte Expression von inhibitorischen G-Proteinen (Böhm et al., 1990), Aktin, p38, ERK1/2 sowie GSK- 3β (Andrukhiv et al., 2006). Außerdem sind, wie bereits in der Einleitung geschrieben, die Level von ROS im insuffizientem Myokard erhöht (Maack et al., 2003). Diese können aber auch direkt den $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanal öffnen (Zhang et al., 2001), was wiederum die ROS – Produktion aus der Elektronentransportkette erhöht (Andrukhiv et al., 2006) und damit einen der Gründe für einen erhöhten ROS – Spiegel in der Herzinsuffizienz darstellen könnte (Ide et al., 1990). Hier zeigt sich auch feed-forward Mechanismus, bei dem die Öffnung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals eine weitere Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals bedingen kann und eine mögliche Erklärung für den memory Effekt der Präkonditionierung liefert (Costa AD, 2008). Eine wichtige Komponente dieser feedback Schleife der Präkonditionierung ist die Translokation von PKC ϵ in das Mitochondrium (Costa et al., 2008), welche auch in der Herzinsuffizienz beobachtet wurde (Simonis et al., 2007).

Zusammenfassend kann aus unserer Beobachtung, dass die Hemmung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals die Resistenz von insuffizientem Myokard gegenüber Hydroxalradikal-induziertem Stunning aufhebt, auf eine endogene Präkonditionierung von insuffizientem Gewebe geschlossen werden.

6 Klinische Implikationen

Patienten mit einem Typ 2 – Diabetes werden oft mit Sulfonylharnstoffen, wie z.B. Glibenclamid behandelt. Glibenclamid ist dabei ein K_{ATP} Kanal-Inhibitor, der sowohl $sarcK_{ATP}$ als auch $mitoK_{ATP}$ Kanäle inhibiert. In einer Studie von Scognamiglio et al. konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Diabetes, koronarer Herzkrankheit und Herzinsuffizienz (linksventrikuläre Pumpfunktion ca. 45%) eine Behandlung mit Glibenclamid, aber nicht mit Insulin, eine kontraktile Dysfunktion bei stress-induzierter Ischämie bewirkt (Scognamiglio et al., 2002). Da diese Patienten vorher nicht präkonditioniert wurden, scheint es bei diesen herzinsuffizienten Patienten eine ischämische Toleranz zu geben, welche sensibel auf Glibenclamid reagiert. Da die beobachteten Effekte nicht typisch für eine Wirkung des $sarcK_{ATP}$ Kanals sind, ist die wahrscheinlichste Erklärung der Effekt von Glibenclamid auf den $mitoK_{ATP}$ (Saavedra et al., 2002). Dies kann auch prognostische Bedeutung haben. So wurde beispielsweise bei herzinsuffizienten Patienten (linksventrikuläre Pumpfunktion 47% bis 55%), welche sich einer Angioplastie bei Myokardinfarkt unterziehen mussten, ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien bei einer Behandlung mit Sulfonylharnstoffen festgestellt (Garrat et al., 1996).

In Zusammenschau mit unseren aktuellen Ergebnissen schlussfolgern wir, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus eine Behandlung mit Glibenclamid die myokardiale Toleranz gegenüber Ischämie und Reperfusion durch Hemmung der $mitoK_{ATP}$ Kanäle verringert. Neue Generationen von Sulfonylharnstoffen, wie z. B. Gliclazid und Glimepirid, interagieren nicht (oder weniger stark) mit dem $mitoK_{ATP}$ Kanal und sollten für diese Patienten bevorzugt eingesetzt werden (Mocanu et al., 2001; Argaud et al., 2009).

7 Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPt, Boyd AE, 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423–6.
2. Albert CJ, Ford DA. (1999) Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am J Physiol* 276:H642–H650.
3. Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. (2006) Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291:H2067-74
4. Ardehali H, Chen Z, KoY, Mejia-Alvarez R, Marban E. (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA*.
5. Ardehali H, O'Rourke B. (2005) Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*. 39:7-16.
6. Argaud L, Garrier O, Loufouat J, Gomez L, Couture-Lepetit E, Gateau-Roesch O, Robert D, Ovize M (2009).. Second Generation Sulphonylureas Preserve Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition by the Mitochondrial KATP opener Nicorandil in experimental myocardial infarction. *Shock*. 32:247–252.
7. Asimakis GK, Lick S, Patterson C. (2002) Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation*. 105:981-6.
8. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. (1992) Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 26:1054–62.
9. Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Bryan J. (1998) Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res*. 83:1132-43.
10. Baczko I, Giles WR, Light PE. (2004) Pharmacological activation of plasmamembrane KATP channels reduces reoxygenation-induced Ca(2+) overload in cardiac myocytes via modulation of the diastolic membrane potential. *Br J Pharmacol* 141:1059–67.
11. Baczko I, Jones L, McGuigan CF, Manning Fox JE, Gandhi M, Giles WR, Clanachan AS, Light PE. (2005) Plasma-membrane KATP channel-mediated cardioprotection involves posthypoxic reductions in calcium overload and contractile dysfunction: mechanistic insights into cardioplegia. *FASEB J*. Jun;19(8):980-2.
12. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL, Harris KA, Potter RF (2004) Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 36:371–9.
13. Baines CP, Cohen MV, Downey JM. (1999) Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:741–54.

14. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. (1999) Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 276: H1361–H1368.
15. Bäumer AT, Flesch M, Wang X, Shen Q, Feuerstein GZ, Böhm M. (2000) Antioxidative enzymes in human hearts with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 32:121-30.
16. Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC, Heusch G. (2000) Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1111–H1119
17. Belch, J.J., Bridges, A.B., Scott, N., Chopra, M. (1991) Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br.Heart J.* 65, 245-248.
18. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P. (1999) Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 100: II340–344.
19. Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, Terzic A.. (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. *FASEB J* 14:1943–52.
20. Billman GE, Englert HC, Scholkens BA. (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.* 286:1465-73.
21. Birincioglu M, Yang XM, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. (1999) S-T segment voltage during sequential coronary occlusions is an unreliable marker of preconditioning. *Am J Physiol.* 277:H2435–H2441.
22. Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E. (1990). Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 82:1249 –1265.
23. Bolli, R. (1990) Mechanism of myocardial “stunning.” *Circulation* 82: 723–738.
24. Bolli, R. (1992) Myocardial “stunning” in man. *Circulation* 86: 1671–1691.
25. Bolli R, Marban E. (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 79:609-34.
26. Bolli R. (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87:972–83.
27. Braunwald E, Kloner RA. (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 66:1146-9.
28. Brierley GP, Jurkowitz M, Chavez E, Jung DW. (1977) Energy-dependent contraction of swollen heart mitochondria. *J Biol Chem.* 252: 7932–7939.
29. Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, Jovanovic A. (2004) Hypoxiainduced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels. *FASEB J* 18:1046–8.

30. Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP. (2008) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ.Res.* 102(9):1082-90.
31. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, Shapiro JL. (1999) Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail* 21:135–45.
32. Cohen MV, Baines CP, Downey JM. (2000) Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of KATP channel. *Annu Rev Physiol.* 62:79 –109.
33. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. (2001) Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res*; 89:273–8.
34. Cole WC, McPherson CD, Sontag D. (1991) ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*; 69:571–81.
35. Contessi S, Metelli G, Mavelli I, Lippe G. (2004) Diazoxide affects the IF1 inhibitor protein binding to F1 sector of beef heart F0F1ATP synthase. *Biochem Pharmacol* 67:1843–51.
36. Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD. (2008) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res.* 77:344-52.
37. Costa AD, Garlid KD. (2008). Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295:H874–H882.
38. Corretti MC, Koretsune Y, Kusuoka H, Chacko VP, Zweier JL, Marban E. (1991) Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences exogenously generated free radicals in rabbit hearts. *J Clin Invest.* 88(3):1014-25
39. Cuong DV, Kim N, Joo H, Youm JB, Chung JY, Lee Y, Park WS, Kim E, Park YS, Han J. (2005) Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts. *Mitochondrion.* 5:121-33.
40. D'Hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M. (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12162–7.
41. Diaz-Velez, C.R., Garcia-Castineiras, S., Mendoza-Ramos, E., Hernandez-Lopez, E. (1996) Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am.Heart J.* 131, 146-152.
42. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Tendera M, Auricchio A, Bax J, Böhm M, Corrà U, della Bella P, Elliott PM, Follath F, Gheorghiade M, Hasin Y, HERNBORG A, Jaarsma T, Komajda M, Kornowski R, Piepoli M, Prendergast B, Tavazzi L, Vachiery JL, Verheugt FW, Zamorano JL, Zannad F. (2008) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart

failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J.* 29:2388-442

43. Du Q, Jovanovic S, Clelland A, Sukhodub A, Budas G, Phelan K, Murray-Tait V, Malone L, Jovanovic A. (2006) Overexpression of SUR2A generates a cardiac phenotype resistant to ischemia. *Faseb J.* 20:1131-41.
44. Eckenhoff RG, Johansson JS. (1997) Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacol Rev* 49:343–367.
45. Flagg TP, Nichols CG. (2005) Sarcolemmal K(ATP) channels: what do we really know? *J Mol Cell Cardiol.* 39:61-70.
46. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG. (2008) Differential Structure of Atrial and Ventricular KATP Atrial KATP Channels Require SUR1. *Circ Res.* 103:1458-65.
47. Flesch M, Maack C, Cremers B, Bäumer AT, Südkamp M, Böhm M. (1999) Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation.* 100:346-53.
48. Foster DB, Rucker JJ, Marban E. (2008) Is Kir6.1 a subunit of mitoK(ATP)? *Biochem Biophys Res Commun.* 366:649-56.
49. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. (2000) Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H305–H312.
50. Gan XT, Cook MA, Moffat MP, Karmazyn M. (1998) Protective effects against hydrogen peroxide-induced toxicity by activators of the ATP-sensitive potassium channel in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 30:33-41.
51. Gao WD, Liu Y, Marban E. (1996) Selective Effects of Oxygen Free Radicals on Excitation-Contraction Coupling in Ventricular Muscle. *Circulation* 94(10)2597-604
52. Garcia-Perez C, Hajnoczky G, Csordas G. (2008) Physical Coupling Supports the Local Ca²⁺ Transfer between Sarcoplasmic Reticulum Subdomains and the Mitochondria in Heart Muscle. *J Biol Chem.* 283:32771-80
53. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 270:13399-405.
54. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271:8796–9.
55. Garlid KD. (1996) Cation transport in mitochondria: the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1275:123–126.
56. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81:1072–82.

57. Garlid KD. (2000) Opening mitochondrial K(ATP) in the heart—what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 95:275–9.
58. Garlid KD, Paucek P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606:23–41.
59. Garratt KN, Brady PA, Hassinger NL, Grill DE, Terzic A, Holmes DR Jr. (1999). Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 33:119 –124.
60. Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. (1995) Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 77:611–21.
61. Gross GJ, Auchampach JA. (1992) Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70:223–33.
62. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. (1995) Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol* 26:145–52.
63. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Darbenzio RB. (1996) Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K_v blocker dofetilide. *Am J Physiol.* 271:H1207–H1214.
64. Grover GJ, Garlid KD. (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32: 677–95.
65. Halestrap A. (2005) Biochemistry: a pore way to die. *Nature.* 434:578-9.
66. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. (2007) The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1767:1007–1031.
67. Hambrook A, Loffler-Walz C, Kurachi Y, Quast U. (1998) Mg²⁺ and ATP dependence of K(ATP) channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* 125:577–83.
68. Hambrook A, Loffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y, Quast U. (1999) ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulphonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* 55:832–40.
69. Hanley PJ, Mickel M, Loffler M, Brandt U, Daut JK. (2002) ATP channel independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol* 542:735–41.
70. Hanley PJ, Daut J. (2005). K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 39:17–50.
71. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkentin JD. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103:670–677.
72. Haruna T, Horie M, Kouchi I, Nawada R, Tsuchiya K, Akao M, Otani H, Murakami T, Sasayama S. (1998) Coordinate interaction between ATP-sensitive K⁺ channel and Na⁺, K⁺-ATPase modulates ischemic preconditioning. *Circulation* 98:2905–10.

73. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 60:617–25.
74. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109:1714–7
75. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2006) Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 70:240-53.
76. Heusch G, Boengler K, Schulz R. (2008) Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 118(19):1915-9.
77. Hill, M.F., Singal, P.K. (1996) Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am.J.Pathol.* 148, 291-300.
78. Hodgson DM, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Bienengraeber M, Ozcan C, Gumina RJ, Pucar D, O'Coilain F, Mann DL, Alekseev AE, Terzic A. (2003) Cellular remodeling in heart failure disrupts K(ATP) channel-dependent stress tolerance. *Embo J.* 22:1732-42.
79. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. (1999) ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* 519 Pt 2:347-60.
80. Holmuhamedov EL, Ozcan C, Jahagir A, Terzic A. (2001) Restoration of Ca²⁺-inhibited oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria by mitochondrial Ca²⁺ unloading. *Mol Cell Biochem.* 220:135-40
81. Holmuhamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Colombini M, Terzic A. (2004) Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett* 568:167–70.
82. Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Krömer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. (2001) Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Hrsg. vom Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung. Bearbeitet im Auftrag der Kommission für Klinische Kardiologie in Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft. *Z. Kardiol* 2001; 90: 218-237.
83. Hoskins DE, Ignasiak DP, Saganek LJ, Gallagher KP, Peterson JT. (1996) Myocardial infarct size is smaller in dogs with pacing-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 32:238-47.
84. Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S. (1995) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* 270:5691–4.
85. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.* 85:357–363.

