

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Pannen

Milrinon-induzierte Postkonditionierung am isolierten Langendorff-Herz:
Dosisabhängige Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens und die
Bedeutung von mitochondrialen calciumsensitiven Kaliumkanälen großer
Leitfähigkeit

Dissertation

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

vorgelegt von
Lara Charlott Trefz

2019

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

gez.: Lara Charlott Trefz

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

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

Zweitgutachter: PD Dr. med. G. Niegisch

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Behmenburg F, **Trefz L**, Dorsch M, Ströthoff M, Mathes A, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Berger MM, Huhn R.

Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca²⁺-sensitive Potassium (mBK_{Ca}) Channels.

J Cardiothorac Vasc Anesth. 2018 Oct;32(5):2142-2148. doi: 10.1053/j.jvca.2017.11.048. Epub 2017 Nov 29

Zusammenfassung

Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter in den Industrienationen. Als akutes Ereignis spielt dabei der Myokardinfarkt eine vorrangige Rolle. Die zeitnahe Reperfusion des ischämischen Myokards ist obligatorisch, um den nekrotischen Untergang von Myokardzellen zu verhindern. Jedoch wirkt auch die Reperfusion *per se* toxisch auf die Zellen. Das ischämische Postkonditionierungsphänomen bietet eine Möglichkeit, diesen Ischämie-Reperfusionsschaden einzugrenzen. Mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (mBK_{Ca}-Kanäle) sind bei der ischämischen Postkonditionierung (PostC) beteiligt. Es ist unbekannt, ob die mBK_{Ca}-Kanäle bei der pharmakologischen PostC mit Milrinon (Phosphodiesterase-III-Inhibitor) beteiligt sind.

Diese Arbeit untersucht, ob eine dosisabhängige Milrinon-induzierte PostC den Ischämie-Reperfusionsschaden reduziert und ob dieser protektive Effekt über die mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird.

Experimentell untersucht wurden diese Fragestellungen an isolierten Herzen von jungen, männlichen Wistar-Ratten im Langendorff-Modell. Die Herzen wurden mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert und unterliefen eine globale, 33-minütige Ischämie und 60-minütige Reperusionsphase. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt. In einer ersten Versuchsserie zur Milrinon-Dosisfindung wurden die Tiere in sieben Gruppen (je Gruppe n = 10) randomisiert. Milrinon wurde mit Reperusionsbeginn über zehn Minuten in den Konzentrationen 0,3 (Mil 0,3), 1 (Mil 1), 3 (Mil 3), 10 (Mil 10), 30 (Mil 30) und 100 (Mil 100) μM appliziert. Die Kontrolltiere (Con 1) erhielten das Vehikel, bestehend aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und Krebs-Henseleit-Puffer. Basierend auf den Ergebnissen der ersten Serie wurden die Versuche der zweiten Reihe mit 3 μM Milrinon fortgeführt. Die Tiere wurden in vier Gruppen (je Gruppe n = 8/9) randomisiert. Mit Beginn der Reperfusion wurde über zehn Minuten Milrinon (Mil), Milrinon mit 1 μM Paxillin (mBK_{Ca}-Kanalinhistor, [Mil + Pax]) oder 1 μM Paxillin (Pax) alleine appliziert. Die Kontrollgruppe (Con 2) erhielt die Vehikellösung. Die statistische Auswertung erfolgte über einen *One-way ANOVA* mit *Tukey's post hoc test*; $p < 0,05$. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

In den Experimenten der ersten Serie zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduzierung auf $22 \pm 7\%$ ($p < 0,05$ *versus* (vs.) Con 1: $37 \pm 7\%$) bei einer Konzentration von 3 μM Milrinon. Höhere Konzentrationen Milrinon (10, 30 und 100 μM) reduzierten die Infarktgröße nicht weiter (Mil 10: $24 \pm 8\%$; Mil 30: $25 \pm 6\%$; Mil 100: $21 \pm 8\%$; nicht signifikant (ns) vs. Mil 3). Niedrigere Konzentrationen Milrinon (0,3 und 1 μM) waren nicht protektiv (Mil 0,3: $44 \pm 5\%$; Mil 1: $40 \pm 3\%$; ns vs. Con 1). In der zweiten Serie betrug die Infarktgröße in der Kontrollgruppe $42 \pm 8\%$ des Risikogebiets. Milrinon-induzierte PostC reduzierte die Infarktgröße auf $25 \pm 6\%$ ($p < 0,05$ vs. Con 2). Paxillin blockierte die Milrinon-induzierte Kardioprotektion (Mil + Pax: $42 \pm 9\%$, $p < 0,05$ vs. Mil). Paxillin alleine hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (Pax: $47 \pm 4\%$, ns vs. Con 2).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Milrinon-induzierte PostC kardioprotektiv wirkt und dieser Effekt über eine Aktivierung der mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird.

Die gezielte, pharmakologische PostC könnte klinisch als einfache, additive Maßnahme zur klassischen Reperfusionstherapie bei akuten ischämisch-kardialen Ereignissen eingeführt werden und durch die Reduzierung des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens die Überlebensrate von betroffenen Patienten verbessern.

Summary

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death in the industrialized nations in adulthood. As an acute event the myocardial infarction plays a leading role. The contemporary reperfusion of the myocardium is mandatory to avoid the necrotic decline of cardiac muscle cells. Paradoxically reperfusion also appears to have a toxic effect on the cells. The ischemic postconditioning phenomenon offers an opportunity to set limits to this ischemic-reperfusion injury. Mitochondrial calcium-sensitive potassium channels (mBK_{Ca}-channels) are part of ischemic postconditioning. It is unknown whether mBK_{Ca}-channels are involved in milrinone (phosphodiesterase-3-inhibitor) - induced postconditioning.

The goal of this study was to discover whether a dose-dependent milrinone-induced postconditioning leads to a reduction of ischemic-reperfusion injury and if this cardioprotective effect involves activation of mBK_{Ca}-channels.

The experimental studies were conducted on the isolated rat heart from two-month-old, male Wistar rats in a Langendorff system. Hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer and subjected to 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. At the end of an experiment infarct size was determined by TTC staining. In a first series to determine a dose-effect curve rats were randomized into seven groups (n= 10 per group). At the onset of reperfusion milrinone was applied for ten minutes in the following concentrations: 0.3 (Mil 0.3), 1 (Mil 1), 3 (Mil 3), 10 (Mil 10), 30 (Mil 30) and 100 (Mil 100) μ M. The control group (Con 1) received the vehicle consisting of dimethylsulfoxid (DMSO) and Krebs-Henseleit buffer. Based on the results of the first series, further experiments in the second series were conducted with 3 μ M milrinone. Hearts were randomized into four groups (n= 8/9 per group). With the onset of reperfusion milrinone (Mil), milrinone with 1 μ M paxilline (mBK_{Ca}-channel-inhibitor, [Mil+ Pax]) or 1 μ M paxilline alone (Pax) were applied over ten minutes. The control group (Con 2) received the vehicle. All data (mean \pm standard deviation) were analysed with a One-way ANOVA with Tukey's post hoc test; $p < 0.05$.

In the first series milrinone at a concentration of 3 μ M reduced infarct size significant to $22 \pm 7\%$ ($p < 0.05$ versus (vs.) Con 1: $37 \pm 7\%$). Higher concentrations of 10, 30 and 100 μ M milrinone did not lead to a further infarct size reduction (Mil 10: $24 \pm 8\%$; Mil 30: $25 \pm 6\%$; Mil 100: $21 \pm 8\%$; not significant (ns) vs. Mil 3). Concentrations of 0.3 and 1 μ M milrinone were not protective (Mil 0.3: $44 \pm 5\%$; Mil 1: $40 \pm 3\%$; ns vs. Con 1). In the second series the control group had an infarct size of $42 \pm 8\%$. Postconditioning with 3 μ M milrinone reduced infarct size to $25 \pm 6\%$ ($p < 0.05$ vs. Con 2). Paxilline blocked milrinone-induced cardioprotection (Mil+ Pax: $42 \pm 9\%$, $p < 0.05$ vs. Mil). Paxilline alone had no effect on infarct size (Pax: $47 \pm 4\%$, ns vs. Con 2).

The results show that milrinone-induced postconditioning has a cardioprotective effect. They further show that this effect involves activation of mBK_{Ca}-channels. The selective pharmacological postconditioning could be translated into the clinical routine as an easy, additive procedure to the classic reperfusion therapy in events of acute myocardial infarction. The resulting reduction of ischemic-reperfusion injury could improve the survival rate in affected patients.

Abkürzungsverzeichnis

<i>AAR</i>	<i>Area at Risk</i>
Abb.	Abbildung
<i>AOP</i>	<i>Aortic Pressure</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Koronarfluss
CK	Kreatinin-Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>GLP-1</i>	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
HF	Herzfrequenz
i.p.	Intraperitoneal
iPostC	Ischämische Postkonditionierung
IR-Schaden	Ischämie-Reperfusionsschaden
JAK	Janus-Kinase
LVP _{dys}	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP _{sys}	Linksventrikulärer endsystolischer Druck
MAD	Mittlerer arterieller Druck
mBK _{Ca} -Kanäle	Mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit
IPC	Ischämische Präkonditionierung
ns	Nicht Signifikant
<i>NS1619</i>	<i>1,3-Dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one</i>
PKA	Proteinkinase A
PostC	Postkonditionierung
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
<i>RISK</i>	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
RIPC	<i>Remote</i> ischämische Präkonditionierung
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>RPP</i>	<i>Rate Pressure Product</i>
<i>SAFE</i>	<i>Survival Activating Factor Enhancement.</i>
<i>STAT3</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
vs.	<i>versus</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

SI-Einheiten

g	Gramm
kg	Kilogramm
g/mol	Gramm pro Mol
μg	Mikrogramm
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
l	Liter
μl	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
s	Sekunden
min	Minuten
h	Stunde

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	AKUTER MYOKARDINFARKT	1
1.1.1	DEFINITION, INZIDENZ UND FOLGEN	1
1.1.2	PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	2
1.2	KONDITIONIERUNG ALS STRATEGIE ZUM SCHUTZ VOR EINEM ISCHÄMIE- REPERFUSIONSSCHADEN	4
1.2.1	ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	4
1.2.2	ISCHÄMISCHE POSTKONDITIONIERUNG	5
1.2.3	MECHANISMEN DER ISCHÄMISCHEN PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	7
1.3	PHARMAKOLOGISCHE POSTKONDITIONIERUNG	9
1.4	MILRINON	11
1.5	MITOCHONDRIALE CALCIUMSENSITIVE KALIUMKANÄLE GROßER LEITFÄHIGKEIT	13
1.6	DAS ISOLIERTE HERZ NACH LANGENDORFF	16
1.7	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER DISSERTATION	16
2	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	VERSUCHSTIERE	17
2.1.2	MODIFIZIERTE KREBS-HENSELEIT-LÖSUNG	18
2.1.3	LANGENDORFF-ANLAGE	19
2.1.4	LABORGERÄTE	20
2.1.5	PHARMAKA	20
2.1.6	CHEMIKALIEN	21
2.1.7	GASE	22
2.1.8	COMPUTER UND SOFTWARE	22
2.2	METHODIK	23
2.2.1	PRÄPARATION UND ISOLIERTE PERFUSION DES RATTENHERZENS	23
2.2.2	UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DES PROTEKTIVEN EFFEKTS DER ISCHÄMISCHEN PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	25
2.2.3	UNTERSUCHUNG DES PROTEKTIVEN EFFEKTS VON MILRINON	27
2.2.4	TTC-FÄRBUNG DER HERZEN	33
2.2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	34

3	<u>ERGEBNISSE</u>	35
3.1	INFARKTGRÖßEN DER VORVERSUCHE ZU ISCHÄMISCHER PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	35
3.2	ERGEBNISSE DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	36
3.2.1	INFARKTGRÖßEN	36
3.2.2	HÄMODYNAMIK	38
3.2.3	TIERGEWICHT, HERZGEWICHT UND ISCHÄMISCHE KONTRAKTUR	40
3.3	ERGEBNISSE DER PAXILLIN-STUDIE	41
3.3.1	INFARKTGRÖßEN	41
3.3.2	HÄMODYNAMIK	43
3.3.3	TIERGEWICHT, HERZGEWICHT UND ISCHÄMISCHE KONTRAKTUR	44
4	<u>DISKUSSION</u>	45
4.1	DISKUSSION – MATERIAL UND METHODIK	46
4.1.1	MODIFIZIERTE KREBS-HENSELEIT-LÖSUNG	46
4.1.2	ISOLIERTES HERZ IM LANGENDORFF-MODELL	48
4.2	DISKUSSION – ERGEBNISSE	51
4.2.1	KARDIOPROTEKTIVER EFFEKT VON ISCHÄMISCHER PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	51
4.2.2	DOSISABHÄNGIGER KARDIOPROTEKTIVER EFFEKT VON MILRINON	52
4.2.3	BLOCKIERUNG DES MILRINON-INDUZIERTEN KARDIOPROTEKTIVEN EFFEKTS IN DER PAXILLIN-STUDIE	57
5	<u>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</u>	62
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	65

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: MILRINON	11
ABB. 2: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER LANGENDORFF-ANLAGE	24
ABB. 3: VERSUCHSABLAUF DER VORVERSUCHSREIHE ZU ISCHÄMISCHER PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	26
ABB. 4: VERSUCHSABLAUF DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	29
ABB. 5: VERSUCHSABLAUF DER PAXILLIN-STUDIE	33
ABB. 6: PLANIMETRIE EINES RATTENHERZENS NACH TTC-FÄRBUNG	34
ABB. 7: INFARKTGRÖßEN DER VORVERSUCHSREIHE ZU ISCHÄMISCHER PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG	36
ABB. 8: INFARKTGRÖßEN DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	37
ABB. 9: INFARKTGRÖßEN DER PAXILLIN-STUDIE	42
ABB. 10: SIGNALKASKADE DER MILRINON-INDUZIERTEN KARDIOPROTEKTION	63

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER MODIFIZIERTEN KREBS-HENSELEIT-LÖSUNG	18
TABELLE 2: PIPETTIERSHEMA FÜR MILRINON (PHOSPHODIESTERASE-III-INHIBITOR) IN DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	28
TABELLE 3: PIPETTIERSHEMA FÜR 3 μ M MILRINON (PHOSPHODIESTERASE-III-INHIBITOR) IN DER PAXILLIN-STUDIE	30
TABELLE 4: PIPETTIERSHEMA FÜR 1 μ M PAXILLIN (MBK _{CA} -KANALINHIBITOR) IN DER PAXILLIN-STUDIE	31
TABELLE 5: HÄMODYNAMISCHE PARAMETER DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	39
TABELLE 6: TIERGEWICHTE, HERZTROCKEN- UND -NASSGEWICHTE SOWIE ZEITPUNKT UND HÖHE DER MAXIMALEN ISCHÄMISCHEN KONTRAKTUR DER MILRINON-DOSISFINDUNGSSTUDIE	41
TABELLE 7: HÄMODYNAMISCHE PARAMETER DER PAXILLIN-STUDIE	43
TABELLE 8: TIERGEWICHTE, HERZTROCKEN- UND -NASSGEWICHTE SOWIE ZEITPUNKT UND HÖHE DER MAXIMALEN ISCHÄMISCHEN KONTRAKTUR DER PAXILLIN-STUDIE	45

1 Einleitung

1.1 Akuter Myokardinfarkt

1.1.1 Definition, Inzidenz und Folgen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z. B. die chronische ischämische Herzkrankheit zählen in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter (1). Die steigende Inzidenz und Prävalenz dieser chronischen Erkrankungen sind mit der stetig wachsenden Lebenserwartung und dem demografischen Wandel assoziiert (2).

Als akutes Ereignis und mögliche Folge einer bestehenden ischämischen Herzkrankheit spielt der Myokardinfarkt eine vorrangige Rolle. Ein akuter Myokardinfarkt ist definiert als eine „irreversible Nekrose größerer zusammenhängender Myokardanteile, meist infolge eines akuten Koronarverschlusses“ (3). Morbidität und Mortalität infolge eines Myokardinfarkts steigen mit höherem Alter (4).

Laut Statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2015 in Deutschland über 200 000 Patienten aufgrund eines akuten Myokardinfarkts vollstationär behandelt (5). Knapp 50 000 Patienten verstarben daran (6). Arbeitsausfälle und langfristige Krankschreibungen als Folge von Herz-Kreislauf-Erkrankungen belasten das Gesundheitssystem und die Wirtschaft (7).

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die einen akuten Koronarverschluss begünstigen können. Dazu zählen mangelnde körperliche Bewegung, Nikotinabusus, Hyperlipidämie, Adipositas, Diabetes mellitus, Fehlernährung und die arterielle Hypertonie (8). Die häufigste Ursache eines akuten Myokardinfarkts ist die Ausbildung eines Thrombus im myokardialen Gefäßsystem. Diese Thrombusbildung ist meist Folge einer Thrombozytenaggregation aufgrund eines Risses in einer arteriosklerotischen Plaque. Eine Gefäßthrombose kann zu einem ischämischen Myokardinfarkt führen, indem der Thrombus einen Teil der koronaren Gefäßversorgung verschließt (8).

Infolge des Myokardinfarkts kann es zu unterschiedlichen Komplikationen kommen. In der Akutphase sind Rhythmusstörungen in Form von Leitungsblockierungen, Vorhof- und Kammerflimmern sowie die ventrikuläre Extrasystolie und Tachykardie von Bedeutung. Auch zu nennen sind Kontraktionsstörungen, kardiogener Schock,

Papillarmuskelabriss sowie Ventrikelwand- und Septumruptur. Eine weitere Akutkomplikation ist die *Pericarditis epistenocardia*. Die chronischen Komplikationen umfassen ebenfalls Rhythmusstörungen sowie Herzinsuffizienz (8).

1.1.2 Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens

Die Kardiomyozyten reagieren auf eine akute Minderdurchblutung mit unterschiedlichen Formen der Schädigung. Es kann zum einen infolge der Ischämie zu einem Kontraktilitätsverlust kommen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Anpassung des Myokards an die ischämischen Bedingungen, indem es seinen Energieverbrauch drastisch senkt und damit potenziell seine Vitalität erhält. Wenn die Ischämie allerdings länger als 20 bis 40 Minuten besteht, bilden sich Zellnekrosen im betroffenen Versorgungsareal aus. Dieser Zelluntergang lässt sich serologisch am Anstieg des Troponin T und der Kreatinin-Kinase (CK) beziehungsweise an deren Isoenzym CK-MB messen (8). Weitere Formen der myokardialen Zellschädigung sind das *hibernating myocardium* sowie das *stunned myocardium*. *Hibernating myocardium* beschreibt einen reversiblen Zustand der Kontraktilitätsreduktion und linksventrikulären Dysfunktion infolge eines geringen koronaren Blutflusses. Kommt es zu einer adäquaten Revaskularisierung des betroffenen Areals, ist eine Wiederherstellung der normalen Herzfunktion möglich (9). Der Begriff *stunned myocardium* beschreibt postischämische anhaltende Kontraktionsstörungen trotz Reperfusion und ohne die Zellen dauerhaft geschädigt zu haben (10). In der klinischen Praxis ist beim akuten Myokardinfarkt ein effektives und schnelles Einleiten der Reperfusion entscheidend, um die Nekrose der Myokardzellen und damit das Infarktgebiet einzugrenzen (11). Therapeutisch kann dies vorzugsweise durch eine primäre perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) erreicht werden oder bei Fehlen der entsprechenden Ressourcen durch eine systemische Fibrinolyse (Übersicht in 12).

Paradoxerweise resultiert die Reperfusion ischämischen Gewebes in einer weiteren Schädigung des betroffenen Areals. Diese irreversiblen Schäden am Myokard werden als Ischämie-Reperfusionsschäden (IR-Schaden) bezeichnet. Dieser IR-Schaden betrifft die Zellen, die direkt vor der Wiederherstellung von Perfusion noch lebensfähig gewesen wären (Übersicht in 13).

Erstmals beschrieben wurde der IR-Schaden 1960 von Jennings et al. in ihren Ausführungen zu der Histologie des reperfundierten, ischämischen Hundeherzens (14). Sie berichteten von Zellschwellung, Kontraktur der Myofibrillen, Disruption der

Sarcolemma und dem Auftreten von intramitochondrialen Calcium-Phosphat-Partikeln (15). Im Laufe der Zeit wurden potenzielle Mediatoren des IR-Schadens beschrieben. Dazu zählen unter anderem oxidativer Stress, intrazellulärer Calciumüberschuss, das Öffnen der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) sowie die Hyperkontraktur von Kardiomyozyten (16). Der intrazelluläre Calciumüberschuss ist eine Folge der anaeroben Zellrespiration während akuter Ischämie. Anaerobe Zellrespiration führt zu Laktatproduktion und damit zu einem pH-Abfall ($< 7,0$). Der pH-Abfall induziert die $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Pumpe, H^+ -Ionen nach extrazellulär zu transportieren. Dies führt zu einem intrazellulären Na^+ -Überschuss, was wiederum die $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Pumpe dazu bringt, entgegen ihrer natürlichen Funktionsweise, Na^+ -Ionen ebenfalls nach extrazellulär zu transportieren (16). Dies führt schlussendlich zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Überschuss. Der niedrige pH-Wert in der Zelle verhindert in dieser Situation das Öffnen der mPTP und eine Hyperkontraktur der Kardiomyozyten (16).

Kommt es zur Reperfusion und der damit verbundenen Wiederverfügbarkeit von Sauerstoff, wird die Elektronentransportkette reaktiviert und generiert *reactive oxygen species* (ROS). Andere Quellen der ROS-Generierung sind die Xanthin-Oxidase der Endothelzellen und die NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten. ROS vermitteln einen myokardialen IR-Schaden, indem das Öffnen der mPTP induziert wird. Ferner wirkt ROS chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und vermittelt eine Fehlfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies trägt zum intrazellulären Ca^{2+} -Überschuss bei und führt zu Schäden der Zellmembran, zu Denaturierung von Enzymen sowie zu oxidativen Schäden an der DNA (16). Reperfusion und Reaktivierung der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Pumpe führen auch dazu, dass der physiologische pH-Wert rapide wiederhergestellt wird. Dies hebt den inhibitorischen Effekt auf das Öffnen der mPTP auf und löst die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten aus. Des Weiteren wird durch die Reperfusion das mitochondriale Membranpotenzial wiederhergestellt, was den Einstrom von Calcium ins Mitochondrium provoziert. Dieser mitochondriale Calciumeinstrom kann ebenfalls das Öffnen der mPTP induzieren (16). Die mPTP ist ein nicht-selektiver Kanal der inneren Mitochondrienmembran, das Öffnen der mPTP führt zur Depolarisierung dieser Membran und zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette). Dadurch kommt es zur ATP-Erschöpfung und letztendlich zum Zelltod (17, 18).

Die mPTP als Teil des Mitochondriums lässt sich als gemeinsamer Endpunkt der genannten Mediatoren (oxidativer Stress, intrazellulärer Calciumüberschuss,

Hyperkontraktur der Kardiomyozyten) und als Effektor des IR-Schadens beschreiben. Damit ist die mPTP eine wichtige Zielstruktur für Kardioprotektion.

Studien im Tiermodell zum akuten Myokardinfarkt lassen vermuten, dass bis zu 50 % der finalen Infarktgröße auf den Reperfusionsschaden zurückzuführen sind (15). Interessanterweise führt eine hypoxische Reperfusion oder ein graduelles Zuführen von Sauerstoff in der Reperfusion zu einem vergleichsweise kleinen Schaden am Gewebe (19, 20). Daraus lässt sich ableiten, dass die direkte Reperfusion mit oxygeniertem Blut das ischämische Gewebe weiter schädigt.

Ischämie und Reperfusion können schwere, irreversible Schäden am Herzen auslösen. Selbst die verbesserten therapeutischen Versorgungsstrategien myokardialer, ischämischer Ereignisse durch u. a. Thrombolyse und PTCA konnten Mortalität und Morbidität noch nicht ausreichend senken. Deshalb bedarf es Strategien, die das Herz vor den Konsequenzen schützen können und über die schnelle Reperfusionstherapie hinausgehen. Einen vielversprechenden Ansatz stellt dabei das Phänomen der Konditionierung dar.

1.2 Konditionierung als Strategie zum Schutz vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Die ischämische Konditionierung beschreibt kurze Episoden subletaler Ischämiephasen des Myokards, die mechanisch ausgelöst werden. In diesen kurzen Ischämiephasen wird die Blutzufuhr zum Herzen, je nach Protokoll, global oder regional unterbrochen. Diese Episoden verursachen keinen irreparablen Schaden, sondern stoßen körpereigene Prozesse an, die die Resistenz des Gewebes gegenüber einer länger andauernden Ischämie steigern (21). Die Konditionierung des Herzens kann vor, während oder nach einer längeren Ischämie erfolgen und wird entsprechend als Prä-, Per- bzw. Postkonditionierung bezeichnet. Eine weitere Variante ist die *remote* ischämische Konditionierung, wobei repetitive Ischämiezyklen an einem herzfernen Organ einen Schutz vor längeren Ischämiephasen am Herzen bewirken (Übersicht in 22). Murry et al. beschrieben im Jahr 1986 erstmals das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC) am Hundeherzen (23). Hierbei ließ sich die myokardiale Infarktgröße durch kurze subletale, regionale Phasen von Ischämie und Reperfusion vor einer länger andauernden Ischämie um 75 % reduzieren. Murry et al. erreichten diese

Infarktgrößenreduzierung, indem sie für viermal fünf Minuten den *Ramus circumflexus* der linken Koronararterie invasiv okkludierten, jeweils getrennt durch fünf Minuten Reperfusion, bevor sie diesen für eine längere Ischämiephase von 40 Minuten verschlossen. Der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurde in der Folge an weiteren Spezies wie Mäusen (24), Schweinen (25), Kaninchen (26), Ratten (27) und Schafen (28) bestätigt. Des Weiteren konnte der positive Effekt der IPC auch in einer Vielzahl von anderen ischämischen Organmodellen gezeigt werden. Dazu zählen die Niere (29), Leber (30), Dünndarm (31) und das Gehirn (32).

Das IPC-Protokoll ist in der klinischen Anwendung in Situationen anwendbar, in denen eine Episode myokardialer Ischämie sicher vorhersehbar ist. Dies schließt Patienten mit ein, bei denen eine kardiale Bypass-Operation, eine Herztransplantation oder auch eine perkutane Koronarintervention geplant ist. Die IPC wird mit den derzeit gängigen intraoperativen kardioprotektiven Maßnahmen, bestehend aus extrakorporaler Zirkulation, Hypothermie und Kardioplegie, kombiniert. 1993 konnten Yellon et al. erstmals zeigen, dass bei Patienten, die eine elektive Bypass-Operation erhielten, das *clamping* der Aorta von zweimal drei Minuten, getrennt durch jeweils zwei Minuten Reperfusion, zu verbesserten myokardialen ATP-Spiegeln führte (33). Dasselbe IPC-Protokoll erreichte in einer nachfolgenden Studie die Reduktion des myokardialen Schadens im Sinne einer Senkung der Troponin-T-Serumspiegel nach 72 Stunden bei Patienten, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen (34).

