

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Einfluss des mitochondrialen calciumsensitiven Kaliumkanals
(mBK_{Ca}) bei der kardialen Präkonditionierung durch Sildenafil:
Eine Studie am isoliert perfundierten Rattenherz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
David Mally
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Amin Polzin

Meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützten
und ohne die ich niemals dort wäre, wo ich jetzt bin.

Meiner Schwester, zu der ich jederzeit aufblicken konnte
und die mir zeigte, dass man ein Ziel erreicht, indem man unbeirrt seinen Weg
geht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Behmenburg, F., Dorsch, M., Huhn, R., Mally, D., Heinen, A., Hollmann, MW., Berger, MM., (2015), Impact of Mitochondrial Ca^{2+} -Sensitive Potassium (mBK_{Ca}) Channels in Sildenafil-induced Cardioprotection in Rats., *PLoS One*, 10(12), e0144737

Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist eine führende Todesursache in Deutschland. Eine Möglichkeit, den hierdurch erlittenen Schaden zu reduzieren, ist die Präkonditionierung des Myokards. Innerhalb der Signalkaskade der Präkonditionierung spielen mitochondriale Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle (mBK_{Ca}) eine Rolle. Das in der Klinik bereits eingesetzte Sildenafil ist in der Lage, Präkonditionierung hervorzurufen. Die Rolle der mBK_{Ca} -Kanäle bei der Sildenafil-induzierten Kardioprotektion ist dabei allerdings unbekannt.

In dieser Arbeit untersuchten wir an isolierten Rattenherzen, ob die Sildenafil-induzierte frühe Präkonditionierung über die Aktivierung der Proteinkinase G und Öffnung von mBK_{Ca} -Kanälen vermittelt wird.

Herzen männlicher Wistar-Ratten wurden an eine Langendorff-Anlage angeschlossen und retrograd über die Aorta bei einem Druck von 80 mmHg mittels Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Alle Herzen unterlagen einer 30-minütigen Ischämie, gefolgt von einer 60-minütigen Reperusionsphase. Am Ende des Experimentes wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ermittelt.

Für die Versuche der ersten Serie wurden männliche Wistar-Ratten randomisiert in vier Gruppen aufgeteilt (jede Gruppe $n = 8$). Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung. Die Präkonditionierung wurde durch Sildenafilapplikation ($3 \mu\text{M}$) über 10 Minuten vor Beginn der Ischämie erreicht. Der mBK_{Ca} -Kanalinhibitor Paxillin ($1 \mu\text{M}$) wurde mit und ohne Sildenafil ($3 \mu\text{M}$) für 15 Minuten vor Beginn der Ischämie appliziert. In einer zweiten Serie wurde der zu Grunde liegende Signalweg mit dem PKG-Blocker KT5823 analysiert. Hierzu wurden der Versuchsaufbau und das Protokoll der ersten Serie genutzt. Es wurden ebenfalls männliche Wistar-Ratten randomisiert in 4 Gruppen (jede Gruppe $n = 8$) aufgeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung. Mittels Sildenafil ($3 \mu\text{M}$) über 10 Minuten vor Beginn der Ischämie wurde das Herz präkonditioniert. Zur Blockierung der PKG wurde KT5823 ($1 \mu\text{M}$) mit und ohne Sildenafil ($3 \mu\text{M}$) für 15 Minuten vor der Ischämie appliziert. Die myokardiale cGMP-Konzentration von je 6 Herzen, die entweder keine Behandlung oder Sildenafil ($3 \mu\text{M}$) erhielten, wurde mittels ELISA bestimmt.

Die Daten (angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden mittels ein- und zweifaktorieller Varianzanalyse sowie Student Newman-Keuls und Tukey's post hoc Test analysiert; das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$ [1].

In der Kontrollgruppe betrug die Infarktgröße $52 \pm 8 \%$. Sildenafil verringerte die Infarktgröße auf $35 \pm 6 \%$ ($p < 0,05$ vs. Kontrolle) und steigerte die cGMP-Konzentration. Paxillin und KT5823 blockierten die durch Sildenafil erreichte Kardioprotektion (Paxillin+Sildenafil: $50 \pm 8 \%$, KT5823+Sildenafil: $45 \pm 8 \%$, beide $p < 0,05$ vs. Sildenafil). Paxillin alleine hatte keine Auswirkung auf die Infarktgröße ($50 \pm 7 \%$, $p > 0,05$ vs Kontrolle) [1].

Diese Arbeit zeigt, dass die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion bei männlichen Wistar Ratten PKG-abhängig über die Öffnung von mK_{Ca} -Kanälen vermittelt wird [1].

Abstract

Coronary heart disease is one of leading causes of death in Germany. One option to minimize the caused damage is to precondition the myocard. Mitochondrial large-conductance Ca^{2+} -sensitive potassium channels (mBK_{Ca}) are involved in the pathway of preconditioning. In the clinic widely used sildenafil is able to induce preconditioning. The role of mBK_{Ca}-channels in acute sildenafil-induced cardioprotection is unknown.

In this study, we investigated, if the acute sildenafil-induced cardioprotection is mediated via protein kinase G and mBK_{Ca}.

Hearts of male Wistar rats were isolated, mounted on a Langendorff system and perfused with Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. Hearts underwent 30 minutes of global ischemia followed by 60 minutes of reperfusion. At the end of the experiment infarct size was determined by TTC staining.

We performed two series of experimental controls. In the first series, we evaluated the impact of sildenafil. Male Wistar rats were randomized into 4 groups (each group n = 8). In the control group hearts were not further treated. Sildenafil (3 μM) was administered over 10 min before the beginning of ischemia in the second group. The mBK_{Ca} channel inhibitor paxilline (1 μM) was administered with and without sildenafil before the onset of ischemia in group 3 and 4. In the second series, the pathway underlying sildenafil-induced cardioprotection was further investigated with the protein kinase G blocker KT5823. For this series, we used the same protocol as in the first series. Again, male Wistar rats were randomized into 4 groups (each group n = 8). In the control group hearts were not further treated. Preconditioning was mediated via application of sildenafil (3 μM) 10 minutes prior to the onset of ischemia. The PKG inhibitor KT5823 (1 μM) was administered with and without sildenafil for 15 minutes before the onset of ischemia. Myocardial cGMP concentration of 6 hearts each, untreated or treated with sildenafil (3 μM) respectively, was measured by ELISA.

Data (mean \pm SD) were analysed with a one and two-way analysis of variance followed by student newman-keuls and tukey's post hoc test. The level of significance was given with $p < 0.05$ [1].

In control animals infarct size was $52 \pm 8 \%$. Sildenafil increased cGMP concentration and reduced infarct size to $35 \pm 6 \%$ ($p < 0.05$ vs. control). Paxilline and KT5823 completely blocked sildenafil-induced cardioprotection (paxilline+sildenafil: $50 \pm 8 \%$, KT5823+sildenafil: $45 \pm 8 \%$, both $p < 0.05$ vs. sildenafil) (taken from [1]).

This study shows that in male rats protein kinase G-dependent opening of mBK_{Ca} channels plays a pivotal role in sildenafil-induced cardioprotection (taken from [1]).

Abkürzungsverzeichnis

5-HD	5-Hydroxydecanoat	LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
AAR	<i>area at risk</i>	LVP	Linksventrikulärer Druck
AK1	Antikörper 1	LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
AK2	Antikörper 2	mBK_{Ca}	mitochondrialer kalziumsensitiver Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
AMI	akuter Myokardinfarkt	mGC	membranständige Guanylatcyklase
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>	mK_{ATP}	der ATP-abhängige Kaliumkanal
AOP	Aortaler Druck	mK-Kanäle	mitochondriale Kaliumkanäle
ATP	Adenosintriphosphat	MPG	N-(2-Mercaptopropionyl)- Glycin
bpm	<i>beats per minute</i>	mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	mtNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxidsynthase
CF	Koronarfluss	MW	Mittelwert
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'- Monophosphat	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphos- phat
ChTx	Charybdotoxin	nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid	NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase	NOS	NO-Synthase
FWOP	<i>first window of preconditioning</i>	PDE₃	Phosphodiesterase 3
GTP	Guanosintriphosphat	PDE₅	Phosphodiesterase 5
HR	Herzfrequenz	PKA	Proteinkinase A
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase		
IR-Schaden	Ischämie- Reperfusionsschaden		
KG	Körpergewicht		
KHK	Koronare Herzkrankheit		
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck		

PKC Proteinkinase C

PKG Proteinkinase G

PTCA perkutane transluminale
coronare Angioplastie

Rep30 Reperfusionphase nach 30
Minuten

ROS Reaktive Sauerstoffspezies

RPP Rate pressure product

SD Standardabweichung

sGC lösliche Guanylatcyklase,
lösliche Guanylatcyklase

siRNA small interfering RNA

SWOP *second window of
preconditioning*

TTC Tetraphenyltetrazoliumchlorid

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE KORONARE HERZKRANKHEIT	1
1.2	ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN UND DESSEN AUSWIRKUNGEN	2
1.3	PRÄKONDITIONIERUNG ALS MÖGLICHKEIT ZUR PROTEKTION VOR DEM ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	5
1.3.1	DIE ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	5
1.3.2	DIE PHARMAKOLOGISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	6
1.3.3	MECHANISMEN DER PRÄKONDITIONIERUNG	7
1.3.4	SILDENAFIL UND SILDENAFIL-INDUZIERTER PRÄKONDITIONIERUNG	12
1.3.5	DER MITOCHONDRIALE KALZIUMSENSITIVE KALIUMKANAL (MBK _{CA}) UND SEINE ROLLE BEI DER PRÄKONDITIONIERUNG	13
1.4	ZIELE DER ARBEIT	15
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	18
2.1	VERSUCHSTIERE	18
2.2	DIE GENUTZTEN SUBSTANZEN	18
2.2.1	SILDENAFIL-CITRATSALZ (PHOSPHODIESTERASE-5-HEMMER)	18
2.2.2	DIMETHYLSULFOXID (DMSO)	19
2.2.3	PAXILLIN	20
2.2.4	KT5823	20
2.3	DER KREBS-HENSELEIT-PUFFER	21
2.4	VERSUCHSAUFBAU	24
2.4.1	PRÄPARATION DER VERSUCHSTIERE	24
2.4.2	DIE LANGENDORFF-ANLAGE	24
2.4.3	APPLIKATION DER TESTSUBSTANZEN	27
2.4.4	INDUKTION DER ISCHÄMIE	27
2.4.5	MESSUNG DER LINKSVENTRIKULÄREN HERZFUNKTION	28
2.4.6	DAS VERSUCHSPROTOKOLL	28
2.4.7	BESTIMMUNG DER INFARKTGRÖÖE DURCH TTC-FÄRBUNG	31

2.5 BESTIMMUNG DER cGMP-KONZENTRATION MITTELS ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	32
2.6 DATENVERARBEITUNG	33
2.7 HÄMODYNAMISCHE AUSWERTUNG	33
2.7.1 LINKSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DRUCK (LVEDP)	34
2.7.2 HERZFREQUENZ (HR)	34
2.7.3 RATE PRESSURE PRODUCT (RPP)	34
2.7.4 KORONARFLUSS (CF)	34
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
<u>3 ERGEBNISSE</u>	<u>36</u>
3.1 ERGEBNISSE DER ERSTEN SERIE: SILDENAFIL UND PAXILLIN	36
3.1.1 INFARKTGRÖßENAUSWERTUNG	36
3.1.2 KARDIALE FUNKTION	37
3.1.3 TIER- UND HERZCHARAKTERISTIKA	42
3.2 ERGEBNISSE DER ZWEITEN SERIE: SILDENAFIL UND KT5823	45
3.2.1 INFARKTGRÖßENAUSWERTUNG	45
3.2.2 KARDIALE FUNKTION	45
3.2.3 TIER- UND HERZCHARAKTERISTIKA	46
3.3 ERGEBNISSE DER cGMP-KONZENTRATIONSMESSUNG	49
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>50</u>
4.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	50
4.1.1 DIE LANGENDORFF-PRÄPARATION	50
4.1.2 DER KREBS-HENSELEIT-PUFFER	52
4.1.3 DIE ELISA-MESSUNG	54
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	55
4.2.1 DIE SILDENAFIL-INDUZIERTER KARDIOPROTEKTION	55
4.2.2 DER MBK _{Ca} -KANAL UND FRÜHE PRÄKONDITIONIERUNG	58
4.2.3 PAXILLIN	60
4.2.4 KT5823	61
4.2.5 ZUSAMMENFASSUNG	62
4.2.6 LIMITATIONEN DER ARBEIT UND AUSBLICK	63
	VI

<u>5</u>	<u>SCHLUSSFOLGERUNG</u>	<u>65</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>66</u>
<u>7</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>75</u>

1 Einleitung

Die myokardiale Ischämie mit nachfolgender Reperfusion und der damit einhergehende Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-Schaden) sind von sehr hoher klinischer Relevanz, da damit tödlich endende Krankheitsverläufe verbunden sein können.

Man unterscheidet dabei Ischämien von kurzer Dauer, die mit einer raschen arteriellen Reperfusion einhergehen, wie zum Beispiel bei dem klinischen Bild der *Angina pectoris* oder der Koronarspasmen, von Ischämien von langer Dauer, die nur durch eine Intervention reperfundiert werden können. Diese Interventionen umfassen zum Beispiel die Ballondilatation (perkutane transluminale coronare Angioplastie, PTCA) bei atherosklerotischen Verkalkungen und Myokardinfarkten oder die Thrombolyse bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI). Als Hauptursache für IR-Schäden gilt dabei die koronare Herzkrankheit.

1.1 Die koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die führende Todesursache in Europa und führt zu jährlichen Kosten von circa 60 Milliarden Euro [2]. Die Lebenszeitprävalenz deutscher Männer beträgt 30 %, die deutscher Frauen 15 %. Die Wahrscheinlichkeit, an einer KHK zu erkranken, steigt mit voranschreitendem Lebensalter [3]. Die KHK gilt als Manifestation der Arteriosklerose der Herzkranzarterien. Als hauptsächlicher Risikofaktor der KHK beziehungsweise der Arteriosklerose, wird dabei der moderne Lebensstil gesehen: Die Nahrung beinhaltet hohe Anteile an gesättigten Fettsäuren, Zuckerzusätzen und Kohlenhydraten mit hohem glykämischen Index [4]. Aus der Kombination von fehlerhafter Ernährung und mangelnder Bewegung, aber auch aufgrund genetischer Disposition ergeben sich die Hauptrisikofaktoren der KHK: erhöhtes LDL-Cholesterin, erniedrigtes HDL-Cholesterin, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und betroffene Familienangehörige ersten Grades [3]. Durch Stenosierung der Herzkranzgefäße kommt es zu einer Koronarinsuffizienz, einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch. Mögliche Formen der Erstmanifestationen stellen die *Angina pectoris* (40 %), das akute Koronarsyndrom (50 %, darunter fallen der

AMI und die instabile *Angina pectoris*) und der plötzliche Herztod (10 %) dar [3]. Im Krankenhaus bei maximaler Versorgung beträgt die Mortalität eines AMI europaweit zwischen 6,3 % und 15,3 % [5]. Grund für die hohe Mortalität ist die schlechte Beherrschbarkeit des Impacts des IR-Schadens. Hierbei spielt nicht nur der Schaden der Ischämie bei akutem Koronararterienverschluss, sondern auch der Schaden bei wiedererlangter Reperfusion eine Rolle.

1.2 Ischämie-Reperfusionsschaden und dessen Auswirkungen

Der Ischämie-Reperfusionsschaden kann in letzter Konsequenz in einer irreversiblen Zellschädigung des Kardiomyozyten resultieren. Der Zellschaden ist dabei abhängig von der Dauer und Ausprägung der fehlenden Blutversorgung und der darauffolgenden Reperfusion [6]. Paradoxe Weise ist dabei die Reperfusion des ischämischen Gewebes die kritische Phase. Zwar ist die Reperfusion für das Überleben des Gewebes essentiell, jedoch birgt sie auch eine große Gefahr, das Gewebe zusätzlich und entscheidend zu schädigen [7-9]:

Bei einer langandauernden Ischämie ist der Organismus aufgrund des fehlenden Sauerstoffs gezwungen, auf einen anaeroben Stoffwechsel umzuschalten. Der in den Mitochondrien lokalisierten Atmungskette, in welcher mittels oxidativer Phosphorylierung sauerstoffabhängig in mehreren Schritten Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird, wird das Substrat entzogen. In der Folge sinkt die ATP-Konzentration und die ATP-abhängigen Transportmechanismen fallen aus. Durch die Akkumulation von Laktat durch den anaeroben Stoffwechsel sinkt der intrazelluläre pH-Wert. Dies führt zu einem intrazellulären und mitochondrialen Anstieg der Kalziumkonzentration, Zellschwellung mit Ruptur der Zelle und konsekutiv zu Zelltod durch Nekrose, Apoptose und Autophagie [6].

Bei der Reperfusion und der damit verbundenen Wiederverfügbarkeit von Sauerstoff spielen viele, untereinander interagierende Mechanismen eine Rolle: Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) werden massiv gebildet, da die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette in den Mitochondrien wieder stattfindet. Additiv kommt die Bildung von ROS (hauptsächlich durch Endothelzellen) durch die Xanthinoxidase hinzu. Die ROS wirken dabei chemotaktisch auf Neutrophile (die durch ihre neutrophileneigene

NADPH-Oxidase die ROS-Bildung wiederum verstärken), schädigen das sarkoplasmatische Retikulum, denaturieren Proteine und sind ebenso in der Lage, die DNA direkt zu schädigen. Die durch die Ischämie präexistente hohe Kalziumkonzentration wird durch die ROS-induzierte Schädigung des sarkoplasmatischen Retikulums noch verstärkt. Ebenso führt eine Störung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters weiterhin zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums, woraus eine Hyperkontraktur des Kardiomyozyten resultiert, die zum Zelltod führt. Der rapide Ausgleich des pH-Wertes erleichtert diese Hyperkontraktur erheblich. Gemeinsame Endpunkte des Zellschadens sind die kardiomyozytäre Hyperkontraktur und die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP, Erklärung siehe S. 11) [10]. Durch Inflammation, ausgelöst von den chemotaktisch eingewanderten neutrophilen Granulozyten einige Stunden nach der Ischämie, wird der ischämische Schaden noch verstärkt (siehe Abbildung 1) [6, 11]. Dies ist bedingt durch die ROS-Bildung durch die neutrophileneigene NADPH-Oxidase, die Ausschüttung abbauender Enzyme und die Verstopfung von Blutgefäßen im Bereich des infarzierten Areals [11]. Das Zusammenspiel all dieser Faktoren führt zu einem verstärkten Zelluntergang bei Reperfusion eines zuvor ischämischen Gewebeareals.

Momentan stellt die PTCA die beste therapeutische Maßnahme zur Verbesserung des Outcomes eines Infarktgeschehens dar [2, 8]. Generell ist es das vorrangige Ziel, die Zeit zwischen Symptombeginn und Intervention so kurz wie möglich zu halten. Dies bedarf einer gut organisierten medizinischen Struktur sowie auch der Mitarbeit des Patienten [12]. Eine weitere vielversprechende therapeutische Möglichkeit, die Infarktgröße und damit den Insult gering zu halten, könnte hier die Präkonditionierung darstellen, mit deren Hilfe die Ischämietoleranz von infarktgefährdeten Zellen und Organen hinaufgesetzt werden kann.

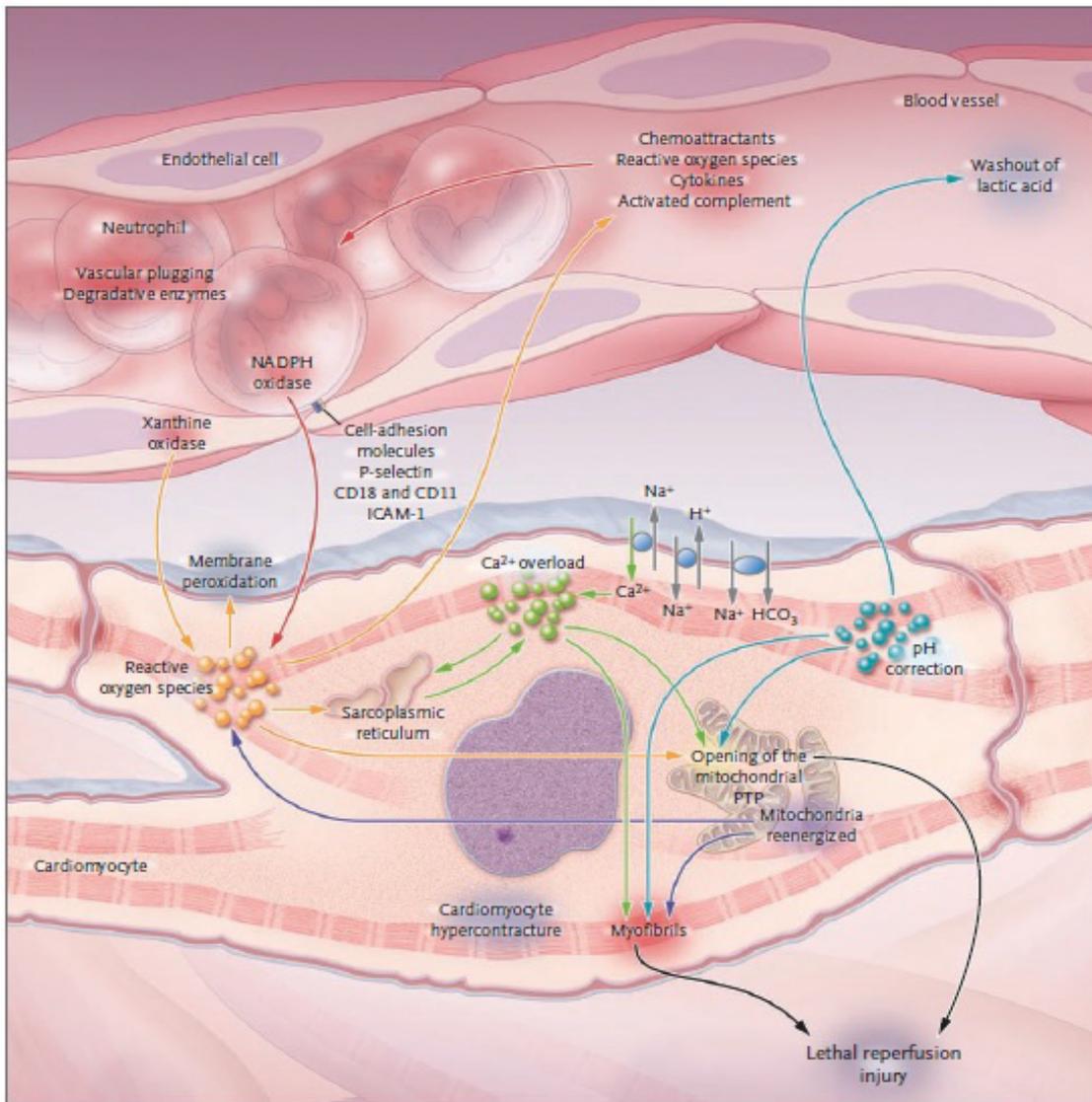


Abbildung 1 **Mediatoren des Ischämie-Reperfusionsschadens.** Dargestellt sind die molekularen und biochemischen Veränderungen des Ischämie-Reperfusionsschadens, die in letzter Konsequenz zum Zelltod führen können. Sie beinhalten die Wiederaufnahme der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette („mitochondria reenergized“, lila), die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Effekte („reactive oxygen species“, ROS, orange), die intrazellulär gesteigerte Kalziumkonzentration („Ca²⁺ overload“, grün), die Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes („pH correction“, blau) und die Inflammation durch neutrophile Granulozyten (rot), deren Auftreten durch Chemokine, ROS, Zytokine und aktiviertem Komplement erklärt werden kann. All diese Signalwege interagieren miteinander und können zur Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* („opening of the mitochondrial PTP“, mPTP) und zur Hyperkontraktur („cardiomyocyte hypercontracture“) führen, welche in letzter Konsequenz zum irreversiblen Zelltod („lethal reperfusion injury“) führt. In der Reperusionsphase nach einer Ischämie werden ROS durch die endotheliale Xanthinoxidase und die wiedererlangte Fähigkeit zur mitochondrialen Energiegewinnung gebildet, später kommt die NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten hinzu. Die ROS bedingen eine Peroxidation der Zellmembran („membrane peroxidation“), schädigen das sarkoplasmatische Retikulum („sarcoplasmatic reticulum“) und sind dazu in der Lage, die mPTP direkt zu öffnen. Des Weiteren wirken sie als *chemoattractant* für neutrophile Granulozyten, denaturieren Proteine und können die DNA direkt schädigen. Die Hyperkalzämie durch die geschädigte sarkolemmale Membran und den gestörten Na⁺/Ca²⁺-Antiporter kann zu einer direkten Öffnung der mPTP und zu einer zellulären Hyperkontraktur führen. Die rasche Normalisierung des pH-Wertes, die durch das Auswaschen von Laktat („washout of lactic acid“), durch den Na⁺/H⁺-Antiporter und den Na⁺/HCO₃⁻-Cotransporter erreicht wird, sorgt für den Wegfall des die mPTP inhibierenden sauren pH-Wertes, was ebenfalls in einer Öffnung der mPTP und Hyperkontraktur resultiert. Circa 6 Stunden nach

Reperfusion migrieren neutrophile Granulozyten, angezogen durch oben genannte Mechanismen, über Zelladhäsionsmoleküle (*“cell adhesion molecules“*) in das Gewebe und zerstören Kardiomyozyten über die Bildung von ROS, enzymatischen Abbau (*„degradative enzymes“*) und Verstopfung von Blutgefäßen (*„vascular plugging“*) (übernommen aus [11]. *Reproduced with permission from [11], Copyright Massachusetts Medical Society.*

1.3 Präkonditionierung als Möglichkeit zur Protektion vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden

Präkonditionierung bezeichnet ein Vorgehen, bei dem ein Organismus durch einmalige oder wiederholte Reize dazu angeregt wird, inhärente Prozesse zu triggern, die den Organismus vor später auftretenden, eventuell schwerwiegenderen Reizen schützen können. Die Präkonditionierung kann über verschiedene Möglichkeiten erreicht werden, welche im Folgenden erläutert werden. Dazu zählen die ischämische und die pharmakologische Präkonditionierung.

