

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

Die Bedeutung von Connexin 43 bei der durch Proteinkinase A-
Aktivierung induzierten Kardioprotektion

Dissertation

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

vorgelegt von

Anika Susanne Falk

2020

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Hug Aubin

Ich brauche keine Superhelden

Ich habe eine Schwester

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen, A., Ströthoff, M., Schmidt, A., Stracke, N., Behmenburg, F., Bauer, I., Hollmann, M. & Huhn, R. (2014). Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA–BKCa signaling pathway. *Experimental Gerontology*, (56), 99-105.

Zusammenfassung

Die Bedeutung von Connexin 43 bei der durch Proteinkinase A-Aktivierung induzierten Kardioprotektion

Die Kardioprotektion durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) wird über mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle (mK_{Ca} -Kanäle) reguliert und ist im Alter aufgehoben. Weder die PKA noch die mK_{Ca} -Kanäle und deren *downstream pathway* unterliegen alterungsbedingten Veränderungen. Dies deutet darauf hin, dass die Signalvermittlung von der PKA zum mK_{Ca} -Kanal über Zwischenschritte vermittelt wird, welche alterungsbedingten Veränderungen unterliegen. Das Transmembranprotein Connexin 43 (Cx43) ist eine mögliche Komponente der Signalkaskade, die für diesen alterungsabhängigen Effekt verantwortlich sein könnte. Das Ziel dieser Studie war, die mögliche Beteiligung von Cx43 bei der durch PKA-Aktivierung bedingten Kardioprotektion zu untersuchen.

Die Versuche wurden an isolierten Herzen von männlichen Wistar-Ratten durchgeführt (6 Versuchsgruppen, alle Gruppen $n=8$). Mit Hilfe einer Langendorff-Anlage wurden die Herzen bei einem Druck von 80 mmHg mit einem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Nach einer globalen Ischämie von 33 Minuten folgte eine einstündige Reperfusionsphase. Im Anschluss wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt. Die Kontrollgruppe (con) blieb unbehandelt. Der PKA-Aktivator Forskolin (for; $0,3 \mu M$) wurde acht Minuten vor Beginn der Ischämie über einen Zeitraum von drei Minuten appliziert. Die Cx43-Inhibitoren gap27 (gap27; $6 \mu M$) bzw. Heptanol (hep; $0,5 mM$) wurden alleine (gap27 bzw. hep) oder in Kombination mit Forskolin (gap27+for bzw. hep+for), beginnend zwölf Minuten vor der Ischämiephase über acht Minuten appliziert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit ANOVA zur Varianzanalyse und *Tukey's post hoc* test zur Signifikanztestung ($p < 0,05$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Die PKA-Aktivierung durch Forskolin führte zu einer Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (for: $26 \pm 6 \%$, vs. con: $37 \pm 8 \%$; $p < 0,05$). Im Gegensatz hierzu zeigte Forskolin nach Blockade von Cx43 durch entweder gap27 oder Heptanol keinen signifikanten infarktgrößenreduzierenden Effekt (gap27+for $33 \pm 7 \%$; hep+for $30 \pm 6 \%$; vs. con: $37 \pm 8 \%$, jeweils $p > 0,05$). Die alleinige Gabe von gap27 oder Heptanol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße (gap27: $32 \pm 7 \%$; hep: $32 \pm 6 \%$; vs. con: $37 \pm 8 \%$, $p > 0,05$). In Bezug auf die Hämodynamik zeigten sich am Ende der Reperfusionsphase keine signifikanten Unterschiede in den Versuchsgruppen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cx43 an der Signaltransduktion der Forskolin-induzierten Kardioprotektion beteiligt ist.

Summary

The role of Connexin 43 in protein kinase A-induced cardioprotection

Cardioprotection by activation of protein kinase A (PKA) is regulated by mitochondrial calcium-sensitive potassium channels (mK_{Ca} channels) and is abolished in old age. Neither the PKA nor the mK_{Ca} channels and their downstream pathway are subject to age-related changes. This indicates that signal transduction from the PKA to the mK_{Ca} channel is mediated through intermediate steps, that are subject to age-related changes. The transmembrane protein connexin 43 (Cx43) is a potential component of the signaling cascade that might be responsible for this age-related effect. The aim of the study was to investigate the possible involvement of Cx43 in PKA activation-induced cardioprotection.

The experiments were carried out on isolated hearts of male Wistar rats (6 experimental groups, all groups n= 8). Using a Langendorff system, the hearts were perfused with a Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. After a global ischemia of 33 minutes, a one-hour period of reperfusion followed. Subsequently, the infarct size was determined by means of triphenyltetrazolium chloride staining. The control group (con) remained untreated. The PKA activator forskolin (for, 0.3 μ M) was administered 8 minutes before the onset of ischemia over a period of 3 minutes. The Cx43 inhibitors gap27 (gap27, 6 μ M) and heptanol (hep, 0.5 mM) were administered alone (gap27 or hep) or in combination with forskolin (gap27+for or hep+for) starting twelve minutes before the ischemic phase and applied for 8 minutes. Statistical analysis of the data was done with ANOVA for analysis of variance and Tukey's post hoc test for significance testing ($p < 0.05$). The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Forskolin-induced PKA activation reduced infarct size in comparison to the control group (for: 26 ± 6 % vs. con: 37 ± 8 %; $p < 0.05$). In contrast, after blocking Cx43 by either gap27 or heptanol, forskolin did not show a significant effect on reducing infarct size (gap27+for 33 ± 7 %, hep+for 30 ± 6 %, vs. con: 37 ± 8 %; $p > 0.05$, respectively). The sole administration of gap27 or heptanol had no significant effect on infarct size (gap27: 32 ± 7 %, hep: 32 ± 6 %, vs. con: 37 ± 8 %; $p > 0.05$). In terms of hemodynamics, there were no significant differences in the experimental groups at the end of the reperfusion phase. The results indicate that Cx43 is involved in signal transduction of forskolin-induced cardioprotection.

Abkürzungsverzeichnis

AoP	Aortaler Druck
ATP	Adenosintriphosphat
bpm	<i>beats per minute</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Koronarfluss
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
con	Kontrollgruppe
Cx43	Connexin 43
dP/dt max	maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit
dP/dt min	minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit
for	Forskolin
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
hep	Heptanol
HF	Herzfrequenz
IE	Internationale Einheit
kDa	Kilodalton
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
mg/kgKG	Milligramm/Kilogramm Körpergewicht
min	Minute

mK_{Ca}	mitochondrialer calciumsensitiver Kaliumkanal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PTCA	<i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>
RCI	<i>respiratory control index</i>
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPP	<i>Rate pressure product</i>
SAFE	<i>Survivor Activation Factor Enhancement</i>
SD	Standardabweichung
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die akute Myokardischämie	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3	Ischämie- und Reperfusionsschäden	2
1.1.4	Therapie des akuten Myokardinfarktes	4
1.2	Kardioprotektion	5
1.2.1	Einführung	5
1.2.2	Präkonditionierungsstrategien	5
1.2.3	Mechanismen der Kardioprotektion	7
1.3	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Puffer und Chemikalien	13
2.1.1	Krebs-Henseleit-Puffer	13
2.1.2	Forskolin	14
2.1.3	gap27	14
2.1.4	Heptanol	15
2.1.5	Pentobarbital	15
2.1.6	Heparin	16
2.2	Versuchsaufbau	16
2.2.1	Die Langendorff-Anlage	16
2.2.2	Versuchstiere	21
2.2.3	Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers	22
2.2.4	Vorbereitung der Langendorff-Anlage	22
2.2.5	Präparation und Organentnahme	22

2.2.6	Fixierung und Vorbereitung des Herzens	23
2.3	Versuchsdurchführung	24
2.3.1	Hämodynamische Variablen	24
2.3.2	Versuchsprotokoll	25
2.3.3	Versuchsgruppen	27
2.4	Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung	28
2.5	Statistische Auswertung	30
2.6	Verwendete Geräte, Materialien, Gase und Chemikalien	30
3	Ergebnisse	34
3.1	Infarktgrößenauswertung	34
3.2	Gewicht	35
3.3	Hämodynamische Variablen	36
3.3.1	Herzfrequenz und Koronarfluss	36
3.3.2	Linksventrikuläre Funktionsvariablen	39
3.3.3	Kontraktilitätsvariablen	44
4	Diskussion	47
4.1	Forskolin, mK_{Ca} -Kanal und Kardioprotektion	47
4.2	Alterungsbedingter Wirkverlust der Kardioprotektion	49
4.3	Connexin 43-Inhibitoren und Infarktgröße	53
4.4	Hämodynamik Auswertung	55
4.5	Diskussion der Methodik	56
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	58
5	Literaturverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Die akute Myokardischämie

1.1.1 Epidemiologie

Ischämische Herzerkrankungen sind in den westlichen Industrieländern von enormer medizinischer und gesellschaftlicher Relevanz. Im Jahr 2017 lag 37 % der Todesfälle in Deutschland eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems zugrunde [1]. Im gleichen Jahr verstarben insgesamt 46966 Menschen an einem akuten Myokardinfarkt, einer der wesentlichen Folgen einer ischämischen Herzerkrankung [2]. Im Laufe der letzten Jahrzehnte zeichnete sich ein Rückgang der Inzidenz und Letalität des Myokardinfarkts ab. Allerdings beträgt die 28-Tage-Letalitätsrate nach einem Myokardinfarkt in der Altersgruppe zwischen 25 und 84 Jahren immer noch 45,9 % bei Männern und 55,9 % bei Frauen [3]. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen neben erheblichen individuellen Krankheitsfolgen auch enorme gesellschaftliche Krankheitskosten. Im Jahr 2017 betrugen die Krankheitskosten durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen 46,4 Milliarden Euro und somit 13,7% der Gesamtausgaben im Gesundheitswesen [4]. Insgesamt zeigen diese Daten, dass einer weiteren Verbesserung der Prävention und Behandlung des akuten Myokardinfarkts eine große Bedeutung zukommt.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es durch einen plötzlichen Verschluss einer Koronararterie zu einer reduzierten bis fehlenden Durchblutung des durch die Koronararterie versorgten Myokardareals. Ein solcher Gefäßverschluss kann beispielsweise durch einen Thrombus bedingt sein. Eine anhaltende Unterbrechung der Sauerstoffversorgung im Myokard führt zu einem Gewebeuntergang, der sogenannten Infarzierung. Die entstandenen nekrotischen Areale können nicht regenerieren und führen zu einer kontraktilen Funktionsstörung des Herzens. Eine schnellstmögliche

Wiederherstellung der Blutversorgung des betroffenen Areal ist daher von entscheidender Bedeutung [5]. Abhängig von Ausmaß und Dauer der ischämischen Phase können unterschiedliche Syndrome auftreten: *Hibernation*, *Stunning* oder Infarkt [6].

Die aktive Anpassung des Energieverbrauchs des Herzens durch Reduktion der myokardialen kontraktilen Funktion wird als *Hibernation* bezeichnet. Rahimtoola beschrieb dieses Phänomen in den frühen achtziger Jahren erstmals bei Patienten, die aufgrund einer koronaren Herzkrankheit eine Bypassoperation erhielten. Durch eine Verringerung des myokardialen Energieverbrauchs ist das Herz fähig, trotz des verminderten Sauerstoffangebots eine ausreichende Pumpfunktion zu gewährleisten und eine Nekrose zu vermeiden. Die *Hibernation* ist ein reversibler Prozess, bei welchem es zu einer Erholung der kontraktilen Funktion kommt [7-9].

Unter *Stunning* wird eine prolongierte myokardiale Dysfunktion nach kurzzeitiger Ischämie und sofortiger Reperfusion verstanden. Die Durchblutung und die Funktion des Myokards sind während der Ischämie stark eingeschränkt. In der Reperfusion wird die Durchblutung wieder vollständig hergestellt. Die kontraktile Funktion regeneriert sich abhängig von der Dauer der vorherigen Ischämiephasen [10, 11]. Ist eine bleibende Schädigung im Myokard entstanden, spricht man von einem Myokardinfarkt. Die Myokardnekrose führt zu einer eingeschränkten kontraktilen Funktion des Herzens. Sie entwickelt sich etwa 20 Minuten nach einem Koronarverschluss und erreicht ihr maximales Ausmaß nach etwa sechs Stunden [5]. Die Infarktgröße ist ein entscheidender Faktor für die Prognose des Patienten [12].

1.1.3 Ischämie- und Reperfusionsschäden

Das Ausmaß der myokardialen Gewebeschädigung, das heißt die Infarktgröße, wird pathophysiologisch nicht nur durch die Ischämiedauer und den während der Ischämie entstandenen Schaden bestimmt, sondern auch durch einen weiteren Gewebeuntergang während der frühen Reperfusion, dem sogenannten Reperfusionsschaden [13].

Die Pathophysiologie der Gewebeschädigung ist durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen bedingt. Beteiligt sind hierbei Ionenkanäle, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Entzündungsmechanismen und endotheliale Dysfunktion [14-17].

Durch eine Unterbrechung des Blutflusses und der Sauerstoffzufuhr wird ein Myokardinfarkt induziert. Durch den Sauerstoffmangel wird der Stoffwechsel in den Zellen von einer aeroben Energiegewinnung (oxidative Phosphorylierung, β -Oxidation) auf eine anaerobe Energiegewinnung umgestellt. Dies führt zu einer Akkumulation von Laktat, Protonen und ROS in der Zelle, es kommt zu einer Gewebsazidose. Im anaeroben Energiestoffwechsel werden pro mol Glucose nur noch drei statt 38 mol Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen. Dieser zelluläre Energiemangel führt zu einer Abnahme der myokardialen Kontraktion. Die Akkumulation von Laktat, Protonen und ROS führt darüber hinaus zu einer Beeinflussung der kardialen Natriumkanäle. Unter physiologischen Bedingungen öffnen sich diese Ionenkanäle zu Beginn eines Aktionspotentials der Herzmuskelzelle für wenige Millisekunden. Bei einer Myokardischämie kommt es zu einem späteren und längeren Natriumeinstrom mit resultierender intrazellulärer Akkumulation von Natrium [18-20]. Hohe intrazelluläre Natriumkonzentrationen bewirken über eine Umkehr des Natrium/Calcium-Austauschers eine vermehrte intrazelluläre Calciumkonzentration. Der Natrium/Calcium-Austauscher befördert unter physiologischen Bedingungen das Calcium aus der Zelle hinaus. Während der Ischämie kommt es zu einer Umkehr der Transportrichtung und Calcium wird in die Zelle transportiert. Die resultierende Calciumüberladung bedingt eine gestörte diastolische Relaxation mit einer hieraus resultierenden Erhöhung der myokardialen Wandspannung. Daraus ergeben sich Mikrozirkulationsstörungen mit reduzierter Sauerstoffversorgung [19, 21-23].

Durch das Wiedereinsetzen des Blutflusses nach einer Ischämiephase wird dem Myokard jedoch weiterer Schaden zugefügt. Diese wegweisende Erkenntnis wurde im Jahr 1960 erstmalig von Jennings et al. als Reperfusionsschaden beschrieben [13]. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass bis zu 50 % der endgültigen Myokardnekrose durch den Reperfusionsschaden bedingt ist [24]. In der einsetzenden Reperfusionsphase kommt es zu einer schnellen Normalisierung des durch die Ischämiephase bedingten azidotischen pH-Wertes mit folgender letaler Schädigung der Myozyten [25]. Zusätzlich trägt eine vermehrte ROS-Produktion zur Entstehung des Reperfusionsschadens bei [14, 15].

Zudem können in der frühen Reperfusionsphase durch eine Thrombozytenaggregation bzw. Thrombozytenaktivierung Mikroembolien verursacht werden, welche zu einer Reduktion der Gewebepерfusion führen können [26]. Darüber hinaus kommt es durch die Expression von proinflammatorischen, prokoagulatorischen und

vasokonstriktorisches Entzündungsmediatoren zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, die eine zusätzliche Schädigung des Herzmuskels bedingt [16, 17].

Obwohl, wie bereits dargestellt, in der Reperfusionphase zusätzlicher Gewebeschaden am Myokard entsteht, ist die Wiederherstellung der Reperfusion das oberste therapeutische Ziel bei der Infarkttherapie, da ein anhaltender Verschluss der Koronararterien zu einem vollständigen Gewebeuntergang am Myokard führt.

1.1.4 Therapie des akuten Myokardinfarktes

Zur Verringerung des Ischämie- und Reperfusionsschadens ist es entscheidend, die Blutversorgung in dem betroffenen Myokard durch Reperfusionstherapien schnellstmöglich wiederherzustellen und somit die Ischämiezeit zu minimieren.

Eine mögliche Behandlungsoption ist die medikamentös durchgeführte Lyse des Thrombus. Mit Hilfe von Aktivatoren der Fibrinolyse, z.B. Streptokinase, wird der Thrombus aufgelöst und die Durchblutung wiederhergestellt. Diese Rekanalisation ist in 70-80 % der Fälle erfolgreich. Mögliche Nebenwirkungen der Lysetherapie sind lebensbedrohliche Blutungskomplikationen und allergische Reaktionen [27, 28].

Eine weitere Reperfusionstherapie ist die PTCA (*percutaneous transluminal coronary angioplasty*). Hierbei wird ein Katheter, an dessen Ende sich ein Ballon befindet, bis in die betroffene Koronararterie vorgeschoben. Ein Aufblasen des Ballons führt zu einer Aufweitung des stenotischen Gefäßabschnitts. Eine anschließende Stentimplantation verringert die Restenoserate. Mögliche Komplikationen des Verfahrens sind eine Fehlpositionierung des Stents, Seitastverschlüsse und ein Stentverlust mit resultierender Stentembolie [29, 30].

Bei einer Bypassoperation wird die Koronarstenose durch eine direkte Verbindung zwischen Aorta, bzw. aortennaher Arterie und dem Koronargefäß umgangen. Häufig wird die linke *A. thoracica interna* als arterielles Verbindungsstück verwendet. Die Operation birgt ein hohes Risiko, sowohl für chirurgische, als auch für anästhesiologische Komplikationen. Die zehnjährige Wiederverschlussrate beträgt 50 % [30].

1.2 Kardioprotektion

1.2.1 Einführung

Neben den zuvor beschriebenen Therapien zur Wiederherstellung der Gewebepfusion, könnte die Anwendung kardioprotektiver Interventionen zur Minimierung des Ischämie- und Reperfusionsschadens beitragen. Diese Interventionen zielen darauf ab, die Toleranz des Herzens gegenüber einer myokardialen Ischämie- und Reperfusionssituation zu steigern. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Kardioprotektion durch Präkonditionierung.

1.2.2 Präkonditionierungsstrategien

Es gibt verschiedene Präkonditionierungsstrategien, wie beispielsweise die ischämische oder pharmakologische Präkonditionierung. Bei der ischämischen Präkonditionierung wird durch vorausgehende kurzzeitige myokardiale Ischämiephasen die Ischämietoleranz des Herzens in Bezug auf nachfolgende Ischämieereignisse gesteigert. Murry und Kollegen beschrieben dieses Phänomen erstmalig im Jahr 1986 bei ihren Untersuchungen an Hundeherzen. Vier Zyklen mit jeweils fünfminütiger Ischämie und anschließender Reperusionsphase, vor dem Eintritt einer längeren folgenden Ischämiephase, konnten die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ischämische Präkonditionierung um 75 % senken [31].

Die Erstbeschreibung der *remote ischemic preconditioning* (RIPC) erfolgte 1993 durch Przyklenk et al.. In einem Kaninchenmodell konnten sie zeigen, dass kurzzeitige Ischämieepisoden, ausgelöst durch einen rezidivierenden Verschluss der Koronararterie, das Myokard vor einer nachfolgenden anhaltenden Ischämie schützen [32].