Es ist festzuhalten, dass es sich bei der IPC um eine invasive Methode handelt. Das *clamping* und *declamping* der Aorta geht mit Risiken einher und schränkt daher die klinische Anwendung ein. Auch ist die Anwendung auf antizipierbare, ischämische Ereignisse beschränkt.

1.2.2 Ischämische Postkonditionierung

Aus dem Konzept der IPC hat sich im Laufe der Forschung das Protokoll der ischämischen Postkonditionierung (iPostC) entwickelt. Dieses neuere Schema bietet den klinisch relevanten Vorteil, dass auch nach erfolgter Schädigung wie z. B. durch einen akuten Myokardinfarkt eine kardioprotektive Maßnahme durchgeführt werden kann. Damit ist dieses Protokoll nicht auf planbare Phasen von Ischämie und Reperfusion (z. B. elektiver Eingriff am Herzen) begrenzt.

Die iPostC wurde erstmals von Zhao et al. 2004 im *in vivo*-Hundemodell beschrieben. Einer 60-minütigen Ischämie folgte eine dreistündige Reperfusion des Hundeherzens. Diese Reperfusion wurde mit drei Zyklen à 30 Sekunden Okklusion und Reperfusion des *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie begonnen. Die positive Auswirkung auf das Myokard zeigte sich nicht nur in einer signifikanten Infarktgrößenreduzierung um 44 % gegenüber der Kontrollgruppe. Beobachtet wurden auch eine Verringerung eines myokardialen Ödems, verminderte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, verminderter apoptotischer Zelltod und verbesserte Endothelfunktion. Die Ergebnisse von Zhao et al. zeigten, dass der protektive Effekt von iPostC ähnlich dem der IPC ist (35).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass iPostC zellbiologisch bei den wichtigen Mediatoren des IR-Schadens ansetzt und dadurch, ergänzend zu den Ergebnissen von Zhao et al., den oxidativen Stress reduziert, intrazellulären Calciumüberschuss verringert (36) sowie eine verzögerte Umkehr der Azidose erreicht (37).

Den experimentellen iPostC-Studien schlossen sich klinische Studien an. Drei klinische Studien derselben Arbeitsgruppe haben das Potenzial von iPostC an unterschiedlichen Patientenkohorten untersucht, die sich einem elektiven kardiochirurgischen Eingriff unterzogen (38–40). Das iPostC-Protokoll erfordert jedoch, entsprechend dem IPC-Protokoll, ein invasives *clamping* und *declamping* der Aorta mit dem Unterschied, dass es hier zu dem Zeitpunkt des *declamping* der Aorta nach koronarem *Bypass* induziert wird. Luo et al. (38) untersuchten bei 24 Kindern, die sich einer Operation zur Korrektur der Fallot-Tetralogie unterzogen, den protektiven Effekt von iPostC (2-mal 30s *clamping* und *declamping* zum Zeitpunkt des *declamping* der Aorta nach koronarem *Bypass*). Das invasive iPostC-Protokoll reduzierte den Myokardschaden, widerspiegelnd in niedrigeren perioperativen Troponin-T- und CK-MB-Spiegeln sowie einem geringeren postoperativen Bedarf an positiv-inotropen Medikamenten.

Ein ähnliches iPostC-Protokoll wurde von Luo et al. bei erwachsenen Patienten eingesetzt, bei denen eine elektive Klappenersatz-Operation durchgeführt wurde (39), sowie bei Kindern, bei denen eine chirurgische Korrektur einer kongenitalen Herzerkrankung erfolgte (40). Auch in diesen beiden Studien reduzierte das iPostC-Protokoll den Myokardschaden. In allen drei Studien von Luo et al. wurde iPostC mit den derzeit gängigen kardioprotektiven Maßnahmen kombiniert.

Entsprechend dem IPC-Protokoll besitzt auch das invasive iPostC-Protokoll Risiken. Das *clamping* und *declamping* der Aorta erhöhen das Risiko von Thromboembolien und beschränken dadurch die klinische Anwendung.

Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erleiden, benötigen eine kardioprotektive Strategie, die nach der myokardialen Indexischämie oder mit der myokardialen Reperfusion durch PTCA induziert werden kann. Die iPostC repräsentiert eine solche kardioprotektive Strategie. Tatsächlich wurden innerhalb von zwei Jahren nach der Erstbeschreibung der iPostC klinische Studien zu der Anwendung an Patienten mit akutem Myokardinfarkt veröffentlicht (41, 42).

In diesen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Unterbrechen der myokardialen Reperfusion nach der Stentimplantation durch vier einminütige Niederdruck-In- und Deflationen des koronaren Angioplastie-Ballons die myokardiale Reperfusion verbesserte, die Infarktgröße reduzierte (direkt sowie nach sechs Monaten) sowie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (nach einem Jahr) verbesserte (41–43). Damit konnten nicht nur kurzfristige, sondern auch langfristige positive Effekte auf das Myokard durch iPostC nachgewiesen werden.

Auch diese Form der klinischen Anwendung von iPostC ist aufgrund der gleichen Gründe und Risiken wie bei den vorher beschriebenen invasiven iPostC-Protokollen, limitiert und gleichzeitig auf Patienten begrenzt, die eine PTCA erhalten.

1.2.3 Mechanismen der ischämischen Prä- und Postkonditionierung

Das experimentelle Design der iPostC hat sich aus der IPC entwickelt. Auch die kardioprotektiven Effekte der beiden Protokolle ähneln sich. Deshalb ist es naheliegend, dass sie ähnliche Signalwege nutzen. Zu diesen Signalwegen, über die IPC und iPostC eine endogene Kardioprotektion vermitteln, gehört der *RISK*-Signalweg (44). *RISK* steht für *reperfusion injury salvage kinase* und beschreibt eine Gruppe aus Proteinkinasen, die bei spezifischer Aktivierung während der Reperfusion Kardioprotektion vermitteln und damit einen IR-Schaden verhindern (45, 46). Wichtige Proteinkinasen des *RISK*-Signalwegs sind der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Akt und die p42/p44 *Extracellular-signal regulated Kinase* (Erk1/2). Ein Konditionierungsstimulus löst eine Phosphorylierung dieser Kinasen aus, wodurch sie

aktiviert werden (47, 48) und gewissermaßen eine Form des programmierten Zellüberlebens vermitteln (15).

Eine weitere wichtige Zielstruktur, um das Herz zum Zeitpunkt der Reperfusion zu schützen, ist die mPTP (17). Die mPTP ist ein nicht-selektiver Kanal der inneren Mitochondrienmembran und gilt als der Endeffektor des *RISK*-Signalweges (49). Das Öffnen der mPTP führt zur Depolarisierung dieser Membran und zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Dadurch kommt es zur ATP-Erschöpfung und letztendlich zum Zelltod (17, 18). Somit stellt die Inhibition des Öffnens der mPTP während der Reperfusion einen Schutzmechanismus für das Myokard dar.

Ein weiterer nennenswerter Signalweg bezüglich der iPostC ist der sogenannte *SAFE*-Signalweg. *SAFE* steht für *survival activating factor enhancement*. Bestandteile dieses Signalwegs sind Janus-Kinasen (JAK) und *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*. JAKs gehören zu der Familie der Tyrosinkinase und spielen eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von Informationen aus dem Zytosol in den Nukleus (Übersicht in 50). Sie werden über einen Liganden, der an ihren Membranrezeptor bindet, aktiviert. Aktivierte JAKs können dann über eine Tyrosin-Phosphorylierung *STAT3*, Teil einer Gruppe aus Transkriptionsfaktor-Proteinen, aktivieren. Damit wird *STAT3* dazu befähigt, Homo- oder Heterodimere zu bilden, die in den Nukleus translozieren, was wiederum in einer Gentranskription resultiert. Diese Signalkette hat einen entscheidenden Anteil an der Transkription von stressreaktiven Genen. Der Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha, ein proinflammatorisches Zytokin, kann als Ligand der JAKs fungieren und somit den *SAFE*-Signalweg aktivieren (51, 52). Der *SAFE*-Signalweg kann unabhängig vom *RISK*-Signalweg eine Kardioprotektion vermitteln (53). Es scheint jedoch so, dass beide Signalwege im Mitochondrium konvergieren und der kardioprotektive Effekt beider Wege ein Resultat der Inhibition des Öffnens der mPTP ist (49, 54).

Aufgrund der Kenntnis dieser Strukturen ist es möglich, diese gezielt pharmakologisch anzusteuern. Es wurde eine Reihe von Studien zu dem Thema der pharmakologischen Konditionierung durchgeführt und Substanzen identifiziert, die eine pharmakologische Kardioprotektion vermitteln.

Der Einsatz von pharmakologischen Substanzen, die fähig sind, die durch iPostC entstehende Kardioprotektion nachzuahmen – im Sinne einer pharmakologischen Postkonditionierung –, würde den Einsatz von invasiven Behandlungsprotokollen

vermeiden und wäre gleichzeitig einsetzbar bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die als Reperfusionstherapie eine systemische Fibrinolyse erhalten (46).

1.3 Pharmakologische Postkonditionierung

Bei der pharmakologischen Postkonditionierung (PostC) handelt es sich um ein kardioprotektives Phänomen, das sich aus den Untersuchungen zu den Signalwegen von IPC und insbesondere iPostC entwickelt hat.

Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien hat bisher von verschiedenen pharmakologischen Substanzen berichtet, die kardioprotektiv wirken. Dazu zählen Substanzen wie beispielsweise Adenosin (55), *glucagon-like peptide-1 (GLP-1)* (56), das atriale natriuretische Peptid (ANP) (57), Erythropoetin (58) und Atorvastatin (59). Sie wirken kardioprotektiv über die Aktivierung des *RISK*-Signalwegs. Cyclosporin A (60) oder Sanglifehrin-A (61) hingegen wirken kardioprotektiv über die Inhibition des Öffnens der mPTP. In einer klinischen Studie führte die Applikation von Cyclosporin A bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die eine PTCA erhielten, zu einer reduzierten Infarktgröße, was sich unter anderem in einer verminderten Ausschüttung von CK ins Serum zeigte (60). In tierexperimentellen Studien führte die pharmakologische Inhibition des Öffnens der mPTP durch Cyclosporin A oder Sanglifehrin-A während der myokardialen Reperusionsphase zu einer Reduzierung der Infarktgröße um bis zu 50 %. Das deutet im Umkehrschluss darauf hin, dass eine geöffnete mPTP für etwa 50 % der finalen Infarktgröße verantwortlich ist (61, 62).

Weitere Stoffklassen wie volatile Anästhetika (z. B. Isofluran, Desfluran, Sevofluran) sind ebenfalls imstande, eine pharmakologische PostC am Myokard zu induzieren (63).

Viele der pharmakologischen Substanzen, die in tierexperimentellen Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, konnten im klinischen Rahmen keinen kardioprotektiven Effekt zeigen, da der *RISK*-mPTP-Signalweg sich als dysfunktional darstellte (64–67). Ein grundlegendes Problem, das schon in einer Studie von Abete et al. im Jahre 1996 (68) gezeigt werden konnte, ist, dass sich Kardioprotektion durch IPC zwar bei jungen, erwachsenen Ratten vermitteln lässt, jedoch nicht bei den 24 Monate alten Tieren. Dieses Alter entspricht in etwa dem Alter eines 75-jährigen Menschen. Jedoch ist genau dies das Alter bei einem Menschen, wo das höchste Risiko für ein akutes kardiales Ereignis besteht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im alten Herzen

endogene Mechanismen, die für die Vermittlung von Kardioprotektion durch Konditionierung wichtig sind, möglicherweise dysfunktional sind. Dies liefert eine potenzielle Erklärung für die ernüchternden Ergebnisse vieler klinischer Studien, die verschiedene Konditionierungsvarianten untersucht haben. Damit besteht das Dilemma, dass die Subpopulation der alten Menschen, die hauptsächlich von akuten kardialen Ereignissen betroffen ist, keinen protektiven Effekt durch Konditionierungsphänomene erhalten könnte.

Im Jahre 2012 führten Huhn et al. Untersuchungen im *in vivo*-Rattenmodell durch, die sich ebenfalls mit der Präkonditionierung des alten Herzens beschäftigten. Untersucht wurden mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (mBK_{Ca}-Kanäle) auf ihre Fähigkeit am alten Herzen eine Kardioprotektion durch Präkonditionierung zu vermitteln (69). Huhn et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung der mBK_{Ca}-Kanäle durch eine präischämische Gabe von *NS1619*, einem selektiven mBK_{Ca}-Kanal-Öffner, die myokardiale Infarktgröße am alten Herzen reduzieren kann. Diese Infarktgrößenreduzierung war im Ausmaß vergleichbar mit der von jungen Herzen durch die jeweils gleiche Konzentration an *NS1619* (69). Eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe im *in vivo*-Rattenmodell aus dem Jahr 2016 beschäftigte sich mit *remote* ischämischer Präkonditionierung (RIPC) des alten Herzens. Die Tiere der RIPC-Gruppe erhielten vier Zyklen bilateraler Ischämie der Hinterbeine vor einer 25-minütigen regionalen kardialen Ischämie. Hier zeigte sich abermals die Problematik, dass die Kardioprotektion am alten Herzen blockiert zu sein scheint. Diese Studie liefert einen weiteren Hinweis, dass das Alter ein blockierender Faktor in der Kardioprotektion ist, der die Inkonsistenz von experimentellen und klinischen Studien erklären kann (70).

Die von Huhn et al. 2012 untersuchten mBK_{Ca}-Kanäle sind den mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanälen, die schon Lee et al. (65) am alten Herzen untersuchten, strukturell ähnlich. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass eine pharmakologische Präkonditionierung des alten Herzens grundsätzlich möglich ist, wenn die Zielstrukturen selektiv aktiviert werden. Allerdings lässt sich daraus noch nicht ableiten, ob durch eine postischämische Aktivierung der mBK_{Ca}-Kanäle im Sinne einer pharmakologischen PostC eine Kardioprotektion überhaupt möglich ist und ob diese dann am alten Herzen wirksam wäre. Jedoch scheinen die mBK_{Ca}-Kanäle einen Ansatz zu bieten, eine pharmakologische Konditionierung am alten Herzen zu

ermöglichen. Es ist somit ein Ziel, eine Substanz zu identifizieren, die einerseits eine pharmakologische PostC am Myokard induzieren kann und gleichzeitig die Kardioprotektion über Strukturen wie die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt, damit die Signaltransduktion und damit die Protektion – auch des alten Herzens – gewährleistet werden kann.

1.4 Milrinon

Milrinon (siehe Abb. 1) ist ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor und findet klinische Anwendung in der Therapie der akuten Herzinsuffizienz nach kardiochirurgischen Eingriffen sowie bei nicht zu kontrollierender schwerer Herzinsuffizienz. Die Substanz wird über den Handelsnamen Corotrop[®] vertrieben (71).

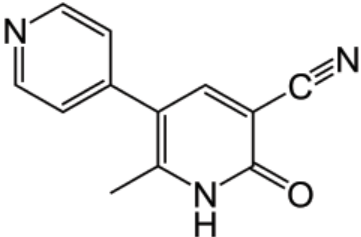
Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht
	$C_{12}H_9N_3O$	211,22 g/mol

Abb. 1: Milrinon

Dargestellt ist Milrinon, ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor, mitsamt seiner Strukturformel, Summenformel und Molekulargewicht. Milrinon wird bei schwerer, akuter Herzinsuffizienz eingesetzt. Über eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration hat es eine positiv inotrope, positiv chronotrope sowie eine starke vasodilatierende Wirkung.

cAMP = Zyklisches Adenosinmonophosphat.

Es bewirkt über die Hemmung der Phosphodiesterase-III eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der erhöhte cAMP-Gehalt hat wiederum eine positiv inotrope, positiv chronotrope sowie eine starke vasodilatierende Wirkung (71) und führt auch zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (71, 72). Durch die Akkumulation von intrazellulärem cAMP wird also eine Kontraktionskraftsteigerung am Herzen und am glatten Gefäßmuskel eine Relaxation erreicht. Die Relaxation betrifft Widerstandsgefäße und venöse Kapazitätsgefäße, was bedeutet, dass Vor- und Nachlast sinken. Jedoch ist der positiv inotrope Effekt gegenüber der Vasodilatation schwächer ausgeprägt (3).

Use et al. konnten in ihren Untersuchungen im *in vivo*-Schweinmodell zeigen, dass der prä- und postischämische Einsatz von Milrinon das Ausmaß des *stunned myocardium* (siehe auch Abschnitt 1.1.2 „Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens“) vermindert und somit einen kardioprotektiven Effekt von Milrinon nachweisen (73).

Der kardioprotektive Effekt durch Milrinon selbst oder andere Substanzen der Gruppe der Phosphodiesterase-III-Inhibitoren wurde in weiteren Studien gezeigt. Sanada et al. konnten zeigen, dass eine präischämische Gabe von Milrinon und Olprinon im *in vivo*-Hundemodell die Infarktgröße durch Aktivierung der PKA reduziert (74). Auch in Modellen am isolierten Herzen konnten die kardioprotektiven Effekte von Phosphodiesterase-III-Inhibitoren wie Olprinon und Amrinon bei präischämischer Gabe gezeigt werden (75, 76). Im Jahr 2011 veröffentlichten Huang et al. die erste Studie (*in vivo*-Rattenmodell), die zeigte, dass die Infusion von Milrinon (5 µg/kg/min) über zehn Minuten im Zeitraum der späten Ischämie/frühen Reperfusion die linksventrikuläre Infarktgröße senkt. Der Zeitpunkt der Gabe des Milrinons entsprach somit einer PostC. Sie stellten ebenfalls fest, dass die kombinierte Gabe von Milrinon und Esmolol (β₁-Blocker, 10 µg/kg/min) die Infarktgröße noch weiter reduzierte als die alleinige Gabe einer dieser Substanzen. Der protektive Effekt durch die kombinierte Gabe von Milrinon und Esmolol wurde durch die Gabe eines PKA-Inhibitors (Rp-cAMPS) oder Akt-Inhibitors (Akt 1/2 Kinase Inhibitor) aufgehoben (77).

Es wird angenommen, dass die Aktivierung des cAMP-PKA-Signalweges vor einer myokardialen Ischämiephase die Kardiomyozyten gegenüber einem IR-Schaden schützt (78, 79). In anderen Studien konnte sogar gezeigt werden, dass der cAMP-PKA-Signalweg das Öffnen der mBK_{Ca}-Kanäle potenziert. Geöffnete mBK_{Ca}-Kanäle besitzen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Kardioprotektion (80–82), weshalb die induzierte Öffnung von mBK_{Ca}-Kanälen in einem verstärkten, kardioprotektiven Effekt am Myokard resultiert. Fukasawa et al. konnten in ihrer Studie am isolierten Kaninchenherzen zeigen, dass Cilostazol, ebenfalls ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor, eine Infarktgrößenreduzierung durch die Aktivierung von mBK_{Ca}-Kanälen über einen cAMP-PKA-abhängigen-Signalweg induziert (83). Heinen et al. konnten im Jahr 2014 zeigen, dass über die direkte Ansteuerung des PKA-mBK_{Ca}-Signalwegs das junge und das alte Herz effektiv vor einem IR-Schaden geschützt werden kann (84). Dafür wurde Forskolin zur Aktivierung der PKA, *NS1619* zur Aktivierung der mBK_{Ca}-Kanäle sowie Iberiotoxin zur Blockierung der mBK_{Ca}-Kanäle verwendet. Die durch Forskolin induzierte Infarktgrößenreduzierung war altersabhängig. Bei den alten Tieren ließ sich

kein kardioprotektiver Effekt nachweisen. Iberiotoxin blockierte eine Forskolin-induzierte Infarktgrößenreduzierung. Hingegen waren die Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle mithilfe von *NS1619* und die damit verbundene Kardioprotektion bei prä- und postischämischer Gabe (Prä- und Postkonditionierung) induzierbar. Dies galt sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren. Das deutet darauf hin, dass insbesondere die mBK_{Ca} -Kanäle eine effektive Zielstruktur für eine pharmakologische PostC darstellen könnten.

Der protektive Effekt von Milrinon wurde auch in anderen Organmodellen untersucht. Toyoda et al. berichteten 2014, dass Milrinon-induzierte PostC der Leber im Rattenmodell den IR-Schaden reduziert (85).

Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob die Milrinon-induzierte PostC am isolierten Herzen eine Protektion gegenüber einer prolongierten Ischämie-/Reperusionsphase vermittelt und ob eine Dosisabhängigkeit besteht. Des Weiteren wurde noch nicht untersucht, ob die Milrinon-induzierte PostC über die mBK_{Ca} -Kanäle erfolgt.

1.5 Mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit

Die Regulation von ionischer Hämose, insbesondere Calcium, ist ein entscheidender Determinant für die Vitalität der Myozyten. Ein massiver Anstieg des intrazellulären Calciums ist einer der Hauptmediatoren des irreversiblen IR-Schadens am Myokard. Während kurzer, subletaler Episoden von myokardialer Ischämie, wie sie bei IPC und iPostC auftreten, kommt es zwar ebenfalls zu einem intrazellulären Calciumanstieg, jedoch führt dieser nicht zu irreversiblen Schäden (16, 86, 87). Dies führte zu der Annahme, dass ein kurzer und moderater Anstieg des Calciums während eines IPC-Stimulus ein wichtiger Bestandteil des Signalweges sein könnte, der letztendlich für die Infarktgrößenreduzierung verantwortlich ist. Przyklenk et al. konnten im Hundemodell zeigen, dass eine 15-minütige Calciumchlorid-Infusion vor einer 60-minütigen Ischämie die Infarktgröße signifikant reduzierte (87). Ionenkanäle der inneren Mitochondrienmembran sind maßgeblich an der Regulation ionischer Hämose beteiligt und haben damit Einfluss auf die Zellfunktion. Dieser Einfluss kann entscheidend für das Zellüberleben sein. Geöffnete Kaliumkanäle erhöhen die mitochondriale Aufnahme von Kalium, das notwendig für die optimale Funktion der oxidativen Phosphorylierung ist (88). Nachdem beschrieben wurde, dass ATP-abhängige Kaliumkanäle der inneren Mitochondrienmembran eine wichtige Struktur

des Signalweges zur Vermittlung der Kardioprotektion durch IPC darstellen (89, 90), wurde ein anderer Subtyp der dortigen Kaliumkanäle, die mBK_{Ca} -Kanäle, untersucht. Die Ergebnisse von Xu et al. deuteten darauf hin, dass die mBK_{Ca} -Kanäle signifikant an der mitochondrialen Kaliumaufnahme der Myozyten beteiligt sind und damit die Effizienz der mitochondrialen Energieproduktion verbessern. Sie öffnen sich bei zytosolischem Calciumanstieg. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine präischämische Gabe des selektiven mBK_{Ca} -Kanal-Öffners *NS1619* im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung einen kardioprotektiven Effekt hat (80).

Shintani et al. stellten die Hypothese auf, dass das Öffnen der mBK_{Ca} -Kanäle als Antwort auf den Calciumanstieg auch eine Rolle bei dem kardioprotektiven Mechanismus der IPC spielt und konnten dies bestätigen. Der Mechanismus besteht darin, dass die mBK_{Ca} -Kanäle sich bei intrazellulärem Calciumanstieg öffnen und damit eine Membranhypervolarisation verursachen. Das wiederum reduziert den spannungsabhängigen Calciumeinstrom, indem der Kaliumausstrom erhöht wird. Dadurch wird ein intrazellulärer Calciumüberschuss verhindert. Sie führten ein IPC-Protokoll im Hundemodell durch und kombinierten dieses in verschiedenen Varianten mit zwei mBK_{Ca} -Kanalinhibitoren (Charybdotoxin und Iberiotoxin) sowie dem selektiven mBK_{Ca} -Kanal-Öffner *NS1619*. Charybdotoxin und Iberiotoxin blockierten die IPC-induzierte Kardioprotektion (91).

2005 demonstrierten Cao et al. an isolierten Rattenherzen, dass die Blockade der mBK_{Ca} -Kanäle mit dem mBK_{Ca} -Kanalblocker Paxillin den IPC-vermittelten, kardioprotektiven Effekt aufhebt. Andererseits konnten sie auch zeigen, dass der protektive Effekt durch die Inhibition der mPTP mit Cyclosporin A nicht abgeschwächt wurde durch eine Vorbehandlung mit Paxillin. Wurden die mPTP und mBK_{Ca} -Kanäle beide pharmakologisch geöffnet, war der protektive Effekt der IPC aufgehoben. Das deutet darauf hin, dass zur Vermittlung dieser Kardioprotektion über die mBK_{Ca} -Kanäle die mPTP geschlossen sein muss. Darüber hinaus deutet es darauf hin, dass sich die mPTP *downstream* der mBK_{Ca} -Kanäle befindet. Sie konnten auch erstmals zeigen, dass die mBK_{Ca} -Kanäle unabhängig von den mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanälen Kardioprotektion vermitteln (92). Ob die mBK_{Ca} -Kanäle aber auch an ischämischer oder pharmakologischer PostC beteiligt sind, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

2010 konnten Huhn et al. die Beteiligung der mBK_{Ca} -Kanäle bei der ischämischen und Morphin-induzierten PostC im *in vitro*-Rattenmodell zeigen. Der mBK_{Ca} -Kanalinhibitor

Paxillin blockierte die durch diese beiden Konditionierungsvarianten ausgelöste Protektion (93).

Auch Jin et al. entdeckten 2012, dass die mBK_{Ca} -Kanäle bei der ischämischen sowie pharmakologischen PostC beteiligt sind. Das pharmakologische Öffnen dieser Kanäle mit *NS1619* reduzierte den IR-Schaden am Myokard. Die Inhibition der Kanäle blockierte hingegen den protektiven Effekt der iPostC. Es wurde angenommen, dass das Öffnen dieser Kanäle mit Einsetzen der Reperfusion das Myokard vor einem IR-Schaden schützt, indem es eine exzessive Ansammlung von ROS und zytosolischem Calcium-Überschuss reduziert. Gleichzeitig wurde angenommen, dass dadurch die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials bei laserinduzierter Öffnung der mPTP verhindert wurde (94).

Die Ansammlung von ROS und zytosolischer Calcium-Überschuss gehören zu den Haupttriggern der Öffnung der mPTP, wodurch Zellschäden induziert werden (91). Geöffnete mBK_{Ca} -Kanäle schwächen die Entstehung dieser Trigger ab. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle indirekt zur Inhibition des Öffnens der mPTP führt (94).