1.3.1 Die ischämische Präkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung wurde zum ersten Mal 1986 von Murry et al. beschrieben [13]. Hundeherzen unterliefen eine viermalige Folge von 5-minütiger Ischämie und 5-minütiger Reperfusion vor einer langandauernden Ischämie. Nach der Ischämie folgte eine 4-tägige Reperfusions- und Erholungszeit, bevor die Infarktgröße bestimmt wurde. Die Infarktgröße war in diesen präkonditionierten Gruppen etwa 75 % geringer als in den unbehandelten Kontrollgruppen. Murrys Arbeitsgruppe konnte mit diesem Versuchsaufbau zeigen, dass eine ischämische Präkonditionierung zu einem verbesserten Outcome nach einer Ischämie führt.

Darauffolgende Studien belegten die Wirksamkeit der Präkonditionierung [14]. Die ischämische Präkonditionierung ist dabei nicht auf einen rein kardialen Effekt zu beschränken. Verschiedene Studien zeigten die Wirksamkeit auch in weiteren Organen wie der Niere [15], der Leber [16] und der Skelettmuskulatur [17].

1993 konnte gezeigt werden, dass die ischämische Präkonditionierung nicht monophasisch ist, sondern in zwei voneinander getrennten Phasen stattfindet. Das frühe oder klassische Präkonditionierungsfenster (*first window of preconditioning, FWOP*) schließt sich unmittelbar dem Präkonditionierungsprotokoll von aufeinander folgender Ischämie und

Reperfusion an und geht verloren, wenn der zeitliche Abstand zwischen den Präkonditionierungszyklen und der langandauernden myokardialen Ischämie (Index-Ischämie) länger als etwa 1-2 Stunden beträgt [18].

Das späte Präkonditionierungsfenster (*second window of preconditioning*, *SWOP*) dagegen entwickelt sich etwa 12-24 Stunden nach Präkonditionierung. Es hält etwa 48 bis 72 Stunden an [19, 20].

Die Entdeckung der ischämischen Präkonditionierung und auch der Möglichkeit, in zwei zeitlich getrennten Fenstern zu agieren, zeigt die bestehende Möglichkeit, Menschen, die einen Herzinfarkt erleiden, besser schützen zu können. Da es jedoch nur mit sehr invasiven Methoden möglich ist, bei Patienten eine Abfolge von kurzandauernden Ischämie- und Reperfusionsphasen durchzuführen, ist es nötig, die zu Grunde liegenden Signalwege zu erforschen. Hierdurch können bestimmte Bestandteile der Transduktionskette pharmakologisch aktiviert werden. Somit wäre eine Präkonditionierung auf pharmakologischem Weg durch bereits im klinischen Alltag genutzte Medikamente erreichbar.

1.3.2 Die pharmakologische Präkonditionierung

Die pharmakologische Präkonditionierung stellt eine Möglichkeit dar, ein Organ zu präkonditionieren, ohne invasive Maßnahmen ergreifen zu müssen. Die Signalkette, über die auch die ischämische Präkonditionierung erfolgt, soll hierbei gezielt durch Pharmaka aktiviert werden, um den gleichen Effekt der Infarktgrößenminderung zu erzielen.

Solche Stoffe stellen beispielsweise Erythropoietin [21], Simvastatin [22], *atrial natriuretic peptide* (ANP) [23], Cyclosporin [24], Exenatid [25] und Metoprolol [26] dar. Zudem wurde auch bei in der Anästhesie verwendeten Substanzen ein präkonditionierender Effekt nachgewiesen, die neben den Opioiden [27, 28] auch die Gruppe der volatilen Anästhetika (Isofluran [29, 30], Halothan [29], Sevofluran [31], Desfluran [31]) umfassen. Gleiches gilt für die Edelgase Xenon [32] und Helium [33].

Diese Pharmaka stellen bei Weitem keine vollständige Liste dar. Dennoch zeigt dieser Auszug, dass es nichtinvasive Möglichkeiten gibt, Organe wirksam zu präkonditionieren.

Eine weitere Stoffgruppe mit präkonditionierender Wirkung stellen die Phosphodiesterasehemmer dar. Vertreter dieser Gruppe mit nachgewiesener Fähigkeit zur Präkonditionierung sind das Tadalafil [34], das Vardenafil [35] und

das Sildenafil [35, 36], die bereits im klinischen Alltag häufig eingesetzt und gut erforscht sind. Eine Applikation dieser Substanzen vor einer totalen, also das ganze Herz betreffenden, Ischämie hatte zum Ergebnis, dass die Infarktgröße der Herzen geringer wurde [34, 35].

Maßgeblich für das gezielte Erforschen dieser Pharmaka und damit den Erfolg der pharmakologischen Präkonditionierung ist jedoch ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Signalkaskade. Um verbesserte pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu erreichen, ist es essentiell, die genauen Mechanismen weiter zu erforschen und an der Signalkaskade teilnehmende Mediatoren offenzulegen.

1.3.3 Mechanismen der Präkonditionierung

In den 1990er Jahren, kurz nach der Erstbeschreibung der Präkonditionierung durch Murry et al., wurden bereits die ersten Schritte der Signaltransduktion erforscht. Adenosin [37] und Adenosin A₁-Rezeptoren [38], die Proteinkinase C (PKC) [39] und der mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanal mK_{ATP} [40] wurden als Signaltransduktionskomponenten identifiziert. Dies führte zu der Annahme, dass Adenosin endogen freigesetzt wird, über seinen Adenosinrezeptor die PKC aktiviert und diese den Kaliumkanal öffnet, was zu einem verminderten Calciumeinstrom führt und dadurch direkt kardioprotektiv wirkt. Es stellte sich in der Folge heraus, dass die Signaltransduktion jedoch komplexer ist und aus deutlich mehr Komponenten besteht, als zunächst angenommen. Dennoch war das Aufdecken einzelner Transduktionskomponenten verbunden mit der Idee, auch durch spezifisch wirkende Pharmaka einzelne Trigger zu aktivieren und so die Präkonditionierungskaskade pharmakologisch in Gang zu setzen.

Man unterscheidet im Präkonditionierungsprozess zwischen Trigger, Mediator und Endeffektor. Die präkonditionierende Ischämie setzt demnach einen Triggermechanismus in Gang, der über verschiedene Signalwege, die aus den Mediatoren bestehen, zu einem oder mehreren Endeffektoren führt.

1.3.3.1 Trigger

Als Trigger werden die Faktoren bezeichnet, die in der Signalkette zuerst freigesetzt werden und über die Stimulation ihrer jeweiligen Rezeptoren die Signalkaskade starten. Den ersten erforschten Trigger stellt das Adenosin bzw.

die Aktivierung des A₁-Rezeptors dar [38]. Aber auch Bradykinin über den B₂-Rezeptor [41], sowie Opioide über den δ-Rezeptor [28] sind Beispiele für Trigger. Während der Präkonditionierung können diese drei Rezeptoren (Adenosin A₁, Bradykinin B₂, Opioid-δ) simultan über die Aktivierung ihrer jeweiligen Gi-Rezeptoren aktiv sein. Die Blockierung einer der drei Rezeptoren kann die Präkonditionierung aufheben, jedoch ist es durch eine stärkere Aktivierung der jeweils anderen Rezeptoren möglich, den fehlenden Stimulus auszugleichen. Allen drei Rezeptoren ist die Weiterleitung des Signals über die PKC gemeinsam [42].

Eine Aktivierung der PKC ist dabei allerdings nicht nur über die oben genannten Rezeptoren möglich. Auch ROS sind dazu in der Lage, über eine Aktivierung der PKC eine präkonditionierende Wirkung zu entfalten [43, 44]. Verschiedene Studien legen nahe, dass die Aktivierung der PKC ohne einen weiteren Zwischenschritt direkt geschieht [45, 46]. Die Studienlage ist hier allerdings nicht eindeutig. Um eine ischämische Präkonditionierung durch ROS zu erreichen, ist mindestens ein Ischämie-Reperfusionsszyklus vor der Index-Ischämie notwendig, da die Radikalbildung von einer Sauerstoffzufuhr abhängig ist. Nur durch eine Reperfusion kann der triggernde Signalweg abgeschlossen werden. Herzen, die diese Abfolge von Ischämie und anschließender Reperfusion nicht erhielten, also nicht präkonditioniert waren, wurden durch die alleinige Anwesenheit von ROS nicht geschützt [42]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse von Schulz et al., der in einem Versuch mit Schweinen nachweisen konnte, dass eine Ischämie ohne Koronarfluss (*no flow ischemia*) das Herz bei einer nachfolgenden Ischämie mit geringem Koronarfluss (*low flow ischemia*) schützen kann [47]. Diese Ergebnisse konnten auch in anderen Spezies bestätigt werden [48]. Eine Protektion konnte hier durch die Bildung von ROS erreicht werden.

Einen weiteren Trigger der Präkonditionierung stellt Stickstoffmonoxid (NO) dar [49-52]. NO wird durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen, NOS) gebildet, von denen vier bekannte Isoformen existieren (endotheliale NOS: eNOS, induzierbare NOS: iNOS, neuronale NOS: nNOS, mitochondriale NOS: mtNOS). Über die Bereitstellung von NO können verschiedene Signalwege aktiviert werden, die eine Präkonditionierung zur Folge haben können.

Nach dem Start der Signalkaskade ist allen Triggern die weitere Transduktion über ihre jeweiligen Mediatoren gemeinsam.

1.3.3.2 Mediatoren

Mediatoren stellen jene Komponenten der Signalkaskade dar, die zur Weiterleitung des präkonditionierenden Signals dienen. Eine herausragende Rolle spielen hierbei die PKC und die Proteinkinase G (PKG). Aber auch weitere Kinasen, wie die p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) und die p42/p44 MAPK, die Proteinkinase A (PKA) und der Phosphatidylinositol-3'-Hydroxy Kinase/Akt-Komplex (PI3K/Akt) [53, 54] sind Beispiele für Mediatoren. Generell kommt der PKC eine besondere Rolle zu, da sowohl die epsilon (ϵ)- als auch die delta (δ)-Isoform Teil der Präkonditionierung sind [55-57]. Werden die beiden Enzyme spezifisch blockiert, wird die Präkonditionierung verhindert. Eine alleinige Blockade der Isoformen ohne vorherige Präkonditionierung beeinflusst den Ischämie-Reperfusionsschaden dabei nicht [39, 58], wodurch die Mediatorfunktion belegt wird. Diese Ergebnisse deuten weiterhin darauf hin, dass Aktivatoren der PKC als Trigger dienen können und die Aktivierung der PKC einen präkonditionierenden Effekt auslöst [39, 42].

Im Falle der Bildung von ROS ist unter anderem der mK_{ATP} -Kanal verantwortlich [59, 60]. Eine pharmakologische Induktion der ROS-Bildung wurde durch die Gabe des selektiven mK_{ATP} -Kanalöffners Diazoxid in einer Zellkultur von adulten Kardiomyozyten erreicht. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass der durch die ROS-Bildung erreichte protektive Effekt durch Radikalfänger wie N-Acetylcystein oder N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (MPG) aufgehoben wird [42, 59].

Dass der mK_{ATP} -Kanal kein Endeffektor, sondern ein Mediator der Präkonditionierung ist, legen die Ergebnisse von Pain et al. nahe. Ihre Forschungsgruppe zeigte, dass der präkonditionierende Effekt über die Aktivierung des Kanals durch Applikation des mK_{ATP} -Kanalinhibitors 5-Hydroxydecanoat (5-HD) während der Präkonditionierungsphase aufgehoben werden kann. Nach erfolgter Präkonditionierung zeigte 5-HD allerdings keine Wirkung mehr [60]: Eine Blockierung der PKC durch Chelerythrin, einem selektiven PKC-Inhibitor [61], hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Präkonditionierung durch Diazoxid, während allerdings die Gabe von Genistein, einem Tyrosinkinaseinhibitor, kurz vor der Index-Ischämie die Präkonditionierung verhinderte [60]. Dies zeigt, dass die Präkonditionierung nicht zwingend über die PKC erfolgen muss, sondern auch über die Aktivierung von Tyrosinkinasen

weitergeleitet wird. Pain et al. konnten in dieser Studie weiterhin zeigen, dass die Präkonditionierung durch MPG blockiert werden kann und freie Radikale einen Teil des Signalwegs bilden. Der mK_{ATP} -Kanal spielt hierbei eine zentrale Rolle [60].

Generell scheint den mitochondrialen Kaliumkanälen (mK-Kanäle) bei der Kardioprotektion über die durch sie bedingte Änderung der intramitochondrialen Kaliumkonzentration eine wichtige Rolle zuzukommen: In physiologischem Zustand bei geschlossenen Kanälen ist der Kaliuminflux durch die innere mitochondriale Membran gering genug, um durch den K^+/H^+ -Antiporter ausgeglichen werden zu können [62]. Kommt es aber zu einer Stressreaktion der Zelle, so wird die protektive Wirkung der mK-Kanäle deutlich: Durch Öffnung der Kanäle steigt der Kaliuminflux in das Mitochondrium rapide. Sekundär diffundiert Wasser in das Mitochondrium, welches dadurch anschwillt. Diese Änderung des Volumens bedingt eine signifikante Änderung des Energiehaushaltes des Mitochondriums [63]. Der Intermembranraum wird durch die Schwellung schmal gehalten, wodurch die Atmungskette effektiv ablaufen kann. Gleichzeitig wird ein Gradient zur Verbesserung des ATP-Transportes in die Zelle geschaffen [62]. Des Weiteren wird durch die erhöhte intramitochondriale Kaliumkonzentration und die damit verbundene Depolarisation auch der Kalziumstrom in die Mitochondrienmatrix erniedrigt, wodurch eine Öffnung der mPTP (siehe Abschnitt 1.3.3.3 auf S. 11) verhindert [62] und das Herz präkonditioniert wird.

Oldenburg et al. konnte in Kaninchen zeigen, über welche Zwischenschritte die Aktivierung des mK_{ATP} -Kanals erfolgen kann: Bradykinin erzeugt die Bildung von NO, welches wiederum die lösliche Guanylatcyklase (sGC) aktiviert. Diese bildet cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Das cGMP ist als *second messenger* dazu in der Lage, die PKG zu aktivieren, welche dann den mK_{ATP} -Kanal öffnet [64]. Einen weiteren Zwischenschritt, die Aktivierung der NOS über Akt, einer Serin/Threonin Kinase, wurde durch Fulton et al. nachgewiesen [65]. Verschiedene Studien bestätigen die Beobachtungen durch Oldenburg et al. [66-68]. Mit dem Nachweis der Aktivierung der PKC- ϵ durch PKG als Schritt zur Öffnung der mK_{ATP} -Kanäle wurde auch diese Lücke in der Signaltransduktion geschlossen [69]. Die PKG scheint also in der Kaskade der PKC vorgeschaltet zu sein, folglich wäre eine Aktivierung der PKG dazu in der Lage, Präkonditionierung hervorzurufen.

Innerhalb der Signalkaskade der Präkonditionierung ist ein *memory*-Effekt eingeschaltet, der durch die Präkonditionierung zustande kommt und das Herz in einem präkonditionierten Zustand hält [70]. Somit kann durch Triggern der Mediatoren erneut ein schützender Effekt hervorgerufen werden.

Letzten Endes haben alle Mediatoren gemeinsam, dass sie über ihre Signaltransduktion entsprechende Endeffektoren aktivieren.

1.3.3.3 Endeffektoren

Endeffektoren sind ursächlich für die Protektion bei der anschließenden Index-Ischämie oder der darauffolgenden Reperfusionphase. Als Endeffektor eindeutig identifiziert wurde die *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP). Sie stellt eine unspezifische Pore an der inneren Mitochondrienmembran dar, die durch einen erhöhten pH-Wert, erhöhte Phosphatkonzentrationen oder eine zu hohe Kalziumkonzentration begleitet von oxidativem Stress, geöffnet werden kann. Infolge dessen können Moleküle mit einer Größe bis zu 1,5 kDa die ansonsten unpermeable innere Mitochondrienmembran passieren [71]. Der daraus resultierende Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials führt zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung und konsekutiv zu einer fehlenden Produktion von ATP. Diese Entkopplung, die durch die Transition erworbene Fähigkeit der ATP-Hydrolyse und das Schwellen des Mitochondriums durch den Molekülinflux verursachen in letzter Konsequenz ein Platzen des Organells und die Freisetzung von nekrotischen und apoptotischen Substanzen, die zum Zelltod führen [71-73]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Hemmung der Öffnung dieser Pore den präkonditionierenden Effekt verursacht und die mPTP somit als Endeffektor der Präkonditionierung gilt [74-76].

Einen schematischen Überblick über die Mechanismen und Effektoren der Präkonditionierung stellt Abbildung 2 dar.

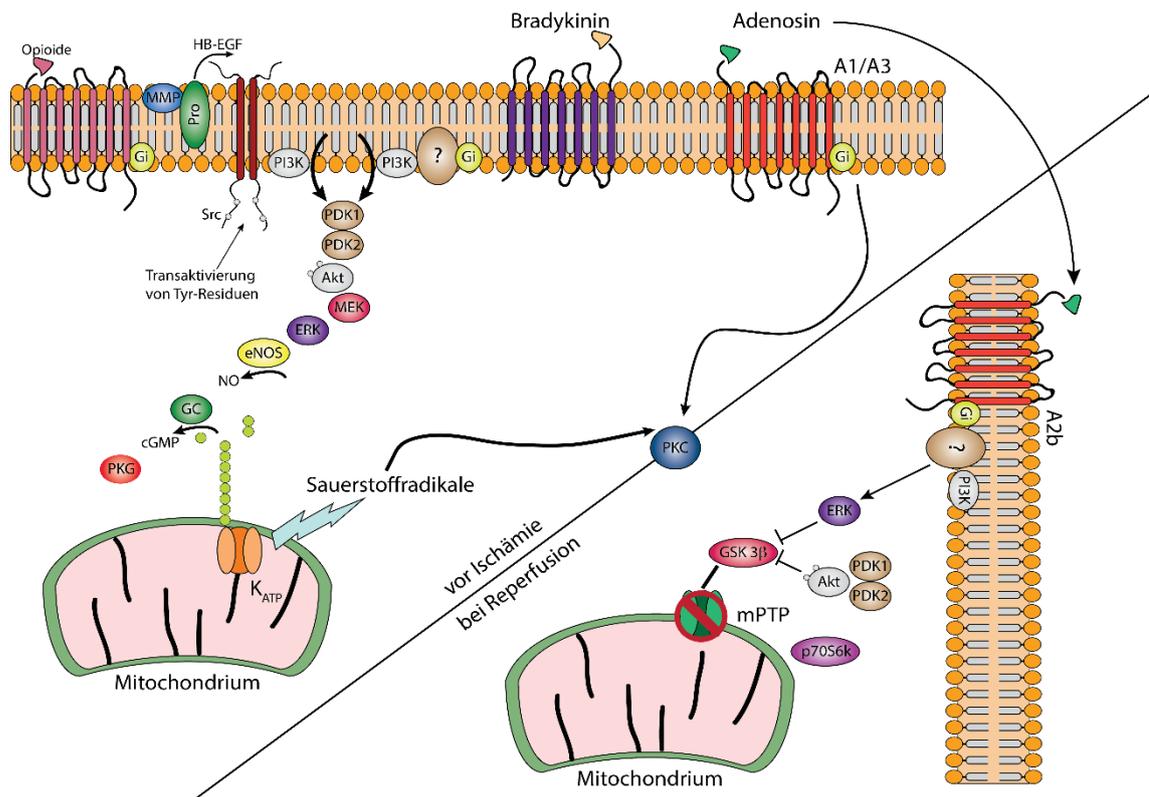


Abbildung 2 **Zusammenfassung des Mechanismus der Präkonditionierung** Über verschiedene Zwischenschritte können die G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Opioides, des Bradykinins und des Adenosins die Proteinkinase C aktivieren, die wiederum eine weitere, nicht genauer geklärte Signalkaskade aktiviert, die letztendlich zu einer Hemmung der Öffnung der mPTP führt. Der hier gezeigte Weg stellt daher eher einen in der Forschung vermuteten Weg dar, der allerdings einer weiteren Überprüfung bedarf (modifiziert nach [77]).

1.3.4 Sildenafil und Sildenafil-induzierte Präkonditionierung

Wie bereits oben erwähnt sind auch Pharmaka der Gruppe der Phosphodiesterasehemmer dazu in der Lage, präkonditionierend zu wirken. In dieser Arbeit wurde der für die Phosphodiesterase 5 (PDE₅) spezifische Hemmstoff Sildenafil genutzt. Klinisch wird der Wirkstoff zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Viagra®, Zulassung 1998 [78]) oder der pulmonalen Hypertonie (Revatio®, Zulassung 2005 [79]) eingesetzt. Sildenafil ist in der Lage, die cGMP-abhängige PDE₅ spezifisch zu hemmen und so durch verminderten Abbau das cGMP verstärkt für seine Effektoren zur Verfügung zu stellen. Das cGMP ist ein *second messenger*, der in der Literatur zuerst im Jahr 1963 Erwähnung fand [80]. Es wird durch die membranständige (mGC) oder lösliche (sGC) Guanylatcyklase aus Guanosintriphosphat zu cGMP prozessiert. In seiner Funktion als Botenstoff ist cGMP dazu in der Lage, zur Relaxation glatter

Muskelzellen zu führen und durch verstärkte Bindung die Proteinkinase A und Proteinkinase G zu aktivieren [81, 82] .

Der kardioprotektive Effekt von Sildenafil wurde in diversen Studien belegt [36, 83-85]. Dabei wurde auch gezeigt, dass die Sildenafilapplikation mit einem Anstieg des cGMP-Spiegels vergesellschaftet ist [86].

Als Mediator der Protektion durch Sildenafil wurde aus der Gruppe der mitochondrialen Kaliumkanäle der mK_{ATP} identifiziert [83, 84]. Eine Verbindung all dieser Erkenntnisse konnten Han et al. machen, als sie in ihrem Versuchsaufbau nachwiesen, dass eine Steigerung der cGMP-Konzentration zu einer PKG-Aktivierung und konsekutiv zu einer Aktivierung des mK_{ATP} -Kanals führte [87] (inhaltlich übernommen aus [1]).

Weiterhin konnte durch Salloum et al. gezeigt werden, dass Sildenafil durch Induktion zweier NOS-Isoformen (eNOS und iNOS) den präkonditionierenden Signalweg in Gang setzen kann [36].

Sildenafil steht damit als Aktivator der eNOS und iNOS, des mK_{ATP} -Kanals und der PKG im Mittelpunkt von vielversprechenden und möglicherweise weitreichenden Möglichkeiten, eine Präkonditionierung hervorzurufen.

Aufgrund weiterer Studienergebnisse liegt allerdings auch die Annahme nahe, dass ein weiterer Vertreter der mitochondrialen Kaliumkanäle bei der Phosphodiesterasehemmer-induzierten Kardioprotektion eine tragende Rolle spielt. Hierbei handelt es sich um den mitochondrialen kalziumsensitiven Kaliumkanal (mBK_{Ca}). Offen ist dabei weiterhin die Frage, ob auch Phosphodiesterasehemmer der Gruppe 5 und somit das Sildenafil dazu in der Lage sind, mit dem mBK_{Ca} -Kanal zu interagieren.

1.3.5 Der mitochondriale kalziumsensitive Kaliumkanal (mBK_{Ca}) und seine Rolle bei der Präkonditionierung

Die Familie des oben bereits erwähnten mBK_{Ca} -Kanals zählt zur Gruppe der Kaliumkanäle mit hoher Kaliumleitfähigkeit (BK = *Big Potassium*), welche durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert werden können. Aus dieser Kanalfamilie existieren sowohl mitochondriale BK_{Ca} -Kanäle als auch nicht-mitochondriale Isoformen.