86. Inagaki N, Gonoi T, Clement JPt, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166–70.
87. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16: 1011–7.
88. Inagaki K, Hahn HS, Dorn GW, Mochly-Rosen D. (2003) Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with δ - Protein kinase C inhibitor and ϵ -protein kinase C activator. *Circulation* 108:869-75
89. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244–7.
90. Jaburek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD. (1998) State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem* 273:13578–82.
91. Jaeschke H. (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia–reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G15–G26.
92. Jiang MT, Ljubkovic M, Nakae Y, Shi Y, Kwok WM, Stowe DF, Bosnjak ZJ. (2006) Characterization of human cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel and its regulation by phorbol ester in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290:H1770-6.
93. Jilkina O, Kuzio B, Grover GJ, Kupriyanov VV. (2002) Effects of K(ATP) channel openers, P-1075, pinacidil, and diazoxide, on energetics and contractile function in isolated rat hearts. *JMol Cell Cardiol* 34: 427–40.
94. Jilkina O, Kuzio B, Grover GJ, Kupriyanov VV. (2003) Cardiosensitive sulfonylthiourea HMR 1098 blocks mitochondrial uncoupling induced by a KATP channel opener, P-1075, in beating rat hearts. *Biochim Biophys Acta* 1638:121–8.
95. Jovanovic A, Jovanovic S, Carrasco AJ, Terzic A. (1998) Acquired resistance of a mammalian cell line to hypoxia-reoxygenation through cotransfection of Kir6.2 and SUR1 clones. *Lab Invest* 78:1101–7.
96. Jung O, Englert HC, Jung W, Gogelein H, Scholkens BA, Busch AE, Linz W. (2000) The KATP channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 361: 445–451.
97. Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, Terzic A. (2005) Cardiac KATP channels in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 38:937-43.
98. Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D. (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res*. 82:519-22.
99. Kevin LG, Novalija E, Riess ML, Camara AK, Rhodes SS, Stowe DF. (2003) Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg* 96:949–955.

100. Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, Colantonio DA, Van Eyk JE, Vatner DE, Rasmussen RL, Vatner SF. (2001) A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca²⁺ handling. *Circ Res.* 89:831-7.
101. Kissin I, Aultman DF, Smith LR. (1983) Effects of volatile anesthetics on myocardial oxidation-reduction status assessed by NADH fluorometry. *Anesthesiology* 59: 447–452
102. Kloner RA, Jennings RB. (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part I. *Circulation.* 104:2981–2989.
103. Kloner RA, Jennings RB. (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part II. *Circulation.* 104:3158–3167.
104. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Böhm M, O'Rourke B, Maack C. (2010) Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation.* 121:1606-13
105. Korge P, Honda HM, Weiss JN. (2002) Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(5):3312-7
106. Koumi SI, Martin RL, Sato R. (1997) Alterations in ATP-sensitive potassium channel sensitivity to ATP in failing human hearts. *Am J Physiol.* 272:H1656-65.
107. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H649–H657.
108. Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, Cohen MV, Garlid KD, Critz SD, Downey JM, Benoit JN. (2002) Opening of ATP-sensitive potassium channels causes Generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basis Res ,Cardiol* 97:365-73.
109. Lacy, F., O'Connor, D.T., Schmid-Schonbein, G.W. (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J.Hypertens.* 16, 291-303.
110. Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabo C, Grover G, Busija DW. (2003) Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol.* 35:1339-47.
111. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11(4):376-381.
112. Light PE, Kanji HD, Fox JE, French RJ. (2001) Distinct myoprotective roles of cardiac sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels during metabolic inhibition and recovery. *FASEB J* 15:2586–94.
113. Lim KH, Javadov SA, Das M, Clarke SJ, Suleiman MS, Halestrap AP. (2002) The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J Physiol* 545:961–74
114. Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG. (2000) ABC of heart failure: aetiology. *BMJ* 320(7227):104-7.

115. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. (1991) Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84:350–6.
116. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. (1994) Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26:661–8.
117. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97:2463–9.
118. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. (2001) Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol*. 59:225-30.
119. Lochner A, Genade S, Tromp E, Podzuweit T, Moolman JA. (1999) Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation* 100:958–66.
120. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U. (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*. 108:1567-74.
121. Maack C, Dabew ER, Hohl M, Schäfers HJ, Böhm M. (2009) Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning. *Circ Res*. 105(8):811-7.
122. Maack C, Böhm M. (2011) Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. *J Am Coll Cardiol*. 58(1):83-6.
123. Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kurachi Y. (2000) C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K(+) channels. *Circ Res*. 87:873-80.
124. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Lung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012 (Elektronische Publikation vor Druck – 19. Mai).
125. Miki T, Cohen MV, Downey JM. (1998) Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 186:3–12.