Die mBK_{Ca} -Kanäle sind anhand der erläuterten Studien als Teil des *RISK*-mPTP-Signalweges anzusehen, der wichtig für die Signaltransduktion von Kardioprotektion ist (siehe auch Abschnitt 1.2.3 „Mechanismen der ischämischen Prä- und Postkonditionierung“).

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2012 konnten Huhn et al. zeigen, dass die Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen durch eine präischämische Gabe von *NS1619* im *in vivo*-Rattenmodell die myokardiale Infarktgröße im alten Herzen reduziert. Diese Infarktgrößenreduzierung war im Ausmaß vergleichbar mit der von jungen Rattenherzen durch die jeweils gleiche Konzentration an *NS1619* (69). Diese Ergebnisse konnten in einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe bestätigt werden (84). Hier wurde zusätzlich gezeigt, dass auch die postischämische Gabe von *NS1619* im Sinne einer pharmakologischen PostC das junge sowie alte Herz im *in vivo*-Modell schützt.

Bisher ist nicht bekannt, ob mBK_{Ca} -Kanäle auch an der Milrinon-induzierten PostC beteiligt sind. Die Betrachtung verschiedener Mechanismen am isolierten Herzen bietet den Vorteil, dass die Beteiligung äußerer Faktoren (Organe, Nervensystem etc.), die sich im *in vivo*-Modell nicht ausschalten lassen, eliminiert sind. Die Auswirkungen einer bestimmten Substanz auf ein Organ lassen sich somit optimal beurteilen.

1.6 Das isolierte Herz nach Langendorff

Die isolierte Perfusion von Säugetierherzen wurde 1895 von Oscar Langendorff etabliert (95, 96). Das Prinzip besteht darin, über eine in die *Aorta ascendens* platzierte Kanüle dem Herzen Blut zuzuführen. Diese retrograde Perfusion, gegensätzlich der physiologischen Perfusionsweise, führt zum Schließen der Taschen der Aortenklappe. Damit wird die Durchblutung vom linken Ventrikel unterbunden und das gesamte Blut fließt durch die Koronararterien, deren Ostien sich jeweils am rechten und linken *Sinus aortae* befinden. Über diesen Zirkulationsweg gelangt das Blut über den *Sinus coronarius* in den rechten Vorhof und verlässt als Ausfluss den Perfusionsweg. Langendorff arbeitete dabei mit einem konstanten hydrostatischen Perfusionsdruck (95).

Die Technik nach Langendorff wird bei vielen Untersuchungen an isolierten Säugetierherzen genutzt. Sie erlaubt große Einsicht in die kardiale Physiologie und Morphologie sowie in biochemische und pharmakologische Abläufe. Hierzu zählen unter anderem die Betrachtungen der kardialen Kontraktilität, Frequenz, elektrochemischen Eigenschaften und des Stoffwechsels (97).

Der Einfluss anderer Organe und des zentralen- sowie vegetativen Nervensystems auf das Herz ist durch die Isolierung aufgehoben. Somit sind periphere Einflüsse durch Hormone und andere neurale Substanzen auf die kardiale Funktion minimiert. Dies bietet den Vorteil, die potenzielle direkte Wirksamkeit eines Pharmakons zu evaluieren (97).

Die einfache Induzierung pathologischer Zustände durch die Veränderung von Oxygenierung (z. B. Anoxie, Hypoxie), Druck- und Flussparameter (z. B. Ischämie-Reperfusion) im Langendorff-Modell bietet die Möglichkeit, eine Reihe von unterschiedlichen Forschungsschwerpunkten zu setzen (97).

1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Dissertation

Jedes Jahr erleiden mehr als 200 000 Menschen in Deutschland einen akuten Myokardinfarkt (5). Knapp 50 000 versterben daran (6). Dies geschieht trotz maßgeblich verbesserter Versorgungsstrategien. Ein Grund dafür ist der letale Schaden an den Myokardzellen, der in der Ischämie- und Reperfusionsphase entsteht. Dieser Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-Schaden) ist ein zentrales Problem des akuten Myokardinfarkts. Der IR-Schaden vergrößert das myokardiale Infarktgebiet

maßgeblich. Ischämie sowie die obligatorische Reperfusion wirken toxisch auf die Myokardzellen (19, 20, 98).

Nach aktuellem Forschungsstand sind sowohl die ischämische als auch die pharmakologische PostC vielversprechende Konzepte, um das Myokard vor einem IR-Schaden zu schützen (35). Die pharmakologische PostC bietet den Vorteil, dass sie keine invasive Intervention darstellt.

Die Signalwege der PostC sind bisher nur teilweise erforscht und erfordern weitere Untersuchungen (99).

Zur pharmakologischen PostC wird in dieser Arbeit Milrinon, ein Phosphodiesterase-III-Inhibitor, verwendet. Milrinon wird derzeit schon in der Therapie der akuten Rechtsherzinsuffizienz verwendet.

Die Fragestellungen dieser Arbeit lauten:

1. Führt die postischämische Applikation von Milrinon im Sinne einer PostC dosisabhängig zu einer Protektion des Myokards gegen einen IR-Schaden?
2. Wird die Milrinon-induzierte PostC über mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (mBK_{Ca}-Kanäle) vermittelt?

Um die Fragestellungen dieser Arbeit zu beantworten, wählten wir einen Versuchsaufbau am isolierten Rattenherzen im Langendorff-Modell. Die Ischämie wurde global induziert. Es wurde zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt. Darauf folgte eine zweite Versuchsserie, um die mechanistischen Zusammenhänge zwischen Milrinon-induzierter PostC und den mBK_{Ca}-Kanälen zu untersuchen. Dafür verwendeten wir den mBK_{Ca}-Kanalinhibitor Paxillin. Die Infarktgröße wurde am Ende eines Versuches mittels TTC-Färbung bestimmt.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Mit Genehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf (Projektnummer: O 27/12 vom 10.05.2012) wurden für diese experimentellen Studien insgesamt 121 junge, männliche Wistar-Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich) im Alter von zwei bis drei

Monaten (zum Versuchszeitpunkt) verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens drei Tage in der ZETT unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Tierhaltung erfolgte in spezifisch-pathogen-freien (SPF) Räumen unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %). Als Einstreu der Käfige diente entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat Lignocel® 3-4 (J. Rettenmaier und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland). Als Futtermittel stand den Tieren *ad libitum* Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (R/M-H V1534-0 10 mm Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) zur Verfügung. Die Tiere erhielten keimfreies Wasser. Das Wasser wurde mittels Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Es erfolgten regelmäßig tierärztliche Kontrollen. Nur gesunde Tiere wurden für die Versuche eingesetzt.

2.1.2 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung

Zur retrograden Perfusion des isolierten Herzens wurde für diese experimentelle Studie ein modifizierter Bikarbonat-Puffer nach Krebs und Henseleit (100) verwendet. Diese Lösung wurde während eines Experiments kontinuierlich mit Carbogen (5 % CO₂, 95 % O₂) begast, um einen pH von 7,4 bei einer Temperatur von 37 °C zu erreichen. Die Zusammensetzung der Lösung diente der Imitation von Blutplasma und wurde aus den aufgeführten Substanzen (siehe Tabelle 1) in *Aqua destillata* hergestellt. Am Versuchstag wurde die Lösung frisch angesetzt, um Elektrolytschwankungen und Kristallisierungsprozesse zu verhindern.

Tabelle 1: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (siehe auch Abschnitt 2.1.6: „Chemikalien“)

Substanz	Summenformel	Menge [g] auf 5l	Molarität [mM]
Natriumchlorid	NaCl	34,48	118
Kaliumchlorid	KCl	1,75	4,7
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO ₄ + 7 H ₂ O	1,48	1,2
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	0,82	1,2
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	10,50	4,25
Ethylendiamintetraacetat	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,73	0,5
Calciumchlorid	CaCl ₂	1,25	2,25
D-Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	9,91	11
L-Laktat Natriumsalz	C ₃ H ₅ NaO ₃	0,56	1

g = Gramm; l = Liter; mM = Millimolar.

2.1.3 Langendorff-Anlage

Brückenverstärker	Bridge Amp, 2 Stück, FE221, Fa. AD Instruments, Oxford, England
Druckaufnehmer	P23XL, Fa. Gould Electronics, Bilthoven, Niederlande
Einhängethermostat	Julabo MW-4, Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Guillotine	Kleintierdekapitator, Modell 7950, Fa. Ugo Basile, Comero, Italien
Injektionskanüle	Sterican Gr. 20, 0.4 mm x 20 mm, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Offener Wasserbaderhitzer	Julabo EC-5, Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Perfusatflasche	ISO SIMAX 5000 ml, Fa. BDL, Turnov, Tschechische Republik
Perfusatschlauch	Tygon Tube 2375 (3,20 mm Innendurchmesser), Fa. Saint-Gobain Akron, Ohio, USA
Perfusor	Perfusor [®] Space, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Pump-Controller	STH Pump Controller IN175, Fa. AD Instruments Oxford, England
Schlauchpumpe	Minipuls 3 Peristaltic Pump ML172, Fa. AD Instruments Oxford, England
Spezialschlauch für Schlauchpumpe	Tygon Tube R 3607 (3,18 mm Innendurchmesser), Fa. Saint-Gobain Akron, Ohio, USA

USB-Datenerfassung

PowerLab 8/35, Fa. AD Instruments
Oxford, England

2.1.4 Laborgeräte

BGA-Messgerät

ABL 700, Fa. Radiometer
Willich, Deutschland

Digitalthermometer

Temperaturmessgerät GTH 1150 C,
Fa. Greisinger, Regenstauf, Deutschland

Laborwaage

BP 1200, Fa. Sartorius
Göttingen Deutschland

pH-Meter

Digital pH-Meter Typ 646 #4498, Fa.
Knick
Berlin, Deutschland

Präzisionswaage

SECURA 224-1S, Fa. Sartorius
Göttingen, Deutschland

2.1.5 Pharmaka

Heparin-Natrium Injektionslösung

CAS-Nr. 9041-08-1 25.000 I.E.,
Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland

Milrinon

CAS-Nr. 78415-72-2, Reinheit $\geq 97\%$,
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

Paxillin

CAS-Nr. 57186-25-1, Reinheit $\geq 98\%$,
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

Pentobarbital-Injektionslösung

CAS-Nr. 76-74-4 Narcoren[®] für Tiere,
Fa. Merial GmbH,
Hallbergmoos, Deutschland

2.1.6 Chemikalien

Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	CAS-Nr. 298-96-4, Reinheit \geq 99 %, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	CAS-Nr. 1004352-4, Reinheit \geq 98 %, Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	CAS-Nr. 60-00-4, Reinheit \geq 98,5 %, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd 37 %	CAS-Nr. 50-00-0, Reinheit \geq 37 %, Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glucose (D-Glucose)	CAS-Nr. 14431-43-7, Reinheit \geq 99,5 %, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	CAS-Nr. 7447-40-7, Reinheit \geq 99 %, Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	CAS-Nr. 7778-77-0, Reinheit \geq 99 %, Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Laktat (L-Laktat-Natriumsalz)	CAS-Nr. 867-56-1, Reinheit \geq 99 %, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄ + 7 H ₂ O)	CAS-Nr. 10034-99-8, Reinheit \geq 99 %, Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	CAS-Nr. 7647-14-5, Reinheit \geq 99,5 %, Fa. Prolabo, Leuven, Belgien

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	CAS-Nr. 144-55-8, Reinheit ≥ 99,5 %, Fa. Fluka-Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Salzsäure rauchend 37 %	CAS-Nr. 7647-01-0, Reinheit ≥ 37 %, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	CAS-Nr. 77-86-1, Reinheit ≥ 99,9 %, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CAS-Nr 67-68-5, Reinheit ≥ 99,9 %, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.7 Gase

Carbogen (5 % CO ₂ , 95 % O ₂)	Fa. Linde AG, München, Deutschland
Stickstoff 5.0 (N ₂)	Fa. Linde AG, München, Deutschland

2.1.8 Computer und Software

Aufzeichnungssoftware	LabChart [®] Pro v. 8.0.5 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia
Flachbettscanner	CanoScan [®] LIDE 700F, Fa. Canon, Krefeld, Deutschland
Planimetriesoftware	SigmaScan [®] v. 5 SPSS Inc., San Jose, CA, USA
Statistiksoftware	GraphPad [®] PrismR 6.01 für Windows, Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA

2.2 Methodik

2.2.1 Präparation und isolierte Perfusion des Rattenherzens

Vor Aufnahme der Experimente lag der Autorin ein Übungsschein vor, der die notwendigen Kenntnisse und praktischen Fähigkeiten zum Töten von Wirbeltieren der Spezies Maus und Ratte bescheinigte. Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen und mit 90 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal (i. p.) sediert. Zur Antikoagulation wurden 1000 I.E. Heparin i. p. injiziert. Nach Versiegen der Schutzreflexe als Zeichen einer tiefen Sedierung wurde das Tier mittels einer Guillotine dekapitiert. Der Thorax des Tieres wurde über eine mediane Thorakotomie eröffnet und das Herz an der Basis exzidiert. Direkt nach der Exzision wurde das Herz für wenige Sekunden in ein 50 ml fassendes Becherglas mit isotoner (0,9 %) Kochsalzlösung überführt, um den koronaren Gefäßkreislauf bis zum Anschluss an die Langendorff-Anlage luftfrei zu halten. Dies diente der Prävention einer Embolisierung der Koronararterien. Das Herz wurde dann schnellstmöglich behutsam aus dem Becherglas genommen und über die Aorta an die Kanüle der Langendorff-Anlage festgeknotet (siehe Abb. 2). Dabei war darauf zu achten, die Zeit von der Exzision des Herzens bis zur Kanülierung der Aorta an die Langendorff-Anlage konstant und so kurz wie möglich zu halten (< 3 min). An der Langendorff-Anlage wurde das Herz retrograd und druckkontrolliert (mittlerer arterieller Druck; MAD = 80 mmHg) über die Aorta perfundiert. Als Perfusat diente eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (siehe Tabelle 1). Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde in einem Wasserbad temperaturkontrolliert auf 37 °C erwärmt, sodass die Temperatur am Herzen der Körpertemperatur entsprach. Die Temperatur des Puffers im Kreislauf wurde durch zusätzliche Wärmekammern, die durch ein separates Wasserbad erhitzt wurden, aufrechterhalten. Das Herz selbst war ebenfalls von einer Wärmekammer umgeben, um es vor Auskühlung zu schützen. Der Puffer wurde kontinuierlich über eine Glasfritte mit Carbogen (200 ml/min) begast. Dies diente der Oxygenierung des Puffers und sorgte für ein stabiles pH-Niveau von 7,4. Über einen kleinen Einschnitt am linken Vorhofsohr des Herzens wurde ein Ballon über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt und dieser mit isotoner (0,9 %) Kochsalzlösung befüllt, bis der enddiastolische linksventrikuläre Druck auf 1–4 mmHg eingestellt war. Der intraventrikuläre Ballon und die Aortenkanüle waren über Druckaufnehmer mit einer PowerLab-Station verbunden.

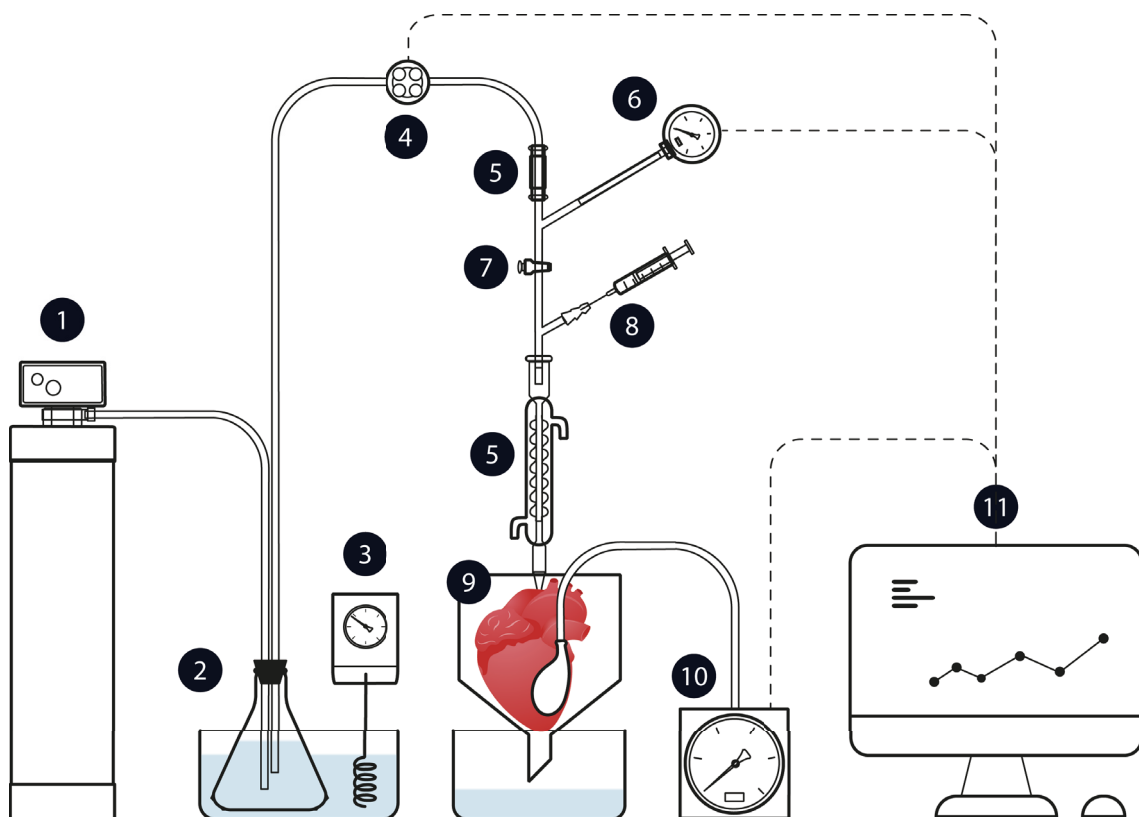


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Langendorff-Anlage

Aufbau der Langendorff-Anlage (nicht maßstabsgerecht): Carbogen (1) begaster Krebs-Henseleit-Puffer (2) wurde im Wasserbad mit Einhängethermostat (3) durchgängig temperaturkontrolliert erhitzt. Über eine Schlauchpumpe (4) wurde der Puffer angesaugt. Im Schlauchsystem befindliche Luftblasen wurden über zwei Luftfallen (5) aus dem System entfernt. Ein Druckaufnehmer (6) gewährleistete eine druckkonstante Perfusion. Die Temperatur des Krebs-Henseleit-Puffers wurde über einen zweiten Wärmekreislauf konstant gehalten. Die Perfusion des Versuchsherzens konnte über einen Dreiwegehahn (7) ein- und ausgeschaltet werden. Perfusoren (8) wurden zur kontinuierlichen Applikation der jeweiligen Substanzen an das Schlauchsystem angeschlossen. Das Herz wurde über die Aorta kanüliert und retrograd perfundiert. Eine Wärmekammer (9) hielt die Umgebungstemperatur des Herzens auf einem konstanten Niveau. Die Hämodynamik des Herzens wurde über die Kompression eines flüssigkeitsgefüllten Ballons im linken Ventrikel mit angeschlossenen Druckaufnehmer (10) kontinuierlich aufgezeichnet. Die Einstellung der Perfusionsparameter erfolgte über eine PowerLab-Station (11). Schlauchpumpe (4) und die Druckaufnehmer (6 und 10) waren mit der PowerLab-Station verbunden. Modifiziert nach (101).

Mittels PowerLab-Station wurde die mechanische Herzaktion mit einer Abtastfrequenz von 2000 Hz in LabChart® aufgezeichnet und grafisch dargestellt. Das koronare Effluat wurde manuell gesammelt und gewogen, um den exakten Koronarfluss zu bestimmen. Das Effluat wurde dem System auf diese Weise entzogen und wurde dementsprechend nicht weiter für die Perfusion genutzt. Die Applikation von einer jeweilig gewünschten Substanz in den koronaren Kreislauf wurde über Dreiwegehähne und Perfusoren ermöglicht.

Für die statistische Auswertung der Hämodynamik wurden jeweils alle im Intervall von 15 s stattfindenden Herzaktionen arithmetisch gemittelt und aufgezeichnet. Die hämodynamischen Parameter der myokardialen, isovolumetrischen Herzfunktion Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVP_{sys}), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP_{dia}), Koronarfluss (CF) und *Rate Pressure Product* (RPP) wurden extrahiert.

Schlussendlich flossen in die Statistik die hämodynamischen Parameter von fest definierten Zeitpunkten in der Einpendelungsphase (*baseline*, 16. Minute) und in der Reperusionsphase (30., 45. und 60. Minute). Arrhythmische Herzaktionen und Artefakte wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. In der Ischämie entwickelte das Herz als Zeichen des Myokardschadens mit Versteifung des linken Ventrikels eine ischämische Kontraktur. Das Kontrakturmaximum in mmHg und der zugehörige Zeitpunkt während der Ischämie wurden erhoben und ausgewertet.

2.2.2 Untersuchung zum Nachweis des protektiven Effekts der ischämischen Prä- und Postkonditionierung

Vor Beginn der zwei Versuchsreihen zur Untersuchung des kardioprotektiven Effekts von Milrinon erfolgte die Durchführung von separaten Experimenten. Diese umfassten Versuche zum protektiven Effekt der IPC (ischämische Präkonditionierung) und der iPostC (ischämische Postkonditionierung) am isolierten Rattenherz im Langendorff-Modell. Die Serie diente dem Zweck, die kardioprotektive Wirksamkeit von IPC und iPostC zu bestätigen und die Methodik der Präparation für die Hauptversuche zu optimieren.

Die Tiere wurden in drei Gruppen randomisiert (je $n = 6$). Die Kontrollgruppe (Con) erhielt keine Intervention. Die Herzen durchliefen eine 20-minütige *baseline* an der Langendorff-Anlage. Das Herz konnte sich dadurch an die *in vitro*-Bedingungen anpassen (zur Übersicht siehe Abb. 3).

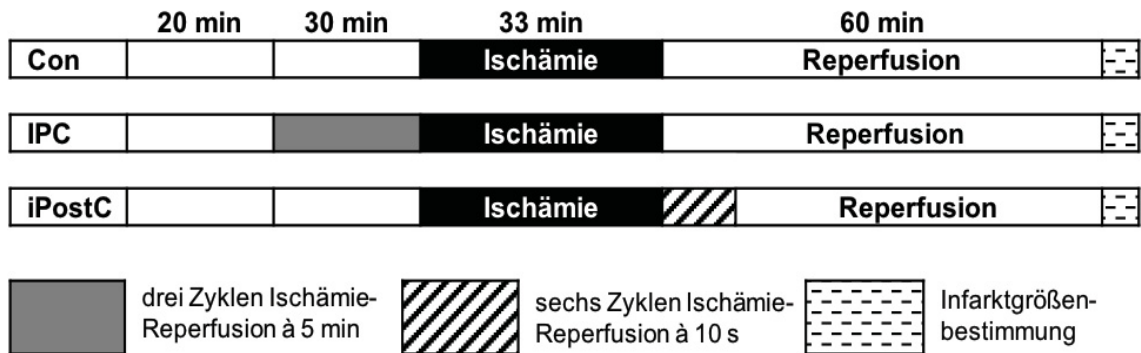


Abb. 3: Versuchsablauf der Vorversuchsreihe zu ischämischer Prä- und Postkonditionierung

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Vorversuchsreihe (drei Gruppen, je $n = 6$). Nach 20 Minuten *baseline* durchliefen die Herzen der IPC-Gruppe eine dreimal 5-minütige globale *no-flow* Ischämie und Reperfusion. Die Herzen der Kontroll (Con)- und iPostC-Gruppe erhielten weitere 30 Minuten keine Intervention. Im Anschluss durchliefen alle Gruppen 33 Minuten eine globale *no-flow* Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Die iPostC-Gruppe erhielt zu Beginn der Reperfusionsphase sechs Zyklen einer jeweils zehnstündigen globalen *no-flow* Ischämie sowie einer zehnstündigen Reperfusion. Nach den Versuchen erfolgte die Infarktgrößenbestimmung per TTC-Färbung.

Con = Kontrolle; IPC = ischämische Präkonditionierung; iPostC = ischämische Postkonditionierung;

n = Anzahl; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid.

Bei den Kontrollherzen und zunächst auch bei den iPostC-Herzen fand für weitere 30 Minuten keine Intervention statt. Für die IPC wurde die Perfusion des Herzens nach der *baseline* für fünf Minuten gestoppt (Globalischämie, *no-flow* Ischämie) und anschließend fünf Minuten lang eine Reperfusion eingeleitet. Dieser Zyklus von Ischämie und Reperfusion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Um eine Diffusion von Sauerstoff aus der umgebenden Raumluft zum isolierten Herzen zu verhindern, wurde die Wärmekammer während der Ischämie mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung aufgefüllt, die auf 37 °C gewärmt und mit Stickstoff begast wurde. Nach dem dritten Zyklus wurde eine 33-minütige Globalischämie eingeleitet, wobei wiederholt die Wärmekammer mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung befüllt und mit Stickstoff begast wurde.

Die Versuchsherzen, die eine iPostC-Intervention durchliefen, erfuhren nach der 33-minütigen Globalischämie (*no-flow* Ischämie) eine zehnstündige Reperfusion und danach eine zehnstündige globale *no-flow* Ischämie. Dieser Zyklus wurde sechsmal wiederholt. Die Gesamtzeit der iPostC-Intervention betrug demnach zwei Minuten. In der zehnstündigen Ischämie wurde die Wärmekammer weder mit Krebs-Henseleit-

Pufferlösung aufgefüllt noch mit Stickstoff begast. Mit Abschluss der sechs iPostC-Zyklen folgten 58 Minuten durchgehende Reperfusion des Herzens.

Generell folgte in dieser Serie nach der 33-minütigen *no-flow* Ischämie bei allen Herzen die 60-minütige Reperfusion. Die zweiminütige iPostC-Intervention fiel hierbei auf die ersten zwei Minuten dieser 60-minütigen Reperfuptionsphase. Für die Reperfusion wurde der Ischämie-Puffer etwa zehn Sekunden vor Ende der Ischämie aus der Wärmekammer abgelassen. Die Koronarperfusion wurde nach genau 33 Minuten Ischämie wieder freigegeben. Das Herz konnte sich nun erholen und musste spätestens ab der 45. Minute für 15 Minuten ununterbrochen schlagen. Schlug das Herz innerhalb der letzten 15 Minuten zum Versuchsende nicht durchgehend, wurde es von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Nach Versuchsende wurde das Herz von der Langendorff-Anlage getrennt und das Herzmassgewicht bestimmt. Im direkten Anschluss wurde es bei -20 °C bis zur späteren Färbung eingefroren.

