

Aus der Klinik für Anästhesiologie

Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Mechanismen der pharmakologischen Konditionierung:
Experimentelle Untersuchungen am Rattenherz
in vivo und *in vitro***

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Experimentelle Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Annika Raupach

2021

Für Finn und Vincenzo

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift fasst die Ergebnisse der unten aufgeführten Originalpublikationen zusammen. Zunächst wird einleitend in die Thematik eingeführt, im Folgenden werden die wesentlichen Methoden und Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Weitergehende Angaben zur Methodik sowie detailliertere Darstellungen der Ergebnisse sind den jeweiligen beigefügten Originalarbeiten zu entnehmen. Abschließend werden die Resultate im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

Originalarbeiten:

1) **Raupach A**, Torregroza C, Niestegge J, Feige K, Klemm-Meyer S, Bauer I, Brandenburger T, Grievink H, Heinen A, Huhn R. MiR-21-5p but not miR-1-3p expression is modulated by preconditioning in a rat model. *Mol Biol Rep*. 2020 Sep;47(9):6669-6677. doi: 10.1007/s11033-020-05721-y. Epub 2020 Aug 12.

2) **Raupach A**, Reinle J, Stroethoff M, Mathes A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Bunte S. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J Clin Med*. 2019 Apr 12;8(4). pii:507. doi: 10.3390/jcm8040507.

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

4) Bunte S, Behmenburg F, Bongartz A, Stroethoff M, **Raupach A**, Heinen A, Minol JP, Hollmann MW, Huhn R, Sixt SU. Potassium (mBKCa) Channels. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018 Oct;32(5):427-434. doi: 10.1007/s10557-018-6819-5.

5) Stroethoff M, Bunte S, **Raupach A**, van de Snepscheut M, Torregroza C, Heinen A, Mathes A, Hollmann MW, Huhn R, Sixt SU. Impact of Ca²⁺-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2019 Oct;33(5):581-588. doi: 10.1007/s10557-019-06908-7.

6) **Raupach A**, Karakurt E, Torregroza C, Bunte S, Feige K, Stroethoff M, Brandenburger T, Heinen A, Hollmann M, Huhn R. Dexmedetomidine provides cardioprotection during early or late reperfusion mediated by different mitochondrial K⁺-channels. *Anesth Analg*. 2021 Jan;132(1):253-260. doi: 10.1213/ANE.0000000000005148.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
[X]	Konzentration von X
5HD	5-Hydroxydecanoat
AAR	Risikogebiet (<i>area at risk</i>)
Akt	synonym für Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
bpm	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium, Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
h	Stunde
H ⁺	Proton
Hif1 α	Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 alpha
HO-1	Hämoxygenase 1
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
i.p.	intraperitoneal
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPostC	ischämische Postkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
kg, g, mg, μ g, ng	Kilogramm, Gramm, Milli~, Mikro~, Nano~
LAD	<i>Ramus interventricularis anterior (left anterior descending artery)</i> ,
LVDP	linksventrikulärer entwickelter Druck (<i>left ventricular developed pressure</i>)
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (<i>left ventricular end-diastolic pressure</i>)
LVESP	linksventrikulärer endsystolischer Druck (<i>left ventricular end-systolic pressure</i>)
K ⁺	Kalium, Kaliumion

kDa	Kilodalton
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KO	Knockout
l, ml, μ l	Liter, Milli~, Mikro~
M, mM, μ M, nM	molar, milli~, mikro~, nano~
MAC	minimale alveoläre Konzentration
mBK _{Ca} ⁻ , BK _{Ca} -Kanal	(mitochondrialer) Calcium-sensitiver Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
min	Minute
MITOK	Poren-formende Untereinheit des ATP-sensitiven Kaliumkanals
MITOK-KO	KO Maus für MITOK
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
mK ⁺ -, K ⁺ -Kanal	(mitochondrialer) Kaliumkanal
mK _{ATP} ⁻ , K _{ATP} -Kanal	(mitochondrialer) ATP-sensitiver Kaliumkanal
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPG	N-2-Mercaptopropionylglycin
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mSK _{Ca} ⁻ , SK _{Ca} -Kanal	(mitochondrialer) Calcium-sensitiver Kaliumkanal mit niedriger Leitfähigkeit
Na ⁺	Natrium, Natriumion
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
non-AAR	gesundes Herzgewebe (<i>area not at risk</i>)
n. s.	nicht signifikant
NS1619	<i>1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one</i>
NS8593	<i>N-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-benzimidazole-2-amin hydrochloride</i>
PDCD4	<i>programmed cell death protein 4</i>
PDE3	Phosphodiesterase 3
PKA	Proteinkinase A
pmK _{ATP} -Kanal	plasmamembranaler ATP-sensitiver Kaliumkanal

PTCA	perkutane, transluminale Koronarangioplastie
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPC	ischämische Fernpräkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i>)
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
s	Sekunde
SAFE	<i>survivor activating factor enhancement</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
WT	Wildtyp, wildtypisch

Inhalt

1.	Einleitung	7
1.1.	Der Ischämie/Reperfusionsschaden	8
1.2.	Kardioprotektion durch Prä- und Postkonditionierung	9
1.3.	Mechanismen der Kardioprotektion.....	11
1.3.1.	Rolle der Mitochondrien	11
1.3.2.	Rolle der Calcium- und ATP-sensitiven Kalium-Kanäle	12
1.3.3.	Rolle der microRNAs.....	14
1.4.	Pharmakologische Konditionierung.....	16
1.4.1.	Isofluran.....	16
1.4.2.	Milrinon	17
1.4.3.	Levosimendan	18
1.4.4.	Dexmedetomidin.....	19
	Fragestellung.....	20
2.	Methoden.....	21
2.1.	<i>In vitro</i> Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens: Isoliertes, perfundiertes Rattenherz (Langendorff-Apparatur).....	21
2.2.	<i>In vivo</i> Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens: Okklusion des <i>Ramus interventricularis anterior</i>	21
2.3.	Infarktgrößenbestimmung.....	22
2.4.	RNA-Isolation und quantitative PCR-Analyse	22
2.5.	Proteinisolation und Western Blot Analyse.....	23
2.6.	Versuchsprotokolle	23
2.6.1.	Rolle von microRNA-Expression bei der Präkonditionierung mit Isofluran.....	23
2.6.2.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Milrinon.....	25
2.6.3.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon.....	26
2.6.4.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Levosimendan	28
2.6.5.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Levosimendan	30
2.6.6.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin	31
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Rolle von microRNA-Expression bei der Präkonditionierung mit Isofluran.....	33
3.2.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Milrinon	37

3.3.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon.....	41
3.4.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Levosimendan.....	43
3.5.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Levosimendan	45
3.6.	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin	47
4.	Diskussion.....	49
4.1.	Bedeutung von microRNAs im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Isofluran	49
4.2.	Bedeutung der mitochondrialen Mechanismen im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Milrinon.....	52
4.3.	Bedeutung der mitochondrialen K ⁺ -Kanäle im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Levosimendan.....	56
4.4.	Bedeutung der mitochondrialen K ⁺ -Kanäle im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Dexmedetomidin	59
4.5.	Methodenkritik	60
4.6.	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis.....	68
7.	Danksagung.....	80
8.	Originalarbeiten	81

1. Einleitung

In der Statistik der häufigsten Todesursachen Deutschlands stehen seit vielen Jahren die chronischen ischämischen Herzerkrankungen an erster Stelle und werden dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (Häufigste Todesursachen in Deutschland, Jahr 2019, Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021, https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html, 08.02.2021). Zudem erhöht sich durch den Anstieg der Lebenserwartung die Inzidenz und Prävalenz von Herz-Kreislaufkrankungen (North *et al.*, 2012). Hierdurch rangieren die Herz-Kreislaufkrankungen an erster Stelle bei den Krankheitskosten (Krankheitskosten 2015, Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017, https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/_inhalt.html, 08.02.2021). Daraus geht klar hervor, dass die Forschung auf eine Vermeidung oder Reduzierung des Schadens durch Herz-Kreislaufkrankungen hinzielen sollte, um die gesundheitlichen Folgen und die Kostenlast zu senken. Ein Mechanismus der Entstehung akuter und chronischer Herz-Kreislaufkrankungen ist der Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden. Dieser konnte in den vergangenen Jahrzehnten durch frühzeitige Diagnose und Therapie, verbesserte Akuttherapien, wie beispielsweise perkutane, transluminale Koronarangioplastie (PTCA) bei Myokardinfarkt, und Langzeittherapien, wie eine medikamentöse Antithromboseprophylaxe, minimiert werden. Durch diese Maßnahmen sank die Sterblichkeit aufgrund koronarer Herzerkrankungen seit Mitte der 1990er Jahre in Deutschland; jedoch stagniert diese Abnahme seit circa 10 Jahren und die ischämischen Herzerkrankungen sind, wie bereits erwähnt, weiterhin die Haupttodesursache in Deutschland geblieben (Deutsche Herzstiftung (November 2020): Deutscher Herzbericht 2019, [de.statista.com, https://de.statista.com/statistik/daten/studie/297626/umfrage/todesfaelle-aufgrund-koronarer-herzkrankheiten-in-deutschland/](https://de.statista.com/statistik/daten/studie/297626/umfrage/todesfaelle-aufgrund-koronarer-herzkrankheiten-in-deutschland/), 19.01.2021). Folglich sind die bisherigen Therapien zur Minimierung des I/R-Schadens nicht ausreichend, so dass eine weitere Reduktion des I/R-Schadens immer noch von medizinischem, wirtschaftlichem und wissenschaftlichem Interesse ist. Durch den Einsatz der PTCA kann der I/R-Schaden durch eine Verkürzung der Ischämiedauer bereits erfolgreich reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Minimierung des I/R-Schadens stellt die Erhöhung der Ischämietoleranz des Herzens durch eine Vorbereitung des Gewebes auf eine I/R mittels Konditionierung dar. Unter der Konditionierung versteht man protektive Interventionen, die vor, während oder nach einer Ischämie durchgeführt werden können.

Diese Interventionen können entweder kurze, nicht-letale I/R-Zyklen (ischämische Konditionierung) oder die Gabe von Pharmaka (pharmakologische Konditionierung) sein. Die Kardioprotektion durch eine Konditionierung ist auch im Menschen ein relevanter Mechanismus, wie beispielsweise an Myokardinfarktpatienten mit und ohne Symptomen einer *Angina pectoris*, die als Korrelat einer ischämischen Präkonditionierung angesehen wird, gezeigt wurde (Kloner *et al.*, 1995). Bei Patienten mit Präinfarktangina wurde eine geringere Infarktgröße, gemessen anhand der Creatinkinase-Konzentration, im Vergleich zu den Patienten ohne Angina-Symptomen bestimmt (Kloner *et al.*, 1995). Jedoch ist die Übertragung der Kardioprotektion mittels Konditionierung in die klinische Situation erschwert, denn klinische Studien zeigten, dass die konditionierenden Interventionen oft nicht zu der gewünschten Protektion führen (Heusch *et al.*, 2016). Der Verlust der Kardioprotektion durch Konditionierung in der klinischen Situation wird unter anderem einem inhibierenden Einfluss durch Komedikationen und -morbidityen zugeschrieben (Kleinbongard *et al.*, 2020).

Trotz intensiver Forschung im Bereich der Konditionierung sind die Mechanismen der Kardioprotektion bisher noch nicht vollständig verstanden. Dieses Verständnis ist aber essentiell zur Optimierung der Konditionierungsstrategie, Identifizierung neuer protektiver Substanzen oder Vermeidung einer Inhibierung durch Komedikationen oder -morbidityen.

1.1. Der Ischämie/Reperfusionsschaden

Bei akutem Myokardinfarkt wie auch bei chronischen ischämischen Herzerkrankungen wird der Blutfluss im Myokard reduziert (Ischämie), was zu einer Unterversorgung, beispielsweise an Sauerstoff, und folglich zum Untergang der Kardiomyozyten führt. Um den Ischämieschaden zu reduzieren, ist eine rasche Wiederherstellung des Blutflusses (Reperfusion) das primäre Ziel, denn das Ausmaß des Ischämie-induzierten Schadens ist abhängig von der Ischämiedauer (Piper *et al.*, 1998; Heusch, 2020). Paradoxe Weise führt auch die Reperfusion selbst zur weiteren Schädigung des Myokards. Diese Prozesse werden unter dem Begriff I/R-Schaden zusammengefasst (Piper *et al.*, 1998; Heusch, 2020).

Zu den Mechanismen, die zum I/R-Schaden beitragen, zählen oxidativer Stress, intrazelluläre und mitochondriale Calciumüberladung, schnelle Wiederherstellung des physiologischen pH-Werts und schlussendlich die gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP). Die Öffnung der mPTP ermöglicht das Ausströmen von Nicotinamadenindinukleotid in das Zytosol, einen schnellen Austausch aller gelösten

Stoffe bis zu einer Größe von 1,5 kDa und einen Einstrom von Wasser aus dem Zytosol, das zur Matrixschwellung und -ruptur führt (Gottlieb, 2011). Diese Mechanismen führen zu einem Untergang der Mitochondrien, wodurch unter anderem proapoptische Faktoren freigesetzt werden, die neben dem energetischen Kollaps der Zelle zusätzlich zum Zelltod beitragen (Yellon *et al.*, 2007; Hausenloy *et al.*, 2013). Während der Ischämie wechselt der Zellmetabolismus der Kardiomyozyten aufgrund des Sauerstoffmangels und der Abnahme der Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) von der aeroben zur anaeroben Glykolyse, wodurch Laktat akkumuliert und die Natrium-Kalium (Na^+/K^+)-ATPase inhibiert wird. Das zusätzliche Laktat wiederum senkt den pH-Wert und durch den Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration ($[\text{H}^+]$) wird die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers erhöht. Daraus resultiert ein Anstieg der intrazellulären $[\text{Na}^+]$, der durch den Natrium-Calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$)-Austauscher reduziert wird, aber gleichzeitig für einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]$ verantwortlich ist. Im Laufe der Ischämie entsteht so eine Überladung der Kardiomyozyten mit Ca^{2+} , wodurch die Kardiomyozyten in Hyperkontraktion gehalten werden. Zeitgleich wird durch den niedrigen, intrazellulären pH-Wert die mPTP geschlossen gehalten (Yellon *et al.*, 2007; Hausenloy *et al.*, 2013).

Kurz nach dem Beginn der Reperfusion stellt sich der physiologische pH-Wert über das Auswaschen von Laktat und die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers durch den Anstieg der ATP-Konzentration wieder ein. Dies hat zur Folge, dass die Inhibierung der mPTP-Öffnung aufgehoben wird und die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten beendet wird. Zudem wird durch die Reperfusion die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), beispielsweise über die Reaktivierung der Atmungskette oder von Xanthinoxidasen, angeregt. Die ROS selbst tragen ebenfalls zur Öffnung der mPTP bei, locken neutrophile Granulozyten an und regen die dysfunktionale Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum an. Diese Prozesse tragen somit zur weiteren Zellschädigung durch fortgesetzte intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung, Lipidperoxidation der Zellmembran, erhöhte Proteindenaturierung und oxidative DNA-Schädigung bei (Yellon *et al.*, 2007; Hausenloy *et al.*, 2013).

1.2. Kardioprotektion durch Prä- und Postkonditionierung

Eine Möglichkeit, den I/R-Schaden zu reduzieren, sind kardioprotektive Maßnahmen, wie zum Beispiel die Konditionierung. Erstmals konnten Murry *et al.* im Jahr 1986 einen kardioprotektiven Effekt anhand einer Reduktion der Infarktgröße um 75 % durch mehrere

kurze, subletale Zyklen (4 x 5 min) von I/R des *Ramus circumflexus* vor einer 40-minütigen Ischämie gefolgt von einer viertägigen Reperfusion in Hunden nachweisen (Murry *et al.*, 1986). Dieses Phänomen wurde ischämische Präkonditionierung (IPC) genannt und ist mittlerweile durch viele Studien in unterschiedlichsten Spezies, sowie auch durch Protektion anderer Organe, beispielsweise Leber oder Niere, verifiziert (Stokfisz *et al.*, 2017). Im klinischen Kontext ist die Anwendung der Präkonditionierung dadurch eingeschränkt, dass die meisten ischämischen Ereignisse, ausgenommen beispielsweise im Rahmen elektiver Herz-Operationen, unvorhersehbar sind. Im Jahr 2003 konnten Zhao *et al.* erstmals zeigen, dass auch eine ischämische Postkonditionierung (IPostC), bei der die Konditionierung durch mehrere kurze, subletale I/R-Zyklen nach der Ischämie vollzogen wurde, die Infarktgrößen bei Hunden reduzieren konnte (Zhao *et al.*, 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Interventionen während der Ischämie (Perkonditionierung), sondern auch im zeitlichen Abstand von bis zu 72 h vor (späte/verzögerte Konditionierung oder *second window of protection*) oder 30 min nach einer Ischämie protektiv sein können (Roubille *et al.*, 2011; Hausenloy *et al.*, 2016; Behmenburg *et al.*, 2017).

Für eine erfolgreiche Kardioprotektion muss die ischämische Konditionierung nicht zwangsläufig direkt am Ort der Ischämie selbst, sondern kann auch herzfern, wie beispielsweise an der Niere, erfolgen (McClanahan *et al.*, 1993; Przyklenk *et al.*, 1993; Donato *et al.*, 2017). Diese sogenannte ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) erlaubt zudem, die Problematik der hohen Invasivität durch lokale Interventionen am Herzen im Rahmen der ischämischen Konditionierung zu umgehen. So konnte gezeigt werden, dass mehrere kurze Zyklen von I/R, beispielsweise durch Aufblasen und Ablassen von Blutdruckmanschetten an den Extremitäten, für eine Kardioprotektion vor einem I/R-Schaden ausreichend sind (Heusch, 2020). Auch hier kann der Stimulus als Postkonditionierung angewendet werden (Kerendi *et al.*, 2005; Donato *et al.*, 2017).

Neben der ischämischen Konditionierung kann eine Kardioprotektion auch durch Pharmaka, also eine pharmakologische Konditionierung, erzielt werden, die ebenfalls vor, während oder nach der Ischämie verabreicht werden können (Caricati-Neto *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). Auf die pharmakologische Konditionierung wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

1.3. Mechanismen der Kardioprotektion

Die genauen Mechanismen der Kardioprotektion sind noch nicht entschlüsselt, aber einige Mediatoren und Signalwege sind bereits bekannt. Dazu zählen der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)- und der *survivor activating factor enhancement*-(SAFE) Signalweg. Diese können jeweils über verschiedene Liganden, die durch eine Konditionierung freigesetzt werden, aktiviert werden, um schlussendlich über den Endeffektor Mitochondrium eine Protektion zu vermitteln (Hausenloy *et al.*, 2005; Lecour, 2009). Ersterer wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induziert, die wiederum eine Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase und ihrer nachgeschalteten Zielproteine Proteinkinase B (Akt) und *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) auslösen. Akt selbst phosphoryliert unter anderem die Proteinkinase C, die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase und die Glykogensynthase-Kinase 3 beta, wobei letztere beispielsweise die mPTP-Öffnung inhibiert (Rosenberg *et al.*, 2018). Die Aktivierung des SAFE-Signalwegs erfolgt über die Bindung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) an den TNF α -Rezeptor 2, der wiederum die Januskinase und den *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) phosphoryliert. Der dimerisierte und aktivierte STAT3 transloziert zum einen in den Zellkern und zum anderen in die Mitochondrien, wo er die Konzentration von ROS, die Elektronentransportkette und die mPTP-Öffnung reguliert (Hadebe *et al.*, 2018). Der SAFE-Signalweg kann unabhängig vom RISK-Signalweg aktiviert werden, wobei Interaktionen zwischen den beiden Signalwegen beschrieben sind (Hadebe *et al.*, 2018). Zudem scheinen einige Konditionierungsformen die Aktivierung beider Signalwege zu benötigen, wohingegen für andere Formen die Aktivierung nur eines der beiden Signalwege ausreichend ist (Hadebe *et al.*, 2018).

1.3.1. Rolle der Mitochondrien

Es herrscht Konsensus darüber, dass das Mitochondrium der Endeffektor der Kardioprotektion vor einem I/R-Schaden darstellt und dies unabhängig davon ist, welche vorgeschaltete Signalkaskade aktiviert wurde (Boengler *et al.*, 2018). Ein myokardialer I/R-Schaden verändert die mitochondrialen Funktionen und Eigenschaften in Kardiomyozyten. Dazu zählen die Bildung von ROS, die oxidative Phosphorylierung sowie die mPTP-Öffnung. Für eine erfolgreiche Kardioprotektion ist eine spezifische Beeinflussung dieser Prozesse erforderlich. Beispielsweise werden die hohen Konzentrationen an ROS zu Beginn der Reperfusion für das Ausmaß des Zelltods mitverantwortlich gemacht, jedoch sind geringe

Konzentrationen an ROS essentiell für die Kardioprotektion (Smith *et al.*, 2017; Boengler *et al.*, 2018). Hierbei spielt die Regulation der mPTP durch ROS eine Rolle, denn die transiente und reversible Öffnung der mPTP ist für die Kardioprotektion notwendig, während eine andauernde Öffnung der mPTP zum Untergang der Mitochondrien durch Schwellung und Freisetzung von proapoptotischen Faktoren führt (Heusch, 2015). Die Balance der ROS-Produktion oder auch der mPTP-Öffnung spiegelt das Paradox wider, dass lange Ischämien zu einer schweren Schädigung des Gewebes führen, während kurze Phasen protektiv wirken können.

1.3.2. Rolle der Calcium- und ATP-sensitiven Kalium-Kanäle

Eine Zielstruktur der kardioprotektiven Signaltransduktion im Mitochondrium stellen die mitochondrialen Kaliumkanäle (mK^+ -Kanal) dar, wobei zwischen ATP- (mK_{ATP}) und Calcium-sensitiven (mK_{Ca}) Kaliumkanälen unterschieden wird. Ihre Beteiligung an der Kardioprotektion wurde durch die Effekte spezifischer Agonisten und Antagonisten belegt (Testai *et al.*, 2015; Sztejn *et al.*, 2020).

Unter physiologischen Bedingungen sind mK^+ -Kanäle geschlossen und die innere Mitochondrienmembran ist impermeabel für K^+ (Testai *et al.*, 2015). In Stresssituationen, wie beispielsweise bei einer Ischämie, werden die mK^+ -Kanäle geöffnet und es kommt zu einem starken Einstrom von K^+ , der wiederum einen Einstrom von Wasser und Anionen nach sich zieht. Die resultierende Matrixschwellung sorgt über verschiedene Mechanismen dafür, dass die Mitochondrien ihre wichtigen Funktionen weiterhin ausüben können. Erstens hält die Matrixschwellung die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für Nukleotide auf einem geringen Niveau, so dass die ATP-Synthese und der ATP-Transfer in das Zytoplasma aufrechterhalten werden. Zweitens verringert die Schwellung auch den intramembranaln Raum, wodurch die oxidative Phosphorylierung effektiver ablaufen kann. Durch die Öffnung der mK^+ -Kanäle selbst kommt es zusätzlich zu einer leichten Membrandepolarisation, die wiederum den Einstrom von Ca^{2+} in die mitochondriale Matrix reduziert und so vor einer Überladung durch Ca^{2+} sowie einer anschließenden mPTP-Öffnung schützt (Testai *et al.*, 2015).

Die K_{ATP} -Kanäle sind Oktamere aus vier transmembranalen, einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanälen und vier transmembranalen Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Untereinheiten (Smith *et al.*, 2017). Erste Beobachtungen bei einer IPC ließen zunächst vermuten, dass der plasmamembranale K_{ATP} (pmK_{ATP})-Kanal die Kardioprotektion über eine Reduktion der

Kontraktilität vermittelt (Smith *et al.*, 2017). Jedoch konnte später durch Verwendung des mK_{ATP}-Kanal-spezifischen Agonisten Diazoxid gezeigt werden, dass lediglich mK_{ATP}-Kanäle für den kardioprotektiven Effekt verantwortlich sind (Garlid *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass der protektive Effekt von Diazoxid, oder auch von einer IPC, lediglich durch den mK_{ATP}-Kanal-spezifischen Inhibitor 5-Hydroxydecanoat (5HD) aufgehoben wurde (Garlid *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Zudem konnte durch Verwendung des spezifischen pmK_{ATP}-Kanal-Blockers HMR1098 eine Beteiligung der pmK_{ATP}-Kanäle an der Vermittlung der Kardioprotektion ausgeschlossen werden (Sato *et al.*, 2000). Nach großen Kontroversen um seine Existenz konnte der mK_{ATP}-Kanal im Jahr 2019 erstmals eindeutig im Mitochondrium identifiziert und der Aufbau des Kanals aus einer Poren-formenden (MITOK) und einer ATP-bindenden (MITOSUR) Untereinheit nachgewiesen werden (Paggio *et al.*, 2019). Ein Knockout (KO) von MITOK (MITOK-KO) in der Maus führte zum Verlust des kardioprotektiven Effekts durch Diazoxid, wodurch verifiziert wurde, dass es sich bei dem mK_{ATP}-Kanal um das molekulare Ziel der Diazoxid-vermittelten Kardioprotektion handelt (Paggio *et al.*, 2019).

Die mK_{Ca}-Kanäle wurden erstmals im Jahr 2002 von Xu *et al.* in Verbindung mit einer kardioprotektiven Wirkung gebracht (Xu *et al.*, 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit dem Aktivator *1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one* (NS1619), der spezifisch für Calcium-sensitive K⁺-Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}) ist, isolierte, perfundierte Herzen vor I/R-Schaden schützte (Xu *et al.*, 2002). In adulten Kardiomyozyten sind BK_{Ca}-Kanäle nicht in der Plasmamembran nachweisbar, sondern nur in der inneren Membran der Mitochondrien und werden somit als mitochondriale BK_{Ca} (mBK_{Ca})-Kanäle bezeichnet (Xu *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2013). Der mBK_{Ca}-Kanal ist ein Produkt des *Kcnma1*-Gens, das auch für die Poren-formende α -Untereinheit des plasmamembranal BK_{Ca}-Kanals kodiert; jedoch wird in Kardiomyozyten durch eine Splicevariante die mitochondriale Lokalisation sichergestellt (Singh *et al.*, 2013; Sztejn *et al.*, 2020). Auch wenn die Spezifität von NS1619, welches von Xu *et al.* für den Nachweis einer Beteiligung des mBK_{Ca}-Kanals an der Kardioprotektion genutzt wurde (Xu *et al.*, 2002), kontrovers diskutiert wird, so konnte unter anderem mit KCNMA1^{-/-}-Mäusen die Rolle von mBK_{Ca}-Kanälen in der Kardioprotektion bestätigt werden (Bentzen *et al.*, 2014). Bei KCNMA1^{-/-}-Mäusen, die eine globale Inaktivierung im *Kcnma1*-Gen tragen, kann durch eine IPC keine Infarktgrößenreduktion mehr ausgelöst werden (Soltysinska *et al.*, 2014). Besonders

interessant für die Übertragung in die Klinik ist, dass eine mBK_{Ca} -Kanal-vermittelte Kardioprotektion anscheinend altersunabhängig ist, denn Heinen *et al.* konnten demonstrieren, dass NS1619 in jungen wie auch in alten Ratten die Infarktgröße reduziert (Heinen *et al.*, 2014). Bei einer Reihe anderer Konditionierungsmethoden geht der kardioprotektive Effekt mit dem Alter verloren (Shim, 2010).