Die oben beschriebene protektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung konnte im Tiermodell auch auf andere Organsysteme, beispielsweise Niere oder Leber, angewendet werden, was auf ein potentiell hohes klinisches Potential hindeutet [33, 34]. Allerdings ist die klinische Anwendbarkeit gering, da die Initiierung der Ischämie wenig praktikabel und aufgrund ihrer hohen Invasivität stark risikobehaftet erscheint. Vor diesem Hintergrund erscheint das Prinzip der herzfernen RIPC interessant, mit welchem sich im Laufe der letzten Jahre mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten.

Hierbei wird die Ischämie nicht am Zielorgan selbst induziert, sondern an herzfernen Körperregionen, beispielsweise am Oberarm des Patienten [35-40]. Eine solche Extremitätenischämie ist zum Beispiel unter Verwendung einer Oberarmmanschette einfach, risikoarm und kostengünstig durchzuführen.

Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die RIPC eine klinische Relevanz haben könnte; allerdings ist die Datenlage zur Wirksamkeit von RIPC widersprüchlich.

Es gibt tierexperimentelle Daten, die auf die Effizienz von RIPC hinweisen. 1996 zeigten Gho et al., dass eine Fernkonditionierung von Niere und Dünndarm das Myokard schützt [41]. 1997 unterstrichen Birnbaum et al. die Bedeutung der RIPC, indem sie zeigten, dass eine Präkonditionierung der Skelettmuskulatur einer Extremität einen protektiven Effekt auf das Myokard bewirkt [42].

Zudem konnten auch klinische Studien die Effizienz von RIPC nachweisen. Es wurde gezeigt, dass RIPC bei Patienten, die erstmalig eine koronare Bypassoperation erhielten, einen protektiven Einfluss auf das Herzmuskelgewebe ausübt und die Prognose der Patienten verbessert [40, 43].

Des Weiteren zeigte sich bei notfallmäßig und elektiv durchgeführten perkutanen koronaren Interventionen der positive Effekt der RIPC-Methode [44-46].

Dem entgegen stehen die Ergebnisse zweier kürzlich veröffentlichter Studien, der RIPHeart-Studie [47], und der ERICCA-Studie [48]. In beiden Studien wurde die Kardioprotektion durch ischämische Fernkonditionierung im Rahmen herzchirurgischer Operationen untersucht und es zeigte sich kein protektiver Effekt durch RIPC.

Zusammengefasst gibt es starke Hinweise auf eine Wirksamkeit der RIPC. Trotz einiger gegensätzlicher Ergebnisse (RIPHeart, ERICCA) zeigt die Mehrzahl der Studien einen positiven Effekt der RIPC. Es handelt sich um ein interessantes und klinisch potentiell relevantes Phänomen, dessen molekulare Grundlage bisher nicht vollständig aufgeklärt ist.

Neben einer ischämischen Präkonditionierung können auch verschiedene pharmakologische Stimuli eine kardiale Präkonditionierung initiieren. Einen solchen Effekt können sowohl volatile Anästhetika, wie beispielsweise Isofluran [49, 50], Desfluran [51], Sevofluran [51], Halothan [52], als auch die Edelgase Helium [53] und das anästhetisch wirksame Xenon [54, 55] haben. Neben den oben genannten volatilen Anästhetika und den Edelgasen wurde auch in der Gruppe der Opiode eine präkonditionierende Wirkung nachgewiesen. Schultz et al. zeigten, dass eine Präkonditionierung mittels Morphin die Infarktgröße in demselben Ausmaß reduzieren

kann, wie eine ischämische Präkonditionierung [56]. Ein weiterer präkonditionierender Effekt wurde für die aus der Gruppe der Phosphodiesterasehemmer kommenden Substanzen Sildenafil [57], Tadalafil [58] und Vardenafil [57] beschrieben.

1.2.3 Mechanismen der Kardioprotektion

Überblick

Auch wenn die exakten Signalwege der verschiedenen Präkonditionierungsformen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, gibt es deutliche Hinweise auf eine gemeinsame molekulare Endstrecke. Insbesondere in der Regulation der mitochondrialen Funktion ist im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke der Effektor der verschiedenen Präkonditionierungsformen zu sehen.

Pagliari et al. veröffentlichten im Jahr 2000 eine Übersichtsarbeit, die die Komplexität der verschiedenen möglichen Signalwege der Kardioprotektion aufzeigt. Hierbei werden drei Hauptsignalwege dargestellt: 1) der cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP)/ Proteinkinase G (PKG)-Signalweg, 2) der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg und 3) der *Survivor Activation Factor Enhancement* (SAFE)-Signalweg. Die verschiedenen Signalkaskaden laufen in einer gemeinsamen Endstrecke im Mitochondrium zusammen, wobei in einer Inhibition der Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) ein Endeffektor der Kardioprotektion gesehen wird [59].

Die mPTP ist ein unspezifischer Kanal der Mitochondrienmembran, dessen Öffnung es in den ersten Minuten der Reperfusionsphase Molekülen mit einer Größe von bis zu 1,5 kDa ermöglicht, die Membran zu passieren. Dadurch kommt es zu einem Abfall des Membranpotentials, einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit folgendem ATP-Verlust und nekrotischem Zelluntergang [60].

Zusätzlich zu erwähnen ist der an der mitochondrialen Membran von Kardiomyozyten gelegene ATP-abhängige Kaliumkanal. Dieser ist zwar nicht das Endglied der Signalkaskade, kann jedoch durch die Beeinflussung des ROS/RNS-Systems (*reaktive oxygen species/ reactive nitrogen species–System*) die Kardioprotektion fördern [61].

Neben den bereits erwähnten Strukturen ist ein weiterer mitochondrialer Kanal von Bedeutung, der mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanal (mK_{Ca}). Die Existenz des mK_{Ca}-Kanals in Kardiomyozyten wurde im Jahr 2002 erstmals beschrieben, wobei Xu und Mitarbeiter zeigen konnten, dass die Öffnung des mK_{Ca}-Kanals einen kardioprotektiven Effekt hat [62].

mK_{Ca}-Kanal, Kardioprotektion und alterungsbedingter Wirkverlust

Die Aktivierung der mK_{Ca}-Kanäle führt nicht nur zur Regulierung mitochondrialer Vorgänge, sondern auch zur Kardioprotektion [63].

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der mK_{Ca}-Kanal Bestandteil einer kardioprotektiven Signalkette durch das Edelgas Helium ist [53]. Als Endpunkt wurde in dieser Studie die Infarktgröße nach einer myokardialen Ischämie- und Reperfusion bestimmt. Heinen et al. verwendeten als mK_{Ca}-Kanal-Blocker Iberiotoxin. Es konnte gezeigt werden, dass Helium in jungen Rattenherzen die Infarktgröße reduziert. Dieser Effekt konnte durch eine mK_{Ca}-Kanal-Blockade aufgehoben werden. In der Versuchsgruppe der älteren Herzen war kein protektiver Effekt nachweisbar. Somit wurde gezeigt, dass die Kardioprotektion des Heliums durch mK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird und im Alter aufgehoben ist [53].

In der Studie konnte nicht nur gezeigt werden, dass der Effekt der Infarktgrößenreduktion durch Helium in alten Herzen nicht mehr vorhanden ist, sondern auch, dass die Gabe von Helium zu einer Modulation der mitochondrialen Funktion führte. Helium induzierte eine geringgradige Entkopplung von oxidativer Phosphorylierung und Atmungskettenaktivität, was durch einen Abfall des *respiratory control index* (RCI) gezeigt werden konnte. Da der mK_{Ca}-Kanal-Blocker Iberiotoxin diesen Effekt aufhob, scheint der durch Helium induzierte Effekt über eine Öffnung dieser Kanäle vermittelt zu werden. Interessanterweise hatte Helium keinen Effekt auf die Funktion von Mitochondrien aus Herzen alter Versuchstiere, in welchen auch kein infarktgrößenreduzierender Effekt nachweisbar war.

Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass eine Ursache des alterungsbedingten Wirkverlustes in einer alterungsabhängigen Veränderung der mK_{Ca}-Kanalfunktion oder in dem mK_{Ca}-Kanal vorangeschalteten Signalweg zu sehen sein könnte [64].

Ursachen des alterungsbedingten Wirkverlusts der Kardioprotektion

Ausgehend von der Hypothese, dass der alterungsbedingte Wirkverlust möglicherweise auf Höhe des mK_{Ca} -Kanals und/oder *upstream* lokalisiert ist, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Im Jahr 2012 konnte gezeigt werden, dass der direkte mK_{Ca} -Kanal Aktivator NS1619, die Infarktgröße sowohl in jungen, als auch in alten Herzen verringert [65]. Dies deutet darauf hin, dass die mK_{Ca} -Kanalfunktion auch in alten Herzen intakt ist und die Ursache des Wirkungsverlustes im *upstream pathway* liegt (Abb. 1).

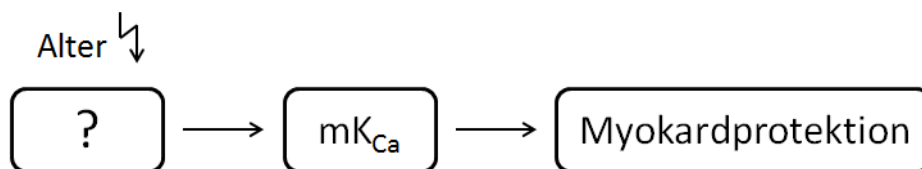


Abb. 1: Mögliche Signalkaskade des alterungsbedingten Wirkverlusts der Kardioprotektion

Der alterungsbedingte Wirkverlust der Kardioprotektion ist in einem Anteil der Signalkaskade zu finden, die dem mK_{Ca} -Kanal vorgeschaltet ist.

Als möglicher *upstream* Regulator des Kanals wurde im Jahr 2012 die Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine PKA-Aktivierung durch den Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin eine Kardioprotektion in jungen, jedoch nicht in alten Rattenherzen bewirkt [65].

Zur Untersuchung eines möglichen alterungsbedingten Wirkverlusts der PKA, wurde in einer weiteren Studie als Marker der PKA-Aktivität, die Phosphorylierung des Phospholambans, eines Substrats der PKA, gemessen. Die Analyse ergab, dass die PKA keinen alterungsbedingten Veränderungen unterliegt. Der alterungsbedingte Verlust der Kardioprotektion ist somit wahrscheinlich nicht durch die PKA bedingt [66]. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Signalvermittlung von der PKA zum mK_{Ca} -Kanal über Zwischenschritte vermittelt wird, welche alterungsbedingten Veränderungen unterliegen (Abb. 2).

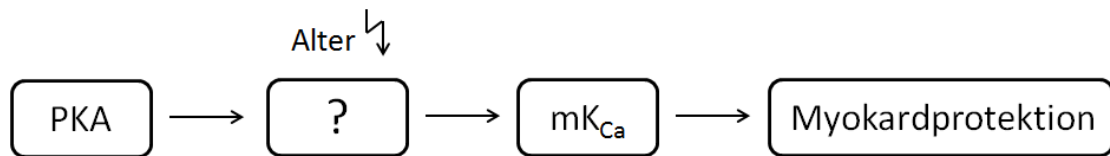


Abb. 2: PKA-mK_{Ca}-Signalweg mit alterungsabhängigem Zwischenschritt

Connexin 43

Connexin 43 (Cx43) gehört zu den Transmembranproteinen. Insgesamt sind 21 verschiedene Isoformen des Connexin bekannt sind. Sie werden nach ihrer jeweiligen molekularen Masse klassifiziert. Cx43 beispielsweise besitzt eine molekulare Masse von 43kDa. Die Connexine bestehen aus vier Transmembrandomänen, die durch eine intrazelluläre und zwei extrazellulären Schlaufen verbunden sind. Darüber hinaus besitzen sie eine N- und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne [67, 68]. Eine schematische Darstellung der Struktur des Connexins, sowie eines Halbkanals und einer *gap junction* ist in Abbildung 3 erkennbar.

Connexine sind in einer Hexameter-Form angeordnet und bilden einen sogenannten Halbkanal mit zentraler Pore, der als Connexon bezeichnet wird. Zwei Kopf-an-Kopf verbundene Connexone bilden einen *gap junction*-Kanal. Dieser ermöglicht einen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt. Ungepaarte Halbkanäle fungieren als Membrankanäle, ähnlich Ionenkanälen. Es ist bekannt, dass Connexine sowohl als *gap junctions*, als auch als Halbkanäle auftreten können. *Gap junctions* im Herzen bestehen vor allem aus Connexin 40, Cx43 und Connexin 45, wobei das Cx43 das dominierende Protein darstellt [68-70].

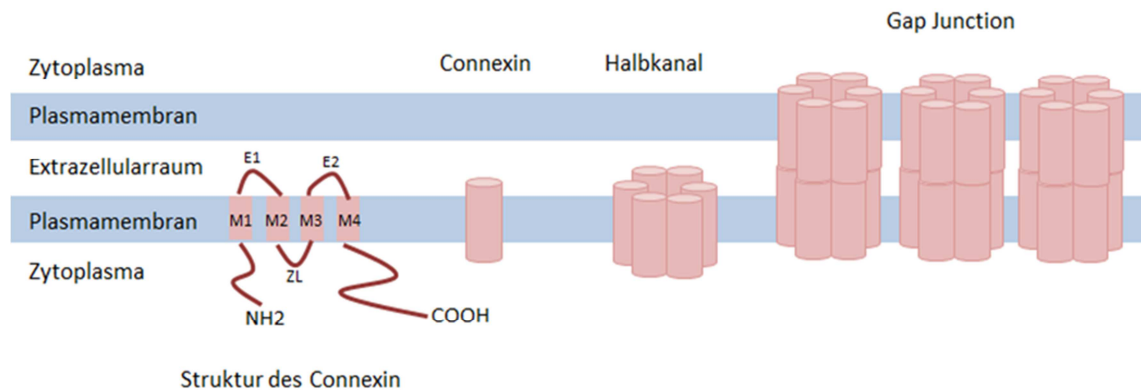


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Struktur des Connexins, eines Halbkanals und einer gap junction

Es konnte gezeigt werden, dass Cx43 eine Phosphorylierungsstelle für die PKA besitzt und als proximaler Regulator der mK_{Ca} -Kanäle fungieren kann [71]. Zudem konnten Boengler et al. im Jahr 2007 zeigen, dass das mitochondriale Cx43 an kardioprotektiven Mechanismen der Präkonditionierung beteiligt ist. Somit könnte Cx43 als gesuchter Zwischenschritt der Signalkaskade von Bedeutung sein [53, 71-73].

Interessanterweise kommt es mit zunehmendem Lebensalter zu einer Abnahme des kardiomyozytären Cx43-Gehaltes, was einen alterungsbedingten Wirkverlust kardioprotektiver Interventionen erklären könnte [74]. Das Transmembranprotein Cx43 ist daher eine mögliche Komponente der Signalkaskade, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnte.

1.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Signalkaskade der Kardioprotektion experimentell untersucht. In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurde eine mögliche Grundstruktur der Signalkaskade entwickelt, welche die Grundlage der Hypothese meiner Dissertationsarbeit darstellt. Die Forschungsergebnisse zeigten, dass weder die PKA noch die mK_{Ca} -Kanäle und deren *downstream pathway* alterungsbedingten Veränderungen unterliegen. Dies deutet darauf hin, dass die Signalvermittlung von der PKA zum mK_{Ca} -Kanal über Zwischenschritte vermittelt

wird, welche alterungsbedingten Veränderungen unterliegen. Das Transmembranprotein Cx43 ist eine mögliche Komponente der Signalkaskade, die für diesen alterungsabhängigen Effekt verantwortlich sein könnte (Abb. 4). Die Voruntersuchungen der Forschungsgruppe zur Signalkaskade führten zu der Fragestellung meiner Dissertation:

Ist Cx43 an der Signaltransduktion der durch PKA-Aktivierung bedingten Kardioprotektion beteiligt?

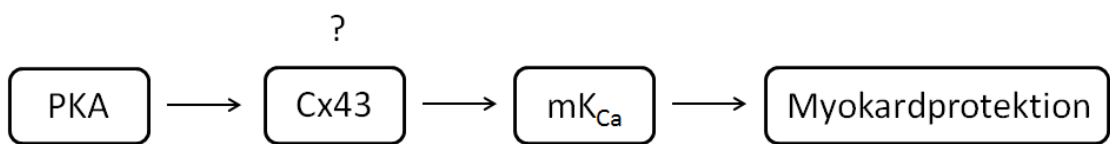


Abb. 4: Fragestellung der Dissertationsarbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche an isolierten Herzen von männlichen Wistar-Ratten mit Hilfe einer Langendorff-Anlage durchgeführt. Nach einer 33-minütigen Ischämie folgte eine einstündige Reperfusionsphase. Im Anschluss wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung bestimmt. Die Aktivierung der PKA erfolgte durch Forskolin, die Bedeutung von Cx43 wurde durch den Einsatz zweier pharmakologischer Cx43-Inhibitoren untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Chemikalien

2.1.1 Krebs-Henseleit-Puffer

Für die Versuche an der Langendorff-Apparatur verwendeten wir einen Krebs-Henseleit-Puffer (KHB), dessen Elektrolytzusammensetzung sich an den physiologischen Blutplasmakonzentrationen orientierte. Durch Verwendung dieser Perfusionslösung wurde es dem isolierten Herzen ermöglicht, für mehrere Stunden an der Langendorff-Anlage weiter zu schlagen, was eine entscheidende Voraussetzung für die experimentellen Versuche am isolierten Herzen ist. Die Zusammensetzung des KHBs kann Tabelle 1 entnommen werden.

Substanz (Strukturformel)	Molekülmasse [g/mol]	Stoffmenge [mM]
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	118
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	4,7
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	246,48	1,2
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	136,09	1,2
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	84,01	25
Ethylendiaminetetraacetic acid ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	292,2	0,5
Calciumchlorid (CaCl_2)	110,99	2,25
Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180,16	11
Lactat ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)	90,08	1
Pyruvat ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$)	110,04	0,1

Tabelle 1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers

mM= Millimolar

2.1.2 Forskolin

Mit Hilfe des Adenylylcyclase-Aktivators Forskolin benutzten wir einen indirekten Ansatz zur Aktivierung der PKA. Es handelte sich hierbei um einen Wirkstoff, der direkt aus der Pflanze *Coleus forskohlii* extrahiert wurde und nicht um synthetisch hergestelltes Forskolin. Forskolin ist ein weißes Pulver, welches für die Versuche als Stock in Dimethylsulfoxid aufgelöst wurde. In Abbildung 5 ist die Strukturformel von Forskolin dargestellt.

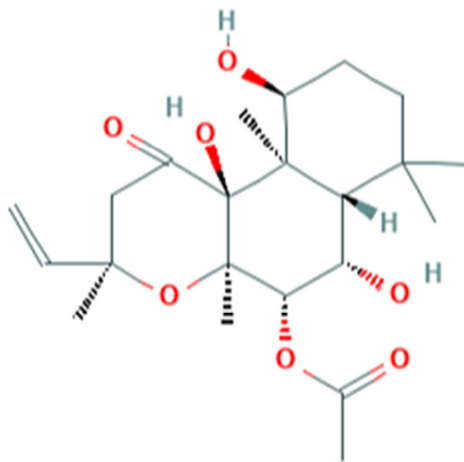


Abb. 5: Strukturformel von Forskolin $C_{22}H_{34}O_7$ [75]

2.1.3 gap27

Die Substanz gap27 ist ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz Ser-Arg-Pro-Thr-Glu-Lys-Thr-Ile-Phe-Ile-Ile. In dieser Studie fungierte es als Inhibitor des Transmembranproteins Cx43 [76]. Gap27 ist ein *Connexin mimetic peptide*, das mit Sequenzen der zwei extrazellulären Schleifen des Cx43 übereinstimmt. Gap27 hat sowohl eine spezifische Wirkung auf die durch Cx43 ausgebildeten *gap junctions*, als auch auf die Halbkanäle [77].