2.2.3 Untersuchung des protektiven Effekts von Milrinon

Die Untersuchung des protektiven Effekts von Milrinon erfolgte in zwei Versuchsserien. Milrinon diente hierbei als Pharmakon zur pharmakologischen PostC. Bei der ersten Serie handelte es sich um eine Dosisfindungsstudie. Dabei war das Ziel, einen protektiven Effekt durch Milrinon-induzierte PostC am Herzen zu zeigen (primärer Endpunkt: Infarktgrößenreduzierung) und die geeignete Dosis Milrinon für die zweite Versuchsreihe zu finden. Die geeignete Dosis wurde als die kleinste noch protektive Dosis Milrinon definiert. Es wurden sechs verschiedene Konzentrationen Milrinon getestet mit einer jeweiligen Gruppengröße von zehn Tieren ($n = 10$). Milrinon wurde zur Applikation in Dimethylsulfoxid (DMSO), einem organischen Lösungsmittel, gelöst. Um eine 40-mM-Stocklösung herzustellen, wurden 50 mg Milrinon in 5,918 ml DMSO gelöst. Getestet wurden folgende Milrinon-Konzentrationen: 0,3 μM (Mil 0,3), 1 μM (Mil 1), 3 μM (Mil 3), 10 μM (Mil 10), 30 μM (Mil 30) und 100 μM (Mil 100). Eine siebte Gruppe mit einer Gruppengröße von zehn Tieren ($n = 10$) bildete die Kontrollgruppe (Con). Die Kontrollgruppe erhielt das Vehikel (1250 μl DMSO und 3750 μl Krebs-Henseleit-Lösung). Die applizierten Konzentrationen ergaben sich aus dem festgelegten Pipettierschema (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Pipettierschema für Milrinon (Phosphodiesterase-III-Inhibitor) in der Milrinon-Dosisfindungsstudie

Dargestellt sind die exakten Mengen der 40-mM-Milrinon-Stocklösung [μl], die für die einzelnen Gruppen pipettiert wurden. Dabei wurde die jeweilige Menge der Milrinon-Stocklösung in einer 5-ml-Spritze mit einer konstanten Menge Krebs-Henseleit-Lösung und einer der jeweiligen Gruppe angepassten Menge DMSO (Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel) gemischt. Die Applikation erfolgte über einen Perfusor mit einer Flussrate von 1 % des gemessenen Koronarflusses (CF). Die Messung des CF erfolgte in der 16. Minute der *baseline*. Das Schema war an diese Flussrate angepasst. Alle Herzen dieser Reihe erhielten 0,25 % DMSO.

Gruppe	Milrinon- Stocklösung [μl]	DMSO [μl]	Krebs-Henseleit- Lösung [μl]
Kontrolle (Con)	-	1250,00	3750
0,3 μM Milrinon (Mil 0,3)	3,75	1246,25	3750
1 μM Milrinon (Mil 1)	12,50	1237,50	3750
3 μM Milrinon (Mil 3)	37,50	1212,50	3750
10 μM Milrinon (Mil 10)	125,00	1125,00	3750
30 μM Milrinon (Mil 30)	375,00	875,00	3750
100 μM Milrinon (Mil 100)	1250,00	-	3750

μl = Mikroliter; μM = Mikromolar; n = Anzahl.

Die Versuche wurden randomisiert durchgeführt. Nach 20 Minuten *baseline* erfolgte bei allen Herzen direkt die Einleitung der 33-minütigen Globalischämie (zur Übersicht siehe Abb. 4).

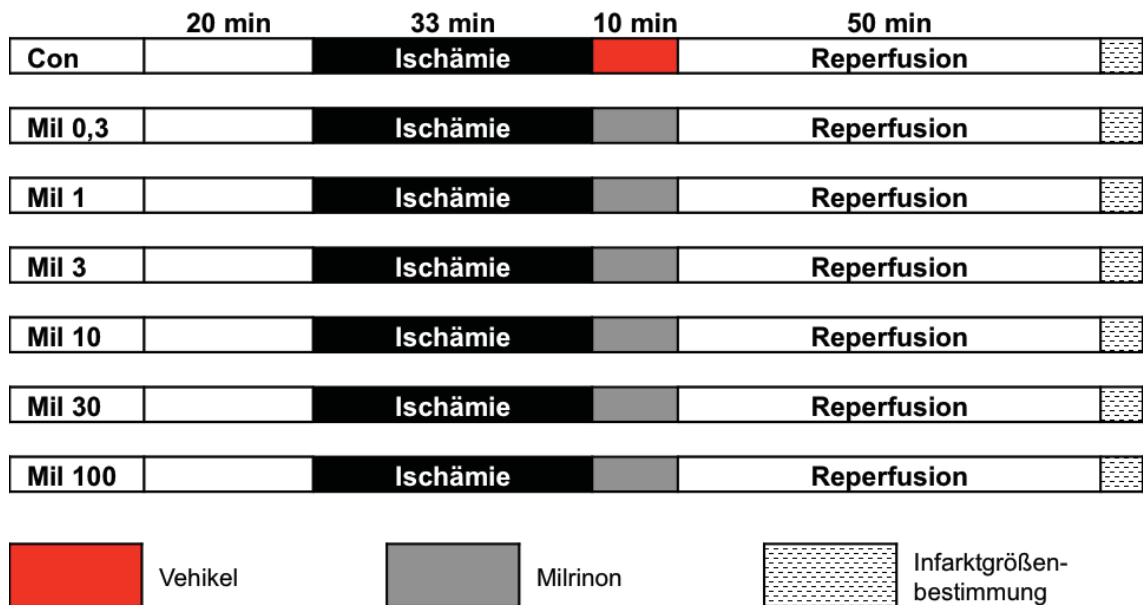


Abb. 4: Versuchsablauf der Milrinon-Dosisfindungsstudie

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Untersuchungen, durchgeführt an isolierten Tierherzen im Langendorff-Modell, der Dosisfindungsstudie (sieben Gruppen/ je n = 10). Das Ziel dieser Serie war es, den protektiven Effekt von Milrinon zu zeigen und dabei die kleinste protektive Dosis Milrinon zu finden. Nach 20 Minuten *baseline* durchliefen alle sieben Gruppen eine globale *no-flow* Ischämie von 33 Minuten. Mit Beginn der Reperfusion wurde über zehn Minuten eine bestimmte Konzentration Milrinon appliziert (0,3; 1; 3; 10; 30 oder 100 µM). Die Kontrollgruppe (Con) erhielt das Vehikel. Darauf folgten in allen Gruppen weitere 50 Minuten Reperfusion. Nach den Versuchen erfolgte die Infarktgrößenbestimmung per TTC-Färbung. Modifiziert nach (150).

Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; min = Minuten, n = Anzahl; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid.

Um auch in dieser Versuchsreihe eine mögliche Diffusion von Sauerstoff der Raumluft zum Herzen zu verhindern wurde die Wärmekammer mit auf 37 °C gewärmtem und Stickstoff begasten Krebs-Henseleit-Puffer aufgefüllt.

Etwa zehn Sekunden vor Ende der Ischämiephase wurde der Ischämie-Puffer wieder aus der Wärmekammer abgelassen. Die Koronarperfusion wurde nach genau 33 Minuten Ischämie wieder eingeleitet.

Nach Ende der 33-minütigen Ischämie und mit direktem Beginn der 60-minütigen Reperfusion erfolgte die Applikation einer bestimmten Dosis Milrinon oder des Vehikels für zehn Minuten über einen Perfusor. Die Flussrate der zu applizierenden Substanz wurde abhängig vom CF des Herzens eingestellt. Dazu wurde in der 16. Minute der *baseline* der CF bestimmt und die Flussrate des Perfusors auf 1 % des CF festgelegt. Die verwendeten 5-ml-Spritzen enthielten eine konstante Menge von 3750 µl Krebs-Henseleit-Lösung und 25 % DMSO. Mit einer Flussrate von 1 % des CF erhielten alle Herzen 0,25 % DMSO.

Das Herz konnte sich nun erholen und musste spätestens ab der 45. Minute für 15 Minuten ununterbrochen schlagen. Schlug das Herz innerhalb der letzten 15 Minuten zum Versuchsende nicht durchgehend, wurde es von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Nach Versuchsende wurde das Herz von der Langendorff-Anlage getrennt und das Herznassgewicht bestimmt. Im direkten Anschluss wurde es bei -20 °C bis zur späteren Färbung eingefroren.

Experimente der zweiten Versuchsserie wurden basierend auf den Ergebnissen der Milrinon-Dosisfindungsstudie mit 3 μM Milrinon fortgeführt. Das Ziel dieser zweiten Serie war es zu zeigen, dass die Milrinon-induzierte PostC über die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird (Paxillin-Studie). Hierfür wurde der mBK_{Ca} -Kanalinhibitor Paxillin zusätzlich zu Milrinon oder in alleiniger Gabe appliziert. Wie für die erste Versuchsserie beschrieben, wurde eine 40-mM-Milrinon-Stocklösung in DMSO hergestellt (50 mg Milrinon in 5,918 ml DMSO). Paxillin wurde ebenfalls in DMSO gelöst. Um eine 10-mM-Paxillin-Stocklösung herzustellen, wurden 10 mg Paxillin in 2,296 ml DMSO gelöst. Die Paxillin-Studie bestand aus vier Gruppen. Die Milrinon-Gruppe (Mil; $n = 9$) erhielt 3 μM Milrinon, die Paxillin-Milrinon Gruppe (Pax + Mil; $n = 8$) erhielt 3 μM Milrinon sowie 1 μM Paxillin und die Paxillin-Gruppe (Pax; $n = 8$) 1 μM Paxillin. Die Milrinon-Gruppe erhielt zusätzlich das Paxillin-Vehikel. Damit wurde gewährleistet, dass die Herzen eine konstante Konzentration DMSO erreichte. Dieses Vorgehen wurde auch bei den Paxillin-Gruppen angewandt, die dementsprechend zusätzlich das Milrinon-Vehikel erhielten. Die Kontrollgruppe (Con; $n = 8$) erhielt die Vehikel von jeweils Milrinon (37,5 μl DMSO und 4962,5 μl Krebs-Henseleit-Lösung) und Paxillin (50 μl DMSO und 4950 μl Krebs-Henseleit-Lösung). Die applizierten Konzentrationen ergaben sich aus den festgelegten Pipettierschemata (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4).

Tabelle 3: Pipettierschema für 3 μM Milrinon (Phosphodiesterase-III-Inhibitor) in der Paxillin-Studie

In der Tabelle sind die exakten Mengen der 40-mM-Milrinon-Stocklösung [μl], die für die einzelnen Gruppen pipettiert wurden, dargestellt. Dabei wurde die jeweilige Menge der Milrinon-Stocklösung in einer 5-ml-Spritze mit einer konstanten Menge Krebs-Henseleit-Lösung und einer der jeweiligen Gruppe angepassten Menge DMSO (Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel) gemischt. Die Applikation erfolgte über einen Perfusor mit einer Flussrate von 1 % des gemessenen Koronarflusses (CF). Die Messung des CF erfolgte in der 16. Minute der *baseline*. Das Schema war an diese Flussrate angepasst. Die Herzen erhielten in dieser Reihe 0,0075 % DMSO durch das Milrinon-Pipettierschema, sowie 0,01 % aus dem Paxillin-Pipettierschema (siehe Tabelle 4).

Gruppe	Milrinon- Stocklösung [µl]	DMSO [µl]	Krebs-Henseleit- Lösung [µl]
Kontrolle (Con)	-	37,50	4962,50
Milrinon (Mil)	37,50	-	4962,50
Paxillin + Milrinon (Pax + Mil)	37,50	-	4962,50
Paxillin (Pax)	-	37,50	4962,50

µl = Mikroliter; n = Anzahl.

Tabelle 4: Pipettierschema für 1 µM Paxillin (mBK_{Ca}-Kanalinhistor) in der Paxillin-Studie

Dargestellt sind die exakten Mengen der 10-mM-Paxillin-Stocklösung [µl], die für die einzelnen Gruppen pipettiert wurden. Dabei wurde die jeweilige Menge der Paxillin-Stocklösung in einer 5-ml-Spritze mit einer konstanten Menge Krebs-Henseleit-Lösung und einer der jeweiligen Gruppe angepassten Menge DMSO (Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel) gemischt. Die Applikation erfolgte über einen Perfusor mit einer Flussrate von 1 % des gemessenen Koronarflusses (CF). Die Messung des CF erfolgte in der 16. Minute der *baseline*. Das Schema war an diese Flussrate angepasst. Die Herzen erhielten durch das Paxillin-Pipettierschema 0,01 % DMSO sowie 0,0075 % DMSO durch das Milrinon-Pipettierschema (siehe Tabelle 3).

Gruppe	Paxillin- Stocklösung [µl]	DMSO [µl]	Krebs-Henseleit- Lösung [µl]
Kontrolle (Con)	-	50	4950
Milrinon (Mil)	-	50	4950
Paxillin + Milrinon (Pax + Mil)	50	-	4950
Paxillin (Pax)	50	-	4950

µl = Mikroliter; n = Anzahl.

Die Versuche wurden randomisiert durchgeführt. Nach 20 Minuten *baseline* erfolgte bei allen Herzen direkt die Einleitung der 33-minütigen Globalischämie (zur Übersicht siehe Abb. 5). Während der Ischämiephase wurde auch in dieser Versuchsreihe die das isolierte Herz umgebende Wärmekammer mit auf 37 °C gewärmtem und Stickstoff begasten Krebs-Henseleit-Puffer aufgefüllt. Einer potenziellen Diffusion von Sauerstoff der umgebenden Raumlufte zum Herzen wurde so entgegengetreten. Identisch zu dem

Vorgehen der vorangegangenen Versuchsreihen wurde etwa zehn Sekunden vor Ende der Ischämiephase der das Herz umgebende Ischämie-Puffer aus der Wärmekammer abgelassen. Die Koronarperfusion wurde nach exakt 33 Minuten Ischämie wieder eingeleitet.

Nach Ende der 33-minütigen Ischämie und mit direktem Beginn der 60-minütigen Reperfusion erfolgte je nach Gruppe die Applikation von den Vehikellösungen, Milrinon alleine, eine kombinierte Gabe von Milrinon und Paxillin oder Paxillin alleine für zehn Minuten über einen Perfusor. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Applikation von Paxillin über den Perfusor zehn Sekunden vor Beginn der Reperfusion gestartet wurde, um zu gewährleisten, dass die mBK_{Ca} -Kanäle blockiert sind, sobald Milrinon appliziert wurde. Milrinon und Paxillin wurden den Herzen in separaten Spritzen über zwei Perfusoren zugeführt. Die Perfusor-Flussrate der zu applizierenden Substanzen wurde abhängig vom CF des Herzens eingestellt. Dazu wurde in der 16. Minute der *baseline* der CF bestimmt und die Flussrate der Perfusoren auf 1 % des CF festgelegt. Die 5-ml-Spritzen, die zur Applikation von Milrinon oder dessen Vehikel, verwendet wurden, enthielten 0,75 % DMSO und eine konstante Menge von 4962,50 μ l Krebs-Henseleit-Lösung. Die 5-ml-Spritzen, die zur Applikation von Paxillin oder dessen Vehikel verwendet wurden, enthielten hingegen 1 % DMSO und eine konstante Menge von 4950 μ l Krebs-Henseleit-Lösung. Bei der genannten Perfusor-Flussrate bedeutet dies, dass die Herzen je nach Gruppe final 0,0075 % bzw. 0,01 % DMSO erhielten.

Das Herz konnte sich nun erholen und musste spätestens ab der 45. Minute für 15 Minuten ununterbrochen schlagen. Schlug das Herz innerhalb der letzten 15 Minuten zum Versuchsende nicht durchgehend, wurde es von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Nach Versuchsende wurde das Herz von der Langendorff-Anlage getrennt und das Herznassgewicht bestimmt. Im direkten Anschluss wurde es bei -20 °C bis zur späteren Färbung eingefroren.

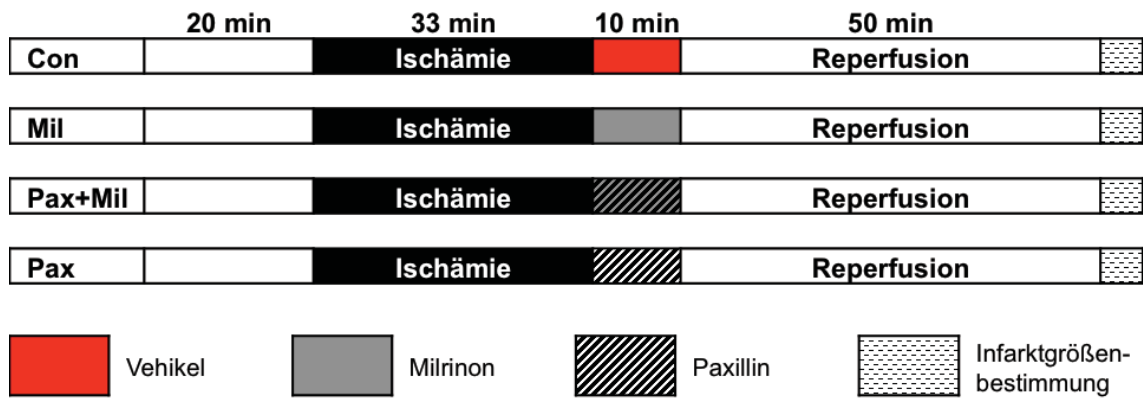


Abb. 5: Versuchsablauf der Paxillin-Studie

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Experimente der Paxillin-Studie (vier Gruppen/je $n = 8/9$). Das Ziel dieser Serie war es zu zeigen, dass die Milrinon-induzierte PostC (Postkonditionierung) über mBK_{Ca} -Kanäle (mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit) vermittelt wird. Nach 20 Minuten *baseline* durchliefen alle vier Gruppen eine globale *no-flow* Ischämie von 33 Minuten. Mit Beginn der Reperfusion wurde über zehn Minuten Milrinon (Mil; $3 \mu\text{M}$), Paxillin mit Milrinon (Pax + Mil; Pax: $1 \mu\text{M}$, mBK_{Ca} -Kanalinhistor) oder Paxillin (Pax; $1 \mu\text{M}$) alleine appliziert. Die Kontrollgruppe (Con) erhielt die Vehikel. Darauf folgten in allen Gruppen weitere 50 Minuten Reperfusion. Nach den Versuchen erfolgte die Infarktgrößenbestimmung per TTC-Färbung. Modifiziert nach (150).

Con = Kontrolle, Mil = Milrinon, Pax + Mil = Paxillin + Milrinon; Pax = Paxillin, min = Minuten;

n = Anzahl; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid.

2.2.4 TTC-Färbung der Herzen

Die Herzen wurden für den Färbvorgang gleichmäßig in etwa 2 mm dicke axiale Scheiben geschnitten und mit einer 0,75 %-Triphenyltetrazoliumchlorid-(TTC)-Lösung in 1,4 % TRIS-Puffer für 15 Minuten bei pH 7,42 und 37°C in einem Wärmebad inkubiert. Die farblose TTC-Lösung enthält Tetrazolium-Kationen. Das Prinzip der TTC-Färbung basiert auf Dehydrogenasen in vitalen Myokardzellen, die diese Kationen über ein Tetrazolium-Radikal zu rotem Formazan reduzieren. Vitales Myokardgewebe wurde so rot gefärbt, während infarziertes Gewebe nicht gefärbt wurde und weiß blieb. Im Anschluss an die Färbung folgte über Nacht die Fixierung in 4 % Formaldehyd-Lösung bei pH 7,4 und 20°C . Nach erfolgter Fixierung wurden die Herzscheiben, sortiert von Basis zu Apex, mittels eines Fotoscanners digitalisiert. Danach wurden die Herzscheiben über sieben Tage unter einem Abzug getrocknet. Die getrockneten Herzscheiben wurden gewogen, um das Trockengewicht des Herzens zu bestimmen.

Die Planimetrie der digitalisierten Herzscheiben erfolgte verblindet mit der Software SigmaScan[®] (siehe Abb. 6). Die Farbsättigung und Kontrastierung der Bilder wurde digital um 30 % erhöht. Dieser Schritt erleichterte die visuelle Differenzierung

zwischen infarziertem und vitalem Myokardgewebe. Das infarzierte Gewebe stellte sich in den Schnitten weiß-gräulich und das vitale Gewebe rötlich dar. Die infarzierten Flächen des linken Ventrikels wurden gekennzeichnet und durch die Software addiert. Anschließend wurde die Summe der infarzierten Areale zur Gesamtfläche des linken Ventrikels ($AAR = Area\ at\ Risk$) ins Verhältnis gesetzt. Der resultierende Quotient aus infarziertem und vitalem Gewebe wurde für alle Herzscheiben arithmetisch gemittelt und somit die durchschnittliche Infarktgröße jedes Herzens bestimmt. Zwei verblindete, voneinander unabhängige Untersucher zeichneten ein jedes Herz gegen.

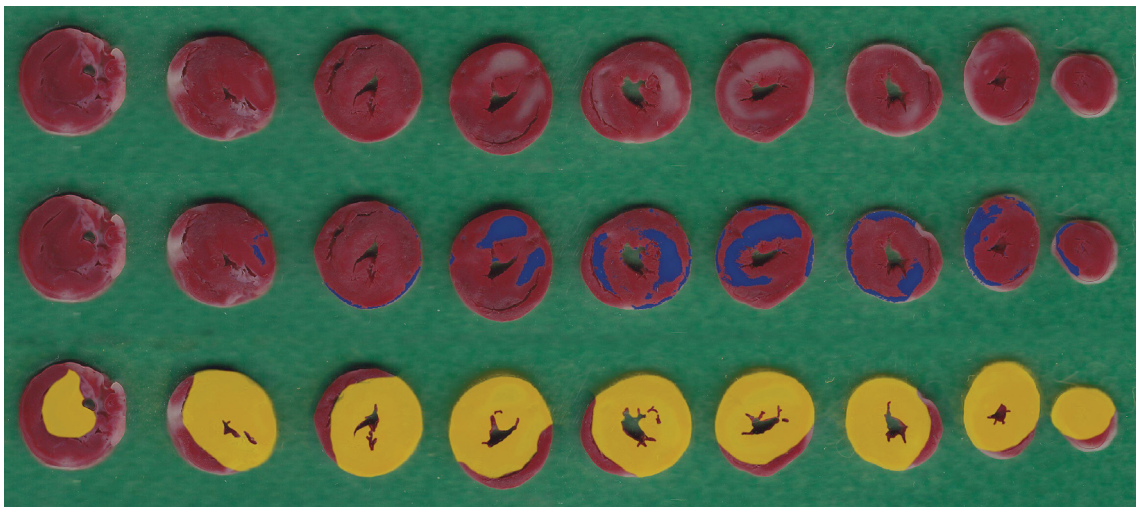


Abb. 6: Planimetrie eines Rattenherzens nach TTC-Färbung

Dargestellt ist beispielhaft die Durchführung der Planimetrie eines Rattenherzens. Ein Herz wurde in neun dünne Scheiben geteilt. Diese axialen Schnitte wurden von Basis (links) nach Apex (rechts) sortiert. Die obere Reihe zeigt die noch ungekennzeichneten Herzscheiben in der genannten Sortierung. Zunächst wurden die Flächen der weißlichen Infarktareale blau gekennzeichnet (siehe mittlere Reihe). Im nächsten Schritt wurde die Fläche des gesamten linken Ventrikels gelb gekennzeichnet (siehe untere Reihe). Aus dem Verhältnis der einzelnen summierten Infarktflächen zur Gesamtfläche des linken Ventrikels wurde die Infarktgröße in % ermittelt. Modifiziert nach (101). TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid.

2.2.5 Statistische Auswertung

Der primäre Endpunkt der *in vitro*-Versuche dieser Arbeit war die Infarktgrößenreduktion. Mithilfe von SigmaStat[®] wurde die erforderliche Gruppengröße ermittelt, um einen Unterschied zwischen zwei Gruppen detektieren zu können. Es wurde eine minimale Differenz des myokardialen Zellschadens von 25 % angenommen und eine Standardabweichung von 10 % erwartet (Werte aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kardioprotektion). Daraus errechnete sich bei gewünschter Power von 80 % und einem angenommenen alpha-Fehler von 0,05 bei insgesamt sieben Gruppen in der Milrinon-Dosisfindungsstudie eine Gruppengröße von acht bis zehn

Tieren. Ein statistisch signifikanter Unterschied von 25 % in der Infarktgröße konnte durch diese kalkulierte Gruppengröße detektiert werden. In der Paxillin-Studie ergab sich dadurch bei insgesamt vier Gruppen und gleichen Gegebenheiten eine Gruppengröße von acht Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism Version 6 verwendet.

Die Parameter der Versuchstiere Tiergewicht, Herzgewichte, ischämisches Kontrakturmaximum und Zeitpunkt der ischämischen Kontraktur wurden mit einer einfaktoriellen *ANOVA* mit *Tukey's post-hoc test* zwischen den Gruppen überprüft.

Die Infarktgrößenunterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einer einfaktoriellen *ANOVA* mit *Tukey's post-hoc test* analysiert.

Der Vergleich der hämodynamischen Parameter in der *baseline* und Reperfusionsphase zwischen den Gruppen oder den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurde mit einer „Zwei-Wege“ *ANOVA* mit *Tukey's post-hoc test* durchgeführt.

Ein $p < 0,05$ wurde für alle Testverfahren als signifikant erachtet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Infarktgrößen der Vorversuche zu ischämischer Prä- und Postkonditionierung

Für die vorliegende Arbeit wurde vor Beginn der Hauptversuche eine Vorversuchsreihe durchgeführt. Diese Vorversuche sollten den in der Literatur beschriebenen Effekt der ischämischen Konditionierung bestätigen. Als primärer Endpunkt wurde die Infarktgrößenreduktion festgelegt. In zwei Gruppen (je $n = 6$) wurde das Konzept der IPC und der iPostC untersucht. Eine dritte Gruppe ($n = 6$) bildete die Kontrolle (Con). Die Infarktgröße der Kontrollgruppe betrug $41 \pm 9 \%$ des Risikogebiets (*AAR*). Die Infarktgröße der IPC-Gruppe betrug hingegen $10 \pm 4 \%$. Diese Reduktion der Infarktgröße war gegenüber der Kontrolle signifikant ($p < 0,05$ *versus* Con: $41 \pm 9 \%$). Die Infarktgröße der iPostC-Gruppe betrug $20 \pm 10 \%$ und war ebenfalls signifikant geringer als die Kontrolle ($p < 0,05$ *vs.* Con: $41 \pm 9 \%$). Die Reduktion der Infarktgröße durch IPC unterschied sich nicht von der Reduktion durch iPostC (IPC: $10 \pm 4 \%$, *vs.* iPostC: $20 \pm 10 \%$; $p > 0,05$ (nicht signifikant [ns])). Die Infarktgrößen wurden grafisch in Abb. 7 dargestellt.