Neben dem BK_{Ca} -Kanal mit großer Leitfähigkeit existieren ebenfalls Calcium-sensitive K^+ -Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit (SK_{Ca}). Die Öffnung von BK_{Ca} -Kanälen wird über den Anstieg der zytosolischen $[Ca^{2+}]$ und einen Potentialgradienten reguliert (Stefani *et al.*, 1997). Die SK_{Ca} -Kanäle werden hingegen spannungsunabhängig reguliert, da ihre Öffnung über die Interaktion mit Calmodulin am C-Terminus vermittelt wird (Jenkins *et al.*, 2011). Für beide Kanaltypen konnte jeweils gezeigt werden, dass durch eine Aktivierung mit den entsprechenden Agonisten eine Infarktgrößenreduktion induziert werden kann (Stowe *et al.*, 2017).

1.3.3. Rolle der microRNAs

Eine Kardioprotektion kann nicht nur über eine Regulation von Signalkaskaden durch posttranslationale Modifikationen vermittelt werden, sondern die Regulation kann auch bereits auf der Ebene der Genexpression erfolgen. Durch Inhibition der Transkription oder Degradierung von *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) können microRNAs (miRNAs) die Genexpression regulieren und stellen somit weitere Mediatoren und Regulatoren der Kardioprotektion dar. MiRNAs gehören zu den nicht-kodierenden RNAs mit einer Länge von 20-23 Nukleotiden (Bartel, 2004; Siebert *et al.*, 2019). Viele Studien konnten zeigen, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Modulation der Signalkaskaden des I/R-Schadens spielen (Siebert *et al.*, 2019). Darüber hinaus kommt es vor, während und nach einer myokardialen I/R zu komplexen Veränderungen in der miRNA-Expression (Siebert *et al.*, 2019). Diese Eigenschaften machen die miRNAs auch für das Forschungsgebiet der Kardioprotektion interessant. Experimentelle und teilweise auch klinische Studien konnten zeigen, dass eine IPC oder eine RIPC zu Expressionsveränderungen von miRNAs im Vergleich zu Kontrollgruppen führt. Die meisten der regulierten miRNAs können dabei die Expression von Apoptose-relevanten Proteinen beeinflussen (Kohns *et al.*, 2019).

Im Folgenden wird näher auf die miRNAs miR-1-3p und miR-21-5p eingegangen, die in den Publikationen dieser Schrift spezifisch untersucht wurden. Für beide miRNAs konnte bereits im Jahr 2009 von Yin *et al.* eine Verbindung zur Kardioprotektion aufgezeigt werden, indem

die Autoren eine Steigerung der Expression der jeweiligen miRNA durch eine IPC vor einer I/R-Intervention nachwiesen (Yin *et al.*, 2009).

Die miR-21-5p rückt zunehmend in den Fokus der Herzforschung, da sie anscheinend in viele Prozesse bei kardiovaskulären Erkrankungen involviert ist. Dies drückt sich beispielsweise durch eine deregulierte Expression von miR-21-5p im Herzen oder im Gefäßsystem bei ischämischen Herzerkrankungen oder kardialer Hypertrophie aus (Kura *et al.*, 2020). Zudem kommt es bei myokardialer I/R zu zeit- und gewebeabhängigen Veränderungen der Expression von miR-21-5p. Weiterhin bewirkte eine Überexpression von miR-21-5p kardioprotektive Effekte (Dong *et al.*, 2009), während eine Depletion einen I/R-Schaden verstärken konnte (Chen *et al.*, 2019). Auch in der pharmakologischen Konditionierung spielt miR-21-5p eine essentielle Rolle, denn in KO-Mäusen ist der kardioprotektive Effekt einer Präkonditionierung mit Isofluran aufgehoben (Olson *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015). Die Expression von miR-21-5p kann unter anderem über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 alpha (Hif1 α) moduliert werden. Die Bindung von Hif1 α an die Promotorregion von miR-21-5p induziert deren Expression, wobei miR-21-5p wiederum durch einen regulatorischen Feedbackloop via *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN)/Akt-Signalweg die Expression von Hif1 α induziert (Liu *et al.*, 2014). Ein gleichzeitiger Anstieg der Expression von miR-21-5p und Hif1 α konnte bereits durch eine Hypoxieinduktion oder bei einer renalen IPC beobachtet werden (Jia *et al.*, 2017). Ein direktes Ziel von miR-21-5p stellt *programmed cell death protein 4* (PDCD4) dar, welches in einem *in vitro* Modell für I/R, Hypoxie und Reoxygenierung, anti-apoptotische Effekte in Kardiomyozyten induzierte (Cheng *et al.*, 2010). Eine *in vivo* Beteiligung von PDCD4 an der Kardioprotektion ist ebenfalls wahrscheinlich, da Zhu *et al.* einen Anstieg an PDCD4-Protein nach IPostC zeigen konnten (Zhu *et al.*, 2016).

Die kardial stark exprimierte miR-1-3p ist eine der meist beschriebenen regulierten miRNAs im Kontext der Präkonditionierung (Kohns *et al.*, 2019). Diese miRNA ist eng mit dem I/R-Schaden verknüpft, wobei die exakte Rolle von miR-1-3p nicht geklärt ist (Kura *et al.*, 2020). In der frühen Phase nach einer I/R wird die Expression von miR-1-3p im Herzgewebe zunächst reduziert. Hierbei handelt es sich anscheinend um einen adaptiven Mechanismus, da zu späteren Zeitpunkten die Expression wieder ansteigt und eine hohe Expression von miR-1-3p eher mit einer Verschlimmerung des I/R-Schadens einhergeht (Kura *et al.*, 2020). So führt auch eine Überexpression von miR-1-3p in transgenen Mäusen zu einem größeren myokardialen

I/R-Schaden, wohingegen eine Suppression der Expression von miR-1-3p das Ausmaß des Schadens abschwächen konnte (Pan *et al.*, 2012; Kura *et al.*, 2020). Bei der Konditionierung ist die Expressionsregulation von miR-1-3p anscheinend abhängig vom Stimulus und Gewebe. Sowohl eine IPC als auch eine IPostC regulierten die Expression von miR-1-3p in Nagetierherzen herauf; beides ging einher mit einer Reduktion der Apoptose (He *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012; Kura *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu führte eine RIPC zunächst zu einer Herunterregulation von miR-1-3p (Duan *et al.*, 2012; Kura *et al.*, 2020). Brandenburger *et al.* konnten mit einem I/R-Modell an Ratten zeigen, dass im Infarktgebiet nach einer zweistündigen Reperfusion die Expression von miR-1-3p durch einen RIPC-Stimulus allein, eine I/R allein oder eine Kombination beider Interventionen herunterreguliert wurde (Brandenburger *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu veränderte sich die Expression von miR-1-3p außerhalb des Infarktgebietes zu diesem Untersuchungszeitpunkt nicht (Brandenburger *et al.*, 2014). Die Rolle von miR-1-3p bei pharmakologischer Konditionierung ist bisher nicht näher untersucht worden.

1.4. Pharmakologische Konditionierung

Bei einer pharmakologischen Konditionierung aktivieren die eingesetzten Pharmaka protektive Signalwege und verhindern dadurch schädliche Prozesse, beispielsweise durch das Abfangen von ROS, oder induzieren protektive Prozesse, wie eine Inhibition der mPTP-Öffnung (Heusch, 2020). Als kardioprotektive Pharmaka werden unter anderem volatile Anästhetika, Edelgase, Opioide, Adenosin oder Adrenorezeptor-Agonisten verwendet (Caricati-Neto *et al.*, 2019; Torregroza *et al.*, 2020). Es handelt sich hierbei um klinisch etablierte Substanzen, deren Nebenwirkungen und Spezifität gut dokumentiert sind. Für experimentelle Ansätze werden auch klinisch nicht einsetzbare Substanzen verwendet, wie spezifische K⁺-Kanalöffner oder -inhibitoren, die hilfreich sind, um die zugrundeliegenden Signalmechanismen aufklären zu können. Im Folgenden werden ausgewählte Substanzen näher vorgestellt, die in dieser kumulativen Arbeit eingesetzt wurden.

1.4.1. Isofluran

Das volatile Anästhetikum Isofluran ist ein halogenierter Ether und wird zur Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung eingesetzt. Im Jahr 1988 zeigten Warltier *et al.* erstmals an Hunden einen kardioprotektiven Effekt durch Isofluran, wobei Isofluran-Inhalation vor einer 15-minütigen Okklusion des *Ramus interventricularis anterior* (*left anterior descending artery*,

LAD) die Kontraktilität verbesserte (Wartier *et al.*, 1988). Auch bei einer Postkonditionierung mit Isofluran konnte eine Kardioprotektion im Sinne einer verbesserten Kontraktilität und reduzierter Infarktgrößen beschrieben werden (Feng *et al.*, 2006). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Protektion über mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird (Krolikowski *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.*, 2016). Auch der RISK-Signalweg spielt dabei anscheinend eine Rolle, da gezeigt wurde, dass in alten Ratten die Inhibition der Kardioprotektion durch Isofluran-Postkonditionierung mit einer fehlenden Aktivierung von involvierten Proteinkinasen, wie Akt oder ERK, einherging (Chang *et al.*, 2012).

Der kardioprotektive Effekt von Isofluran kann nicht nur über Signalwege auf der Ebene der Proteine, sondern auch über die Expressionsregulation von miRNAs vermittelt werden. Erstens kann Isofluran die Expression von miR-21-5p in Mäuseherzen und isolierten Kardiomyozyten induzieren. Zweitens führte ein KO der miR-21-5p in Mäusen dazu, dass diese nicht mehr von einem kardioprotektiven Effekt auf die Infarktgrößenreduktion durch Präkonditionierung mit Isofluran profitieren konnten (Olson *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015). Weiterhin konnte dieselbe Arbeitsgruppe in einem *in vitro* Ansatz mit isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass Isofluran die Öffnung der mPTP verzögert, wobei dieser Effekt bei den Kardiomyozyten der miR-21-5p-KO-Mäusen fehlte (Qiao *et al.*, 2015). Für miR-21-5p ist somit bereits eine Rolle bei der Präkonditionierung mit Isofluran in Mäusen beschrieben. Bisher war aber nicht bekannt, ob die Expression von miR-1-3p ebenfalls durch Isofluran reguliert wird und ob diese eine Rolle bei der Kardioprotektion durch Isofluran spielen könnte.

1.4.2. Milrinon

Milrinon ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase 3 (PDE3) und wird unter anderem bei herzchirurgischen Eingriffen als positiver inotroper Wirkstoff und pulmonaler Vasodilatator eingesetzt (Rong *et al.*, 2019). Durch die Inhibition der PDE3 steigt die Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Satoh *et al.*, 1990), welches wiederum die PKA aktiviert und dadurch einen Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} auslöst (Sanada *et al.*, 2001). Im Jahr 2001 beschrieben Sanada *et al.* erstmals einen kardioprotektiven Effekt durch eine Präkonditionierung mit Milrinon im Hund (Sanada *et al.*, 2001). Die Autoren zeigten in dieser Studie, dass die Protektion durch Milrinon über einen cAMP-, PKA-, und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-abhängigen Mechanismus vermittelt wird (Sanada *et al.*, 2001). Auch bei einem I/R-Schaden an anderen Organen, wie Leber (Kume *et al.*, 2006) und

Gehirn (Saklani *et al.*, 2010), konnte ein protektiver Effekt durch die Präkonditionierung mit Milrinon nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde auch für die Postkonditionierung mit Milrinon eine Kardioprotektion beschrieben, die anscheinend über eine Inhibition der mPTP-Öffnung vermittelt wird (Matsumoto *et al.*, 2012).

Sanada *et al.* zeigten zwar bereits einen kardioprotektiven Effekt durch die Präkonditionierung mit Milrinon und konnten auch die ersten Stufen der Signalkaskade aufdecken, jedoch ist die Signalübertragung in das Mitochondrium und die folgende mitochondriale Signalkaskade bisher nicht weiter untersucht worden. Ebenso ist bislang nicht bekannt gewesen, ob die mBK_{Ca} -Kanäle beim kardioprotektiven Signalmechanismus der Postkonditionierung mit Milrinon involviert sind.

1.4.3. Levosimendan

Der Calcium-Sensitizer Levosimendan erhöht durch die Interaktion mit dem kardialen Troponin C die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} in Kardiomyozyten, ohne dabei die intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} zu steigern, wodurch ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs umgangen wird (Brixius *et al.*, 2002; Papp *et al.*, 2012). Unter anderem durch die Hemmung von PDE3, einer gemeinsamen Eigenschaft mit Milrinon, wirkt Levosimendan positiv-inotrop (Cosentino *et al.*, 2020), wobei es keinen Effekt auf die diastolische Funktion hat (Brixius *et al.*, 2002; Papp *et al.*, 2012). Seine vasodilatatorischen Eigenschaften vermittelt Levosimendan durch das Öffnen von K_{ATP} -Kanälen im Gefäßsystem, wengleich auch eine Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen durch Levosimendan zur Vasodilatation an Koronararterien von Schweinen (Usta *et al.*, 2006) und humanen *Arteriae thoracicae internae* (*human internal thoracic arteries*) (Pataricza *et al.*, 2003) beschrieben wurde. Levosimendan wird zur Behandlung von akutem Herzversagen eingesetzt und kann bei einem präoperativen Einsatz unter bestimmten Bedingungen die Mortalität verringern (Levin *et al.*, 2012). Ein kardioprotektiver Effekt durch die Präkonditionierung mit Levosimendan konnte erstmals von Leprán *et al.* in einem *in vitro* Modell für I/R an isolierten, perfundierten Kaninchenherzen im Sinne einer reduzierten Infarktgröße und einer verbesserten Herzfunktion demonstriert werden (Lepran *et al.*, 2006). Für die Postkonditionierung mit Levosimendan konnte ebenfalls eine Reduktion der Infarktgröße als kardioprotektiver Effekt von du Toit *et al.* gezeigt werden (du Toit *et al.*, 2008). Die Forschergruppe beobachtete an isolierten Meerschweinchenherzen, dass mK_{ATP} -Kanäle und der RISK-Signalweg die Kardioprotektion durch Postkonditionierung

mit Levosimendan vermitteln (du Toit *et al.*, 2008). Ein kardioprotektiver Effekt der Postkonditionierung mit Levosimendan konnte zudem in einer *in vivo* Studie an Ratten verifiziert werden. In dieser Studie reduzierte Levosimendan die Infarktgröße in demselben Ausmaß wie eine IPC, wobei eine Kombination beider Konditionierungsmethoden den kardioprotektiven Effekt nicht verstärkte (Honisch *et al.*, 2010). Weiterhin konnten Matsumoto *et al.* bereits zeigen, dass die Regulation der mPTP in die Postkonditionierung mit Levosimendan involviert ist (Matsumoto *et al.*, 2012).

Obwohl bekannt war, dass Levosimendan BK_{Ca}-Kanäle zur Vasodilatation aktivieren kann (Pataricza *et al.*, 2003; Usta *et al.*, 2006), war bisher nicht untersucht worden, ob mBK_{Ca}- oder auch mSK_{Ca}-Kanäle bei der Kardioprotektion durch Konditionierung mit Levosimendan eine Rolle spielen.

1.4.4. Dexmedetomidin

Dexmedetomidin ist ein selektiver α_2 -Adrenorezeptor-Agonist, der zur Sedierung von erwachsenen Patienten auf der Intensivstation verwendet wird (Keating, 2015; Davy *et al.*, 2017). Ein kardioprotektiver Effekt vor I/R-Schaden konnte bereits in experimentellen Studien nachgewiesen werden (Yoshikawa *et al.*, 2018; Bunte *et al.*, 2020). Bei der Präkonditionierung mit Dexmedetomidin kann der protektive Effekt vor einem I/R-Schaden über den BK_{Ca}-Kanal vermittelt werden, da der BK_{Ca}-Inhibitor Paxillin eine Reduktion der Infarktgröße durch Dexmedetomidin in einem isolierten, perfundierten Rattenherz aufhob (Behmenburg *et al.*, 2017). Auch der mK_{ATP}-Kanal spielt eine Rolle bei der Protektion vor einem I/R-Schaden durch Präkonditionierung mit Dexmedetomidin, denn in einem Rattenmodell für zerebralen I/R-Schaden hob der mK_{ATP}-Kanal-Inhibitor 5HD eine Protektion durch Dexmedetomidin auf (Yuan *et al.*, 2017). Die Postkonditionierung mit Dexmedetomidin hat ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt durch Reduktion der Infarktgröße nach I/R-Schaden; dieser Effekt ist interessanterweise anscheinend unabhängig von der Dauer und dem Startzeitpunkt der Applikation während der Reperfusion (Bunte *et al.*, 2020). Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob die Kardioprotektion der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin ebenfalls über BK_{Ca}- und/oder mK_{ATP}-Kanäle vermittelt wird.

Fragestellung

Trotz intensiver Forschung sind die Mechanismen der Kardioprotektion mittels pharmakologischer Prä- und Postkonditionierung bisher nicht vollständig charakterisiert. Um ein besseres Verständnis der Mechanismen zu erlangen, wurden im Einzelnen folgende Fragen experimentell bearbeitet:

1. Welchen Einfluss haben die Inhalation von Isofluran und eine I/R-Intervention auf die Expression von miR-1-3p und miR-21-5p im Rattenherz? Ist die Expression der beiden miRNAs über Hif1 α reguliert? Wie wirkt sich eine Expressionsveränderung von miR-21-5p auf das direkte Hif1 α -Ziel PDCD4 aus?
2. Ist die Kardioprotektion durch die Präkonditionierung mit Milrinon über die Aktivierung von mBK_{Ca}-Kanälen, die Freisetzung von ROS und die Inhibierung der mPTP vermittelt?
3. Ist auch die Kardioprotektion mittels Postkonditionierung mit Milrinon über die Aktivierung von mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt?
4. Wird eine Kardioprotektion durch eine Präkonditionierung mit Levosimendan über mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt?
5. Ist für den Infarkt-reduzierenden Effekt der Postkonditionierung mit Levosimendan die Aktivierung von mSK_{Ca}- und/oder mBK_{Ca}-Kanälen notwendig?
6. Ist für die Signaltransduktion des kardioprotektiven Effekts durch Postkonditionierung mit Dexmedetomidin die Aktivierung der mBK_{Ca}- und mK_{ATP}-Kanäle essentiell? Ist die Aktivierung der beiden Kanäle zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion für die Kardioprotektion verantwortlich?

2. Methoden

2.1. *In vitro* Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens: Isoliertes, perfundiertes Rattenherz (Langendorff-Apparatur)

Vor der Herzisolation wurden männliche Wistar-Ratten mit 80 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital per intraperitonealer (i.p.) Injektion betäubt und nach 5 min dekapitiert. Nach einer Thorakotomie wurden die Herzen isoliert und in eine druckkonstante Langendorff-Apparatur (80 mmHg) integriert. Die Herzen wurden mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP: 116 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24,9 mM NaHCO₃; 2,5 mM CaCl₂; 8,3 mM Glukose; 2,2 mM Pyruvat) perfundiert und dabei bei einer konstanten Temperatur von 37 °C gehalten. Zur Messung der hämodynamischen Parameter wurde ein flüssigkeitsgefüllter Ballon in den linken Ventrikel eingebracht und ein enddiastolischer Druck von 4-8 mmHg eingestellt. Der Ballon war mit einem Druckaufnehmer gekoppelt und leitete kontinuierlich den linksventrikulären Druck an ein Datenerfassungssystem (PowerLab) mit einer Aufnahmezeit von 500 Hz weiter. Diese Signale wurden mittels Chart für Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) auf einem Computer aufgezeichnet; es wurden folgende Variablen bestimmt: linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP, mmHg), linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP, mmHg), linksventrikulärer entwickelter Druck (LVDP, LVDP = LVESP - LVEDP, mmHg), Herzfrequenz (bpm), Zeitpunkt der maximalen Ischämiekontraktur (min), Druckmaxima der Ischämiekontraktur (mmHg). Aus dem Durchfluss des Puffers durch das Herz wurde der Koronarfluss zu definierten Zeitpunkten abgeleitet. Alle Herzen durchliefen an der Apparatur eine 20-minütige Adaptation, eine 33-minütige Ischämie und eine 60-minütige Reperfusion. Je nach Versuchsprotokoll erfolgten vor oder nach der Ischämie Substanzgaben über Perfusoren. Zur Einleitung einer Ischämie wurde die Perfusion gestoppt und das Herz in einem Bad aus Stickstoff-gesättigtem KHP inkubiert. Zur Reperfusion wurde die Perfusion des Herzens wiederhergestellt und das Herz aus dem Ischämie-Bad entfernt.

2.2. *In vivo* Modell des Ischämie/Reperfusionsschadens: Okklusion des *Ramus interventricularis anterior*

Zur Einleitung der Anästhesie wurden 12 Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten i.p. 80 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Deutschland) verabreicht.

Die Anästhesie wurde über eine kontinuierliche Infusion von 40 mg/kg Körpergewicht/h Pentobarbital über einen Katheter in der *Vena jugularis* aufrechterhalten. Zur Aufzeichnung der hämodynamischen Variablen wurde ein arterieller Zugang über die linke *Arteria carotis* gelegt. Nach einer linksseitigen lateralen Thorakotomie wurde eine Naht (5-0) um den *Ramus interventricularis anterior* (LAD) gelegt. Zur Induktion der Ischämie wurde das Gefäß mit der Naht okkludiert und zur Reperfusion die Okklusion gelöst.

Nach der Reperfusion wurde zur Separation des Infarktgebietes (*area at risk*; AAR) vom gesunden Herzgewebe (*area not at risk*; non-AAR) vor der Herzentnahme das Gefäß wieder verschlossen und 4 ml Evans Blau-Lösung intravenös injiziert. Die non-AAR färbt sich dabei blau an, während die AAR ungefärbt bleibt. Die beiden Gewebeareale wurden separiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.3. Infarktgrößenbestimmung

Nach Versuchsende wurden die Herzen in sieben transversale Scheiben, beginnend am Apex und endend kurz vor der Klappenebene, geschnitten. Die Herzscheiben wurden daraufhin für 15 min mit 0,75%iger 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC) gefärbt und für 24 h in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach dem Scannen der Scheiben wurde in jeder einzelnen Scheibe die Fläche des Infarktgebiets und des gesamten linken Ventrikels per Planimetrie durch einen verblindeten Untersucher mittels SigmaScan Pro 5 (SPPS Science Software, Chicago, USA) bestimmt. Für die *in vivo* Versuche wurde die prozentuale Infarktgröße aus dem Verhältnis der Infarktgröße und dem Risikogebiet bestimmt. Für die *in vitro* Versuche wurde die prozentuale Infarktgröße aus dem Verhältnis der Infarktgröße und der gesamten Größe des linken Ventrikels bestimmt.

2.4. RNA-Isolation und quantitative PCR-Analyse

Die Isolation von RNA aus gefrorenem Herzgewebe erfolgte mittels TRIzol™-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Zur Überprüfung der Integrität und Reinheit der isolierten RNA sowie der Konzentrationsbestimmung wurden eine Agarose-Gelelektrophorese und eine Spektrophotometrie (Nano-Drop ND-1000, Thermo Scientific, Waltham) bei Absorptionen von 230 und 260 nm durchgeführt.

Für die reverse Transkription der Gesamt-RNA wurde der RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die quantitative Polymerasekettenreaktion

(qPCR) zur Analyse der miRNA-Expression wurde mit TaqMan™ microRNA-Assays 20X (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt: rno-miR-1-3p (Assay ID: 002064), U6 (Assay ID: 001973), hsa-miR-21-5p (Assay ID: 000397). Die qPCR zur Analyse der mRNA-Expression wurde mit TaqMan™ Gene Expression Assays 20X (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mittels ABI 7300HT Thermocycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit folgendem PCR-Protokoll durchgeführt: 50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s, 60 °C für 60 s. Es wurden folgende Assays eingesetzt: Hämoxygenase 1 (HO-1, Rn01536933_m1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF, Rn01511601_m1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Rn01462661_g1). Die relative Expression der miRNA und mRNA wurde mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode berechnet (Pfaffl, 2001).

2.5. Proteinisolation und Western Blot Analyse

Zur Herstellung eines Gesamtzelllysats wurde gefrorenes Gewebe in Lysispuffer (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na-EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP40; 2,5 mM Natriumpyruvat, 2,5 mM Natriumvanadat, Protease-Inhibitor Mix Complete) homogenisiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration über die Lowry Methode (Lowry *et al.*, 1951) wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte über Chemilumineszenz.

2.6. Versuchsprotokolle

Die jeweiligen Versuchsprotokolle der Originalpublikationen dieser Schrift werden im Folgenden kurz beschrieben. Die ausführlichen Beschreibungen der Studien sind den Originalpublikationen zu entnehmen.

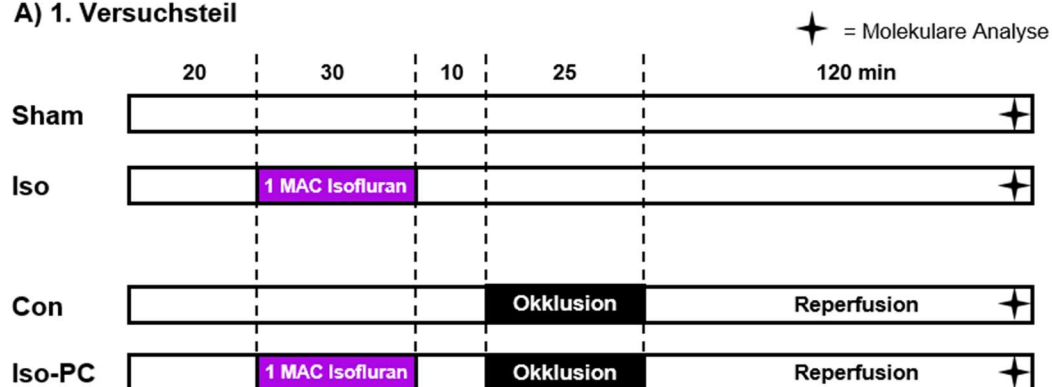
2.6.1. Rolle von microRNA-Expression bei der Präkonditionierung mit Isofluran

In Publikation 1 wurde anhand eines *in vivo* I/R-Modells untersucht, ob eine Präkonditionierung mit Isofluran zu Veränderungen der Expression ausgewählter miRNAs führt. Zur Versuchsvorbereitung wurden alle Tiere mit Pentobarbital anästhesiert und nach einer Thorakotomie eine Naht um die LAD positioniert. Der erste Versuchsteil diente der Gewebebegewinnung für die Molekularanalyse (Abbildung 1 A), während der zweite Versuchsteil (Abbildung 1 B) für die Infarktgrößenbestimmung genutzt wurde.

Im 1. Versuchsteil wurden männliche Wistar-Ratten in vier Gruppen randomisiert. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Tiere entweder keine weitere Intervention (Sham), eine

30-minütige Inhalation von 1 MAC (minimale alveoläre Konzentration) Isofluran (1,5 % Isofluran, 40 % Sauerstoff in Druckluft) (Iso), eine 25-minütige Okklusion der LAD mit anschließender Reperfusion von 120 min (Con) oder eine Inhalation mit 1 MAC Isofluran vor der Okklusion mit anschließender Reperfusion (Iso-PC). Mit Hilfe einer Evans Blau-Färbung wurde das perfundierte (non-AAR) vom nicht perfundierten Gewebe (AAR) getrennt und für die Molekularanalyse verwendet. Mit qPCR wurden die Expressionen von miR-1-3p und miR-21-5p sowie die Expression der mRNA von HO-1 und VEGF bestimmt. Die Proteinexpression von PDCD4 wurde mit einer Western Blot-Analyse untersucht.