2.1.4 Heptanol

Heptanol diente neben gap27 als weiterer Inhibitor des Cx43 [76]. Heptanol ist ein reversibler, nicht selektiver Cx43-Inhibitor [78, 79]. Es handelt sich um eine farblose, schwer wasserlösliche Flüssigkeit mit intensivem Geruch. Es wurde in Anlehnung an die Forschungsergebnisse von Gysembergh in einer Konzentration von 0,5 mM verwendet [80].

2.1.5 Pentobarbital

Für die Anästhesie der Versuchstiere verwendeten wir in unseren Experimenten das aus der Gruppe der Barbiturate stammende Pentobarbital. Die Substanz bindet an die β -Untereinheit der γ -Aminobuttersäure (GABA)-A-Rezeptoren und führt über einen zunehmenden Chlorid-Einstrom zu einer verstärkten Wirkung des inhibitorischen Transmitters GABA. Darüber hinaus kommt es zu einer Hemmung des exzitatorischen Glutamat-Rezeptors [81]. Mit einer Wirkdauer von vier bis acht Stunden zählt es zu den mittellang wirkenden Barbituraten. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 15-48 Stunden. Die Wirkung von Pentobarbital ist stark dosisabhängig. In geringen Dosen besitzt das Medikament eine sedative, in mittleren Dosen eine hypnotische und in hohen Dosen eine narkotische Eigenschaft. Darüber hinaus wirkt es antikonvulsiv und besitzt in subnarkotischer Dosierung eine hyperalgetische Eigenschaft. In der Humanmedizin wird es heutzutage nur noch nach strenger Indikationsstellung im Bereich der Epilepsie angewendet. Ein Einsatz als Schlafmittel ist aufgrund der starken Nebenwirkungen, sowie einer starken Abhängigkeitssymptomatik bei chronischer Anwendung nicht mehr indiziert [81]. Im Bereich der Tiermedizin ist Pentobarbital Mittel der Wahl zur Euthanasie von Tieren. Eine bewusste Überdosierung dieses Narkotikums führt zu einem schnellen und stressarmen Eintritt des Todes. Die dafür verwendete Injektionsart ist variabel, das Medikament kann sowohl intravenös als auch intraperitoneal, intrakardial oder intrapulmonal verabreicht werden [82]. In der vorliegenden Studie wurde Pentobarbital intraperitoneal in einer Dosis von 80 mg/kgKG eingesetzt. In dieser Dosierung wurde eine sedative bis hypnotische Wirkung erzielt.

2.1.6 Heparin

In der Phase nach Tötung des Tieres und vor Beginn der Myokardperfusion an der Langendorff-Apparatur bestand aufgrund der Blutstase das Risiko intrakoronarer Thromben, welche zu einer Einschränkung der Myokardperfusion mit einer daraus resultierenden Gewebsschädigung führen könnten. Um die Entstehung von Thromben zu vermeiden, wurde dem Versuchstier prophylaktisch das Antikoagulanz Heparin injiziert. Heparin verstärkt im Komplex mit Antithrombin III dessen antikoagulatorische Wirkung um ein Vielfaches. Der Komplex inaktiviert zahlreiche Gerinnungsenzyme, wie zum Beispiel Faktor Xa, Faktor XIIa und Thrombin. In dieser Studie wurde Heparin mit einer Dosis von 1000 IE zeitgleich mit Pentobarbital dem Tier intraperitoneal injiziert [81].

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Die Langendorff-Anlage

Im Bereich der physiologischen, pharmakologischen und klinischen Forschung ist das isolierte Herz nach Langendorff eine seit vielen Jahrzehnten erfolgreich etablierte Methode. Die Langendorff-Anlage ermöglicht es, ein isoliertes Herz retrograd mit einer oxygenierten und nährstoffreichen Lösung zu perfundieren.

Im Jahr 1895 beschrieb Oscar Langendorff erstmals die *ex-vivo*-Organperfusion eines isolierten Herzens. Die vorherig beschriebenen Perfusionsmodelle wurden im Gegensatz zu Langendorffs Modell *in-vivo* durchgeführt. Carl Ludwig entwickelte im Jahr 1846 beispielsweise sein Modell der parabiotischen Koronarperfusion. Dieses wurde im Jahr 1889 durch Martin und Applegrath weiterentwickelt. Ihr Modell setzte einen vollständigen Lungenkreislauf zur Oxygenierung des Blutes voraus. Dabei verblieben Herz und Lunge während der Perfusion im Kadaver des Tieres [83]. Diese Apparatur gilt als unmittelbarer Vorreiter des Langendorff-Modells.

Im Jahr 1895 veröffentlichte Oscar Langendorff sein Modell zur Perfusion eines isolierten Herzens. Dabei wurde das Herz vollständig aus dem Kadaver des

Versuchstiers herausgenommen und auf eine Oxygenierung durch die Lunge verzichtet [84].

Dieses 1895 entwickelte Modell stellt die Grundlage der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Langendorff-Apparatur dar.

Hier wurde eine kommerziell erhältliche Langendorff-Anlage der Firma Panlab verwendet, die in Abbildung 6 abgebildet ist [85]. Funktionell bestand die verwendete Langendorff-Apparatur aus einem Perfusionssystem (Abb. 7+8: beinhaltet die Bauteile A, B und D der Abbildung 6) und einem Wärmekreislauf (Abb. 9: beinhaltet die Bauteile C, E, F und G der Abbildung 6).



Abb. 6: Hauptanlage der Langendorff-Apparatur

Beschriftungen der Anlage; A= Perfusatbehälter, B= Drei-Wege-Hahn, C= Verbindungsbox, D= Aortenkanüle, E= Wärmeverrichtung, F= Wärmebehälter, G= Heizstab, H= Drehregler für die Carbogenzufuhr; [85]

Das Perfusionssystem ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt und gewährleistet die Versorgung des Herzens mit Perfusat. In der Ischämiephase wurde das Perfusionssystem auf einen rezirkulierenden Modus umgestellt, um eine Auskühlung und Desoxygenierung des Herzens zu verhindern (Abb. 8).

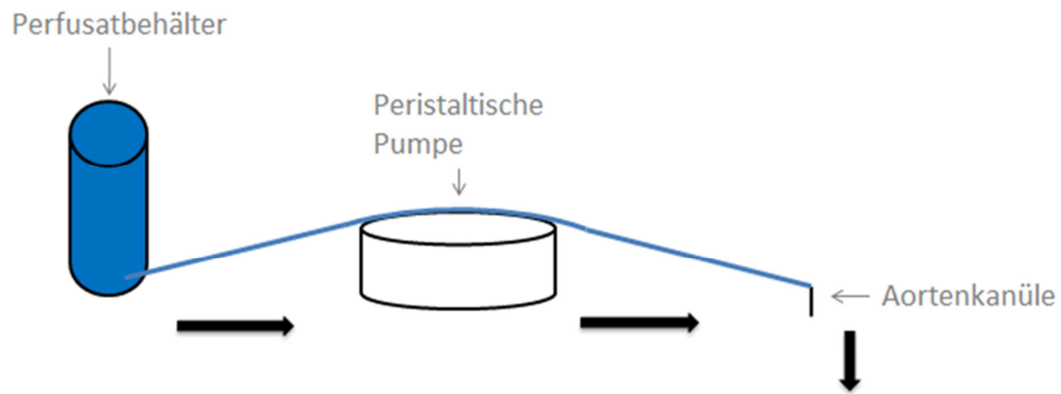


Abb. 7: Perfusionssystem

Perfusionssystem zur Versorgung des isolierten Herzens. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung des Perfusats an.

Im Perfusionssystem wurde der KHB aus dem Perfusatbehälter über die peristaltische Pumpe zur Aortenkanüle geleitet. Mit Hilfe eines Drehreglers ließ sich die Intensität der Carbogenzufuhr (5 % CO₂/95 % O₂) in den Perfusatbehälter variieren. Am unteren Ende der Aortenkanüle wurde das Herz positioniert und retrograd perfundiert. Zur Induktion der Myokardischämie wurde die Perfusion des Herzens durch Umlegen eines direkt proximal der Aortenkanüle gelegenen Drei-Wege-Hahns gestoppt. Um zu verhindern, dass es aufgrund einer Abkühlung des im Schlauchsystem befindlichen Perfusats während der Ischämiephase in der initialen Reperfusionsphase zu einer Perfusion mit hypothermem Perfusat kam, zirkulierte das Perfusat in einem Rezirkulationsmodus. Hierbei wurde der KHB aus dem Perfusatbehälter über die peristaltische Pumpe um den Drei-Wege-Hahn über der Aortenkanüle wieder zurück in den Perfusatbehälter geleitet. Eine schematische Darstellung dieses Rezirkulationsmodus kann Abbildung 8 entnommen werden.

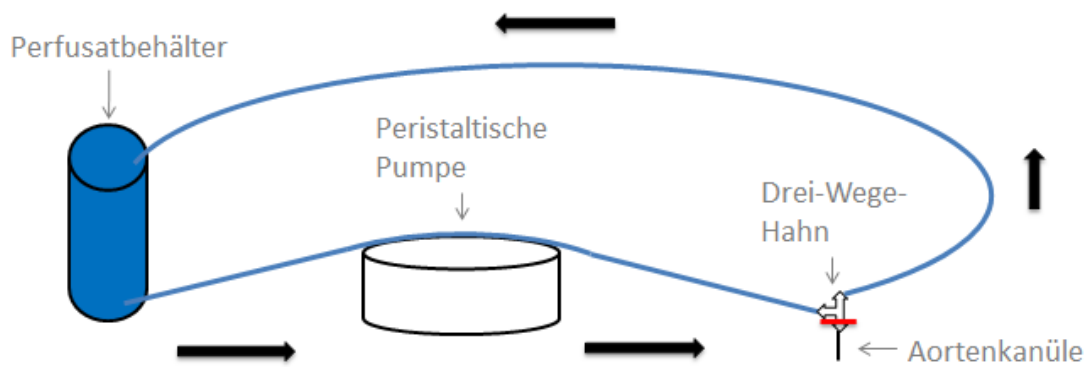


Abb. 8: Rezirkulationsmodus

Rezirkulationsmodus für die Ischämiephase der Experimente. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung des Perfusats an.

Um eine konstante Temperatur des KHBs während des Experimentes gewährleisten zu können, besaß die Langendorff-Apparatur neben dem Perfusionssystem auch einen Wärmekreislauf, dessen schematischer Aufbau der Abbildung 9 zu entnehmen ist. Ein Wärmebehälter mit integriertem Heizstab war mit destilliertem Wasser gefüllt und umgab den Perfusatbehälter. Über eine Pumpe wurde das beheizte destillierte Wasser aus dem Wärmebehälter in die Verbindungsbox und in die Wärmeverrichtung geleitet. Die Wärmeverrichtung erwärmte den Bereich um die Aortenkanüle. Das Thermostat wurde so eingestellt, dass die Temperatur an der Aortenkanüle zwischen 37,5 und 38 Grad Celsius betrug. Das Perfusat floss innerhalb der Verbindungsbox zur Aortenkanüle. Die Verbindungsbox war in den Wärmekreislauf integriert und konnte somit das Perfusat kurz vor Eintritt in die Aortenkanüle erwärmen.

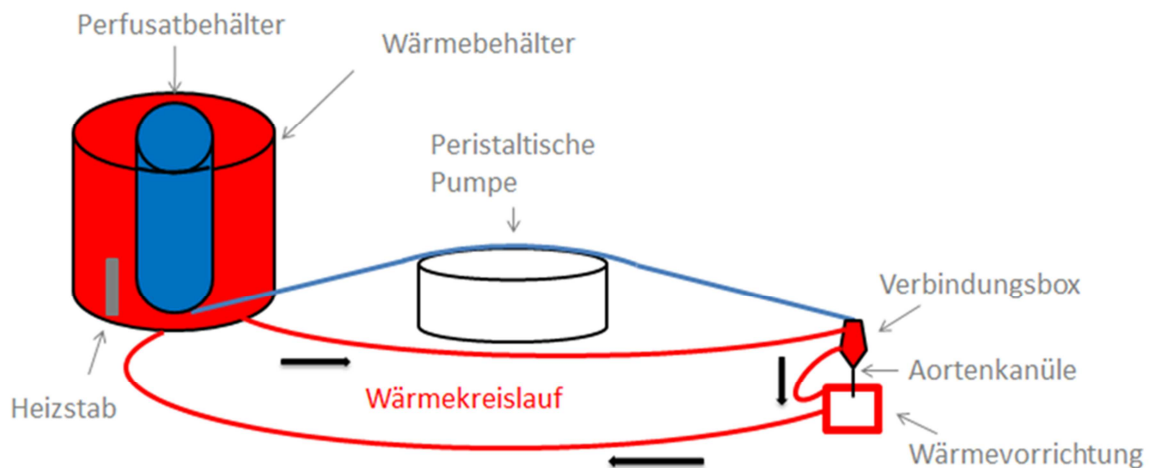


Abb. 9: Perfusionssystem und Wärmekreislauf

Perfusionssystem und Wärmekreislauf der Langendorff-Anlage. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung des Wärmekreislaufs an.

Die peristaltische Pumpe und der daran angeschlossene Pumpenregler ermöglichten eine Organperfusion unter konstantem Druck oder unter konstanten Flussbedingungen. In dieser Studie erfolgte die Perfusion mit einem konstanten Druck von 80 mmHg, wobei die Flussrate durch den Pumpenregler variabel angepasst wurde.

Im Bereich der Aortenkanüle wurde der Druck mit Hilfe eines angeschlossenen Druckaufnehmers und Druckwandlers gemessen und durch einen 8-Kanal-Datenschreiber erfasst. Die Daten wurden über den Computer (Aufzeichnungssoftware: Lab Chart 7 Reader) analysiert und die Pumpe reguliert. Bei Abfall des aortalen Druckes unter 80 mmHg wurde die Pumpgeschwindigkeit reguliert, um den Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten. Durch diesen Mechanismus wurde der Modus des druckkonstanten Systems ermöglicht. Die Eichung der Pumpgeschwindigkeit erfolgte über die Eichung des Flusses im System. Zur Messung der linksventrikulären Funktion wurde ein mit Flüssigkeit gefüllter Ballonkatheter (Abb. 10) an einen baugleichen zweiten Druckaufnehmer angeschlossen, dessen Signal im vorher beschriebenen Power Lab System amplifiziert und detektiert wurde.

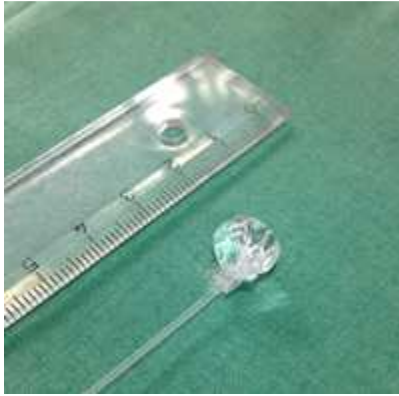


Abb. 10: Ballonkatheter

Ballonkatheter zur Messung der linksventrikulären Funktion

2.2.2 Versuchstiere

Für die Experimente an der Langendorff-Anlage wurden 48 männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 300 g verwendet. Sie stammten entweder aus der hauseigenen Tierzucht der Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf oder sie wurden von einem externen Zulieferer (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle Saint Berthevin Cedex, France) bestellt und in die ZETT Düsseldorf geliefert (Internes Aktenzeichen der ZETT: O 27/12). Ein zwölf Stunden Tag-Nacht-Wechsel wurde durch eine künstliche Beleuchtung (weißes Kunstlicht, Intensität 300-320 Lux) ermöglicht. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen vorgeschriebener Größe, auf entkeimtem Weichholzgranulat (Fa. Rettenmaier & Söhne GmbH u. CoKG, Rosenberg, Deutschland) gehalten. Ein geregeltes Klima, eine konstante Raumtemperatur zwischen 20 und 24 Grad Celsius und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % zählten darüber hinaus zu der konventionellen und standardisierten Tierhaltung der ZETT Düsseldorf. In den Tierkäfigen hatten die Tiere *ad libitum* Zugang zu Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse, Ssniff R/M-Haltung, 10 mm, Fs. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und entkeimtem (ozonisiertes, mit HCL angesäuertem) Wasser mit einem pH-Wert zwischen 2,6 und 3,0. Als Versuchstiere wurden ausschließlich die Tiere herangezogen, die keine Krankheitsanzeichen aufwiesen. Bei externen Tieren wurde eine Adaptationszeit von mindestens 24 Stunden eingehalten.

2.2.3 Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers

Um einem Bakterienwachstum sowie Elektrolytschwankungen vorzubeugen und Kristallisierungsprozesse zu vermeiden, welche zu Embolien im Herzen führen könnten, wurde der KHB an jedem Versuchstag frisch angesetzt. Alle in Tabelle 1 aufgelisteten Substanzen wurden in destilliertem Wasser unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst.

2.2.4 Vorbereitung der Langendorff-Anlage

Vor jedem Versuch wurden die Druckaufnehmer geeicht. Im offenen Perfusatkreislauf wurde die Anlage gespült und anschließend wurde der Perfusatbehälter mit Puffer gefüllt und mit Hilfe von Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % CO₂) begast. Die Oxygenierung des Perfusats war obligat zur Sauerstoffversorgung des isolierten Herzens. Gleichzeitig stellte sich durch den CO₂-Anteil des Carbogens der pH-Wert nahe dem physiologischen Bereich auf 7,40-7,45 ein. Vor Versuchsbeginn wurden alle im System vorhandenen Luftblasen entfernt. Sowohl die Druckaufnehmer als auch der Ballonkatheter wurden nochmals auf mögliche Luftblasen kontrolliert.

2.2.5 Präparation und Organentnahme

Durch eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kgKG Pentobarbital (Verdünnung 1:10, Injektionsvolumen 1,5 ml) wurde das Tier anästhesiert. Eine zusätzliche Koagulationsprophylaxe erhielt das Tier durch eine intraperitoneale Injektion von 1000 IE Heparin. Sobald das Tier keine Reaktion (Kornealreflex, Schmerzreiz) mehr zeigte, wurde es durch Dekapitation mittels Guillotine getötet. Nach der Dekapitation wurde das Tier an Extremitäten und Schwanz auf dem Operationstisch fixiert. Durch einen horizontalen Hautschnitt unterhalb des Schwertfortsatzes, wurde die Bauchhöhle des

Tieres offen gelegt. Der Thorax wurde durch einen transversalen Schnitt entlang des Brustbeines eröffnet, wobei die Rippen direkt an ihrem Ansatz am Sternum, rechtsseitig durchgeschnitten wurden. Die Benutzung eines Thoraxspalters ermöglichte einen besseren Zugang zu den Thoraxorganen. Mit Hilfe einer stumpfen Pinzette wurde das Herz von der Thoraxwand und dem Zwerchfell präpariert. Nach der Diaphragmatomie und Perikardiotomie wurde das Herz an der Herzbasis circa zwei Zentimeter aus dem Thorax herausgehoben. Dadurch wurden die Leitungsbahnen des Herzens sichtbar und das Herz konnte durch einen horizontalen Schnitt an der *Aorta ascendens* abgesetzt werden. Das Organ wurde in eine mit Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gefüllte Petrischale gelegt. Es folgte eine feine Präparation mit Entfernung eventuell vorhandener Organreste, wie z.B. von Trachea, Ösophagus, Perikard oder Lunge zur Darstellung der Aorta. Die Präparationen und auch die Organentnahme sollten sicher und innerhalb von 30 Sekunden erfolgen, um einer möglichen Traumatisierung des Gewebes sowie einer verlängerten Ischämiezeit entgegenzuwirken.