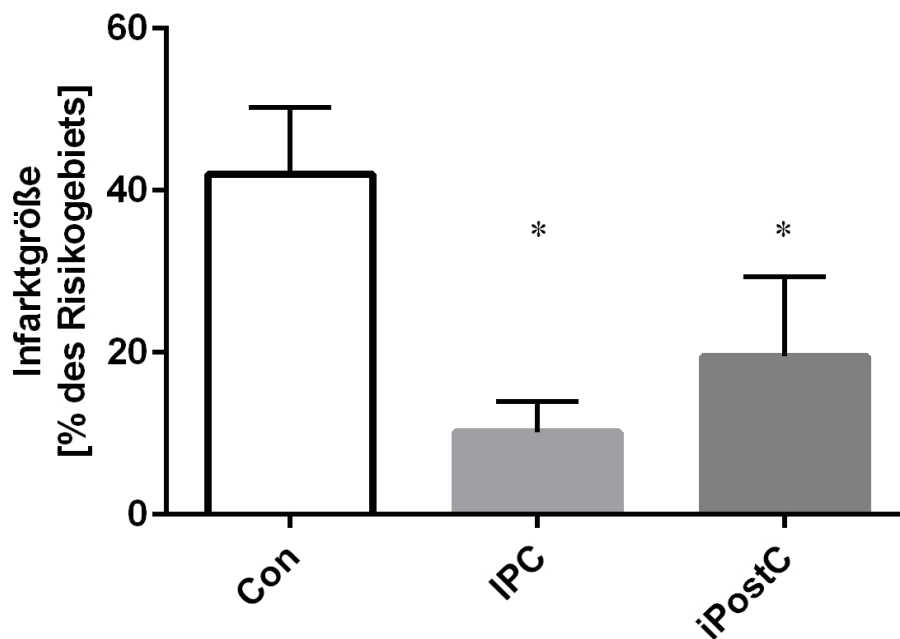


Abb. 7: Infarktgrößen der Vorversuchsreihe zu ischämischer Prä- und Postkonditionierung

Zur Bestätigung des kardioprotektiven Effekts ischämischer Konditionierungsverfahren wurden isolierte Tierherzen in drei Gruppen (Con, IPC, iPostC; je $n = 6$) randomisiert. Die Herzen durchliefen eine Einpendelungsphase (*baseline*, 20 min). IPC-Herzen erhielten im Anschluss drei Zyklen à 5 min globale Ischämie-Reperfusion. Danach folgten 33 min globale Ischämie und 60 min Reperfusion. IPostC-Herzen erhielten nach der Ischämiephase von 33 min sechs Zyklen à 10 s Ischämie-Reperfusion. Es folgten weitere 58 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit TTC gefärbt. Die Infarktgröße wurde planimetrisch berechnet und als prozentualer Anteil des Risikogebiets angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Infarktgrößen der IPC- und der iPostC-Gruppen waren signifikant geringer gegenüber der Kontrolle (* $p < 0,05$ vs. Con).

Con = Kontrolle; IPC = ischämische Präkonditionierung; iPostC = ischämische Postkonditionierung; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid;

n = Anzahl; vs. = *versus*; min = Minuten; s = Sekunden.

3.2 Ergebnisse der Milrinon-Dosisfindungsstudie

3.2.1 Infarktgrößen

Das Ziel der Dosisfindungsstudie bestand darin, den kardioprotektiven Effekt durch eine dosisabhängige Milrinon-induzierte PostC zu zeigen und die kleinste protektive Dosis Milrinon für die zweite Versuchsreihe zu finden. Der primäre Endpunkt der Studie war die Infarktgrößenreduktion. Es wurden sechs verschiedene Konzentrationen Milrinon getestet mit einer jeweiligen Gruppengröße von zehn Tieren ($n = 10$). Getestet wurden folgende Konzentrationen Milrinon: 0,3 μM (Mil 0,3), 1 μM (Mil 1), 3 μM (Mil

3), 10 μM (Mil 10), 30 μM (Mil 30) und 100 μM (Mil 100). Eine siebte Gruppe mit einer Gruppengröße von zehn Tieren ($n = 10$) bildete die Kontrollgruppe (Con).

Die Infarktgröße der Kontrollgruppe (Con) betrug $37 \pm 7\%$ des Risikogebiets (AAR). Die Applikation von 0,3 μM (Mil 0,3) und 1 μM (Mil 1) Milrinon führte nicht zu einem protektiven Effekt am Myokard. Stattdessen bewegten sich die Infarktgrößen auf Kontrollniveau (Mil 0,3: $40 \pm 5\%$; Mil 1: $40 \pm 4\%$; ns vs. Con).

Bei der Analyse der Infarktgrößen zeigte sich eine statistisch signifikante Infarktgrößenreduzierung ab der Gabe von 3 μM (Mil 3). Die Infarktgröße in dieser Gruppe betrug $21 \pm 7\%$ ($p < 0,05$ vs. Con: $37 \pm 7\%$). Die höheren Konzentrationen Milrinon, 10 bis 100 μM (Mil 10, Mil 30, Mil 100), waren ebenfalls signifikant protektiv, führten jedoch zu keiner signifikant stärkeren Kardioprotektion (Mil 10: $24 \pm 8\%$; Mil 30: $27 \pm 8\%$; Mil 100: $20 \pm 9\%$; ns vs. Mil 3: $21 \pm 7\%$). Die Infarktgrößen wurden grafisch in Abb. 8 dargestellt.

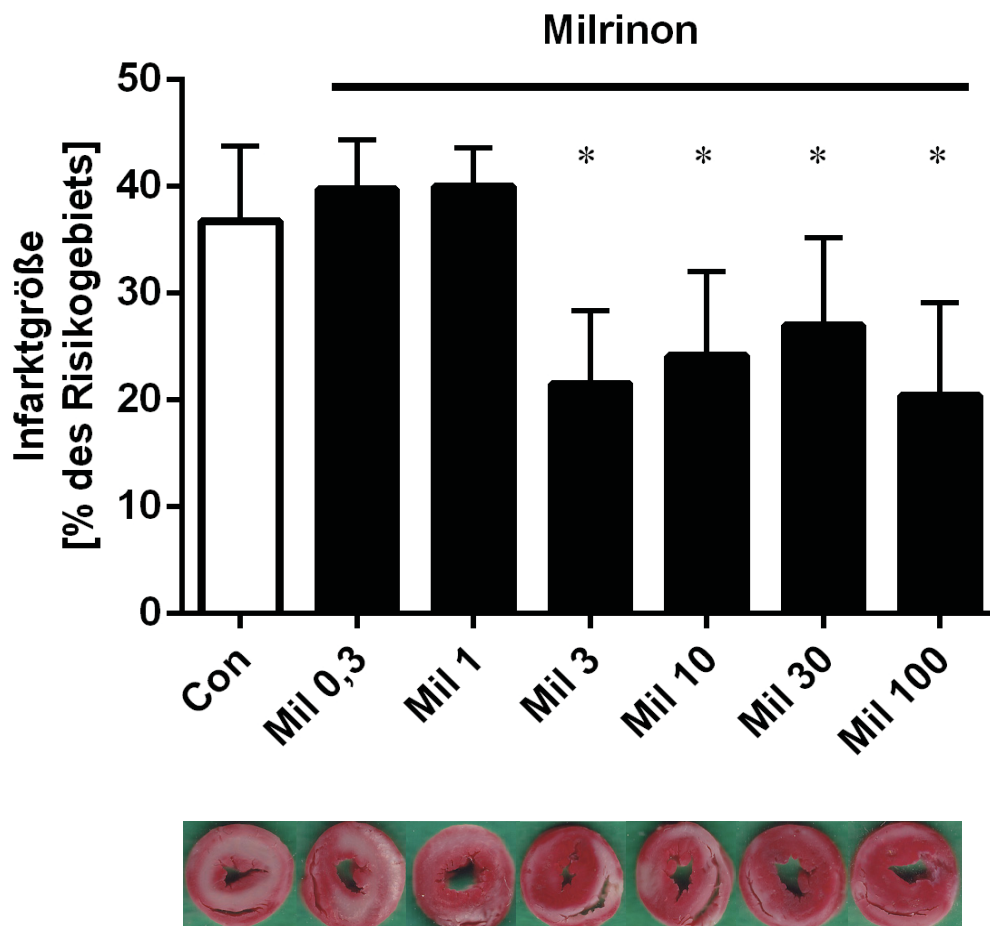


Abb. 8: Infarktgrößen der Milrinon-Dosisfindungsstudie

An isolierten Tierherzen im Langendorff-Modell wurden in der Milrinon-Dosisfindungsstudie verschiedene Konzentrationen Milrinon bezüglich eines kardioprotektiven Effekts untersucht.

Als primärer Endpunkt wurde die Infarktgrößenreduzierung festgelegt. Die isolierten Tierherzen wurden in sieben Gruppen (je n = 10) randomisiert. Im Anschluss an eine 33-minütige Ischämie erhielten die Interventionsgruppen Milrinon [μM] in folgenden Konzentrationen: 0,3 (Mil 0,3), 1 (Mil 1), 3 (Mil 3), 10 (Mil 10), 30 (Mil 30) oder 100 (Mil 100) über 10 min zu Beginn der 60-minütigen Reperfusionphase. Die Kontrollgruppe (Con) erhielt das Vehikel. Die Herzen wurden mit TTC gefärbt. Die Infarktgröße wurde planimetrisch berechnet und als prozentualer Anteil des Risikogebiets angegeben. Die vorliegenden Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Es wurde eine repräsentative Herzscheibe je Gruppe dargestellt. Milrinon führte ab einer Konzentration von 3 μM zu einer signifikanten Infarktgrößenreduzierung (* p < 0,05 vs. Con). Höhere Konzentrationen Milrinon (Mil 10, Mil 30 und Mil 100) führten jedoch zu keiner signifikant stärkeren Infarktgrößenreduzierung (p > 0,05 vs. Mil 3). Modifiziert nach (150).

Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; TTC = Tetrazoliumchlorid;

n = Anzahl; vs. = *versus*; ns = nicht signifikant; μM = mikromolar; min = Minuten.

3.2.2 Hämodynamik

Die analysierten hämodynamischen Parameter umfassen Herzfrequenz [min^{-1}], linksventrikulären enddiastolischen Druck [mmHg], linksventrikulären endsystolischen Druck [mmHg], *Rate Pressure Product* (*RPP*) sowie den Koronarfluss [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$] und sind in Tabelle 5 dargestellt. Diese Parameter wurden während der Experimente kontinuierlich gemessen, in die statistische Auswertung flossen die zugehörigen Messwerte jedoch zu einem definierten Zeitpunkt während der *baseline* (16. Minute) sowie 30, 45 und 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion ein. In der *baseline* zeigte sich bezüglich der Parameter Herzfrequenz, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, linksventrikulärer endsystolischer Druck, *RPP* und Koronarfluss kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Auch in der Gegenüberstellung dieser hämodynamischen Parameter von den Interventionsgruppen zu den hämodynamischen Parametern der Kontrollgruppe gab es weder in der *baseline* noch in der Reperfusion signifikante Unterschiede.

Die Herzfrequenz zeigte zum Ende des Experiments (Reperfusion 60. Minute) in allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied zur *baseline*.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war nach der Ischämie zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikant höher im Vergleich zur *baseline*. Der linksventrikuläre endsystolische Druck zeigte hingegen in allen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt nach der Ischämie ein gegensätzliches Verhalten. Die Drücke waren im Vergleich zur *baseline* signifikant niedriger. Auch das *RPP* war nach der Ischämiephase zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikant niedriger gegenüber der *baseline*.

Der Koronarfluss war nach der Ischämie in allen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt signifikant geringer im Vergleich zur *baseline*.

Innerhalb einer Gruppe zeigte sich zu den verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der bereits genannten hämodynamischen Parameter kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter der Milrinon-Dosisfindungsstudie

Isolierte Tierherzen im Langendorff-Modell wurden in sieben Gruppen randomisiert. Sie durchliefen eine Einpendelungsphase (*baseline*) von 20 min. Es folgte eine Ischämie von 33 min. Zu Beginn der 60-minütigen Reperfusion erhielten die Interventionsgruppen (Mil 0,3; Mil 1; Mil 3; Mil 10; Mil 30; Mil 100) über 10 min verschiedene Konzentrationen Milrinon (Mil). Die Kontrolle (Con) erhielt das Vehikel. Zu definierten Zeitpunkten wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP_{dia}), linksventrikulärer systolischer Druck (LVP_{sys}), *Rate Pressure Product* (RPP) und der Koronarfluss (CF) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer „Zwei-Wege“ ANOVA mit *Tukey's post-hoc test*. Alle Werte sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung). Modifiziert nach (150).

	μ M	<i>baseline</i>	Reperfusion [min]		
			30	45	60
<i>HF [min⁻¹]</i>					
Con	-	326 \pm 40	244 \pm 131*	304 \pm 76	280 \pm 49
Mil	0,3	331 \pm 33	285 \pm 135	271 \pm 56	298 \pm 47
Mil	1	333 \pm 49	215 \pm 117*	239 \pm 101*	256 \pm 69
Mil	3	313 \pm 45	209 \pm 101*	285 \pm 69	261 \pm 35
Mil	10	314 \pm 51	361 \pm 85	260 \pm 39	264 \pm 46
Mil	30	322 \pm 43	204 \pm 111*	228 \pm 96*	263 \pm 72
Mil	100	325 \pm 55	201 \pm 123*	248 \pm 85	269 \pm 102
<i>LVP_{dia} [mmHg]</i>					
Con	-	5 \pm 2	86 \pm 7*	82 \pm 7*	81 \pm 6*
Mil	0,3	4 \pm 2	83 \pm 5*	79 \pm 6*	77 \pm 5*
Mil	1	3 \pm 2	83 \pm 8*	79 \pm 8*	77 \pm 7*
Mil	3	5 \pm 1	85 \pm 9*	81 \pm 6*	78 \pm 6*
Mil	10	3 \pm 2	88 \pm 7*	83 \pm 6*	81 \pm 5*
Mil	30	4 \pm 2	88 \pm 6*	83 \pm 6*	80 \pm 6*
Mil	100	4 \pm 2	86 \pm 5*	82 \pm 4*	80 \pm 5*

	μM	<i>baseline</i>	Reperfusion [min]		
			30	45	60
<i>LVP_{sys} [mmHg]</i>					
Con	-	148 ± 13	97 ± 10*	101 ± 11*	99 ± 10*
Mil	0,3	144 ± 9	103 ± 7*	105 ± 7*	103 ± 4*
Mil	1	139 ± 15	96 ± 7*	97 ± 7*	99 ± 8*
Mil	3	143 ± 12	101 ± 10*	101 ± 11*	101 ± 9*
Mil	10	137 ± 10	101 ± 5*	104 ± 7*	103 ± 6*
Mil	30	145 ± 8	107 ± 19*	98 ± 6*	97 ± 7*
Mil	100	144 ± 13	97 ± 8*	100 ± 10*	98 ± 7*
<i>RPP [min⁻¹ x mmHg]</i>					
Con	-	47607 ± 6504	23370 ± 12891*	30341 ± 7749*	27381 ± 4726*
Mil	0,3	47413 ± 3633	29419 ± 14091*	28581 ± 7083 *	30633 ± 5746*
Mil	1	45482 ± 9211	20806 ± 11537*	23207 ± 9987*	25088 ± 6965*
Mil	3	45653 ± 6505	20694 ± 9977*	28330 ± 6722*	25936 ± 3983*
Mil	10	42925 ± 6270	26469 ± 8904*	27186 ± 5055*	27182 ± 5299*
Mil	30	45705 ± 8129	22198 ± 12497 *	22530 ± 9328*	25686 ± 6127*
Mil	100	45971 ± 5506	19848 ± 12392*	24459 ± 7924*	26298 ± 9325*
<i>CF (ml x min⁻¹)</i>					
Con	-	16 ± 3	9 ± 2*	10 ± 3*	9 ± 3*
Mil	0,3	15 ± 1	10 ± 4*	10 ± 3*	10 ± 3*
Mil	1	16 ± 3	10 ± 3*	10 ± 3*	11 ± 3*
Mil	3	15 ± 2	10 ± 4*	10 ± 5*	11 ± 5*
Mil	10	15 ± 3	11 ± 4*	11 ± 4*	11 ± 4*
Mil	30	15 ± 2	11 ± 4*	10 ± 4*	9 ± 3*
Mil	100	16 ± 3	8 ± 2*	8 ± 2*	9 ± 2*

μM = Mikromolar; min = Minuten; mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; ml = Milliliter.

* p < 0,05 vs. *baseline*.

3.2.3 Tiergewicht, Herzgewicht und ischämische Kontraktur

Neben der Hämodynamik wurden auch die Parameter Körpergewicht der Versuchstiere, Herztrocken- und -nassgewicht sowie die Zeitpunkte und Höhe der Kontraktur von den Myokardzellen in der Ischämie betrachtet. Diese Parameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Tiergewichte, Herztrocken- und -nassgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur der Milrinon-Dosisfindungsstudie

Dargestellt sind das Körpergewicht, das Herznassgewicht nach Versuchsende sowie das Herztrockengewicht nach Trocknung für sieben Tage. Ferner sind Zeitpunkt und Höhe der Kontraktur des linken Ventrikels während der 33-minütigen Ischämiephase angegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen ANOVA. Alle Werte sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung).

	Milrinon [μM]	n	Körper- gewicht [g]	Herztrocken- gewicht [g]	Herznass- gewicht [g]	Zeitpunkt der max. ischämischen Kontraktur [min]	Höhe der max. ischämischen Kontraktur [mmHg]
Con	-	10	287 \pm 29	0,16 \pm 0,02	1,60 \pm 0,23	13 \pm 2	65 \pm 5
Mil	0,3	10	285 \pm 24	0,16 \pm 0,02	1,46 \pm 0,14	14 \pm 1	62 \pm 6
Mil	1	10	286 \pm 24	0,17 \pm 0,02	1,56 \pm 0,08	13 \pm 2	63 \pm 6
Mil	3	10	278 \pm 25	0,17 \pm 0,03	1,48 \pm 0,12	13 \pm 2	66 \pm 8
Mil	10	10	296 \pm 32	0,16 \pm 0,01	1,62 \pm 0,11	14 \pm 2	62 \pm 9
Mil	30	10	282 \pm 23	0,16 \pm 0,02	1,55 \pm 0,12	13 \pm 1	67 \pm 10
Mil	100	10	281 \pm 21	0,15 \pm 0,01	1,49 \pm 0,10	13 \pm 1	66 \pm 7

Con = Kontrolle; Mil = Milrinon.

μ M = Mikromolar; g = Gramm; n = Anzahl; min = Minuten; mmHg = Millimeter Quecksilbersäule.

3.3 Ergebnisse der Paxillin-Studie

3.3.1 Infarktgrößen

Basierend auf den Ergebnissen der Milrinon-Dosisfindungsstudie wurde in dieser zweiten Serie (Paxillin-Studie) eine Konzentration von 3 μ M Milrinon zur Induzierung der PostC eingesetzt. Diese Konzentration Milrinon wurde als die niedrigste noch protektive Dosis ermittelt. Diese Paxillin-Studie beschäftigte sich mit den mechanistischen Zusammenhängen zwischen Milrinon-induzierter PostC und den mBK_{Ca}-Kanälen. Das Ziel dieser zweiten Serie war es zu zeigen, dass Milrinon-induzierte PostC über die mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird. Hierfür wurde der mBK_{Ca}-Kanalinh inhibitor Paxillin zusätzlich zu Milrinon oder in alleiniger Gabe appliziert. Auch in dieser Versuchsreihe wurde die Infarktgrößenreduktion als primärer Endpunkt festgelegt. In Abb. 9 sind die Infarktgrößen grafisch dargestellt.

Insgesamt wurden vier Gruppen mit einer Größe von jeweils acht bis neun Tieren (n = 8–9), in dieser Serie untersucht. Die Infarktgröße der Kontrollgruppe (Con) betrug

42 ± 8 % des Risikogebiets (*AAR*). Die alleinige Gabe von Milrinon (Mil) hingegen ergab wiederholt eine signifikante Infarktgrößenreduzierung. Die Infarktgröße in dieser Gruppe lag bei 25 ± 6 % ($p < 0,05$ vs. Con). Die Applikation von Paxillin (Pax) zusätzlich zu Milrinon (Mil) verhinderte die Milrinon-induzierte Infarktgrößenreduktion. Die Infarktgröße in dieser Gruppe lag bei 42 ± 9 % ($p < 0,05$ vs. Mil). Die alleinige Gabe von Paxillin (Pax) hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Die Infarktgröße lag hier bei 47 ± 4 % (ns vs. Con).

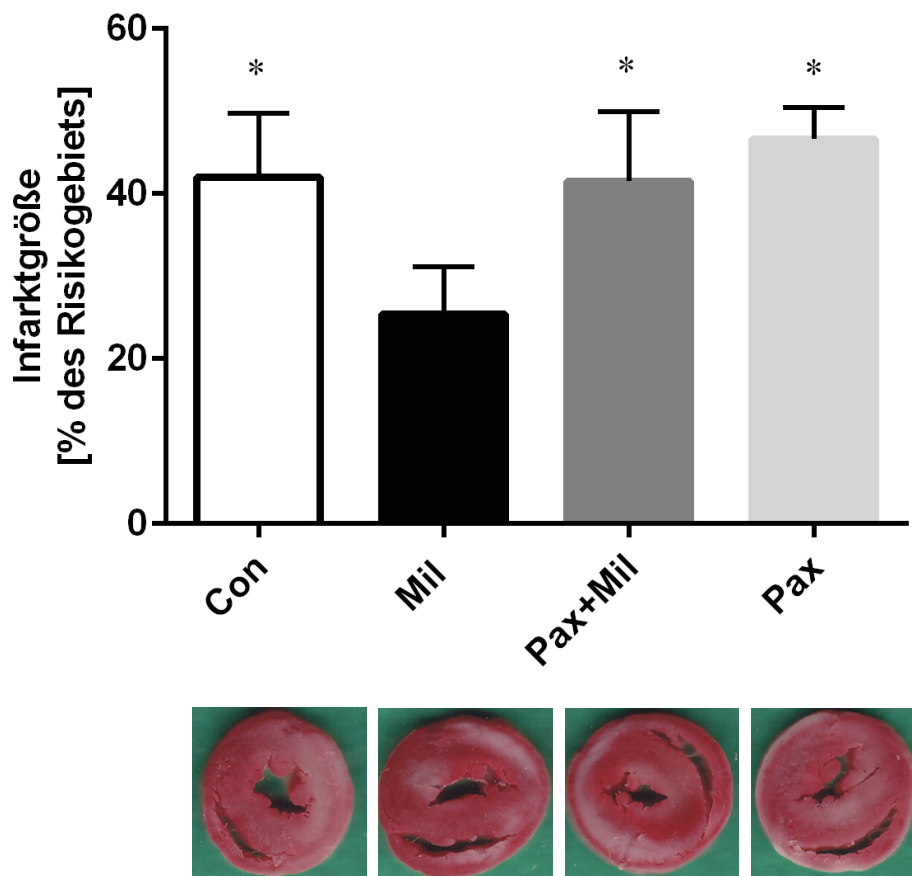


Abb. 9: Infarktgrößen der Paxillin-Studie

In der Paxillin-Studie wurden die mechanistischen Zusammenhänge des kardioprotektiven Effekts von Milrinon untersucht. Dafür wurde Paxillin, ein Inhibitor der mitochondrialen calciumsensitiven Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (mBK_{Ca}-Kanäle), verwendet. Isolierte Tierherzen wurden in vier Gruppen (je n = 8/9) randomisiert. Als primärer Endpunkt wurde die Infarktgrößenreduzierung festgelegt. Die Interventionsgruppen erhielten entweder Milrinon (Mil; 3 µM), Paxillin und Milrinon (Pax + Mil; Pax: 1 µM) oder Paxillin alleine (Pax; 1 µM). Die Kontrollgruppe (Con) erhielt die Vehikel. Die Herzen wurden mit TTC gefärbt. Die Infarktgröße wurde planimetrisch berechnet und als prozentualer Anteil des Risikogebiets angegeben. Die vorliegenden Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Es wurde eine repräsentative Herzscheibe je Gruppe dargestellt. Die Infarktgrößen der Gruppen Con, Pax + Mil und Pax waren signifikant erhöht gegenüber Mil (* $p < 0,05$ vs. Mil). Modifiziert nach (150).

Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxillin; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid;

n = Anzahl; vs. = *versus*.

3.3.2 Hämodynamik

Die analysierte Hämodynamik umfasst Herzfrequenz [min^{-1}], linksventrikulären enddiastolischen Druck [mmHg], linksventrikulären endsystolischen Druck [mmHg], *Rate Pressure Product (RPP)* sowie den Koronarfluss [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$]. Die komplette Hämodynamik dieser Serie ist in Tabelle 7 dargestellt. Diese Parameter wurden während der Experimente kontinuierlich gemessen, in die statistische Auswertung flossen die zugehörigen Messwerte jedoch zu einem definierten Zeitpunkt in der *baseline* (16. Minute) sowie nach 30, 45 und 60 Minuten in der Reperfusion. In der *baseline* zeigte sich bezüglich der Parameter Herzfrequenz, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, linksventrikulärer endsystolischer Druck, *RPP* und Koronarfluss kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Darüber hinaus zeigte sich auch in dieser Versuchsreihe über den gesamten Versuchsablauf (*baseline* und Reperfusion) kein signifikanter Unterschied der hämodynamischen Parameter der Interventionsgruppen gegenüber den hämodynamischen Parametern der Kontrollgruppe.

Bei Betrachtung der Herzfrequenz zeigte sich zum Ende des Experiments (Reperfusion 60. Minute) in allen Gruppen ein signifikanter Unterschied zur *baseline*.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war nach der Ischämie zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikant höher im Vergleich zur *baseline*. Der linksventrikuläre endsystolische Druck zeigte hingegen in allen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt nach der Ischämie ein gegensätzliches Verhalten. Die Drücke waren im Vergleich zur *baseline* signifikant niedriger. Auch das *RPP* war nach der Ischämiephase zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikant niedriger gegenüber der *baseline*. Der Koronarfluss war nach der Ischämie zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikant geringer im Vergleich zur *baseline*.

Innerhalb einer Gruppe zeigte sich zu den verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der bereits genannten hämodynamischen Parameter kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 7: Hämodynamische Parameter der Paxillin-Studie

Isolierte Tierherzen im Langendorff-Modell wurden in vier Gruppen randomisiert. Sie durchliefen eine Einpendelungsphase (*baseline*) von 20 min. Es folgte eine Ischämie von 33 min. Zu Beginn der 60-minütigen Reperfusion erhielten die Interventionsgruppen über 10 min Milrinon (Mil), Paxillin und Milrinon (Pax + Mil) oder Paxillin alleine (Pax). Die Kontrolle (Con) erhielt die Vehikel. Zu definierten Zeitpunkten wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP_{dia}), linksventrikulärer systolischer Druck

(LVP_{sys}), *Rate Pressure Product (RPP)* und der Koronarfluss (CF) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer „Zwei-Wege“ ANOVA mit *Tukey's post-hoc test*. Alle Werte sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung). Modifiziert nach (150).