A) 1. Versuchsteil



B) 2. Versuchsteil

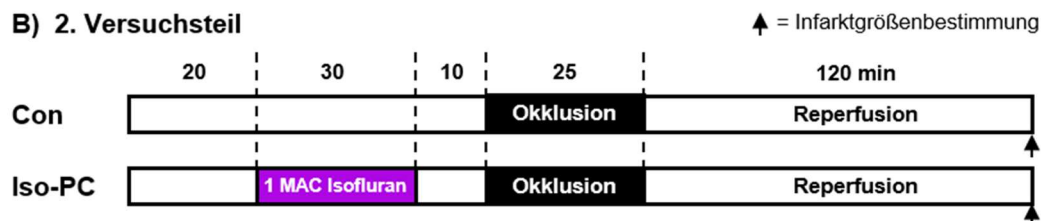


Abbildung 1: Experimentelles Protokoll zur Analyse der miRNA-Expression bei einer Präkonditionierung mit Isofluran (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). A) 1. Versuchsteil zur Gewebegewinnung für die Molekularanalyse. B) 2. Versuchsteil zur Infarktgrößenbestimmung. Iso = Isofluran, Con = Kontrollgruppe, PC = Präkonditionierung, MAC = minimale alveoläre Konzentration.

Im 2. Versuchsteil wurden männliche Wistar-Ratten in zwei Gruppen randomisiert. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Tiere eine 25-minütige Okklusion der LAD mit anschließender Reperfusion von 120 min (Con) oder eine Inhalation mit 1 MAC Isofluran vor der Okklusion mit anschließender Reperfusion (Iso-PC). Nach Versuchsende wurde die Infarktgröße per TTC-Färbung bestimmt.

2.6.2. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Präkonditionierung mit Milrinon

In Publikation 2 wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Milrinon ermittelt und der zugrundeliegende Mechanismus in Hinblick auf eine Beteiligung von mBK_{Ca}-Kanälen, ROS-Freisetzung und Inhibition der mPTP untersucht. Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Apparatur das folgende Protokoll: 20 min Adaptation, 10 min Substanzapplikation, 33 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

Im 1. Teil der Studie wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt (Abbildung 2). Die Ratten wurden in 5 Gruppen randomisiert (n = 7-9 pro Gruppe). Die Kontrollgruppe (Con) erhielt nur Vehikel. Die Herzen der weiteren Gruppen erhielten je nach Zugehörigkeit 0,3, 1, 3 oder 10 µM Milrinon für eine Dauer von 10 min bis unmittelbar vor Beginn der Ischämie.

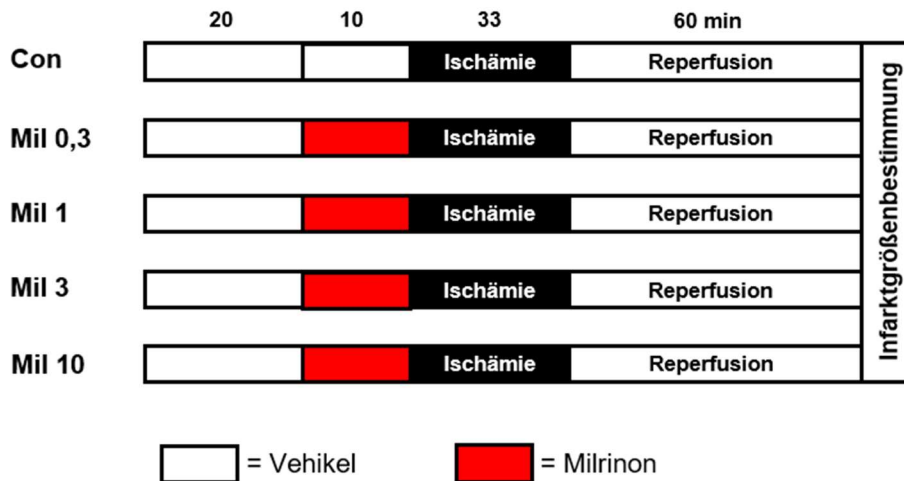


Abbildung 2: Experimentelles Protokoll zur Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil X = Milrinon X µM.

Im 2. Teil der Studie wurde der Mechanismus, über den die Kardioprotektion durch die Präkonditionierung mit Milrinon vermittelt wird, untersucht (Abbildung 3). Die Ratten wurden in 8 Gruppen randomisiert (n = 7-9 pro Gruppe). Die Kontrollgruppe (Con) erhielt nur Vehikel. Die Herzen der Gruppe Mil wurden mit 1 µM Milrinon perfundiert. Diese Konzentration war im 1. Teil als niedrigste Konzentration mit maximalem protektiven Effekt bestimmt worden. Zur Überprüfung, ob die mBK_{Ca}-Kanäle am protektiven Mechanismus beteiligt sind, wurde der mBK_{Ca}-Kanal-Inhibitor Paxillin (Pax, 1 µM) eingesetzt. Die Beteiligung der ROS wurde durch die Gabe des ROS-Fängers N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG, 1 mM) analysiert. Die Gabe von

200 nM Cyclosporin A (CsA) erfolgte zur Prüfung, ob die mPTP-Inhibition eine Rolle in diesem Kontext spielt.

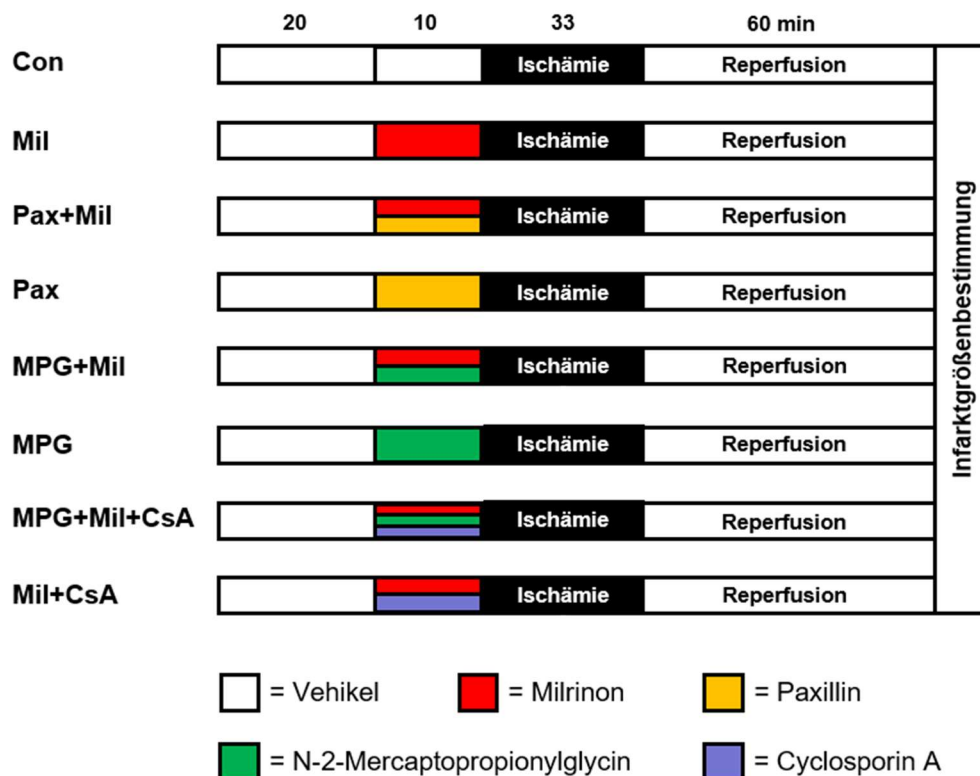


Abbildung 3: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Mechanismen der Präkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil = Milrinon 1 μ M, Pax = Paxillin 1 μ M, MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin 1 mM, CsA = Cyclosporin A 200 nM.

2.6.3. Beteiligung von K^+ -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon

In Publikation 3 wurde anhand eines *in vitro* I/R-Modells des isolierten, perfundierten Herzens eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die Postkonditionierung mit Milrinon erstellt und untersucht, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals in diesem Kontext von Bedeutung ist. Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Apparatur das folgende Protokoll: 20 min Adaptation, 33 min Ischämie, 60 min Reperfusion. Zu Beginn der Reperfusion startete eine 10-minütige Substanzapplikation. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

Zuerst wurde in einer Dosis-Wirkungs-Studie die niedrigste Konzentration für die Postkonditionierung mit Milrinon ermittelt, die den größten protektiven Effekt auf die Infarktgrößen nach einem I/R-Schaden bewirkte (Abbildung 4). Dazu wurden männliche Ratten in 7 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen erhielten an der Langendorff-

Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit im Anschluss an die Ischämie nur Vehikel (Con) oder 0,3, 1, 3, 10, 30 oder 100 μM Milrinon.

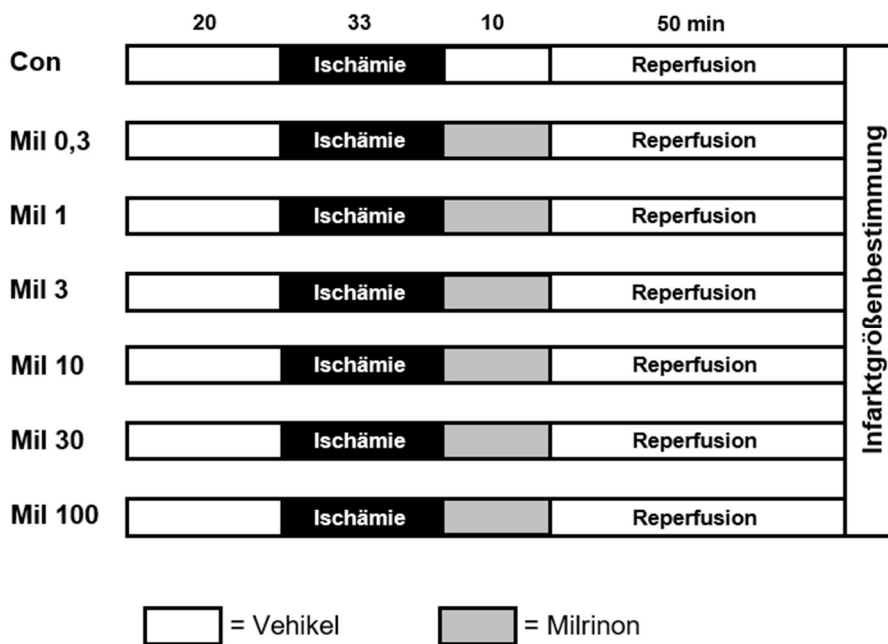


Abbildung 4: Experimentelles Protokoll zur Dosis-Wirkungs-Studie für die Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 3, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil X = Milrinon X μM .

Im 2. Studienteil wurde analysiert, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals eine Rolle bei der Kardioprotektion mittels Postkonditionierung mit Milrinon spielt (Abbildung 5). Dazu wurden männliche Ratten in 4 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen erhielten an der Langendorff-Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit im Anschluss an die Ischämie nur Vehikel (Con), 3 μM Milrinon (Mil), 1 μM Paxillin (Pax) oder eine Kombination aus 3 μM Milrinon und 1 μM Paxillin (Pax+Mil).

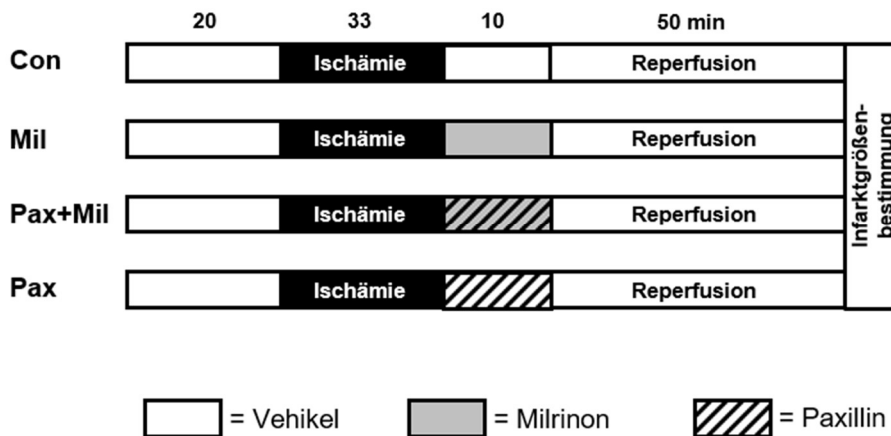


Abbildung 5: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Beteiligung von mBK_{Ca} -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 3, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil = Milrinon $3 \mu M$, Pax = Paxillin $1 \mu M$.

2.6.4. Beteiligung von K^+ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Levosimendan

In Publikation 4 wurde an Hand eines *in vitro* I/R-Modells des isolierten, perfundierten Herzens eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die Präkonditionierung mit Levosimendan erstellt und untersucht, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals in diesem Kontext von mechanistischer Bedeutung ist. Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Apparatur das folgende Protokoll: 20 min Adaptation, 10 min Substanzapplikation, 33 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

Zuerst wurde in einer Dosis-Wirkungs-Studie die niedrigste Konzentration für die Präkonditionierung mit Levosimendan gesucht, die den größten protektiven Effekt auf die Infarktgrößen nach einem I/R-Schaden zeigt (Abbildung 6). Dazu wurden männliche Ratten in 5 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen erhielten an der Langendorff-Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit im Anschluss an die Ischämie nur Vehikel (Con) oder $0,03$, $0,1$, $0,3$ oder $1 \mu M$ Levosimendan.

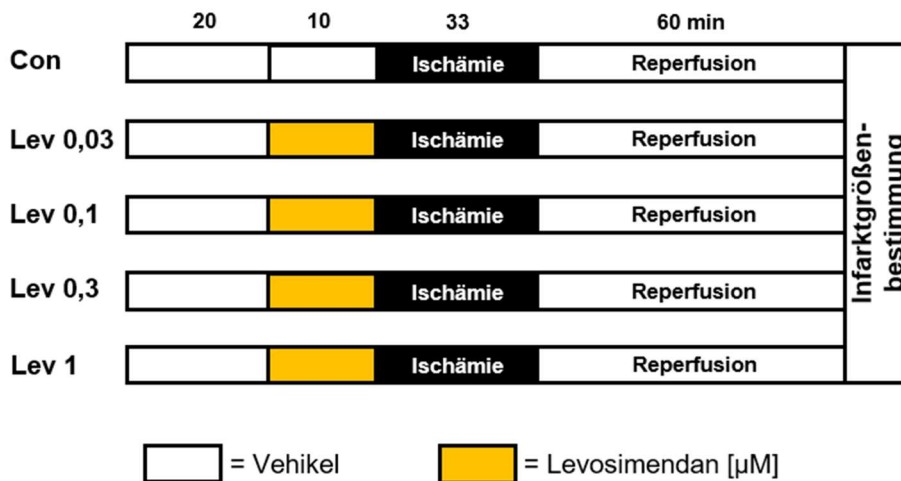


Abbildung 6: Experimentelles Protokoll zur Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Levosimendan (modifiziert nach Publikation 4, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Lev X = Levosimendan X μM .

Im 2. Studienteil wurde analysiert, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals eine Rolle bei der Kardioprotektion mittels einer Präkonditionierung mit Levosimendan spielt (Abbildung 7). Dazu wurden männliche Ratten in 4 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen erhielten an der Langendorff-Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit vor der Ischämie nur Vehikel (Con), 0,3 μM Levosimendan (Lev), 1 μM Paxillin (Pax) oder eine Kombination aus 0,3 μM Levosimendan und 1 μM Paxillin (Pax+Lev).

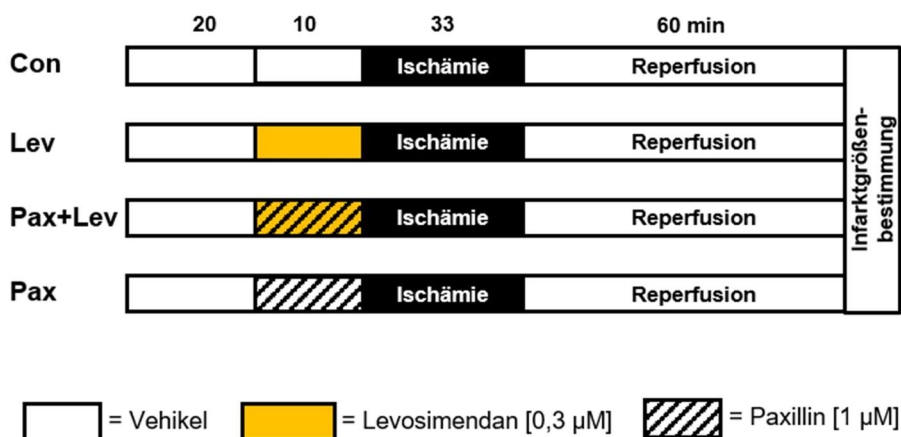


Abbildung 7: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Beteiligung von mBK_{Ca} -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 4, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Lev = Levosimendan 0,3 μM , Pax = Paxillin 1 μM .

2.6.5. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Postkonditionierung mit Levosimendan

In Publikation 5 wurde an Hand eines *in vitro* I/R-Modells des isolierten, perfundierten Herzens eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die Postkonditionierung mit Levosimendan erstellt und untersucht, ob die Signaltransduktion für den kardioprotektiven Effekt über mSK_{Ca}- und/oder mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird. Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Apparatur das folgende Protokoll: 20 min Adaptation, 33 min Ischämie, 60 min Reperfusion. Zu Beginn der Reperfusion startete eine 10-minütige Substanzapplikation. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

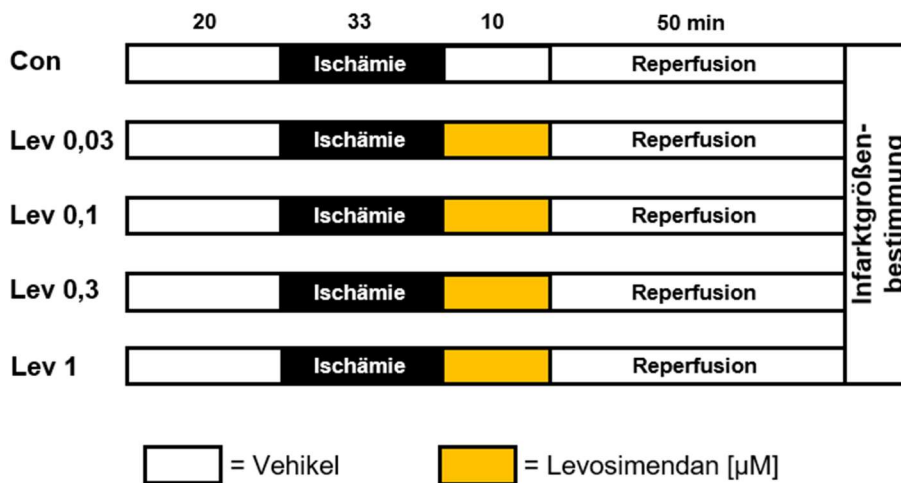


Abbildung 8: Experimentelles Protokoll zur Dosis-Wirkungs-Studie für die Postkonditionierung mit Levosimendan (modifiziert nach Publikation 5, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Lev X = Levosimendan X µM.

Im 1. Teil der Studie wurde in einer Dosis-Wirkungs-Studie die niedrigste Konzentration für die Postkonditionierung mit Levosimendan gesucht, die den größten protektiven Effekt auf die Infarktgrößen nach einem I/R-Schaden bewirkte (Abbildung 8). Dazu wurden männliche Ratten in 5 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen wurden an der Langendorff-Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit im Anschluss an die Ischämie nur mit Vehikel (Con) oder 0,03, 0,1, 0,3 oder 1 µM Levosimendan für 10 Minuten perfundiert.

Im 2. Studienteil wurde analysiert, ob die Aktivierung der mSK_{Ca}- und/oder mBK_{Ca}-Kanäle eine Rolle bei der Kardioprotektion durch Postkonditionierung mit Levosimendan spielen (Abbildung 9). Dazu wurden männliche Wistar-Ratten in 6 Gruppen randomisiert. Die isolierten Rattenherzen wurden an der Langendorff-Apparatur je nach Gruppenzugehörigkeit nach der Ischämie nur mit Vehikel (Con), 0,3 µM Levosimendan (Lev), 1 µM Paxillin (Pax, Inhibitor der mBK_{Ca}-Kanäle) oder 0,1 µM *N-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-*

benzimidazole-2-amin hydrochloride (NS8593, Inhibitor der SK_{Ca}-Kanäle) perfundiert. Zwei Versuchsgruppen erhielten eine Kombination aus den jeweiligen Inhibitoren und 0,3 µM Levosimendan.

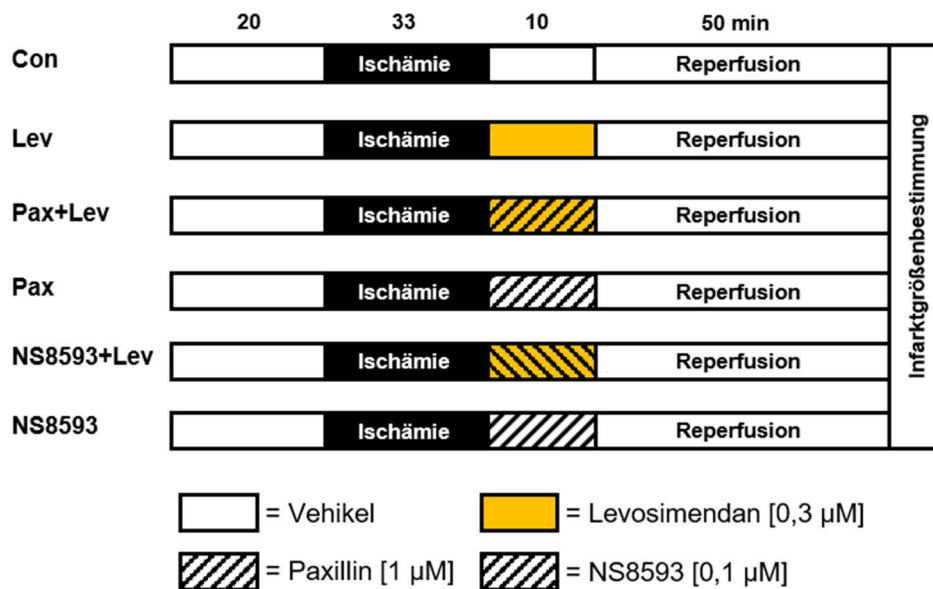


Abbildung 9: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Beteiligung von mSK_{Ca}- und mBK_{Ca}-Kanälen bei der Postkonditionierung mit Levosimendan (modifiziert nach Publikation 5, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Lev = Levosimendan 0,3 µM, Pax = Paxillin 1 µM, NS8593 = N-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-benzimidazole-2-amin hydrochloride 0,1 µM.

2.6.6. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin

In Publikation 6 wurde untersucht, ob die Aktivierung von mBK_{Ca}- und/oder mK_{ATP}-Kanälen an der Signaltransduktion zur Kardioprotektion mittels Postkonditionierung mit Dexmedetomidin beteiligt ist und ob diese Kanäle zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusionsphase aktiviert werden. Dazu wurden Ratten in 9 Gruppen randomisiert (n = 9-10 pro Gruppe, Abbildung 10). Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Apparatur das folgende Protokoll: 15 min Adaptation, 33 min Ischämie, 60 min Reperfusion. Die Reperfusionsphase beinhaltete zwei 10-minütige Applikationsphasen für Substanzen. Die 1. Applikation startete direkt zu Beginn der Reperfusionsphase und die zweite Applikation startete 30 min nach Reperfusionsbeginn. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

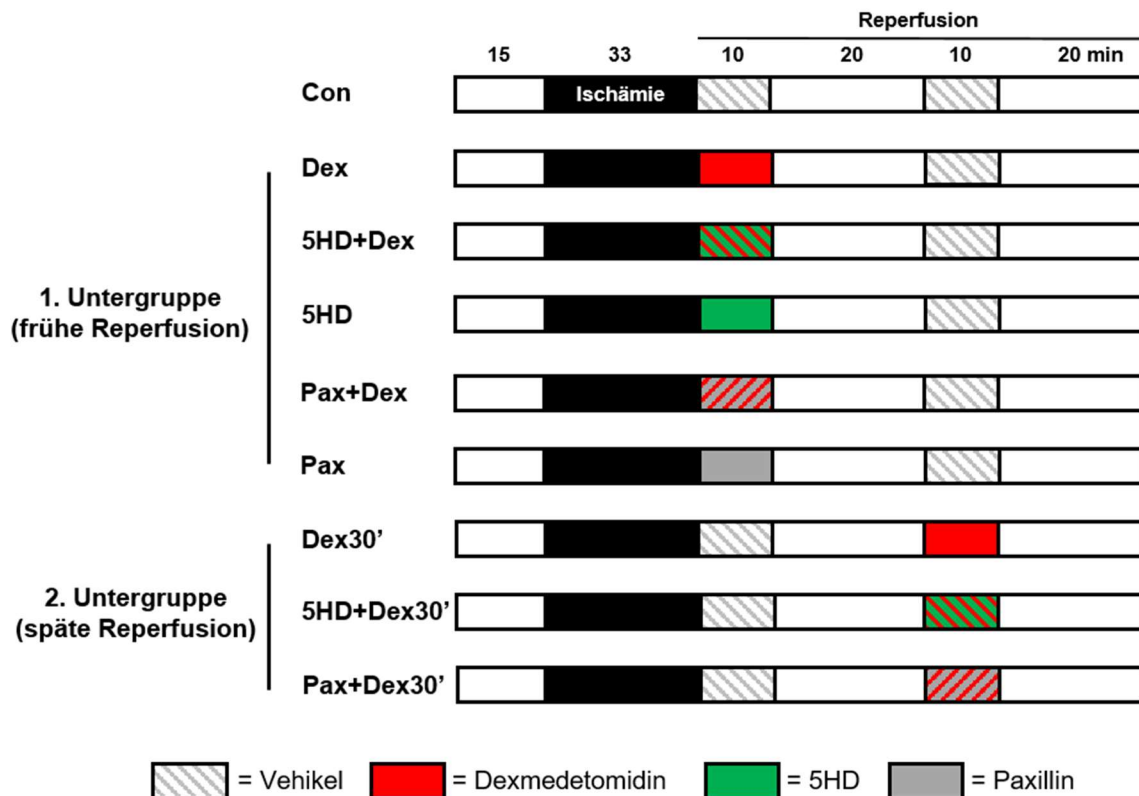


Abbildung 10: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Beteiligung von mBK_{Ca} - und/oder mK_{ATP} -Kanälen am protektiven Effekt durch eine Postkonditionierung mit Dexmedetomidin in der frühen und späten Phase der Reperfusion (modifiziert nach Publikation 6, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Dex = Dexmedetomidin 3 nM, 5HD = 5-Hydroxydecanoat 100 μ M, Pax = Paxillin 1 μ M, Dex30' = Dexmedetomidin 3 nM, Gabe 30 min nach Beginn der Reperfusion.