2.2.6 Fixierung und Vorbereitung des Herzens

Die Kanülierung der Aorta erfolgte mit Hilfe zweier atraumatischer Pinzetten. Der Aortenstumpf wurde gefasst und leicht auseinandergezogen, sodass er bis über die Fixierungsrille der Aortenkanüle gestülpt werden konnte. Die endgültige Fixierung des Herzens an der Kanüle erfolgte durch eine Fadenligatur mittels eines Polyesterfadens zwischen dem ersten Abgang des *Arcus aortae* und den Koronarostien. Die Perfusion des Herzens erfolgte retrograd durch die Aorta und führte zum druckbedingten Schluss der Aortenklappe. Das Perfusat floss aus der Aortenkanüle über die Koronarien in das Herzgewebe hinein und über den *Sinus coronarius* aus dem Herzen heraus in ein Auffangbecken. Um den Ballonkatheter in den linken Ventrikel einführen zu können, wurde die Spitze des linken Herzhohres eingeschnitten. Durch das eröffnete Herzhohr wurde eine atraumatische Pinzette eingeführt und die Öffnung leicht gedehnt. Der zusammengefaltete Ballon wurde anschließend durch das Herzhohr in den linken Vorhof und durch die Mitralklappe hindurch in den linken Ventrikel geführt. Über eine mit destilliertem Wasser gefüllte Spritze wurde der Ballon entfaltet. Das Ballonvolumen

diente der Simulation der Vorlast des Herzens. Das Volumen wurde so gewählt, dass ein enddiastolischer Druck von 3-8 mmHg erzielt wurde.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Hämodynamische Variablen

Wie zuvor beschrieben, wurde die Flussgeschwindigkeit des Perfusats, welche dem Koronarfluss (CF) entspricht, kontinuierlich aufgezeichnet. Über den Druckaufnehmer an der Aortenkanüle wurde der Perfusionsdruck im System gemessen. Der Perfusionsdruck entspricht dem aortalen Druck (AoP). Der zweite Druckaufnehmer war mit dem Ballonkatheter verbunden und zeichnete den linksventrikulären Druck auf. Aus dieser Druckaufzeichnung wurden der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) bestimmt. Des Weiteren wurden die Messgrößen Herzfrequenz (HF), minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}), maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) und *rate pressure product* (RPP) bestimmt (Tabelle 2).

Messgröße	Messeinheit	Beschreibung
Koronarfluss (CF)	ml/min	
AoP	mmHg	Aortaler Druck = Perfusionsdruck
LVSP	mmHg	Linksventrikulärer systolischer Druck
LVEDP	mmHg	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
Herzfrequenz (HF)	Schläge/min	
Linksventrikulärer entwickelter Druck (LVDP)	mmHg	LVDP= LVSP-LVEDP
Minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt min)	mmHg	Maß der diastolischen Funktion
Maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt max)	mmHg	Maß der systolischen Funktion
Rate pressure product (RPP)	bpm*mmHg	HF* LVDP= Maß der Arbeitsbelastung des Herzens

Tabelle 2: Hämodynamische Variablen

Angabe der Messgröße mit Messeinheit und Beschreibung, ml/min= Milliliter pro Minute, mmHg= Millimeter-Quecksilbersäule, bpm= Schläge/min

2.3.2 Versuchsprotokoll

Das Herz wurde an die Langendorff-Apparatur überführt und in der Stabilisierungsphase 20 Minuten druckkonstant perfundiert. War ein regelmäßiger Herzrhythmus und ein LVDP von über 60 mmHg nachweisbar, konnte das Herz in die Versuchsreihe aufgenommen werden. Es folgte eine zwölfminütige Applikationsphase. Ein genaues Versuchsprotokoll beschrieb den Zeitpunkt, die Dauer und das zu applizierende Medikament je nach Versuchsgruppe. Der Versuchsplan sah sechs Versuchsgruppen mit jeweils acht Versuchen vor. Nach der Applikationsphase begann die 33-minütige Ischämiephase. Die Langendorff-Anlage wurde dafür vom Perfusionsmodus in den Rezirkulationsmodus umgestellt, wodurch das Herz nicht mehr mit Perfusat versorgt wurde. Um eine konstante Temperatur während der Ischämie zu gewährleisten, wurde das Herz in eine 0,9 %-ige NaCl-Lösung eingetaucht, welche auf 37 Grad Celsius gehalten wurde. Nach einer Ischämiedauer von 33 Minuten wurde

durch eine Umstellung auf den Perfusionsmodus die Reperfusion initiiert. Am Ende der 60-minütigen Reperfusionsphase wurde das Herz an der Herzbasis abgesetzt und in einer fünf Milliliter-Spritze bei -80 Grad Celsius eingefroren. Die Versuchsdauer von Beginn der Stabilisierungsphase bis zum Ende der Reperfusionsphase betrug in allen Versuchsgruppen 125 Minuten. Während des Experiments wurden die hämodynamischen Variablen kontinuierlich aufgezeichnet und im Anschluss an das Experiment verschiedene Zeitpunkte nach festem Protokoll analysiert. Abbildung 11 zeigt den Versuchsablauf mit den einzelnen Versuchsphasen und den Zeitpunkten der Hämodynamikauswertung.

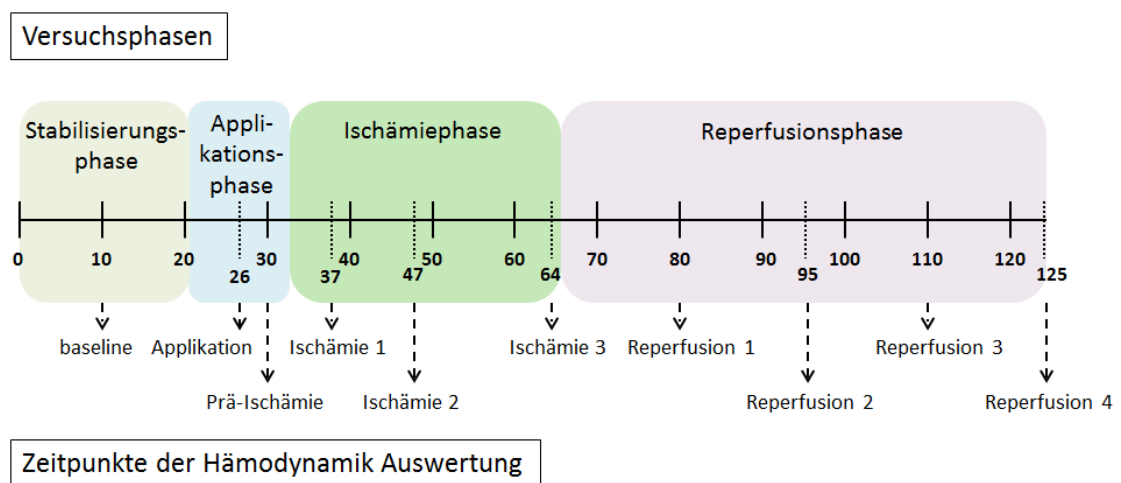


Abb. 11: Versuchsablauf

Dargestellt sind die Versuchsphasen und die Zeitpunkte der Hämodynamikauswertung. Angabe in Minuten.

Zu Beginn der Reperfusionsphase konnte es zum Auftreten von Herzrhythmusstörungen kommen. Herzen, welche zwischen Minute 75 und 85 des Experiments eine andauernde Arrhythmie aufwiesen, wurden durch Verwendung eines Pacers stimuliert. Hierbei erfolgte die Stimulation für maximal drei Sekunden und fünf Wiederholungen innerhalb des beschriebenen Zeitraums.

2.3.3 Versuchsgruppen

Die sechs Versuchsgruppen (n= 8 pro Gruppe) hatten eine identische Stabilisierungsphase (20 min), Ischämiephase (33 min) und Reperfusionsphase (60 min). Die Applikationsphase variierte (Abb. 12). Im Folgenden wird auf die verschiedenen Variationen der Applikationsphase eingegangen. Die angegebenen Substanzen wurden mit Hilfe zweier Perfusoren direkt in die Verbindungsbox, unmittelbar proximal der Aortenkanüle, appliziert.

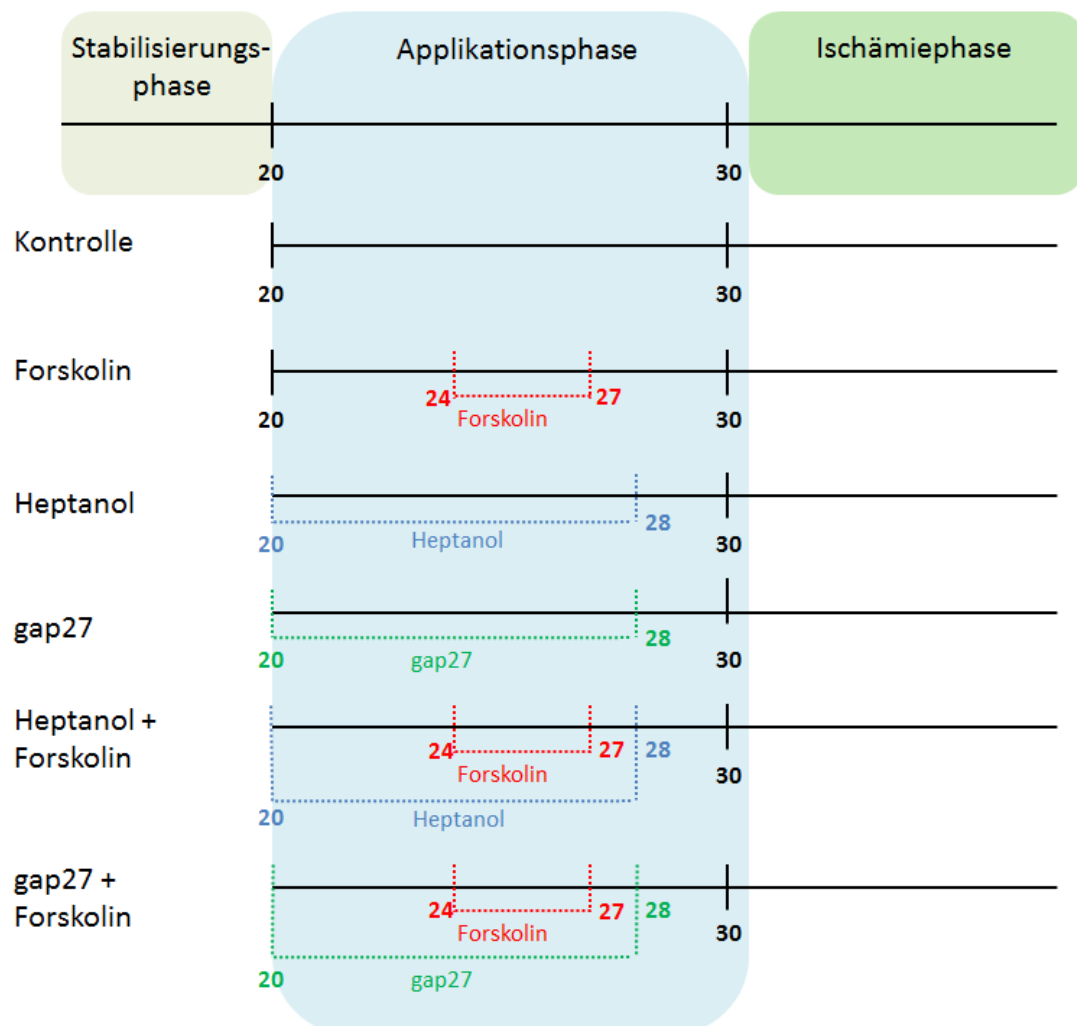


Abb. 12: Applikationsphase der sechs Versuchsgruppen

Die Herzen der Kontrollgruppe blieben in der Applikationsphase unbehandelt. Um den Effekt einer PKA-Aktivierung auf die Infarktgröße zu untersuchen, wurde Forskolin (0,3 μ M) ab Minute 24 des Experiments über eine Zeitdauer von drei Minuten appliziert. Die Bedeutung von Cx43 im Rahmen der Forskolin-induzierten Kardioprotektion wurde durch zusätzliche Verwendung zweier Connexin-Inhibitoren (Heptanol, gap27) getestet. In der Heptanol+Forskolingruppe wurden die Substanzen Heptanol (0,5 mM) und Forskolin (0,3 μ M) innerhalb der Applikationsphase verabreicht. Heptanol wurde in Minute 20 des Experimentes für eine Dauer von acht Minuten appliziert und Forskolin wurde ab der 24. Minute des Versuches für eine Dauer von drei Minuten appliziert. In der gap27+Forskolingruppe wurden die Substanzen gap27 (6 μ M) und Forskolin (0,3 μ M) in der Applikationsphase verabreicht. Gap27 wurde in Minute 20 des Experiments für eine Dauer von acht Minuten und Forskolin wurde ab der 24. Minute des Versuches für eine Dauer von drei Minuten appliziert. Um zu überprüfen, ob die alleinige Blockade durch Heptanol oder gap27 einen Effekt auf die Infarktgröße hatte, wurden Versuche mit alleiniger Applikation der Cx43-Inhibitoren durchgeführt. In der Heptanolgruppe wurde Heptanol (0,5 mM) über eine Dauer von acht Minuten ab Minute 20 appliziert. In der gap27-Gruppe wurde gap27 (6 μ M) ab Minute 20 des Experiments für eine Dauer von acht Minuten verabreicht.

2.4 Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Nach Versuchsende wurden die Herzen von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und anschließend bei -80°C eingefroren. Zur Analyse der Infarktgrößen wurde die TTC-Färbung verwendet. 1981 wurde diese Methode zur präzisen Unterscheidung von vitalem und avitalem Gewebe etabliert. Durch eine Reaktion der im vitalen Gewebe vorhandenen Dehydrogenasen mit dem Tetrazoliumsalz der Färbelösung entstand ein dunkelrotes Formazanpigment. Somit erschien nach der Färbung vitales Gewebe rot und geschädigtes, stoffwechselinaktives Gewebe weiß (Abb. 13) [86, 87].

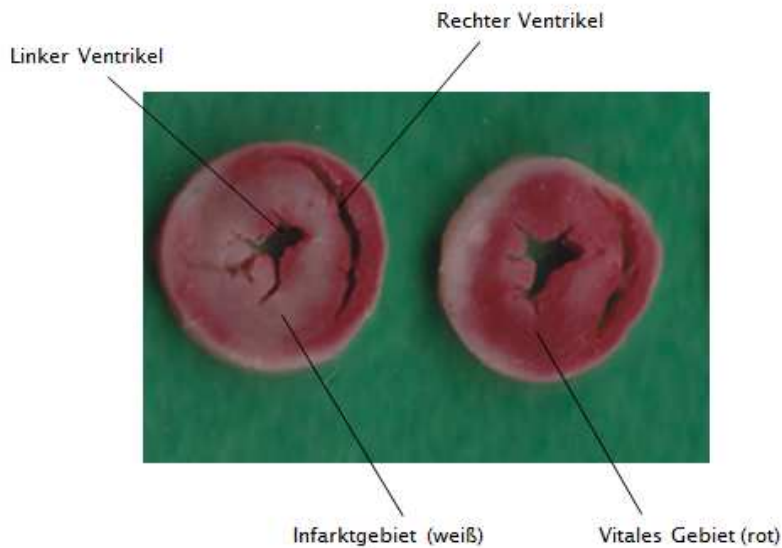


Abb. 13: Sichtbare Infarktareale nach der Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Unterscheidung Infarktgebiet und vitales Gewebe. Darstellung des linken und rechten Ventrikels. Linke Herzscheibe exemplarisch aus der Kontrollgruppe. Rechte Herzscheibe exemplarisch aus der Forskolingruppe.

Zur Herstellung der 0,75 %-igen TTC- Farblösung wurden TTC und Sigma 7-9 Puffer in 100 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 37 Grad Celsius erhitzt und unter Verwendung von Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,42 titriert. Die eingefrorenen Herzen wurden millimeterweise aus der Spritze herausgeschoben und in circa ein Millimeter dicke Herzscheiben geschnitten. Diese wurden in einer Färbeschale in 500 µl TTC-Lösung für 15 Minuten in einem Wärmeschrank bei 37 Grad inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Herzscheiben für einen Zeitraum von vier Stunden mit einer vierprozentigen Formaldehydlösung (Verdünnung mit Leitungswasser) fixiert.

Zur Auswertung der Infarktareale wurden die Herzscheiben eingescannt und mit Hilfe des Programmes Sigma Scan Pro 5 verblindet analysiert. Zur Analyse der Gesamtfläche des Infarktes, wurde das avitale Gewebe des Risikogebietes des linken Ventrikels (=area at risk) umzeichnet. Hierbei wurde das Verhältnis des gemessenen avitalen Gewebes zur Gesamtfläche des Risikogebiets des linken Ventrikel gesetzt. Die Infarktgröße wird in Prozent des Risikoareals berechnet.

2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Mittels SigmaStat ®Version 3.5 und Microsoft Excel® erfolgte die statistische Auswertung und graphische Darstellung. Die Infarktgrößen wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem *Tukey's post hoc test* analysiert. Die gemessenen hämodynamischen Variablen wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem *Tukey's post hoc test* analysiert. Es wurden die einzelnen Gruppen und die verschiedenen Zeitpunkte untereinander verglichen. Unterschiede galten als statistisch signifikant, wenn $p \leq 0,05$ war.

2.6 Verwendete Geräte, Materialien, Gase und Chemikalien

In Tabelle 3 sind die Bestandteile der Langendorff-Anlage, in Tabelle 4 die verwendeten Laborgeräte, in Tabelle 5 die zur Aufzeichnung und Auswertung der Daten verwendeten Software und in Tabelle 6 die verwendeten Gase und Chemikalien aufgeführt.

Langendorff-Anlage	LE 02.200, Panlab, Barcelona, Spanien
Schläuche für peristaltische Pumpe	Tygon R 3603, Saint-Gobain, Herzogenrath , Deutschland
Schläuche für Langendorff-Anlage	F11794, Gilson Inc., Villiers le Bel, Frankreich
Thermostat	LE 13206, Panlab, Barcelona, Spanien
Peristaltische Pumpe	ML 172 Miniplus 3 Peristaltic Pump, AD Instruments, Oxford, England
Pumpenregler	ML 175 STH Pump Controller, AD Instruments, Oxford, England
Druckaufnehmer	MLT 844/d Physiological Pressure Transducer, PowerLab, AD Instruments, Oxford, England
Druckwandler	MLT 844/d Physiological Pressure Transducer, PowerLab, AD Instruments, Oxford, England

8-Kanal-Datenschreiber	ML870, PowerLab 8/30, AD Instruments, Oxford, England
Eichgerät Druckaufnehmer	Quecksilbersäule Typ 367 serial no. 97110, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Guillotine	Kleintierdekapitator, Modell 7950, Ugo Basile, Comerio Italien
Injektionskanüle	Sterican Gr.20, 0,4mm x 20mm, Braun, Melsungen, Deutschland
Polyesterfaden	Fadenstärke- USP 4/0, Fadenstärke- metric 1,5 unsteril, Resorba Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland
5-Milliliter-Spritze	Braun Omnifix 5 ml, Braun, Melsungen, Deutschland
Pacer	Typ TG2/8, Seriennummer 76065, Ifd, Düsseldorf, Deutschland
Perfusor	11 plus MA. 01746, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
Perfusor	Perfusor Space Typ 8713030, Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 3: Langendorff-Anlage

Auflistung der Bestandteile für die Versuche mit der Langendorff-Anlage mit Herstellerangaben.

Laborwaage	BP 1200, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage	SECURA 224-1S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646 #4498, Knick, Berlin-Zehlendorf, Deutschland
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1150C, Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Magnetrührer	Variomag mobil, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Heizplatte	MR 2002, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Färbeschale	24 Well Platte, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich

Tabelle 4: Laborgeräte

Auflistung der verwendeten Laborgeräte mit Herstellerangaben.