126. 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. *Nat Med* 8:466–72.
127. Mironova GD, Negoda AE, Marinov BS, Paucek P, Costa AD, Grigoriev SM, Skarga YY, Garlid KD. (2004) Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). *J Biol Chem*. 279:32562-8.
128. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. (1995) Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 76:73–81.
129. Miura T, Liu Y, Goto M, Tsuchida A, Miki T, Nakano A, Nishino Y, Ohnuma Y, Shimamoto K. (2001) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels play a role in cardioprotection by Na⁺-H⁺ exchange inhibition against ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 37:957–63.
130. Mocanu MM, Maddock HL, Baxter GF, Lawrence CL, Standen NB, Yellon DM (2001). Glimepiride, a novel sulfonylurea, does not abolish myocardial protection afforded by either ischemic preconditioning or diazoxide. *Circulation*. 103:3111–3116.
131. Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W. (2002) Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* 96:934–40.
132. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74:1124 –1136.
133. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 335:1182-9.
134. Nationale Versorgungsleitlinie in Trägerschaft der Bundesärztekammer, der Kassenärztlichen Bundesvereinigung und der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2009) Chronische Herzinsuffizienz Version 1.0. abrufbar unter <http://www.versorgungsleitlinien.de>
135. Ng B, Kang Y, Xie H, Sun H, Gaisano HY. (2008) Syntaxin-1A inhibition of P-1075, cromakalim, and diazoxide actions on mouse cardiac ATP-sensitive potassium channel. *Cardiovasc Res*. 80(3):365-74
136. Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ. (1991) ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res*. 68:280–287.
137. Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JPT, Gonzalez G, Aguilar-Bryan, L, Permutt, MA, Bryan, J. (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272:1785–7.
138. Noma A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 305:147–148.

139. Notsu T, Tanaka I, Mizota M, Yanagibashi K, Fukutake K. (1992) A cAMP dependent protein kinase inhibitor modulates the blocking action of ATP and 5-hydroxydecanoate on the ATP-sensitive K_v channel. *Life Sci.* 51:1851–1856.
140. O'Rourke B, Ramza BM, Marbán E. (1994) Oscillations of membrane current and excitability driven by metabolic oscillations in heart cells. *Science.* 265:962–966.
141. O'Rourke B. (2000) Myocardial K(ATP) Channels in Preconditioning. *Circ Res* 87:845–55.
142. O'Rourke B. (2004) Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94:420–32.
143. Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K, Kukreja RC. (1999) Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 277: H2425–H2434.
144. Ockaili RA, Bhargava P, Kukreja RC. (2001) Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in hearts: role of mitochondrial K(ATP) channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2406–H2411.
145. Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, Garlid KD, Cohen MV, Grover GJ, Downey JM. (2003) P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 35:1035–42.
146. Ovide-Bordeaux S, Ventura-Clapier R, Veksler V. (2000) Do modulators of the mitochondrial K(ATP) channel change the function of mitochondria in situ? *J Biol Chem* 275:37291–5.
147. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. (2000) Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 87:460–6.
148. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. (1995) Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 29:782–8.
149. Pang CY, Neligan P, Xu H, He W, Zhong A, Hopper R, Forrest CR. (1997) Role of ATP-sensitive K⁺ channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol* 273:H44–H51.
150. Patel HH, Ludwig LM, Fryer RM, Hsu AK, Warltier DC, Gross GJ. (2002) Delta opioid agonists and volatile anesthetics facilitate cardioprotection via potentiation of K(ATP) channel opening. *FASEB J* 16: 1468–70.
151. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267:26062–9.
152. Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Garlid KD. (1996) Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem* 271:32084–8.
153. Picard S, Criniti A, Iwashiro K, Rouet R, Monti F, Tonelli E, Ruvolo G, Ducouret P, del Monte F, Papalia U, Puddu PE. (1999) Protection of human myocardium in vitro

- by K(ATP) activation with low concentrations of bimakalim. *J Cardiovasc Pharmacol.* 34:162-72.
154. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. (1997) Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 81:404–14.
155. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, Argaud L, Muntean D, Salles D, Loufouat J, Gueugniaud PY, Lehot JJ, Ovize M. (2004) Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 100:581–8.
156. Pomerantz BJ, Robinson TN, Heimbach JK, Calkins CM, Miller SA, Banerjee A, Harken AH. (2000) Selective mitochondrial KATP channel opening controls human myocardial preconditioning: too much of a good thing? *Surgery.* 128:368-73
157. Przyklenk K. (2001) Pharmacologic treatment of the stunned myocardium: the concepts and the challenges. *Coron Artery Dis.* 12:363–369.
158. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* 77:1165–1232.
159. Riess ML, Novalija E, Camara AK, Eells JT, Chen Q, Stowe DF. (2003) Preconditioning with sevoflurane reduces changes in nicotinamide adenine dinucleotide during ischemia-reperfusion in isolated hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesthesiology* 98:387–395.
160. Riess ML, Stowe DF, Warltier DC. (2004) Cardiac pharmacological preconditioning with volatile anesthetics: from bench to bedside? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1603–H1607.
161. Saavedra WF, Paolucci N, Kass DA. (2002) Effects of cardioselective KATP channel antagonism on basal, stimulated, and ischaemic myocardial function in in vivo failing canine heart. *Br J Pharmacol.* 135:657-62.
162. Sakamoto J, Miura T, Goto M, Imura O. (1995) Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by protein kinase C inhibitors in the rabbit. *Cardiovasc Res* 29:682–8.
163. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaee A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB. (2005) Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail.* 11:473-80.
164. Sanada S, Asanuma H, Tsukamoto O, Minamino T, Node K, Takashima S, Fukushima T, Ogai A, Shinozaki Y, Fujita M, Hirata A, Okuda H, Shimokawa H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. (2004) Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation* 110:51–7.
165. Sato T, O'Rourke B, Marban E. (1998) Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res* 83:110
166. Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marban E. (2000) Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation* 101: 2418–23.