Die Kontrollgruppe erhielt in beiden Applikationsphasen nur das Vehikel. Die Herzen der 1. Untergruppe (frühe Reperfusion) wurden in der 1. Applikationsphase spezifisch und in der 2. Applikationsphase nur mit Vehikel behandelt. Die spezifische Behandlung bestand aus 3 nM Dexmedetomidin, 100 μ M 5-Hydroxydecanoat (5HD, mK_{ATP} -Kanal-Inhibitor), 1 μ M Paxillin (Pax, mBK_{Ca} -Kanal-Inhibitor) oder einer Kombination der jeweiligen Inhibitoren und Dexmedetomidin. Die Herzen der 2. Untergruppe (späte Reperfusion) wurden in der 1. Applikationsphase nur mit Vehikel und in der 2. Applikationsphase spezifisch behandelt. Die spezifische Behandlung bestand aus 3 nM Dexmedetomidin oder einer Kombination der jeweiligen Inhibitoren und Dexmedetomidin.

3. Ergebnisse

3.1. Rolle von microRNA-Expression bei der Präkonditionierung mit Isofluran

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Inhalation von Isofluran die Expression von miR-21-5p steigern kann (Olson *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob dies auch für miR-1-3p zutrifft, inhalierten die Ratten Luft mit oder ohne Isofluran und im Anschluss wurde im Herzgewebe die Expression der miRNAs analysiert (Publikation 1). Die Expression von miR-21-5p wurde durch Isofluran im Vergleich zu Sham-Gruppe gesteigert (Iso: 172 ± 56 % vs. Sham: 100 ± 27 %, $p < 0,05$; Abbildung 11 A). Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied der Expression von miR-1-3p zur entsprechenden Kontrolle festgestellt werden (Iso: 94 ± 16 % vs. Sham: 100 ± 27 %, n. s.; Abbildung 11 B). Wurde die Isofluran-Inhalation als Präkonditionierung vor einer I/R-Intervention eingesetzt, traten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ebenfalls keine Veränderungen in der Expression von miR-21-5p (Abbildung 11 C) oder miR-1-3p auf (Abbildung 11 D).

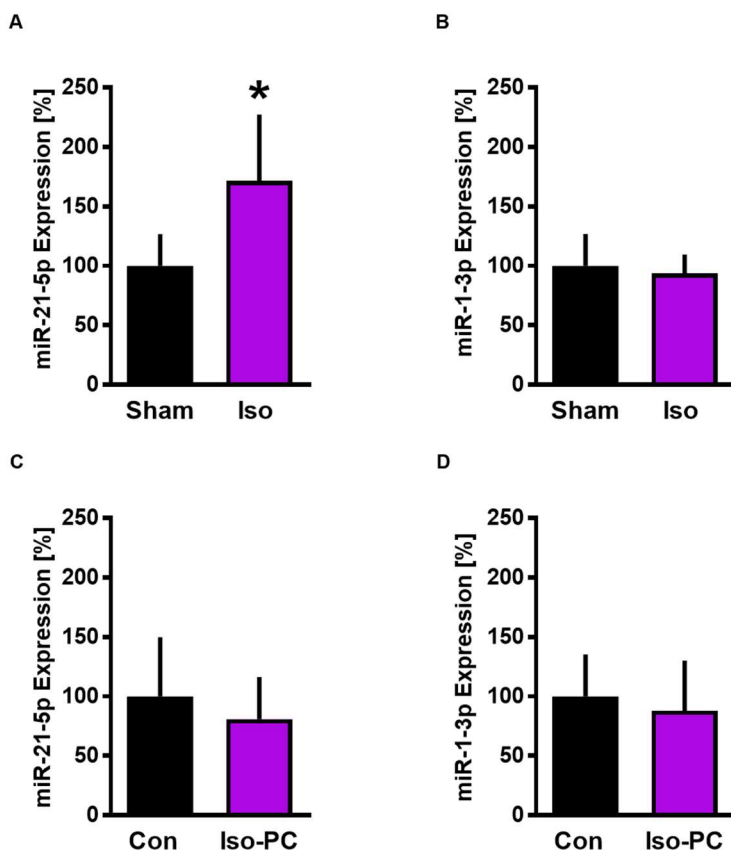


Abbildung 11: Quantitative Analyse der miRNA-Expression im Herzgewebe (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). A/B: Expression der miR-21-5p (A) und miR-1-3p (B) ohne (Sham) oder mit Inhalation von 1 MAC Isofluran (Iso). C/D: Expression der miR-21-5p (C) und miR-1-3p (D) ohne (Con) oder mit Inhalation von 1 MAC Isofluran (Iso-PC) vor regionaler Ischämie mit anschließender Reperfusion. Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Sham.

Der kardioprotektive Effekt einer Präkonditionierung mit Isofluran äußerte sich in einer signifikanten Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrolle (Con: 65 ± 12 % vs. Iso-PC: 43 ± 15 %, $p < 0,05$; Abbildung 12).

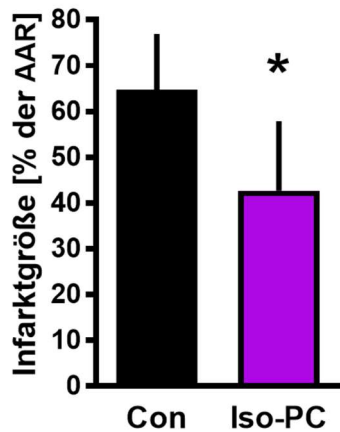


Abbildung 12: Infarktgrößen der Herzen von Ratten ohne (Con) oder mit Inhalation von 1 MAC Isofluran (Iso-PC) vor regionaler Ischämie mit anschließender Reperfusion (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Mittelwerte \pm SD, $n = 8-9$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Con.

Um eine potentielle Rolle von Hif1 α als Regulator der Expression beider miRNAs in diesem Kontext zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der Hif1 α -Zielgene HO-1 und VEGF analysiert. Die alleinige Behandlung mit Isofluran hatte im Vergleich zur Kontrolle (Sham) keinen Einfluss auf die Expression der mRNA von HO-1 (Iso: 131 ± 76 % vs. Sham: 100 ± 51 %, n. s.; Abbildung 13 A), erhöhte aber die Expression der mRNA von VEGF (Iso: 143 ± 22 % vs. Sham: 100 ± 18 %, $p < 0,05$; Abbildung 13 B). Die Isofluran-Inhalation und eine nachfolgende I/R-Intervention beeinflussten im Vergleich zur Kontrolle (Con) die Expression von HO-1 (Iso-PC: 112 ± 75 % vs. Con: 100 ± 67 %, n. s.; Abbildung 13 C) oder VEGF (Iso-PC: 101 ± 34 % vs. Con: 100 ± 40 %, n. s.; Abbildung 13 D) nicht. Demnach wird die Expression der mRNA des Hif1 α -Zielgens VEGF durch Isofluran induziert, so dass eine Hif1 α -abhängige Regulation von miR-21-5p durch Isofluran vermutet werden kann.

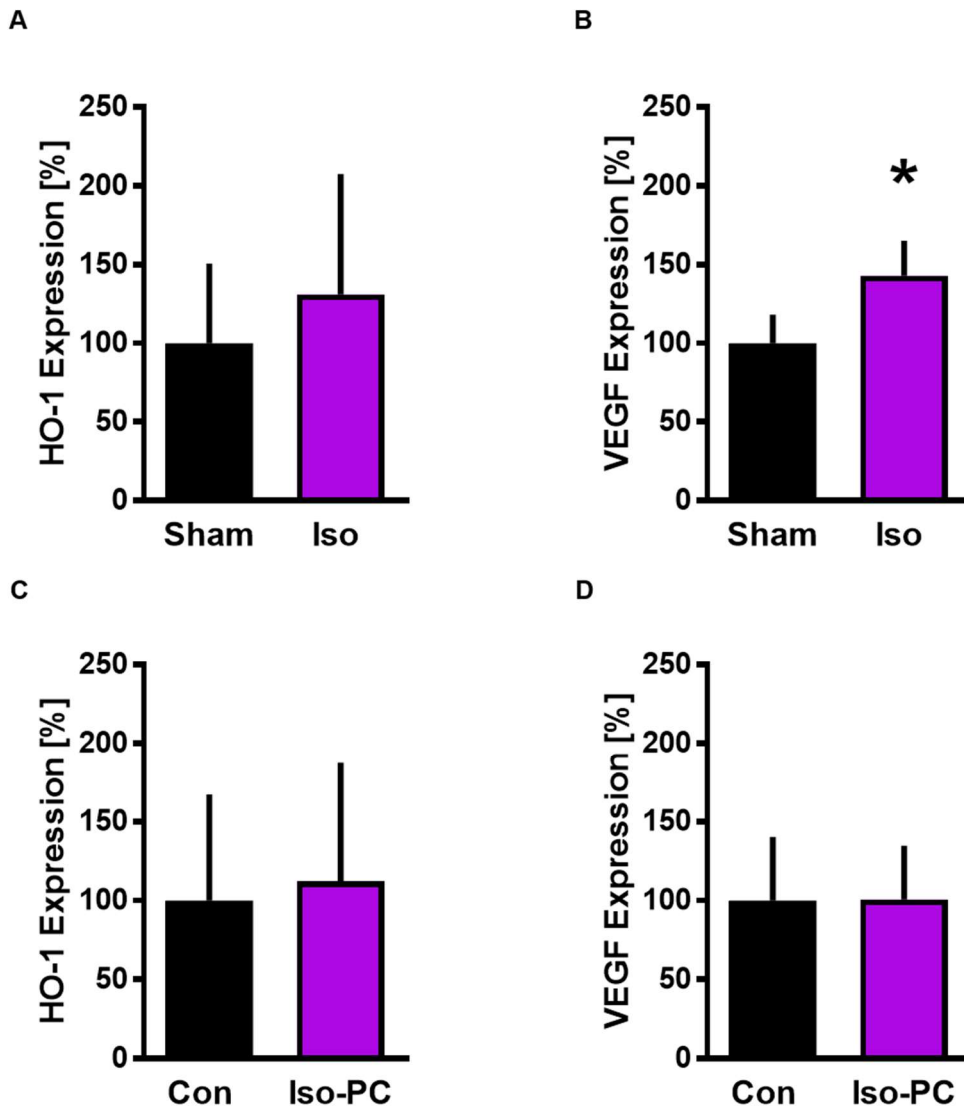


Abbildung 13: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von HO-1 und VEGF im Herzgewebe (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). A/B: Expression der mRNA von HO-1 (A) und VEGF (B) ohne (Sham) oder mit Inhalation von 1 MAC Isofluran (Iso). C/D: Expression der mRNA von HO-1 (C) und VEGF (D) ohne (Con) oder mit Inhalation von 1 MAC Isofluran (Iso-PC) vor regionaler Ischämie mit anschließender Reperfusion. Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ pro Gruppe, $* = p < 0,05$ vs. Sham.

Da die Expression der miR-21-5p durch alleinige Isofluran-Inhalation herunterreguliert war, wurde die Proteinexpression von PDCD4, einem direkten Zielgen der miR-21-5p, untersucht. Die Proteinexpression von PDCD4 war nach Isofluran-Inhalation im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (Iso: 128 ± 41 % vs. Sham: 100 ± 54 %; n. s.; Abbildung 14). Somit wird die Proteinexpression des direkten miR-21-5p Zielgens PDCD4 anscheinend nicht durch Isofluran induziert.

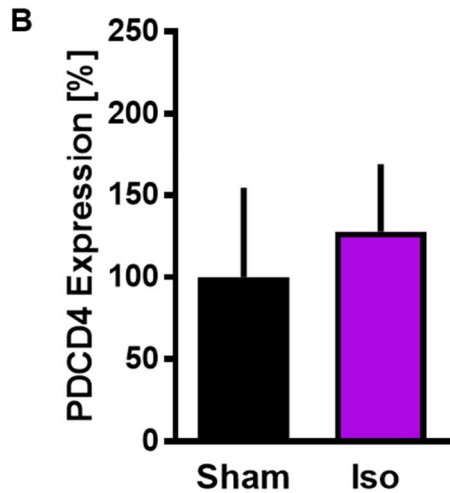
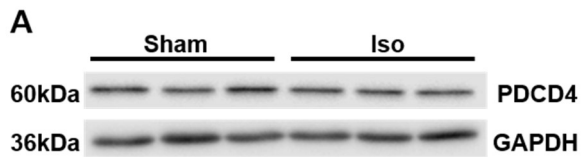


Abbildung 14: Proteinexpression von PDCD4 im Herzgewebe. Vor Organentnahme wurden die Ratten ohne (Sham) oder mit 1 MAC Isofluran (Iso) inhaliert (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). A: Repräsentative Western Blot-Analyse. B: Quantifizierung der Western Blot-Analyse. Mittelwerte \pm SD, n = 6 pro Gruppe.

Im Versuchsteil 1 traten bei den hämodynamischen Variablen Herzfrequenz und mittlerer arterieller Druck keine Veränderungen zwischen den Messzeitpunkten und den Gruppen auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: Hämodynamische Variablen des 1. Versuchsteils (modifiziert nach Publikation 1). Iso = Isofluran, Con = Kontrollgruppe, PC = Präkonditionierung. Mittelwerte \pm SD, n = 6 pro Gruppe.

	Baseline	Ischämie 24	Reperfusion		
			15	60	120 min
Herzfrequenz (min ⁻¹)					
Sham	427 \pm 20		409 \pm 33	403 \pm 20	392 \pm 20
Iso	402 \pm 20		378 \pm 29	390 \pm 32	373 \pm 18
Con	364 \pm 74	407 \pm 18	370 \pm 94	381 \pm 35	342 \pm 75
Iso-PC	400 \pm 31	392 \pm 37	392 \pm 39	425 \pm 34	384 \pm 30
Mittlerer arterieller Druck (mmHg)					
Sham	116 \pm 7		104 \pm 24	102 \pm 22	92 \pm 30
Iso	118 \pm 13		114 \pm 17	105 \pm 26	81 \pm 15
Con	106 \pm 17	113 \pm 11	117 \pm 13	106 \pm 5	84 \pm 29
Iso-PC	115 \pm 37	117 \pm 18	116 \pm 20	107 \pm 24	93 \pm 31

Im 2. Versuchsteil wurden ebenfalls keine Unterschiede in den hämodynamischen Variablen zwischen den Gruppen oder den Zeitpunkten gemessen (Tabelle 2). Nur für die Gruppe Iso-PC wurde eine signifikante Reduktion des mittleren arteriellen Drucks nach 120 min Reperfusion im Vergleich zur Baseline gemessen. Schlussendlich führten die Behandlungen in beiden Versuchsteilen nicht zu einer Veränderung der untersuchten hämodynamischen Variablen.

Tabelle 2: Hämodynamische Variablen des 2. Versuchsteils (modifiziert nach Publikation 1, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Iso = Isofluran, Con = Kontrollgruppe, PC = Präkonditionierung. Mittelwerte \pm SD, n = 6 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Baseline.

	Baseline	Ischämie 24	Reperfusion		
			15	60	120 min
Herzfrequenz (min ⁻¹)					
Con	397 \pm 24	379 \pm 60	378 \pm 65	382 \pm 43	393 \pm 53
Iso-PC	379 \pm 41	336 \pm 50	340 \pm 57	344 \pm 57	332 \pm 56
Mittlerer arterieller Druck (mmHg)					
Con	114 \pm 21	116 \pm 22	114 \pm 29	114 \pm 20	102 \pm 21
Iso-PC	130 \pm 16	102 \pm 27	104 \pm 28	105 \pm 25	86 \pm 18*

3.2. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Präkonditionierung mit Milrinon

Im 1. Studienteil der Publikation 2, einer Dosis-Wirkungs-Studie, wurde die niedrigste und zugleich maximal kardioprotektive Konzentration von Milrinon zur Präkonditionierung bestimmt. Die Infarktgrößen und repräsentative Herzscheiben sind in Abbildung 15 aufgeführt. In der Kontrollgruppe (Con) betrug die Infarktgröße 63 \pm 8 %. Die Präkonditionierung mit 0,3 μ M Milrinon reduzierte die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (Mil 0,3: 49 \pm 6 %, p < 0,05 vs. Con). Die Steigerung der Konzentration von Milrinon auf 1 μ M reduzierte die Infarktgröße weiter (Mil 1: 32 \pm 6 %; p < 0,05 vs. Mil 0,3), wobei eine weitere Konzentrationssteigerung auf 3 μ M und 10 μ M die Infarktgröße nicht weiter verringerte (Mil 3: 32 \pm 6 %, Mil 10: 34 \pm 4 %; jeweils n. s. vs. Mil 1). Somit ist 1 μ M Milrinon die niedrigste Konzentration, bei der noch der maximale kardioprotektive Effekt auftritt und diese Konzentration wurde entsprechend in den weiteren Experimenten verwendet.

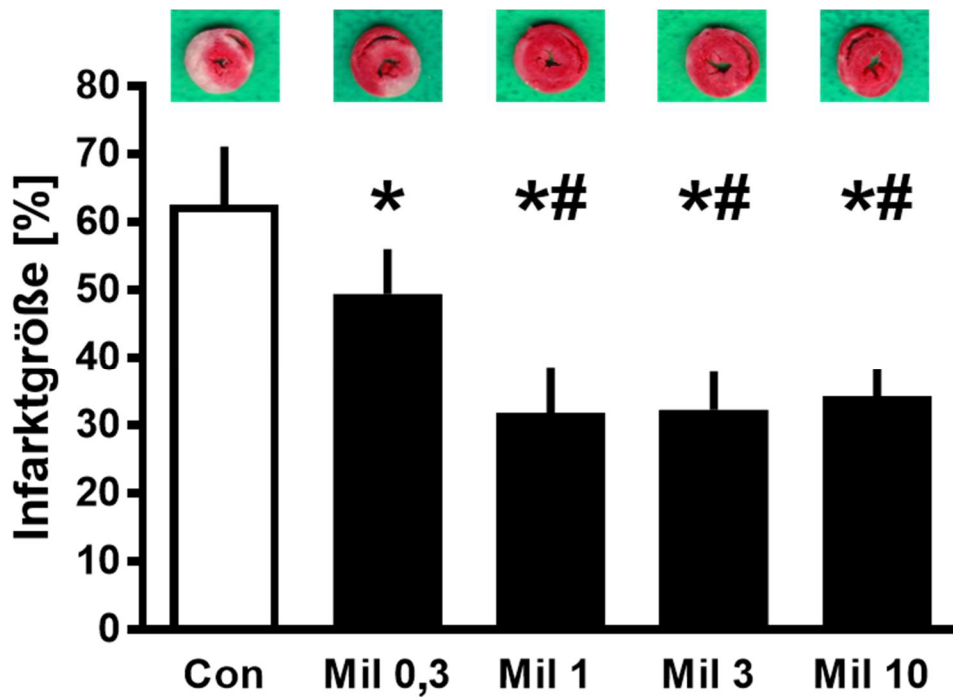


Abbildung 15: Infarktgrößen der Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Für jede Versuchsgruppe ist eine repräsentative Herzscheibe abgebildet. Infarktgrößen der Kontrollgruppe (Con) und der Gruppen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Milrinon (Mil, in μM) präkonditioniert wurden. Mittelwerte \pm SD, $n = 7-9$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Con, # = $p < 0,05$ vs. Mil 0,3.

Die hämodynamischen Variablen des 1. Studienteils sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Herzfrequenz blieb über den Versuchsverlauf für alle Gruppen unverändert. Nur in der Kontrollgruppe war die Frequenz in der Reperfusion im Vergleich zur Baseline reduziert. Der LVDP und der Koronarfluss sanken in allen Gruppen während der Reperfusion im Vergleich zur Baseline ab. Für den LVDP wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Der Koronarfluss der Gruppen Mil 0,3 und Mil 10 war im Vergleich zur Kontrollgruppe höher. Insgesamt führte die Gabe von Milrinon nicht zur einer Veränderung der kardialen Funktion bezüglich der untersuchten hämodynamischen Variablen.

Tabelle 3: Hämodynamische Variablen des 1. Studienteils (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil X = Milrinon X μM , LVDP = linksventrikulärer entwickelter Druck, PC = Präkonditionierung. Mittelwerte \pm SD, n = 7-9 pro Gruppe, * = $p < 0.05$ vs. Baseline, # = $p < 0.05$ vs. Con.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30 min	60 min
<i>Herzfrequenz (min^{-1})</i>				
Con	311 \pm 37	302 \pm 30	244 \pm 46*	248 \pm 34*
Mil 0.3	313 \pm 27	316 \pm 32	262 \pm 54	285 \pm 47
Mil 1	301 \pm 21	282 \pm 36	252 \pm 36	232 \pm 68
Mil 3	315 \pm 32	344 \pm 38	231 \pm 78	275 \pm 72
Mil 10	325 \pm 61	328 \pm 45	258 \pm 43	263 \pm 40
<i>LVDP (mmHg)</i>				
Con	117 \pm 20	125 \pm 23	26 \pm 12*	27 \pm 12*
Mil 0.3	123 \pm 16	123 \pm 15	24 \pm 11*	22 \pm 7*
Mil 1	137 \pm 9	138 \pm 12	17 \pm 5*	29 \pm 5*
Mil 3	129 \pm 21	131 \pm 19	31 \pm 11*	36 \pm 8*
Mil 10	118 \pm 21	130 \pm 28	22 \pm 14*	25 \pm 12*
<i>Koronarfluss ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)</i>				
Con	13 \pm 3	13 \pm 2	7 \pm 2*	6 \pm 1*
Mil 0.3	17 \pm 2#	17 \pm 2#	9 \pm 2*	7 \pm 2*
Mil 1	14 \pm 2	14 \pm 2	8 \pm 1*	6 \pm 1*
Mil 3	13 \pm 4	15 \pm 3	8 \pm 1*	7 \pm 1*
Mil 10	14 \pm 2	16 \pm 2#	8 \pm 1*	7 \pm 1*

Im 2. Studienteil wurde ein zugrundeliegender Mechanismus der Präkonditionierung mit Milrinon untersucht (Abbildung 16). Milrinon reduzierte im Vergleich zur Kontrolle die Infarktgröße signifikant (Con: 57 \pm 6 % vs. Mil: 34 \pm 6 %; $p < 0,05$). In Kombination mit dem mBK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin oder dem ROS-Fänger MPG ging der kardioprotektive Effekt von Milrinon verloren (Pax + Mil: 53 \pm 6 %, MPG + Mil: 59 \pm 7 %; n. s. vs. Con). Die beiden Substanzen selbst hatten keinen Einfluss auf die Infarktgröße (Pax: 53 \pm 7 %, MPG: 58 \pm 5 %; n. s. vs. Con). Die zusätzliche Gabe von CsA, einem Inhibitor der mPTP-Öffnung, konnte den protektiven Effekt von Milrinon bei Anwesenheit von MPG wiederherstellen (MPG + Mil + CsA: 35 \pm 7 %; $p < 0,05$ vs. MPG + Mil), wobei CsA alleine keinen Effekt auf die Milrinon-induzierte Reduktion der Infarktgröße hatte (Mil + CsA: 31 \pm 10 %; n. s. vs. Mil). Folglich wird für die Infarktgrößenreduktion durch Präkonditionierung mit Milrinon die Aktivierung von mBK_{Ca} -Kanälen, die Freisetzung von ROS und eine Inhibition der mPTP benötigt.

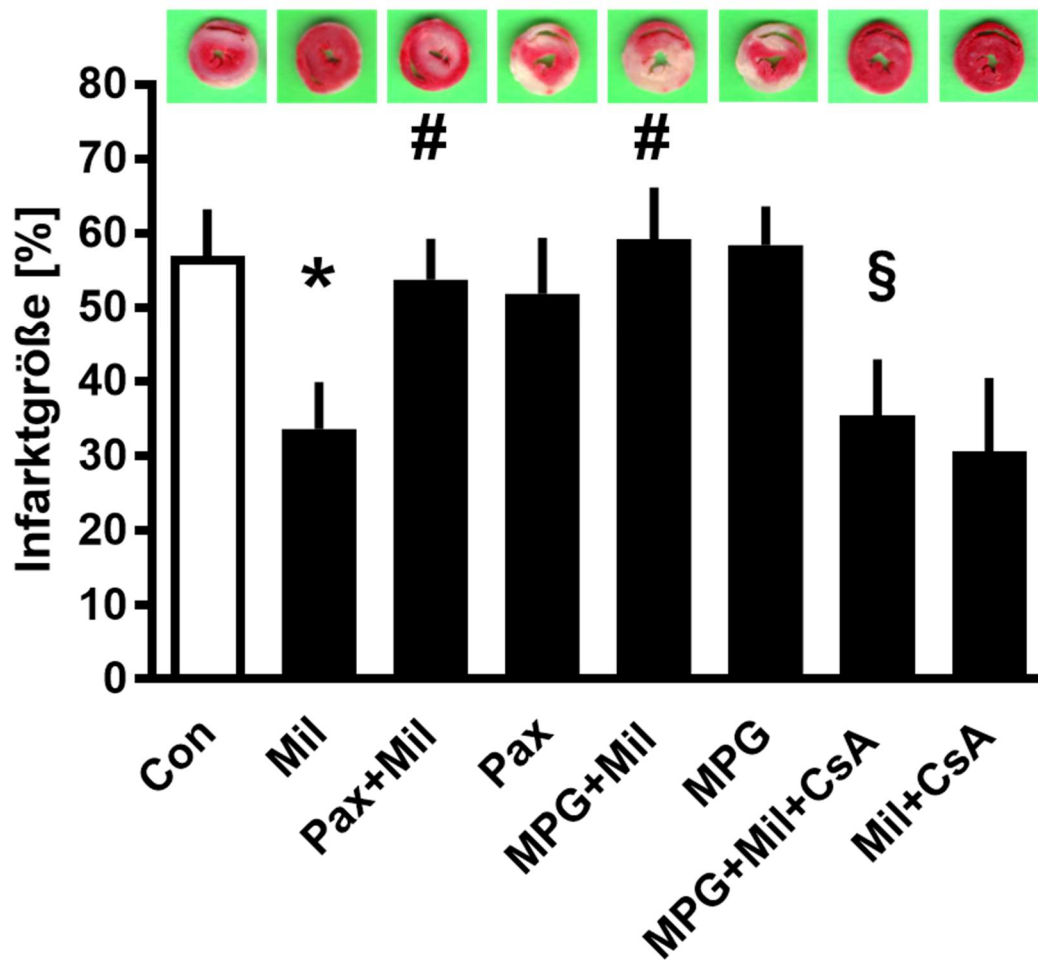


Abbildung 16: Infarktgrößenbestimmung zur Analyse des Mechanismus der Präkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Für jede Versuchsgruppe ist eine repräsentative Herzscheibe abgebildet. Con = Kontrolle, Mil = 3 μ M Milrinon, Pax = 1 μ M Paxillin, MPG = 1 mM N-2-Mercaptopropionylglycin, CsA = 200 nM Cyclosporin A. Mittelwerte \pm SD, n = 7-9 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Con, # = p < 0,05 vs. Mil, § = p < 0,05 vs. MPG + Mil.

Die hämodynamischen Variablen des 2. Studienteils sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Herzfrequenz blieb über den Versuchsverlauf unverändert. Der LVDP und der Koronarfluss sanken in allen Gruppen während der Reperfusion im Vergleich zur Baseline ab. Für die Herzfrequenz und den Koronarfluss wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Der LVDP der Gruppen Pax+Mil und MPG+Mil+CsA war im Vergleich zur Kontrollgruppe während der Präkonditionierung verringert. Schlussendlich führten die Substanzgaben nicht zu einer Veränderung der kardialen Funktion bezüglich der untersuchten hämodynamischen Variablen.