	<i>baseline</i>	Reperfusion [min]		
		30	45	60
<i>HF [min⁻¹]</i>				
Con	320 \pm 54	237 \pm 76*	230 \pm 84*	228 \pm 63*
Mil	356 \pm 44	230 \pm 134*	242 \pm 114*	268 \pm 78*
Pax + Mil	344 \pm 38	202 \pm 115*	235 \pm 80*	211 \pm 75*
Pax	320 \pm 27	292 \pm 26	246 \pm 53	212 \pm 39*
<i>LVP_{dia} [mmHg]</i>				
Con	2 \pm 2	80 \pm 4*	72 \pm 4*	70 \pm 4*
Mil	1 \pm 1	73 \pm 28*	76 \pm 8*	74 \pm 7*
Pax + Mil	1 \pm 1	70 \pm 30*	76 \pm 9*	73 \pm 8*
Pax	1 \pm 1	80 \pm 5*	75 \pm 6*	72 \pm 5*
<i>LVP_{sys} [mmHg]</i>				
Con	139 \pm 10	95 \pm 4*	98 \pm 8*	93 \pm 8*
Mil	137 \pm 14	100 \pm 7*	98 \pm 7*	100 \pm 5*
Pax + Mil	140 \pm 17	98 \pm 6*	94 \pm 7*	95 \pm 10*
Pax	140 \pm 11	95 \pm 7*	97 \pm 7*	97 \pm 5*
<i>RPP [min⁻¹ x mmHg]</i>				
Con	44730 \pm 8572	22769 \pm 7723*	22551 \pm 8301*	21,408 \pm 6746*
Mil	48975 \pm 9466	22730 \pm 13033*	23725 \pm 11104*	26630 \pm 7548*
Pax + Mil	48139 \pm 7939	19475 \pm 10859*	21868 \pm 6787*	19687 \pm 6845*
Pax	45134 \pm 4766	27871 \pm 3003*	24010 \pm 5905*	20634 \pm 4646*
<i>CF (ml x min⁻¹)</i>				
Con	16 \pm 2	10 \pm 3*	11 \pm 3*	10 \pm 2*
Mil	16 \pm 1	8 \pm 1*	8 \pm 1*	9 \pm 1*
Pax + Mil	16 \pm 2	8 \pm 2*	8 \pm 2*	9 \pm 3*
Pax	15 \pm 2	9 \pm 2*	9 \pm 2*	9 \pm 2*

min = Minuten; mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; ml = Milliliter.

* p < 0,05 vs. *baseline*.

3.3.3 Tiergewicht, Herzgewicht und ischämische Kontraktur

Zusätzlich zur Hämodynamik wurden auch die Parameter Körpergewicht der Versuchstiere, Herztrocken- und -nassgewicht sowie die Zeitpunkte und Höhe der

Kontraktur von den Myokardzellen in der Ischämie betrachtet. Diese Parameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Tiergewichte, Herztrocken- und -nassgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur der Paxillin-Studie

Dargestellt sind das Körpergewicht, das Herznassgewicht nach Versuchsende sowie das Herztrockengewicht nach Trocknung für sieben Tage. Ferner sind Zeitpunkt und Höhe der Kontraktur des linken Ventrikels während der 33-minütigen Ischämiephase angegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellem ANOVA. Alle Werte sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung).

	n	Körpergewicht [g]	Herztrockengewicht [g]	Herznassgewicht [g]	Zeitpunkt der max. ischämischen Kontraktur [min]	Höhe der max. ischämischen Kontraktur [mmHg]
Con	8	288 \pm 28	0,17 \pm 0,02	1,61 \pm 0,14	13 \pm 1	63 \pm 7
Mil	9	285 \pm 23	0,17 \pm 0,02	1,55 \pm 0,20	13 \pm 2	68 \pm 11
Pax + Mil	8	282 \pm 18	0,15 \pm 0,01	1,60 \pm 0,21	13 \pm 1	64 \pm 11
Pax	8	290 \pm 15	0,17 \pm 0,02	1,68 \pm 0,17	14 \pm 1	62 \pm 9

Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxillin.

n = Anzahl; g = Gramm, min = Minuten; mmHg = Millimeter Quecksilbersäule.

4 Diskussion

Diese Arbeit setzt sich mit der Fragestellung auseinander, ob durch pharmakologische PostC eine Infarktgrößenreduzierung am Myokard erreicht werden kann und ob diese PostC über die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird. Zunächst wurde eine Versuchsserie durchgeführt, um den protektiven Effekt von ischämischer Prä- und Postkonditionierung zu bestätigen. Für die pharmakologische PostC wurde in dieser Arbeit Milrinon verwendet. Milrinon gehört zu der Gruppe der Inodilatoren. Es wirkt positiv inotrop und vasodilatatorisch über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts. Die Milrinon-induzierte PostC erfolgte nach 33-minütiger globaler Ischämie. Die Hauptversuche waren unterteilt in eine Dosisfindungsstudie und eine anschließende Studie mit Paxillin (Paxillin-Studie). In der Dosisfindungsstudie wurden sechs verschiedene Konzentrationen Milrinon getestet. Die dort ermittelte kleinste noch protektive Dosis Milrinon wurde dann weiter in der Paxillin-Studie verwendet. Die Paxillin-Studie untersuchte die mechanistischen Zusammenhänge zwischen der

Milrinon-induzierten PostC und den mBK_{Ca} -Kanälen. Dafür wurde die Eigenschaft von Paxillin genutzt, mBK_{Ca} -Kanäle zu inhibieren.

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass ischämische Prä- und Postkonditionierung das Herz effektiv vor einem IR-Schaden schützen. Die Dosis Milrinon, die in der Dosisfindungsstudie ermittelt wurde, war auch in der Paxillin-Studie protektiv. Zudem konnte in der Paxillin-Studie gezeigt werden, dass Milrinon-induzierte PostC über die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird.

4.1 Diskussion – Material und Methodik

4.1.1 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung

Einer der am häufigsten verwendeten Bikarbonat-Puffer für die retrograde Perfusion eines isolierten Herzens im Langendorff-Modell ist eine modifizierte Lösung nach Krebs und Henseleit aus dem Jahre 1932 (100). Die Zusammensetzung dieser Lösung soll die Bestandteile von Blutplasma imitieren. Die in der Literatur meistgenutzte Lösung hat folgende Zusammensetzung in mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 $MgSO_4$, 1,2 KH_2PO_4 , 4,25 $NaHCO_3$, 2,25 $CaCl_2$ und 11 Glucose (102). Auch in dieser Arbeit wurde diese Lösung in genannter Zusammensetzung als Basis gewählt. Während eines Experiments wurde die Lösung kontinuierlich mit Carbogen (5 % CO_2 , 95 % O_2) begast. Dadurch wurde das Sauerstoffangebot für das Herz aufrechterhalten und gleichzeitig das nötige CO_2 geliefert, um eine pH-Stabilität zu gewährleisten. Dennoch sind die Ionen- und Substratkonzentrationen in dieser Lösung nicht physiologisch (insbesondere der Kalium- und Calciumgehalt) (97). Dies liegt daran, dass die Lösung keine Proteine oder andere Moleküle enthält, die normalerweise im Blutplasma enthalten sind und potenziell Ionen binden (97). Die Energiequelle dieser Lösung für das Herz ist Glukose. Normalerweise präferiert das normoxische Herz freie Fettsäuren (103). Das Herz ist jedoch imstande jedes metabolische Substrat erfolgreich als Energiequelle zu nutzen (102, 104, 105). Der Zusatz von freien Fettsäuren oder Pyruvat ist möglich, kann jedoch während der Oxygenierung der Lösung zu signifikanter Schaumbildung führen (105). Dies ist einer der Gründe, weshalb diese Substrate dem hier verwendeten Puffer nicht zugeführt wurden. Ein weiterer Punkt, der bezüglich der Glukose betrachtet werden muss, ist die relativ hohe Konzentration dieses Substrats in der Lösung. Die genutzte Konzentration von 11 mM ist fast doppelt so hoch wie physiologisch in einer männlichen Wistar-Ratte (6–7 mmol/l, 125 mg/dl) (105, 106). Eine

Glukosekonzentration von 11 mM könnte daher schon als diabetisch gelten. Es wurde dennoch diese unphysiologische Menge an Glukose verwendet, da keine zusätzlichen Energiesubstrate genutzt wurden und die Glukose somit die einzige Energiequelle für die Myokardzellen darstellte (105).

Das Fehlen von Proteinen, Hämoglobin und hormonellen sowie zellulären Bestandteilen in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung führt zu gewissen Limitationen. Die Flusseigenschaften dieser Lösung sind gegenüber Blut verändert und führen zu einem artifiziell hohen Koronarfluss. Dies löst Scherstress entlang des Endothels der Koronararterien aus (97). Des Weiteren ist die Sauerstofflöslichkeit im Vergleich zu Blut vermindert und die Dissoziation des Sauerstoffs im kardialen Gewebe niedriger (105).

Durch das Fehlen der genannten Komponenten besteht ein geringerer onkotischer Druck (104, 105). Infolgedessen können Ödeme im Gewebe des isoliert perfundierten Herzens entstehen. Dies gilt insbesondere für Untersuchungen mittels Ischämie-Reperusionsprotokoll (105, 107, 108). In dieser Arbeit wurde der Wassergehalt des Myokardgewebes nach Ende eines Experiments indirekt über die Messung des Herznassgewichts bestimmt. Bezüglich des Nassgewichts zeigten sich weder zwischen den Gruppen der Dosisfindungsstudie noch zwischen den Gruppen der Paxillin-Studie Unterschiede. Ob Ödeme im Myokardgewebe entstanden sind, lässt sich dadurch jedoch nicht abschließend klären. Das Herzgewicht wurde nicht direkt nach Exzision aus dem Versuchstier bestimmt, um die Zeit, in der das Herz nicht perfundiert wurde, so kurz wie möglich zu halten. Somit standen keine Ausgangswerte des Herzgewichts zur Verfügung, um einen Vergleich mit dem Herzgewicht nach Versuchsende anzustreben. Der primäre Endpunkt in den Versuchsreihen dieser Arbeit war die Infarktgrößenreduzierung. Die Entstehung von Ödemen stand nicht im Fokus.

Die sich normalerweise im Blut befindlichen Antioxidantien und Glukosteroide fehlen in der Krebs-Henseleit-Lösung und stehen dem Herzen damit nicht zur Verfügung. Dadurch wird das Herz gegenüber umgebenden Immunstimuli angreifbar (97). Hierzu zählen zum Beispiel bakterielle Verunreinigungen (109). Verunreinigungen wurde durch tägliches Ansetzen einer frischen Lösung und tägliche Reinigung der Anlage entgegengetreten. Des Weiteren wurde die Langendorff-Anlage regelmäßig zusätzlich gründlich mit HCl (37 %) gereinigt, um eventuelle Rückstände und Verschmutzungen zu beseitigen.

Einige der oben genannten Probleme, beispielsweise die kardiale Ödementstehung durch den niedrigen onkotischen Druck der Krebs-Henseleit-Lösung, könnten durch die Verwendung von Blut oder erythrozytenhaltigen Lösungen zur Perfusion des isolierten Herzens potenziell verhindert werden. Die Vorbereitung dieser Lösungen ist aber weitaus zeitaufwendiger und schwieriger. Ein weiterer Nachteil ist, dass das Blut im Gegensatz zu der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung durch die Langendorff-Anlage rezirkuliert. So kann es nicht nur zu Verunreinigungen der Lösung kommen, sondern es kommt auch zu einer progressiven, unvermeidbaren Hämolyse der Erythrozyten (110, 111). Daher wird in den meisten Studien, wie auch in dieser Arbeit, die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung für *ex vivo*-Untersuchungen bevorzugt (105).

4.1.2 Isoliertes Herz im Langendorff-Modell

Die isolierte Organperfusion nach Oscar Langendorff weist eine lange Entwicklungsgeschichte auf, die bereits im späten 19. Jahrhundert beginnt. Bis heute ist das Langendorff-Modell die Methode der Wahl, um die myokardiale Physiologie und zelluläre Signalwege zu untersuchen.

Diese etablierte Methode ist kostengünstig und liefert äußerst reproduzierbare Ergebnisse. Trotz der Tatsache, dass das Herz vom Körper isoliert ist, liefert die Methode dennoch eine annähernd physiologische Situation. In der richtigen Umgebung schlägt das Herz auch außerhalb des Körpers spontan weiter. Diese Umgebung lässt sich durch eine oxygenierte Perfusionslösung schaffen, die auf eine angemessene Temperatur von 37 °C erwärmt wird.

In der isolierten Perfusion nach Langendorff ist das Herz frei von den Einflüssen anderer Organe, der systemischen Zirkulation und von den Signalen des zentralen sowie autonomen Nervensystems. Dies lässt sich als ein Vorteil werten, da bei Untersuchungen einer Wirkung bestimmter Substanzen periphere Einflüsse auf die Herzaktion ausgeschlossen werden können und damit der direkte Einfluss auf die verschiedenen Herzparameter zu erkennen ist. Zudem bestehen am isolierten Herzen keine Einflüsse durch Medikamente wie Sedativa im Vergleich zum *in vivo*-Modell. Sedativa verteilen sich im Gewebe und werden dort gespeichert, wodurch sie nachhaltig auf das Herz wirken können. Bei der Gabe von Studiensubstanzen kann deren Konzentration genauestens bestimmt werden und reaktive Herzaktionen können beobachtet werden. Daneben eignet sich die Präparation nach Langendorff insbesondere auch für Studien, die die Induktion von Ischämie und Arrhythmien oder auch

verschiedene Grade der Anoxie und Hypoxie notwendig machen. Diese pathologischen Zustände lassen sich am isolierten Herzen unkompliziert induzieren und würden normalerweise eine Bedrohung für das Leben eines Versuchstieres in einem *in vivo*-Versuch bedeuten (97).

Dennoch weist diese Methode auch Nachteile auf. Die Explantation und Instrumentierung des Herzens erfordert ein gewisses Maß an Können, da das Herz empfindlich auf Kontusionen reagiert. Es besteht die Gefahr, das Herz während der Explantation und Instrumentierung unbeabsichtigt zu präkonditionieren oder zu schädigen. Die Zeit von der Explantation bis zur Perfusion an der Langendorff-Anlage sollte deshalb so kurz wie möglich sein. Bei einem Rattenherz sollte diese Zeit bis zur Perfusion des Herzens nicht länger als drei Minuten betragen (112). Die Kanülierung der Aorta sollte besonders achtsam erfolgen. Wird die Kanüle zu tief eingeführt, kann die Aortenklappe beschädigt werden (97, 105).

Die Isolation des Herzens vom Körper macht es schwieriger, über die Ergebnisse der Studie, direkte Rückschlüsse für die Klinik zu ziehen. Die isolierte Präparation limitiert die Lebensdauer des Herzens. Sutherland et al. beschreiben einen Rückgang der Kontraktilität und der chronotropen Funktionen um 5–10 % pro Stunde (102). Aus diesem Grund wird ein isoliertes Herz in der Langendorff-Anlage trotz Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht unbeschränkt lange weiterschlagen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *baseline*-Phase von 20 Minuten und eine Reperfusionphase von 60 Minuten gewählt. Dies ergibt eine isolierte Perfusion eines Herzens von insgesamt 80 Minuten. Ausgehend von einem durchschnittlichen Kontraktilitätsverlust und Abnahme der Chronotropie von etwa 8 % pro Stunde würde dies in der vorliegenden Arbeit einen Verlust von ca. 10–11 % bedeuten. Das schlägt sich in einigen ausgewerteten hämodynamischen Parametern nieder. Nach 60 Minuten Reperfusion in der Paxillin-Studie waren die linksventrikulären systolischen Drücke und die Herzfrequenz der Herzen aller Gruppen signifikant geringer gegenüber der *baseline*. Durch dieses Ergebnis ist jedoch ein Einfluss auf den Endpunkt Infarktgröße als unwahrscheinlich zu betrachten.

Der genaue Einfluss auf die Hämodynamik durch die isolierte Perfusion lässt sich in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend beurteilen, da die Herzen durch die global induzierte Ischämie für 33 Minuten ausgeprägte Myokardschäden erfuhren, die ebenfalls die Kontraktilität und Chronotropie mindern. Durch den Verlust von vitalen Myokardzellen sind insgesamt weniger Zellen an der Schlagkraft des Herzens beteiligt.

Eine globale Ischämie kann auch zu einem Infarkt im Bereich des Sinusknotens führen. Der Sinusknoten bildet das primäre Schrittmacherzentrum des Herzens und steuert die Kontraktionsfrequenz. Ein Untergang von Sinusknotenzellen führt zu einer niedrigeren Herzfrequenz. In der Dosisfindungsstudie konnte jedoch nicht das exakt gleiche Verhalten von Herzfrequenz und linksventrikulärem systolischen Druck beobachtet werden. Zwar war auch in dieser Studie der linksventrikuläre systolische Druck in der Reperfusion signifikant geringer gegenüber der *baseline*, die Herzfrequenz stabilisierte sich jedoch so weit, dass zwar deutliche Unterschiede gegenüber der *baseline* bestanden, diese jedoch nicht das angesetzte Signifikanzniveau erfüllten.

Im Langendorff-Modell gibt es zwei mögliche retrograde Perfusionsweisen, die druck- oder die flusskonstante Perfusion. In dieser Arbeit wurde die druckkonstante Perfusion gewählt. Aus einem physiologischen Standpunkt betrachtet, würde bei flusskonstanter Perfusion die Autoregulation der Koronarien außer Kraft gesetzt werden. Das bedeutet, dass die zum Herzen transportierte Perfusatsmenge nicht entsprechend an kardiale Veränderungen angepasst werden kann. Die Koronarperfusion wird physiologisch über den Tonus der glatten Muskelzellen in den Koronargefäßen geregelt, der sich bei flusskonstanter Perfusion nicht reaktiv schwankender Herzfrequenz oder Kontraktilität anpasst. Ebenso wenig kann eine Anpassung in einer Ischämiephase erfolgen. Demnach sollte der druckkonstanten Perfusion bei Studien mit Ischämiephasen der Vorzug gewährt werden (102).

Der systolische Druck eines Rattenherzens *in situ* schwankt zwischen 70 und 90 mmHg. Der in dieser Arbeit gewählte Perfusionsdruck liegt bei 80 mmHg (MAD) und somit genau im physiologischen Bereich. Ein Perfusionsdruck von 80 mmHg in der Langendorff-Anlage ist in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen etabliert und wurde in vorangegangenen Studien verwendet (93, 113–119). In der Literatur lassen sich teilweise Empfehlungen für ein niedrigeres Drucklevel für *ex vivo*-Studien finden. Ein Druck zwischen 70 und 90 mmHg wird als zu hoch erachtet. Ein Druck zwischen 60 und 70 mmHg wird dagegen vorgeschlagen. Dieser Vorschlag rührt daher, dass die genutzte Krebs-Henseleit-Lösung im Langendorff-Modell einen geringeren Flusswiderstand als Blut aufweist und die Gefahr der interstitiellen Ödembildung des isoliert perfundierten Organs besteht. Darüber hinaus können Drucklevel über 70 mmHg dazu führen, dass die Aortenklappe beschädigt wird und das Perfusat nicht durch das gesamte Koronarbett zirkuliert (Übersicht in 97). Es ist daher möglich, dass der gewählte Perfusionsdruck von 80 mmHg in dieser Arbeit zu Schäden der

Aortenklappen geführt haben könnte und das Herz durch die Perfusion größeren Schaden genommen hat, als es der Fall gewesen wäre mit einem niedrigeren Perfusionsdruck. Die Voraussetzungen und das damit verbundene Risiko für potenziell entstandene Klappenschäden war in diesem Fall jedoch für alle Herzen der durchgeführten Versuche gleich, sodass dies keine Bedeutung für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit hat.

4.2 Diskussion – Ergebnisse

4.2.1 Kardioprotektiver Effekt von ischämischer Prä- und Postkonditionierung

In der Literatur werden erfolgreiche *in vitro/ex vivo*-IPC- und iPostC-Protokolle beschrieben. Daher wurde vor Beginn der zwei Hauptversuchsreihen dieser Arbeit, der „Milrinon-Dosisfindungsstudie“ und der „Paxillin-Studie“, eine Vorversuchsreihe durchgeführt. Es wurden ein bestimmtes IPC- sowie iPostC-Protokoll dieser klassischen Konditionierungsvarianten auf ihre kardioprotektiven Eigenschaften untersucht. Die Reduzierung der Infarktgröße wurde als primärer Endpunkt festgelegt. Die Ergebnisse dieser Reihe konnten zeigen, dass IPC sowie iPostC im Vergleich zur Kontrolle die Infarktgröße signifikant verringern. IPC verringerte die Infarktgröße zwar stärker als iPostC, jedoch war dieser Unterschied in der Reduktion der Infarktgröße nicht signifikant. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass beide Varianten gleichwertig protektiv sind und der Konditionierungsstimulus durch IPC der iPostC nicht überlegen ist.

Die Ergebnisse des hier verwendeten iPostC-Protokolls (sechs Zyklen Ischämie und Reperfusion à 10 Sekunden nach 33-minütiger Globalischämie und vor 60-minütiger Reperfusionsphase) sind konform mit anderen Studien. Tsang et al. führten ebenfalls eine iPostC in einem *in vitro*-Rattenmodell durch und konnten einen kardioprotektiven Effekt nachweisen (48). In der Studie folgten einer 35-minütigen regionalen Indexischämie ebenfalls sechs Zyklen à 10 Sekunden Reperfusion und Ischämie mit einer anschließenden 120-minütigen Reperfusionsphase. Das in dieser Arbeit durchgeführte IPC-Protokoll führte, wie auch das IPC-Protokoll aus der Studie von Tsang et al., zwar zu einer vergleichsweise stärkeren Infarktgrößenreduzierung als die iPostC-Protokolle. Der Unterschied ist in beiden Arbeiten jedoch nicht signifikant. Eine Studie von Halkos et al. (*in vivo*-Hundemodell, Ligatur des *Ramus interventricularis*

anterior für 60 min, 3 h Reperfusion) kam zu einem sehr ähnlichen Schluss. Auch sie konnten zeigen, dass IPC und iPostC die Infarktgröße in einem ähnlichen Ausmaß verringern (120). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, ob die Kombination aus IPC und iPostC den kardioprotektiven Effekt noch verstärkt. Tsang et al. sowie auch Halkos et al. konnten in ihren Arbeiten jedoch keinen additiven Effekt der beiden Interventionen zeigen (48, 120). Die Arbeitsgruppe um Yang et al. (*in vivo*-Kaninchenmodell, 45 min Okklusion, 3 h Reperfusion) hingegen stellte einen additiven Effekt von IPC und iPostC fest (121).

Eine weitere Studie am isolierten Rattenherzen im Langendorff-Modell von der Arbeitsgruppe Zhu et al. konnte auch zeigen, dass iPostC zu einer Infarktgrößenreduzierung führt (122). Auch sie nutzten ein iPostC-Protokoll von sechs Zyklen à 10 Sekunden von Ischämie und Reperfusion nach einer 40-minütigen Indexischämie und vor einer 90-minütigen Reperfusionsphase.

4.2.2 Dosisabhängiger kardioprotektiver Effekt von Milrinon

In der Milrinon-Dosisfindungsstudie wurden verschiedene Konzentrationen Milrinon auf ihre kardioprotektive Eigenschaft am isolierten Rattenherzen untersucht. Als kardioprotektiv wurde in dieser Arbeit die Reduktion der Infarktgröße nach einer Ischämie-Reperfusionsphase gewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Milrinon mit Einsetzen der Reperfusion das Herz effektiv vor einem IR-Schaden schützt. Dieser kardioprotektive Effekt ist vergleichbar mit dem Effekt, den die iPostC auf das Herz hat (siehe auch Abschnitt Ergebnisse 3.1 „Infarktgrößen der Vorversuche zu ischämischer Prä- und Postkonditionierung“ und 3.2 „Ergebnisse der Milrinon-Dosisfindungsstudie“).

Ab einer Konzentration von 3 μ M Milrinon wurde die myokardiale Infarktgröße signifikant reduziert. Höhere Konzentrationen Milrinon (10, 30 und 100 μ M) verringerten die Infarktgröße ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die Reduktion der Infarktgröße in diesen Gruppen war jedoch nicht größer als in der Gruppe, die 3 μ M Milrinon erhielt. Die Infarktgrößenreduzierung war dosisabhängig. Eine Konzentration von 0,3 und 1 μ M Milrinon reduzierte die Infarktgröße nicht. Studien, die diese Dosisabhängigkeit der Milrinon-induzierten PostC am isolierten Rattenherzen aufzeigen, fehlten bisher.

Milrinon wird bei Formen der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt, jedoch nur zur Kurzzeitbehandlung (bis zu 48 h). Die Langzeitbehandlung einer chronischen

Herzinsuffizienz mit Milrinon kann zu verschiedenen unerwünschten Wirkungen führen. Unter anderem erhöht es die Mortalität, löst kardiale Arrhythmien sowie Hypotonien aus und kann zu einer Thrombozytopenie führen (71, 123). Der Einsatz von Milrinon bei akuter Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt wird aufgrund des Nebenwirkungsprofil (kardiale Arrhythmien) aktuell nicht empfohlen (123). Milrinon wirkt positiv inotrop und vasodilatatorisch (71, 124), aber auch positiv chronotrop (71). In dieser Arbeit wurde die kleinste noch protektive Dosis Milrinon ermittelt. In Anbetracht der Nebenwirkungen, die bei einer Milrinontherapie in Langzeitbehandlung auftreten, ist die Kenntnis dieser Dosis nützlich, um potenziell negativen Effekten vorzubeugen und die Toxizität für das Myokard so gering wie möglich zu halten.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Substanzen beschrieben, die zur pharmakologischen PostC des Herzens verwendet werden und kardioprotektiv wirken (siehe Abschnitt 1.3 „Pharmakologische Postkonditionierung“). Auch der Einsatz von Milrinon und anderen Phosphodiesterase-III-Inhibitoren ist beschrieben. Hein et al. waren die ersten, die eine Infarktgrößenreduzierung mithilfe von einer perischämischen Gabe von Milrinon in einem *in vivo*-Schweinmodell (90-minütige Ligatur der rechten Koronararterie, 120 min Reperfusion) nachwies (125). Durch den Verschluss der rechten Koronararterie in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hein et al. wurde der rechte Ventrikel zur *AAR*. Grundsätzlich besitzt der rechte Ventrikel deutlich weniger Muskelmasse als der linke Ventrikel und die meisten ischämischen Ereignisse ereignen sich im Stromgebiet der linken Koronararterie. Dadurch haben ischämische Ereignisse des linken Ventrikels nicht nur einen größeren Einfluss auf die Hämodynamik (durch Infarzierung von Muskelmasse), sie sind auch das vergleichsweise häufigere Ereignis. Aus dem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit trotz global induzierter Ischämie nur der linke Ventrikel als *AAR* deklariert und betrachtet. Huang et al. veröffentlichten 2011 eine Studie, wo der Effekt von Milrinon und Esmolol (β_1 -Blocker) sowie die kombinierte Gabe beider Pharmaka in einem *in vivo*-Rattenmodell (30 min Ischämie, 4 h Reperfusion) untersucht wurde. Die Gabe der jeweiligen Substanz erfolgte über zehn Minuten in den letzten fünf Minuten der Ischämie, übergehend in die ersten fünf Minuten der Reperfusion. Demnach wurde in der Arbeit von Huang et al. eine Art Mischform aus per-/und postischämischen pharmakologischen Konditionierungen untersucht. Esmolol und Milrinon reduzierten beide die linksventrikuläre Infarktgröße. Esmolol reduzierte die Infarktgröße um 13 % im Vergleich zur Kontrolle und Milrinon sogar um 45 %. Die kombinierte Gabe von Esmolol und Milrinon reduzierte die

Infarktgröße um 65 % und war somit additiv (77). In der vorliegenden Arbeit reduzierte Milrinon-induzierte PostC die Infarktgröße um rund 40 %. Dies entspricht den Ergebnissen von Huang et al.