Der genaue strukturelle Aufbau der Kanalfamilie ist noch unbekannt. Es wird angenommen, dass der Kanal aus mindestens zwei Untereinheiten besteht: Der α -Untereinheit, bestehend aus vier porenbildenden Monomeren, und der β -

Untereinheit, die wiederum aus vier Monomeren besteht. Die β -Untereinheit ist für die Modulation der Calciumsensitivität verantwortlich und dazu in der Lage, mit der α -Untereinheit zu interagieren, um die Kanalaktivität zu modulieren [88]. Sie besteht aus zwei Transmembrandomänen. In nicht-mitochondrialen K_{Ca} -Kanälen der arteriellen glatten Muskelzellen wurde zudem noch eine γ -Untereinheit identifiziert, die reich an Leucin ist und aus einer Transmembrandomäne besteht und die für eine spannungsabhängige Modulation der α -Untereinheit verantwortlich gemacht wird [89].

Während die nicht-mitochondrialen Isoformen hauptsächlich an der Zellmembran glatter Muskelzellen exprimiert werden und ihre Funktion im vaskulären System in der Regulation des Gefäßtonus [90] ausüben, spielen für die Kardioprotektion die an der inneren Mitochondrienmembran exprimierten mBK_{Ca} -Kanäle eine Rolle [91].

Der erste Vertreter der mitochondrialen BK_{Ca} -Kanäle wurde 1999 in menschlichen Gliazellen identifiziert. Er wurde zunächst beschrieben als ein calciumabhängiger Kaliumkanal (*large conductance calcium-activated potassium channel*), dessen Stimulation unter anderem durch ionisiertes Calcium erfolgt und der durch Charybdotoxin (ChTx) blockierbar ist. Eine spezifische physiologische Funktion konnte dem Kanal allerdings nicht zugeordnet werden [92].

Eine weitere Isoform dieses Kanals wurde wenige Jahre später an der inneren Mitochondrienmembran von Myokardzellen von Meerschweinchen dargestellt [91]. Fukasawa et al. zeigten, dass Phosphodiesterase-3-Hemmer (PDE₃-Hemmer) dazu in der Lage sind, den mBK_{Ca} -Kanal zu aktivieren [93]. Weiterhin zeigte sich, dass diese Kanäle zu einem Teil ebenfalls durch die PKG aktivierbar sind [94, 95].

Mit einem spezifischen Aktivator, dem NS1619, wurde nachgewiesen, dass der mBK_{Ca} -Kanal ebenfalls an der Kardioprotektion beteiligt ist. Der durch den Aktivator hervorgerufene Effekt konnte durch die Kanalblocker ChTx und Iberiotoxin aufgehoben werden [91]. Dass der kardioprotektive Effekt durch den mBK_{Ca} -Kanalblocker Paxillin antagonisierbar ist, wurde ebenfalls nachgewiesen [96, 97]. Gleiche protektive Effekte wurden auch im Gehirn über die mBK_{Ca} -Kanäle der Gliazellen nachgewiesen [98]. Cao et al. konnten zeigen, dass eine ischämische Präkonditionierung den gleichen Effekt hatte wie die direkte

Aktivierung durch NS1619. Darüber hinaus konnte dieser Effekt zwar mit Paxillin, allerdings nicht mit dem K_{ATP} -Blocker 5-HD antagonisiert werden. Erst die Inhibition der Öffnung der mPTP konnte die Kardioprotektion aufheben [99]. Dies legt nahe, dass der mBK_{Ca} -Kanal einen Mediator der Kardioprotektion darstellt, der von der Signaltransduktion des vorher beschriebenen mK_{ATP} -Kanals unabhängig ist.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die pharmakologische Öffnung des mBK_{Ca} -Kanals sowohl eine frühe und späte Präkonditionierung [100, 101], als auch eine Postkonditionierung bewirkt [102]. Unlängst wurde von Singh et al. gezeigt, dass der mBK_{Ca} -Kanal auf mitochondrialer Ebene auf dem KCNMA1 (Slo1) Gen (*potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1*) kodiert ist. Unterstützt wurde diese Annahme durch Experimente an KCNMA1-Knockout-Mäusen, bei denen NS1619, ein spezifischer Aktivator des mBK_{Ca} -Kanals, keinen kardioprotektiven Effekt hatte [103]. Interessanterweise führt eine submaximale Konzentration zweier gleichzeitig applizierter Kanalaktivatoren zu additiven kardioprotektiven Effekten [104].

Mit der Entdeckung des mBK_{Ca} -Kanals wurde somit also ein wichtiger Mediator der Präkonditionierung beschrieben, dessen vor- und nachgeschalteter Mechanismus in weiten Teilen noch unklar ist. Eine besondere Aufmerksamkeit liegt dabei auf der Entdeckung des Triggermechanismus. Der Fakt, dass durch die Aktivierung der PKG eine Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle stattfinden kann, gibt Grund zur Annahme, dass auch Vertreter der Phosphodiesterasehemmer der Gruppe 5, von denen bereits eine Kardioprotektion über andere Zwischenschritte nachgewiesen ist, ihre Fähigkeit ebenfalls über diesen bisher wenig erforschten Kanal entfalten können. Hier liegt es nahe, das bereits gut bekannte Sildenafil zu nutzen, um wichtige Verbindungen der präkonditionierenden Fähigkeiten des Sildenafils und des mBK_{Ca} -Kanals verknüpfen zu können.

1.4 Ziele der Arbeit

Obwohl die Forschung zur Präkonditionierung eine sehr große Aufmerksamkeit erfährt, sind die genauen Mechanismen weiterhin ungeklärt und geben Fragen auf.

Von zentraler Bedeutung ist nach wie vor eine Darstellung des genauen Signalwegs. Damit einher geht die Frage nach einem genaueren Verständnis der involvierten Enzyme und Proteine und das Wissen um pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten.

Insbesondere mit der Neuentdeckung des mitochondrialen calciumabhängigen Kalziumkanals mBK_{Ca} als Mediator des präkonditionierenden Signalwegs stehen der Forschung einige neue Türen offen. Eine zentrale Frage dabei ist, welche Stimulatoren einen Trigger dieses Kanals in der frühen Präkonditionierung darstellen. Durch die Aktivierbarkeit des Kanals mittels PKG liegt die Vermutung nahe, dass eine pharmakologische Aktivierung des Kanals und dadurch ein Erreichen der Kardioprotektion durch Erhöhung der cGMP-Konzentration zu erzielen ist. Aktuell steht der Nachweis dieser Querverbindung aus. Mit Sildenafil, das bereits als präkonditionierend beschrieben ist und dessen Wirkungen der Steigerung der Konzentration von cGMP und der Aktivierung von PKG gut bekannt sind, steht uns der ideale Wirkstoff zur Verfügung, die zentralen Fragen dieser Arbeit beantworten zu können.

Diese lauten:

Welchen Effekt hat eine Vorbehandlung mit Sildenafil auf den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden?

Wird die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion über eine Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals vermittelt?

Wird die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion über die Aktivierung der Proteinkinase G auf den mBK_{Ca} -Kanal vermittelt?

Der mögliche Signalweg (vgl. Abbildung 3) könnte dabei folgendermaßen aussehen: Durch die Gabe von Sildenafil wird die PDE_5 gehemmt. In der Folge kommt es zur Konzentrationserhöhung von cGMP. Dies führt zur verstärkten Aktivierung der PKG. Hierdurch kann eine Öffnung des mBK_{Ca} -Kanals bedingt werden, die dann zur Kardioprotektion führen kann.

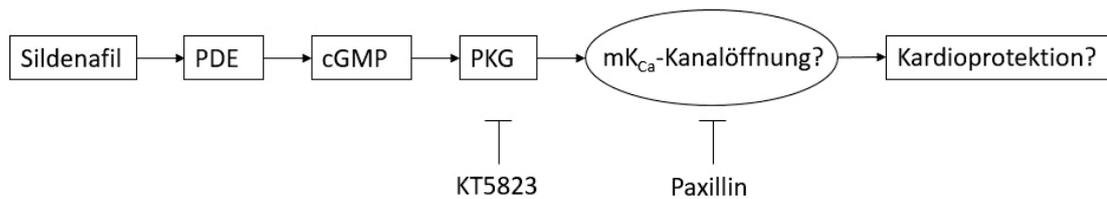


Abbildung 3 **Möglicher Signalweg der Präkonditionierung durch Sildenafil.** Hier dargestellt ist der mögliche Signalweg der Präkonditionierung durch Sildenafil. Über die Hemmung der Phosphodiesterase kann die PKG über cGMP vermehrt aktiviert werden. Dies kann in einer vermehrten Öffnung der mBK_{Ca}-Kanäle resultieren und damit zur Kardioprotektion führen. Die PKG kann durch die Gabe von KT5823 gehemmt werden. Durch Paxillin können die mBK_{Ca}-Kanäle gehemmt werden. PDE = Phosphodiesterase, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, mBK_{Ca} = mitochondrialer, calciumabhängiger Kaliumkanal, Paxillin = mBK_{Ca}-Kanalinhibitor. Eigene Abbildung [1].

Die Versuche fanden statt in einem *ex vivo* Versuchsaufbau (Langendorff-Apparatur) am isolierten Rattenherz, auf das Sildenafil übertragen wurde. Als mBK_{Ca}-Kanalblocker wurde Paxillin eingesetzt. Als PKG-Blocker wurde KT5823 genutzt.

Als Endpunkt der Studie wurde die Infarktgröße als prozentualer Anteil des Risikogebietes gewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die für die Organentnahmen benötigten Versuchstiere stammten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf (Internes Aktenzeichen der ZETT: O 27/12). Insgesamt wurden für die Versuche 76 männliche Wistar-Ratten eingesetzt, um den Mechanismus der Sildenafil-induzierten Kardioprotektion näher zu charakterisieren [1].

Die konventionelle Tierhaltung erfolgte in Makrolon®-Einzelkäfigen des Typs 3 (ca. 800 cm², Höhe 15 cm) unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 50 ± 5 %, Luftumwälzrate 16-20 Mal pro Stunde). Die künstliche Beleuchtung wurde mit einer Intensität von 300-320 Lux durchgeführt und unterlag einem Tag-Nacht-Wechsel alle 12 Stunden. Als Einstreu der Käfige diente entkeimtes Weichholzgranulat (Fa. LASvendi, Soest). Als Futtermittel wurde ein Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) benutzt, welches *ad libitum* eingesetzt wurde. Das entkeimte Trinkwasser (ozonisiert und mit HCl angesäuert, pH 2,6-3,0) wurde ebenfalls *ad libitum* eingesetzt [1].

Das Gewicht der Tiere lag zwischen 250 und 320 g. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt ca. 3 Monate alt. Es wurden ausschließlich Versuchstiere herangezogen, die keinerlei Krankheitszeichen aufwiesen.

2.2 Die genutzten Substanzen

2.2.1 Sildenafil-Citratsalz (Phosphodiesterase-5-Hemmer)

Sildenafilcitrat wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Seine chemische Bezeichnung lautet 1-[[3-(4,7-Dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazin Citratsalz. Durch die Summenformel $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$ (Strukturformel siehe Abbildung 4) ergibt sich die molare Masse von 666,7 g/mol. Sildenafil stellt einen potenten selektiven Inhibitor der cGMP-abhängigen PDE₅ dar.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurde eine Sildenafil-Stocklösung hergestellt. Hierzu wurde Sildenafil-Citrat in einer Konzentration von 10 mM in 100 %igem

Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (siehe Abschnitt 2.2.2). Zur Verwendung von Sildenafil für die jeweiligen Versuche wurde die Stocklösung mit Krebs-Henseleit-Puffer verdünnt auf eine Konzentration von 300 µM Sildenafil in einer etwa 3 %igen DMSO-Lösung. Diese Lösung wurde in einer Spritze angefertigt und mit einem Hundertstel des gemessenen Koronarflusses der Langendorff-Anlage hinzugegeben, sodass die Endkonzentration von Sildenafil am Herzen 3 µM betrug.

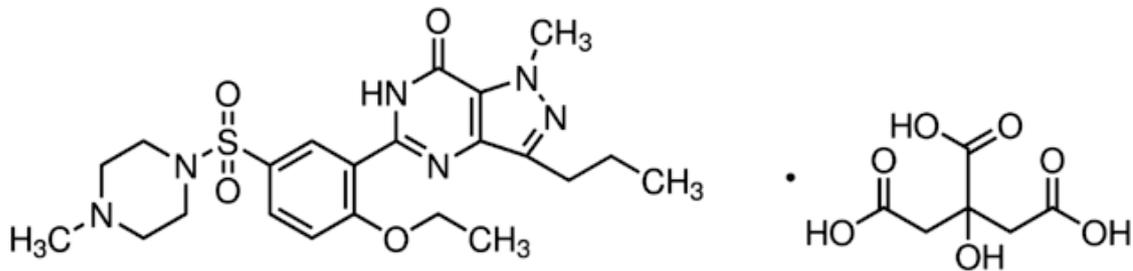


Abbildung 4 **Sildenafil-Citrat** Abgebildet ist die Strukturformel des genutzten Sildenafil-Citrates.

2.2.2 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogene DMSO stellt einen Trägerstoff mit sehr guten Lösungseigenschaften für organische und anorganische Chemikalien dar. Die Summenformel lautet C_2H_6OS (Strukturformel siehe Abbildung 5), was eine molare Masse von 78,13 g/mol ergibt. Eine Versuchsgruppe bestehend aus 8 isolierten Herzen erhielt das DMSO in etwa 3 %iger Lösung als Vehikelkontrolle ohne die Zugabe des Sildenafilis.

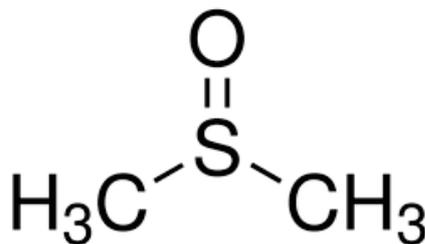


Abbildung 5 **Dimethyl-Sulfoxid**
Abgebildet ist die Strukturformel des DMSO.

2.2.3 Paxillin

Das genutzte Paxillin stammte von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland). Paxillin besitzt die Summenformel $C_{27}H_{33}NO_4$ (Strukturformel siehe Abbildung 6) und die molare Masse 435,6 g/mol. Es stellt einen potenten Blocker des mitochondrialen calciumsensitiven Kaliumkanals (mBK_{Ca}) dar [105, 106].

Paxillin wurde ebenfalls als Pulver geliefert und in DMSO zu einem 10 mM Stock gelöst. Für die Versuche wurde dieser Stock weiter verdünnt, um eine Endkonzentration von 1 μ M am Herzen zu ermöglichen. Diese Konzentration knüpft an vorangegangene Versuche an [107].

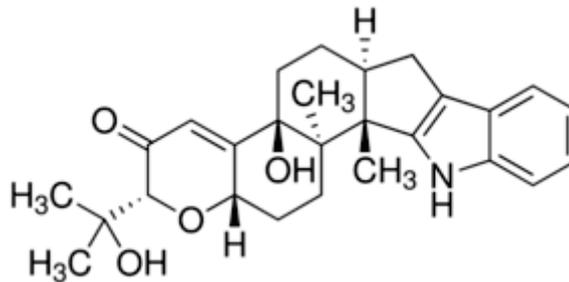


Abbildung 6 **Paxillin** Abgebildet ist die Strukturformel von Paxillin.

2.2.4 KT5823

Das KT5823 stammte ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland). Seine Summenformel lautet $C_{29}H_{25}N_3O_5$, die molare Masse beträgt 495,53 g/mol (Strukturformel siehe Abbildung 7). KT5823 ist ein selektiver Inhibitor der Proteinkinase G [108, 109].

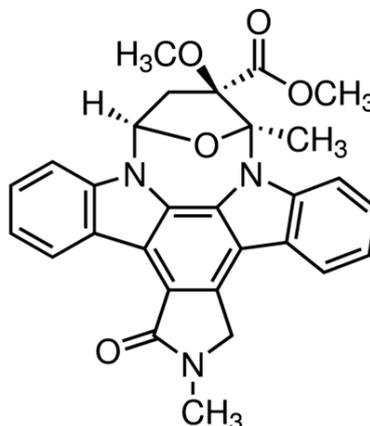


Abbildung 7 **KT5823**. Abgebildet ist die Strukturformel von KT5823.

Gleich dem Paxillin wurde das KT5823 zu einem Stock mit der Konzentration 10 mM gelöst. Durch weitere Verdünnung mit dem Krebs-Henseleit-Puffer wurde vor jedem Versuch eine Konzentration von 100 μ M in einer Spritze erreicht. Der Inhalt dieser Spritze wurde mit einem Hundertstel des Koronarflusses appliziert, sodass die Endkonzentration am Herzen 1 μ M betrug.

2.3 Der Krebs-Henseleit-Puffer

Zur kontinuierlichen retrograden Perfusion der Herzen wurde ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer genutzt. An jedem Versuchstag wurde diese Lösung neu angesetzt, um ein Ausfällen oder Kristallisieren sowie Elektrolytschwankungen zu verhindern. Als Grundlage diente destilliertes Wasser, in dem folgende Stoffe gelöst wurden: 116 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,1 mM MgSO₄, 1,17 mM KH₂PO₄, 24,9 mM NaHCO₃, 2,52 mM CaCl₂, 8,3 mM Glukose und 2,2 mM Pyruvat (siehe Liste der genutzten Chemikalien und Gase, Tabelle 1). Die Pufferzusammensetzung weicht geringfügig von den isotonen kristalloiden Infusionslösungen des klinischen Gebrauchs ab (die Basis des Krebs-Henseleit-Puffers bildet eine Ringer-Lösung) und wurde im Versuchsaufbau unter anderem als Transportmedium für die pharmakologischen Zusätze genutzt [1].

Während der Durchführung der Versuche wurde der Puffer kontinuierlich mit Carbogen, bestehend aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, begast, wodurch ein Sauerstoffpartialdruck von 540-620 mmHg, ein Kohlenstoffdioxidpartialdruck von 35-38 mmHg und ein pH-Wert von 7,38-7,43 erreicht wurde [1].

Tabelle 1 Liste der genutzten Chemikalien und Gase

Name	Summenformel	Hersteller	Sitz des Herstellers	molare Masse
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	58,44
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	74,55
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₂ + 7H ₂ O	MERCK EuroLab GmbH	Darmstadt	246,48
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	136,09
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	94,01
Kalziumchlorid	CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	110,99
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	ROTH	Karlsruhe	180,16
Pyruvat	C ₃ H ₃ NaO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	110,04
Triphenyltetrazoliumchlorid	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg	334,79
TRIS Pufferan	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth	Karlsruhe	121,14
Formaldehyd	CH ₂ O	Merck KGaA	Darmstadt	30,03
Carbogen		LINDE AG	München	
Stickstoff		LINDE AG	München	

Tabelle 2 **Substanzen und Wirkstoffe.** Aufgelistet sind die genutzten Wirkstoffe der Arbeit.

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Sitz des Herstellers
Sildenafilcitrat		Sigma-Aldrich GmbH	München
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma-Aldrich GmbH	München
Paxillin		Sigma-Aldrich GmbH	München
KT5823		Sigma-Aldrich GmbH	München
Pentobarbital	Narcoren	Merial GmbH	Hallbergmoos
Heparin	Heparin-Natrium 25000 IE	Ratiopharm	Ulm

Tabelle 3 **Verbrauchsmaterialien und Geräte.** Aufgeführt sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in der Arbeit genutzt wurden.

Gerät	Hersteller	Modell	Sitz des Herstellers
Pacer	ifd	Typ TG2/8	Düsseldorf, Deutschland
Peristaltische Pumpe	Gilson Inc.	Abimed minipuls 3, Modell 312	Villiers le Bel, Frankreich
Wasserbad Perfusat	Julabo	Modell EC	Seelbach, Deutschland
Wasserbad Wärmekreislauf	Julabo	Modell MW-6	Seelbach, Deutschland
Perfusor 1	B. Braun	Perfusor® Space, Typ 8713030	Melsungen, Deutschland
Perfusor 2	Harvard Apparatus	11Plus CAT, Nr. 70-2280	March-Hugstetten, Deutschland
Schläuche für peristaltische Pumpe	Saint-Gobain	Tygon R 3603	Herzogenrath, Deutschland
Schläuche Langendorff-Anlage	Gilson Inc.	F 11794	Villiers le Bel, Frankreich
Guillotine	UGO BASILE, S.R.L	Biological Research Apparatus Model 7959	Monvalle, Italien

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Präparation der Versuchstiere

Die Untersuchungen zum kardioprotektiven Effekt von Sildenafil über die PKG und den mBK_{Ca} -Kanal erfolgten an einer Langendorffanlage am isolierten Rattenherzen.

Männliche Wistar Ratten wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 90 mg/kg Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) anästhesiert [1]. Gleichzeitig erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 0,2 ml Heparin (Heparin-Natrium 25000 IE, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) um eine Koagulation des Blutes in der Eviszerationsphase zu verhindern. Nachdem das Versuchstier in tiefer Narkose lag, wurde es mittels einer Guillotine (Biological Research Apparatus, UGO BASILE S.R.L., Modell 7959, Serien-Nr.: 04501712070) dekapitiert. Durch eine mediane Thorakotomie wurde erst der Thorax und direkt danach das Perikard eröffnet. Das Herz wurde am Gefäßstamm abgesetzt und zur Überbrückung bis zum Anschluss an die Langendorffanlage unmittelbar in eine 0,9 %ige NaCl-Lösung überführt.

2.4.2 Die Langendorff-Anlage

An der Langendorffanlage wurde das Herz retrograd über die Aorta perfundiert. Ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer diente als Transportmedium und Perfusat. Der Puffer wurde in einem Wasserbad (Modell EC, Fa. Julabo GmbH, Germany) auf 45 °C erwärmt, um zu gewährleisten, dass die Endtemperatur am Herzen der Körpertemperatur entsprach. Mittels einer peristaltischen Pumpe (Abimed minipuls 3, Modell 312, Fa. Gilson, Frankreich) wurde das Perfusat durch ein Schlauchsystem (Schlauchsystem der Anlage: Tygon® R 3603, Innendurchmesser 3,2 mm, Außendurchmesser 6,4 mm, in die Pumpe eingespannte Schläuche: F11794, Innendurchmesser 3,16 mm, Fa. Gilson, Frankreich) in die Anlage transportiert. Die Anlage besaß zwei Perfusatkreisläufe. Ein Kreislauf schloss ein Überlaufbecken ein, der in einer definierten Höhe angebracht war, um durch die entstehende Wassersäule einen konstanten Perfusionsdruck von 80 mmHg zu gewährleisten. Das Perfusat, das durch diesen Kreislauf floss, wurde in dem Perfusatbehälter wieder aufgefangen und konnte erneut der Anlage zugeführt werden. Der zweite Kreislauf schloss die

Perfusion des Herzens mit ein. Über einen Dreiwegehahn konnte dieser dem ersten Kreislauf zugeschaltet werden. Perfusat, welches durch das Herz geflossen war, wurde verworfen (siehe Abbildung 8: schematische Darstellung der Langendorff-Präparation).

Um den Krebs-Henseleit-Puffer auch im Kreislauf bei konstanter Temperatur zu halten und so das Herz vor Abkühlung von außen zu schützen, wurden zusätzlich zwei Wärmekammern hinzugefügt, in denen Wasser zirkulierte, das durch ein separates Wasserbad (Modell MW-6, Fa. Julabo, Deutschland) auf 38,5 °C erwärmt wurde. Eine dieser beiden Wärmekammern diente gleichzeitig als Luftfänger, um einer Embolisierung der Koronarien durch Luftblasen zu verhindern. Während des gesamten Versuches wurde über zwei Druckaufnehmer und einen im linken Ventrikel positionierten Ballon der linksventrikuläre Druck (LVP), der aortale Druck (AOP) und die Herzfrequenz (HR) gemessen und kontrolliert. Die gemessenen Werte wurden mit dem Programm LabChart 7 (Version 7.3.7., ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) aufgezeichnet und grafisch dargestellt. Der Koronarfluss (*coronary flow*, CF) wurde während des gesamten Versuches zu definierten Zeitpunkten manuell gemessen [1].