Aufzeichnungssoftware	LabChart 7 Reader, v 7.3.4 Donnerstag, 5. Juli 2012, AD Instruments, Oxford, England
Planimetriesoftware	Sigma Scan Pro 5, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA
Statistiksoftware	SigmaStat Version 3.5, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA

Tabelle 5: Software

Auflistung der zur Aufzeichnung und Auswertung der Daten verwendeten Software mit Herstellerangaben.

Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ * 7H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lactat (C ₃ H ₆ O ₃)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pyruvat (C ₃ H ₄ O ₃)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Forskolin (C ₂₂ H ₃₄ O ₇)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
gap27	American Peptide Company, Chelsea Vista, California,

	USA
Heptanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{OH}$)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sigma 7-9 ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2$)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid 0,9% (NaCl)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Salzsäure rauchend 37% (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37% (CH_2O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbogen (5 % CO_2 /95 % O_2)	Linde, Pullach, Deutschland
Pentobarbital	Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Heparin	Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland

Tabelle 6: Gase und Chemikalien

Auflistung der in den Versuchen verwendeten Gase und Chemikalien mit Herstellerangaben.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Infarktgrößenauswertung und im Anschluss die Auswertung der hämodynamischen Variablen LVDP, LVEDP, dP/dt max, CF, LVSP, HF, RPP und dP/dt min dargestellt.

3.1 Infarktgrößenauswertung

In Abbildung 14 sind von jeder Versuchsgruppe die durchschnittliche prozentuale Infarktgröße in Prozent des Risikoareals graphisch dargestellt.

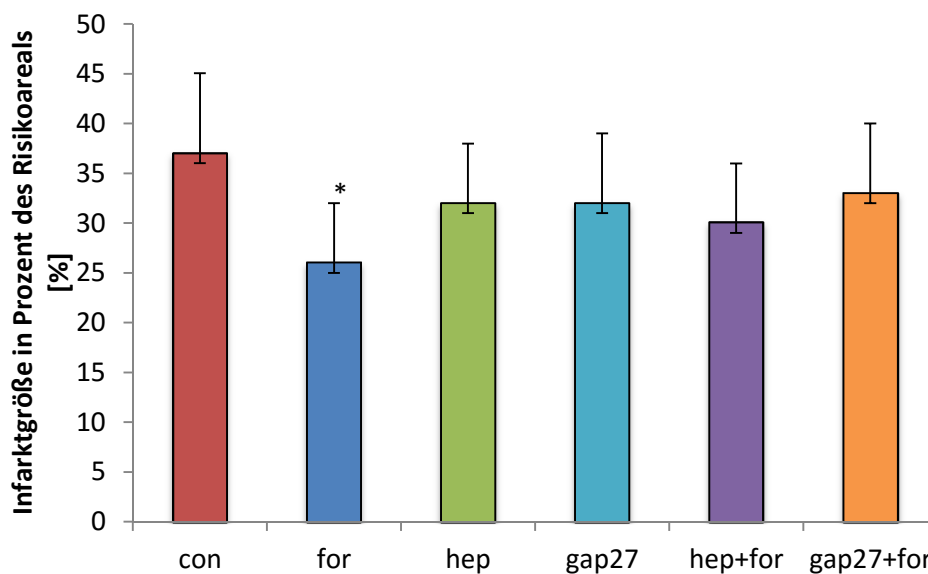


Abb. 14: Infarktgrößenauswertung

Dargestellt sind die durchschnittlichen Infarktgrößen der sechs Versuchsgruppen (n= 8) in % des linken Ventrikels. con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingrouppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingrouppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW $\pm$ SD. *p<0.05 vs. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wies eine Infarktgröße von $37 \pm 8 \%$ auf. Durch Gabe des PKA-Aktivators Forskolin reduzierte sich die Infarktgröße auf $26 \pm 6 \%$ (for: $26 \pm 6 \%$; vs. con: $37 \pm 8 \%$, * $p < 0,05$). Im Gegensatz hierzu zeigte Forskolin nach Blockade von Cx43 durch entweder gap27 oder Heptanol keinen signifikanten infarktgrößenreduzierenden Effekt (gap27+for: $33 \pm 7 \%$; hep+for: $30 \pm 6 \%$; jeweils $p > 0,05$ vs. con: $37 \pm 8 \%$). Die alleinige Gabe von gap27 oder Heptanol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße (gap27: $32 \pm 7 \%$; hep: $32 \pm 6 \%$; $p > 0,05$ vs. con: $37 \pm 8 \%$).

3.2 Gewicht

In Tabelle 7 sind die Ausgangsgewichte der Tiere zur Versuchsbeginn sowie die Trockenherzgewichte nach Färbung und Fixierung dargestellt.

Gewicht Tier + Herzgewicht (trocken) in Gramm						
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
Gewicht Tier	259 ± 28	284 ± 17	272 ± 21	278 ± 10	268 ± 16	288 ± 8
Herzgewicht (trocken)	$0,16 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$

Tabelle 7: Gewicht des Versuchstiers und Herzgewicht in Gramm der sechs Versuchsgruppen.

Ausgangsgewicht der Tiere zur Versuchsbeginn sowie das Herztrockengewicht in Gramm nach Färbung und Fixierung für die sechs Versuchsgruppen. con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingrouppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingrouppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW $\pm$ SD.

3.3 Hämodynamische Variablen

3.3.1 Herzfrequenz und Koronarfluss

Der zeitliche Verlauf der hämodynamischen Variablen HF und CF ist graphisch in Abbildung 15 dargestellt. Die exakten Messergebnisse können Tabelle 8 entnommen werden. Zum Versuchsbeginn gab es keine Unterschiede in HF und CF zwischen den Gruppen. Die Applikation von Forskolin führte in der Forskolingruppe, sowie in den Gruppen hep+for und gap27+for zu einem nicht signifikanten Anstieg der HF (con: 306 ± 29 bpm vs. for: 362 ± 33 bpm, con: 306 ± 29 bpm vs. hep+for: 364 ± 71 bpm, con: 306 ± 29 bpm vs. gap27+for: 362 ± 30 bpm; jeweils $p > 0,05$). Während der Applikationsphase zeigte sich ein Anstieg des CF in den Gruppen for, hep+for sowie gap27+for, wobei der CF zum Zeitpunkt Applikation (unmittelbar nach Applikation von Forskolin in der Applikationsphase) in der Forskolingruppe am höchsten war (con: 11 ± 4 ml/min, for: 21 ± 4 ml/min, hep+for: 14 ± 8 ml/min, gap27+for: 19 ± 3 ml/min; con vs. for $p < 0,05$, con vs. hep+for $p > 0,05$, con vs. gap27+for $p < 0,05$). Nach 60-minütiger Reperfusion gab es keine signifikanten Unterschiede in HF und CF zwischen den Gruppen.

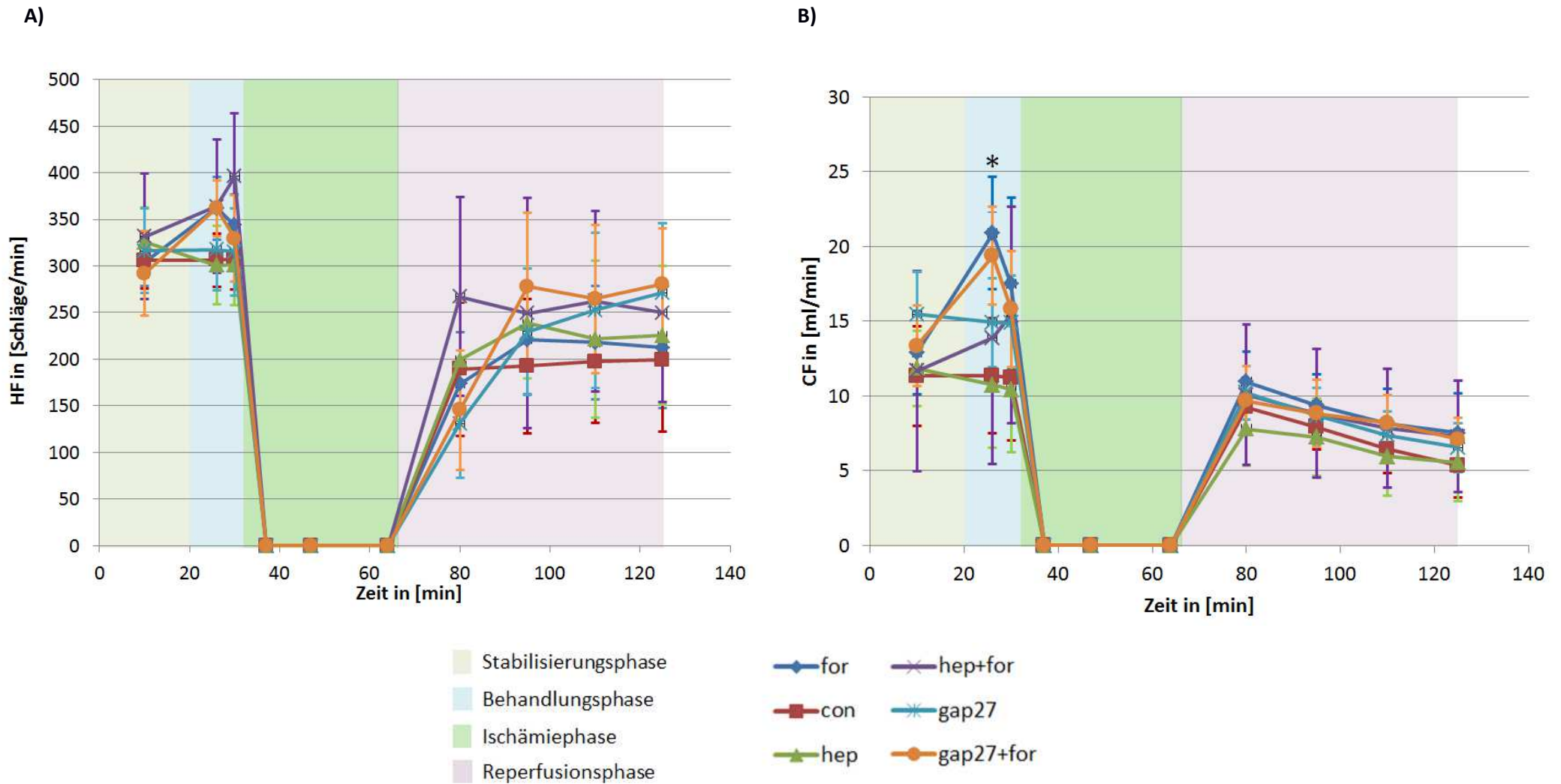


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz- und Koronarflussmessung

Zeitlicher Verlauf der HF- (Abb. 15A) und CF-Messung (Abb. 15B) für die sechs Versuchsgruppen mit farblicher Darstellung der vier Versuchsphasen. con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingruppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingruppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW $\pm$ SD. *: $p < 0,05$, con vs. for; con vs. gap27+for

A)	HF in Schläge/min					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	306 ± 30	304 ± 25	325 ± 37	316 ± 45	332 ± 67	292 ± 45
Applikation	306 ± 29	362 ± 33	301 ± 42	318 ± 44	364 ± 71	362 ± 30
Prä-Ischämie	308 ± 33	344 ± 33	301 ± 44	315 ± 47	396 ± 68	329 ± 47
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	189 ± 72	173 ± 56	199 ± 63	131 ± 58	267 ± 106	145 ± 64
Reperfusion 2	193 ± 72	221 ± 58	239 ± 59	229 ± 68	249 ± 123	278 ± 80
Reperfusion 3	197 ± 66	218 ± 61	222 ± 84	252 ± 83	262 ± 97	265 ± 79
Reperfusion 4	199 ± 77	213 ± 65	225 ± 74	271 ± 74	250 ± 96	280 ± 60

B)	CF in ml/min					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	11 ± 3	13 ± 3	12 ± 2	15 ± 3	12 ± 7	13 ± 3
Applikation	11 ± 4	*21 ± 4	11 ± 4	15 ± 3	14 ± 8	*19 ± 3
Prä-Ischämie	11 ± 4	18 ± 6	10 ± 4	15 ± 3	15 ± 7	16 ± 4
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	9 ± 2	11 ± 2	8 ± 2	10 ± 2	10 ± 5	10 ± 2
Reperfusion 2	8 ± 1	9 ± 2	7 ± 3	9 ± 2	9 ± 4	9 ± 2
Reperfusion 3	6 ± 2	8 ± 2	6 ± 2	7 ± 2	8 ± 4	8 ± 2
Reperfusion 4	5 ± 2	8 ± 3	6 ± 3	7 ± 2	7 ± 4	7 ± 1

Tabelle 8: Hämodynamische Variablen der Herzfrequenz (A) und des Koronarflusses (B) der sechs Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingruppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingruppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW ± SD.

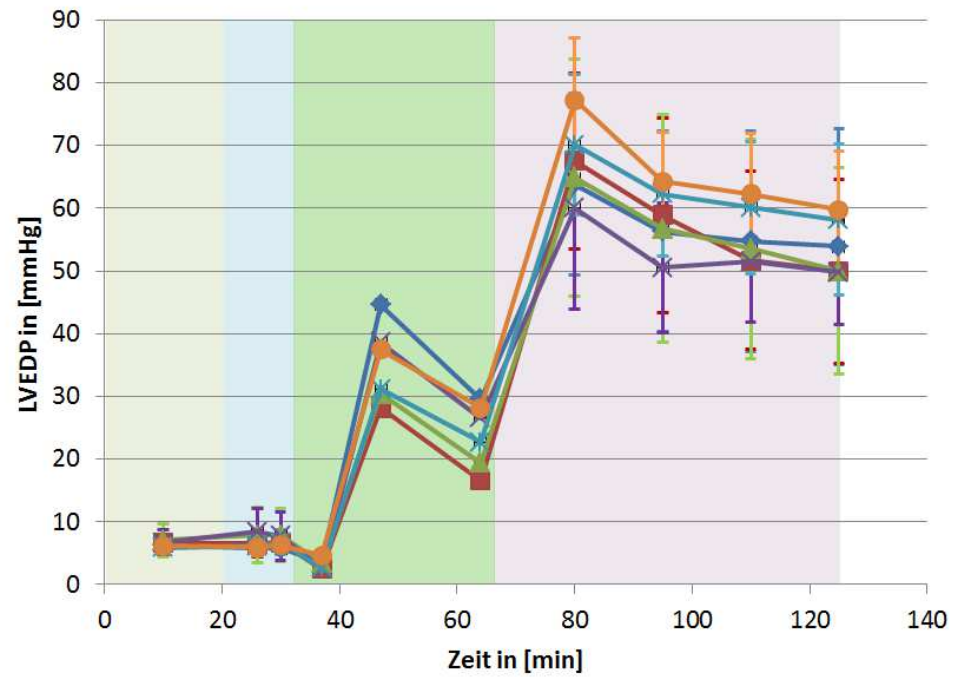
*: p< 0,05, con vs. for; con vs. gap27+for

3.3.2 Linksventrikuläre Funktionsvariablen

Der zeitliche Verlauf der linksventrikulären Funktionsvariablen LVEDP, LVDP, RPP und LVSP ist graphisch in Abbildung 16 dargestellt. Die Messergebnisse können Tabelle 9 entnommen werden. Zu Versuchsbeginn gab es keine Unterschiede des LVEDP und LVDP zwischen den Gruppen. In der RPP Messung zeigte die Gruppe hep+for signifikante Unterschiede zu allen anderen Versuchsgruppen zum Messzeitpunkt *baseline*. In dieser Versuchsgruppe wiesen zwei Herzen initial einen sehr niedrigen RPP auf. Der signifikant niedrigere Wert der hep+for Gruppe im Gegensatz zu den übrigen Versuchsgruppen kann dadurch bedingt sein ($p < 0,05$ vs. hep+for, siehe Tabelle 9C). Die übrigen hämodynamischen Variablen der genannten Herzen zeigten sich stabil, sodass die Herzen in die Versuchsauswertung aufgenommen wurden.

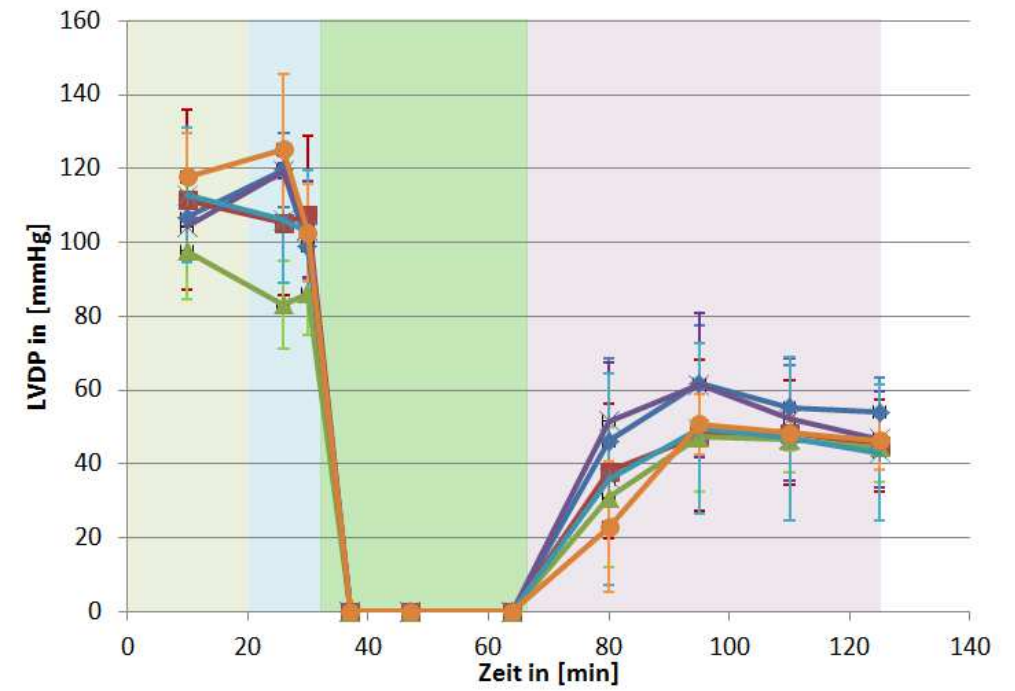
In der Messung des LVSP zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen hep+for und gap27+for. Gap27+for zeigte hierbei mit 124 ± 12 mmHg und hep+for mit 101 ± 11 mmHg den größten bzw. kleinsten *baseline*-Wert der LVSP-Messungen, wodurch der signifikante Unterschied ($p < 0,05$ vs. hep+for, siehe Tabelle 9D) erklärt werden kann. Die übrigen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede der LVSP zu Versuchsbeginn. Im Versuchsverlauf kam es zu einer Abnahme des LVDP und RPP in allen Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppe Forskolin zeigte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine geringere LVDP-Reduktion nach 60-minütiger Reperfusion. Am Ende der 60-minütigen Reperfusion gab es keine Unterschiede in LVEDP, LVDP, RPP und LVSP zwischen den Gruppen.