Fukasawa et al. konnten in ihrer Studie am isolierten Kaninchenherzen zeigen, dass eine präischämische Gabe von Cilostazol (Phosphodiesterase-III-Inhibitor) über zehn Minuten eine Infarktgrößenreduzierung durch die direkte Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen erreicht (83). In derselben Studie wurde auch Milrinon (10 μ M) untersucht, das im Gegensatz zu Cilostazol (10 μ M) keine Infarktgrößenreduzierung erreichte. Sie begründeten dies mit den Erkenntnissen der Studie von Shakur et al. (126), dass Milrinon in Kaninchen-Myozyten nicht nur die Phosphodiesterase-III, sondern auch die Phosphodiesterase-IV inhibiert. Dadurch würde der intrazelluläre cAMP- und Calciumgehalt stärker ansteigen als durch Cilostazol. Folglich ist ein optimaler cAMP- und Calciumgehalt wichtig, um Kardioprotektion zu vermitteln (83). Dieser Zusammenhang wurde in der Einleitung dieser Arbeit auch dargestellt (siehe Abschnitt 1.5 „Mitochondriale calciumsensitive Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit“). Fukasawa et al. führten im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit eine pharmakologische Präkonditionierung mit Cilostazol und Milrinon an isolierten Kaninchenherzen im Langendorff-Modell durch und entschieden sich in ihrem Modell für eine flusskonstante Perfusion. Somit wurden die Versuche Fukasawas et al. nicht nur an einer anderen Spezies durchgeführt, was eine Erklärung für ihr Ergebnis sein könnte, sondern sie wählten auch eine Perfusion, die die physiologische Autoregulation der Koronarien außer Kraft setzte. Die Wahl der Konzentration von 10 μ M und die Infusion über zehn Minuten sind keine Erklärung für das negative Ergebnis, da in der vorliegenden Arbeit mit der gleichen Konzentration und Infusionszeit ein deutlicher kardioprotektiver Effekt gezeigt werden konnte.

Lobato et al. führten eine klinische Studie an Patienten durch, die eine kardiale Revaskularisierungstherapie mit einem *Arteria thoracica interna-Graft* erhielten. Die Patienten bekamen entweder Milrinon über zehn Minuten (50 μ g/kg bzw. 5 μ g/kg/min) oder eine Epinephrin-Infusion (0,03 μ g/kg/min) kurz nach der Trennung von der Herz-Lungen-Maschine. Die Milrinon-Gruppe zeigte eine bessere kardiale Kontraktilität sowie einen besseren Blutfluss durch den *Arteria thoracica interna-Graft* trotz des geringeren arteriellen Drucks im Vergleich zur Epinephrin-Gruppe. Das bedeutet, dass Milrinon den Widerstand im *Graft* senkte trotz eines niedrigen Systemdrucks, was zu einer verbesserten Organperfusion führte (127). Die Studie von Lobato et al. wies keine

Kontrollgruppe auf, sodass unklar bleibt, wie die hämodynamischen Verhältnisse in einer Gruppe ohne die Gabe von Milrinon oder Epinephrin gewesen wären.

Die Arbeitsgruppe um Hamada et al. führte eine ähnliche Studie wie Lobato et al. durch. Auch sie konnten zeigen, dass eine einmalige Milrinon-Bolusinjektion (50 µg/kg) nach der Trennung des Patienten von der Herz-Lungen-Maschine zu einem verbesserten kardialen Index führt (128).

In den Studien von Lobato et al. und Hamada et al. erfolgte die Milrinon-Gabe zu einem Zeitpunkt, der der Phase der kardialen Reperfusion entspricht und somit als pharmakologische PostC gewertet werden kann. Dies unterstützt die positiven Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

In der Auswertung der Hämodynamik der Dosisfindungsstudie sind die Parameter Herzfrequenz [min^{-1}], linksventrikulärer enddiastolischer Druck [mmHg], linksventrikulärer endsystolischer Druck [mmHg], *RPP* und Koronarfluss [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$] betrachtet worden. Sie wurden zu einem bestimmten Zeitpunkt in der *baseline* (16. Minute) sowie zu drei definierten Zeitpunkten in der Reperfusion (nach 30, 45 und 60 Minuten) bestimmt und analysiert.

In der *baseline* zeigten diese Parameter weder einen signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen noch gegenüber der Kontrolle (Con). Signifikante Unterschiede zeigten sich erst in der Reperusionsphase. Nach 30 Minuten Reperfusion war die Herzfrequenz in den Gruppen Con, Mil 1, Mil 3, Mil 30 und Mil 100 signifikant geringer gegenüber der *baseline*. Nach 45 Minuten Reperfusion zeigten sich signifikante Unterschiede in der Herzfrequenz weiterhin in den Gruppen Mil 1 und Mil 30. Zum Ende eines Experiments (nach 60 Minuten Reperfusion) gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Herzfrequenz mehr in den Gruppen. Es ist festzustellen, dass die Kontrollgruppe sowie einige Milrinon-Gruppen in der Reperfusion signifikant schwächere Herzfrequenzen zeigten als in der *baseline*. In den restlichen Gruppen war die Herzfrequenz in der Reperfusion zwar niedriger im Vergleich zur *baseline*, jedoch erfüllte dieser Unterschied nicht das angesetzte Signifikanzniveau ($p < 0,05$). Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war nach der Ischämie zu jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen – inklusive der Kontrolle – signifikant höher im Vergleich zur *baseline*. Dies ist auf das entstandene Infarktareal im Ventrikel zurückzuführen. Auch in den Gruppen mit signifikant geringeren

Infarktarealen (Mil 3, Mil 10, Mil 30 und Mil 100) war der linksventrikuläre enddiastolische Druck signifikant höher gegenüber der *baseline*.

Der linksventrikuläre endsystolische Druck war nach der Ischämie zu allen drei Messzeitpunkten in allen Gruppen signifikant niedriger im Vergleich zur *baseline*.

Es wäre anzunehmen gewesen, dass der linksventrikuläre enddiastolische Druck in den Gruppen mit deutlich niedrigeren Infarktarealen nicht ganz so hohe Werte annehmen würde aufgrund der größeren Anzahl an intakten Kardiomyozyten. Das Gleiche gilt für die Entwicklung des linksventrikulären endsystolischen Drucks. Auch hier zeigte sich wider Erwarten in den Gruppen mit signifikant geringeren Infarktarealen ein signifikant höherer Druck gegenüber der *baseline* in ähnlicher Größenordnung wie in den Gruppen mit großem Infarktareal. Somit ist bei Betrachtung der postischämischen Hämodynamik der Herzen kein Rückschluss auf das entstandene Infarktareal möglich.

In dieser Arbeit wurde auch das *RPP* (*Rate Pressure Product*) betrachtet. Beim *RPP* (= HF x systolischer Druck [mmHg]) handelt es sich um einen Wert, der die myokardiale Arbeitslast beschreibt. Durch das *RPP* kann eine Aussage darüber getroffen werden, wieviel Stress das Myokard ausgesetzt ist, bemessen an den Schlägen pro Minute (HF) und dem arteriellen Druck, gegen den es anpumpen muss. Über das *RPP* lässt sich weiter auch auf den zu erwartenden Sauerstoffverbrauch des Herzens rückschließen (129). Nach der Ischämie nahm das *RPP* in allen Gruppen zu allen Messzeitpunkten signifikant ab. Als Produkt aus Herzfrequenz und systolischem Druck, die auch jeweils nach der Ischämie abnahmen, handelt es sich um ein zu erwartendes Ergebnis. Dementsprechend hatten die Herzen auch eine geringere Arbeitslast und einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch, jedoch durch Infarzierung auch weniger vitale Zellen, die sich am Pumpvorgang beteiligten. Der Koronarfluss war nach der Ischämiephase in allen Gruppen – inklusive der Kontrolle – zu jedem Messzeitpunkt signifikant geringer im Vergleich zur *baseline*. Der Infarkt führt zu einer reduzierten Herzleistung, weshalb auch insgesamt weniger Perfusat über die Koronarien durch das Herz gepumpt wurde. Obwohl die Infarktareale in den Gruppen Mil 1, Mil 3, Mil 30 und Mil 100 signifikant geringer waren als in der Kontrollgruppe, wurde der Koronarfluss dadurch nicht verbessert.

PostC mit Milrinon führte dementsprechend nicht zu einer Verbesserung der Hämodynamik oder des Koronarflusses in der Reperfusion. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Studien der Arbeitsgruppe selbst (114) und auch denen anderer Arbeitsgruppen, die verschiedene Präkonditionierungsstrategien mithilfe von

Sildenafil (Phosphodiesterase-V-Inhibitor) untersuchten (130). Es wäre denkbar gewesen, dass die Milrinon-Gabe in der Reperfusion über die vasodilatatorischen Eigenschaften von Milrinon zu einer Verbesserung des koronaren Blutflusses führt. Als eine mögliche Erklärung, dass es nicht zu dieser antizipierten Verbesserung kam, kann myokardiales *stunning* in Betracht gezogen werden. Myokardiales *stunning* beschreibt einen dysfunktionalen Zustand vitalen Myokards in einer Reperfusionsphase nach längerer Ischämie (siehe auch Abschnitt 1.1.2 „Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens“) (10). Weil der Koronarfluss nicht verbessert wurde, lässt sich auch die kardioprotektive Wirkung Milrinons nicht auf den vasodilatatorischen Effekt zurückführen, durch den die Durchblutung des Myokards über die Koronararterien verbessert worden wären. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Milrinon-induzierte PostC über einen anderen Signalweg vermittelt werden muss. Aus der Beobachtung, dass die Milrinon-Applikation weder zu einer Verbesserung noch zu einer Verschlechterung der Hämodynamik und des Koronarflusses im Vergleich zur Kontrolle geführt hat, lässt sich auch die Annahme postulieren, dass bei der Verwendung Milrinons zur Postkonditionierung nicht mit akuten kardialen Nebenwirkungen gerechnet werden muss.

Weitere erhobene Parameter der Dosisfindungsstudie waren das Körpergewicht der Versuchstiere, Herztrocken- und -nassgewicht sowie die Zeitpunkte und Höhe der Kontraktur von den Myokardzellen in der Ischämie. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die diesbezüglichen Ausgangsvoraussetzungen waren demnach für alle Experimente gleich. Die Höhe der Kontraktur von den Myokardzellen stellt einen Indikator des Myokardschadens dar. Da keine Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden, ist festzuhalten, dass alle Herzen mit einer vergleichbaren Myokardschädigung in die Reperfusion eintraten und somit die Interventionsherzen keine bessere Grundvoraussetzung hatten als die Kontrollen.

4.2.3 Blockierung des Milrinon-induzierten kardioprotektiven Effekts in der Paxillin-Studie

Das Ziel der Paxillin-Studie bestand darin, den Zusammenhang zwischen Milrinon-induzierter PostC und den mBK_{Ca} -Kanälen aufzudecken. Für die Versuche dieser Reihe wurde die in der Dosisfindungsstudie ermittelte Milrinondosis von 3 μ M (Mil) verwendet. Erneut reduzierte diese Dosis die Infarktgröße signifikant in vergleichbarer Größenordnung wie in der Dosisfindungsstudie. Die kombinierte Applikation von

Paxillin (Pax) und Milrinon (Mil) zeigte keinen protektiven Effekt am Myokard. Die alleinige Gabe von Paxillin (Pax) hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße, sie lag auf Kontrollniveau.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Milrinon-induzierte PostC über mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird. Der Block mithilfe von Paxillin verhinderte die Milrinon-induzierte Protektion gänzlich. Dies spiegelt sich in der ausgeprägten Infarktgröße in dieser Gruppe (Pax + Mil) wider. Die genutzte Dosierung von $1 \mu M$ ist eine Standarddosis und wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe als auch von anderen häufig verwendet (93, 114, 131). Der Zusammenhang zwischen Milrinon-induzierter PostC und mBK_{Ca} -Kanälen wurde hier erstmalig untersucht.

Milrinon führt über Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA (71). Die PKA wiederum moduliert das Öffnen der mBK_{Ca} -Kanäle. Sato et al. konnten zeigen, dass die PKA alleine zwar nicht ausreicht, die mBK_{Ca} -Kanäle zu öffnen, aber dass die Kanäle durch die PKA vorbereitet werden, sich stärker zu öffnen (81). In mehreren Studien konnte auch gezeigt werden, dass eine aktivierte PKA zu einer Infarktgrößenreduzierung führt (74, 77, 83). Es besteht damit die Möglichkeit, dass die über Milrinon ausgelöste Signalkaskade von einer cAMP-Erhöhung in eine Aktivierung der PKA übergeht und dies in geöffneten mBK_{Ca} -Kanälen resultiert. Für diese Kaskade ist es aber notwendig, dass die mBK_{Ca} -Kanäle geöffnet werden können bzw. nicht blockiert sind, da blockierte Kanäle eine Kardioprotektion verhindern. Somit ist es denkbar, dass Milrinon über den direkten Weg die mBK_{Ca} -Kanäle aktiviert, aber dass diese Kanäle über den cAMP-PKA-Signalweg noch stärker geöffnet werden und der protektive Effekt verstärkt wird. Der PKA- mBK_{Ca} -Signalweg wurde schon von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Heinen et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass über die direkte Ansteuerung dieses Signalweges mittels *NS1619* (selektiver mBK_{Ca} -Kanal-Öffner) nicht nur in jungen Herzen eine Kardioprotektion vermittelt werden kann, sondern auch in alten (84). Mit Milrinon existiert eine Substanz, die nicht nur diesen Signalweg ansteuert, sondern sogar bereits als Medikament in der Kardiochirurgie eingesetzt wird (71).

Fukasawa et al. untersuchten in ihrer Studie ebenfalls den Zusammenhang zwischen Phosphodiesterase-III-Inhibitoren (Cilostazol und Milrinon) und mBK_{Ca} -Kanälen. Sie zeigten, dass durch eine präischämische Gabe von Cilostazol ($10 \mu M$) über zehn Minuten eine Infarktgrößenreduzierung durch die direkte Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen erreicht wird. Dieser Effekt ließ sich im selben Protokoll mit Milrinon ($10 \mu M$)

nicht wiederholen. Dennoch wird in der Studie der Zusammenhang zwischen Phosphodiesterase-III-Inhibitoren und mBK_{Ca} -Kanälen deutlich.

Die mBK_{Ca} -Kanäle gehören zu der großen Gruppe der spannungsgesteuerten calciumsensitiven Kaliumkanäle. Sie bestehen aus einem Tetramer von α -Untereinheiten, die die leitfähige Pore bilden und vom Slo1-Gen (*Kcnma1*) kodiert werden. Gewebsspezifische Hilfsuntereinheiten (β 1-4) modulieren pharmakologische und funktionelle Eigenschaften, wie die Kinetik, Ca^{2+} -Sensitivität oder Toxinblockade (132).

In dieser Studie wurde Paxillin als Inhibitor der mBK_{Ca} -Kanäle verwendet. Paxillin ist ein toxisches, tremorgenes Indolalkaloid des Pilzes *Penicillium paxilli* (133). Es blockiert effektiv mBK_{Ca} -Kanäle (93, 131, 134). Allerdings ist Paxillin auch ein potenter Inhibitor anderer calciumsensitiver Kaliumkanäle und blockiert somit nicht exklusiv mBK_{Ca} -Kanäle (131, 134, 135).

Daher ist bei der Interpretation der Ergebnisse darauf zu achten, dass potenziell auch andere calciumsensitive Kanäle in den Kardiomyozyten blockiert worden sein könnten. Diese Annahme wird unterstützt durch eine Studie von Wojtovich et al. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Isofluran-induzierte Präkonditionierung das Herz vor einem IR-Schaden schützt, dieser Effekt jedoch von Paxillin (1 μ M) im Wildtyp-Mausmodell als auch im *Kcnma1-knockout*-Mausmodell, aufgehoben wurde (136, 137). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass Paxillin für einen kardioprotektiven Effekt wichtige Strukturen blockiert, die nicht im *Kcnma1*-Gen kodiert werden. Die α -Untereinheiten von mBK_{Ca} -Kanälen und calciumsensitiven Kaliumkanälen der Zellmembran sind allerdings Produkte des *Kcnma1*-Gens und damit nicht für die Beobachtung von Wojtovich et al. im *Kcnma1-knockout*-Mausmodell verantwortlich (138).

Es stehen noch andere mBK_{Ca} -Inhibitoren für *in vivo*- als auch *in vitro*-Studien zur Verfügung. Diese wurden in dieser Arbeit nicht auf ihre Wirkung untersucht. Zu nennen sind die Skorpion-Toxine Iberiotoxin und Charybdotoxin. Einige calciumsensitive Kaliumkanäle mit bestimmten β -Untereinheiten, insbesondere der neuronalen β 4- (*knmb4*)-Untereinheit, zeigen eine gewisse Resistenz gegenüber einem Block mithilfe dieser Toxine (139). Paxillin hingegen blockt auch diese Untereinheit (140). Darüber hinaus scheint Paxillin mit hoher Affinität an calciumsensitive Kaliumkanäle zu binden (134). Daher wird in Studien, die calciumsensitive Kaliumkanäle untersuchen, häufig Paxillin verwendet.

Calcium-sensitive Kanäle sind zu einer Vielzahl in vaskulärer, glatter Muskulatur zu finden, haben aber auch funktionelle Rollen in Neuronen, Skelettmuskulatur, Nieren und sekretorischen Zellen (Übersicht in 121, 131, 132). Somit können diese Kanäle den Blutdruck (142), die cerebrovaskuläre Durchblutung (143) als auch den koronaren Blutfluss (144) beeinflussen. Werden die Kanäle in Zellen vaskulärer, glatter Muskulatur durch steigende, intrazelluläre Ca^{2+} -Level aktiviert, resultiert dies in einer Relaxation durch verminderten Ca^{2+} -Einstrom (145). In den genannten Geweben befinden sich die Kanäle bevorzugt in der Zellmembran. Studien haben gezeigt, dass diese Kanäle in den Kardiomyozyten hingegen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (80, 146, 147). Dies unterstützt die Ergebnisse dieser Paxillin-Studie, dass Milrinon-induzierte PostC über mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird. Borchert et al. führten 2013 eine Studie an isolierten Ventrikel-Myokardzellen durch und konnten zeigen, dass eine pharmakologische Öffnung der mBK_{Ca} -Kanäle die Zellen in einer simulierten Reperfusion effektiv vor einem IR-Schaden schützt. Dieser cytoprotektive Effekt wurde durch Paxillin aufgehoben (148). Diese Studie wurde an isolierten Ventrikelzellen durchgeführt, sodass ein zusätzlicher Einfluss von unter anderem vaskulären calciumsensitiven Kaliumkanälen auf den kardioprotektiven Effekt ausgeschlossen werden kann. Diese Aussage gilt aber nur unter der Annahme, dass sich calciumsensitiven Kaliumkanäle in Kardiomyozyten ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran befinden. In einer neueren Studie von Lai et al. wurden jedoch in Myokardzellen des Sinusknotens calcium-sensitive Kaliumkanäle in der Zellmembran gefunden, sodass eine Expression von calciumsensitiven Kaliumkanälen außerhalb des myokardialen Mitochondriums nicht gänzlich auszuschließen ist (149). Auch die Arbeit von Wojtovich et al. aus dem Jahr 2013 unterstützt diese Annahme. In ihrem Modell konnten sie zeigen, dass eine Deletion von mBK_{Ca} -Kanälen in isolierten Kardiomyozyten den kardioprotektiven Effekt von *NS1619* nicht aufhebt. Zuvor zeigten sie, dass *NS1619* seinen kardioprotektiven Effekt im isolierten Herzen über selektives Öffnen von mBK_{Ca} -Kanälen vermittelt. Sie stellten jedoch auch fest, dass am intakten Herzen eine Kardioprotektion mithilfe von *NS1619* nur bei intakten mBK_{Ca} -Kanälen möglich ist und dies die intrinsische kardial-neuronale Funktion erhält. Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, dass die Kardioprotektion im intakten Herzen mechanistisch abhängig von mBK_{Ca} -Kanälen vermittelt werden muss, dieser Mechanismus aber nicht autonom auf die Kardiomyozyten beschränkt ist. Sie zogen dafür mBK_{Ca} -Kanäle in kardialen Neuronen in Betracht (137).

Die Auswertung der Hämodynamik der Paxillin-Studie beinhaltete die gleichen Parameter wie die der Dosisfindungsstudie. Betrachtet wurden abermals die Herzfrequenz, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, linksventrikulärer endsystolischer Druck, *RPP* und der Koronarfluss. Sie wurden zu einem bestimmten Zeitpunkt in der *baseline* (16. Minute) sowie zu drei definierten Zeitpunkten in der Reperfusion (nach 30, 45 und 60 Minuten) bestimmt und analysiert. In der *baseline* zeigte sich weder zwischen den Interventionsgruppen noch gegenüber der Kontrolle ein signifikanter Unterschied bezüglich dieser Parameter. In der Reperfusion hingegen gab es zu fast jedem Messzeitpunkt in allen Gruppen signifikante Unterschiede gegenüber der *baseline* bezüglich der genannten Parameter. Die Herzfrequenz war in allen Gruppen signifikant geringer gegenüber der *baseline*. Die einzige Ausnahme bildete die Paxillin-Gruppe (Pax), wo die Herzfrequenz nach 30 und 45 Minuten nicht signifikant geringer gegenüber der *baseline* war. Nach 60 Minuten war jedoch auch in dieser Gruppe eine signifikant geringere Herzfrequenz zu verzeichnen, sodass zum Versuchsende keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen der Paxillin-Studie bezüglich der Herzfrequenz zu verzeichnen waren. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck aller Gruppen der Paxillin-Studie war in der Reperusionsphase zu allen drei Messzeitpunkten signifikant erhöht. Der linksventrikuläre endsystolische Druck in allen vier Gruppen war in der Reperfusion zu allen Messzeitpunkten signifikant erniedrigt gegenüber der *baseline*. Entsprechend war das *RPP* in allen vier Gruppen zu allen Messzeitpunkten in der Reperfusion signifikant erniedrigt gegenüber der *baseline*. Auch der Koronarfluss war in der Reperfusion zu allen drei Messzeitpunkten und in allen vier Gruppen signifikant erniedrigt gegenüber der *baseline*.

Diese hämodynamischen Parameter (Herzfrequenz, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, linksventrikulärer endsystolischer Druck, *RPP* und Koronarfluss) sind vergleichbar mit denen der Dosisfindungsstudie. Im Umkehrschluss lässt sich so auf einen einheitlichen Versuchsablauf in den beiden Studien rückschließen. Es bestätigt aber auch die Annahme, dass über die Hämodynamik kein Rückschluss auf das Infarktareal zu treffen ist, da sich im Verhalten der Hämodynamik aller Gruppen beider Studien keine entscheidenden Unterschiede zeigten. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass Ischämie und Reperfusion zu reproduzierbaren Effekten am Myokard führen, wenn die zugehörigen hämodynamischen Parameter von der Dosisfindungs- und der Paxillin-Studie betrachtet werden. Ein Einfluss auf die kardiale Leistung durch die Applikation

von Milrinon und Paxillin ist nicht festzustellen. Es war weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der Hämodynamik und des Koronarflusses in den Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Dosisfindungsstudie (siehe auch Abschnitt 4.2.2 „Dosisabhängiger kardioprotektiver Effekt von Milrinon“).

In der Paxillin-Studie wurden ebenfalls das Körpergewicht der Versuchstiere, Herztrocken- und -nassgewicht sowie der Zeitpunkt und die Höhe der Kontraktur von den Myokardzellen in der Ischämie betrachtet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die diesbezüglichen Ausgangsvoraussetzungen waren demnach für alle Experimente gleich und entsprachen denen der Dosisfindungsstudie. Auch in der Dosisfindungsstudie gab es keine Unterschiede zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen bezüglich des Körpergewichts der Versuchstiere, des Herztrocken- und -nassgewichts sowie der Zeitpunkte und Höhe der Kontraktur von den Myokardzellen in der Ischämie. Diese Parameter waren auch im Vergleich zwischen den experimentellen Gruppen der Dosisfindungs- und Paxillin-Studie ähnlicher Größenordnung. Auch dies zeigt die vorhandene Homogenität zwischen den Gruppen der beiden Studien im Hinblick auf diese Parameter und verdeutlicht, dass alle Herzen die gleichen Grundvoraussetzungen hatten.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Milrinon-induzierte PostC das isolierte Herz dosisabhängig vor einem IR-Schaden schützt.

Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Milrinon-induzierte PostC mechanistisch über die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird. Die Gabe des mBK_{Ca} -Kanalinhbibitors Paxillin blockierte in einer zweiten Versuchsreihe die kardioprotektive Wirkung von Milrinon gänzlich. Die Öffnung der mBK_{Ca} -Kanäle wird durch die PKA moduliert (69). Milrinon führt cAMP-abhängig zu einer Hochregulation der PKA (71, 72). Somit teilen sich Milrinon und die mBK_{Ca} -Kanäle einen Signalweg. Es ist möglich, dass Milrinon über eine Hochregulation der PKA einen kardioprotektiven Effekt vermittelt (150). In Abb. 10 ist der postulierte Signalweg dargestellt (150).