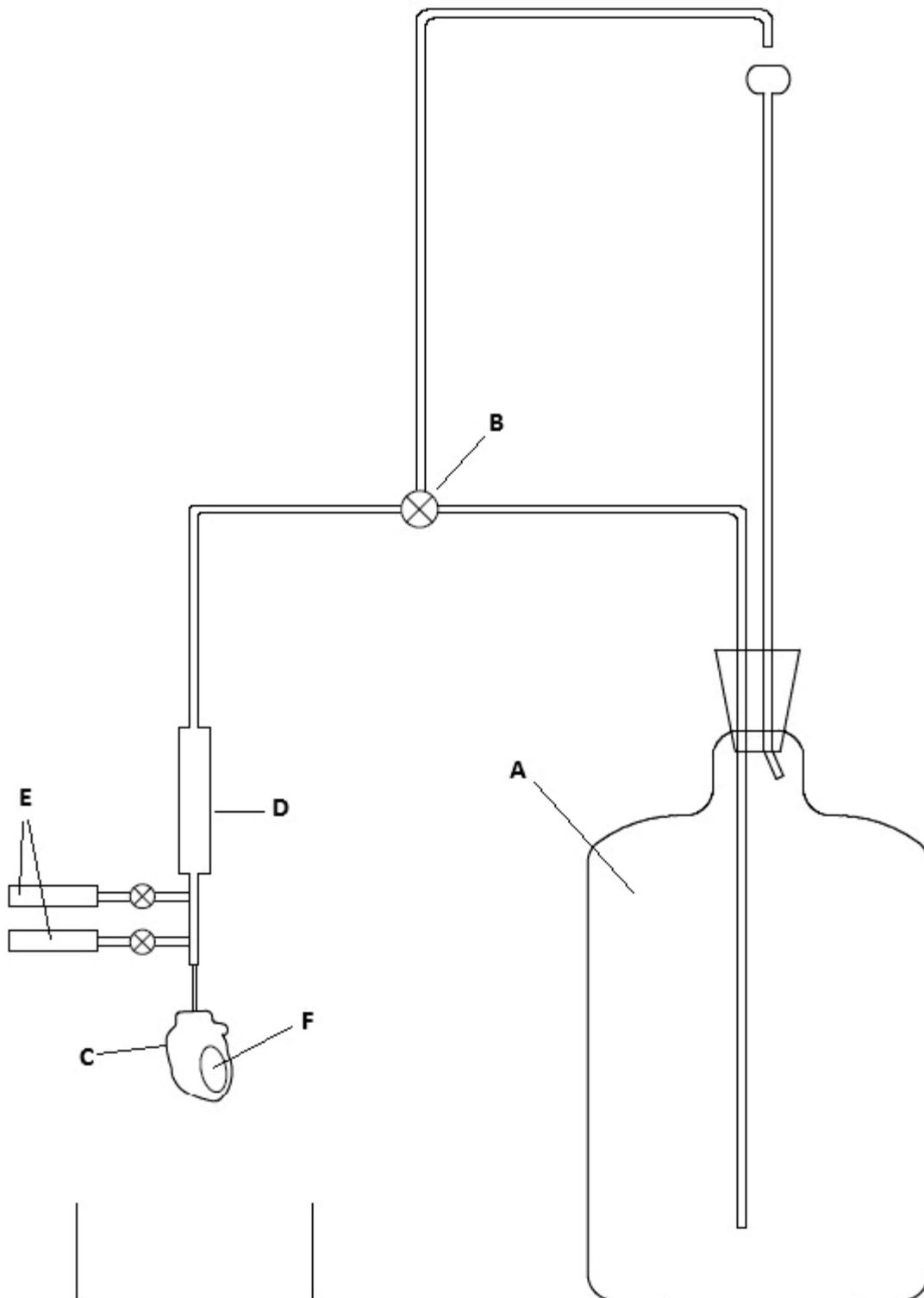


Abbildung 8 **Schematische Darstellung der Langendorff-Präparation.** In dem großen Behältnis (A) befand sich das Perfusat, das durch ein Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde. Eine Pumpe beförderte das Perfusat in die Anlage. Durch einen Dreiwegehahn (B) wurde das System zweigeteilt, in einen oberen, offenen Kreislauf und den das Herz perfundierenden Zulauf. Durch den offenen Kreislauf konnte ein konstanter aortaler Druck von 80 mmHG gewährleistet werden. Vor dem Herzen (C) befand sich der Luftfänger (D). Unmittelbar vor dem Zufluss des Perfusats in das Herz waren die beiden Perfusoren vorgeschaltet (E). Angedeutet ist der Ballon im linken Ventrikel (F). Perfusat, das durch das Herz floss, wurde verworfen. Eigene Abbildung.

2.4.3 Applikation der Testsubstanzen

Die in den Versuchen genutzten Substanzen Sildenafil, Paxillin, KT5823 und DMSO wurden in für diese Studie standardisierten Konzentrationen (s. 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4) appliziert.

Für die Applikation wurden Perfusoren (1. Modell: Perfusor ® Space, Typ 8713030, Fa. B.Braun, Deutschland, 2. Modell: 11Plus CAT, Number 70-2280, Fa. Harvard Apparatus, USA) genutzt, die für die jeweiligen Substanzen so eingestellt wurden, dass die erwünschten Zielkonzentrationen der einzelnen Substanzen am Herzen erreicht werden konnten. Dies musste für jeden Versuch individuell abgestimmt werden, da die Perfusoreinstellung mit dem manuell gemessenen Koronarfluss korrelierte.

Zu Beginn der Applikation der einzelnen Substanzen wurde ein Dreiwegehahn (vgl. Abbildung 8, E) umgelegt und der Perfusor gestartet. Nach zweiminütiger Applikationsdauer wurde der Koronarfluss erneut manuell gemessen, um den Perfusorfluss entsprechend anzugleichen. Dieses Vorgehen wurde alle zwei Minuten wiederholt.

Im Falle der gleichzeitigen Applikation von Sildenafil und Paxillin, respektive KT5823, wurden zwei Perfusoren an zwei unterschiedlichen Dreiwegehähnen an das System angeschlossen.

Nach Beendigung der Applikation wurden die Perfusoren ausgestellt und die Dreiwegehähne wieder umgelegt. Im Anschluss an die Applikation wurde die Ischämiephase induziert.

2.4.4 Induktion der Ischämie

Durch das Umlegen eines weiteren Dreiwegehahns (vgl. Abbildung 8, B) wurde der Perfusatzufluss des Herzens unterbunden und so eine globale Ischämie induziert. Während der Ischämiephase wurde die das Herz umgebende Wärmekammer mit Stickstoff-gesättigtem Perfusat befüllt. Dieses Perfusat wurde in einem separaten Wärmebad auf 38 °C erwärmt und gleichzeitig begast. Während der gesamten Ischämiephase wurde die Stickstoffbegasung aufrechterhalten, um eine Diffusion von Sauerstoff in das Herz von außen zu verhindern. Gleichzeitig verhinderte das Perfusat ein Auskühlen des Herzens. Zum Ende der Ischämiephase wurde die Wärmekammer entleert und der Dreiwegehahn wieder so umgelegt, dass das Herz wieder mit einem aortalen Druck von 80 mmHg mit dem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert wurde.

Zeigte das Herz in den ersten zehn Minuten nach Beginn der Reperfusion keine Aktionen, wurde es durch einen Pacer (ifd, Ingenieurbüro für Datenverarbeitung, Typ TG2/8) mit 28 V Spannung elektrisch defibrilliert (Pulsbreite 2 ms, Pulspause 200 ms). Zeigte es weiterhin keine Aktionen, wurde es regelmäßig alle fünf Minuten erneut defibrilliert, bis eine Herzaktion fortbestand. Es wurden lediglich Herzen in die Studie eingeschlossen, die einen ununterbrochenen Rhythmus von 15 Minuten zu Versuchsende vorwiesen.

2.4.5 Messung der linksventrikulären Herzfunktion

Um die linksventrikuläre Herzfunktion ableiten zu können, wurde ein Ballon über eine Inzision des linken Vorhofes in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser war vollständig mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllt und luftleer. Über einen Dreiwegehahn wurde er durch weitere Befüllung balloniert oder entleert. Die Kompression des Ballons wurde von dem Druckaufnehmer gemessen und softwaregestützt mittels LabChart 7 (Fa. ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) graphisch abgeleitet.

Zu Beginn jedes Versuches wurde über die Füllmenge des Ballons ein enddiastolischer Druck (*left ventricular enddiastolic pressure*, LVEDP in mmHg) im linken Ventrikel von 4-8 mmHg eingestellt [1].

Durch den Ballon wurde der systolische linksventrikuläre Druck (*left ventricular systolic pressure*, LVSP in mmHg), der LVEDP, die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($dP/dt \max$ in mmHg/s), die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($dP/dt \min$ in mmHg/s) und die HR gemessen. Aus diesen Werten wurde der absolut entwickelte linksventrikuläre Druck (*left ventricular developed pressure*, LVDP) abgeleitet durch die Formel

$$LVSP - LVEDP = LVDP$$

und das *rate pressure product* (RPP) durch die Formel

$$HR \cdot LVSP = RPP.$$

Alle Messwerte wurden während des gesamten Versuches kontinuierlich aufgezeichnet und graphisch dargestellt.

2.4.6 Das Versuchsprotokoll

In dieser Studie wurden in zwei Versuchsreihen je vier Gruppen untersucht. In Abbildung 9 und Abbildung 10 ist das Versuchsprotokoll dargestellt. Die Aufteilung der Herzen auf die einzelnen Gruppen erfolgte randomisiert. Der erste

Teil der Arbeit widmete sich der Frage, ob die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion über mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird.

Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt lediglich die Vehikellösung DMSO (Kontrolle, $n = 8$), die zweite wurde nur mit Sildenafil behandelt ($n = 8$), die dritte mit Sildenafil und Paxillin ($n = 8$) und die vierte lediglich mit Paxillin ($n = 8$). Allen gemeinsam sind eine mindestens 20-minütige *baseline*, eine 30-minütige Ischämiephase 25 Minuten nach Beginn des Versuchs und eine 60-minütige Reperfusionphase, die sich der Ischämiephase anschloss. Unterschieden haben sich die einzelnen Gruppen in Dauer und Art der Applikation der einzelnen Substanzen. Aufgrund von Ergebnissen vorangehender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Mindestdauer von 20 min für die *baseline* festgelegt. Die Applikation für Sildenafil und DMSO erfolgte über 10 Minuten. Die *baseline* in diesen beiden Gruppen betrug 25 Minuten. Die Applikation von Paxillin erfolgte über 15 Minuten. Daher betrug die *baseline* in den beiden Paxillin-Interventionsgruppen 20 Minuten [1].

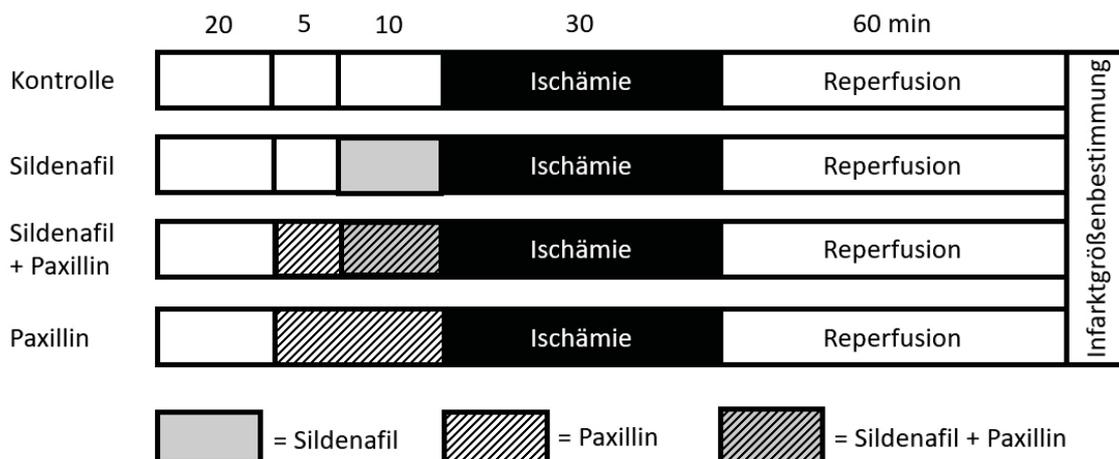


Abbildung 9 **Studienprotokoll der ersten Serie.** Jeder Versuch begann mit einer mindestens 20-minütigen *baseline* (*baseline*). Ihr folgte die Applikationsphase, in der die verschiedenen Substanzen appliziert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt eine 3 %ige DMSO-Lösung für 10 Minuten, die Sildenafilgruppe eine 3 μ M Sildenafillösung für 10 Minuten. Paxillin (1 μ M) wurde für je 15 Minuten appliziert. Daraus resultierte eine um 5 Minuten verlängerte *baseline* in der Kontroll- und Sildenafilgruppe zum Erreichen gleicher Gesamtversuchsdauer. In der Paxillin + Sildenafilgruppe begann die 10-minütige Sildenafilapplikation 5 Minuten nach Beginn der Paxillingabe. In der Paxillingruppe wurde lediglich 1 μ M Paxillin appliziert. Der Präkonditionierungsphase folgte die 30 Minuten andauernde globale Ischämie (Ischämie), der sich eine Reperfusionphase (Reperfusion) für 60 Minuten anschloss. Gemeinsamer Endpunkt aller Versuche war die Bestimmung der Infarktgröße (Infarktgrößenbestimmung). Eigene Abbildung, modifiziert [1].

Nach Beendigung der Applikation der jeweiligen Substanzen erfolgte die Induktion der Ischämie durch eine Unterbrechung der Perfusatzufuhr. Nach einer

Aufrechterhaltung der Ischämie für 30 Minuten wurde das Herz wieder für 60 Minuten reperfundiert. In dieser letzten Phase des Protokolls erfolgten keine weiteren pharmakologischen Interventionen, es wurde lediglich die Erholung des Herzens gemessen und graphisch aufgetragen. Die Gesamtversuchszeit betrug somit 2 Stunden und 5 Minuten.

Nach Auswertung dieser ersten Versuchsreihe ergab sich die Frage, ob die durch Sildenafil hervorgerufene Kardioprotektion direkt mit der Erhöhung von cGMP und damit einer verstärkten Aktivität der PKG zusammenhängt.

Hierzu wurden in einem zweiten Arm der Arbeit separate Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse eine ergänzende Aussage bezüglich der Präkonditionierung durch Sildenafil treffen. Das Versuchsprotokoll glich dabei weitestgehend dem in Abbildung 9 dargestellten Protokoll (genaues Protokoll vergleiche Abbildung 10), es wurde lediglich das Paxillin durch KT5823, einen spezifischen Blocker der PKG, ersetzt [1].

In vier Versuchsgruppen wurden randomisiert je acht Rattenherzen zugeteilt und untersucht. Die erste Gruppe galt als Kontrollgruppe und erhielt lediglich die Vehikellösung DMSO. Gruppe 2 wurde analog zum obigen Protokoll mit Sildenafil behandelt. In der dritten Gruppe wurden 5 Minuten vor der Gabe von Sildenafil 1 μ M KT5823 appliziert. Gruppe 4 erhielt lediglich 1 μ M KT5823 über 15 Minuten, um einen etwaigen alleinigen Effekt des PKG-Blockers zu prüfen [1].

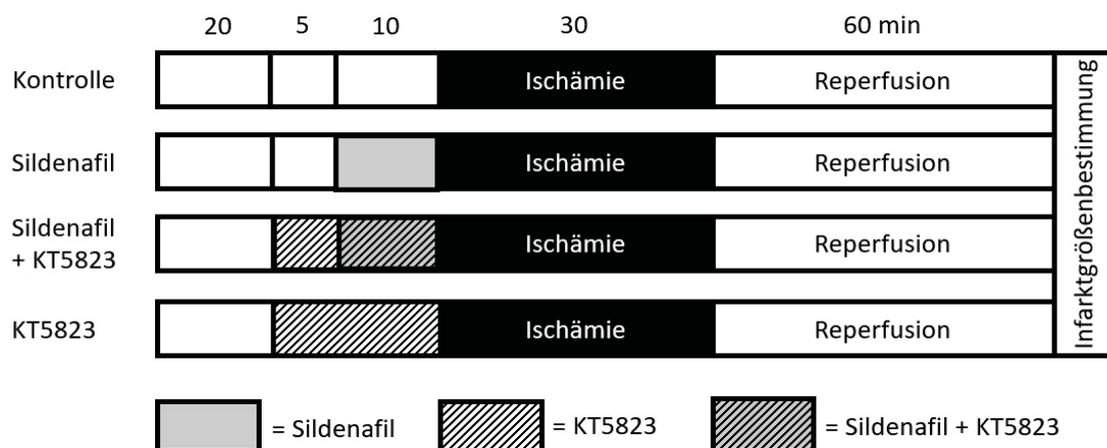


Abbildung 10 **Versuchsprotokoll der zweiten Serie.** Dargestellt ist das Versuchsprotokoll des weiterführenden Studienarmes mit der Fragestellung, ob die Sildenafil-induzierte Präkonditionierung cGMP-abhängig ist und über die PKG weitergeleitet wird. Es erfolgte zunächst eine 20-minütige *baseline*, der sich die Applikationsphase anschloss. Die Kontrollgruppe erhielt eine 10-minütige Applikation der Trägerlösung DMSO, die Sildenafil-Gruppe eine 10-minütige Applikation von 3 μ M Sildenafillösung. Zum spezifischen Blocken der PKG wurde die Substanz KT5823 eingesetzt. Diese wurde in der KT+Sildenafilgruppe in einer Konzentration von 1 μ M

5 Minuten vor der Applikation von Sildenafil appliziert und für die Laufzeit des Sildenafils weitergegeben. Die letzte Gruppe erhielt ausschließlich 1 μ M KT5823 für 15 Minuten. Der Präkonditionierungsphase folgte die 30 Minuten andauernde globale Ischämie (Ischämie), der sich eine Reperfusionphase (Reperfusion) für 60 Minuten anschloss. Gemeinsamer Endpunkt aller Versuche war die Bestimmung der Infarktgröße (Infarktgrößenbestimmung). Eigene Abbildung, modifiziert [1].

In einer Subanalyse wurde zusätzlich in je sechs Rattenherzen der Kontroll- und der Sildenafilgruppe die myokardiale cGMP-Konzentration gemessen. Zeitpunkt der Messung war direkt nach der Beendigung der Sildenafilapplikation. Im Falle der Kontrollherzen ohne Applikation fand die Messung direkt vor Eintritt in die Ischämie statt. Die Konzentration wurde mittels ELISA gemessen [110] (inhaltlich übernommen aus [1]).

2.4.7 Bestimmung der Infarktgröße durch TTC-Färbung

Nach Beendigung des Versuches wurden die Herzen an ihrer Basis von der Langendorffanlage abgeschnitten und bei -80 °C eingefroren. Zur Färbung wurden sie in tiefgefrorenem Zustand in 1-2 mm dicke Scheiben geschnitten (siehe Abbildung 11). Anschließend wurden diese Scheiben in einer 0,75 %igen Tetraphenyltetrazoliumchlorid-Färbelösung (TTC) eingetaucht und bei 38 °C für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. TTC färbt NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) der vitalen Zellen aufgrund seines Reduktionspotenzials rot. Nicht vitale Zellen, die kein NADPH mehr enthalten, werden entsprechend nicht angefärbt und bleiben farblos.

Im Anschluss an die 15-minütige Inkubation wurden die Scheiben für vier Stunden in einer 4 %igen Formaldehydlösung zur Fixation eingetaucht. Danach wurden die einzelnen Scheiben eingescannt und die Infarktgrößen mit Hilfe des Programmes SigmaScan Pro 5 (SPSS Science Software, Chicago, IL, USA) eingezeichnet. Hierzu wurde mit der Software das avitale Gewebe (siehe Abbildung 11) des zu messenden Risikogebietes des linken Ventrikels umfahren, um die Gesamtfläche des Infarktes zu objektivieren. Dies wurde ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtfläche des Risikogebietes. Die Auswertung erfolgte

verblindet. Die Infarktgröße wird angegeben in Prozent des Risikoareals (*area at risk*, AAR).



Abbildung 11 **Gefärbte und fixierte Herzschnitte**. Noch vitales Gewebe stellt sich rot dar, nicht vitales ist ungefärbt und stellt sich daher weiß dar.

2.5 Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der cGMP-Konzentration erfolgte mittels ELISA (Enzo Life sciences, Famingdale, New York, USA). Die Sensitivität wird durch den Hersteller mit 0,059 pmol/ml, etwaige Kreuzreaktionen mit einer Wahrscheinlichkeit < 0,001 % angegeben [110].

Die Grundlage dieses Tests ist der sogenannte kompetitive ELISA. Hierfür wird eine 96-Well-Mikrotirierplatte mit einem GxR-IgG-Antikörper (*Goat-anti-Rabbit*, AK1) beschichtet. Zu diesen Platten wird das zu untersuchende cGMP (*sample*), eine cGMP-Lösung, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (*antigen conjugate*, Konjugat), und cGMP-spezifische Antikörper (AK2) gegeben. Das cGMP konkurriert nun um die Bindungsstellen der jeweiligen Antikörper mit dem Konjugat. In mehreren standardisierten Waschkvorgängen werden überschüssige Antikörper und unspezifische Bindungen nach entsprechender Inkubationszeit entfernt.

Zum Abschluss wird eine Substratlösung, bestehend aus p-Nitrophenyl Phosphat, hinzugegeben, die zu einer Farbreaktion durch die alkalische Phosphatase führt (vergleiche Abbildung 12). Anhand dieser kann man mittels Photometer bei 405 nm Lichtwellenlänge die Farbintensität messen, die indirekt proportional zur Menge des tatsächlich vorhandenen cGMP ist. Durch den Vergleich der optischen Dichte mit einer Standardkurve kann die cGMP-Konzentration jeder einzelnen Probe ermittelt werden.

Zur Normierung der cGMP-Konzentration auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe wurde die Proteinmessung nach Pierce angewandt (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

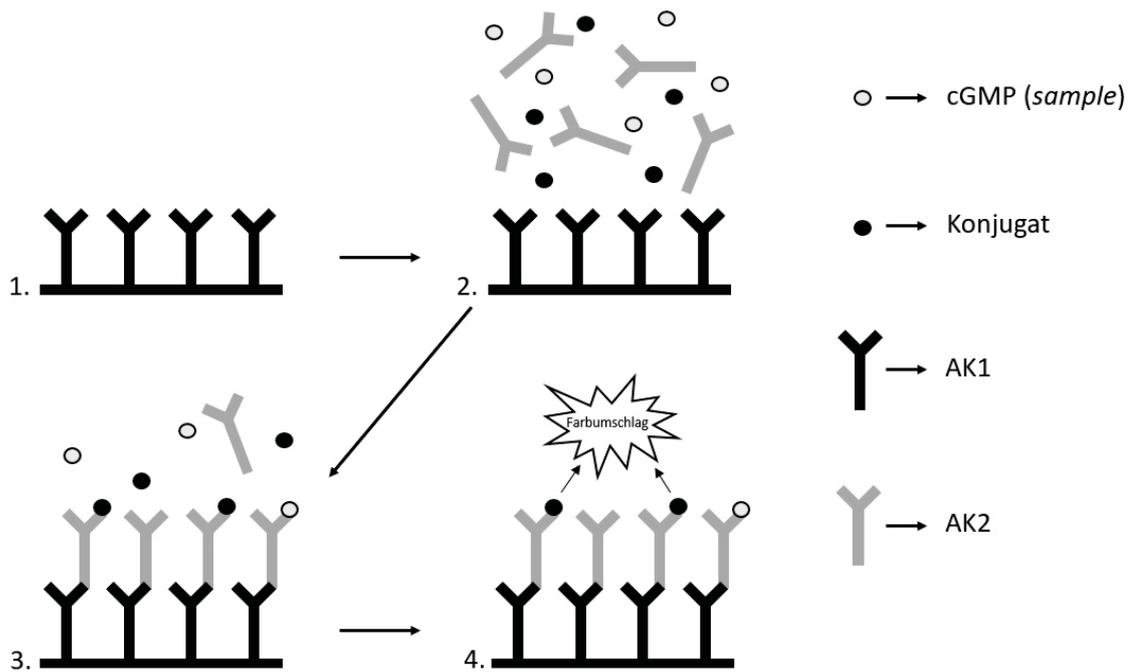


Abbildung 12 **Schematische Abbildung des ELISA-Messprinzips.** Dargestellt sind die Arbeitsschritte des kompetitiven ELISA. Dem auf dem Well befindlichen Antikörper (AK1) wird die Probe, ein Konjugat (cGMP konjugiert mit einem Enzym mit alkalischer Phosphatase-Aktivität) und weitere Antikörper (AK2) hinzugegeben. Das in den Proben enthaltene cGMP und das Konjugat konkurrieren um die Bindung mit dem AK2, dieser wiederum bindet an AK1. Nach Beifügen der Substratlösung tritt durch das Enzym am Konjugat ein Farbumschlag ein. Eigene Abbildung.

2.6 Datenverarbeitung

Die Versuche wurden kontinuierlich im Versuchsablauf mit der Software LabChart 7.3.7® (Fa. ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) aufgezeichnet und überwacht. Mittels LabChart Reader® (Fa. ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) wurden die Aufzeichnungen ausgelesen und relevante Messpunkte sowie manuell bestimmte Parameter per Microsoft Excel® (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) zusammengefasst. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad PRISM 6 ® (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA).

2.7 Hämodynamische Auswertung

Zu definierten Zeitpunkten (während der *baseline*, der Präkonditionierung und der Reperfusion nach 30 und 60 Minuten) wurden während des Versuchsablaufes hämodynamische Daten erhoben. Zur Auswertung herangezogen wurden dabei der LVEDP, die HR, das RPP und der CF. Mittels Microsoft Excel® (Fa. Microsoft Corporation, USA) wurden die Werte tabellarisch

zusammengetragen und zusammengefasst. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurde jeweils der Mittelwert der gesamten Gruppe bestimmt und mit den jeweiligen Werten der anderen Gruppen verglichen.

2.7.1 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist der artifiziell bei jedem Versuch in einem bestimmten Bereich (4-8 mmHg) eingestellte Ausgangswert. Vor Induktion der Ischämie bleibt er konstant, durch Kalziumausschüttung während der Ischämie und darauffolgende Hyperkontraktur steigt er im Verlauf der Versuche an und kann somit indirekt einen Hinweis auf das Ausmaß des geschädigten Areals geben.

2.7.2 Herzfrequenz (HR)

Die Herzfrequenz wurde aufgezeichnet in Schlägen pro Minute (*beats per minute*, bpm).