167. Saurin AT, Pennington DJ, Raat NJH, Latchman DS, Owen MJ, Marber MS. (2002) Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene Abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovasc Res* 55:672-80
168. Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D, Holtz J. (2002) Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol.* 39(3):481-488
169. Schmidt RF, Lang F, Thews G. (2007) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg.
170. Schulz R, Rose J, Heusch G. (1994) Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol* 267:H1341–H1352.
171. Scognamiglio R, Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S, Negut C, Palisi, M, Bagolin E, Tiengo A. (2002). Effects of treatment with sulfonylurea drugs or insulin on ischemia-induced myocardial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 51:808–812.
172. Seharaseyon J, Sasaki N, Ohler A, Sato T, Fraser H, Johns DC, O'Rourke B, Marbán E. (2000) Evidence against functional heteromultimerization of the KATP channel subunits Kir6.1 and Kir6.2. *J Biol Chem* 275:17561–5.
173. Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG. (1997) Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol* 110: 643–54.
174. Shyng S, Nichols C. (1997) Octameric stoichiometry of the KATP channel Complex. *J Gen Physiol.* 110:655-664
175. Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F. (1999) Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 257:549–54.
176. Simkhovich BZ, Przyklenk K, Kloner RA. (1998) Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc Res* 40:9–22.
177. Simonis G, Briem SK, Schoen SP, Bock M, Marquetant R, Strasser RH. (2007) Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 305:103–111.
178. Singh H, Hudman D, Lawrence CL, Rainbow RD, Lodwick D, Norman RI. (2003) Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35:445–59.
179. Sommerschild HT, Kirkeboen KA. (2000) Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 44:1038–55.
180. Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. (1995) Does ischemic preconditioning in the human involve Protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ. Res.* 77(5):1030-5.

181. Statistisches Bundesamt (2007) Pressemitteilung Nr.385
182. Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K. (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241:693–7.
183. Suzuki M, Li RA, 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: 570–7.
184. 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* 109:509–16.
185. Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, Nakaya H. (2003) Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation* 107:682–5.
186. Szewczyk A, Mikolajek B, Pikula S, Nalecz MJ. (1993) Potassium channel openers induce mitochondrial matrix volume changes via activation of ATP-sensitive K_v channel. *Pol J Pharmacol.* 45:437–443.
187. Tan HL, Mazon P, Verberne H, Sleeswijk M, Coronel A, Opthof T, Janse M. (1993) Ischaemic preconditioning delays ischaemia-induced cellular Electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res.* 27:644-651
188. Thornton JD, Thornton CS, Downey JM. (1993) Effect of adenosine receptor blockade: preventing protective preconditioning depends on time of initiation. *Am J Physiol* 265:H504–H508.
189. Tokube K, Kiyosue T, Arita M. (1998) Effects of hydroxyl radicals on KATP channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 437:155-7.
190. Toyoda Y, Friehs I, Parker RA, Levitsky S, McCully JD. (2000) Differential role of sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2694–H2703.
191. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-del Valle N, Huang P. (2008) Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal.* Aug;10(8):1343-74.
192. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. (1997) Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 80:743–8.
193. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Utsumi H, Nakamura R, Egashira K, Takeshita A. (2001) Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. *Cardiovasc Res.* 49:103-9.
194. Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Antelli A, Canistro D, Francolini G, Macri G, Mastroianni F, Paolini M, Ferrari R. (2004) Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor- α , and progression to heart failure after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 43:2000-8.