Tabelle 4: Hämodynamische Variablen des 2. Studienteils (modifiziert nach Publikation 2, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Mil = Milrinon, Pax = Paxillin, MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin, CsA = Cyclosporin A, LVDP = linksventrikulärer entwickelter Druck, PC = Präkonditionierung. Mittelwerte \pm SD, n = 7-9 pro Gruppe, * = p < 0.05 vs. Baseline, # = p < 0.05 vs. Con.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30 min	60 min
<i>Herzfrequenz (min⁻¹)</i>				
Con	275 \pm 28	264 \pm 13	237 \pm 65	234 \pm 45
Mil	282 \pm 34	289 \pm 37	260 \pm 54	235 \pm 46
Pax+Mil	322 \pm 29	314 \pm 22	280 \pm 70	249 \pm 40
Pax	298 \pm 30	260 \pm 36	230 \pm 41	233 \pm 47
MPG+Mil	301 \pm 35	294 \pm 39	274 \pm 65	227 \pm 44
MPG	294 \pm 41	284 \pm 40	218 \pm 71	229 \pm 82
MPG+Mil+CsA	314 \pm 34	288 \pm 42	253 \pm 53	222 \pm 72
Mil+CsA	299 \pm 30	295 \pm 26	251 \pm 69	204 \pm 51
<i>LVDP (mmHg)</i>				
Con	146 \pm 19	151 \pm 22	18 \pm 15*	21 \pm 8*
Mil	148 \pm 23	144 \pm 20	23 \pm 11*	32 \pm 14*
Pax+Mil	131 \pm 10	122 \pm 24#	25 \pm 9*	35 \pm 12*
Pax	144 \pm 24	126 \pm 25	30 \pm 10*	35 \pm 12*
MPG+Mil	141 \pm 15	157 \pm 24	23 \pm 15*	26 \pm 16*
MPG	134 \pm 18	148 \pm 18	18 \pm 7*	24 \pm 8*
MPG+Mil+CsA	132 \pm 33	125 \pm 38#	22 \pm 13*	22 \pm 10*
Mil+CsA	133 \pm 22	139 \pm 36	26 \pm 7*	33 \pm 11*
<i>Koronarfluss (ml*min⁻¹)</i>				
Con	16 \pm 2	16 \pm 3	8 \pm 2*	7 \pm 2*
Mil	16 \pm 2	17 \pm 2	8 \pm 2*	7 \pm 2*
Pax+Mil	16 \pm 4	14 \pm 2	9 \pm 3*	8 \pm 4*
Pax	16 \pm 2	13 \pm 3	8 \pm 2*	7 \pm 2*
MPG+Mil	17 \pm 3	19 \pm 2	7 \pm 2*	6 \pm 2*
MPG	15 \pm 2	17 \pm 2	7 \pm 3*	6 \pm 3*
MPG+Mil+CsA	15 \pm 3	17 \pm 5	6 \pm 2*	5 \pm 3*
Mil+CsA	15 \pm 4	16 \pm 4	7 \pm 2*	6 \pm 2*

3.3. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon

Im 1. Versuchsteil (Publikation 3) wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie durchgeführt, um die geringste Dosis mit dem maximal kardioprotektiven Effekt für die Postkonditionierung mit Milrinon zu erhalten (Abbildung 17). In der Kontrollgruppe (Con) wurde eine Infarktgröße von 37 \pm 7 % bestimmt. Die Gaben von 0,3 und 1 μ M Milrinon hatten jeweils keinen Einfluss auf die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mil 0,3: 44 \pm 5 %, Mil 1: 40 \pm 3 %, jeweils n. s. vs. Con). Ab einer Konzentration von 3 μ M Milrinon (Mil 3) konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 22 \pm 7 % (p < 0,05 vs. Con) nachgewiesen werden. Eine stufenweise Erhöhung der Konzentration von Milrinon auf 100 μ M führte nicht zu einer stärkeren Infarktreduktion (Mil 10: 24 \pm 8 %, Mil 30: 25 \pm 6 %, Mil

100: 21 ± 8 %; jeweils n. s. vs. Mil 3). Somit stellt die Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Milrinon die geringste Dosis dar, mit der der stärkste kardioprotektive Effekt zu erzielen ist.

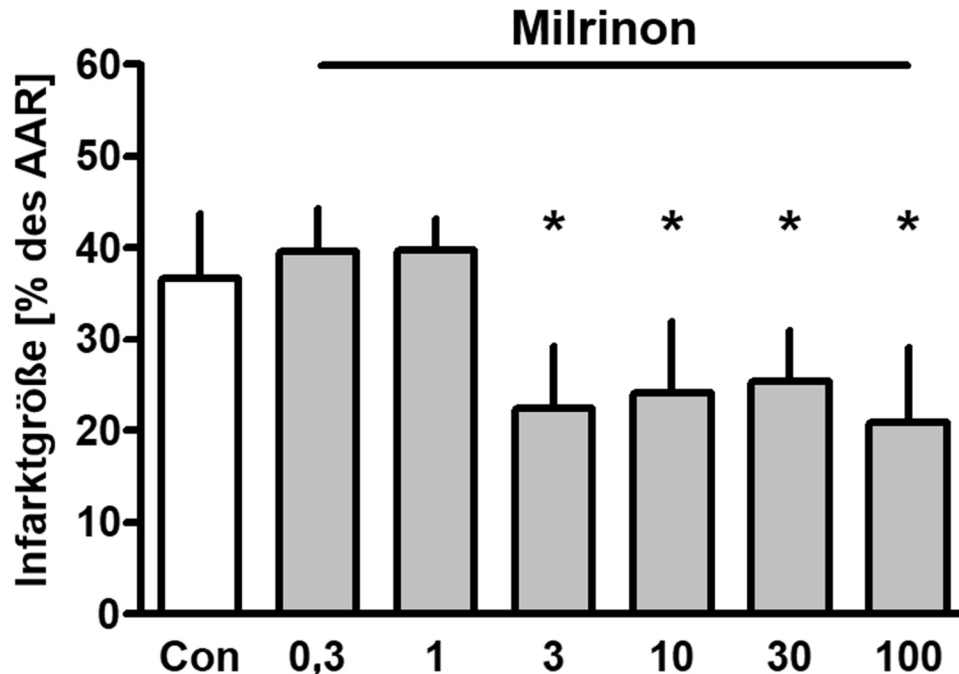


Abbildung 17: Infarktgrößen der Dosis-Wirkungs-Studie für die Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 3, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Infarktgrößen der Kontrollgruppe (Con) und der Gruppen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Milrinon (Mil, in μM) postkonditioniert wurden. AAR = Risikogebiet. Mittelwerte \pm SD, $n = 10$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Con.

Im 2. Studienteil wurde analysiert, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals eine Rolle bei der Kardioprotektion mittels Postkonditionierung mit Milrinon spielt (Abbildung 18). In der Kontrollgruppe (Con) wurde eine Infarktgröße von 42 ± 8 % bestimmt; die Gabe von $3 \mu\text{M}$ Milrinon reduzierte die Infarktgröße auf 25 ± 6 % ($p < 0,05$ vs. Con). Der mBK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin hob den Effekt der Infarktgrößenreduktion durch Milrinon auf (Pax+Mil: 42 ± 9 %, $p < 0,05$ vs. Mil), wobei der Inhibitor selbst keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte (Pax: 47 ± 4 %, n. s. vs. Con). Folglich ist die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals für die Infarktgrößenreduktion bei der Postkonditionierung mit Milrinon notwendig.

In beiden Studienteilen konnten bei den hämodynamischen Variablen keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Originalpublikation).

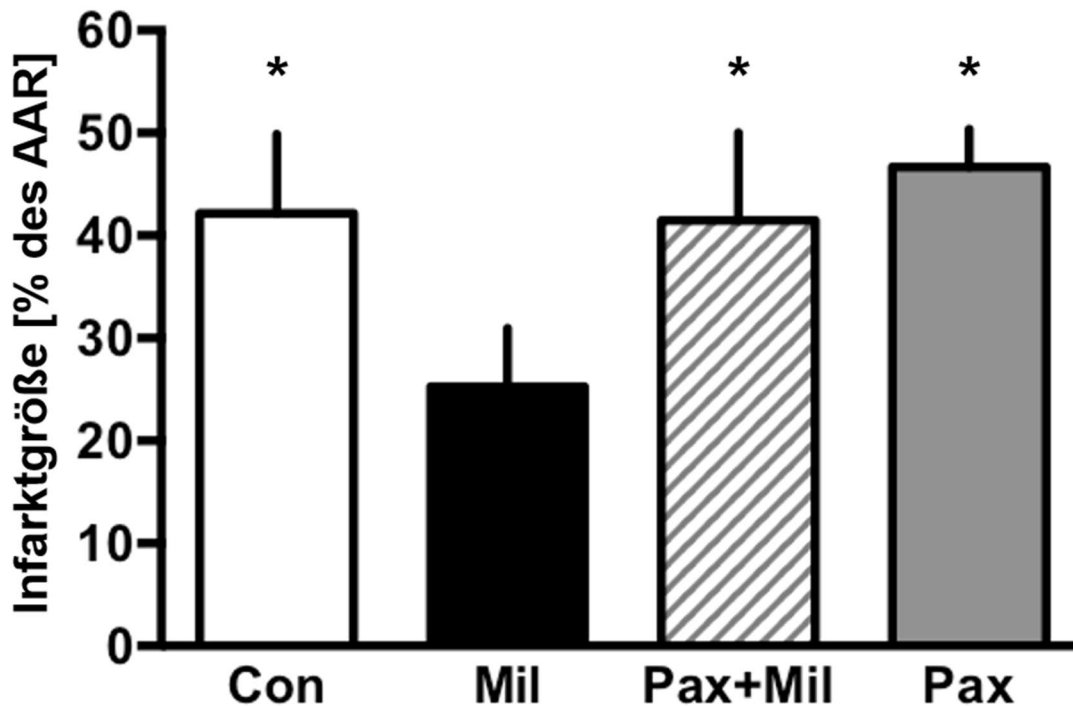


Abbildung 18: Infarktgrößenbestimmung zur Analyse der Beteiligung von mBK_{Ca} -Kanälen an der Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 3, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Die Herzen wurden mit Vehikel (Con), 3 μ M Milrinon (Mil), 1 μ M mBK_{Ca} -Inhibitor Paxillin (Pax) oder einer Kombination aus 3 μ M Milrinon und 1 μ M Paxillin (Pax+Mil) behandelt. Mittelwerte \pm SD, n = 8-9 pro Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. Mil.

3.4. Beteiligung von K^+ -Kanälen an der Präkonditionierung mit Levosimendan

Im 1. Versuchsteil (Publikation 4) wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie durchgeführt, um die geringste Dosis mit dem höchsten kardioprotektiven Effekt für die Postkonditionierung mit Levosimendan zu ermitteln (Abbildung 19). In der Kontrollgruppe (Con) betrug die Infarktgröße 58 ± 7 %. Nach der Gabe von 0,03 μ M Levosimendan bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (Lev 0,03: 55 ± 6 %; n. s. vs. Con). Eine signifikante Reduktion der Infarktgröße konnte mit 0,1 μ M Levosimendan erzielt werden (Lev 0,1: 47 ± 9 %; $p < 0,05$ vs. Con), wobei die Reduktion nochmals mit einer Erhöhung der Konzentration auf 0,3 μ M Levosimendan verstärkt werden konnte (Lev 0,3: 30 ± 7 %; $p < 0,05$ vs. Con). Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 1 μ M konnte den protektiven Effekt nicht weiter intensivieren (Lev 1: 30 ± 5 %; n. s. vs. Lev 0,3). Somit stellt 0,3 μ M Levosimendan die niedrigste und maximal kardioprotektive Konzentration dar.

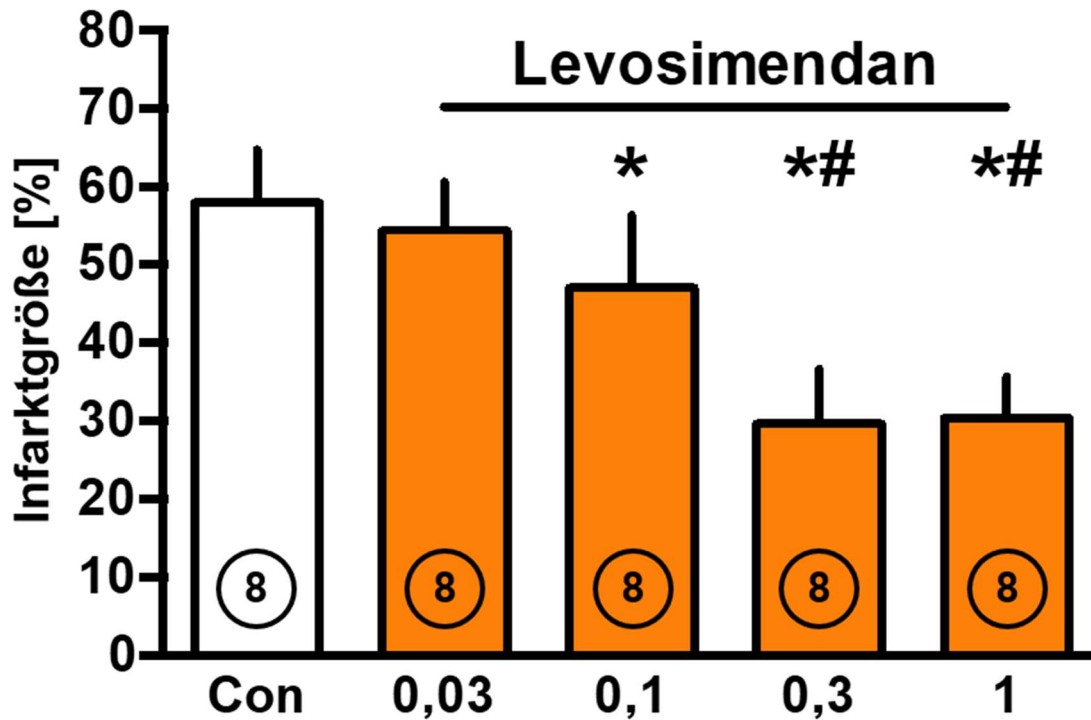


Abbildung 19: Infarktgrößenbestimmung der Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Levosimendan (modifiziert nach Publikation 4, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Infarktgrößen der Kontrollgruppe (Con) und der Gruppen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Levosimendan (in μM) präkonditioniert wurden. Mittelwerte \pm SD, $n = 8$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Con, # = $p < 0,05$ vs. Lev 0,03.

Im 2. Studienteil wurde analysiert, ob die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals eine Rolle bei der Kardioprotektion durch Präkonditionierung mit Levosimendan spielt (Abbildung 20). Die Präkonditionierung mit $0,3 \mu\text{M}$ Levosimendan reduzierte im Vergleich zur Kontrolle die Infarktgröße signifikant (Con: $64 \pm 5 \%$ vs. Mil: $27 \pm 4 \%$; $p < 0,05$). Die Gabe des mBK_{Ca} -Kanal-Inhibitors Paxillin hob den kardioprotektiven Effekt von Levosimendan vollständig auf (Pax + Lev: $62 \pm 7 \%$, $p < 0,05$ vs. Mil), wohingegen der Inhibitor selbst keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte (Pax: $56 \pm 6 \%$, n. s. vs. Con). Somit ist die Aktivierung des mBK_{Ca} -Kanals für die Kardioprotektion mittels Präkonditionierung mit Milrinon essentiell.

Für beide Studienteile konnten bei den hämodynamischen Variablen keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Originalpublikation).

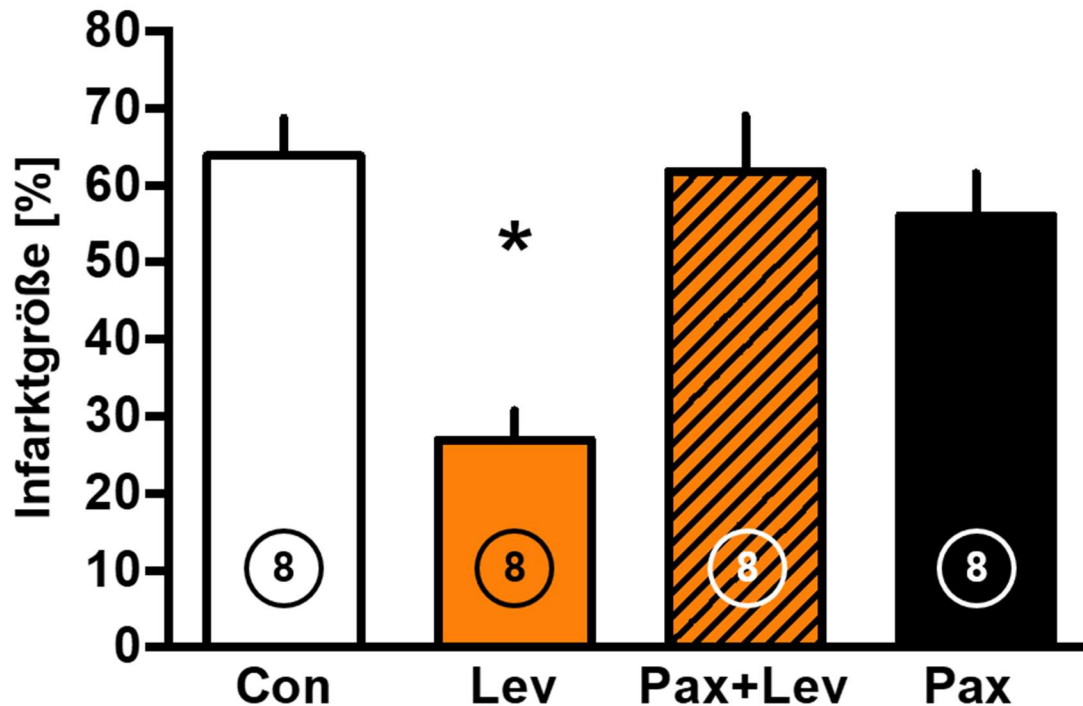


Abbildung 20: Infarktgrößenbestimmung. Infarktgrößen für die Analyse zum Mechanismus der Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 4, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Con = Kontrolle, Lev = Levosimendan 0,3 μ M, Pax = Paxillin 1 μ M, Mittelwerte \pm SD, n = 5-6 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Con.

3.5. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Postkonditionierung mit Levosimendan

In der Publikation 5 wurde anhand eines *in vitro* I/R-Modells des isolierten, perfundierten Herzens eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die Postkonditionierung mit Levosimendan erstellt und untersucht, ob die Signaltransduktion für den kardioprotektiven Effekt über die mSK_{Ca}- und/oder mBK_{Ca}-Kanäle vermittelt wird.

In der Dosis-Wirkungs-Studie wurde in der Kontrollgruppe (Con) eine Infarktgröße von 60 \pm 7 % bestimmt (Abbildung 21). Bei der Applikation von 0,03 μ M und 0,1 μ M Levosimendan wurde jeweils kein Unterschied zur Kontrollgruppe detektiert (Lev 0,03: 56 \pm 7 %, Lev 0,1: 50 \pm 8 %; jeweils n. s. vs. Con). Eine signifikante Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde mit 0,3 μ M Levosimendan erzielt (Lev 0,3: 30 \pm 5 %; p < 0,05 vs. Con), wobei eine Erhöhung der Konzentration auf 1 μ M Levosimendan den protektiven Effekt nicht weiter steigern konnte (Lev 1: 32 \pm 4 %; p < 0,05 vs. Lev 0,3). Somit stellt 0,3 μ M Levosimendan die niedrigste und maximal kardioprotektive Konzentration dar.

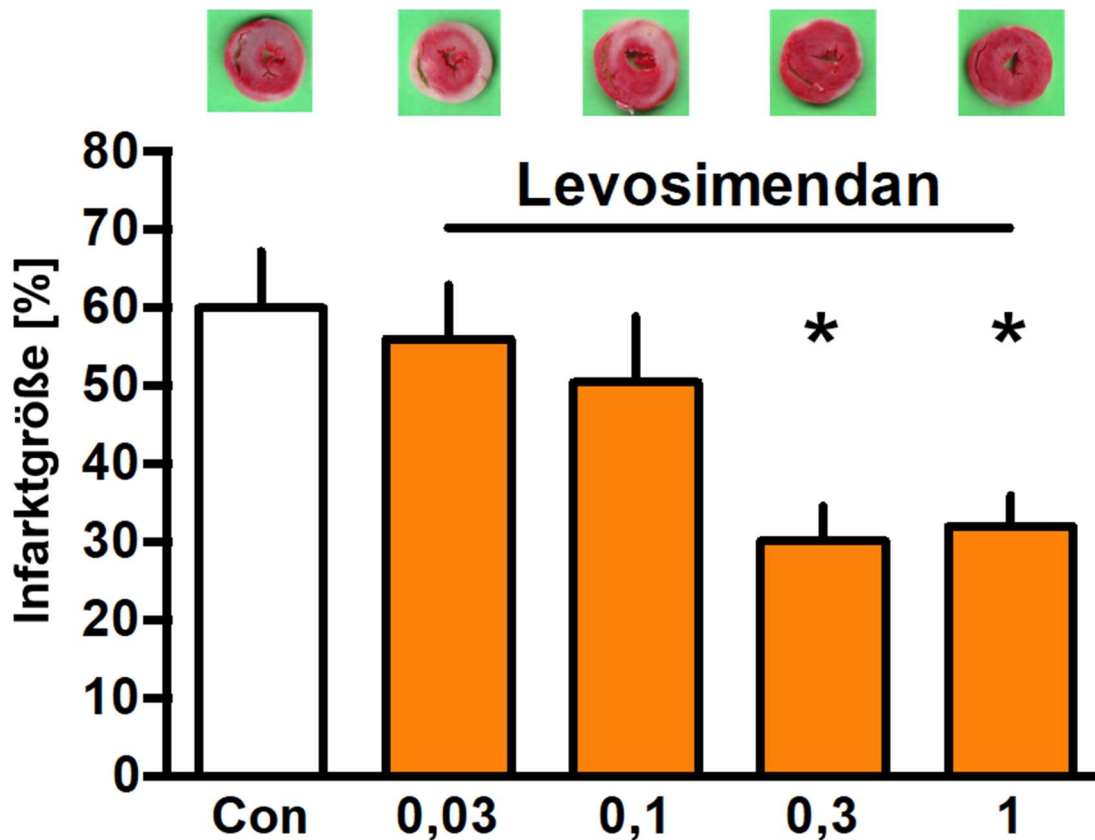


Abbildung 21: Infarktgrößen der Dosis-Wirkungs-Studie für die Postkonditionierung mit Levosimendan (modifiziert nach Publikation 5, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Infarktgrößen der Kontrollgruppe (Con) und der Gruppen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Levosimendan (in μM) postkonditioniert wurden. Für jede Versuchsgruppe ist eine repräsentative Herzscheibe abgebildet. Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ pro Gruppe, * = $p < 0,05$ vs. Con.

Im 2. Studienteil zur Untersuchung des Mechanismus wurde in der Kontrollgruppe (Con) eine Infarktgröße von $59 \pm 6\%$ bestimmt (Abbildung 22). Die Postkonditionierung mit $0,3 \mu\text{M}$ Levosimendan reduzierte im Vergleich zur Kontrolle die Infarktgröße auf $31 \pm 8\%$ ($p < 0,05$ vs. Con). Der kardioprotektive Effekt von Levosimendan wurde vollständig von Paxillin, einem Inhibitor der BK_{Ca} -Kanäle, aufgehoben (Pax + Lev: $62 \pm 6\%$, $p < 0,05$ vs. Lev), während NS8593, ein Inhibitor der SK_{Ca} -Kanäle, keinen Einfluss auf den protektiven Effekt hatte (NS8593 + Lev: $35 \pm 7\%$, n. s. vs. Lev). Beide Inhibitoren alleine hatten jeweils keinen Effekt auf die Infarktgröße (Pax: $62 \pm 4\%$, NS8593: $60 \pm 4\%$; beide n. s. vs. Con). Folglich ist die Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle, im Gegensatz zu den mSK_{Ca} -Kanälen, für eine Infarktgrößenreduktion der Postkonditionierung mit Levosimendan notwendig.

Für beide Studienteile konnten bei den hämodynamischen Variablen keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Originalpublikation).

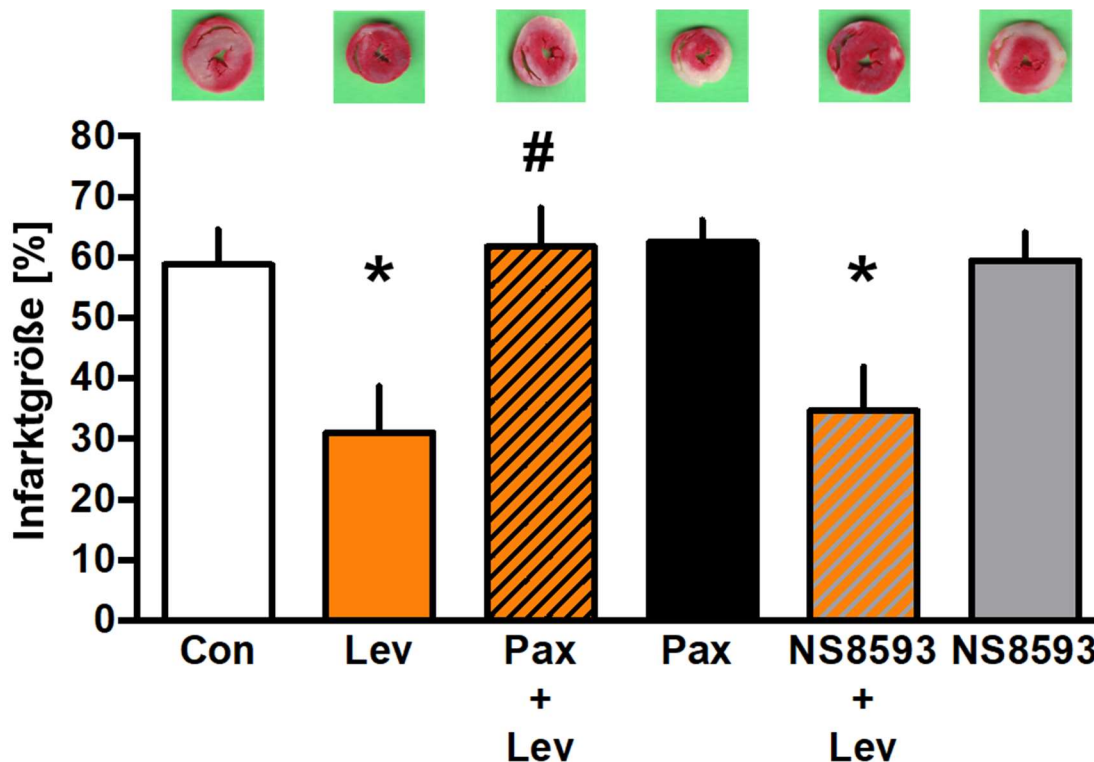


Abbildung 22: Infarktgrößenbestimmung zur Analyse des Mechanismus der Postkonditionierung mit Milrinon (modifiziert nach Publikation 5, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Für jede Versuchsgruppe ist eine repräsentative Herzscheibe abgebildet. Con = Kontrolle, Lev = 0,3 μ M Levosimendan, Pax = 1 μ M Paxillin, NS8593 = 0,1 μ M N-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-benzimidazole-2-amin hydrochloride. Mittelwerte \pm SD, n = 5-6 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Con. # = p < 0,05 vs. Lev.