2.7.3 Rate pressure product (RPP)

Das RPP ist ein Maß für die Arbeit, die das Herz leisten muss, um zu schlagen. Damit stellt es ein indirektes Maß für den Energieverbrauch und die hämodynamische Antwort des Herzens dar. Laut Formel (s. S. 28) wird es gebildet aus der HR und dem LVSP.

2.7.4 Koronarfluss (CF)

Der CF ist der einzige in den Versuchen manuell bestimmte Wert. Der Koronarfluss steht durch einen konstanten Perfusionsdruck in direktem Zusammenhang mit dem Gefäßwiderstand. Somit stellt er einen direkten Messwert für den koronaren Widerstand dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des CF der durch das Herz ausgeworfene Krebs-Henseleit-Puffer für einen festgelegten Zeitraum von 15 Sekunden in einem geeichten Gefäß aufgefangen und in ml/min angegeben.

2.8 Statistische Auswertung

Mittels GraphPad StateMate™ Version 1.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) wurde eine Gruppengröße von $n = 8$ bestimmt, um einen Unterschied der Infarktgröße von 25 % mit 80 %iger Sicherheit bei einem $\alpha < 0,05$ zu erkennen. Die Schätzungen des mittleren Unterschiedes von 25 % bei einer

Standardabweichung von 15 % basiert auf vorangegangenen eigenen Versuchen [111] [1].

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Science Software, Version 12.0.1 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) erfolgte zum Vergleich der Infarktgrößen. Bei Signifikanzen wurde der Student Newman-Keuls post hoc test verwendet [1].

Hämodynamische Parameter wurden in einer zweifachen ANOVA, gefolgt vom Tukey's post hoc test verglichen [1].

Die Daten werden beschrieben als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD). Als Signifikanzniveau wurden 5 % angenommen ($p < 0,05$) [1].

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der ersten Serie: Sildenafil und Paxillin

3.1.1 Infarktgrößenauswertung

Die Infarktgröße (siehe Abbildung 13) wird angegeben als prozentualer Anteil des Risikogebiets und betrug in der Kontrollgruppe $52 \% \pm 8 \%$. Durch die Applikation von Sildenafil wurde die Infarktgröße deutlich auf $35 \% \pm 6 \%$ gesenkt ($p < 0,05$ versus Kontrollgruppe). Die Kombination von Paxillin mit Sildenafil führte, verglichen mit der Sildenafil-Gruppe, erneut zu einem Anstieg der Infarktgröße ($50 \% \pm 7 \%$, $p < 0,05$ versus Sildenafilgruppe). Die alleinige Gabe von Paxillin hatte keine Auswirkung auf die Infarktgröße ($50 \% \pm 8 \%$, $p > 0,05$ versus Kontrollgruppe) [1].

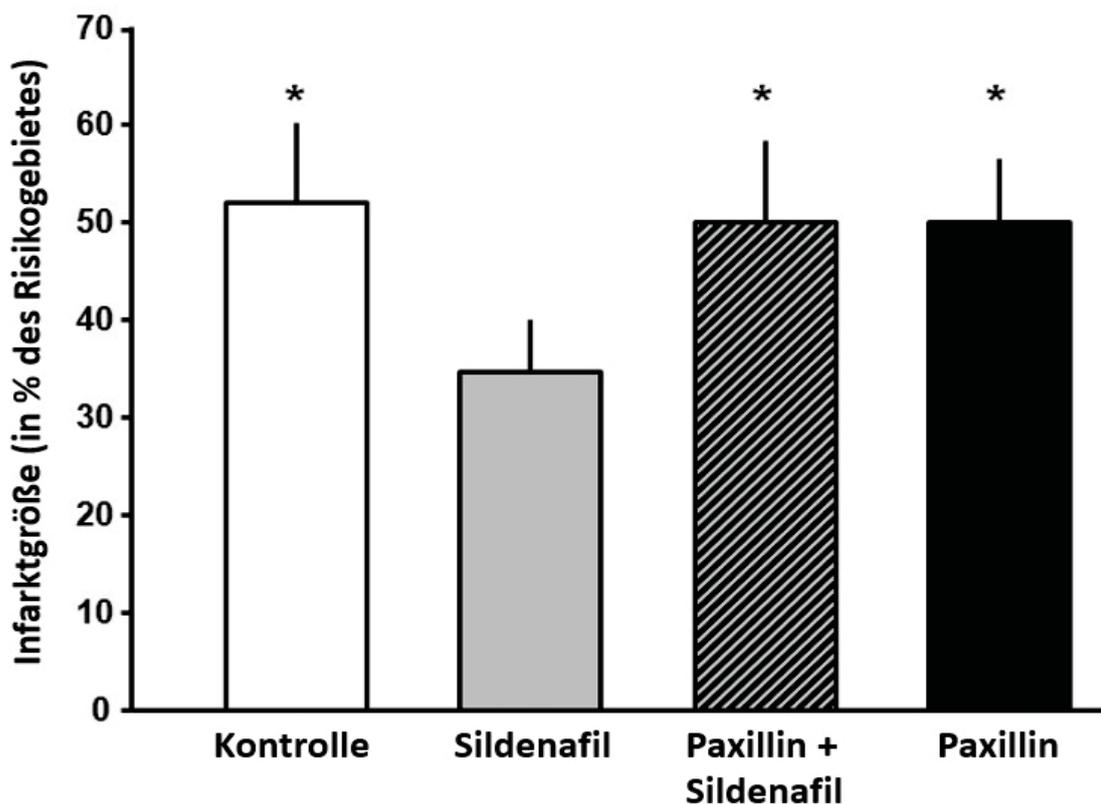


Abbildung 13 **Infarktgrößen**. Dargestellt sind die Infarktgrößen bezogen auf das Risikogebiet der pharmakologisch unbehandelten Kontrollherzen (Kontrolle), der Herzen, die eine Sildenafilapplikation (Sildenafil, $3 \mu\text{M}$) mit oder ohne dem mBK_{Ca} -Kanalblocker Paxillin (Paxillin, $1 \mu\text{M}$) erhielten, sowohl der Herzen, die nur Paxillin erhielten. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Alle Gruppen $n = 8$. * = $p < 0,05$ versus Sildenafil. Eigene Abbildung [1].

3.1.2 Kardiale Funktion

Wie in Tabelle 5, S. 44 zusammengefasst, gab es zwischen den vier Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die HR, das RPP, den LVEDP und den CF.

Während der gesamten Dauer des Experimentes zeigten sich keine Schwankungen in der Herzfrequenz, während allerdings der LVEDP in der Reperusionsperiode in allen Versuchsgruppen anstieg ($p < 0,05$ versus *baseline*). Im Gegensatz dazu sanken der CF und das RPP während der Reperusionsphase signifikant (alle Gruppen: $p < 0,05$ versus *baseline*). Ein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen konnte nicht gezeigt werden. Ebenso hatte die Präkonditionierung keinen signifikant nachweisbaren Einfluss auf die kardiale Funktion, da sich hier kein Anhalt für eine Änderung der Messwerte im Vergleich zur Messung in der *baseline* ergab [1].

3.1.2.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz unterlag an den vier Messpunkten nach der *Baseline*, nach der Applikation, 30 Minuten nach Reperusionsbeginn und zum Ende des Versuches keiner statistisch nachweisbaren Änderung (siehe Abbildung 14). Sowohl die Applikation von DMSO in der Kontrollgruppe, noch die von 3 μM Sildenafil, als auch die Applikation von 1 μM Paxillin und die Kombination beider führten nicht zu einer Veränderung der Herzfrequenz. Auch zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

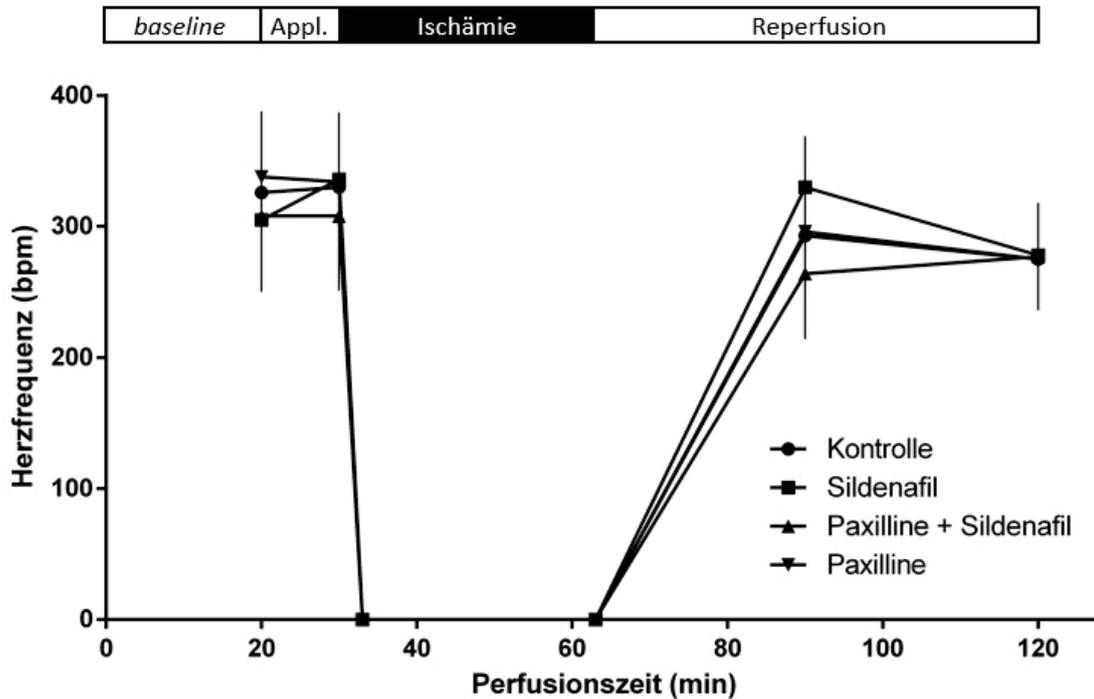


Abbildung 14 **Herzfrequenz**. Über den gesamten Versuchsverlauf war keine signifikante Änderung der Herzfrequenz erkennbar. Bpm = *beats per minute*, Appl. = Applikation der Testsubstanzen. n = 8/Gruppe. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Eigene Abbildung.

3.1.2.2 Rate Pressure Product

Das RPP verminderte sich im Vergleich zur *baseline* statistisch signifikant nach der globalen Ischämie in der Reperusionsphase ($p < 0,05$ versus *baseline*, siehe Abbildung 15) in allen Versuchsgruppen gleichermaßen. In der Kontrollgruppe fiel das RPP hierbei nach 30-minütiger Reperfusion auf $18,6 \% \pm 11,3 \%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur *baseline*-Messung. Nach 60-minütiger Reperfusion zeigte das RPP keine Änderung ($22,3 \% \pm 7,9 \%$, $p < 0,05$ vs. *baseline*, nicht signifikant versus der ersten Messung in der Reperusionsphase nach 30 Minuten (Rep30)). In der Sildenafilgruppe fiel das RPP nach der Ischämie auf $20,1 \% \pm 12,1 \%$ ($p < 0,05$ versus *baseline*) Bis zum Versuchsende zeigte es ebenfalls keine statistisch signifikante Änderung ($23,1 \% \pm 6,6 \%$, $p < 0,05$ versus *baseline*, $p > 0,05$ versus Rep30) bezüglich des Ausgangswertes der *baseline*.

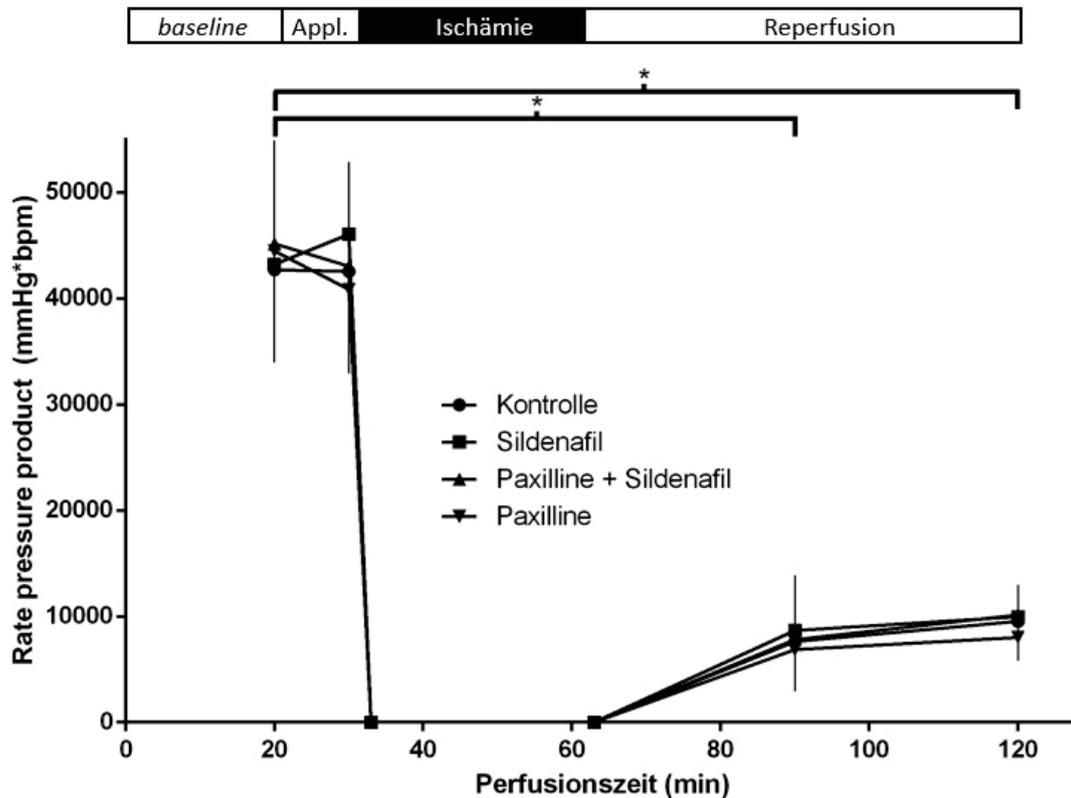


Abbildung 15 **Rate pressure product**. Das rate pressure product fiel in allen Versuchsgruppen im Laufe der Versuche gleichermaßen signifikant ab. Appl. =Applikation der Testsubstanzen. n = 8 / Gruppe. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $p < 0,05$ versus *baseline*. Eigene Abbildung.

In der Paxillin + Sildenafilgruppe fiel der Wert nach 30 Minuten auf $17,3 \% \pm 10,8 \%$ ($p < 0,05$ vs. *baseline*), nach 60 Minuten betrug das RPP $22,4 \% \pm 6,3 \%$ ($p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). Auch die Paxillingruppe zeigte ähnliche Muster mit einem Abfall auf $15,4 \% \pm 5,3 \%$ ($p < 0,05$ versus *baseline*) 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion und $18 \% \pm 4,9 \%$ nach 60 Minuten ($p < 0,05$ vs *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden nicht statistisch signifikant gezeigt.

3.1.2.3 *Left ventricular enddiastolic pressure*

Der LVEDP verhielt sich dem RPP gegensätzlich. In der *baseline* und der Präkonditionierungsphase zeigten sich noch keine statistisch signifikanten Schwankungen, nach der globalen 30-minütigen Ischämie wurde jedoch in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg des LVEDP im Vergleich zur *baseline*

nachgewiesen. Auch nach 60-minütiger Reperfusion war das RPP im Vergleich zur *baseline* signifikant erhöht (siehe Abbildung 16).

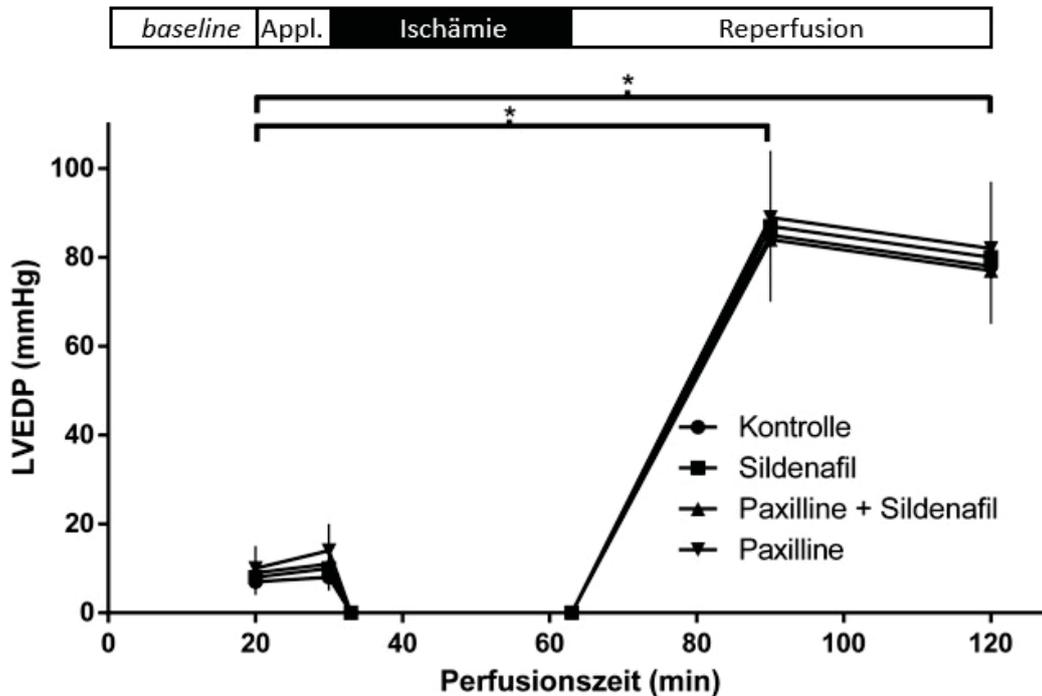


Abbildung 16 **Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)**. In der Präkonditionierungsphase ergab sich noch keine statistische Änderung des LVEDP, in der Reperfusionsphase nach der 30-minütigen globalen Ischämie war jedoch ein deutlicher signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Appl. = Applikation der Testsubstanzen. n = 8 / Gruppe. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. * = p < 0,05 versus *baseline*. Eigene Abbildung.

In der Kontrollgruppe stieg der LVEDP von 7 ± 3 mmHg auf 85 ± 15 mmHg ($p < 0,05$ vs. *baseline*), nach 60 Minuten zeigte sich keine Änderung (78 ± 13 mmHg, $p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). In der Sildenafilgruppe stieg der LVEDP von 8 ± 1 mmHg auf 87 ± 13 mmHg in der ersten Messung der Reperfusionsphase an ($p < 0,05$ versus *baseline*). Nach 60-minütiger Reperfusion betrug der LVEDP 80 ± 11 mmHg ($p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). In der Paxillin + Sildenafilgruppe zeigte sich ein Anstieg von einem Ausgangswert von 9 ± 4 mmHg auf 84 ± 8 mmHg ($p < 0,05$ vs. *baseline*). Nach 60 Minuten betrug der LVEDP 77 ± 10 mmHg ($p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). In der Paxillingruppe zeigte sich ein gleiches Bild, zunächst betrug der LVEDP 10 ± 5 mmHg, um dann auf 89 ± 15 mmHg ($p < 0,05$ vs. *baseline*) und sich bis zum Versuchsende nicht mehr signifikant zu ändern

(82 ± 15 mmHg, $p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). Es gab dabei keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.1.2.4 Koronarfluss

In Abbildung 17 ist die koronare Herzdurchblutung grafisch dargestellt. Nach der 30-minütigen globalen Ischämie war der Koronarfluss in allen Gruppen gleichermaßen gegenüber der *baseline* erniedrigt. Im weiteren Verlauf der Reperfusion zeigte sich keine weitere signifikante Änderung des Koronarflusses.

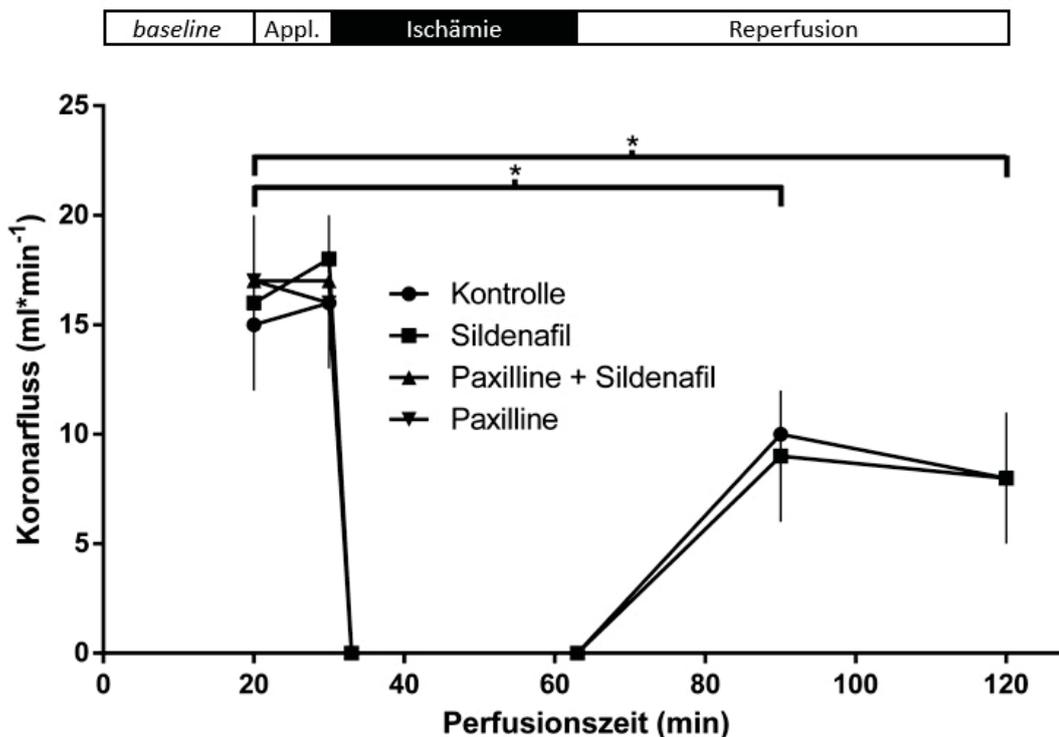


Abbildung 17 **Koronarfluss**. Durch die Präkonditionierung ändert sich der Koronarfluss noch nicht signifikant. Nach 30-minütiger Reperfusion ist er jedoch deutlich abgefallen und erholt sich auch im weiteren Verlauf nicht mehr. Appl. =Applikation der Testsubstanzen. n = 8 / Gruppe. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $p < 0,05$ versus *baseline*. Eigene Abbildung.

In der Kontrollgruppe fiel der CF 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion auf $62,9 \% \pm 14,3 \%$ ($p < 0,05$ vs. *baseline*). Nach 60 Minuten zeigte sich keine weitere Änderung des CF im Vergleich zur vorherigen Messung ($54,3 \% \pm 11,4 \%$ im Vergleich zur *baseline*, $p < 0,05$, $p > 0,05$ vs. Rep30). In der Sildenafilgruppe war ein Abfall des CF auf $56,25 \% \pm 18,75 \%$ des Ausgangswertes der *baseline* nachweisbar ($p < 0,05$ vs. *baseline*). Zu Versuchsende erholt sich der CF ebenfalls nicht und fällt im Vergleich zur ersten

Reperfusionsmessung auch nicht weiter ab ($50 \% \pm 18,75 \%$, $p < 0,05$ versus *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30,). Die Paxillin + Sildenafilgruppe bot das gleiche Bild: nach 30 Minuten betrug der CF im Vergleich zur *baseline* $44,7 \% \pm 19,3 \%$ ($p < 0,05$ vs. *baseline*), nach 60 Minuten $44,7 \% \pm 4,4 \%$ ($p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). Auch in der Paxillingruppe änderte sich dieses Schema nicht ($54,5 \% \pm 9,8 \%$ vs. *baseline* nach 30 Minuten, $p < 0,05$, und $47,3 \pm 7,1 \%$ nach 60 Minuten, $p < 0,05$ vs. *baseline*, $p > 0,05$ vs. Rep30). Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 Tier- und Herzcharakteristika

Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Körpergewichts der Ratten oder der Herzgewichte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. (siehe Tabelle 4, S. 43) [1].

Auch die Zeitpunkte der maximalen ischämischen Kontraktur, die durch einen Calciumausstrom aus infarzierten Zellen während der Ischämie zustande kommt, unterschieden sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht. Der maximale kontraktile Anstieg innerhalb der Ischämie wurde nach 15 ± 1 min verzeichnet. Lediglich in der Paxillin + Sildenafilgruppe wurde das Maximum nach 16 ± 1 min erreicht. Die Höhe der maximalen Kontraktur schwankte hierbei zwischen im Mittel 59 ± 9 mmHg in der Sildenafilgruppe und 66 ± 18 mmHg in der Paxillingruppe (siehe Tabelle 4, S. 43).

Im Mittel betrug die Zeit von Dekapitation bis zum Anschluss des Herzens und dem Start der retrograden Reperfusion 80 ± 12 Sekunden.