195. Van Der Linden PJ, Daper A, Trenchant A, De Hert SG. (2003) Cardioprotective effects of volatile anesthetics in cardiac surgery. *Anesthesiology* 99:516–517.
196. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273: 18092–8.
197. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. (2002) Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 105:2332-6.
198. Wagner S, Seidler T, Picht E, Maier LS, Kazanski V, Teucher N, Schillinger W, Pieske B, Isenberg G, Hasenfuss G, Kogler H. (2003) Na(+)-Ca(2+) exchanger overexpression predisposes to reactive oxygen species-induced injury. *Cardiovasc Res.* 60:404-12.
199. Weiss JN, Venkatesh N. (1993) Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc Drugs Ther* 7(Suppl 3):499–505.
200. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. (2003) A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* 111:1497-504.
201. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ. Res.* 80(1):76-81.
202. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B. (2002) Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298:1029–33.
203. Yao Z, Gross G. (1994) Activation of ATP-sensitive potassium channels lowers the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol.* 267:H1888-H1894
204. Yao Z, Gross GJ. (1994) Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 89:1769–75.
205. Yellon DM, Downey JM. (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83:1113– 51.
206. Yoshida K, Hirata T, Akita Y, Mizukami Y, Yamaguchi K, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashima S. (1996) Translocation of protein kinase C- α , δ and ϵ isoforms in ischemic rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1317:36– 44.
207. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. (1994) Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 266: H1145–H1152.
208. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. (2002) Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial KATP channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 97:4–14.
209. Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kogler H, Moller K, Hasenfuss G, Janssen PM. (2002) Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circ Res.* 90:988-95.

210. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 89:1177–83.
211. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem.* 265:16330-6.
212. Zingman LV, Hodgson DM, Bienengraeber M, Karger AB, Kathmann EC, Alekseev AE, Terzic A. (2002) Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonyleurea receptor in gating ATP-sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* 277:14206–10.
213. Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, Rayburn BK, Smith D, Weisfeldt ML, Flaherty JT. (1989) Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem.* 264(32):18890-5
214. Zweier JL, Talukder MA. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury . *Cardiovasc Res.* 70:181-90.

8 Publikationen / Dank

8.1 Originalarbeiten

- 2001 C. Maack, S. Tyroller, P. Schnabel, E. Dabew, M.Südkamp & M.Böhm: *Characterization of β_1 -selectivity, adrenoceptor-Gs-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium*: Br J Pharmacol (England), Apr 2001, 132(8) p1817-26
- 2003 C. Maack, M. Böhm, L. Vlaskin, E. Dabew, K. Lorenz, HJ Schäfers, MJ Lohse, S. Engelhardt. *Partial agonist activity of bucindolol is dependent on the activation state of the human beta1-adrenergic receptor*. Circulation 2003 Jul 22;108(3):348-53
- 2006 B.J. Stuck, R.E. Dabew, H.J. Schaefers, M. Boehm. *Chest pain due to sternotomy wire suture in a patient with revascularized coronary heart disease*. Clin Res Cardiol. 2006 (10):565-7.
- 2009 C. Maack, E.R. Dabew, M. Hohl, HJ Schäfers, M. Böhm. *Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning*. Circ. Res. 2009 105(8):811-7.
- 2011 S. Walter, P. Kostopoulos, A. Haass, I. Keller, M. Lesmeister, T. Schlechtriemen, C. Roth, P. Papanagiotou, I. Grunwald, H. Schumacher, S-Helwig, J. Viera, H. Körner, M. Alexandrou, U. Yilmaz, K. Ziegler, K. Schmidt, R. Dabew, D. Kubulus, Y. Liu, T. Volk, K.Kronfeld, C. Ruckes, T. Bertsch, W. Reith, K. Fassbender. *Diagnosis and treatment of patients with stroke in a mobile stroke unit versus in hospital: a randomised controlled trial*. Lancet Neurol. 2012 May;11(5):397-404.

8.2 Poster und Vorträge

- 2004 C. Maack, E.R. Dabew, B. Cremers, H-J. Schäfers, M. Böhm:
Aktivierung von mitochondrialen, aber nicht sarkolemmalen Adenosin Triphosphat-sensitiven Kalium-Kanälen (K_{ATP} -Kanälen) gewährt funktionelle Protektion bei Hypoxie/ Reoxygenierung in menschlichem Myokard.
Freier Vortrag; Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 04/04
- 2004 C. Maack, E.R. Dabew, B. Cremers, M. Flesch, H-J. Schäfers, M. Böhm:
Aktivierung von mitochondrialen und sarkolemmalen Adenosin Triphosphat-sensitiven Kalium-Kanälen (K_{ATP} -Kanäle) gewährt Protektion gegen Hydroxylradikal-induzierte kontraktile Dysfunktion in menschlichem Myokard.
Postervortrag; Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 04/04
- 2008 E.R. Dabew, P Fries, HJ. Schäfers, I. Kindermann, A. Bücken, G. Schneider:
MRT kardialer und parakardialer Raumforderungen
Fortbildungsposter 89. Deutscher Röntgenkongress in Berlin 05/08
(Posterpreis Magna cum laude)
- 2009 E.R. Dabew, A. Massmann, P. Fries, M. Katoh, A. Bücken, G. Schneider:
Diagnostik reperfundierter embolisierter pulmonaler arteriovenöser Malformationen (PAVM) bei Patienten mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie (HHT) mittels kontrastverstärkter MRA.
Freier Vortrag 90. Deutscher Röntgenkongress in Berlin 05/09
- 2009 E.R. Dabew, P. Fries, M. Katoh, F. Becker, A. Bücken, G. Schneider:
Imaging of different subtypes of solid renal tumors.
Wissenschaftsposter ISMRM in Honolulu, Hawaii 04/09
- 2009 R. Seidel, E.R. Dabew, C. Zwick, M. Wirth, A. Bücken:
Evaluierung der HRCT bei immunsuppremierten Patienten mit Verdacht auf pulmonale Pilzinfektion.
Freier Vortrag 90. Deutscher Röntgenkongress in Berlin 05/09