3.6. Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin

In Publikation 6 wurde untersucht, ob die Aktivierung von mBK_{Ca}- und/oder mK_{ATP}-Kanälen an der Signaltransduktion zur Kardioprotektion mittels Postkonditionierung mit Dexmedetomidin beteiligt ist und ob die Inaktivierung der Kanäle zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion eine Kardioprotektion verhindert. Die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung sind in Abbildung 23 dargestellt. Für die Kontrollgruppe (Con) wurde eine Infarktgröße von 57 \pm 9 % detektiert. In der 1. Untergruppe (frühe Reperfusion) reduzierte die Dexmedetomidin-Gabe die Infarktgröße auf 31 \pm 7 % (p < 0,05 vs. Con). Diese Reduktion der Infarktgröße durch Dexmedetomidin wurde durch die Gabe des mK_{ATP}-Kanal-Inhibitors 5HD oder des BK_{Ca}-Kanal-Inhibitors Paxillin jeweils vollständig aufgehoben (5HD + Dex: 52 \pm 6 %; Pax + Dex: 53 \pm 4 %, jeweils p < 0,05 vs. Dex). Beide Inhibitoren alleine hatten keinen Effekt auf die Infarktgröße (5HD: 54 \pm 8 %, n. s. vs. Con; Pax: 53 \pm 11 %, n. s. vs. Con). In der 2. Untergruppe (späte Reperfusion) reduzierte die Postkonditionierung mit

Dexmedetomidin ebenfalls die Infarktgröße (Dex30': 33 ± 10 %, p < 0,05 vs. Con). Die Gabe von 5HD beeinflusste den Effekt von Dexmedetomidin nicht (5HD + Dex30': 36 ± 7 %, p < 0,05 vs. Con), wohingegen die Applikation von Paxillin die Reduktion der Infarktgröße vollständig aufhob (Pax + Dex30': 58 ± 7 %, p < 0,05 vs. Dex30'). Demnach ist die Aktivierung beider Kanäle in der frühen Reperfusionphase für eine Infarktgrößenreduktion der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin notwendig, wohingegen in der späten Phase nur die Aktivierung des mBK_{Ca}-Kanals essentiell ist.

Für die hämodynamischen Variablen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Originalpublikation).

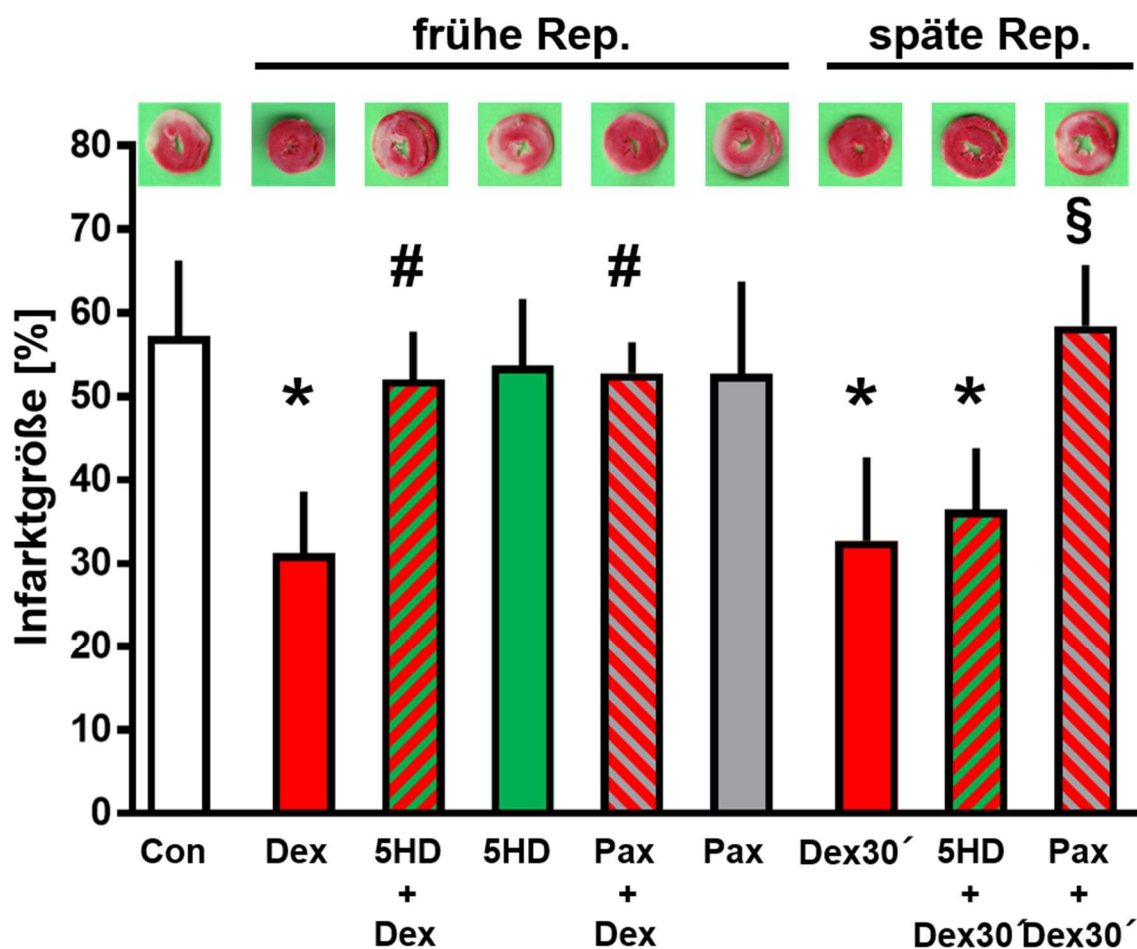


Abbildung 23: Infarktgrößenbestimmung von Herzen, die in der frühen (1. Untergruppe) oder in der späten (2. Untergruppe) Reperfusion (Rep.) mit Vehikel, 3 nM Dexmedetomidin (Dex), 100 µM 5-Hydroxydecanoat (5HD, mK_{ATP}-Kanal-Inhibitor), 1 µM Paxillin (Pax, BK_{Ca}-Kanal-Inhibitor) oder einer Kombination der Substanzen behandelt wurden (modifiziert nach Publikation 6, mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Für jede Versuchsgruppe ist eine repräsentative Herzscheibe abgebildet. Con: Kontrolle, Dex30' = Gabe von Dexmedetomidin nach 30 min Reperfusion. Mittelwerte ± SD, n = 9-10 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Con, # = p < 0,05 vs. Dex, § = p < 0,05 vs. Dex30'.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung von microRNAs im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Isofluran

In Publikation 1 konnte gezeigt werden, dass Isofluran zu den untersuchten Zeitpunkten die Expression von miR-21-5p, jedoch nicht von miR-1-3p, induziert. Wird die Inhalation mit Isofluran als Präkonditionierung vor einer I/R-Intervention eingesetzt, so kann keine Expressionsveränderungen für beide miRNAs festgestellt werden. Zudem wird die mRNA-Expression des Hif1 α -Zielgens VEGF durch Isofluran induziert, so dass eine Hif1 α -abhängige Regulation von miR-21-5p durch Isofluran naheliegt. Weiterhin wird die Proteinexpression des direkten miR-21-5p-Zielgens PDCD4 durch die gesteigerte Expression von miR-21-5p nicht verändert.

Olson *et al.* hatten bereits 2015 den Einfluss von Isofluran auf die Expression von miR-21-5p untersucht und gezeigt, dass 15 min nach einer Isofluran-Inhalation deren Expression induziert wird (Olson *et al.*, 2015). Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals demonstriert werden, dass dieser Anstieg auch über einen längeren Zeitraum (155 min nach Inhalation) erhalten bleibt. Dieser Expressionsanstieg war interessanterweise nach einer zusätzlichen I/R-Intervention trotz gleichem Untersuchungszeitpunkt im Nicht-Risikogebiet nicht zu detektieren. Somit scheint die I/R den Anstieg der Expression zu verhindern. Die bisherigen Studien zur Expression von miR-21-5p zeigen, möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns und folglich auch unterschiedlichen statistischen Vergleiche, kein einheitliches Bild. Van Rooij *et al.* detektierten 3 und 14 Tage nach einem akuten Herzinfarkt eine Heraufregulation von miR-21-5p in der Grenzregion des Infarktareals und dem gesunden Myokard im Vergleich zu Sham-operierten Mäusen. Die Autoren schlussfolgerten, dass die I/R selbst langfristig die Expression reguliert (van Rooij *et al.*, 2008). Bei einem Vergleich mit nicht infarziertem Gewebe beschrieben Dong *et al.* hingegen eine Herunterregulation im Infarktgebiet und eine Heraufregulation in der Grenzregion (Dong *et al.*, 2009). Sollten also doch I/R selbst einen Einfluss auf die Expression haben, so würde eine mögliche Expressionsinduktion durch Isofluran bei dem Vergleich zwischen den Gruppen Con und Iso-PC durch den I/R-induzierten Anstieg überlagert werden. Dies würde dann die gleichen Expressionslevel von miR-21-5p in den beiden Gruppen erklären. Da der Fokus von Publikation 1 auf dem Einfluss von Isofluran auf die Expression von miRNAs lag, war die statistische

Analyse auf den Vergleich der Gruppen mit und ohne Inhalation von Isofluran ausgerichtet worden. In einer zukünftigen Studie mit einem veränderten Studiendesign, das einen statistischen Vergleich zwischen den Gruppen Sham und Con zulassen würde, könnte der alleinige Anteil von I/R an der Expressionsänderung bestimmt werden. Aber nicht nur die Inhalation von Isofluran oder eine I/R können die Expression von miR-21-5p regulieren, sondern auch eine IPC. Dong *et al.* analysierten die Expression der miR-21-5p 6 h nach einem Myokardinfarkt und zeigten, dass eine IPC die Herunterregulation von miR-21-5p im infarzierten Gewebe bei einem Vergleich mit einer Sham-operierten Kontrolle verhindert (Dong *et al.*, 2009). Zusammengefasst ist die Expression der miR-21-5p anscheinend abhängig von der Art der Präkonditionierung, dem Messzeitpunkt und dem untersuchten Anteil des Herzgewebes.

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise aus der Literatur, dass die Expression von miR-21-5p abhängig von Hif1 α reguliert werden kann (Jia *et al.*, 2017). Um diese Regulation im Kontext von Isofluran zu überprüfen, wurde die Hif1 α -Aktivierung über einen Anstieg der mRNA-Expression von VEGF und HO-1 untersucht, die als indirekte Marker der Hif1 α -Aktivierung genutzt werden können (Berger *et al.*, 2010). Da die Inhalation von Isofluran zu einem Anstieg der Expression von VEGF führte, ist zu vermuten, dass die Hif1 α -Aktivierung durch Isofluran gesteigert wurde und folglich die Expression der miR-21-5p heraufregulierte. Diese Annahme wird durch andere Studien gestützt, die ebenfalls Expressionsanstiege von VEGF oder Hif1 α durch Isofluran zeigen konnten. Wang *et al.* wiesen zu einem frühen Zeitpunkt (15 min) nach einer Inhalation von Isofluran einen Expressionsanstieg von VEGF, Hif1 α und ERK im Gewebe des linken Ventrikels von Ratten nach, der auch für mindestens 155 min bestehen blieb (Wang *et al.*, 2006). Im Gehirn von Ratten konnte ebenfalls durch Isofluran eine Hif1 α -Expressionsinduktion nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 2012). Ein direkter Nachweis, dass die Expression von miR-21-5p durch Isofluran abhängig von Hif1 α reguliert wird, ist bisher nicht erbracht worden und muss in weiteren Studien untersucht werden.

Eine Heraufregulation der miR-21-5p kann kardioprotektive Effekte haben, da für sie bereits anti-apoptotische Eigenschaften gezeigt wurden (Dong *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2020). Zur Analyse der Auswirkungen einer gesteigerten Expression von miR-21-5p wurde daher die Proteinexpression von PDCD4 untersucht. Dong *et al.* konnten zeigen, dass PDCD4 proapoptotische Eigenschaften besitzt, die durch miR-21-5p supprimiert werden können und

damit zum kardioprotektiven Effekt von miR-21-5p beitragen (Dong *et al.*, 2009). Zudem wies eine frühere Studie an einer Vielzahl von Organen der Maus, unter anderem an Herz und Nieren, nach, dass bei einem Knockdown von miR-21-5p die Expression von PDCD4 ansteigt und die Aktivität des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) reduziert wird (Jia *et al.*, 2017). In Publikation 1 konnten jedoch keine Expressionsveränderungen von PDCD4 gezeigt werden. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass der Zeitpunkt der Gewebeentnahme zu früh gewählt wurde, um eine Veränderung der Proteinexpression detektieren zu können, denn andere Studien wählten deutlich spätere Zeitpunkte. Zwei unabhängige Forschergruppen bestimmten die PDCD4 Proteinexpression 24 h nach dem Knockdown von miR-21-5p in unterschiedlichen Organen der Maus (Jia *et al.*, 2017) oder isolierten Kardiomyozyten (Dong *et al.*, 2009) und konnten eine Heraufregulation in diesem späteren Zeitfenster nachweisen. Die Proteinmenge von PDCD4 wird aber nicht nur durch miR-21-5p reguliert, sondern auch über andere Mechanismen auf der Ebene von Transkription, Translation und Proteindegradation (Matsushashi *et al.*, 2019). Somit könnten durch Isofluran zum anderen ebenfalls Mechanismen induziert werden, die für einen gegensätzlichen Effekt, also eine Erhöhung der PDCD4 Proteinmenge, verantwortlich sind und folglich den Effekt maskieren. So konnte gezeigt werden, dass Isofluran die Konzentrationen von *transforming growth factor beta* (TGFβ) erhöht (Yin *et al.*, 2020), wobei TGFβ wiederum die Apoptose über eine Heraufregulierung von PDCD4 fördern kann (Matsushashi *et al.*, 2019). Zusammenfassend weisen die unveränderten Proteinmengen von PDCD4 zu den ausgewählten Zeitpunkten nicht zwingend darauf hin, dass durch die Heraufregulation von miR-21-5p keine Herunterregulation der Proteinexpression von PDCD4 stattfindet. Die erhobenen Daten lassen bisher nur Vermutungen über die Expressionsregulation zu, so dass weitere Studien notwendig sind, um Aussagen über die exakte Regulation von PDCD4 in diesem Kontext treffen zu können.

Für die miR-1-3p konnte unter diesen experimentellen Bedingungen keine Veränderung der Expression durch Isofluran gezeigt werden. Es gibt aber Hinweise, dass andere Formen der Präkonditionierung sehr wohl einen Einfluss auf die Expression der miR-1-3p haben können. Beispielsweise konnte nach einer RIPC-Intervention zunächst eine Herunterregulation (165 min nach RIPC) und zu einem späteren Zeitpunkt (405 min) eine Heraufregulation der miR-1-3p im Vergleich zu einer Sham-behandelten Gruppe nachgewiesen werden

(Brandenburger *et al.*, 2014). Folgte der RIPC-Intervention eine Phase von I/R, so wurde zum frühen Zeitpunkt ebenfalls eine Herunterregulation im Risikogebiet detektiert, während zum späten Zeitpunkt keine Expressionsveränderung zu finden war. Im Gegensatz dazu konnte im Nicht-Risikogebiet nur zum späten Zeitpunkt eine Induktion der Expression gezeigt werden. Dies legt nahe, dass im Nicht-Risikogebiet die Expression zeitabhängig differentiell reguliert wird (Brandenburger *et al.*, 2014). Somit könnte der Messzeitpunkt 2,5 h nach der Inhalation von Isofluran in Publikation 1 zu früh für eine messbare Veränderung der Expression gewählt worden sein. Dafür spricht auch eine Studie von Dong *et al.*, die eine Reduktion der miR-1-3p-Expression nach einem akuten Myokardinfarkt in der Ratte zeigen konnten. Diese Reduktion wurde allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich 6 h nach Induktion des Infarktes, gemessen (Dong *et al.*, 2009). Folglich scheint die miR-1-3p-Expression zu frühen Zeitpunkten weder durch I/R noch durch Isofluran reguliert zu werden, jedoch ist eine Regulation an späteren Zeitpunkten über Isofluran durchaus möglich und müsste in Folgestudien weiter untersucht werden.

4.2. Bedeutung der mitochondrialen Mechanismen im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Milrinon

In Publikation 2 (Präkonditionierung) konnte gezeigt werden, dass es sich bei einer Konzentration von 1 μM Milrinon um die niedrigste und maximal kardioprotektive Konzentration zur Präkonditionierung in dem gewählten Modell handelt. Diese Kardioprotektion wird durch den BK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin und dem ROS-Fänger MPG blockiert, wobei die Blockade durch MPG über eine Inhibition der mPTP-Öffnung mittels CsA aufgehoben wird. Daher wird die Kardioprotektion anscheinend über mBK_{Ca} -Kanäle, die Freisetzung von ROS und eine Inhibition der mPTP vermittelt.

In Publikation 3 (Postkonditionierung) wurde nachgewiesen, dass es sich bei einer Konzentration von 0,3 μM Milrinon um die niedrigste und maximal kardioprotektive Konzentration zur Postkonditionierung in dem gewählten Modell handelt. Diese Kardioprotektion wird durch den BK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin aufgehoben, was für eine Vermittlung der Kardioprotektion durch den mBK_{Ca} -Kanal spricht.

Die Präkonditionierung mit Milrinon induzierte Konzentrations-abhängig eine Reduktion der Infarktgröße (Publikation 2). Ab einer Konzentration von 0,3 μM Milrinon konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße gezeigt werden, wobei der kardioprotektive Effekt mit

einer Konzentrationserhöhung auf 1 μM Milrinon gesteigert werden konnte. Höhere Konzentrationen bis 10 μM Milrinon induzierten keine weitere Reduktion der Infarktgröße. Die Postkonditionierung mit Milrinon induzierte erst ab einer Konzentration von 3 μM Milrinon eine Infarktgrößenreduktion, wobei hier höhere Konzentrationen diesen Effekt nicht verstärken konnten (Publikation 3). Somit sind bei einer Präkonditionierung mit Milrinon anscheinend geringere Konzentrationen als bei einer Postkonditionierung für eine Infarktgrößenreduktion ausreichend. In den Publikationen 2 und 3 reduzierte Milrinon die Infarktgröße um 40-50 %, womit sich die Infarktgrößenreduktion in einer ähnlichen Größenordnung wie in anderen Studien bewegt (Huang *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2012). Zudem liegt eine Konzentration von 1-3 μM (211-633 ng/ml) Milrinon in einem klinisch relevanten Bereich. Für den Menschen wurde gezeigt, dass eine Plasmakonzentration von 100-300 ng/ml (0,5-1,4 μM) Milrinon das indizierte Herzzeitvolumen dosisabhängig verbessert, wobei Plasmakonzentrationen über 500 ng/ml (2,4 μM) Milrinon keinen zusätzlichen Nutzen erbrachten (Bailey *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 2013). Bei einer Bestimmung von Milrinon-Plasmaspiegeln bei Patienten mit einem indizierten Herzzeitvolumen kleiner als 2,5 l/min/m² wurden, nach Applikation von 50 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht Milrinon, Konzentrationen von bis zu 400 ng/ml (1,9 μM) gemessen (Bailey *et al.*, 1994). Folglich könnten die erforderlichen Konzentrationen von 1-3 μM Milrinon für eine Kardioprotektion auch bei Patienten unter den üblicherweise im klinischen Kontext verwendeten Dosen erreicht werden.

Sowohl für die Prä- (Publikation 2) als auch für die Postkonditionierung (Publikation 3) mit Milrinon wurde der infarktgrößenreduzierende Effekt durch die Gabe des BK_{Ca}-Inhibitors Paxillin aufgehoben. Dies lässt den Schluss zu, dass die Öffnung des Kanals für die Vermittlung der Protektion notwendig ist. Mit diesen beiden Publikationen wurde erstmals gezeigt, dass der kardioprotektive Effekt von Milrinon über diese Kanäle vermittelt wird. Der mBK_{Ca}-Kanal wurde im Rahmen der Kardioprotektion schon oft beschrieben und wird im nächsten Kapitel (4.3) ausführlich diskutiert.

Die Aktivierung von mBK_{Ca}-Kanälen kann unter anderem die Konzentration von ROS beeinflussen. Beispielsweise führt der Verlust des Kanals zu einer gesteigerten ROS-Freisetzung in Mitochondrien der Kardiomyozyten von KCNMA^{-/-}-Mäusen nach einer Reoxygenierung (Soltysinska *et al.*, 2014). Da die Herzen der KCNMA^{-/-}-Mäuse nach einer I/R

größere Infarktareale als die wildtypischen (WT) Herzen ausbildeten, vermuteten die Autoren eine protektive Rolle für die mBK_{Ca} -Kanäle durch die Modulation des oxidativen Zustands mittels einer Abschwächung der Freisetzung von großen Mengen an ROS nach I/R. Bei einer Konditionierung hingegen werden geringe Level an ROS benötigt und diese Freisetzung von ROS könnte wiederum über den mBK_{Ca} -Kanal erfolgen. Dies konnte an isolierten Mitochondrien von Meerschweinchenkardiomyozyten gezeigt werden, da die Gabe des BK_{Ca} -Kanal-Aktivators NS1619 eine Produktion der ROS auslöst, während der Inhibitor Paxillin zu einem gewissen Maß wiederum die ROS-Produktion durch NS1619 hemmen kann (Heinen *et al.*, 2007). Um den Einfluss der ROS bei der Signaltransduktion der Kardioprotektion durch Milrinon zu untersuchen, wurde in Publikation 2 der ROS-Fänger MPG eingesetzt. Durch die Gabe von MPG wurde der kardioprotektive Effekt der Präkonditionierung mit Milrinon aufgehoben, wobei MPG alleine keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte. Folglich scheinen die ROS eine wichtige Rolle in dem Kontext der Konditionierung mit Milrinon einzunehmen. Auch für andere Formen der Konditionierung konnte mit Hilfe von MPG eine notwendige Beteiligung der ROS für die Kardioprotektion gezeigt werden. Beispielsweise kann der infarktgrößenreduzierende Effekt einer IPC durch eine 15-minütige Infusion von 300 μ M MPG 20 min vor einer globalen Ischämie in einem isolierten, perfundierten Kaninchenherz aufgehoben werden (Baines *et al.*, 1997). Auch hier hatte MPG alleine keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Gleichsinnige Effekte wurden auch in einem *in vivo* Ratten-Modell für einen I/R-Schaden erzielt (Toufektsian *et al.*, 2003). Im Gegensatz zur Publikation 2 und den zuvor erwähnten Studien mit MPG wiesen Tanonaka *et al.* aber einen reduzierenden Effekt von MPG auf die Infarktgröße nach (Tanonaka *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sind nicht exakt mit den Ergebnissen der Publikation 2 vergleichbar, da es einige Unterschiede im Studiendesign gibt. Die Autoren setzten zwar ebenfalls eine MPG-Konzentration von 1 mM ein, applizierten aber das MPG vor der Ischämie über eine Dauer von 30 min anstatt 10 min. Diese längere Applikationsphase führte zu einer Abnahme des LVDP während der gesamten Applikationsphase um 60 %, wohingegen in Publikation 2 keine Veränderung im LVDP gemessen werden konnte. Zusätzlich wurden in diesen beiden Studien deutlich unterschiedliche LVDPs bestimmt. In Publikation 2 wurde für Kontroll- und MPG-behandelte Tiere ein relativ konstanter LVDP von ca. 150 mmHg während der Baseline- und der Konditionierungsphase gemessen, wohingegen Tanonaka *et al.* von einem LVDP von 75 mmHg zu Beginn des Versuchs für Kontrolltiere und MPG-behandelte Tiere berichteten. Zudem sank

der LVDP der MPG-behandelten Tiere während der Konditionierung auf 50 mmHg. Der niedrige LVDP in der Studie von Tanonaka *et al.* könnte auf eine schlechtere Kontraktilität der Herzen hindeuten, während der massive Abfall des LVDP während der Konditionierung eine Kardioprotektion, ähnlich wie durch eine IPC, induzieren könnte, die also unabhängig von MPG wäre. In welchem Ausmaß MPG die Konzentrationen der ROS beeinflusst oder welche Konzentrationen der ROS während der Konditionierung vorhanden sein müssen bzw. während der Ischämie oder der Reperfusion nicht überschritten werden dürfen, müssen zukünftige Studien untersuchen.

Da bekannt ist, dass die Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle und die Konzentration der ROS die Öffnung der mPTP regulieren können (Boengler *et al.*, 2018), wurde auch die Beteiligung der mPTP an der Präkonditionierung mit Milrinon untersucht. In Publikation 2 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der mPTP-Öffnung durch CsA bei Anwesenheit von Milrinon trotz Gabe des ROS-Fängers MPG die Infarktgröße reduzierte. Jedoch konnte kein additiver Effekt durch die Kombination von Milrinon und CsA auf die Reduktion der Infarktgröße nachgewiesen werden. Somit könnte einerseits jede Substanz selbst bereits maximal kardioprotektiv sein oder andererseits beide Substanzen die Reduktion der Infarktgröße über denselben Mechanismus, nämlich die Inhibierung der mPTP-Öffnung, und nicht über zwei verschiedene Mechanismen vermitteln. Mit dem gewählten experimentellen Design kann nicht eindeutig belegt werden, dass die Inhibierung der mPTP-Öffnung den kardioprotektiven Effekt durch die Präkonditionierung mit Milrinon vermittelt, aber die Vermutung liegt aufgrund der bisher bekannten kardioprotektiven Mechanismen der Konditionierung nahe. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der mBK_{Ca} -Kanäle durch die Regulation der mitochondrialen Bioenergetik zu einem leichten Konzentrationsanstieg der ROS führt (Stowe *et al.*, 2006; Heinen *et al.*, 2007). Dies wird als Impuls (Trigger) der Präkonditionierung angesehen und verhindert den explosiven, hohen Konzentrationsanstieg der ROS während der Reperfusion (Stowe *et al.*, 2006; Heinen *et al.*, 2007). Dieser Anstieg würde ansonsten die Öffnung der mPTP, die als Endeffektor der mitochondrialen Signaltransduktion der Kardioprotektion angesehen wird, begünstigen (Boengler *et al.*, 2018). Ein sicherer Nachweis für die Beteiligung der mPTP könnte mittels des mPTP-Öffners Atractylosid geführt werden. Dies wurde bereits für die Postkonditionierung mit Milrinon durchgeführt; die Gabe von Atractylosid hob die Infarktgrößenreduktion durch Milrinon in einem *in vivo* Modell für einen I/R-Schaden an Ratten auf (Matsumoto *et al.*, 2012). Ob Atractylosid auch die Reduktion der

Infarktgröße durch eine Präkonditionierung mit Milrinon aufhebt, muss in einer zukünftigen Studie untersucht werden.

4.3. Bedeutung der mitochondrialen K^+ -Kanäle im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Levosimendan

In den Publikationen 4 (Präkonditionierung) und 5 (Postkonditionierung) konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von 0,3 μ M Levosimendan die niedrigste und maximal kardioprotektive Konzentration sowohl zur Prä- als auch zur Postkonditionierung in dem gewählten Modell darstellt. Zudem wird die jeweilige Kardioprotektion durch den BK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin aufgehoben, was für eine Vermittlung der Kardioprotektion durch den mBK_{Ca} -Kanal spricht. Weiterhin wird eine Postkonditionierung mit Levosimendan nicht durch den SK_{Ca} -Kanal Inhibitor NS8593 blockiert, so dass dieser Kanal anscheinend keine Rolle in diesem Kontext spielt.