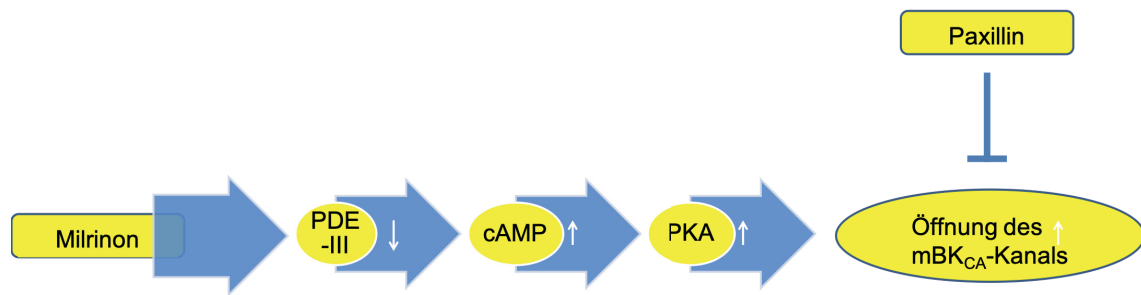


Abb. 10: Signalkaskade der Milrinon-induzierten Kardioprotektion

Schematische Darstellung des postulierten Signalweges der Milrinon-induzierten Kardioprotektion.

Milrinon blockiert die Phosphodiesterase-III (PDE-III). Dies führt über eine Erhöhung des cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) zu einer Hochregulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Die PKA moduliert das Öffnen der mBK_{Ca}-Kanäle. Über geöffnete mBK_{Ca}-Kanäle wird eine Kardioprotektion durch Milrinon-induzierte PostC möglich. Die Inhibition der mBK_{Ca}-Kanäle mithilfe von Paxillin (mBK_{Ca}-Kanalinhibitor) blockiert die Kardioprotektion. Modifiziert nach (150).

mBK_{Ca}-Kanal = mitochondrialer calciumsensitiver Kaliumkanal großer Leitfähigkeit; PostC = Postkonditionierung.

Die mBK_{Ca}-Kanäle konnten als wichtige Struktur in der Signalkaskade der Milrinon-induzierten PostC identifiziert werden. Durch die Identifikation dieser Kanäle ist es möglich, diese pharmakologisch direkt anzusteuern. Zukünftige pharmakologische PostC-Protokolle könnten dieses Wissen für weitere Untersuchungen zur Entschlüsselung der vollständigen Signalkaskade der Kardioprotektion nutzen sowie für die Untersuchung weiterer potenziell kardioprotektiver Substanzen.

Die mBK_{Ca}-Kanäle sind besondere Strukturen in Bezug auf kardioprotektive Verfahren, da diese Kanäle auch am alten Herzen aktivierbar sind und somit eine Kardioprotektion des alten Herzen ermöglichen (69). In der Vergangenheit sind viele klinische Studien daran gescheitert, dass erfolgreiche experimentelle Protokolle am Herzen des gealterten Menschen keine kardioprotektive Wirkung zeigten (64–67). Das Alter *per se* gilt als Risikofaktor für kardiale Ereignisse. Weitere Risikofaktoren sind unter anderem, wie bereits in der Einleitung erläutert, Diabetes oder Fettstoffwechselstörungen. In kommenden Studien könnte die Frage geklärt werden, ob Milrinon-induzierte PostC tatsächlich am alten Herzen greifen kann und damit ein kardioprotektiver Effekt zu verifizieren wäre. Ferner wären auch PostC-Protokolle mittels Milrinon am alten, diabetischen Herzen denkbar. Eine Studie dieser Art könnte für ein großes klinisches

Risikokollektiv aufschlussreiche Ergebnisse liefern. Studien zeigten, dass Hyperglykämie eine Kardioprotektion über pharmakologische Prä- und Postkonditionierung verhindert (Übersicht in 144). Eine Studie von Matsumoto et al. konnte jedoch in einem *in vivo*-Rattenmodell zeigen, dass die postischämische Gabe von Milrinon die Infarktgröße nach regionaler Koronarokklusion über 30 Minuten auch unter hyperglykämischen Bedingungen verringerte (151). Damit lieferten Matsumoto et al. einen weiteren Hinweis dafür, dass Milrinon-induzierte PostC von besonderer klinischer Relevanz sein könnte, um erfolgreich ein experimentelles Protokoll in die Klinik zu übertragen.

Insgesamt weist die vorliegende Arbeit einige Limitationen auf. Alle Untersuchungen wurden an Herzen von jungen, männlichen Versuchstieren vorgenommen. Aus dem Grund sind generelle Rückschlüsse auf andere Populationen schwierig. Die Untersuchungen erfolgten an isolierten Herzen. Der systemische Einfluss ist somit unbekannt. Des Weiteren liefert die Arbeit keine Antwort darauf, was der genaue mechanistische Hintergrund zwischen der Milrinon-induzierten Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle und der dadurch resultierenden Kardioprotektion ist. Die Beantwortung dieser Frage sollte Bestandteil weiterer Studien sein. Bisher konnten Studien zeigen, dass die Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen die ROS-Produktion reduziert und verhindert, dass sich die mPTP öffnet (94, 152, 153). Dies sind Gründe dafür, dass der IR-Schaden am Myokard verringert wird.

Die gezielte pharmakologische PostC könnte klinisch als einfache additive Maßnahme zur klassischen Reperfusionstherapie (PTCA, Lyse) des akuten Myokardinfarkts eingeführt werden. Die erwartete Reduzierung des myokardialen IR-Schadens könnte so die Überlebensrate und Lebensqualität von betroffenen Patienten verbessern.

6 Literaturverzeichnis

1. WHO | The global burden of disease: 2004 update [Internet]. WHO. [zitiert 10. Mai 2017]. Verfügbar unter: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
2. RKI - GBE kompakt 2012 - GBE kompakt 2/2012: Demografische Alterung und Folgen für das Gesundheitssystem [Internet]. [zitiert 11. Mai 2016]. Verfügbar unter: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsK/2012_2_Demografischer_Wandel_Alterung.html?nn=3321752
3. Erdmann E, Herausgeber. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße; mit 239 Tabellen; [Therapie evidenzbasiert]. 6., vollst. überarb. u. aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer; 2006. 913 S.
4. Devlin W, Cragg D, Jacks M, Friedman H, O'Neill W, Grines C. Comparison of outcome in patients with acute myocardial infarction aged >75 years with that in younger patients. *Am J Cardiol.* März 1995;75(8):573–6.
5. Staat & Gesellschaft – Krankenhäuser – Krankenhauspatienten - Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert 10. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/20DiagnosenInsgesamt.html>
6. Staat & Gesellschaft – Todesursachen – Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen – Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert 10. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html>
7. Staat & Gesellschaft – Krankheitskosten – Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert 14. Oktober 2015]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten.html;jsessionid=F54FF4E49711730B311DA83627BAF832.cae4>
8. Amann-Vesti BR. Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag; 2006. 1232 S.
9. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J.* Januar 1989; 117(1): 211–21.
10. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 12. Januar 1982; 66(6): 1146–9.
11. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, u. a. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* August 1999; 277(2 Pt 2): H660–668.
12. Welch TD, Yang EH, Reeder GS, Gersh BJ. Modern Management of Acute Myocardial Infarction. *Curr Probl Cardiol.* Juli 2012; 37(7): 237–310.
13. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Mai 1998; 38(2): 291–300.

14. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* Juli 1960; 70: 68–78.
15. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med.* 13. September 2007; 357(11): 1121–35.
16. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* Januar 2013; 123(1): 92–100.
17. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* April 2003; 35(4): 339–41.
18. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* März 2010; 105(2): 151–4.
19. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol.* Januar 1989; 256(1 Pt 2): H315–319.
20. Perry MA, Wadhwa SS. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol.* März 1988; 254(3 Pt 1): G366–372.
21. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology. *Physiol Rev.* 1. Oktober 2003; 83(4): 1113–51.
22. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res.* 1. August 2008; 79(3): 377–86.
23. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* November 1986; 74(5): 1124–36.
24. Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol.* Oktober 1998; 93(5): 384–90.
25. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* April 1990; 66(4): 1133–42.
26. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation.* Juli 1991; 84(1): 341–9.
27. Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res.* März 1992; 26(3): 226–31.
28. Burns PG, Krukenkamp IB, Caldarone CA, Gaudette GR, Bukhari EA, Levitsky S. Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning? *Circulation.* 1. November 1995; 92(9 Suppl): II447–451.
29. Cao C, Wang S, Fan L, Wan X, Liu X, Chen X. Renal Protection by Ischemic Preconditioning Is Associated with p50/p50 Homodimers. *Am J Nephrol.* 2010; 31(1): 1–8.
30. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* August 2000; 232(2): 155–62.

31. Saeki I, Matsuura T, Hayashida M, Taguchi T. Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning have protective effect against cold ischemia-reperfusion injury of rat small intestine. *Pediatr Surg Int*. August 2011; 27(8): 857–62.
32. Wu C, Zhan RZ, Qi S, Fujihara H, Taga K, Shimoji K. A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice. *J Neurosci Methods*. 30. Mai 2001; 107(1–2): 101–6.
33. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet Lond Engl*. 31. Juli 1993; 342(8866): 276–7.
34. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart Br Card Soc*. April 1997; 77(4): 314–8.
35. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, u. a. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. August 2003; 285(2): H579–588.
36. Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res*. 1. Mai 2006; 70(2): 200–11.
37. Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*. 10. April 2007; 115(14): 1895–903.
38. Luo W, Li B, Lin G, Huang R. Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Mai 2007; 133(5): 1373–4.
39. Luo W, Li B, Chen R, Huang R, Lin G. Effect of ischemic postconditioning in adult valve replacement. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. Februar 2008; 33(2): 203–8.
40. Luo W, Li B, Lin G, Chen R, Huang R. Does cardioplegia leave room for postconditioning in paediatric cardiac surgery? *Cardiol Young*. Juni 2008; 18(3): 282–7.
41. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. Juli 2005; 65(3): 361–7.
42. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L’Huillier I, u. a. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 4. Oktober 2005; 112(14): 2143–8.
43. Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, u. a. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*. 26. Februar 2008; 117(8): 1037–44.
44. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacol Ther*. November 2007; 116(2): 173–91.
45. Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med*. November 1999; 9(8): 245–9.
46. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 15. Februar 2004; 61(3): 448–60.

47. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Februar 2005; 288(2): H971–976.
48. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of „modified reperfusion“ protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 6. August 2004 ;95(3): 230–2.
49. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol*. März 2006; 38(3): 414–9.
50. Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*. Februar 2000; 37(1–2): 1–11.
51. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, u. a. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 20. Dezember 2005; 112(25): 3911–8.
52. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*. Juli 2009; 47(1): 32–40.
53. Skyschally A, Caster P van, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, u. a. Ischemic Postconditioning in Pigs No Causal Role for RISK Activation. *Circ Res*. 1. Februar 2009; 104(1): 15–8.
54. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*. November 2010; 105(6): 771–85.
55. Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J*. Oktober 2006; 27(20): 2400–5.
56. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, u. a. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2. März 2004; 109(8): 962–5.
57. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, u. a. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 27. Oktober 2007; 370(9597): 1483–93.
58. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol*. September 2005; 100(5): 397–403.
59. Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol*. 5. Februar 2003; 41(3): 508–15.

60. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, u. a. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 31. Juli 2008; 359(5): 473–81.
61. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2003; 60(3): 617–25.
62. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 15. August 2002; 55(3): 534–43.
63. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Lange M, Smul TM, Lotz C, u. a. Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med* Maywood NJ. Oktober 2009; 234(10): 1186–91.
64. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, u. a. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*. 11. Mai 2011; 305(18): 1863–72.
65. Lee T-M, Su S-F, Chou T-F, Lee Y-T, Tsai C-H. Loss of Preconditioning by Attenuated Activation of Myocardial ATP-Sensitive Potassium Channels in Elderly Patients Undergoing Coronary Angioplasty. *Circulation*. 22. Januar 2002; 105(3): 334–40.
66. Liu L, Zhu J, Brink PR, Glass PSA, Rebecchi MJ. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiol Scand*. Mai 2011; 55(5): 622–30.
67. Chang DJ, Chang CH, Kim JS, Hong YW, Lee WK, Shim YH. Isoflurane-induced post-conditioning in senescent hearts is attenuated by failure to activate reperfusion injury salvage kinase pathway. *Acta Anaesthesiol Scand*. August 2012; 56(7): 896–903.
68. Abete P, Ferrara N, Cioppa A, Ferrara P, Bianco S, Calabrese C, u. a. Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart. *J Am Coll Cardiol*. Juni 1996; 27(7): 1777–86.
69. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, u. a. Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A. *Exp Gerontol*. Januar 2012; 47(1): 116–21.
70. Behmenburg F, Heinen A, Bruch L vom, Hollmann MW, Huhn R. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth* [Internet]. [zitiert 19. April 2017]; Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053077016302403>
71. Aktories K, Forth W, Allgaier C, Herausgeber. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10., überarb. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. 1224 S.
72. Evans DB. Overview of cardiovascular physiologic and pharmacologic aspects of selective phosphodiesterase peak III inhibitors. *Am J Cardiol*. 3. Januar 1989; 63(2): 9A–11A.

73. Use T, Makita T, Ureshino H, Cho S, Yoshitomi O, Akiyama D, u. a. Milrinone administered before ischemia or just after reperfusion, attenuates myocardial stunning in anesthetized swine. *Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother*. Oktober 2006; 20(5): 327–34.
74. Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, Node K, Takashima S, u. a. Cardioprotective Effect Afforded by Transient Exposure to Phosphodiesterase III Inhibitors. *Circulation*. 7. August 2001; 104(6): 705–10.
75. Nomura Y, Horimoto H, Mieno S, Nakahara K, Okawa H, Yoshida M, u. a. Repetitive preischemic infusion of phosphodiesterase III inhibitor olprinone elicits cardioprotective effects in the failing heart after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. Juni 2003; 248(1–2): 179–84.
76. Saltman AE, Gaudette GR, Levitsky S, Krukenkamp IB. Amrinone preconditioning in the isolated perfused rabbit heart. *Ann Thorac Surg*. August 2000; 70(2): 609–13.
77. Huang M-H, Wu Y, Nguyen V, Rastogi S, McConnell BK, Wijaya C, u. a. Heart Protection by Combination Therapy with Esmolol and Milrinone at Late-Ischemia and Early Reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1. Juni 2011; 25(3): 223.
78. Lochner A, Genade S, Tromp E, Podzuweit T, Moolman JA. Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation*. 31. August 1999; 100(9): 958–66.
79. Tong H, Bernstein D, Murphy E, Steenbergen C. The role of β -Adrenergic Receptor Signaling in Cardioprotection. *FASEB J* [Internet]. 31. März 2005 [zitiert 26. August 2016]; Verfügbar unter: <http://www.fasebj.org/content/early/2005/05/28/fj.04-3067fje>
80. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Eyk JEV, Sidor A, u. a. Cytoprotective Role of Ca^{2+} - Activated K^{+} Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane. *Science*. 11. Januar 2002; 298(5595): 1029–33.
81. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation*. 18. Januar 2005; 111(2): 198–203.
82. O'Rourke B, Cortassa S, Akar F, Aon M. Mitochondrial ion channels in cardiac function and dysfunction. *Novartis Found Symp*. 2007; 287: 140–56.
83. Fukasawa M, Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H. 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (Cilostazol), a Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor, Reduces Infarct Size via Activation of Mitochondrial Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels in Rabbit Hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 7. Januar 2008; 326(1): 100–4.
84. Heinen A, Ströthoff M, Schmidt A, Stracke N, Behmenburg F, Bauer I, u. a. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol*. August 2014; 56: 99–105.
85. Toyoda T, Tosaka S, Tosaka R, Maekawa T, Cho S, Eguchi S, u. a. Milrinone-induced postconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: the roles of phosphatidylinositol 3-kinase and nitric oxide. *J Surg Res*. Januar 2014; 186(1): 446–51.

86. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol*. Oktober 1993; 88(5): 456–70.
87. Przyklenk K, Hata K, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation*. 19. August 1997; 96(4): 1305–12.
88. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Februar 2001; 280(2): H649–657.
89. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, u. a. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. Dezember 1997; 81(6): 1072–82.
90. Geshi E, Ishioka H, Nomizo A, Nakatani M, Katagiri T. The role of ATP-sensitive potassium channels in the mechanism of ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol*. September 1999; 34(3): 446–53.
91. Shintani Y, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Asano Y, u. a. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol*. Dezember 2004; 37(6): 1213–8.
92. Cao C-M, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong T-M. Calcium-Activated Potassium Channel Triggers Cardioprotection of Ischemic Preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2. Januar 2005; 312(2): 644–50.
93. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Schlack W, Preckel B, Hollmann MW. Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels. *Br J Anaesth*. November 2010; 105(5): 589–95.
94. Jin C, Wu J, Watanabe M, Okada T, Iesaki T. Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts. *J Physiol Sci JPS*. Juli 2012; 62(4): 325–32.
95. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere*. August 1895; 61(6): 291–332.
96. Zimmer H-G. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *Physiology*. 1. August 1998; 13(4): 203–10.
97. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelağ A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. März 2007; 55(2): 113–26.
98. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. Juni 1986; 250(6 Pt 1): G749–753.
99. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. Juni 2009; 204(2): 334–41.
100. Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klin Wochenschr*. April 1932; 11(18): 757–9.

101. Aytulun AA. Geschlechtsspezifische Effekte von humanem Plasma nach Ischämischer Fernpräkonditionierung des älteren Menschen auf Infarktgröße und Hämodynamik des isolierten Langendorffherzens [Internet]. [zitiert 6. September 2018]. Diss. Univ. Düsseldorf 2018. Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=45625>
102. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res.* Juni 2000; 41(6): 613–27.
103. Bing RJ, Siegel A, Ungar I, Gilbert M. Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med.* April 1954; 16(4): 504–15.
104. Bing RJ. Some aspects of biochemistry of myocardial infarction. *Cell Mol Life Sci CMLS.* März 2001; 58(3): 351–5.
105. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* Juni 2011; 50(6): 940–50.
106. Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse [Internet]. [zitiert 23. Januar 2018]. Diss. Univ. Düsseldorf 2005. Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=3343>
107. Walters HL, Digerness SB, Naftel DC, Waggoner JR, Blackstone EH, Kirklin JW. The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 1992; 24(10): 1063–77.
108. Qiu Y, Hearse DJ. Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Mai 1992; 103(5): 960–8.
109. Ferdinandy P, Panas D, Schulz R. Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol.* Juni 1999; 276(6 Pt 2): H1861–1867.
110. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Independent contribution of catecholamines to arrhythmogenesis during evolving infarction in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* Februar 2002; 135(3): 807–15.
111. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. The isolated blood-perfused rat heart: an inappropriate model for the study of ischaemia- and infarction-related ventricular fibrillation. *Br J Pharmacol.* Dezember 2002; 137(7): 1089–99.
112. Minhaz U, Koide S, Shohtsu A, Fujishima M, Nakazawa H. Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic Res Cardiol.* Oktober 1995; 90(5): 418–23.
113. Frässdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, u. a. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth J Can Anesth.* August 2010; 57(8): 767–73.
114. Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Hollmann MW, u. a. Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PloS One.* 2015;10(12):e0144737.
115. Dorsch M, Behmenburg F, Raible M, Blase D, Grievink H, Hollmann MW, u. a. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PloS One.* 2016; 11(3):e0151025.

116. Behmenburg F, Pickert E, Mathes A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, u. a. The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. April 2017; 69(4): 228–35.
117. Pælestik KB, Jespersen NR, Jensen RV, Johnsen J, Bøtker HE, Kristiansen SB. Effects of hypoglycemia on myocardial susceptibility to ischemia–reperfusion injury and preconditioning in hearts from rats with and without type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 9. November 2017; 16: 148.
118. Hjortbak MV, Hjort J, Povlsen JA, Jensen RV, Støttrup NB, Laursen MR, u. a. Influence of diabetes mellitus duration on the efficacy of ischemic preconditioning in a Zucker diabetic fatty rat model. *PLOS ONE*. 23. Februar 2018; 13(2):e0192981.
119. Xiao J, Ke Z-P, Shi Y, Zeng Q, Cao Z. The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. *J Cell Biochem* [Internet]. [zitiert 9. Juli 2018];0(0). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.26878>
120. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang N-P, Kin H, Payne CS, u. a. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg*. 1. September 2004; 78(3): 961–9.
121. Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*. 1. September 2004; 44(5): 1103–10.
122. Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, u. a. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K–PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc Res*. 1. Oktober 2006; 72(1): 152–62.
123. Felker GM, Benza RL, Chandler AB, Leimberger JD, Cuffe MS, Califf RM, u. a. Heart failure etiology and response to milrinone in decompensated heart failure: Results from the OPTIME-CHF study. *J Am Coll Cardiol*. März 2003; 41(6): 997–1003.
124. Borow KM, Come PC, Neumann A, Baim DS, Braunwald E, Grossman W. Physiologic assessment of the inotropic, vasodilator and afterload reducing effects of milrinone in subjects without cardiac disease. *Am J Cardiol*. 15. April 1985; 55(9): 1204–9.
125. Hein M, Roehl AB, Baumert JH, Scherer K, Steendijk P, Rossaint R. Anti-ischemic effects of inotropic agents in experimental right ventricular infarction. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1. August 2009; 53(7): 941–8.
126. Shakur Y, Fong M, Hensley J, Cone J, Movsesian MA, Kambayashi J-I, u. a. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on cAMP-PDE activity, intracellular cAMP and calcium in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother*. September 2002; 16(5): 417–27.
127. Lobato EB, Urdaneta F, Martin TD, Gravenstein N. Effects of milrinone versus epinephrine on grafted internal mammary artery flow after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1. Februar 2000; 14(1): 9–11.

128. Hamada Y, Kawachi K, Yamamoto T, Nakata T, Kashu Y, Sato M, u. a. Effects of single administration of a phosphodiesterase III inhibitor during cardiopulmonary bypass: comparison of milrinone and amrinone. *Jpn Circ J*. August 1999; 63(8): 605–9.
129. Gobel FL, Norstrom LA, Nelson RR, Jorgensen CR, Wang Y. The rate-pressure product as an index of myocardial oxygen consumption during exercise in patients with angina pectoris. *Circulation*. März 1978; 57(3): 549–56.
130. Das A, Xi L, Kukreja RC. Protein Kinase G-dependent Cardioprotective Mechanism of Phosphodiesterase-5 Inhibition Involves Phosphorylation of ERK and GSK3 β . *J Biol Chem*. 24. Oktober 2008; 283(43): 29572–85.
131. Wang X, Fisher PW, Xi L, Kukreja RC. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. Januar 2008; 44(1): 105–13.
132. Contreras GF, Castillo K, Enrique N, Carrasquel-Ursulaez W, Castillo JP, Milesi V, u. a. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels*. 2. November 2013; 7(6): 442–58.
133. Imlach WL, Finch SC, Dunlop J, Dalziel JE. Structural determinants of lolitrem for inhibition of BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur J Pharmacol*. März 2009; 605(1–3): 36–45.
134. Sanchez M, McManus OB. Paxilline Inhibition of the Alpha-subunit of the High-conductance Calcium-activated Potassium Channel. *Neuropharmacology*. 1996; 35(7): 963–8.
135. Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, u. a. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry*. 17. Mai 1994; 33(19): 5819–28.
136. Wojtovich AP, Sherman TA, Nadtochiy SM, Urciuoli WR, Brookes PS, Nehrke K. SLO-2 Is Cytoprotective and Contributes to Mitochondrial Potassium Transport. *PLOS ONE*. 1. Dezember 2011; 6(12):e28287.
137. Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Urciuoli WR, Smith CO, Grunnet M, Nehrke K, u. a. A non-cardiomyocyte autonomous mechanism of cardioprotection involving the SLO1 BK channel. *PeerJ*. 5. März 2013; 1:e48.
138. Singh H, Lu R, Bopassa JC, Meredith AL, Stefani E, Toro L. mitoBKCa is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci*. 25. Juni 2013; 110(26): 10836–41.
139. Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci*. 5. September 2000; 97(10): 5562–7.
140. Hu H, Shao L-R, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, u. a. Presynaptic Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Glutamatergic Hippocampal Terminals and Their Role in Spike Repolarization and Regulation of Transmitter Release. *J Neurosci*. 15. Dezember 2001; 21(24): 9585–97.
141. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*. Juni 1998; 8(3): 321–9.

142. Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, u. a. Vasoregulation by the β_1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*. Oktober 2000; 407(6806): 870–6.
143. Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, u. a. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci*. November 2006; 9(11): 1397–403.
144. Borbouse L, Dick GM, Asano S, Bender SB, Dincer UD, Payne GA, u. a. Impaired function of coronary BKCa channels in metabolic syndrome. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1. November 2009; 297(5): H1629–37.
145. Wellman GC, Nelson MT. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca^{2+} -sensitive ion channels. *Cell Calcium*. September 2003; 34(3): 211–29.
146. Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1. Oktober 2005; 289(4): H1635–42.
147. Bentzen BH, Osadchii O, Jespersen T, Hansen RS, Olesen S-P, Grunnet M. Activation of big conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK) protects the heart against ischemia–reperfusion injury. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 1. März 2009; 457(5): 979–88.
148. Borchert GH, Hlaváčková M, Kolář F. Pharmacological activation of mitochondrial BKCa channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury. *Exp Biol Med*. 1. Februar 2013; 238(2): 233–41.
149. Lai MH, Wu Y, Gao Z, Anderson ME, Dalziel JE, Meredith AL. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1. November 2014; 307(9): H1327–38.
150. Behmenburg F, Trefz L, Dorsch M, Ströthoff M, Mathes A, Raupach A, u. a. Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca^{2+} -sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 29. November 2017.
151. Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, Higashijima U, Maekawa T, Hara T, u. a. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol*. 12. Januar 2012; 11: 4.
152. Cheng Y, Gu X, Bednarczyk P, Wiedemann F, Haddad G, Siemen D. Hypoxia Increases Activity of the BK-Channel in the Inner Mitochondrial Membrane and Reduces Activity of the Permeability Transition Pore. *Cell Physiol Biochem*. 2008; 22(1–4): 127–36.
153. Kulawiak B, Kudin AP, Szewczyk A, Kunz WS. BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp Neurol*. 1. August 2008; 212(2): 543–7.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt **Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer** für ihre fortwährende Unterstützung und Mühen als meine wissenschaftliche Betreuerin und Doktormutter sowie für die hilfreichen Anregungen von Beginn bis Fertigstellung der Arbeit.

Ich bedanke mich auch herzlich **bei Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen** für seine Arbeit als Arbeitsgruppenleiter, die experimentelle Betreuung und die Zeit, die er sich allzeit bei Problemen genommen hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt **Dr. med. Friederike Behmenburg** für die ausführliche Einarbeitung im Labor, die experimentelle Betreuung sowie für die zahlreichen Hilfestellungen im Verlauf meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Claudia Dohle** und **Birgitt Berke**, die beide allzeit als Ansprechpartnerinnen im Labor bei Fragestellungen zur Verfügung standen.

Zuletzt bedanke ich mich bei **Andreas Stroth** für seine Hilfe, Motivation und die tatkräftige, emotionale Unterstützung über den gesamten Prozess der Arbeit.