Tabelle 4 **Übersicht der Tier- und Herzgewichte sowie der Zeitpunkte und Höhen der maximalen ischämischen Kontraktionen der ersten Serie.** Das Körpergewicht der Versuchstiere unterschied sich zwischen den vier verschiedenen Versuchsgruppen nicht signifikant. Gleich verhielt sich das Gewicht der getrockneten Herzen. Die Zeitpunkte und Höhen der maximalen ischämischen Kontraktionen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Eigene Tabelle, modifiziert [1].

	n	Körpergewicht (g)	Herzgewicht trocken (g)	Zeitpunkt der maximalen ischämischen Kontraktur (min)	Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur (mmHg)
Kontrolle	8	279 \pm 22	0,14 \pm 0,02	15 \pm 1	66 \pm 12
Sildenafil	8	284 \pm 23	0,15 \pm 0,02	15 \pm 1	59 \pm 9
Paxillin + Sildenafil	8	285 \pm 19	0,15 \pm 0,01	16 \pm 1	60 \pm 11
Paxillin	8	287 \pm 29	0,15 \pm 0,01	15 \pm 1	66 \pm 18

Tabelle 5 **Hämodynamische Werte der ersten Serie.** Die Herzfrequenz zeigte im gesamten Verlauf der Versuche keine signifikante Änderung zwischen den Versuchsgruppen. Das RPP (*rate pressure product*) fiel innerhalb des Versuches nach der Ischämie in der Reperfusionphase in allen Gruppen signifikant ab im Vergleich zur *baseline*. Zwischen den vier Gruppen zeigten sich dabei keine Signifikanzen. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck stieg während der Reperfusionphase in allen Gruppen signifikant an im Vergleich zur *baseline*. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigten sich keine Signifikanzen. Der Koronarfluss fiel in der Reperfusionphase signifikant ab. Diese Beobachtung wurde in allen Gruppen gemacht. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab es nicht. Appl. = Applikation der Testsubstanzen; RPP = *rate pressure product*; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $p < 0,05$ versus *baseline*. Eigene Tabelle, modifiziert [1].

	<i>baseline</i>	Appl.	Reperfusion	
			30	60
<i>Herzfrequenz (bpm)</i>				
Kontrolle	326 \pm 29	330 \pm 43	296 \pm 36	275 \pm 24
Sildenafil	305 \pm 28	336 \pm 20	330 \pm 39	278 \pm 26
Paxillin + Sildenafil	308 \pm 58	305 \pm 57	264 \pm 50	277 \pm 41
Paxillin	338 \pm 50	334 \pm 53	296 \pm 50	275 \pm 37
<i>RPP (mmHg*bpm)</i>				
Kontrolle	42704 \pm 6340	42845 \pm 8826	7940 \pm 4844*	9544 \pm 3368*
Sildenafil	43200 \pm 9234	46046 \pm 6831	8662 \pm 5223*	9972 \pm 2840*
Paxillin + Sildenafil	45168 \pm 9736	43034 \pm 8034	7817 \pm 4875*	10135 \pm 2852*
Paxillin	44487 \pm 6362	40588 \pm 7904	6873 \pm 2347*	8018 \pm 2185*
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Kontrolle	7 \pm 3	8 \pm 3	85 \pm 15*	78 \pm 13*
Sildenafil	8 \pm 1	10 \pm 1	87 \pm 13*	80 \pm 11*
Paxillin + Sildenafil	9 \pm 4	11 \pm 3	84 \pm 8*	77 \pm 10*
Paxillin	10 \pm 5	14 \pm 6	89 \pm 15*	82 \pm 15*
<i>Koronarfluss (ml*min⁻¹/g Trockenherzgewicht)</i>				
Kontrolle	105 \pm 15	113 \pm 17	66 \pm 15*	57 \pm 12*
Sildenafil	107 \pm 10	117 \pm 9	60 \pm 15*	55 \pm 17*
Paxillin + Sildenafil	114 \pm 16	114 \pm 19	51 \pm 22*	51 \pm 5*
Paxillin	112 \pm 13	103 \pm 13	61 \pm 11*	53 \pm 8*

3.2 Ergebnisse der zweiten Serie: Sildenafil und KT5823

3.2.1 Infarktgrößenauswertung

Die Infarktgröße der Kontrollgruppe betrug 44 ± 7 %. Sildenafil reduzierte die Infarktgröße auf 26 ± 7 % ($p < 0,05$ versus Kontrolle). Dieser Effekt wurde durch KT5823 komplett aufgehoben (Infarktgröße 45 ± 8 %, $p < 0,05$ versus Sildenafil). Die alleinige Gabe von KT5823 zeigte keinen Effekt auf die Infarktgröße (46 ± 4 % versus Sildenafil) (Abbildung 18) [1].

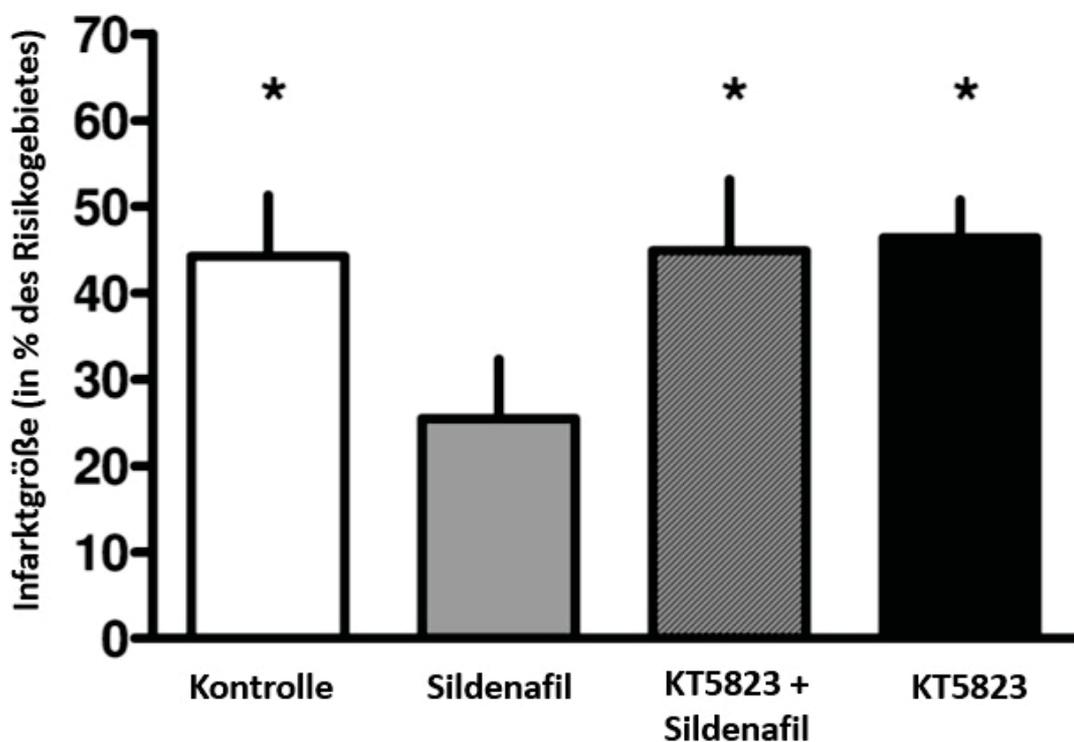


Abbildung 18 **Infarktgrößen des zweiten Studienteils**. Dargestellt sind die Infarktgrößen bezogen auf das Risikogebiet der pharmakologisch unbehandelten Kontrollherzen, der Herzen, die eine Sildenafilapplikation ($3 \mu\text{M}$) mit oder ohne dem PKG-Inhibitor KT5823 ($1 \mu\text{M}$) erhielten, sowohl der Herzen, die nur KT5823 erhielten ($1 \mu\text{M}$). Alle Gruppen $n = 8$. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung * = $p < 0,05$ vs. Sildenafil. Eigene Abbildung, modifiziert [1].

3.2.2 Kardiale Funktion

Es gab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, was das RPP, den LVEDP oder den CF angeht. Einzig in der HR zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung des Herzschlages in der Reperfusionphase sowie in der KT5823 + Sildenafilgruppe

eine signifikante Erniedrigung der HR zu Beginn der Reperfusion, die sich danach wieder erholte. Wie im ersten Versuchsteil stieg auch im zweiten Versuchsteil der LVEDP in allen Gruppen in der Reperusionsphase signifikant an, während der CF und das RPP einen signifikanten Abfall zeigten (vergleiche Tabelle 6) [1].

3.2.3 Tier- und Herzcharakteristika

Es gab keine Unterschiede bezüglich des Körpergewichts, des Herztrockengewichts, dem Zeitpunkt und der Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur (Tabelle 7) [1].

Tabelle 6 **Hämodynamische Werte der zweiten Serie.** Die Herzfrequenz zeigte in der Kontrollgruppe einen signifikanten Abfall in der Reperfusionphase. Auch in der KT5823 + Sildenafilgruppe zeigte sich zu Beginn der Reperfusion ein signifikanter Abfall, der sich zum Ende wieder erholte. Bei den übrigen Messwerten zeigte sich keine Signifikanz. Das RPP (*rate pressure product*) fiel innerhalb des Versuches nach der Ischämie in der Reperfusionphase in allen Gruppen signifikant ab im Vergleich zur *baseline*. Zwischen den vier Gruppen zeigten sich dabei keine Signifikanzen. Der LVEDP stieg während der Reperfusionphase in allen Gruppen signifikant an im Vergleich zur *baseline*. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigten sich keine Signifikanzen. Der Koronarfluss fiel in allen Gruppen in der Reperfusionphase signifikant ab. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gab es nicht. Appl. = Applikation der Testsubstanzen; RPP = *rate pressure product*; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $p < 0,05$ versus *baseline*. Eigene Tabelle, modifiziert [1].

	<i>baseline</i>	Appl.	Reperfusion	
			30	60
<i>Herzfrequenz (bpm)</i>				
Kontrolle	334 \pm 37	316 \pm 36	238 \pm 43*	249 \pm 41*
Sildenafil	295 \pm 40	305 \pm 43	226 \pm 117	244 \pm 39
KT5823 + Sildenafil	313 \pm 57	306 \pm 54	198 \pm 109*	252 \pm 56
KT5823	317 \pm 32	298 \pm 26	287 \pm 48	256 \pm 34
<i>RPP (mmHg*bpm)</i>				
Kontrolle	38004 \pm 6029	35803 \pm 6717	6021 \pm 3845*	7840 \pm 3220*
Sildenafil	34296 \pm 4887	35525 \pm 4167	4036 \pm 2255*	5964 \pm 2297*
KT5823 + Sildenafil	36038 \pm 6829	32697 \pm 4745	6403 \pm 5231*	6076 \pm 2809*
KT5823	37895 \pm 6834	33894 \pm 3521	6300 \pm 4834*	6736 \pm 3338*
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Kontrolle	4 \pm 2	5 \pm 4	72 \pm 12*	66 \pm 9*
Sildenafil	5 \pm 2	7 \pm 3	70 \pm 9*	64 \pm 8*
KT5823 + Sildenafil	4 \pm 2	6 \pm 3	64 \pm 12*	60 \pm 9*
KT5823	4 \pm 2	6 \pm 3	77 \pm 10*	70 \pm 8*
<i>Koronarfluss (ml*min⁻¹/g Trockenherzgewicht)</i>				
Kontrolle	101 \pm 15	100 \pm 14	59 \pm 5*	56 \pm 3*
Sildenafil	95 \pm 22	100 \pm 21	66 \pm 15*	59 \pm 13*
KT5823 + Sildenafil	100 \pm 21	100 \pm 21	61 \pm 11*	57 \pm 14*
KT5823	92 \pm 20	89 \pm 23	62 \pm 6*	59 \pm 7*

Tabelle 7 **Tier- und Herzcharakteristika der zweiten Versuchsreihe.** Das Körpergewicht, das Herztrockengewicht, der Zeitpunkt der maximalen ischämischen Kontraktur sowie die Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur unterschieden sich nicht signifikant. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Eigene Tabelle, modifiziert [1].

	n	Körpergewicht (g)	Herztrockengewicht (g)	Zeitpunkt der maximalen ischämischen Kontraktur (min)	Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur (mmHg)
Kontrolle	8	270 \pm 16	0,16 \pm 0,01	15 \pm 1	48 \pm 14
Sildenafil	8	291 \pm 21	0,16 \pm 0,02	15 \pm 2	50 \pm 6
KT5823 + Sildenafil	8	295 \pm 32	0,16 \pm 0,02	15 \pm 2	46 \pm 12
KT5823	8	264 \pm 19	0,16 \pm 0,01	16 \pm 1	47 \pm 9

3.3 Ergebnisse der cGMP-Konzentrationsmessung

Durch die Applikation von Sildenafil stieg die Konzentration des cGMP im Vergleich zu den lediglich mit DMSO behandelten Kontrollherzen signifikant an. Im Mittelwert betrug die Konzentration des cGMP der Kontrollherzen 0,056 pmol/mg Protein. Nach Applikation des Sildenafil stieg die Konzentration signifikant auf 0,101 pmol cGMP/mg Protein an ($p < 0,05$, vergleiche Abbildung 19) [1].

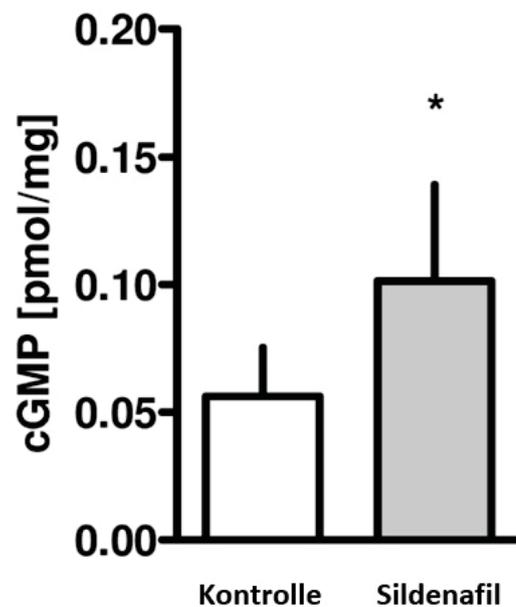


Abbildung 19 **cGMP-Konzentration**. In einem weiterführenden Teil der Arbeit wurde die cGMP-Konzentration in Herzen gemessen, welche mit Sildenafil behandelt wurden. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Herzen der Kontrollgruppe, die lediglich das Perfusat mit DMSO angeboten bekamen. cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, * = $p < 0,05$). Gruppengröße $n = 6$. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Eigene Abbildung, modifiziert [1].

4 Diskussion

Zentraler Gegenstand der Arbeit sind die Fragen, ob Sildenafil einen Einfluss auf den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden hat und ob die PKG und der mBK_{Ca} -Kanal eine Rolle in der Weiterleitung eines durch Sildenafil hervorgerufenen Effektes spielt.

Die vorliegende Studie zeigt, dass der PDE₅-Hemmstoff Sildenafil eine starke kardioprotektive Wirkung besitzt. Sildenafil ist dazu in der Lage, in an der Langendorff-Anlage isoliert perfundierten Rattenherzen, die einer 30-minütigen globalen Ischämie und einer darauffolgenden 60-minütigen Reperfusionsphase ausgesetzt waren, den Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant abzuschwächen. Dieser Sildenafil-induzierte kardioprotektive Effekt wurde durch den selektiven mBK_{Ca} -Kanalblocker Paxillin sowie den PKG-Blocker KT5823 komplett blockiert. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Öffnung der mBK_{Ca} -Kanäle in der Signalkaskade der Kardioprotektion eine tragende Rolle spielt. Bei der Sildenafil-induzierten frühen Präkonditionierung konnten des Weiteren keine Änderungen der Hämodynamik beobachtet werden. Die geleistete Herzarbeit und der Koronarfluss unterschieden sich nicht von Kontrollherzen. Dies legt nahe, dass die Kardioprotektion nicht durch eine Änderung des Muskeltonus der Koronargefäße und damit verbundenen Vasodilatation, sondern über einen davon unabhängigen Signalweg erreicht wurde.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Die Langendorff-Präparation

Der Grundstein für die heute genutzte Langendorff-Präparation wurde bereits 1866 durch Carl Ludwig und Elias Cyon mit der Perfusion eines isolierten Froschherzens gelegt. Weiterentwickelt wurde diese Systematik durch H. Newell Martin 1883 und Oskar Langendorff 1895, die auch Säugetierherzen perfundierten. Auf dieser Grundlage wurde in den 1960er Jahren das Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens von Howard E. Morgan und James R. Neely entwickelt [112].

Die Langendorff-Apparatur ist die heutzutage am weitesten verbreitete Methode der Perfusion eines isolierten Herzens. Abhängig von der gewählten Betriebsart (konstanter Druck oder konstanter Fluss) ist sie gut geeignet, pharmakologische Interventionen durchzuführen, die kardiale Elektrophysiologie zu erforschen oder

Aussagen über die Regulation des Blutflusses zu treffen. Ebenso sind Versuche betreffend myokardialer Ischämiesyndrome gut möglich [113]. Der große Vorteil der Präparation zu *in vivo*-Studien ist, dass kardiale Effekte ohne Einfluss eines regulierenden Organismus gemessen werden können. Humorale, metabolische, neuronale oder vegetative Faktoren werden durch die Isolation ausgeschaltet. Zudem können metabolische und funktionelle Änderungen leicht gemessen werden [114, 115].

Durch die Langendorff-Apparatur kann *ex vivo* ein physiologischer Zustand des Herzens simuliert werden. Während einer druckkontrollierten Perfusion, wie bei unseren Versuchen genutzt, kann dabei der arterielle Koronardruck durch Regulation des Blutflusses vom Herzen gesteuert werden. Dies ist beim flusskontrollierten Modell nicht möglich, da hier die autoregulierenden Prozesse durch ein konstantes Angebot des Perfusates ausgehebelt werden. Verschiedene Studien, allen voran Neely et al., belegen, dass das druckkontrollierte Herz über mehrere Stunden bei einem ausreichenden Sauerstoffangebot seine Funktion aufrechterhalten kann [116, 117]. Zudem ist eine Mangelversorgung durch ein konstant bleibendes Angebot durch den gleichbleibenden Druck ausgeschlossen. Im Gegensatz zu einer *in vivo*-Situation sind die Versuchsbedingungen mit der Langendorff-Anlage sehr gut standardisierbar und somit ist eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreichbar.

Ein wichtiger Faktor für die fehlerfreie Funktion des Herzens an der Anlage ist die korrekte Temperatureinstellung. Das isolierte Rattenherz bedarf dabei einer konstanten Temperatur von 37 °C [113]. Bei Ratten beträgt die Herzfrequenz im Mittel in Ruhe etwa 350 bpm [118]. Schon kleine Änderungen in der Temperatur des Herzens können zu Änderungen der kardialen Schlagkraft (Inotropie) oder der Herzfrequenz führen [119, 120]. Eine zu starke Hyper- oder Hypothermie ist jeweils dazu in der Lage, bereits präkonditionierende Effekte zu zeigen [121]. Aufgrund der relativ großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen läuft das Herz Gefahr, in kurzer Zeit viel Wärme zu verlieren [121]. Die Konstanthaltung der Zieltemperatur von 37 °C kann durch Erwärmen des Perfusionspuffers oder extern durch Umspülen des Herzens mit einer gewärmten Lösung sowie durch Wärmelampen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei voneinander unabhängigen Wärmebädern gearbeitet. Das eine sorgte für eine konstante

Temperatur des Perfusionspuffers, um das Herz direkt über den Puffer zu erwärmen. Das erwärmte Wasser aus dem zweiten Bad wurde genutzt, um die Verbindungen des Systems zu durchspülen und so einen Wärmeverlust zu verringern. Wir verzichteten bewusst auf eine kontinuierliche Temperaturmessung, um eine zusätzliche Manipulation des Herzens zu vermeiden.

In dem von uns genutzten Aufbau der Langendorff-Anlage (vgl. Abbildung 8) wurde durch eine peristaltische Pumpe das Perfusat kontinuierlich in das System gepumpt. Über einen freien Überlauf in einer Höhe von 1,09 m wurde ein konstanter aortaler Druck von 80 mmHg (entspricht ca. 1,09 mH₂O) und damit eine druckkontrollierte Perfusion aufrechterhalten.

Eine wichtige Voraussetzung für den fehlerfreien Versuchsablauf ist die Luftfreiheit des Schlauchsystems der Langendorff-Anlage, da von Luft einschließen die Gefahr von Luftembolien des Herzens ausgeht. Vor jeder Inbetriebnahme musste daher die Anlage gründlich gespült und auf Luftblasen untersucht werden. Luftblasen, die auf irgendeine Weise in die Anlage gerieten, wurden in der in dieser Arbeit genutzten Anlage durch einen Luftfänger aufgefangen, der den Lufttransport in das Herz verhinderte. Da der Zulauf der Testsubstanzen zwischen Luftfänger und Herz erfolgte, war der Anschluss der die Testsubstanzen führenden Leitungen an die Anlage ein kritisches Moment. Hier musste mit größter Sorgfalt auf einen luftfreien Abschluss geachtet werden. Ein weiteres kritisches Moment ist die Übertragung des explantierten Herzens an die Kanüle der Anlage. Durch eine möglichst kurze Dekapitations-zu-Reperfusionzeit und die dazwischengeschaltete Übertragung des explantierten Herzens in NaCl-Lösung konnte die Phase der kalten Ischämie bis zum Anschluss an die Kanüle geringgehalten werden.

4.1.2 Der Krebs-Henseleit-Puffer

Die Perfusion des Herzens kann mit Blut oder, wie in der vorliegenden Arbeit, mit Krebs-Henseleit-Puffer erfolgen. Die Alternative mit Echtblut ist dabei zwar physiologischer, jedoch durch einen aufwändigen Filter- und Aufbereitungsprozess auch deutlich störanfälliger, langwieriger und kostenaufwändiger. Voraussetzung für die Verwendung eines Krebs-Henseleit-Puffers ist die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂), damit ein Sauerstoffpartialdruck > 500 mmHg gewährleistet ist. Da die

Sauerstofftransportkapazität des Puffers im Vergleich zum Echtblut deutlich geringer ist, ist ein solch hoher Druck nötig, um das Herz ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Des Weiteren muss der Puffer konstant auf 37 °C gehalten werden, um die Körperkerntemperatur der Ratte zu imitieren [113]. Für langandauernde Versuche ist der Krebs-Henseleit-Puffer allerdings nicht geeignet. Hier ist ein Echtblutaufbau zu bevorzugen [122].

Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde von Hans Krebs entwickelt und dient der Perfusion isolierter Organe. In der unmodifizierten Zusammensetzung beinhaltet er 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,52 mM CaCl₂ und 11 mM Glukose [123]. Der hohe Anteil an Glukose ist nötig, um die Herzarbeit gewährleisten zu können, da die Glukose das einzig metabolisch verwertbare Substrat des Puffers ist. Pyruvat (sowie Fettsäuren oder Laktat [124, 125]) kann ebenfalls als metabolisches Substrat der Herzmuskulatur gewählt werden. Im Falle von Fettsäuren muss allerdings darauf geachtet werden, dass sich bei Begasung des Puffers mit Carbogen kein Schaum bildet [121]. Physiologisch beträgt die Glukosekonzentration in Ratten 5,6 – 6,3 mmol/l [126]. In der unmodifizierten Krebs-Henseleit-Lösung ist sie mit 11,1 mmol/l fast doppelt so hoch. Dies impliziert eine diabetische Stoffwechsellage, die man in einem physiologischen Modell kritisch betrachten sollte [121]. Inwiefern diese kurzfristige Erhöhung des Blutzuckers eine Auswirkung auf die Infarktreduzierung hat, ist jedoch unklar. In unserer Arbeit wichen wir daher von der vorgeschlagenen Rezeptur ab und nutzten zusätzlich zu 8,3 mM Glukose auch 2,2 mM Pyruvat, um näher am physiologischen Modell zu bleiben.

Da der Krebs-Henseleit-Puffer auf der Basis der Ringer-Lösung entwickelt wurde, ergeben sich zwei hauptsächliche Effekte durch die Perfusion mit einer kristallinen Lösung: 1. Die Sauerstofftransportkapazität ist im Vergleich zum Vollblut schlechter und 2. Durch das Fehlen von Albumin ist der onkotische Druck der Lösung gering. Das Resultat dieser Effekte ist ein deutlich erhöhter Koronarfluss, verglichen mit dem physiologischen Zustand (> 15 ml/min*^g, [127]) Umgekehrt proportional dazu verändert sich die Koronarreserve, die im Vergleich zu physiologischen Zuständen um ein Vielfaches verringert ist [127-129]. Eine weitere Problematik ergibt sich durch den geringen onkotischen Druck. Da Albumin schlecht wasserlöslich ist und in begasten Medien zur Schaumbildung neigt, ist es für den Krebs-Henseleit-Puffer ungeeignet. Folglich fehlt es an

Proteinen, um den onkotischen Druck hoch zu halten. Die Folge davon sind interstitielle Ödeme in den isoliert perfundierten Organen. Dies ist allerdings eine Problematik, die erst bei längeren Beobachtungszeiten auftritt und daher bei kurzen Versuchsprotokollen wie in dieser Arbeit zu vernachlässigen ist [130]. Trotz dieser Einschränkungen bietet die Krebs-Henseleit-Lösung insbesondere für kurze Versuchsprotokolle einen zuverlässigen Puffer. Der Funktionsverlust in Herzen beträgt pro Stunde nur ungefähr 5 – 10 % [121, 124, 131].