Zunächst wurden Dosis-Wirkungs-Studien für die jeweiligen Konditionierungsformen erstellt. In Publikation 4 wurde erstmals eine Dosis-Wirkungs-Studie für die Präkonditionierung mit Levosimendan in Bezug auf die Infarktgröße in einem I/R-Modell der Ratte durchgeführt. Der größte Effekt auf die Reduktion der Infarktgröße wurde bei einer Levosimendan-Konzentration von 0,3 μ M erreicht, wobei eine Verringerung der Konzentration zu Lasten der Stärke der Protektion ging und eine Erhöhung keine weitere Reduktion der Infarktgröße bewirkte. Auch für die Postkonditionierung betrug die geringste und maximal protektive Konzentration 0,3 μ M Levosimendan (Publikation 5). Einen kardioprotektiven Effekt im Sinne einer Verbesserung der Herzfunktion und einer Verringerung von Arrhythmien konnten Meyer *et al.* bereits 2008 bei einer Konzentration von 0,75 μ M Levosimendan in isolierten, perfundierten Herzen von Kaninchen zeigen (Meyer *et al.*, 2008). Beide Levosimendan-Konzentrationen befinden sich somit in einem ähnlichen Bereich, wobei diese tierexperimentell verwendeten Konzentrationen über dem üblicherweise klinisch erreichten Bereich liegen: Bei herzinsuffizienten Patienten lag bei einer, im klinischen Einsatz gebräuchlichen, Infusionsrate von 0,05-0,1 μ g/kg/min nach 4 h die maximale Konzentration im Plasma bei 15-35 ng/ml (54-125 nM) (Antila *et al.*, 2004). Eine deutlich höhere Plasmakonzentration von Levosimendan kann jedoch bei einer 10-minütigen Bolusgabe von 24 μ g/kg Levosimendan, die im Falle der Notwendigkeit einer sofortigen Medikamentenwirkung eingesetzt wird, erwartet werden und daher möglicherweise der

kardioprotektive Konzentrationsbereich doch erreicht werden. Zudem könnten auch die beiden Metaboliten von Levosimendan, OR-1855 und OR-1896, an einem kardioprotektiven Effekt im Menschen beteiligt sein. Levosimendan wird durch Darmbakterien zu OR-1855 metabolisiert, welches dann weiter zu OR-1896 acetyliert wird. Letzteres besitzt ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie Levosimendan und hat eine deutlich längere Halbwertszeit als Levosimendan selbst, wodurch es für den langanhaltenden, hämodynamischen Effekt von Levosimendan mitverantwortlich ist (Cosentino *et al.*, 2020). Ob diese Metaboliten an der Kardioprotektion beteiligt sind, müsste aber zunächst in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Wirkung von Levosimendan wird hauptsächlich über die Sensitivierung der Myofilamente für Ca^{2+} vermittelt. Jedoch konnte in *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Levosimendan auch den einwärts gerichteten Strom von Ca^{2+} durch L-Typ-Calciumkanäle in ventrikulären Kardiomyozyten fördert (Virag *et al.*, 1996). Dieser Mechanismus könnte auch eine Rolle bei dem kardioprotektiven Effekt von Levosimendan spielen. Arijo *et al.* konnten zeigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom in atriale und ventrikuläre Zellen der Ratte bei Konzentrationen von 1-10 μM Levosimendan nicht beeinflusst ist (Ajiro *et al.*, 2002). Da die in den Publikationen 4 und 5 verwendeten Konzentrationen von Levosimendan unter 10 μM liegen, kann der Effekt von Levosimendan auf den Ca^{2+} -Einstrom für die Kardioprotektion wahrscheinlich vernachlässigt werden.

Eine Beteiligung des mBK_{Ca} -Kanals konnte sowohl für die Prä- (Publikation 4) als auch für die Postkonditionierung (Publikation 5) mit Levosimendan gezeigt werden, da bei beiden Konditionierungsformen die Reduktion der Infarktgröße durch Levosimendan mit dem BK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin unterbunden wurde. Auch für die Konditionierung mit Milrinon (Publikation 2 und 3) konnte eine Beteiligung der mBK_{Ca} -Kanäle gezeigt werden. Diese Befunde und die Studienergebnisse anderer Autoren unterstreichen die wichtige Rolle von mBK_{Ca} -Kanälen in der Kardioprotektion (Bentzen *et al.*, 2014). Genetische Modelle untermauern diese Annahme weiter, denn bei einer globalen Inaktivierung des KCNMA -Gens, welches die Poren-formende α -Untereinheit des mBK_{Ca} -Kanals kodiert, kann in Mäusen durch eine IPC keine Infarktgrößenreduktion mehr ausgelöst werden (Soltysinska *et al.*, 2014). Die Rolle von mBK_{Ca} -Kanälen wird weiterhin durch Studien gestützt, die durch den spezifischen Aktivator NS1619 eine Kardioprotektion in verschiedenen Spezies nachwiesen (Bentzen *et al.*,

2014). Besonders interessant für die Übertragung in die Klinik ist, dass die Kardioprotektion mit dem BK_{Ca}-Kanal-Aktivator NS1619 anscheinend altersunabhängig ist, denn NS1619 reduzierte sowohl in jungen als auch in alten Ratten die Infarktgröße (Heinen *et al.*, 2014). Zudem konnte diese Kardioprotektion mit einer identischen Konzentration von NS1619 in beiden Altersgruppen induziert werden, wobei eine Konzentrationssteigerung nicht zu einem verstärkten kardioprotektiven Effekt führte (Heinen *et al.*, 2014). Diese altersunabhängige Kardioprotektion ist eine Besonderheit, da andere Konditionierungsformen ihren protektiven Effekt mit dem Alter verlieren (Shim, 2010). Um eine Beteiligung des mBK_{Ca}-Kanals an der pharmakologischen Konditionierung mit Milrinon und Levosimendan zu verifizieren, könnte man in zukünftigen Studien den Effekt der pharmakologischen Konditionierung an KCNMA1^{-/-} Mäusen untersuchen. Im Falle einer Beteiligung der mBK_{Ca}-Kanäle sollte in diesen Mäusen bei einer Konditionierung mit Milrinon oder Levosimendan keine Kardioprotektion durch beispielsweise Infarktgrößenreduktion nachweisbar sein.

Im Gegensatz zum mBK_{Ca}-Kanal konnten für die Postkonditionierung mit Levosimendan in Publikation 5 keine Hinweise für eine Beteiligung des mSK_{Ca}-Kanals an der kardioprotektiven Signaltransduktion erbracht werden, denn der SK_{Ca}-Kanal Inhibitor NS8593 hatte keinen Einfluss auf den protektiven Effekt von Levosimendan. Obwohl für die Kardioprotektion durch Postkonditionierung mit Levosimendan keine Beteiligung des mSK_{Ca}-Kanals gezeigt wurde, kann die Aktivierung dieses Kanals anscheinend dennoch eine Kardioprotektion vermitteln. Stowe *et al.* konnten zeigen, dass eine Kardioprotektion nicht nur durch die Gabe des BK_{Ca}-Kanal-Agonisten NS1619, sondern auch durch die Gabe des SK_{Ca}-Kanal-Agonisten DCEB in einem *in vivo* I/R-Modell in Ratten oder in einem *in vitro* Modell für I/R-Schaden in Meerschweinchen induziert wurde (Stowe *et al.*, 2017). Eine mögliche Kreuzaktivierung der Kanäle durch die Agonisten ist unwahrscheinlich, da auch bei Anwesenheit des BK_{Ca}-Kanal-Antagonisten Paxillin die Protektion durch die Gabe des SK_{Ca}-Kanal-Agonisten DCEB in isolierten, perfundierten Meerschweinchenherzen erfolgreich war (Stowe *et al.*, 2017). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine Kardioprotektion über beide Kanäle vermittelt werden kann, aber die Protektion durch Postkonditionierung mit Levosimendan nur über die mBK_{Ca}-Kanäle erfolgt. Die Unterscheidung der beiden K⁺-Kanäle ist auch deshalb wichtig, da sie unterschiedliche Aktivierungsmechanismen besitzen. Der jeweilige Status der Zelle, beispielsweise bezüglich ihrer Transmembranspannung oder zytoplasmatischen Calcium-Konzentration, entscheidet darüber, welcher Kanal aktiviert wird, obwohl beide Kanäle die

mitochondriale Bioenergetik regulieren (Stowe *et al.*, 2017). Wenngleich für beide Kanäle spezifische Inhibitoren und Aktivatoren existieren, teilen sie sich anscheinend dennoch eine gemeinsame Endstrecke bei der Signaltransduktion zur Vermittlung der Kardioprotektion. Der jeweilige kardioprotektive Effekt von BK_{Ca}- und SK_{Ca}-Aktivatoren wird durch die Gabe des ROS-Fängers TBAP (*Mn (III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin*) aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass es durch Aktivierung der beiden Kanäle zu einer ROS-Freisetzung kommt, die entscheidend für die Kardioprotektion ist (Stowe *et al.*, 2017).

4.4. Bedeutung der mitochondrialen K⁺-Kanäle im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung mit Dexmedetomidin

In Publikation 6 konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen spezifischen Antagonisten sowohl der mBK_{Ca}- als auch der mK_{ATP}-Kanäle die Reduktion der Infarktgröße durch Gabe von Dexmedetomidin in der frühen Reperfusionphase aufhoben. Im Gegensatz dazu wurde die Kardioprotektion durch Gabe von Dexmedetomidin in der späten Reperfusionphase nur durch die Blockade des mBK_{Ca}-Kanals verhindert, während die Blockade des mK_{ATP}-Kanals keinen Einfluss hatte. Folglich ist in der frühen Reperfusionphase die Kardioprotektion von Dexmedetomidin anscheinend über beide Kanäle vermittelt, wohingegen in der späten Reperfusionphase nur noch der mBK_{Ca}-Kanal involviert ist.

Das Ergebnis, dass Dexmedetomidin eine Protektion im Herzen über den mK_{ATP}-Kanal vermittelt, ist im Einklang mit Studienergebnissen, die eine Dexmedetomidin-induzierte Protektion im Gehirn zeigen. Das Gehirn kann vor einem I/R-Schaden durch Präkonditionierung mit Dexmedetomidin geschützt werden, wobei dieser Effekt durch den mK_{ATP}-Kanal-Inhibitor 5HD aufgehoben werden kann, was für eine essentielle Beteiligung des mK_{ATP}-Kanals spricht (Yuan *et al.*, 2017). Darüber hinaus wird ein neuroprotektiver Effekt von Dexmedetomidin durch die Gabe des mK_{ATP}-Kanal Inhibitors Glibenclamid in einem *in vivo* Rattenmodell für Parkinson inhibiert (Minaei *et al.*, 2019). Dass mK_{ATP}-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Kardioprotektion spielen, konnte auch schon bei der Konditionierung mit anderen Substanzen (Krolikowski *et al.*, 2005; Obal *et al.*, 2005; Stroethoff *et al.*, 2018; Paggio *et al.*, 2019) oder mittels einer RIPC (Aggarwal *et al.*, 2017) demonstriert werden. Fällt die Aktivierung dieses Kanals komplett aus, wie in einer KO-Maus für das Kanal-kodierende Gen MITOK (MITOK-KO), so kann die pharmakologische Präkonditionierung mit Diazoxid nicht mehr, wie bei der WT-Maus, vor einem I/R-Schaden schützen (Paggio *et al.*,

2019). Diese MITOK-KO Mäuse reagieren sensitiver auf den I/R-Schaden als WT-Mäuse, da sie größere Infarktareale ausbilden, wodurch nochmals die protektive Eigenschaft dieser Kanäle unterstrichen wird (Paggio *et al.*, 2019).

Die Beobachtung, dass die mK_{ATP} -Kanäle bei der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin eine Funktion in der Kardioprotektion ausschließlich in der frühen, aber nicht in der späten Reperfusionphase besitzen, deckt sich mit Ergebnissen aus einer Studie von Barsukevich *et al.* zur IPostC (Barsukevich *et al.*, 2015). Der kardioprotektive Effekt durch eine IPostC, die direkt oder 10 min nach Reperfusionstart initiiert wurde, konnte durch die Gabe des mK_{ATP} -Antagonisten 5HD aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu blieb die IPostC trotz einer Gabe von 5HD protektiv, wenn die Intervention 30 oder 45 min nach der Ischämie stattfand. Folglich ist auch bei einer IPostC der mK_{ATP} -Kanal nur in der frühen Phase der Reperfusion an der Signaltransduktion der Kardioprotektion beteiligt. Ob der mBK_{Ca} -Kanal bei einer IPostC in der späten Phase dieselbe kardioprotektive Funktion wie bei der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin hat, müssen zukünftige Studien zeigen.

4.5. Methodenkritik

Ein *in vitro* Modell, wie das isolierte, perfundierte Herz, besitzt Limitationen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist nicht direkt möglich. Die Langendorff-Apparatur gewährleistet durch den experimentellen Aufbau mit konstant einstellbaren Parametern (beispielsweise der Temperatur) und ohne Einfluss weiterer systemischer Faktoren (beispielsweise neuraler oder peripher-vaskulärer Einflüsse) jedoch auf der einen Seite eine hohe Reproduzierbarkeit und damit eine sehr gute Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Studien. Zusätzlich kann ein direkter Einfluss einer Substanz auf das Herz analysiert werden, was besonders in der Grundlagenforschung von Bedeutung ist, deren Aufgabe hauptsächlich in der Aufklärung von grundlegenden Mechanismen und Signaltransduktionen besteht. Auf der anderen Seite fehlt in der Langendorff-Apparatur gerade der systemische Einfluss auf das Herz. Dies wird zum Beispiel deutlich bei den hämodynamischen Variablen, denn es wird nur die isovolumetrische Arbeit ohne eine Regulation durch neuro-humorale oder peripher-vaskuläre Einflüsse bestimmt, wodurch eine Übertragung in die klinische Situation erschwert wird.

Im Langendorff-Modell können sowohl globale als auch regionale Ischämien analysiert werden, wobei die globale Ischämie aus verschiedenen Gründen in den präsentierten

Publikationen präferiert wurde. Kim *et al.* führten einen direkten Vergleich zwischen diesen beiden Ischämieformen durch und stellten fest, dass globale Ischämien größere zusammenhängende Infarktgebiete als regionale Ischämien induzieren (Kim *et al.*, 2012). Dies erleichtert die Diskriminierung zwischen gesundem und infarziertem Gewebe bei der Infarktgrößenbestimmung. Ein weiterer Vorteil der globalen Ischämie ist die hohe Reproduzierbarkeit durch ein standardisiertes Ausmaß der Ischämie, welches durch die Unterbrechung der Perfusion des gesamten Herzens gewährleistet wird. Im Gegensatz dazu kann bei einer regionalen Ischämie das Ausmaß des betroffenen Gewebeareals durch Variationen der Umstechung bezüglich Position am Herzen, Anzahl der betroffenen Gefäße oder Stärke der Perfusionsunterbrechung verändert sein.

In den „Richtlinien für experimentelle Modelle für myokardiale Ischämie und Infarkte“ wurde vorgegeben, dass alle Studien, die kardioprotektive Interventionen untersuchen, als primären Endpunkt die quantitative Bestimmung der Kardiomyozytenvitalität haben sollten (Lindsey *et al.*, 2018). Für das Modell des isolierten, perfundierten Herzen und alle *in vivo* Modelle ist die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung als Goldstandard anzusehen (Lindsey *et al.*, 2018), die auch in allen Publikationen in dieser kumulativen Arbeit durchgeführt wurde. Trotz erfolgreicher Kardioprotektion, gezeigt anhand reduzierter Infarktgrößen, spiegeln die hämodynamischen Daten der vorgestellten Publikationen keine verbesserte Herzfunktion wider; dies scheint zunächst im Widerspruch zu einer erfolgreichen Kardioprotektion zu stehen. Die kardiale Dysfunktion gilt zwar ebenfalls als ein Maß für den Ischämieschaden und ist wie der Zelltod, repräsentiert durch die Infarktgröße, oft das Resultat der gleichen Mechanismen, aber die Protektion vor kardialer Dysfunktion bzw. Zelltod kann über unterschiedliche Wege verlaufen (Lindsey *et al.*, 2018). Folglich muss eine Infarktgrößenreduktion nicht zwingend mit einer Verbesserung der Herzfunktion einhergehen.

Nachdem die ersten Erkenntnisse zum Mechanismus der jeweiligen pharmakologischen Konditionierung im *in vitro* Modell der Langendorff-Präparation gewonnen wurden, sollten die Ergebnisse in einem *in vivo* Modell validiert werden. Denn erst damit können systemische Einflüsse untersucht werden, die zuvor nicht berücksichtigt werden konnten. Zudem könnten erst in einem *in vivo* Modell mögliche Langzeiteffekte analysiert werden. Aber auch dem *in vivo* Modell sind Grenzen gesetzt, da beispielsweise die chirurgischen Ansprüche an den Experimentator deutlich höher sind und dementsprechend die Reproduzierbarkeit des I/R-

Schadens niedriger sein kann (Lindsey *et al.*, 2018). Das *in vivo* Rattenmodell der transienten LAD-Okklusion in Publikation 1 ist ein etabliertes Modell in der Forschung zum I/R-Schaden, was eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Zudem ist das Modell der transienten Okklusion der permanenten Okklusion überlegen, da sie besser die klinische Situation des Myokardinfarkt-Patienten nach üblicher PTCA widerspiegelt. Dennoch ist bei der Übertragung auf den Menschen weiterhin zu bedenken, dass Speziesunterschiede erheblich sein können.

In den vorliegenden Studien wurden ausschließlich gesunde, junge Ratten untersucht. Dies entspricht nicht der Patientengruppe, die von einer Kardioprotektion durch Konditionierung profitieren würden. Diese Patienten leiden meist an Komorbiditäten, wie Diabetes, und/oder sind fortgeschrittenen Alters. Die vorliegenden Studien dienen zunächst zur Aufklärung des Mechanismus, um anschließend in Modellen mit Komorbiditäten mögliche inhibierende Einflüsse auf die Kardioprotektion zu untersuchen. Ähnlich verhält es sich mit Komedikationen, die gerade in der pharmakologischen Konditionierung zu Wechselwirkungen führen können.

Die Spezifität und Wirksamkeit von Kanal-Inhibitoren sind für ein präzises Ergebnis entscheidend und werden deswegen im Folgenden ausführlich diskutiert.

Paxillin ist ein Indol-Diterpen, das zu der Familie der tremorgenen Mykotoxine von *Penicillium paxilli* gehört und als Blocker der BK_{Ca}-Kanäle wirkt (Yu *et al.*, 2016). Paxillin bindet an die α -Untereinheit der BK_{Ca}-Kanäle (Inhibierungskonstante $K_i = 1,9$ nM zur Blockade von K⁺-Strömen in Oozyten, die die α -Untereinheit des Kanals exprimieren) und fördert die Bindung von Charybdotoxin an BK_{Ca}-Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur (Sanchez *et al.*, 1996). Die Inhibierung durch Paxillin wird durch eine starke Stabilisierung der geschlossenen Konformation des Kanals bewirkt, indem Paxillin enger und bevorzugt an die geschlossene Konformation bindet (Zhou *et al.*, 2014). Saleem *et al.* konnten an verschiedenen Splicevarianten des BK_{Ca}-Kanals eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von 0,35–0,70 μ mol/l bestimmen (Saleem *et al.*, 2009). Die verwendete Paxillinkonzentration in den in dieser Arbeit vorgestellten Publikationen betrug 1 μ M und sollte somit ausreichend sein, um eine Inhibition auszulösen. Auch die Spezifität von Paxillin ist bei der Konzentration von 1 μ M gewährleistet, denn obwohl Paxillin auch Isoformen der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und Inositol-1,4,5-

Trisphosphat hemmt, liegen die jeweiligen IC_{50} -Werte über einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ Paxillin und damit deutlich über der verwendeten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Paxillin (Longland *et al.*, 2000; Bilmen *et al.*, 2002).

Der Antagonist 5HD inhibiert spezifisch die mitochondrialen, aber nicht die plasmamembranalenen, K_{ATP} -Kanäle (Sato *et al.*, 1998). Der Blocker agiert an derselben Bindungsstelle wie ATP, moduliert dabei aber dessen Bindung nicht (Notsu *et al.*, 1992). Erst kürzlich konnten die Untereinheiten des mK_{ATP} -Kanals *in vitro* rekonstruiert werden. Nach Ausbildung eines kompletten Kanals war eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ 5HD für eine vollständige Blockade ausreichend (Paggio *et al.*, 2019). In Publikation 6 wurden ebenfalls $100 \mu\text{M}$ 5HD eingesetzt; dies sollte somit zu einer effektiven Blockade geführt haben. Zudem setzten viele andere Studien den Blocker in gleicher oder sogar niedrigerer Konzentration erfolgreich ein (Lucchinetti *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016).

CsA ist ein lipophiles, zyklisches Peptid aus 11 Aminosäuren und wurde aus dem Pilz *Tolyocladium inflatum* Gams isoliert (Borel *et al.*, 1991; Hausenloy *et al.*, 2012). Es hemmt die Öffnung der mPTP über die Bindung an die mitochondriale Prolyl-Isomerase Cyclophillin D, die die Öffnung der mPTP reguliert (Hausenloy *et al.*, 2012). Die Effekte von CsA sind auf einen sehr kleinen Dosisbereich limitiert, denn es konnten kardioprotektive Effekte anhand eines verbesserten linksventrikulären Drucks in einem isolierten, perfundierten Rattenherz nur mit einer Dosis von 200 nM CsA gezeigt werden, wohingegen niedrigere oder höhere Konzentrationen keinen Effekt hatten (Griffiths *et al.*, 1993; Trankle *et al.*, 2016). Auch ein infarktgrößenreduzierender Effekt konnte bereits mit dieser Dosis gezeigt werden (Minners *et al.*, 2000; Mozaffari *et al.*, 2008). Folglich sollte die Konzentration von 200 nM CsA, die in Publikation 2 eingesetzt wurden, zu einer Inhibierung der mPTP-Öffnung geführt haben.

NS8593 ist ein lipophiler, synthetisch hergestellter, selektiver SK_{Ca} -Kanal-Blocker, der keinen Einfluss auf die K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer und hoher Leitfähigkeit hat (Strobaek *et al.*, 2006). Diese Substanz blockiert nicht die Pore selbst, sondern moduliert die Leitfähigkeit für Ca^{2+} aller drei Subtypen des SK_{Ca} -Kanals (Dissoziationskonstante $K_d = 0,42\text{-}0,73 \mu\text{M}$, bei $0,5 \mu\text{M}$ Ca^{2+}) mit einer IC_{50} von 91 nM negativ (Strobaek *et al.*, 2006). Die verwendete Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ NS8593 in Publikation 5 sollte somit ausreichend sein, um eine Inhibition des SK_{Ca} -Kanals zu gewährleisten. Auch TRPM7 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7*), ein Kanal der ebenfalls für Ca^{2+} permeabel ist, wird durch NS8593 inhibiert

(Chubanov *et al.*, 2012). Da dies aber mit einer IC_{50} von 1,5 μ M erfolgt (Chubanov *et al.*, 2012), sollte bei der Konzentration von 0,1 μ M NS8593, wie in Publikation 5, eine ausreichende Selektivität für den SK_{Ca} -Kanal gegeben sein. Diese Konzentration wurde auch bereits in anderen Studien erfolgreich zur Inhibierung des SK_{Ca} -Kanals eingesetzt (Diness *et al.*, 2010; Stowe *et al.*, 2017).

4.6. Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studien zur pharmakologischen Konditionierung tragen dazu bei, die Mechanismen und die Signaltransduktion, die eine Kardioprotektion vermitteln, besser zu verstehen. Weiterhin muss natürlich das Ziel verfolgt werden, die noch bestehenden Wissenslücken zu schließen, um die Mechanismen der Kardioprotektion in Gänze zu entschlüsseln. Dazu zählt unter anderem die Bestimmung der Mindest- bzw. Höchstkonzentrationen von ROS während der Konditionierung bzw. der Reperfusion. Obwohl allgemein anerkannt ist, dass leichte Anstiege der ROS-Konzentration protektiv wirken und starke Anstiege als schädlich anzusehen sind, konnten bislang keine Schwellenwerte für ROS ermittelt werden (Andreadou *et al.*, 2020). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Analysesysteme für quantitative Messungen von intrazellulären ROS-Konzentrationen, die eine Bestimmung dieser Schwellenwerte ermöglichen würden (Andreadou *et al.*, 2020). Eine quantitative Messung von ROS ist unter anderem aufgrund ihrer hohen Reaktivität und auch ihrer heterogenen Erscheinungsformen (beispielsweise als Superoxid oder Hydroxyl-Radikal) schwierig, so dass in den meisten Studien nur qualitative Analysen zur Bildung von ROS über beispielsweise fluoreszierende Sonden durchgeführt werden (Sampieri *et al.*, 2019). Da die ROS in allen Formen der Konditionierung eine tragende Rolle einnehmen, wäre eine Methodenentwicklung zur Quantifizierung von ROS für eine Bestimmung der Schwellenwerte ein enormer Zugewinn für die Forschung zur Kardioprotektion.

Ein detailliertes Verständnis von Substanz-spezifischen Mechanismen ermöglicht es erst, gezielt an einer Optimierung der Kardioprotektion oder an einer Vermeidung von inhibierenden Effekten auf die Kardioprotektion durch beispielsweise Komedikationen oder -morbiditäten weiter zu forschen. Letzteres nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da die Komedikationen und -morbiditäten für die Schwierigkeiten bei der Übertragung des protektiven Effekts durch eine Konditionierung vom experimentellen Bereich in die klinische Situation verantwortlich gemacht werden (Kleinbongard *et al.*, 2020). Auch auf

experimenteller Ebene werden durch Komorbiditäten Einschränkungen der Kardioprotektion verursacht, wie wir beispielsweise durch das Ausbleiben einer Infarktgrößenreduktion unter hyperglykämischen Bedingungen bei einer Postkonditionierung mit Dexmedetomidin im isolierten, perfundierten Rattenherz zeigen konnten (Torregroza *et al.*, 2020). Eine Inhibierung der Kardioprotektion durch eine Komedikation kann auch durch die Wahl des Anästhetikums entstehen, da in Anwesenheit von Dexmedetomidin die Präkonditionierung mit Milrinon nicht mehr zu einer Reduktion der Infarktgröße in einem isolierten, perfundierten Rattenherz führte (Bunte *et al.*, 2019).

Das gezielte Eingreifen, um eine Inhibition der Kardioprotektion durch Komedikationen oder -morbiditäten im klinischen Kontext zu vermeiden, könnte folgende Maßnahmen beinhalten:

Erstens könnte die Substanz zur Konditionierung spezifisch für den Patienten gewählt werden, so dass deren kardioprotektiver Effekt nicht durch die entsprechende Komedikation oder -morbidität beeinflusst wird. Positiv anzumerken ist, dass es sich bei den Substanzen zur pharmakologischen Konditionierung größtenteils um bereits klinisch etablierte Medikamente handelt, deren kardioprotektive Effekte teilweise in klinisch relevanten Dosierungen, wie beispielsweise für Milrinon (Publikation 2 und 3), zum Tragen kommen. Erschwerend wird allerdings sein, dass Patienten meist nicht nur an einer Komorbidität leiden und außerdem unter dem Einfluss einer Vielzahl von Medikamenten stehen. In den experimentellen Modellen wird bisher größtenteils nur eine einzelne pathologische Bedingung näher untersucht, so dass die zukünftige Forschung mit Modellen, die Kombinationen von Komedikationen und -morbiditäten ermöglichen, durchgeführt werden sollte, um deren Einfluss auf die kardioprotektiven Mechanismen weiter entschlüsseln zu können.