- 2009 R. Seidel, M. Wirth, E.R. Dabew, A. Opitz, A. Bucker:
*CT Angiographie zur Detektion akuter pulmonaler Embolien im Kontext
typischer und atypischer klinischer Präsentation.*
Wissenschaftsposter 90. Deutscher Röntgenkongress in Berlin 05/09
- 2009 C. Maack, E.R. Dabew, M. Hohl, A. A. Cura, T. Zeller, HJ Schäfers, M. Böhm:
*Endogenous Activation of Mitochondrial K_{ATP} Channels Protects Human
Failing Myocardium From Hydroxyl Radical-induced Stunning.*
Postervortrag; Kongress der American Heart Association in Orlando, Florida
11/09

8.3 Dank

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit herzlich bedanken, die vorgelegten Experimente in den kardiologischen Forschungslaboratorien der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikum des Saarlandes durchführen zu können.

Des Weiteren gebührt Herrn Dr. med. C. Maack für die freundschaftliche Betreuung, die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden sowie die Unterstützung und Beratung beim Erstellen dieser Disseration meine große Dankbarkeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers sowie den Kollegen und Kolleginnen der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes für die freundliche Hilfe bei der Gewinnung der Herzmuskelgewebe, die zentraler Bestandteil der Experimente gewesen sind.

Frau J. Michaely danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung beim Durchführen der Western Blot Experimente.

Zuletzt möchte ich Frau Dr. med. K. I. Schmidt für die gute Zusammenarbeit im Forschungslabor danken.

9 Lebenslauf

Persönliche Information

- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtstag: 15. März 1978
- Geburtsort: Mönchengladbach
- Eltern: Dr. Daby Dabew, Laborarzt i.R.
Sigrun Lieselotte Dabew, geb. Stötzel, verstorben 1998

Beruflicher Werdegang

seit 01.10.2011	Facharzt Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätskliniken des Saarlandes
27.09.2011	Facharztprüfung für Allgemeine Radiologie
01.06.2010 – 30.09.2011	Assistenzarzt Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie der Universitätskliniken des Saarlandes
01.01.2007 – 31.05.2010	Assistenzarzt Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätskliniken des Saarlandes
01.06.2005 – 31.12.2006	Assistenzarzt Innere Medizin III Universitätskliniken des Saarlandes

Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

03.05.2005	Drittes Staatsexamen
06.12.2004 – 25.03.2005	3. PJ Tertial: Chirurgie an der Universität des Saarlandes
16.08.2004 – 05.12.2004	2. PJ Tertial: Urologie an der Universität in Zürich (Universitätsspital Zürich)
26.04.2004 – 15.08.2004	1. PJ Tertial: Kardiologie an der Universität in Bern (Inselspital)
31.03.2004	Zweites Staatsexamen
24.02.2003 – 04.04.2003	Famulatur, Innere Medizin (Kardiologie), Universitätsklinik in Homburg (Saar)
09.09.2002 – 11.10.2002	Famulatur, Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Praxis Dr. Lipman in Mönchengladbach
21.03.2002	Erstes Staatsexamen

09.07.2001 – 28.09.2001	Famulatur, Innere Medizin (Kardiologie), Universitätsklinik in Homburg (Saar)
12.09.2000	Ärztliche Vorprüfung

Wehrdienst / Wehersatzdienst, Schulausbildung

1997 – 1998	Zivildienst im Krankenhaus Franziskushaus, Mönchengladbach
1988 – 1997	Bischöfliche Marienschule Mönchengladbach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife am 9.Juni 1997
1986 – 1988	Gemeinschaftsgrundschule Regentenstraße, Mönchengladbach
1984 – 1986	Gemeinschaftsgrundschule Wickrath