4.1.3 Die ELISA-Messung

Die zu untersuchende Konzentration des cGMP wurde mittels kommerziell erhältlicher enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) bestimmt. Der zu verwendende ELISA beruht auf einem kompetitiven Prinzip. Die zu untersuchende Probe konkurriert hierbei um eine Antikörperbindungsstelle mit einem Konjugat. An diesem ist ein Enzym gekoppelt, das durch eine Substratlösung zu einem Farbumschlag der Lösung führt und so die Konzentration quantifizierbar macht. Das genutzte Verfahren wird durch den Hersteller als speziesunabhängig, die Rate an Kreuzreaktionen mit unter 0,001 % angegeben [110].

Aufgrund des sehr kleinen Moleküls ist es so gut wie unmöglich, mehr als ein Epitop für die Antikörperbindung bereitzustellen. Dies ist der Grund, weshalb es ausschließlich kompetitive ELISA mit einem spezifischen Antikörper gibt. Vorteilhaft bei der Durchführung eines ELISA ist die Fähigkeit, sehr niedrige Konzentrationen zu detektieren und dass er im Unterschied zu radioaktiv arbeitenden Verfahren keiner gesonderten Sicherheitsvorkehrungen und Auflagen zur Entsorgung bei jedoch gleicher Detektionsfähigkeit bedarf. Auf Grund der guten Standardisierbarkeit und einfachen Handhabung ist der ELISA ein verlässliches Instrument in der Bestimmung der cGMP-Konzentration [132]. Da die Messung der Konzentration jedoch zweizeitig stattfindet, ist ein zwischenzeitiger Einfluss von Guanylatcyklasen, Freisetzung aus subzellulären Strukturen und der generellen Versuchsdauer nicht ausgeschlossen [81, 133]. Die hierdurch entstandenen Messungenauigkeiten können durch den ELISA nicht erfasst werden. Da diese etwaigen Messungenauigkeiten jedoch alle Versuchsgruppen gleichermaßen betreffen, ist dies in dieser Arbeit zu vernachlässigen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In den letzten Jahrzehnten wurden bei der Erforschung des Ischämie-Reperfusionsschadens enorme Fortschritte im Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen gemacht. Durch diese Einsicht konnten zahlreiche experimentelle Studien durchgeführt werden, die zum Ziel hatten, den IR-Schaden gering zu halten oder zu verhindern. Doch obwohl die Wirksamkeit dieser Interventionen in den Studien sehr deutlich war, hielten sie bislang keinen Einzug in den klinischen Alltag. Grund dafür könnte sein, dass die benutzten Pharmaka und Interventionen aufgrund von klinischen Nebenwirkungen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Eine Grundvoraussetzung für die klinische Umsetzbarkeit stellt eine Kombination aus effektivem Wirkprofil und einem akzeptablen Nebenwirkungsprofil bei gleichzeitiger starker kardioprotektiver Wirkung dar [1].

Der Umfang an Pharmaka, die den Ärzten heutzutage zur Kardioprotektion klinisch zur Verfügung steht, ist gering. Zwar wurden bereits verschiedene klinische Studien zur pharmakologischen Präkonditionierung am Menschen durchgeführt [31, 134-138], bei denen neben der verbesserten kardialen Leistung auch eine Reduktion der Infarktparameter (z.B. Troponin I) nachgewiesen wurde [139-141], es konnte sich hieraus jedoch keine allgemeingültige Vorgehensweise, geschweige denn ein Goldstandard etablieren.

Da es jedoch eine Reihe weiterer Optionen zur wirkungsvollen klinischen Präkonditionierung geben könnte, sollten die Untersuchungen sich nicht auf Substanzen mit bereits nachgewiesenen protektiven Effekten beschränken. Mit Sildenafil aus der Gruppe der PDE₅-Hemmstoffe untersuchten wir einen weiteren vielversprechenden Wirkstoff der Kardioprotektion, der bereits in anderen Gebieten der Medizin eingesetzt wird.

4.2.1 Die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion

Diese Arbeit zeigt, dass Sildenafil, wenn es unmittelbar vor einem ischämischen Insult appliziert wird, dazu in der Lage ist, kardioprotektive Mechanismen in Gang zu setzen und den aus dem Insult resultierenden Ischämie-Reperfusionsschaden zu minimieren. Die Möglichkeit der Kardioprotektion durch Sildenafil ist bereits in weiteren Studien (vgl. [83, 84, 86]) vorbeschrieben, wobei sich die beschriebenen und untersuchten Mediatoren allerdings von dem in dieser Arbeit beobachteten

Mediator (mBK_{Ca}-Kanal) unterscheiden. Der Fortschritt der Identifikation des präkonditionierenden Signalwegs von Sildenafil könnte insbesondere im Hinblick auf die momentane klinische Situation von besonderem Interesse für die Zukunft sein: Sildenafil wird aktuell bereits im klinischen Alltag erfolgreich eingesetzt. Es besitzt die Zulassung zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Viagra®) und seit 2006 auch zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie (Revatio®) [142]. Durch diese Einsatzgebiete ist Sildenafil aus pharmakodynamischer und pharmakokinetischer Sicht ein gut erforschter Wirkstoff und ein Medikament, das mittlerweile weit verbreitet ist (inhaltlich übernommen aus [1]). Auch in Subpopulationen, die beispielsweise an Diabetes mellitus, arterieller Hypertension, Multipler Sklerose, Niereninsuffizienz oder Leberdysfunktionen leiden, zeigte Sildenafil keine Wirkabschwächung [143-145]. In Deutschland war Sildenafil bis Ende 2013 patentrechtlich geschützt, seitdem sind auch kostengünstigere Generika im Handel erwerbbar. Dazu kommt, dass Sildenafil die wichtige Anforderung eines günstigen Nebenwirkungsprofils erfüllt [1]. Durch die in dieser Arbeit beschriebene Fähigkeit der frühen Präkonditionierung über den mBK_{Ca}-Kanal könnten denkbare Einsatzgebiete von Sildenafil zum Beispiel Interventionen und Operationen sein, bei denen es kurzzeitig zu Verschlüssen von Koronargefäßen kommt oder generell die Gefahr einer Induktion eines Reperfusionsschadens besteht, wie beispielsweise bei der koronaren Bypass-Operation. Sildenafil könnte in diesen Feldern zu einem verbesserten Outcome der Patienten beitragen [1].

Ein weiterer, nicht zu unterschätzender Vorteil von Sildenafil ist, dass zusätzlich zu dem kardioprotektiven Effekt in Tiermodellen weitere günstige, potenziell lebensverlängernde Wirkungen nachgewiesen wurden. Dazu zählen die Reduktion der kardialen Hypertrophie und Apoptose [146], die Verbesserung der hämodynamischen Werte und des koronaren Gefäßwiderstandes [147] sowie die Verbesserung des Überlebens [146] (inhaltlich übernommen aus [1]). Der Schluss liegt nahe, dass die Kardioprotektion durch Sildenafil ein attraktives Forschungsziel ist, dessen weitere Aufklärung vielversprechend erscheint. Hierbei gilt es insbesondere, den zu größten Teilen noch unbekanntem Signalweg der Kardioprotektion von Sildenafil und der damit verbundenen Verhinderung des Ischämie-Reperfusionsschadens aufzudecken, um diesbezüglich ein genaueres und gezielteres klinisches Vorgehen ableiten zu können.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die in der vorliegenden Arbeit genutzte 10-minütige Applikationsdauer von Sildenafil vor einer Ischämie die kardialen (hämodynamischen) Parameter nicht signifikant beeinflusst und dass es betreffend die Herzfrequenz, den linksventrikulären enddiastolischen Druck, das RPP und den Koronarfluss keine gruppenspezifische Änderung eines dieser Parameter gegeben hat. Zwar fällt in der Reperfusionphase verglichen mit der *baseline* sowohl der Koronarfluss als auch das RPP, jedoch geschieht dies in allen Gruppen in gleicher Weise. Im Vergleich der Sildenafilgruppe mit den anderen Versuchsgruppen zeigen sich keinerlei Signifikanzen bezüglich der HR, des LVEDP, des RPP und des CF. Die kurze präischämische Applikation von Sildenafil beeinflusst die kardiale Leistungsfähigkeit somit weder positiv noch negativ. Diese Beobachtung wurde auch in weiteren Studien gemacht und untermauert die von uns gemachte Feststellung [84]. Es ist somit denkbar, dass die Gabe von Sildenafil zur Präkonditionierung auch unabhängig von kardialen Nebenwirkungen stattfinden kann. Dies ist insbesondere im Hinblick auf das Patientenkollektiv von Vorteil, das am ehesten von dieser Wirkung profitiert.

Sildenafil ist als Phosphodiesterasehemmstoff in erster Linie dafür bekannt, über die PKG-abhängige Generierung von cGMP eine vasodilatierende Wirkung zu besitzen, woraus die momentane klinische Hauptwirkung abgeleitet wird. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Koronarfluss jedoch nicht wie erwartet durch die Relaxation von glatten Muskelzellen anstieg, sondern sogar im Gegenteil nach der Ischämie deutlich reduziert war. Auch in der Präkonditionierungsphase von Sildenafil vor der Ischämie wurde kein signifikanter Anstieg des Koronarflusses im Vergleich zur *baseline* und zwischen den verschiedenen Gruppen verzeichnet. Da unter der Wirkung von Sildenafil der koronare Blutfluss somit zu keinem Zeitpunkt signifikant angestiegen war, ist davon auszugehen, dass die frühe kardioprotektive Wirkung von Sildenafil einen anderen Signalweg besitzt als die potentielle vasodilatierende Wirkung und somit davon unabhängig ist. Der postischämisch niedrige Koronarfluss ist dabei am ehesten durch den Infarktschaden erklärbar.

Ein möglicher Erklärungsansatz dieser Beobachtung könnte die verwendete Konzentration des Sildenafil sein. Wie bereits erwähnt, wurde die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion in mehreren Studien bereits beschrieben [36, 83-86, 148-150]. In verschiedenen Tiermodellen (Maus, Ratte, Kaninchen) wurde

gezeigt, dass eine präischämische Gabe von Sildenafil die Infarktgröße signifikant senkte. Im Falle der Versuche mit Rattenherzen [86, 148, 150] ist eine körperrgewichtsadaptierte Konzentration des Sildenafils gewählt worden, die von 0,001 mg/kg Körpergewicht (KG) bis 0,7 mg/kg KG variierte. Dies entspricht bei einem KG der Ratte von beispielsweise 280 g einer Konzentration von 0,6 nM im Falle von 0,001 mg/kg KG bis 0,4 μ M im Falle von 0,7 mg/kg KG. Es sind jedoch auch Konzentrationen von 1 μ M Sildenafil im Langendorff-Modell an Maus Herzen überliefert [85]. Für unsere Studie wählten wir eine Sildenafilkonzentration (3 μ M), die sich an Studien zum Effekt von Sildenafil bei der erektilen Dysfunktion und den *lower urinary tract symptoms* (LUTS, Symptome des unteren Harntraktes) orientierte [151-153] (inhaltlich übernommen aus [1]). Es ist somit denkbar, dass durch eine im Vergleich mit den oben genannten Langendorff-Studien höhere Sildenafilkonzentration am Organ die Affinität der kardioprotektiven Trigger stärker ist als die der vasodilatierenden, wodurch der Koronarfluss zu Gunsten des verminderten IR-Schadens erniedrigt wird [1]. Ebenfalls denkbar wäre ein hemmender Signalweg, der von der bereits gestarteten präkonditionierenden Signalkaskade ausgeht und die Vasodilatation unterbindet. Möglich wäre, dass eine erhöhte Konzentration von Sildenafil nicht nur die PDE₅, sondern auch die PDE₃ hemmt. Hierdurch stiege die Konzentration von zyklischem Adonsinmonophosphat (cAMP) an, was wiederum über multiple Signalwege eine eigene Wirkung entfalten könnte.

4.2.2 Der mBK_{Ca}-Kanal und frühe Präkonditionierung

Dass Sildenafil nach der Blockade der mBK_{Ca}-Kanäle in der vorliegenden Studie keine Kardioprotektion mehr gewährleisten konnte, impliziert, dass diese Kanäle ein notwendiger Baustein des Signaltransduktionswegs der frühen Sildenafil-induzierten Kardioprotektion sind.

Wie bereits beschrieben, befinden sich die mBK_{Ca}-Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran [91]. Die Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Lebenszyklus einer Zelle, da sie unter anderem über die Atmungskette die ATP-Synthese steuern, über die Fähigkeit, Calcium-Ionen zu speichern und wieder abzugeben in die Kalziumhomöostase eingreifen und die Apoptose steuern. Dadurch spielen sie eine tragende Rolle in der Regulation des Ischämie-Reperfusionsschadens [83]. In zahlreichen verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass der mBK_{Ca}-Kanal als nachgeschalteter Mediator in der

Signalkaskade kardioprotektiver Interventionen von zentraler Bedeutung ist [91, 107, 111, 154-156] (inhaltlich übernommen aus [1]). Als Teil der Superfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle spielt er eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Diese Funktion erfüllt er hauptsächlich über seine Abhängigkeit von der transmembranären Spannung und der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das Öffnen des mBK_{Ca} -Kanals führt demnach zu einem kardioprotektiven Effekt [83] (inhaltlich übernommen aus [1]). Da die mBK_{Ca} -Kanäle auch von der Proteinkinase A und C [154, 157] reguliert werden, teilen sie sich einen gemeinsamen Abschnitt des Signalwegs mit Sildenafil, das neben dem PKG/cGMP-Signalweg auch den PKA/cAMP-Signalweg [82] aktiviert sowie die Aktivierung der PKC fördert [158]. Aus diesen Entdeckungen wird deutlich, dass die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion eine Aktivierung der PKA und PKC *upstream* benötigt, die gleichermaßen der Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals zu Gute kommt. Thebaud et al. jedoch beschreiben, dass in den glatten Muskelzellen von Gefäßen die Regulation des Gefäßtonus durch Sildenafil über die PKG-induzierte Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen gesteuert wird [159]. Es ist somit auch denkbar, dass die Sildenafil-induzierte Kardioprotektion alleinig von der PKG getragen wird. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse von Kukreja et al., aus denen deutlich wird, dass der Sildenafil-induzierte kardioprotektive Effekt durch eine unwirksam gemachte PKG in Kardiomyozyten blockiert wird [160]. Wir konnten mit unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeit diese Ergebnisse bestätigen (siehe S. 45) [1]. Der Nachweis der Erhöhung der cGMP-Konzentration dieser Arbeit untermauert die Vermutung, dass die frühe Sildenafil-induzierte Kardioprotektion zumindest zu einem Teil durch den verminderten Abbau des cGMP und folglich erhöhter Aktivität der PKG vermittelt wird, die im weiteren Verlauf die Öffnung der mBK_{Ca} -Kanäle bewirken [1]. Es bleibt allerdings weiterhin unklar, ob die Signalwege der einzelnen Proteinkinasen untereinander interagieren und zu welchem Ausmaß der jeweilige Signalweg zu einem kardioprotektiven Effekt führt. Des Weiteren ist es ebenfalls denkbar, dass Sildenafil direkt mit dem mBK_{Ca} -Kanal interagieren und ihn so öffnen kann.

In einer Studie von Wang et al. [161] wurde gezeigt, dass der mBK_{Ca} -Kanal in der späten Sildenafil-induzierten Kardioprotektion eine Rolle spielt. Der Effekt war ebenfalls durch Paxillin aufhebbar. Durch ein selektives Ausschalten der $\beta 1$ -

Untereinheit des mBK_{Ca} -Kanals mittels siRNA (*small interfering RNA*) wurde die Integration des Kanals innerhalb der Signalkaskade bestätigt. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Studie auch, dass der mK_{ATP} -Kanal im Falle der späten Konditionierung durch Sildenafil den gleichen Effekt hat. Die Studie konnte allerdings aufgrund des Studienprotokolls keine Aussage über den Zusammenhang von Sildenafil und dem mBK_{Ca} -Kanal in der frühen Präkonditionierung tätigen. Die Frage, inwiefern ein unmittelbarer Zusammenhang mit dem ebenfalls beteiligten mK_{ATP} -Kanal besteht und ob beide Kanäle untereinander interagieren, bleibt ebenfalls unbeantwortet.

In Zusammenschau von oben genannter Studie mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist nun davon auszugehen, dass der mBK_{Ca} -Kanal unabhängig vom Zeitpunkt der Präkonditionierung (frühe versus späte Präkonditionierung) ein integraler Bestandteil des Signalwegs bei der Sildenafil-induzierten Präkonditionierung ist. Inwiefern der mBK_{Ca} -Kanal bei der frühen Präkonditionierung jedoch mit dem mK_{ATP} -Kanal interagiert, können sowohl oben genannte Studie ([161]) noch diese Arbeit beantworten. Da Sildenafil auch über den K_{ATP} -Kanal eine frühe Präkonditionierung bewirkt [84], sollte eine etwaige Interaktion beider Kanäle genauer untersucht werden.

4.2.3 Paxillin

Paxillin findet in der klinischen Praxis keine Anwendung, sondern wird ausschließlich als spezifischer BK_{Ca} -Blocker [106, 107, 111, 161, 162] in der Forschung eingesetzt. 1 μ M Paxillin über 15 Minuten, 5 Minuten vor der Zugabe von Sildenafil und konsekutiv während einer simultanen 10-minütigen Sildenafilapplikation war in unserem Versuchsaufbau ausreichend, um die durch Sildenafil hervorgerufene Infarktminde rung vollständig aufzuheben. Paxillin hatte dabei keinerlei eigene Effekte auf die Hämodynamik oder kardiale Funktion. Die Herzfrequenz blieb konstant, während, wie in allen anderen Gruppen auch, das RPP und der Koronarfluss sanken und der LVEDP stieg. Eine eigene Wirkung oder eine Interaktion mit der zu testenden Substanz Sildenafil ist somit ausgeschlossen.

Bei der Wahl der applizierten Konzentration von Paxillin orientierten wir uns an bereits am Langendorff-Modell durchgeführten Studien zum Thema der Kardioprotektion am isolierten Rattenherz [99, 163]. Die 15-minütige Applikationsdauer von Paxillin wählten wir nach eigenen Erfahrungen

vorausgehender Versuche [107], diese wurden allerdings auf dem Gebiet der Postkonditionierung gemacht. In der Literatur sind im Falle der Präkonditionierung im Langendorff-Modell am isolierten Rattenherz jedoch auch kürzere Applikationszeiten von 5 Minuten bei einer Konzentration von 1 μM von Paxillin mit einem signifikanten Effekt beschrieben [164]. Um ein Auswaschen des Paxillin und damit eine Wirkabschwächung während der Sildenafilgabe zu verhindern, erfolgte eine 10-minütige simultane Gabe von Sildenafil und Paxillin. Da Paxillin, wie im einleitenden Satz dieses Abschnittes beschrieben, die gesamte Subpopulation der BK_{Ca} -Kanäle hemmt, muss dessen Rolle kritisch hinterfragt werden. Die Annahme lautete bisher, dass sich die BK_{Ca} -Kanäle an der inneren Mitochondrienmembran befinden und die Effekte der Präkonditionierung über die Mitochondrien vermittelt werden. Lai et al. zeigten in 2014, dass BK_{Ca} -Kanäle auch an der plasmatischen Membran der Zellen des Sinusknotens befindlich sind [165]. Eine Wirkung extramitochondrialer BK_{Ca} -Kanäle in Bezug auf die Kardioprotektion kann also nicht mit kompletter Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.2.4 KT5823

Das genutzte KT5823 ist ein potenter Blocker der PKG, der *in vitro* eingesetzt wird [109]. Analog der Wirkung des Paxillin war KT5823 nach einer 15-minütigen Applikation 5 Minuten vor Beginn der Sildenafilapplikation und 10 Minuten simultaner Gabe in einer Konzentration von 3 μM dazu in der Lage, die von Sildenafil gewirkte Kardioprotektion aufzuheben. Die Konzentration des von uns genutzten KT5823 orientierte sich hierbei an in der Literatur berichteten Konzentrationen [166, 167].

Neben der Fähigkeit zur Inhibition der PKG ist KT5823 ebenfalls dazu in der Lage, die PKC und die PKA zu hemmen, wenn auch deutlich schwächer [168, 169]. Es ist also denkbar, dass das KT5823 nicht nur über die Hemmung der PKG die Sildenafilwirkung unterdrückt, sondern die Hemmung auch mittels PKA und *downstream* über die PKC stattfindet. Dies ist insbesondere aufgrund der oben bereits genannten Tatsache, dass die mBK_{Ca} -Kanäle ebenfalls durch die PKA und PKC aktivierbar sind, interessant. Es ist nicht gänzlich ausgeschlossen, dass die Modulation der mBK_{Ca} -Kanäle auch in der Sildenafil-induzierten Kardioprotektion ebenfalls über die alternativen Proteinkinasen erfolgen kann. Da die hauptsächliche Wirkung des KT5823 jedoch in der Inhibition der PKG liegt,

ist anzunehmen, dass auch der überwiegende Anteil der durch Sildenafil ausgelösten Präkonditionierung über die PKG vermittelt wird. Den Nachweis dieser Behauptung bleibt diese Arbeit jedoch schuldig. Hierzu bedarf es einem hochselektiven und ausschließlich auf die PKG wirkenden Inhibitor. Eine solche Substanz, die frei von jedweden weiteren Effekten ist, steht jedoch meines Wissens der Forschung nicht zur Verfügung.

4.2.5 Zusammenfassung

Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass der eingangs postulierte Signalweg in Abbildung 3 einen korrekten Zwischenschritt auf dem Weg zur Kardioprotektion darstellt. Sildenafil hemmt dabei die PDE₅, wodurch es zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration kommt. Hierüber wird vermehrt die PKG aktiviert, welche wiederum die Öffnungswahrscheinlichkeit der mBK_{Ca}-Kanäle erhöht. Aus der mBK_{Ca}-Kanalöffnung resultiert die Präkonditionierung (vgl. Abbildung 20). Die genaue Signalkaskade, die der mBK_{Ca}-Kanal-abhängigen Sildenafil-induzierten Kardioprotektion zugrunde liegt, ist mit der momentanen Studienlage jedoch nicht abschließend zu benennen und bedarf in Zukunft weiterer Abklärung.

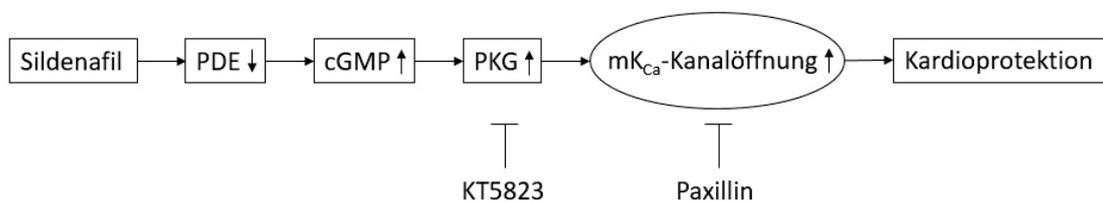


Abbildung 20 **Signalweg der frühen Kardioprotektion durch Sildenafil.** Durch Sildenafil sinkt die Aktivität der Phosphodiesterase. Hierdurch steigt die Konzentration der cGMP, welche zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase G führt. Hieraus resultiert eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der mK_{Ca}-Kanäle, welche in letzter Konsequenz zur Kardioprotektion führt. Sowohl durch Paxillin als auch durch KT5823 ist dieser Effekt blockierbar. PDE = Phosphodiesterase, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, mK_{Ca} = mitochondrialer, calciumabhängiger Kaliumkanal, Paxillin = mK_{Ca}-Kanalinhibitor. Eigene Abbildung, modifiziert [1].

4.2.6 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Zusätzlich zur schwierigen Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den menschlichen Organismus auf Grund verschiedener (Patho-) Mechanismen oder nicht absehbarer Nebenwirkungen kommt, dass das hier verwendete Modell keinen Aufschluss über das Verhalten der Kardioprotektion bei bestimmten Komorbiditäten gibt. Es ist denkbar, dass eine frühe kardioprotektive Wirkung von Sildenafil demnach im Sinne einer nicht vorhersehbaren Wechselwirkung in bestimmten Krankheitskonstellationen von Patienten nicht erreicht werden kann. Zu diesen Komorbiditäten zählen unter anderem Hypercholesterinämie, Atherosklerose oder Diabetes. Ferdinandy et al. beschrieben, dass die genannten pathologischen Veränderungen die Präkonditionierung zur Kardioprotektion unwirksam machen können. Die Grundlage dafür liefern Veränderungen auf molekularer Ebene, welche ebenfalls mit steigendem Alter auftreten können [170-172]. Der Nachweis der Wirksamkeit von Sildenafil-induzierter Kardioprotektion in Verbindung mit diesen Pathologien steht weiterhin aus.