A)



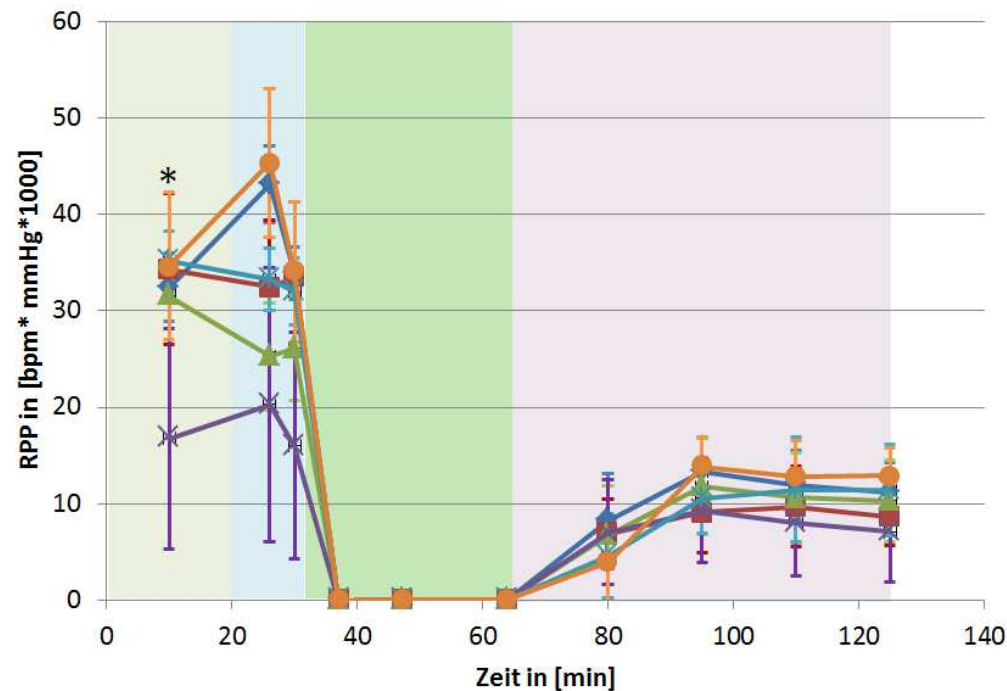
Stabilisierungsphase
Behandlungsphase
Ischämiephase
Reperfusionsphase

B)



for
con
hep
gap27
gap27+for
hep+for

C)



D)

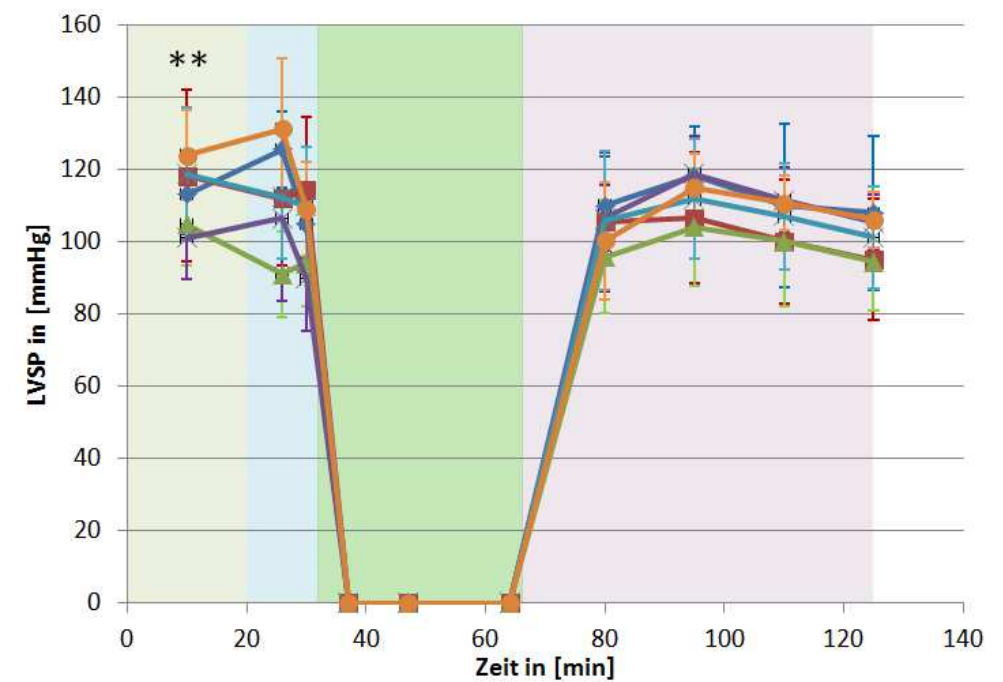


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP), des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP), des rate pressure products (RPP) und der linksventrikulären systolischen Druckmessung (LVSP)

Zeitlicher Verlauf der LVEDP (Abb. 16A), LVDP (Abb. 16B), RPP (Abb. 16C), LVSP (Abb. 16D). Messung für die sechs Versuchsgruppen mit farblicher Darstellung der vier Versuchsphasen. con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingrouppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingrouppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW $\pm$ SD. *: $p < 0,05$ vs. hep+for, siehe Tabelle 9C, **: $p < 0,05$ vs. hep+for, siehe Tabelle 9D

A)	LVEDP in mmHg					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	7 ± 1	6 ± 1	7 ± 3	6 ± 1	7 ± 2	6 ± 1
Applikation	7 ± 2	6 ± 1	8 ± 4	6 ± 1	8 ± 4	6 ± 1
Prä-Ischämie	7 ± 2	6 ± 1	8 ± 4	7 ± 2	8 ± 4	6 ± 1
Ischämie 1	# 3 ± 2	# 4 ± 3	# 3 ± 1	# 3 ± 1	# 3 ± 1	# 5 ± 4
Ischämie 2	# 28 ± 15	# 45 ± 19	# 30 ± 14	# 31 ± 14	# 39 ± 16	# 37 ± 18
Ischämie 3	# 17 ± 9	# 30 ± 15	# 19 ± 5	# 23 ± 10	# 27 ± 6	# 28 ± 10
Reperfusion 1	68 ± 14	64 ± 14	65 ± 19	70 ± 11	60 ± 16	77 ± 10
Reperfusion 2	59 ± 16	56 ± 16	57 ± 18	62 ± 10	51 ± 10	64 ± 8
Reperfusion 3	52 ± 14	55 ± 18	54 ± 18	60 ± 11	52 ± 10	62 ± 10
Reperfusion 4	50 ± 15	54 ± 19	50 ± 16	58 ± 12	50 ± 8	60 ± 9
B)	LVDP in mmHg					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	112 ± 24	107 ± 11	98 ± 13	113 ± 18	104 ± 5	118 ± 12
Applikation	105 ± 20	120 ± 10	83 ± 12	106 ± 17	119 ± 15	125 ± 20
Prä-Ischämie	107 ± 21	99 ± 9	86 ± 11	103 ± 17	104 ± 14	103 ± 13
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	38 ± 18	46 ± 23	31 ± 19	36 ± 29	52 ± 20	23 ± 18
Reperfusion 2	48 ± 20	62 ± 16	47 ± 15	50 ± 23	61 ± 12	51 ± 8
Reperfusion 3	48 ± 14	55 ± 11	47 ± 9	47 ± 22	52 ± 10	48 ± 5
Reperfusion 4	45 ± 13	54 ± 9	45 ± 9	43 ± 19	47 ± 9	46 ± 8

C)	RPP in bpm*mmHg*1000					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	*34,3 ± 8,4	*32,4 ± 3,6	*31,5 ± 3,7	*35,1 ± 3,4	16,8 ± 11,4	*34,7 ± 8,2
Applikation	32,6 ± 7,8	43,1 ± 4,0	25,3 ± 5,9	33,2 ± 3,4	20,3 ± 14,2	45,4 ± 8,2
Prä-Ischämie	33,4 ± 8,4	33,9 ± 2,8	26,1 ± 5,9	32,0 ± 3,7	16,0 ± 11,8	34,0 ± 7,7
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	6,9 ± 3,8	8,3 ± 4,9	6,7 ± 5,5	4,6 ± 4,6	7,0 ± 5,5	3,9 ± 4,4
Reperfusion 2	9,1 ± 4,4	13,4 ± 3,5	11,8 ± 5,3	10,6 ± 4,0	9,3 ± 5,4	13,9 ± 3,2
Reperfusion 3	9,7 ± 4,5	12,0 ± 3,6	10,6 ± 5,0	11,5 ± 5,8	8,1 ± 5,5	12,8 ± 4,0
Reperfusion 4	8,7 ± 3,2	11,2 ± 3,0	10,3 ± 4,5	11,5 ± 5,0	7,1 ± 5,2	12,9 ± 3,1
D)	LVSP in mmHg					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	118 ± 24	113 ± 11	105 ± 12	119 ± 18	101 ± 11	**124 ± 12
Applikation	112 ± 19	126 ± 10	91 ± 12	112 ± 17	107 ± 23	131 ± 20
Prä-Ischämie	114 ± 20	105 ± 10	94 ± 12	110 ± 16	90 ± 14	109 ± 13
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	106 ± 19	110 ± 14	96 ± 16	106 ± 19	107 ± 9	100 ± 16
Reperfusion 2	107 ± 18	118 ± 14	104 ± 16	112 ± 17	119 ± 11	115 ± 9
Reperfusion 3	100 ± 17	110 ± 23	100 ± 18	107 ± 15	111 ± 9	111 ± 9
Reperfusion 4	95 ± 17	108 ± 21	95 ± 14	101 ± 14	105 ± 8	106 ± 8

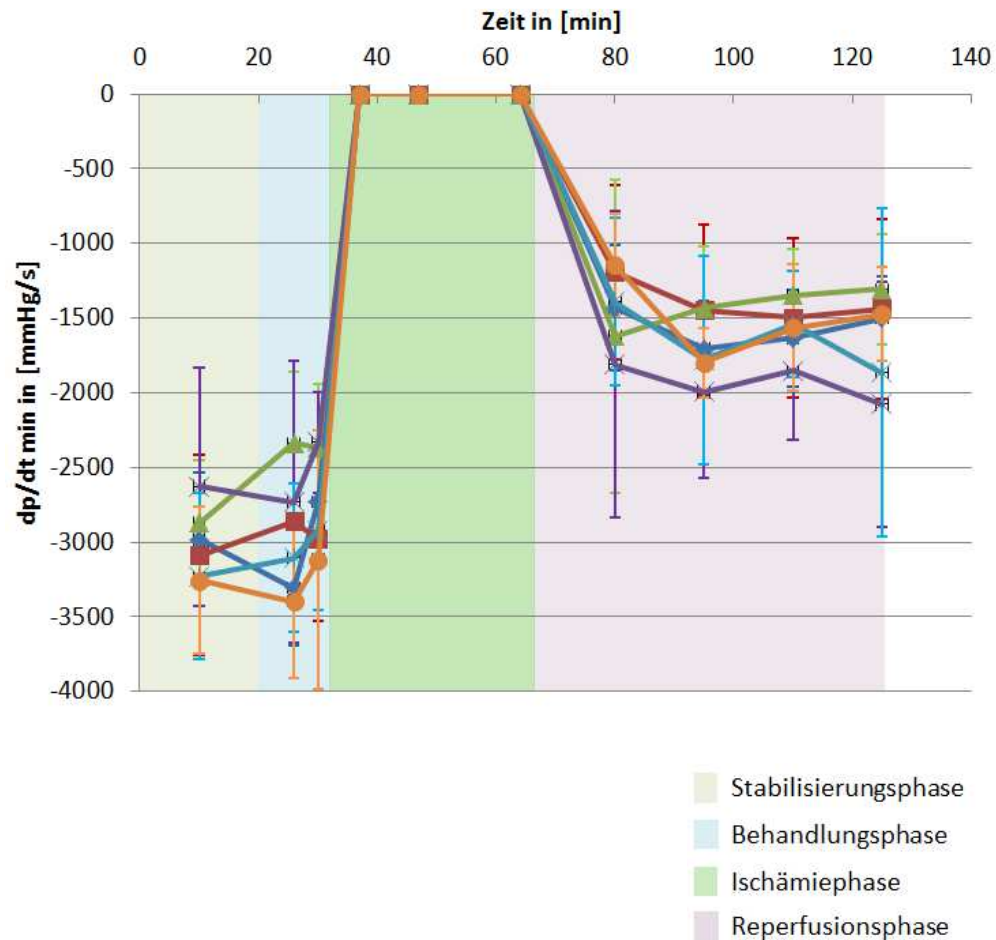
Tabelle 9: Hämodynamische Variablen linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP; A), linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP;B), rate pressure product (RPP;C) und linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP;D) der sechs Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingruppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingruppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW ± SD. *: p< 0,05 vs. hep+for, **: p< 0,05 vs. hep+for

Während der Ischämie haben die Herzen nicht geschlagen; damit gibt es keine systolische und diastolische Herzfunktion. Die gemessenen Werte entstehen durch ischämische Kontraktur und wurden unter LVEDP eingetragen.

3.3.3 Kontraktilitätsvariablen

Der zeitliche Verlauf der Kontraktilitätsvariablen dP/dt min und dP/dt max ist graphisch in Abbildung 17 dargestellt. Die Messergebnisse können Tabelle 10 entnommen werden. Zu Versuchsbeginn gab es keine Unterschiede in minimaler und maximaler linksventrikulärer Druckänderungsgeschwindigkeit zwischen den Gruppen. Nach 60-minütiger Reperfusion gab es keine Unterschiede in dP/dt min und dP/dt max zwischen den Gruppen.

A)



B)

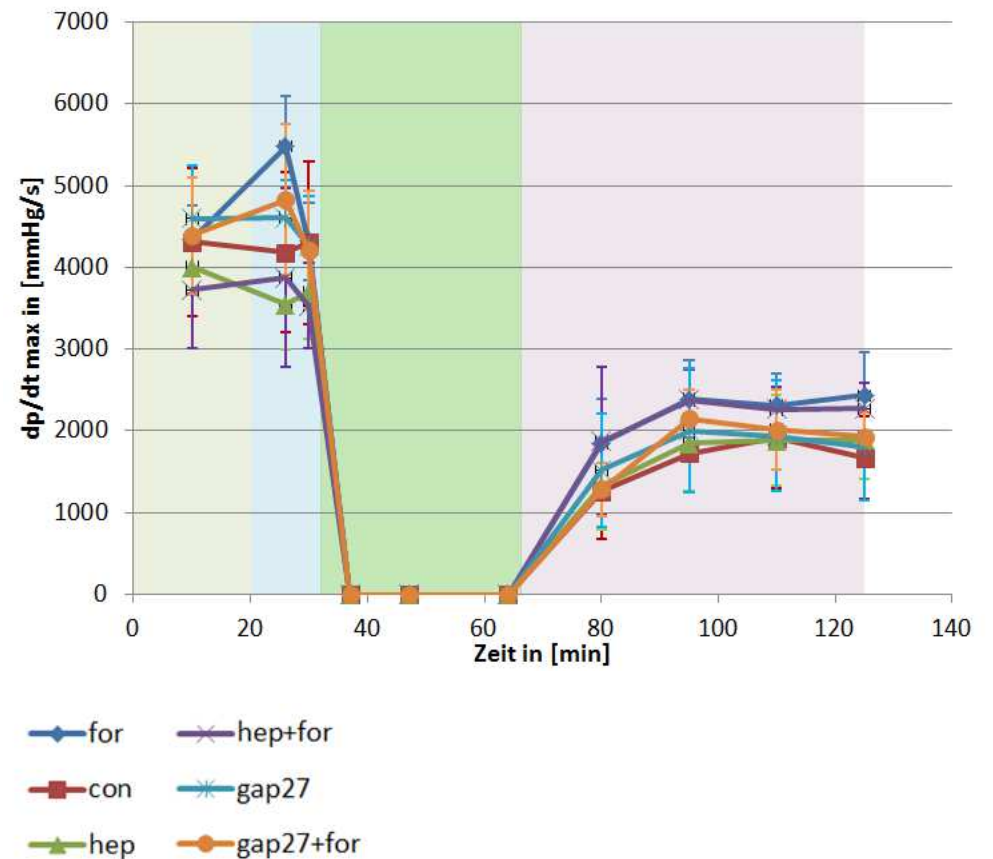


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der minimalen linksventrikulären Druckänderungsgeschwindigkeit (dp/dt min) und der maximalen linksventrikulären Druckänderungsgeschwindigkeit (dp/dt max) Messung

Zeitlicher Verlauf der dp/dt min (Abb. 17A) und dp/dt max (Abb. 17B) Messung für die sechs Versuchsgruppen mit farblicher Darstellung der vier Versuchsphasen. con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingrouppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingrouppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW $\pm$ SD.

A)	dP/dt min in mmHg/s					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	-3089 ± 670	-2982 ± 448	-2871 ± 420	-3229 ± 555	-2627 ± 798	-3255 ± 493
Applikation	-2859 ± 495	-3308 ± 387	-2336 ± 475	-3105 ± 500	-2733 ± 942	-3396 ± 511
Prä-Ischämie	-2977 ± 554	-2729 ± 366	-2369 ± 429	-2918 ± 536	-2333 ± 337	-3188 ± 870
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	-1194 ± 583	-1433 ± 419	-1620 ± 1048	-1391 ± 561	-1813 ± 1026	-1144 ± 345
Reperfusion 2	-1447 ± 568	-1705 ± 323	-1433 ± 409	-1782 ± 698	-1996 ± 574	-1800 ± 235
Reperfusion 3	-1497 ± 532	-1635 ± 321	-1349 ± 314	-1541 ± 352	-1854 ± 464	-1565 ± 425
Reperfusion 4	-1440 ± 604	-1501 ± 282	-1308 ± 371	-1867 ± 1100	-2078 ± 823	-1475 ± 316

B)	dP/dt max in mmHg/s					
	con	for	hep	gap27	hep+for	gap27+for
baseline	4307 ± 910	4345 ± 404	4004 ± 343	4593 ± 650	3720 ± 704	4391 ± 714
Applikation	4185 ± 971	5478 ± 614	3546 ± 559	4607 ± 456	3873 ± 1089	4827 ± 921
Prä-Ischämie	4300 ± 997	4316 ± 478	3700 ± 584	4263 ± 600	3526 ± 524	4217 ± 717
Ischämie 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ischämie 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reperfusion 1	1263 ± 580	1851 ± 547	1326 ± 542	1519 ± 695	1876 ± 905	1282 ± 333
Reperfusion 2	1728 ± 457	2390 ± 477	1846 ± 585	2000 ± 758	2376 ± 379	2150 ± 359
Reperfusion 3	1911 ± 609	2312 ± 387	1882 ± 558	1939 ± 677	2262 ± 268	2014 ± 494
Reperfusion 4	1669 ± 509	2434 ± 527	1890 ± 487	1810 ± 664	2271 ± 319	1931 ± 299

Tabelle 10: Hämodynamische Variablen minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt min,A) und maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt max,B) der sechs Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten

con= Kontrollgruppe, for= Forskolin, gap27+for= gap27+Forskolingrouppe, gap27= gap27-Gruppe, hep+for= Heptanol+Forskolingrouppe, hep= Heptanolgruppe. Daten sind MW ± SD.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass der kardioprotektive Effekt einer PKA-Aktivierung mit Forskolin durch Inhibierung von Cx43 aufgehoben wird. Dies deutet darauf hin, dass Cx43 im Rahmen der Forskolin-induzierten Präkonditionierung essentiell beteiligt ist.

4.1 Forskolin, mK_{Ca} -Kanal und Kardioprotektion

Forskolin ist in vielen Bereichen der Wissenschaft seit vielen Jahren als Wirkstoff zur Aktivierung der Adenylylcyclase etabliert [88, 89] [90]. In dieser Studie verwendeten wir Forskolin im Rahmen der Kardioprotektion.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich durch die Gabe des PKA-Aktivators Forskolin die Infarktgröße signifikant reduzierte. Im Gegensatz hierzu hatte Forskolin, nach Blockade von Cx43 durch gap27 oder Heptanol, keinen signifikanten infarktgrößenreduzierenden Effekt. Ebenfalls zeigte sich bei alleiniger Applikation von gap27 oder Heptanol kein signifikanter Einfluss auf die Infarktgröße. Die Kardioprotektion durch Forskolin wurde somit durch Applikation eines Cx43-Inhibitors aufgehoben. Es konnte somit gezeigt werden, dass Cx43 essentiell an der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion beteiligt ist.