Im Bereich der erektilen Dysfunktion wurde gezeigt, dass das Wirkspektrum von Sildenafil trotz einer therapeutischen Wirksamkeit von 60-70 % in Gesunden bei Patienten mit Diabetes mellitus oder weiteren die Gefäße betreffenden Krankheiten deutlich abgeschwächt ist und sogar bis zu einer kompletten Resistenz gegenüber Phosphodiesterase-5-Hemmstoffen reichen kann. Die Grundlage für diese Wirksamkeitsabschwächung liefert die verringerte Expression oder Aktivität von Stickstoffmonoxidsynthasen, die verringerte Ausschüttung von Stickstoffmonoxid oder die Zerstörung dessen, was in letzter Konsequenz zu einer herabgesetzten Wirkung der cGMP und damit zu einer Abschwächung des Phosphodiesterasehemmers führt [173]. Dennoch kann die Wirksamkeit an gewissen Prädiktoren festgemacht werden. So ist zum Beispiel im Falle des Diabetes die Ausprägung diabetischer Komplikationen sowie die Einstellung des Blutzuckers maßgeblich für den Therapieerfolg mit Phosphodiesterase-5-Hemmstoffen [144, 174]. Die Übertragbarkeit auf die Präkonditionierung fällt auch hier schwer, da nicht abschließend geklärt ist, welcher Signalweg der Präkonditionierung zugrunde liegt. Da nicht ausgeschlossen ist, dass andere Signaltransduktionen den präkonditionierenden

Effekt begründen, ist es weiterhin möglich, dass eine Sildenafil-induzierte Kardioprotektion in oben genannten Komorbiditäten erreicht werden kann.

Des Weiteren berücksichtigt diese Studie nicht den Geschlechterunterschied der Präkonditionierung zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren. Der in der Forschung verbreitete Ansatz, fast ausschließlich männliche Versuchstiere zu nutzen [175], wurde in dieser Arbeit auch unterstützt. Begründet ist diese Herangehensweise hauptsächlich in den fehlenden zyklusabhängigen hormonellen Schwankungen, die bei weiblichen Versuchstieren die Ergebnisse beeinflussen könnten und nicht quantifiziert werden können [176]. Dies ist insbesondere im Falle der Präkonditionierung ein nicht zu vernachlässigender Faktor, da bereits gezeigt wurde, dass Östrogen einen eigenen kardioprotektiven Effekt besitzt, welcher die Messwerte potentiell verfälschen kann [177]. Darüber hinaus sind die physiologischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern sehr ausgeprägt [178]. Dennoch mehren sich in den letzten Jahren die Studien, die auch das weibliche Geschlecht berücksichtigen [179]. Eine wichtige Arbeit in diesem Kontext veröffentlichten Song et al.. In dieser wurde gezeigt, dass ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren besteht. So zeigte die Studie, dass ischämische Präkonditionierung bei weiblichen Versuchstieren nicht wirkte, während sie bei männlichen eine Wirkung zeigte. Ein weiterer wichtiger Punkt der Arbeit ist, dass die Präkonditionierung nur teilweise von hormonellen Einflüssen abhängig ist [180]. Cao et al. wiesen unterschiedliche Signalwege zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren nach [181]. Es muss Gegenstand weiterer Forschung sein zu klären, ob die frühe Sildenafil-induzierte Kardioprotektion gleichen zwischengeschlechtlichen Schwankungen unterliegt [1].

Ähnlich verhält es sich mit dem Lebensalter der Versuchstiere. Präkonditionierende Effekte variieren mit dem Lebensalter [182]. Ob diese Schwankungen auch im Falle der Sildenafil-induzierten Kardioprotektion existieren, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden [1].

5 Schlussfolgerung

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien, die die Rolle von Sildenafil beim Schutz vor einem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden beschreiben und die Mechanismen aufdecken. Aus diesen Studien wird deutlich, dass die Expression von NO-Synthasen, die Akkumulation von cGMP, die Aktivierung von Kinasen (wie zum Beispiel PKC, MAP oder ERK) und das Öffnen der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle Teile der Signalkaskade sind. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle von Sildenafil in der frühen Kardioprotektion und zeigte, dass die Öffnung der mBK_{Ca} -Kanäle ein maßgeblicher Schritt der Sildenafil-induzierten Kardioprotektion ist. Diese Öffnung ist bedingt durch die erhöhte Konzentration von cGMP und damit der erhöhten Aktivität der PKG. Die genauen Schritte der Signalkaskade *up-* und *downstream* des Kanals sind dabei allerdings weiterhin unklar und bedürfen weiterer Forschung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten dabei helfen, neue Medikamente und Therapien zu erforschen, um dem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden vorzubeugen (inhaltlich übernommen aus [1]).

6 Literaturverzeichnis

1. Behmenburg, F., et al., *Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144737.
2. Frohlich, G.M., et al., *Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI*. Eur Heart J, 2013. **34**(23): p. 1714-22.
3. Herold, G., *Koronare Herzerkrankung (KHK)*, in *Innere Medizin*. 2013, Gerd Herold Verlag. p. 239-251.
4. Dalen, J.E., et al., *The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease*. Am J Med, 2014. **127**(9): p. 807-12.
5. Smith, F.G., et al., *Comparative care and outcomes for acute coronary syndromes in Central and Eastern European Transitional countries: A review of the literature*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2015. **4**(6): p. 537-54.
6. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
7. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
8. Piper, H.M., et al., *[Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]*. Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**(12): p. 586-90.
9. Yellon, D.M., *Myocardial reperfusion and reperfusion injury: current views*. Bratisl Lek Listy, 1991. **92**(2): p. 66-76.
10. Solaini, G. and D.A. Harris, *Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 2): p. 377-94.
11. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
12. Silber, S., *[Evidence-based management of ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). Latest guidelines of the European Society of Cardiology (ESC) 2010]*. Herz, 2010. **35**(8): p. 558-64.
13. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
14. Lawson, C.S. and J.M. Downey, *Preconditioning: state of the art myocardial protection*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(4): p. 542-50.
15. Bonventre, J.V., *Kidney ischemic preconditioning*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(1): p. 43-8.
16. Jin, L.M., et al., *Ischemic preconditioning enhances hepatocyte proliferation in the early phase after ischemia under hemi-hepatectomy in rats*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012. **11**(5): p. 521-6.
17. Pang, C.Y., et al., *Effector mechanism of adenosine in acute ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 2): p. R887-95.
18. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. Circ Res, 1993. **72**(6): p. 1293-9.
19. Baxter, G.F., et al., *Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning*. Circulation, 1994. **90**(6): p. 2993-3000.
20. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
21. Wright, G.L., et al., *Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury*. FASEB J, 2004. **18**(9): p. 1031-3.

22. Lefer, A.M., et al., *Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts*. *Circulation*, 1999. **100**(2): p. 178-84.
23. Rastegar, M.A., et al., *Atrial natriuretic peptide reduces the severe consequences of coronary artery occlusion in anaesthetized dogs*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2000. **14**(5): p. 471-9.
24. Massoudy, P., et al., *Cardioprotection by cyclosporine A in experimental ischemia and reperfusion--evidence for a nitric oxide-dependent mechanism mediated by endothelin*. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**(2): p. 535-44.
25. Timmers, L., et al., *Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(6): p. 501-10.
26. Ibanez, B., et al., *Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance*. *Circulation*, 2007. **115**(23): p. 2909-16.
27. Schultz, J.E., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors*. *Circulation*, 1998. **97**(13): p. 1282-9.
28. Schultz, J.E., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart*. *Circ Res*, 1996. **78**(6): p. 1100-4.
29. Warltier, D.C., et al., *Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane*. *Anesthesiology*, 1988. **69**(4): p. 552-65.
30. Cason, B.A., et al., *Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits*. *Anesthesiology*, 1997. **87**(5): p. 1182-90.
31. De Hert, S.G., et al., *Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients*. *Anesthesiology*, 2003. **99**(2): p. 314-23.
32. Li, Q., et al., *Pretreatment with xenon protected immature rabbit heart from ischaemia/reperfusion injury by opening of the mitoKATP channel*. *Heart Lung Circ*, 2013. **22**(4): p. 276-83.
33. Huhn, R., et al., *Helium-induced late preconditioning in the rat heart in vivo*. *Br J Anaesth*, 2009. **102**(5): p. 614-9.
34. Sesti, C., et al., *The phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil reduces myocardial infarct size*. *Int J Impot Res*, 2007. **19**(1): p. 55-61.
35. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(2): p. 453-8.
36. Salloum, F., et al., *Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart*. *Circ Res*, 2003. **92**(6): p. 595-7.
37. Toombs, C.F., et al., *Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia*. *Circulation*, 1992. **86**(3): p. 986-94.
38. Liu, G.S., et al., *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart*. *Circulation*, 1991. **84**(1): p. 350-6.
39. Ytrehus, K., Y. Liu, and J.M. Downey, *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1145-52.
40. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, *Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs*. *Circ Res*, 1992. **70**(2): p. 223-33.
41. Wall, T.M., R. Sheehy, and J.C. Hartman, *Role of bradykinin in myocardial preconditioning*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(2): p. 681-9.

42. Downey, J.M., T. Krieg, and M.V. Cohen, *Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1123**: p. 187-96.
43. Tritto, I., et al., *Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts*. Circ Res, 1997. **80**(5): p. 743-8.
44. Baines, C.P., M. Goto, and J.M. Downey, *Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(1): p. 207-16.
45. Gopalakrishna, R. and W.B. Anderson, *Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6758-62.
46. von Ruecker, A.A., et al., *Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **163**(2): p. 836-42.
47. Schulz, R., et al., *Intraischemic preconditioning. Increased tolerance to sustained low-flow ischemia by a brief episode of no-flow ischemia without intermittent reperfusion*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 942-50.
48. Ferrari, R., et al., *Metabolic adaptation during a sequence of no-flow and low-flow ischemia. A possible trigger for hibernation*. Circulation, 1996. **94**(10): p. 2587-96.
49. Takano, H., et al., *Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 73-84.
50. Bolli, R., *Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(11): p. 1897-918.
51. Dawn, B. and R. Bolli, *Role of nitric oxide in myocardial preconditioning*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **962**: p. 18-41.
52. Jones, S.P. and R. Bolli, *The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(1): p. 16-23.
53. Burley, D.S., P. Ferdinandy, and G.F. Baxter, *Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(6): p. 855-69.
54. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
55. Liu, G.S., et al., *Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(10): p. 1937-48.
56. Zhao, J., et al., *The expression of constitutively active isoforms of protein kinase C to investigate preconditioning*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23072-9.
57. Mitchell, M.B., et al., *Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C*. Circ Res, 1995. **76**(1): p. 73-81.
58. Yang, X.M., et al., *Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(3): p. 991-9.
59. Forbes, R.A., C. Steenbergen, and E. Murphy, *Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism*. Circ Res, 2001. **88**(8): p. 802-9.
60. Pain, T., et al., *Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 460-6.
61. Herbert, J.M., et al., *Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **172**(3): p. 993-9.
62. Testai, L., et al., *Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs*. Med Res Rev, 2015. **35**(3): p. 520-53.
63. Garlid, K.D., *Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen*. Basic Res Cardiol, 2000. **95**(4): p. 275-9.

64. Oldenburg, O., et al., *Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H468-76.
65. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
66. Qin, Q., et al., *Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoKATP-dependent mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H712-8.
67. Krieg, T., et al., *Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2606-11.
68. Krieg, T., et al., *Peptide blockers of PKG inhibit ROS generation by acetylcholine and bradykinin in cardiomyocytes but fail to block protection in the whole heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1976-81.
69. Costa, A.D., et al., *Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria*. Circ Res, 2005. **97**(4): p. 329-36.
70. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
71. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
72. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
73. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
74. Hausenloy, D.J., et al., *Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H841-9.
75. Hausenloy, D., et al., *Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection*. Circulation, 2004. **109**(14): p. 1714-7.
76. Javadov, S.A., et al., *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 513-24.
77. Tissier, R., M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Protecting the acutely ischemic myocardium beyond reperfusion therapies: are we any closer to realizing the dream of infarct size elimination?* Arch Mal Coeur Vaiss, 2007. **100**(9): p. 794-802.
78. Goldstein, I., et al., *Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction*. Sildenafil Study Group. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1397-404.
79. Galie, N., et al., *Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2148-57.
80. Ashman, D.F., et al., *Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 330-4.
81. Lucas, K.A., et al., *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 375-414.
82. Tantini, B., et al., *Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(2): p. 131-8.
83. Lee, K.H., et al., *Effects of Sildenafil on Nanostructural and Nanomechanical Changes in Mitochondria in an Ischemia-Reperfusion Rat Model*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014. **41**(10): p. 763-8.
84. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H1263-9.

85. Das, A., et al., *ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(5): p. H1236-43.
86. Das, S., et al., *Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase 5*. *Drugs Exp Clin Res*, 2002. **28**(6): p. 213-9.
87. Han, J., et al., *ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(4): p. H1545-54.
88. Meera, P., et al., *A calcium switch for the functional coupling between alpha (hsl α) and beta subunits (KV,Ca beta) of maxi K channels*. *FEBS Lett*, 1996. **382**(1-2): p. 84-8.
89. Evanson, K.W., et al., *LRRC26 is a functional BK channel auxiliary gamma subunit in arterial smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2014. **115**(4): p. 423-31.
90. Tano, J.Y. and M. Gollasch, *Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 381.
91. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. *Science*, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
92. Siemen, D., et al., *Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **257**(2): p. 549-54.
93. Fukasawa, M., et al., *6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in rabbit hearts*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **326**(1): p. 100-4.
94. Deenadayalu, V., et al., *Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(1): p. H115-23.
95. Gragasin, F.S., et al., *The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels*. *FASEB J*, 2004. **18**(12): p. 1382-91.
96. Bentzen, B.H., et al., *Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury*. *Pflugers Arch*, 2009. **457**(5): p. 979-88.
97. Ardehali, H. and B. O'Rourke, *Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death*. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. **39**(1): p. 7-16.
98. Liao, Y., et al., *Neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels limit brain infarction and promote survival*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15601.
99. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **312**(2): p. 644-50.
100. Wang, X., et al., *Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(5): p. H2070-7.
101. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H434-40.
102. Jin, C., et al., *Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts*. *J Physiol Sci*, 2012. **62**(4): p. 325-32.
103. Singh, H., et al., *MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(26): p. 10836-41.
104. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A*. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 198-203.

105. Knaus, H.G., et al., *Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels*. *Biochemistry*, 1994. **33**(19): p. 5819-28.
106. Sanchez, M. and O.B. McManus, *Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 963-8.
107. Huhn, R., et al., *Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels*. *Br J Anaesth*, 2010. **105**(5): p. 589-95.
108. Smolenski, A., et al., *Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1998. **358**(1): p. 134-9.
109. Bioscience, T., *Certificate of Analysis - KT 5823*, in *Product information*. 2016. p. 2.
110. Inc., E.L.S., *Datasheet ADI-900-164*. 2017.
111. Frassdorf, J., et al., *Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels*. *Can J Anaesth*, 2010. **57**(8): p. 767-73.
112. Zimmer, H.G., *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. *News Physiol Sci*, 1998. **13**: p. 203-210.
113. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **303**(2): p. H156-67.
114. de Leiris, J., D.P. Harding, and S. Pestre, *The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischaemia*. *Basic Res Cardiol*, 1984. **79**(3): p. 313-21.
115. Sigg, D., et al., *Cardiac Electrophysiology - Methods and Models*. 2010, Springer US. p. 251-2.
116. Neely, J.R., et al., *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart*. *Am J Physiol*, 1967. **212**(4): p. 804-14.
117. Graf, B.M., et al., *Synthetic 8-ornithine-vasopressin, a clinically used vasoconstrictor, causes cardiac effects mainly via changes in coronary flow*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1997. **41**(3): p. 414-21.
118. Dobson, G.P., *On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003. **30**(8): p. 590-7.
119. Fukunami, M. and D.J. Hearse, *The inotropic consequences of cooling: studies in the isolated rat heart*. *Heart Vessels*, 1989. **5**(1): p. 1-9.
120. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 613-27.
121. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 940-50.
122. Schmitz-Spanke, S., et al., *[The isolated rabbit heart: comparison between five different modifications]*. *Herz*, 2002. **27**(8): p. 803-13.
123. Krebs, H.A., Henseleit, K., *Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper*. Vol. 11. 1932: Klinische Wochenschrift.
124. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003. **30**(11): p. 867-78.
125. Bing, R.J., *Some aspects of biochemistry of myocardial infarction*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(3): p. 351-5.
126. Gartner, K., et al., *Stress response of rats to handling and experimental procedures*. *Lab Anim*, 1980. **14**(3): p. 267-74.
127. Bratkovsky, S., et al., *Measurement of coronary flow reserve in isolated hearts from mice*. *Acta Physiol Scand*, 2004. **181**(2): p. 167-72.
128. Reichelt, M.E., et al., *Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model*. *Exp Physiol*, 2009. **94**(1): p. 54-70.

129. Hartley, C.J., et al., *Effects of isoflurane on coronary blood flow velocity in young, old and ApoE(-/-) mice measured by Doppler ultrasound*. *Ultrasound Med Biol*, 2007. **33**(4): p. 512-21.
130. Vogel, W.M., A.W. Cerel, and C.S. Apstein, *Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran*. *J Mol Cell Cardiol*, 1986. **18**(12): p. 1207-18.
131. Headrick, J.P., et al., *Functional properties and responses to ischaemia-reperfusion in Langendorff perfused mouse heart*. *Exp Physiol*, 2001. **86**(6): p. 703-16.
132. Schmidt, H., Hofmann, F., Stasch, J.-P., *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*. 2009, Springer. p. 214-216.
133. Francis, S.H., et al., *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. *Pharmacol Rev*, 2010. **62**(3): p. 525-63.
134. Ono, H., et al., *Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation*. *Am Heart J*, 2004. **148**(4): p. E15.
135. Group, I.S., *Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial*. *Lancet*, 2002. **359**(9314): p. 1269-75.
136. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(2): p. 299-310.
137. De Hert, S.G., et al., *Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients*. *Anesthesiology*, 2002. **97**(1): p. 42-9.
138. Belhomme, D., et al., *Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery*. *Circulation*, 1999. **100**(19 Suppl): p. II340-4.
139. Tomai, F., et al., *Beneficial impact of isoflurane during coronary bypass surgery on troponin I release*. *G Ital Cardiol*, 1999. **29**(9): p. 1007-14.
140. Cromheecke, S., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass*. *Anesth Analg*, 2006. **103**(2): p. 289-96, table of contents.
141. Guarracino, F., et al., *Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006. **20**(4): p. 477-83.
142. Das, A., et al., *PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer*. *Pharmacol Ther*, 2015. **147**: p. 12-21.
143. Hatzimouratidis, K. and D.G. Hatzichristou, *A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient?* *Drugs*, 2005. **65**(12): p. 1621-50.
144. Hatzimouratidis, K. and D. Hatzichristou, *Phosphodiesterase type 5 inhibitors: the day after*. *Eur Urol*, 2007. **51**(1): p. 75-88; discussion 89.
145. Padma-nathan, H., et al., *A 4-year update on the safety of sildenafil citrate (Viagra)*. *Urology*, 2002. **60**(2 Suppl 2): p. 67-90.
146. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(3): p. H1398-406.
147. Reffelmann, T. and R.A. Kloner, *Effects of sildenafil on myocardial infarct size, microvascular function, and acute ischemic left ventricular dilation*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(2): p. 441-9.
148. Milano, G., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition mimics intermittent reoxygenation and improves cardioprotection in the hypoxic myocardium*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27910.

149. Madhani, M., et al., *Phospholemman Ser69 phosphorylation contributes to sildenafil-induced cardioprotection against reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(3): p. H827-36.
150. Koneru, S., et al., *Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6B): p. 2651-64.
151. Fusco, F., et al., *Sildenafil effect on the human bladder involves the L-cysteine/hydrogen sulfide pathway: a novel mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors*. Eur Urol, 2012. **62**(6): p. 1174-80.
152. Dikmen, A., di Villa Bianca, R., Mitidieri, E., Donnarumma, E., Sevin, G., Cirino, G., Sorrentino, R., Yetik-Anacak, G., *New mechanism for the beneficial effect of sildenafil on erectile function: H2S. Nitric Oxide*, 2013. **31**(2): p. 38.
153. Oger, S., et al., *Signalling pathways involved in sildenafil-induced relaxation of human bladder dome smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(5): p. 1135-43.
154. Heinen, A., et al., *Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway*. Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 99-105.
155. Shintani, Y., et al., *Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(6): p. 1213-8.
156. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A*. Exp Gerontol, 2012. **47**(1): p. 116-21.
157. Wulf, A. and A. Schwab, *Regulation of a calcium-sensitive K⁺ channel (clK1) by protein kinase C*. J Membr Biol, 2002. **187**(1): p. 71-9.
158. Das, A., et al., *Protein kinase C plays an essential role in sildenafil-induced cardioprotection in rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(4): p. H1455-60.
159. Thebaud, B., et al., *Sildenafil reverses O₂ constriction of the rabbit ductus arteriosus by inhibiting type 5 phosphodiesterase and activating BK(Ca) channels*. Pediatr Res, 2002. **52**(1): p. 19-24.
160. Kukreja, R.C., et al., *Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases*. Exp Clin Cardiol, 2011. **16**(4): p. e30-5.
161. Wang, X., et al., *Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(1): p. 105-13.
162. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. J Gen Physiol, 2014. **144**(5): p. 415-40.
163. Cao, C.M., M. Chen, and T.M. Wong, *The K(Ca) channel as a trigger for the cardioprotection induced by kappa-opioid receptor stimulation -- its relationship with protein kinase C*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(7): p. 984-91.
164. Gao, Q., et al., *Opening the calcium-activated potassium channel participates in the cardioprotective effect of puerarin*. Eur J Pharmacol, 2007. **574**(2-3): p. 179-84.
165. Lai, M.H., et al., *BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **307**(9): p. H1327-38.
166. Stockand, J.D. and S.C. Sansom, *Mechanism of activation by cGMP-dependent protein kinase of large Ca(2+)-activated K⁺ channels in mesangial cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1669-77.
167. Murthy, K.S., *Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 1): p. 199-208.
168. Burkhardt, M., et al., *KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33536-41.

169. Hidaka, H. and R. Kobayashi, *Pharmacology of protein kinase inhibitors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1992. **32**: p. 377-97.
170. Ferdinandy, P., *Myocardial ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: effects of hypercholesterolaemia/hyperlipidaemia*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(2): p. 283-5.
171. Ferdinandy, P., R. Schulz, and G.F. Baxter, *Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(4): p. 418-58.
172. Ferdinandy, P., et al., *Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(4): p. 1142-74.
173. de Tejada, I.S., *Therapeutic strategies for optimizing PDE-5 inhibitor therapy in patients with erectile dysfunction considered difficult or challenging to treat*. Int J Impot Res, 2004. **16 Suppl 1**: p. S40-2.
174. Basu, A. and R.E. Ryder, *New treatment options for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus*. Drugs, 2004. **64**(23): p. 2667-88.
175. Leinwand, L.A., *Sex is a potent modifier of the cardiovascular system*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 302-7.
176. Ostadal, B. and P. Ostadal, *Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 541-54.
177. Lee, T.M., et al., *Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+)Channels in canine hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(7): p. 1147-58.
178. Ostadal, B., et al., *Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(9): p. 1011-9.
179. Duvall, W.L., *Cardiovascular disease in women*. Mt Sinai J Med, 2003. **70**(5): p. 293-305.
180. Song, X., et al., *Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(4): p. 459-66.
181. Cao, Z., et al., *Sex differences in the mechanism of Met5-enkephalin-induced cardioprotection: role of PI3K/Akt*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H302-10.
182. Turcato, S., et al., *Ischemic preconditioning depends on age and gender*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(3): p. 235-43.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Inge Bauer für die nahe und direkte Betreuung und die kritischen und konstruktiven Anregungen. Besonders danken möchte ich für die Unterstützung und die Geduld in den letzten Phasen vor Fertigstellung der Dissertation.

Ich danke meinen Betreuern Frau Dr. med. Friederike Behmenburg, Herrn PD Dr. Dr. med. Huhn-Wientgen aus der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie Herrn Dr. Dr. med. A. Heinen aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf (zu Beginn meiner Arbeit ebenfalls an der Klinik für Anästhesiologie tätig) für die Überlassung des Themas. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und mir ständig mit Rat und Tat zur Seite standet!

Außerdem danke ich Frau Claudia Dohle für die tatkräftige Unterstützung im Labor während der Versuche und der anschließenden Auswertung.

Ebenso danke ich Anika Schmidt für die Einarbeitung in die Eigenarten der Langendorff-Anlage, die Handhabung der Tiere und das Beibringen der technischen Feinheiten, die für das gute Gelingen unabdingbar waren.

Maximilian Dierkes danke ich für die Gestaltung interessanter, kurzweiliger und informativer Versuchstage und die aufmunternden Worte und Ideen, wenn es doch nicht so lief, wie es sollte.

Den Kollegen des Labors danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die ständige Diskussionsbereitschaft und die netten Gespräche.

Fabian Haase danke ich für die Unterstützung der grafischen Gestaltung.

Worte allein können die Dankbarkeit nicht ausdrücken, die ich für meine Eltern und meine Schwester empfinde, ohne deren Rückhalt, Bestätigung, Aufmunterung und auch finanzielle Unterstützung mein Medizinstudium und

diese Arbeit niemals möglich geworden wären. Ohne euch hätte ich diesen Weg nicht bestreiten können.

Mein letzter Dank gilt Miriam Schäfer, die immer für mich da ist und mich in jeder Situation vorbehaltlos unterstützt. Ich kann mir eine Zeit ohne dich an meiner Seite nicht vorstellen.