Die kardioprotektive Eigenschaft des Forskolins wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Lochner et al. verwendeten in ihren Versuchen mit isolierten Rattenherzen Forskolin als präkonditionierende Substanz. Sie konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung der Herzen mit Forskolin zu einem Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Gehaltes führte und das Herz nach einer 25-minütigen globalen Ischämie eine bessere funktionelle Erholung, gemessen durch Herzminutenvolumen und Arbeitsleistung, aufwies [91].

In einer weiteren Studie zur Kardioprotektion durch Forskolin benutzten Makaula et al. ebenfalls ein *ex-vivo*-Modell mit isolierten Rattenherzen. Nach einer 30-minütigen

Stabilisierungsphase, gefolgt von einer 30-minütigen Ischämiephase, erfolgte eine 30-minütige Reperfusionsphase. Forskolin wurde hierbei vor der Ischämiephase als präkonditionierende Substanz für eine Zeitdauer von fünf Minuten gegeben. Eine Vorbehandlung mit Forskolin konnte den LVDP verbessern und die Infarktgröße reduzieren [92].

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls der kardioprotektive Effekt von Forskolin untersucht. Ein Schwerpunkt hierbei lag in der Erforschung der Signalkaskade der Forskolin-induzierten Kardioprotektion. Im Jahr 2012 konnten Huhn et al. zeigen, dass eine durch Forskolin-bedingte PKA-Aktivierung, durch die Aktivierung der Adenylylcyclase, die Infarktgröße verringerte [65]. In dieser *in-vivo*-Versuchsreihe erhielten die Versuchstiere eine intraperitoneale Applikation von Forskolin und es wurde eine 25-minütige regionale Ischämie induziert, gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusionsphase. Bei gleichzeitiger Applikation des PKA-Inhibitors H-89 kam es zu keiner Infarktgrößenreduktion. Es wurde gezeigt, dass die durch Forskolin-bedingte Kardioprotektion durch eine Aktivierung von PKA bedingt war.

In Rahmen der Kardioprotektion wurde auch die Bedeutung des mK_{Ca} -Kanals in verschiedenen Studien untersucht. Im Jahr 2002 wurde erstmals von Xu et al. die Existenz der mK_{Ca} -Kanäle in Kardiomyozyten gezeigt und zeitgleich das kardioprotektive Potential bei direkter Aktivierung beschrieben [62]. Eine Beteiligung der mK_{Ca} -Kanäle im Rahmen der ischämischen und der pharmakologischen Präkonditionierung, beispielsweise durch Anästhetika, Morphin oder auch Sildenafil, konnte nachfolgend in verschiedenen Studien gezeigt werden [63, 93-95].

Auch in Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde im Jahr 2015 eine mögliche Beteiligung der mK_{Ca} -Kanäle an der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion diskutiert. *In-vivo*-Versuche konnten zeigen, dass die kardioprotektive Wirkung von Forskolin durch einen mK_{Ca} -Kanal-Inhibitor aufgehoben wurde und demonstrieren somit die Beteiligung der mK_{Ca} -Kanäle an der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion [95]. Die mK_{Ca} -Kanäle sind insbesondere interessant, da es Hinweise gibt, dass sie keinem alterungsbedingten Wirkverlust unterliegen. In einer Versuchsreihe wurden mK_{Ca} -Kanäle durch NS1619 direkt pharmakologisch aktiviert.

Es zeigte sich eine Reduktion der Infarktgrößen sowohl in jungen, als auch in alten Herzen.

Allerdings ist die exakte Ursache des alterungsbedingten Wirkverlustes weiterhin unklar, wobei Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe darauf hindeuten, dass der alterungsabhängige Signalschritt im vorgeschalteten Signalweg liegen muss [65, 66].

4.2 Alterungsbedingter Wirkverlust der Kardioprotektion

Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz eines akuten Myokardinfarktes [96]. Devlin et al. und Maggioni et al. beschrieben bereits in den neunziger Jahren, dass auch die Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt mit dem Alter ansteigt [97, 98]. Haase et al. zeigten, dass die Mortalität bei einem akuten Myokardinfarkt in der Patientengruppe über 75 Jahre deutlich höher ist, als bei jüngeren Patienten. Als Grundlage nutzten sie den Datenpool aus dem MITRA-Register, in dem Daten von 6067 Patienten mit akutem Myokardinfarkt registriert wurden [99].

Die Ursache der alterungsabhängigen Zunahme der Inzidenz und Mortalität eines akuten Myokardinfarkts ist nicht vollständig geklärt. Als mögliche Ursache wird eine Abnahme der kardioprotektiven Mechanismen im Alter diskutiert.

So zeigten beispielsweise tierexperimentelle Studien von Fenton et al., Sniecinski and Liu und Abete et al., dass die kardioprotektive Wirkung der Präkonditionierung in alten Herzen vermindert oder sogar aufgehoben ist [100-102]. Fenton benutzte in seinen Experimenten isolierte Rattenherzen aus zwei unterschiedlichen Altersgruppen (drei Monate alt vs. 22 Monate alt), um einen möglichen Einfluss des Alters auf die protektive Wirkung zu untersuchen. Eine ischämische Präkonditionierung in jungen Herzen bewirkte eine signifikante Reduktion der Nekroserate. In alten Herzen konnte dieser kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung nicht nachgewiesen werden [100].

Im Gegensatz hierzu zeigten Przyklenk und Burns in *in-vivo*-Versuchen, dass eine ischämische Präkonditionierung auch in alten Herzen zu einer Reduktion der Infarktgröße führt [103, 104]. Przyklenk et al. verwendeten ein *in-vivo*-Kaninchenmodell mit erwachsenen (vier bis sechs Monate alt), mittelalten (24-27 Monate alt) und alten (42-60 Monate alt) Kaninchenherzen. Eine ischämische Präkonditionierung bewirkte in allen drei Gruppen eine Abnahme der Nekroserate im Myokard [103]. Burns et al. verwendeten ein *in-vivo*-Schafsmodell mit erwachsenen (0,5-1 Jahr) und alten Versuchstieren (5,7-8,9 Jahre). Die ischämische Präkonditionierung führte in beiden Altersgruppen zur signifikanten Abnahme der Nekroserate (erwachsene Herzen 54 % vs. alte Herzen 47 %) [104].

Im Vergleich zu Przyklenk und Burns, die mit Schafs- bzw. Kaninchenherzen arbeiteten, verwendeten Fenton et al., Snieciński et al. und Abete et al. Rattenherzen. Die gegensätzlichen Ergebnisse könnten durch die Verwendung von unterschiedlichen Spezies bedingt sein. Es ist möglich, dass speziesspezifische Unterschiede vorhanden sind, dies ist jedoch unklar. Dennoch weist die Mehrheit der Experimente einen alterungsabhängigen Wirkverlust der Präkonditionierung auf.

Die Vorversuche der hiesigen Arbeitsgruppe konnten ebenfalls einen alterungsbedingten Wirkverlust der Kardioprotektion zeigen. Es wurde nachgewiesen, dass der kardioprotektive Effekt der Präkonditionierung mittels Forskolin einem alterungsabhängigen Wirkverlust unterliegt [65]. Ein Fokus der Arbeitsgruppe lag hierbei auf der Erforschung des Signaltransduktionswegs der durch Forskolin-induzierten Kardioprotektion, im Besonderen auf der Frage, welcher Signalschritt des PKA-mK_{Ca}-Signalwegs einem alterungsabhängigen Wirkverlust unterliegt.

Hierbei scheinen, wie bereits vorbeschrieben, die mK_{Ca}-Kanäle keinem alterungsbedingten Wirkverlust zu unterliegen, da eine pharmakologische mK_{Ca}-Kanalöffnung mit NS1619 nicht nur in jungen, sondern auch in alten Ratten zu einer Infarktgrößenreduktion führte. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass der alterungsabhängige Signalschritt in einem vorangeschalteten Signalweg liegen muss [65, 66].

Ein proximaler Regulator der mK_{Ca}-Kanäle ist die PKA [105]. In einer Versuchsreihe der Arbeitsgruppe wurde die PKA durch Forskolin direkt pharmakologisch aktiviert. Als Marker der PKA-Aktivität wurde die Phosphorylierung des Phospholambans, eines

Substrats der PKA, gemessen. Diese war alterungsabhängig sowohl in der Versuchsgruppe mit den jungen, als auch in der Gruppe mit den alten Herzen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Forskolin-Aktivierung erhöht. Es konnte somit gezeigt werden, dass die PKA keinen alterungsbedingten Veränderungen unterliegt [66].

Zusammengefasst zeigen diese Vorversuche, dass weder die PKA noch die mK_{Ca} -Kanäle einem alterungsbedingten Wirkverlust unterliegen und somit Signalschritte, die zwischen PKA und mK_{Ca} -Kanal geschaltet sind, für den alterungsabhängigen Wirkverlust der Forskolin-induzierten Kardioprotektion verantwortlich sein müssen (Abb. 18).

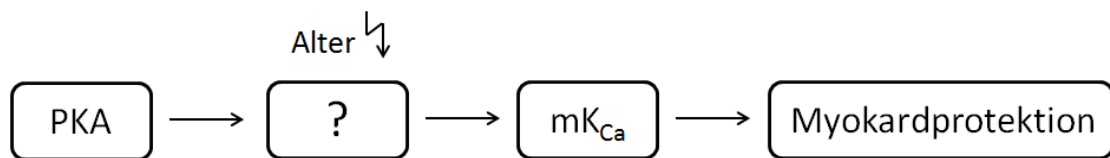


Abb. 18: Alterungsabhängiger Wirkverlust der Signalkaskade

Ein möglicher Signalzwischenschritt, der für den alterungsabhängigen Wirkverlust der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion verantwortlich sein könnte, ist die Aktivierung von Cx43.

Cx43 ist in der Literatur bereits mehrfach im Zusammenhang mit kardioprotektiven Mechanismen beschrieben worden. Boengler et al. konnten im Jahr 2007 belegen, dass mitochondriales Cx43 an der ischämischen Präkonditionierung beteiligt ist [106]. Schulz und Heusch zeigten ebenfalls, dass Cx43 essentiell an der Vermittlung der ischämischen Präkonditionierung beteiligt ist [107]. Schwanke et al. zeigten in Versuchen mit Cx43 defizienten Mäusen den Verlust des protektiven Effekts einer ischämischen Präkonditionierung [108]. Rodriguez-Sinovas et al. zeigten, dass bei *Knock-in* Mäusen, bei denen die kodierende Region von Cx43 durch Cx32 ersetzt wurde, sowohl eine ischämische, als auch eine pharmakologische Präkonditionierung keine protektive Wirkung hervorriefen [109].

Die hiesige Arbeitsgruppe beschäftigte sich ebenfalls mit einer möglichen alterungsabhängigen Wirkung von Cx43. Durch eine Proteinexpression konnte gezeigt werden, dass der mitochondriale Cx43-Anteil im Myokard alter Herzen geringer ist als im Myokard junger Herzen [66]. Diese alterungsabhängige Abnahme des Cx43-Gehalts wurde bereits in mehreren Studien in unterschiedlichen Geweben gezeigt. Muramatsu und Yeh schilderten einen verminderten Cx43-Gehalt in älteren Aortenendothelzellen und in älterer Zahnpulpa [110, 111]. Ein Abnahme von Cx43 in den sinoatrialen Knoten von alten Meerschweinchen wurde von Jones et al. im Jahr 2004 belegt [112]. Chen und Jones veröffentlichten 2000 eine Studie, in der ein abnehmender Cx43-Gehalt in älteren Hamsterherzen beschrieben wird [113]. Boengler konnte durch Proteinexpression aufzeigen, dass der Gehalt von Cx43, sowohl am Sarkoplasma, als auch in den Mitochondrien in alten Mäuseherzen abnahm [106].

Zusammengefasst wurde Cx43 in der Literatur bereits mehrfach im Zusammenhang mit kardioprotektiven Mechanismen beschrieben und unterliegt alterungsbedingten Veränderungen. Cx43 könnte somit der Signalschritt in der beschriebenen Signalkaskade sein, der für den alterungsbedingten Wirkverlust der Forskolin-bedingten Kardioprotektion verantwortlich ist.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass Forskolin zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt. Diese Kardioprotektion wurde durch Applikation eines Cx43-Inhibitors aufgehoben. Die Ergebnisse zeigen, dass Forskolin nach Blockade mit Cx43 durch entweder gap27 oder Heptanol keinen signifikanten infarktgrößenreduzierenden Effekt aufweist. Cx43 ist somit essentiell an der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion beteiligt (Abb. 19).



Abb. 19: Arbeitshypothese der Dissertationsarbeit

4.3 Connexin 43-Inhibitoren und Infarktgröße

In dieser Studie wurden die beiden Substanzen Heptanol und gap27 zur Inhibierung von Cx43 eingesetzt. Bei Kombination von Forskolin mit einem Cx43-Blocker war die Infarktgröße auf dem Niveau der Kontrollgruppe, hep+for und gap27+for sind beide nicht signifikant vs. con. Der infarktgrößerreduzierende Effekt von Forskolin verliert durch Anwesenheit der Connexin-Inhibitoren seine Wirkung. Dies zeigt die Bedeutung von Cx43 im Rahmen der Forskolin-bedingten Kardioprotektion.

Eine Einschränkung der vorliegenden Studie ist jedoch die Tatsache, dass die Infarktgröße von hep+for und gap27+for sich nicht signifikant zur Forskolingruppe unterscheidet. Daher fehlt der endgültige experimentelle Nachweis, dass Cx43 an der Forskolin-induzierten Kardioprotektion beteiligt ist. Um klar schlussfolgern zu können, dass Cx43 das *missing link* im Signalweg ist, würde man in den vorliegenden Versuchen erwarten, dass durch die Blockade des Cx43, die Infarktgrößen der Versuchsgruppen hep+for und gap27+for der Infarktgröße der Kontrollgruppe entspricht. Zusätzlich würde man erwarten, dass sich die Infarktgrößen von hep+for und gap27+for signifikant zur Versuchsgruppe for unterscheiden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Signifikanz könnte sein, dass die Cx43-Blocker nicht vollständig das Cx43 blockieren. Weitere Studien mit Verwendung transgener Mäuse mit Cx43-Mangel müssten diesen Aspekt näher untersuchen.

Neben der Hypothese, dass die Cx43-Blocker nicht vollständig das Cx43 blockieren, könnte die fehlende Signifikanz der Infarktgrößen von hep+for und gap27+for zu for dadurch bedingt sein, dass die Cx43-Blocker selbst kardioprotektiv sind und damit den Effekt der Cx43-Blockade zum Teil maskieren. Garcia-Dorado et al. zeigten beispielsweise im Jahr 1997, dass sowohl bei Versuchen mit *in-situ*-Schweineherzen, als auch bei Versuchen mit isolierten Herzen, bei Applikation von Heptanol, die myokardiale Infarktgröße signifikant reduziert wurde. Dazu verwendeten sie ein Ischämie-Reperusionsmodell, bei dem die Substanz Heptanol während der ersten 15 Minuten der Reperusionsphase appliziert wurde [114]. Auch eine 24-minütige Dauerinfusion von Heptanol vor der Ischämiephase senkte die Infarktgröße signifikant [115]. Saltman, Miura und Johanson konnten ebenfalls nachweisen, dass die alleinige

Applikation von Heptanol zu einer Reduktion der myokardialen Infarktgröße führte. [116-118].

Im Gegensatz dazu stehen Studien, die zeigten, dass es bei Applikation von Heptanol zu keiner kardioprotektiven Wirkung kommt. 2001 veröffentlichte Gysembergh seine Versuche mit isolierten Rattenherzen und einem regionalen Ischämie-Reperfusionsmodell, bei denen Heptanol zu keiner Reduktion der Infarktgröße im Myokard führte [80]. Auch Li et al. zeigten im Jahr 2002, dass die Applikation von Heptanol keinen Effekt auf die Infarktgröße bei Rattenherzen in einem Ischämie-Reperfusionsmodell hatte [119].

Diese gegensätzlichen Resultate könnten dadurch erklärt werden, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Konzentrationen von Heptanol verwendet wurden. Gysembergh wählte in seinen Versuchen eine deutlich geringere Konzentration von Heptanol (0,5 mM) im Vergleich zu beispielsweise Johansen et al. 2011 (Konzentration Heptanol 2 mM). Bei Li et al. wurde in den Versuchsprotokollen beschrieben, dass vor der Ischämiephase eine zehnminütige Heptanol-Auswaschphase stattfand, was zu einer geringen Konzentration von Heptanol vor der Ischämiephase führte.

In dieser Studie wurde, orientiert an den Versuchen von Gysembergh, eine Heptanolkonzentration gewählt, von der keine direkt kardioprotektive Wirkung vermutet wurde. Es zeigten sich in den vorliegenden Versuchen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Heptanolgruppe und der Kontrollgruppe; es konnte zudem kein kardioprotektiver Effekt durch die alleinige Applikation von Heptanol gezeigt werden.

Im Gegensatz zu Heptanol gibt es bezüglich der direkt kardioprotektiven Wirkung von gap27 bisher nur wenige Studien. Beispielsweise zeigten Hawat et al. in *in-vivo*-Versuchen, dass eine Applikation von gap27 vor oder während der Ischämiephase die Infarktgröße des Myokards signifikant senkte [79]. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsmodelle (*in-vivo* vs. *ex-vivo*) ist jedoch eine direkte Vergleichbarkeit zu unseren Versuchsaufbau nur eingeschränkt möglich.

Bei alleiniger Applikation von gap27 konnten in der vorliegenden Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Gap27 weist in dieser Studie keinen kardioprotektiven Effekt auf.

Es sind weitere Versuchsreihen notwendig, um die direkte kardioprotektive Wirkung von gap27 und eine möglicherweise bestehende konzentrationsabhängige Wirkung, ähnlich wie sie bei Heptanol besteht, zu untersuchen.

4.4 Hämodynamik Auswertung

In den Abbildungen 15-17 sind die gemessenen hämodynamischen Variablen über die verschiedenen zeitlichen Phasen des Versuchs dargestellt. Am Ende der Reperfusionsphase waren bei den hämodynamischen Variablen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vorhanden, es waren lediglich Tendenzen erkennbar. In allen Versuchsgruppen kam es in der Reperfusionsphase zu einer Abnahme des LVDP im Vergleich zum Ausgangswert. Die Versuchsgruppe Forskolin zeigte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine geringere Abnahme des LVDP. Es zeigte sich insgesamt keine signifikante Verbesserung, jedoch eine tendenziell bessere Erholung der myokardialen Kontraktilität der Forskolingruppen am Ende der Reperfusionsphase.

Darüber hinaus konnten Unterschiede zwischen der Forskolingruppe und der Kontrollgruppe für den LVSP nachgewiesen werden. Während des Versuchs kam es zu einer Abnahme des LVSP in beiden Gruppen; diese war für die Forskolingruppe jedoch geringer als für die Kontrollgruppe. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine tendenzielle Verbesserung der hämodynamischen Funktion nach einem ischämischen Ereignis in der Forskolingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In Abbildung 17B ist die positiv inotrope Wirkung des Forskolins ersichtlich. DP/dtmax als Kenngröße der myokardialen Kontraktilität stieg nach Applikation von Forskolin in den Versuchsgruppen for, hep+for und gap27+for an.

Theoretisch könnte die positiv inotrope Wirkung von Forskolin in dem Versuchsaufbau die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen insoweit einschränken, dass durch die

Änderung der hämodynamischen Variablen, das Outcome und die Nekroserate beeinflusst werden. Zu dem Messzeitpunkt prä-Ischämie, unmittelbar vor der Ischämiephase, zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Forskolin in Bezug auf dP/dt_{max} . Die Phase zwischen Beendigung der Applikation und Start der Ischämie (Minute 28-32) war somit lang genug gewählt, dass der kurzfristig durch Forskolin-bedingte Einfluss auf die hämodynamische Variable dP/dt_{max} keinen Einfluss auf die Nekroserate nehmen konnte. Das unterschiedliche Outcome zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Forskolin bezüglich der Nekroserate kann daher nicht durch die beschriebene kurzfristige Änderung der hämodynamischen Variable dP/dt_{max} bedingt sein.

In der vorliegenden Studie konnte durch die Applikation von Forskolin eine Reduktion der Infarktgröße beobachtet werden, die durch Cx43-Inhibitoren aufgehoben wurde. Es zeigten sich jedoch in Bezug auf die hämodynamische Variable keine funktionellen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Dies könnte einerseits an der begrenzten Beobachtungszeit der Reperusionsphase liegen, andererseits könnte eine mögliche Erklärung hierfür das myokardiale Stunning sein. Hierbei persistiert, trotz Beseitigung der Myokardischämie durch Wiederherstellung der Perfusion und trotz normalem koronarem Blutfluss, die postischämische kontraktile Dysfunktion. Es kann zwar zu einer Erholung der kontraktiven Funktion des Myokards kommen, jedoch erfolgt diese nicht unmittelbar, sondern erfordert Zeit [10]. Es ist möglich, dass in der vorliegenden Studie, die Beobachtungsdauer nach der Reperfusion zu kurz gewählt wurde, um diesen Effekt zu sehen. In weiteren Versuchsreihen müsste daher untersucht werden, ob durch eine längere Reperusionsphase die Erholung der kontraktiven Funktion am Myokard beobachtet werden kann.

4.5 Diskussion der Methodik

Das isolierte Herz nach Langendorff ermöglicht eine über Stunden andauernde stabile koronare Perfusion des Herzens über eine retrograde Perfusion der Aorta. Hierbei gelangt das Perfusat aufgrund der druckbedingt dauerhaft geschlossenen Aortenklappe über die Koronararterien ins Herzgewebe. Ein Abfluss des Perfusats aus dem Herzen ist

durch den *Sinus coronarius* gewährleistet. Die Langendorff-Apparatur ermöglicht die Durchführung verschiedener Forschungsansätze. In einem Ischämie-Reperusionsmodell wird die Auswirkung einer Ischämie auf das Myokard getestet. Während des Experiments können mechanische Parameter, wie beispielsweise Inotropie und Chronotropie, metabolische Effekte und pharmakologische Auswirkungen erfasst werden. Eine direkte Medikamentenwirkung auf das Myokard kann ebenfalls getestet werden [83, 120]. Das Prinzip dieser isolierten Perfusion hat den Vorteil, dass das Herz unabhängig von extrakardialen, systemischen Einflüssen untersucht werden kann. Das vegetative Nervensystem, Hormone oder andere Organsysteme können die Versuchsdurchführung nicht beeinflussen. Die Langendorff-Experimente sind leicht reproduzierbar, zeitsparend und kostengünstig. Durch den eigenen Taktgeber innerhalb des Herzens arbeitet das Organ über die physiologische Erregungsausbreitung autonom [121].

Einschränkungen der Langendorff-Apparatur sind beispielsweise potentiell auftretende mikrobiologische Kontaminationen, welche die Versuchsergebnisse beeinflussen können. Daher ist eine gründliche Reinigung der Anlage nach jedem Gebrauch obligat [122]. Zudem bedarf der Präparation des Herzens ein hohes Maß an Präzision, da das Organ sensibel gegenüber Verletzungen ist. Während der Präparation und der Anbringung des Herzens an die Apparatur besteht die Möglichkeit, das Organ versehentlich ischämisch zu präkonditionieren. In den vorliegenden Versuchen erfolgte die Präparation und die Organentnahme innerhalb von 30 Sekunden, um die ungewollte Ischämiezeit einzugrenzen. Es wurde darauf geachtet, die Entnahmezeit in allen Versuchsgruppen identisch zu halten.

Die Infarktgröße der Forskolingruppe betrug $26 \pm 6 \%$. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $37 \pm 8 \%$, zeigte sich ein deutlich protektiver Effekt des Forskolins. Eine zusätzliche ischämische Präkonditionierung der Versuchsgruppen scheint unwahrscheinlich.

Ein weiterer Nachteil des Versuchsaufbaus ist, dass es durch die retrograde Perfusion des Herzens zu einer Insuffizienz der Aortenklappe kommen kann. Dadurch fließt das Perfusat nicht mehr durch die Koronararterien und das Herzgewebe kann nicht adäquat versorgt werden. Ein exakter Nachbau der physiologischen Bedingungen des Herzens ist mit der Langendorff-Apparatur prinzipiell nicht möglich; so fehlt beispielsweise die extrinsische neuronale Steuerung des Herzens [121].

Einen Nachteil unseres Versuchsdesigns stellt die Verwendung von ausschließlich gesunden Rattenherzen dar. Eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den klinischen Alltag wäre dadurch denkbar, dass die Versuche mit bereits vorerkrankten, wie beispielsweise arteriosklerotisch, hypertensiv oder diabetogen veränderten Rattenherzen ergänzt würden. Dies war jedoch nicht Fokus unserer Studie, bei primär die Beteiligung von Cx43 bei der Forskolin-bedingten Kardioprotektion untersucht werden sollte.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Forschungsergebnisse liefern erstmals Hinweise über die Beteiligung von Cx43 an der durch Forskolin-bedingten Kardioprotektion und damit eine mögliche Erklärung für den alterungsbedingten Wirkverlust der Forskolin-bedingten Kardioprotektion. Das Verständnis und die Erforschung der exakten Signaltransduktionswege der Kardioprotektion sind entscheidend, um in Zukunft Patienten mit kardiovaskulärem Risiko und Patienten mit Myokardinfarkt optimal prophylaktisch und therapeutisch behandeln zu können. Das Ziel dieser Forschungen ist, auf lange Sicht, die Inzidenz, Morbidität und Mortalität eines akuten Myokardinfarktes zu senken.

5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, 2019. Todesursachen. [online]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html> [abgerufen am 07.08.2019].
2. Statistisches Bundesamt, 2019. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2017. [online]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> [abgerufen am 07.08.2019]
3. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2019. Daten zu Herzinfarkten in der Region Augsburg (Mortalität, Morbidität, Letalität, Vorerkrankungen, medizinische Versorgung). [online]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gast&p_aid=0&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=6770#tab4 [abgerufen am 17.07.2019]
4. Statistisches Bundesamt, 2019. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten [Pressemitteilung] 29. September 2017. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html [abgerufen am 17.07.2019].
5. Downey, J., et al., *Signaling pathways in ischemic preconditioning*. Heart failure reviews, 2007. 12(3-4): p. 181-188.
6. Dörge, H., R. Schulz, and G. Heusch, *Pathophysiology of hibernation, stunning, and ischemic preconditioning*. Thorac Cardiovasc Surg, 1998. 46 Suppl 2: p. 255-62; discussion 263.
7. Heusch, G. and R. Schulz, *Hibernating Myocardium: New Answers, Still More Questions!* Circulation Research, 2002. 91(10): p. 863-865.
8. Rahimtoola, S.H., *A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina*. Circulation, 1985. 72(6 Pt 2): p. V123-35.
9. Dörge, H., G. Schulz, and Heusch, *Pathophysiologie von Hibernation, Stunning und Ischemic Preconditioning*. Der Internist, 1998. 39(7): p. 676-683.
10. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. 66(6): p. 1146-9.

11. Bolli, R., *Mechanism of myocardial "stunning"*. Circulation, 1990. 82(3): p. 723-38.
12. St John Sutton, M., et al., *Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial*. Circulation, 1997. 96(10): p. 3294-9.
13. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. 70: p. 68-78.
14. Cadenas, S., J. Aragonés, and M.O. Landazuri, *Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2010. 88(2): p. 219-28.
15. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2006. 70(2): p. 181-90.
16. Boyle, E.M., Jr., et al., *Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion*. Ann Thorac Surg, 1996. 62(6): p. 1868-75.
17. Bainey, K.R. and P.W. Armstrong, *Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. Am Heart J, 2014. 167(5): p. 637-45.
18. Ju, Y.K., D.A. Saint, and P.W. Gage, *Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes*. J Physiol, 1996. 497 (Pt 2): p. 337-47.
19. Turer, A.T. and J.A. Hill, *Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy*. Am J Cardiol, 2010. 106(3): p. 360-8.
20. H.Rieger, W.S., *Klinische Angiologie* 1998: Springer Verlag, p. 543-545.
21. Jacobshagen, C., *[Late sodium current and calcium overload--pathogenesis and adequate treatment]*. Dtsch Med Wochenschr, 2013. 138(16): p. 842-7.
22. Sossalla, S. and L.S. Maier, *Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes*. Pharmacol Ther, 2012. 133(3): p. 311-23.
23. Tani, M. and J.R. Neely, *Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange*. Circ Res, 1989. 65(4): p. 1045-56.
24. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial Reperfusion Injury*. New England Journal of Medicine, 2007. 357(11): p. 1121-1135.
25. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes*. Exs, 1996. 76: p. 99-114.

26. Xu, Y., et al., *Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(2): p. H692-9.
27. Herold, G., *Innere Medizin*. 2014, Gerd Herold: Köln. p. 255-257.
28. Karow, T., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 2013, p. 171-177
29. Lapp, H. and I. Krakau, *Das Herzkatheterbuch. Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*. 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 48-90.
30. Ackermann, H., *Allex- Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP*. 2014: Thieme, p.90-94.
31. 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.
32. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. 87(3): p. 893-9.
33. Tsutsui, H., et al., *Protective effect of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through sympathetic nervous system in rats*. Eur J Pharmacol, 2013. 718(1-3): p. 206-12.
34. Ko, J.S., et al., *The protective effect of ischemic preconditioning against hepatic ischemic-reperfusion injury under isoflurane anesthesia in rats*. Transplant Proc, 2013. 45(5): p. 1704-7.
35. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system*. J Am Coll Cardiol, 2005. 46(3): p. 450-6.
36. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(11): p. 2277-82.
37. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. 370(9587): p. 575-9.
38. Ali, Z.A., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial*. Circulation, 2007. 116(11 Suppl): p. I98-105.

39. Kharbanda, R.K., T.T. Nielsen, and A.N. Redington, *Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice*. Lancet, 2009. 374(9700): p. 1557-65.
40. Thielmann, M., et al., *Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial*. Lancet, 2013. 382(9892): p. 597-604.
41. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. 94(9): p. 2193-200.
42. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. Circulation, 1997. 96(5): p. 1641-6.
43. Kleinbongard, P., et al., *Persistent Survival Benefit From Remote Ischemic Pre-Conditioning in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery*. Journal of the American College of Cardiology, 2018. 71(2): p. 252-254.
44. Botker, H.E., et al., *Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial*. Lancet, 2010. 375(9716): p. 727-34
45. White, S.K., et al., *Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction*. JACC Cardiovasc Interv, 2015. 8(1 Pt B): p. 178-188.
46. Luo, S.J., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing coronary stent implantation*. Can J Cardiol, 2013. 29(9): p. 1084-9
47. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. 373(15): p. 1397-407.
48. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery*. N Engl J Med, 2015. 373(15): p. 1408-17.
49. 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

50. Mullenheim, J., et al., *Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals*. Anesthesiology, 2002. 96(4): p. 934-40.
51. 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.
52. 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.
53. Heinen, A., et al., *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium channel activation*. Anesthesiology, 2008. 109(5): p. 830-6.
54. Weber, N.C., et al., *The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK*. Br J Pharmacol, 2005. 144(1): p. 123-32.
55. Pagel, P.S., et al., *Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo*. Anesth Analg, 2007. 105(3): p. 562-9.
56. 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.
57. 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.
58. Sesti, C., et al., *The phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil reduces myocardial infarct size*. Int J Impot Res, 2007. 19(1): p. 55-61.
59. Pagliaro, P., et al., *Cardioprotective pathways during reperfusion: focus on redox signaling and other modalities of cell signaling*. Antioxid Redox Signal, 2011. 14(5): p. 833-50.
60. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. 46(6): p. 821-31.

61. 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.
62. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. 298(5595): p. 1029-33.
63. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. 312(2): p. 644-50.
64. Heinen, A., et al., *Helium-induced Preconditioning in Young and Old Rat Heart*. Anesthesiology, 2008(109): p. 830-836.
65. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A*. Exp Gerontol, 2012. 47(1): p. 116-21.
66. Heinen, A., et al., *Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK signaling pathway*. Exp Gerontol, 2014. (56), 99-105.
67. Su, V. and A.F. Lau, *Connexins: Mechanisms regulating protein levels and intercellular communication*. FEBS Letters, 2014. 588(8): p. 1212-1220.
68. D'Hondt, C., et al., *Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?* Bioessays, 2009. 31(9): p. 953-74.
69. Iyyathurai, J., et al., *Peptides and peptide-derived molecules targeting the intracellular domains of Cx43: Gap junctions versus hemichannels*. Neuropharmacology, 2013. 75(0): p. 491-505.
70. Kar, R., et al., *Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012. 524(1): p. 2-15.
71. TenBroek, E.M., et al., *Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP*. J Cell Biol, 2001. 155(7): p. 1307-18.
72. Boengler, K., et al., *Connexin 43 impacts on mitochondrial potassium uptake*. Front Pharmacol, 2013. 4: p. 73.
73. 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.
74. Boengler, K., G. Heusch, and R. Schulz, *Connexin 43 and ischemic preconditioning: effects of age and disease*. Exp Gerontol, 2006. 41(5): p. 485-8.

75. National Center for Biotechnology Information, 2019. Forskolin, CID=47936,. PubChem Database. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Forskolin> [abgerufen am 17.07. 2019]
76. Przyklenk, K., et al., *Pretreatment with D-myo-inositol trisphosphate reduces infarct size in rabbit hearts: role of inositol trisphosphate receptors and gap junctions in triggering protection*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. 314(3): p. 1386-92.
77. Wang, N., et al., *Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca²⁺ elevation*. Basic Res Cardiol, 2012. 107(6): p. 304.
78. Evans, W.H. and S. Boitano, *Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication*. Biochem Soc Trans, 2001. 29(Pt 4): p. 606-12.
79. Hawat, G., P. Helie, and G. Baroudi, *Single intravenous low-dose injections of connexin 43 mimetic peptides protect ischemic heart in vivo against myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2012. 53(4): p. 559-66.
80. Gysembergh, A., R.A. Kloner, and K. Przyklenk, *Pt. Cardiovasc Pathol*, 2001. 10(1): p. 13-7.
81. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2012, Pulheim. p975-976.
82. Ungemach, R.F., R. Kroker, and W. Löscher, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 2010, Stuttgart: Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & co. KG. 712.
83. Döring, H.J. and Döring, *The isolated perfused heart according to langendorff —History and presence, modifications and applications*. Acta Chirurgica Austriaca, 1996. 28(6): p. 328-333.
84. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. Pflüger, Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere, 1895. 61(6): p. 291-332.
85. Panlab, *User manuel LE 05.200 Langendorff*. 2002: Barcelona. p. 1.
86. Nachlas, M.M. and T.K. Shnitka, *Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity*. Am J Pathol, 1963. 42: p. 379-405.

87. Klein, H.H., et al., *The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction*. Virchows Archiv A, 1981. 393(3): p. 287-297.
88. Marone, G., et al., *Inhibition of IgE-mediated release of histamine and peptide leukotriene from human basophils and mast cells by forskolin*. Biochem Pharmacol, 1987. 36(1): p. 13-20.
89. Caprioli, J. and M. Sears, *Forskolin lowers intraocular pressure in rabbits, monkeys, and man*. Lancet, 1983. 1(8331): p. 958-60.
90. Kilmer, S.L. and R.C. Carlsen, *Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration*. Nature, 1984. 307(5950): p. 455-77.
91. Lochner, A., et al., *Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway*. Circulation, 1999. 100(9): p. 958-66.
92. Makaula, S., et al., *H-89, a non-specific inhibitor of protein kinase A, promotes post-ischemic cardiac contractile recovery and reduces infarct size*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. 45(4): p. 341-7.
93. Redel, A., et al., *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning*. Anesth Analg, 2008. 106(2): p. 384-91.
94. Frassdorf, J., et al., *Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels*. Can J Anaesth, 2010. 57(8): p. 767-73.
95. 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.
96. Löwel, H., *Themenheft 33" Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt"*. 2006.
97. Devlin, W., et al., *Comparison of outcome in patients with acute myocardial infarction aged > 75 years with that in younger patients*. Am J Cardiol, 1995. 75(8): p. 573-6.
98. Maggioni, A.P., et al., *Age-related increase in mortality among patients with first myocardial infarctions treated with thrombolysis. The Investigators of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-2)*. N Engl J Med, 1993. 329(20): p. 1442-8.

99. Haase, K.K., et al., *In-hospital mortality of elderly patients with acute myocardial infarction: data from the MITRA (Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction) registry*. Clin Cardiol, 2000. 23(11): p. 831-6.
100. Fenton, R.A., et al., *Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 2000. 32(7): p. 1371-5.
101. Sniecinski, R. and H. Liu, *Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium*. Anesthesiology, 2004. 100(3): p. 589-97.
102. Abete, P., et al., *Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart*. J Am Coll Cardiol, 1996. 27(7): p. 1777-86.
103. Przyklenk, K., G. Li, and P. Whittaker, *No loss in the in vivo efficacy of ischemic preconditioning in middle-aged and old rabbits*. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(6): p. 1741-7.
104. Burns, P.G., et al., *Is the preconditioning response conserved in senescent myocardium?* Ann Thorac Surg, 1996. 61(3): p. 925-9.
105. Sanada, S., et al., *Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C*. Circulation, 2004. 110(1): p. 51-7.
106. Boengler, K., et al., *Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(4): p. H1764-9.
107. Schulz, R. and G. Heusch, *Connexin43 and ischemic preconditioning*. Adv Cardiol, 2006. 42: p. 213-27.
108. Schwanke, U., et al., *No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(4): p. H1740-2.
109. Rodriguez-Sinovas, A., et al., *Effects of substitution of Cx43 by Cx32 on myocardial energy metabolism, tolerance to ischaemia and preconditioning protection*. J Physiol, 2010. 588(Pt 7): p. 1139-51.
110. Muramatsu, T., et al., *Reduction of connexin 43 expression in aged human dental pulp*. Int Endod J, 2004. 37(12): p. 814-8.
111. Yeh, H.I., et al., *Age-related alteration of gap junction distribution and connexin expression in rat aortic endothelium*. J Histochem Cytochem, 2000. 48(10): p. 1377-89.

112. Jones, S.A., M.K. Lancaster, and M.R. Boyett, *Ageing-related changes of connexins and conduction within the sinoatrial node*. J Physiol, 2004. 560(Pt 2): p. 429-37.
113. Chen, M. and D.L. Jones, *Age- and myopathy-dependent changes in connexins of normal and cardiomyopathic Syrian hamster ventricular myocardium*. Can J Physiol Pharmacol, 2000. 78(8): p. 669-78.
114. Garcia-Dorado, D., et al., *Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion*. Circulation, 1997. 96(10): p. 3579-86.
115. Chen, B.P., et al., *Delayed uncoupling contributes to the protective effect of heptanol against ischaemia in the rat isolated heart*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005. 32(8): p. 655-62.
116. Saltman, A.E., et al., *Gap junction uncoupling protects the heart against ischemia*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. 124(2): p. 371-6.
117. Miura, T., et al., *Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 286(1): p. H214-21.
118. Johansen, D., et al., *Heptanol triggers cardioprotection via mitochondrial mechanisms and mitochondrial potassium channel opening in rat hearts*. Acta Physiol (Oxf), 2011. 201(4): p. 435-44.
119. Li, G., et al., *The gap junction uncoupler heptanol abrogates infarct size reduction with preconditioning in mouse hearts*. Cardiovasc Pathol, 2002. 11(3): p. 158-65.
120. Doring, H.J., *The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application*. Physiol Bohemoslov, 1990. 39(6): p. 481-504.
121. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. 55(2): p. 113-26.
122. 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.