Zweitens könnte durch die Gabe einer weiteren Substanz die Inhibition umgangen werden. Im Falle einer Konditionierung mit Levosimendan, bei der die Kardioprotektion über den mBK_{Ca} -Kanal vermittelt wird (Publikation 4 und 5), könnte zum Beispiel bei einer Blockade des mBK_{Ca} -Kanals durch eine Komorbidität diese Blockade über eine gezielte Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktion umgangen werden.

Drittens könnten die zeitlichen Abläufe von pharmakologischer Konditionierung und Komedikation optimiert werden. Im Falle einer Postkonditionierung mit Dexmedetomidin könnten beispielsweise Medikamente, die den mK_{ATP} -Kanal blockieren, in der späten und nicht

in der frühen Phase der Reperfusion verabreicht werden. Dadurch würde der kardioprotektive Effekt von Dexmedetomidin aufrechterhalten werden, da in der späten Reperfusionphase die Beteiligung dieses Kanals anscheinend nicht für die Protektion essentiell ist (Publikation 6).

Neben der Optimierung der Konditionierung mit Substanzen, für die bereits ein kardioprotektiver Effekt gezeigt wurde, kann das Wissen über die Mechanismen auch bei der gezielten Suche nach neuen kardioprotektiven Substanzen helfen. Denn es ist anzunehmen, dass Substanzen, für die bisher keine kardioprotektiven Eigenschaften bekannt waren, die aber eine Wirkung beispielsweise auf die K^+ -Kanäle oder die mPTP haben, ein Potential zur Kardioprotektion besitzen. Zudem könnten mit einem detaillierten Verständnis der Mechanismen neue Substanzen generiert werden, die noch zielgerichteter als die bisher bekannten Substanzen wirken können und dabei kaum unerwünschte Wirkungen auf andere Prozesse im Körper haben. Im Hinblick auf die Bedeutung des mBK_{Ca} -Kanals in der Kardioprotektion könnte die Entwicklung von Kanalaktivatoren, die spezifisch in Mitochondrien der Kardiomyozyten wirken, interessant sein. Vorteilhaft wäre hier sogar ein schaltbares An-Aus-System zur Imitierung der Zyklen einer IPC. Dies könnte beispielsweise über Photopharmakologie realisiert werden, die über den Einbau von molekularen Lichtschaltern (*photoswitches*) in Substanzen eine räumliche und zeitliche Kontrolle über die Bioaktivität mittels Licht erzielt (Velema *et al.*, 2014).

Schlussendlich muss mit weiteren Studien der spezifische kardioprotektive Mechanismus der einzelnen Substanzen weiter entschlüsselt werden, damit die Übertragung der pharmakologischen Konditionierung aus dem experimentellen Bereich in die klinische Situation ebenfalls zu einer erfolgreichen Kardioprotektion führt, um Patienten bestmöglich vor einem I/R-Schaden schützen zu können.

5. Zusammenfassung

Ischämische Herzerkrankungen gehören zu den Haupttodesursachen in Deutschland. Ein Mechanismus der Entstehung dieser Krankheitsbilder ist der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden). Eine Möglichkeit, um das Ausmaß des I/R-Schadens zu reduzieren, stellt die Konditionierung dar. Die protektiven Konditionierungsinterventionen können entweder kurze, nicht-letale I/R-Zyklen (ischämische Konditionierung) oder die Gabe von Pharmaka (pharmakologische Konditionierung) vor (Prä~) oder nach (Post~) einer Ischämie sein. Trotz

intensiver Forschung sind die Mechanismen der Kardioprotektion nicht vollständig verstanden. Das Ziel der Studien dieser Schrift war es, zu untersuchen, durch welche Mechanismen die Kardioprotektion vor einem I/R-Schaden bei der pharmakologischen Konditionierung mit Isofluran, Milrinon, Levosimendan und Dexmedetomidin vermittelt wird.

Die Fragestellungen wurden an Wistar-Ratten entweder in einem *in vivo* Modell der LAD-Okklusion oder in einem *in vitro* Modell des isolierten, perfundierten Herzens (Langendorff-Modell) untersucht.

Mit dem *in vivo* Modell (Publikation 1) wurde untersucht, ob die Inhalation mit Isofluran nicht nur die Expression der miR-21-5p, sondern auch der miR-1-3p reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Isofluran die Expression von miR-21-5p steigert, wohingegen die Expression der miR-1-3p unverändert bleibt. Des Weiteren ist die Expressionssteigerung der miR-21-5p durch Isofluran anscheinend über Hif1 α reguliert.

Mit Hilfe des *in vitro* Modells wurde gezeigt, dass der kardioprotektive Effekt sowohl der Prä- (Publikation 2) als auch der Postkonditionierung (Publikation 3) mit Milrinon über den mitochondrialen Calcium-sensitiven Kalium-Kanal (mBK_{Ca}-Kanal) vermittelt wird. Weiterhin wurde festgestellt, dass für den kardioprotektiven Effekt der Präkonditionierung mit Milrinon die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Inhibierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transmissions-Pore essentiell sind.

Ebenso wurde gezeigt, dass der mBK_{Ca}-Kanal für die Vermittlung des kardioprotektiven Effekts der Prä- (Publikation 4) und der Postkonditionierung (Publikation 5) mit Levosimendan benötigt wird.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Aktivierung von mBK_{Ca}- und/oder mitochondrialen ATP-sensitiven Kalium (mK_{ATP})-Kanälen an der Signaltransduktion zur Kardioprotektion bei einer Postkonditionierung mit Dexmedetomidin beteiligt ist und ob die Inaktivierung der Kanäle zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion eine Kardioprotektion verhindert. Es wurde festgestellt, dass während der frühen Reperfusionsphase beide Kanäle involviert sind, wohingegen in der späten Phase nur der mBK_{Ca}-Kanal für eine Kardioprotektion benötigt wird.

Diese Studien erweitern das Verständnis über die teils pharmakaspezifischen Mechanismen, über die eine Kardioprotektion vor einem I/R-Schaden vermittelt wird. Das bessere

Verständnis der Mechanismen und Signalwege wird als Grundlage weiterer Studien dienen, um die kardioprotektiven Strategien durch pharmakologische Konditionierung weiter zu optimieren und inhibierende Effekte durch Komedikationen bzw. -morbidityen zu analysieren.

6. Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., P. K. Randhawa, N. Singh and A. S. Jaggi (2017). "Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Remote Ischemic Preconditioning Induced Tissue Protection." J Cardiovasc Pharmacol Ther **22**(5): 467-475.

Ajiro, Y., N. Hagiwara, Y. Katsube, N. Sperelakis and H. Kasanuki (2002). "Levosimendan increases L-type Ca(2+) current via phosphodiesterase-3 inhibition in human cardiac myocytes." Eur J Pharmacol **435**(1): 27-33.

Andreadou, I., R. Schulz, A. Papapetropoulos, B. Turan, K. Ytrehus, P. Ferdinandy, A. Daiber and F. Di Lisa (2020). "The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H₂S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection." J Cell Mol Med **24**(12): 6510-6522.

Antila, S., M. Kivikko, L. Lehtonen, J. Eha, A. Heikkilä, P. Pohjanjousi and P. J. Pentikainen (2004). "Pharmacokinetics of levosimendan and its circulating metabolites in patients with heart failure after an extended continuous infusion of levosimendan." Br J Clin Pharmacol **57**(4): 412-415.

Bailey, J. M., J. H. Levy, M. Kikura, F. Szlam and C. C. Hug, Jr. (1994). "Pharmacokinetics of intravenous milrinone in patients undergoing cardiac surgery." Anesthesiology **81**(3): 616-622.

Baines, C. P., M. Goto and J. M. Downey (1997). "Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium." J Mol Cell Cardiol **29**(1): 207-216.

Barsukevich, V., M. Basalay, J. Sanchez, A. Mrochek, J. Whittle, G. L. Ackland, A. V. Gourine and A. Gourine (2015). "Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning." Basic Res Cardiol **110**(1): 452.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Behmenburg, F., Y. Boekholt, P. van Caster, M. Dorsch, A. Heinen, M. W. Hollmann and R. Huhn (2017). "Extended Second Window of Protection of Sevoflurane-induced Preconditioning." J Cardiovasc Pharmacol **70**(5): 284-289.

Behmenburg, F., E. Pickert, A. Mathes, A. Heinen, M. W. Hollmann, R. Huhn and M. M. Berger (2017). "The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels." J Cardiovasc Pharmacol **69**(4): 228-235.

Bentzen, B. H., S. P. Olesen, L. C. Ronn and M. Grunnet (2014). "BK channel activators and their therapeutic perspectives." Front Physiol **5**: 389.

Berger, M. M., R. Huhn, G. T. Oei, A. Heinen, A. Winzer, I. Bauer, B. Preckel, N. C. Weber, W. Schlack and M. W. Hollmann (2010). "Hypoxia induces late preconditioning in the rat heart in vivo." Anesthesiology **113**(6): 1351-1360.

Bilmen, J. G., L. L. Wootton and F. Michelangeli (2002). "The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by paxilline." Arch Biochem Biophys **406**(1): 55-64.

Boengler, K., G. Lochnit and R. Schulz (2018). "Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **315**(5): H1215-H1231.

Borel, J. F. and Z. L. Kis (1991). "The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune)." Transplant Proc **23**(2): 1867-1874.

Brandenburger, T., H. Grievink, N. Heinen, F. Barthel, R. Huhn, F. Stachuletz, M. Kohns, B. Pannen and I. Bauer (2014). "Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo." Shock **42**(3): 234-238.

Brixius, K., S. Reicke and R. H. Schwinger (2002). "Beneficial effects of the Ca²⁺ sensitizer levosimendan in human myocardium." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H131-137.

Bunte, S., F. Behmenburg, N. Majewski, M. Stroethoff, A. Raupach, A. Mathes, A. Heinen, M. W. Hollmann and R. Huhn (2020). "Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury." Anesth Analg **130**(1): 90-98.

Bunte, S., T. Lill, M. Falk, M. Stroethoff, A. Raupach, A. Mathes, A. Heinen, M. W. Hollmann and R. Huhn (2019). "Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning." J Clin Med **8**(3).

Cao, S., Y. Liu, H. Wang, X. Mao, J. Chen, J. Liu, Z. Xia, L. Zhang, X. Liu and T. Yu (2016). "Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts." PeerJ **4**: e1706.

Caricati-Neto, A., P. R. Errante and F. S. Menezes-Rodrigues (2019). "Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection." Int J Mol Sci **20**(16).

Chang, D. J., C. H. Chang, J. S. Kim, Y. W. Hong, W. K. Lee and Y. H. Shim (2012). "Isoflurane-induced post-conditioning in senescent hearts is attenuated by failure to activate reperfusion injury salvage kinase pathway." Acta Anaesthesiol Scand **56**(7): 896-903.

Chen, C. H., S. Y. Hsu, C. C. Chiu and S. Leu (2019). "MicroRNA-21 Mediates the Protective Effect of Cardiomyocyte-Derived Conditioned Medium on Ameliorating Myocardial Infarction in Rats." Cells **8**(8).

Cheng, Y., P. Zhu, J. Yang, X. Liu, S. Dong, X. Wang, B. Chun, J. Zhuang and C. Zhang (2010). "Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4." Cardiovasc Res **87**(3): 431-439.

Chubanov, V., M. Mederos y Schnitzler, M. Meissner, S. Schafer, K. Abstiens, T. Hofmann and T. Gudermann (2012). "Natural and synthetic modulators of SK (K(ca)2) potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7." Br J Pharmacol **166**(4): 1357-1376.

Cosentino, N., G. Niccoli, F. Fracassi, A. Rebuzzi, P. Agostoni and G. Marenzi (2020). "Rationale, experimental data, and emerging clinical evidence on early and preventive use of levosimendan in patients with ventricular dysfunction." Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother **6**(5): 310-316.

Cox, Z. L., M. W. Calcutt, T. B. Morrison, W. S. Akers, M. B. Davis and D. J. Lenihan (2013). "Elevation of plasma milrinone concentrations in stage D heart failure associated with renal dysfunction." J Cardiovasc Pharmacol Ther **18**(5): 433-438.

Dai, B., F. Wang, X. Nie, H. Du, Y. Zhao, Z. Yin, H. Li, J. Fan, Z. Wen, D. W. Wang and C. Chen (2020). "The Cell Type-Specific Functions of miR-21 in Cardiovascular Diseases." Front Genet **11**: 563166.

Davy, A., J. Fessler, M. Fischler and L. E. G. M (2017). "Dexmedetomidine and general anesthesia: a narrative literature review of its major indications for use in adults undergoing non-cardiac surgery." Minerva Anesthesiol **83**(12): 1294-1308.

Diness, J. G., U. S. Sorensen, J. D. Nissen, B. Al-Shahib, T. Jespersen, M. Grunnet and R. S. Hansen (2010). "Inhibition of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels terminates and protects against atrial fibrillation." Circ Arrhythm Electrophysiol **3**(4): 380-390.

Donato, M., P. Evelson and R. J. Gelpi (2017). "Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning." Curr Opin Cardiol **32**(6): 784-790.

Dong, S., Y. Cheng, J. Yang, J. Li, X. Liu, X. Wang, D. Wang, T. J. Krall, E. S. Delphin and C. Zhang (2009). "MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction." J Biol Chem **284**(43): 29514-29525.

du Toit, E. F., A. Genis, L. H. Opie, P. Pollesello and A. Lochner (2008). "A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart." Br J Pharmacol **154**(1): 41-50.

Duan, X., B. Ji, X. Wang, J. Liu, Z. Zheng, C. Long, Y. Tang and S. Hu (2012). "Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model." Cardiology **122**(1): 36-43.

Feng, J., G. Fischer, E. Lucchinetti, M. Zhu, L. Bestmann, D. Jegger, M. Arras, T. Pasch, J. C. Perriard, M. C. Schaub and M. Zaugg (2006). "Infarct-remodeled myocardium is

receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling." Anesthesiology **104**(5): 1004-1014.

Garlid, K. D., P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy, H. N. Murray, R. B. Darbenzio, A. J. D'Alonzo, N. J. Lodge, M. A. Smith and G. J. Grover (1997). "Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection." Circ Res **81**(6): 1072-1082.

Gottlieb, R. A. (2011). "Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury." J Cardiovasc Pharmacol Ther **16**(3-4): 233-238.

Griffiths, E. J. and A. P. Halestrap (1993). "Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts." J Mol Cell Cardiol **25**(12): 1461-1469.

Hadebe, N., M. Cour and S. Lecour (2018). "The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target?" Basic Res Cardiol **113**(2): 9.

Hausenloy, D. J., J. A. Barrabes, H. E. Botker, S. M. Davidson, F. Di Lisa, J. Downey, T. Engstrom, P. Ferdinandy, H. A. Carbrera-Fuentes, G. Heusch, B. Ibanez, E. K. Iliodromitis, J. Insete, R. Jennings, N. Kalia, R. Kharbanda, S. Lecour, M. Marber, T. Miura, M. Ovize, M. A. Perez-Pinzon, H. M. Piper, K. Przyklenk, M. R. Schmidt, A. Redington, M. Ruiz-Meana, G. Vilahur, J. Vinten-Johansen, D. M. Yellon and D. Garcia-Dorado (2016). "Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery." Basic Res Cardiol **111**(6): 70.

Hausenloy, D. J., E. A. Boston-Griffiths and D. M. Yellon (2012). "Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent." Br J Pharmacol **165**(5): 1235-1245.

Hausenloy, D. J., A. Tsang and D. M. Yellon (2005). "The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning." Trends Cardiovasc Med **15**(2): 69-75.

Hausenloy, D. J. and D. M. Yellon (2013). "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target." J Clin Invest **123**(1): 92-100.

He, B., J. Xiao, A. J. Ren, Y. F. Zhang, H. Zhang, M. Chen, B. Xie, X. G. Gao and Y. W. Wang (2011). "Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning." J Biomed Sci **18**: 22.

Heinen, A., M. Aldakkak, D. F. Stowe, S. S. Rhodes, M. L. Riess, S. G. Varadarajan and A. K. Camara (2007). "Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1400-1407.

Heinen, A., M. Strothoff, A. Schmidt, N. Stracke, F. Behmenburg, I. Bauer, M. W. Hollmann and R. Huhn (2014). "Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway." Exp Gerontol **56**: 99-105.

Heusch, G. (2015). "Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning." Circ Res **116**(4): 674-699.

Heusch, G. (2020). "Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective." Nat Rev Cardiol **17**(12): 773-789.

Heusch, G. and T. Rassaf (2016). "Time to Give Up on Cardioprotection? A Critical Appraisal of Clinical Studies on Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning." Circ Res **119**(5): 676-695.

Honisch, A., N. Theuring, B. Ebner, C. Wagner, R. H. Strasser and C. Weinbrenner (2010). "Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition." Basic Res Cardiol **105**(2): 155-167.

Huang, M. H., Y. Wu, V. Nguyen, S. Rastogi, B. K. McConnell, C. Wijaya, B. F. Uretsky, K. K. Poh, H. C. Tan and K. Fujise (2011). "Heart protection by combination therapy with esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion." Cardiovasc Drugs Ther **25**(3): 223-232.

Jenkins, D. P., D. Strobaek, C. Hougaard, M. L. Jensen, R. Hummel, U. S. Sorensen, P. Christophersen and H. Wulff (2011). "Negative gating modulation by (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) depends on residues in the inner pore vestibule: pharmacological evidence of deep-pore gating of K(Ca)₂ channels." Mol Pharmacol **79**(6): 899-909.

Jia, P., X. Wu, Y. Dai, J. Teng, Y. Fang, J. Hu, J. Zou, M. Liang and X. Ding (2017). "MicroRNA-21 Is Required for Local and Remote Ischemic Preconditioning in Multiple Organ Protection Against Sepsis." Crit Care Med **45**(7): e703-e710.

Jiang, H., Y. Huang, H. Xu, Y. Sun, N. Han and Q. F. Li (2012). "Hypoxia inducible factor-1alpha is involved in the neurodegeneration induced by isoflurane in the brain of neonatal rats." J Neurochem **120**(3): 453-460.

Keating, G. M. (2015). "Dexmedetomidine: A Review of Its Use for Sedation in the Intensive Care Setting." Drugs **75**(10): 1119-1130.

Kerendi, F., H. Kin, M. E. Halkos, R. Jiang, A. J. Zatta, Z. Q. Zhao, R. A. Guyton and J. Vinten-Johansen (2005). "Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors." Basic Res Cardiol **100**(5): 404-412.

Kim, J. H., J. Kim, Y. H. Park, K. J. Chun, J. S. Kim, Y. H. Jang, M. Y. Lee and Z. Xu (2012). "Cardiodynamics and infarct size in regional and global ischemic isolated heart model: comparison of 1 hour and 2 hours reperfusion." Korean Circ J **42**(9): 600-605.

Kinoshita, M., Y. M. Tsutsumi, K. Fukuta, A. Kasai and K. Tanaka (2016). "Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels." J Med Invest **63**(1-2): 80-84.

Kleinbongard, P., H. E. Botker, M. Ovize, D. J. Hausenloy and G. Heusch (2020). "Comorbidities and co-medications as confounders of cardioprotection-Does it matter in the clinical setting?" Br J Pharmacol **177**(23): 5252-5269.

Kloner, R. A., T. Shook, K. Przyklenk, V. G. Davis, L. Junio, R. V. Matthews, S. Burstein, M. Gibson, W. K. Poole, C. P. Cannon and et al. (1995). "Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning?" Circulation **91**(1): 37-45.

Kohns, M., R. Huhn, I. Bauer and T. Brandenburger (2019). "MiRNA-Mediated Mechanisms of Cardiac Protection in Ischemic and Remote Ischemic Preconditioning-A Qualitative Systematic Review." Shock **51**(1): 44-51.

Krolikowski, J. G., M. Bienengraeber, D. Weihrauch, D. C. Warltier, J. R. Kersten and P. S. Pagel (2005). "Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels." Anesth Analg **101**(6): 1590-1596.

Kume, M., R. Banafsche, Y. Yamamoto, Y. Yamaoka, R. Nobiling, M. M. Gebhard and E. Klar (2006). "Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone." J Surg Res **136**(2): 209-218.

Kura, B., B. Kalocayova, Y. Devaux and M. Bartekova (2020). "Potential Clinical Implications of miR-1 and miR-21 in Heart Disease and Cardioprotection." Int J Mol Sci **21**(3).

Lecour, S. (2009). "Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?" J Mol Cell Cardiol **47**(1): 32-40.

Lepran, I., P. Pollesello, S. Vajda, A. Varro and J. G. Papp (2006). "Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model." J Cardiovasc Pharmacol **48**(4): 148-152.

Levin, R., M. Degrange, C. Del Mazo, E. Tanus and R. Porcile (2012). "Preoperative levosimendan decreases mortality and the development of low cardiac output in high-risk patients with severe left ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass." Exp Clin Cardiol **17**(3): 125-130.

Li, W., N. Wu, W. Shu, D. Jia and P. Jia (2015). "Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats." Exp Ther Med **10**(6): 2197-2205.

Lindsey, M. L., R. Bolli, J. M. Canty, Jr., X. J. Du, N. G. Frangogiannis, S. Frantz, R. G. Gourdie, J. W. Holmes, S. P. Jones, R. A. Kloner, D. J. Lefer, R. Liao, E. Murphy, P. Ping, K. Przyklenk, F. A. Recchia, L. Schwartz Longacre, C. M. Ripplinger, J. E. Van Eyk and G. Heusch (2018). "Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **314**(4): H812-H838.

Liu, Y., H. Nie, K. Zhang, D. Ma, G. Yang, Z. Zheng, K. Liu, B. Yu, C. Zhai and S. Yang (2014). "A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes." FEBS Lett **588**(17): 3137-3146.

Liu, Y., T. Sato, B. O'Rourke and E. Marban (1998). "Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?" Circulation **97**(24): 2463-2469.

Longland, C. L., J. L. Dyer and F. Michelangeli (2000). "The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor." Eur J Pharmacol **408**(3): 219-225.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lucchinetti, E., M. Jamnicki, G. Fischer and M. Zaugg (2008). "Preconditioning by isoflurane retains its protection against ischemia-reperfusion injury in postinfarct remodeled rat hearts." Anesth Analg **106**(1): 17-23, table of contents.

Matsushashi, S., M. Manirujjaman, H. Hamajima and I. Ozaki (2019). "Control Mechanisms of the Tumor Suppressor PDCD4: Expression and Functions." Int J Mol Sci **20**(9).

Matsumoto, S., S. Cho, S. Tosaka, U. Higashijima, T. Maekawa, T. Hara and K. Sumikawa (2012). "Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts." Cardiovasc Diabetol **11**: 4.

McClanahan, T., B. Nao, L. Wolke, B. Martin, T. Mertz and K. Gallagher (1993). "Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits." Faseb J **7**:A118.

Meyer, K., J. D. Schipke, R. C. Klocke, E. Gams and B. Korbmacher (2008). "Inotropic, vasodilating and preconditioning actions of levosimendan in the heart." Thorac Cardiovasc Surg **56**(7): 379-385.

Minaei, A. and H. Haghdoost-Yazdi (2019). "Dexmedetomidine attenuates the induction and reverses the progress of 6-hydroxydopamine- induced parkinsonism; involvement of KATP channels, alpha 2 adrenoceptors and anti-inflammatory mechanisms." Toxicol Appl Pharmacol **382**: 114743.

Minners, J., E. J. van den Bos, D. M. Yellon, H. Schwalb, L. H. Opie and M. N. Sack (2000). "Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection." Cardiovasc Res **47**(1): 68-73.

Mozaffari, M. S. and S. W. Schaffer (2008). "Effect of pressure overload on cardioprotection of mitochondrial KATP channels and GSK-3 β : interaction with the MPT pore." Am J Hypertens **21**(5): 570-575.

Murry, C. E., R. B. Jennings and K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74**(5): 1124-1136.

North, B. J. and D. A. Sinclair (2012). "The intersection between aging and cardiovascular disease." Circ Res **110**(8): 1097-1108.

Notsu, T., I. Tanaka, M. Takano and A. Noma (1992). "Blockade of the ATP-sensitive K⁺ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes." J Pharmacol Exp Ther **260**(2): 702-708.

Obal, D., S. Dettwiler, C. Favoccia, H. Scharbatke, B. Preckel and W. Schlack (2005). "The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo." Anesth Analg **101**(5): 1252-1260.

Olson, J. M., Y. Yan, X. Bai, Z. D. Ge, M. Liang, A. J. Kriegel, D. M. Twaroski and Z. J. Bosnjak (2015). "Up-regulation of microRNA-21 mediates isoflurane-induced protection of cardiomyocytes." Anesthesiology **122**(4): 795-805.

Paggio, A., V. Checchetto, A. Campo, R. Menabo, G. Di Marco, F. Di Lisa, I. Szabo, R. Rizzuto and D. De Stefani (2019). "Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria." Nature **572**(7771): 609-613.

Pan, Z., X. Sun, J. Ren, X. Li, X. Gao, C. Lu, Y. Zhang, H. Sun, Y. Wang, H. Wang, J. Wang, L. Xie, Y. Lu and B. Yang (2012). "miR-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models." PLoS One **7**(11): e50515.

Papp, Z., I. Edes, S. Fruhwald, S. G. De Hert, M. Salmenpera, H. Leppikangas, A. Mebazaa, G. Landoni, E. Grossini, P. Caimmi, A. Morelli, F. Guarracino, R. H. Schwinger, S. Meyer, L. Algotsson, B. G. Wikstrom, K. Jorgensen, G. Filippatos, J. T. Parissis, M. J. Gonzalez, A. Parkhomenko, M. B. Yilmaz, M. Kivikko, P. Pollesello and F. Follath (2012). "Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan." Int J Cardiol **159**(2): 82-87.

Pataricza, J., I. Krassoi, J. Hohn, A. Kun and J. G. Papp (2003). "Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery." Cardiovasc Drugs Ther **17**(2): 115-121.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Piper, H. M., D. Garcia-Dorado and M. Ovize (1998). "A fresh look at reperfusion injury." Cardiovasc Res **38**(2): 291-300.

Przyklenk, K., B. Bauer, M. Ovize, R. A. Kloner and P. Whittaker (1993). "Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion." Circulation **87**(3): 893-899.

Qiao, S., J. M. Olson, M. Paterson, Y. Yan, I. Zaja, Y. Liu, M. L. Riess, J. R. Kersten, M. Liang, D. C. Warltier, Z. J. Bosnjak and Z. D. Ge (2015). "MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury via Akt/Nitric Oxide Synthase/Mitochondrial Permeability Transition Pore Pathway." Anesthesiology **123**(4): 786-798.

- Rong, L. Q., M. Rahouma, A. Abouarab, A. Di Franco, N. M. Calautti, M. M. Fitzgerald, M. J. Arisha, D. A. Ibrahim, L. N. Girardi, K. O. Pryor and M. Gaudino (2019). "Intravenous and Inhaled Milrinone in Adult Cardiac Surgery Patients: A Pairwise and Network Meta-Analysis." J Cardiothorac Vasc Anesth **33**(3): 663-673.
- Rosenberg, J. H., J. H. Werner, M. J. Moulton and D. K. Agrawal (2018). "Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning." J Cardiovasc Transl Res **11**(4): 292-307.
- Roubille, F., A. Franck-Miclo, A. Covinhes, C. Lafont, F. Cransac, S. Combes, A. Vincent, P. Fontanaud, C. Sportouch-Dukhan, C. Redt-Clouet, J. Nargeot, C. Piot and S. Barrere-Lemaire (2011). "Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo." Circulation **124**(12): 1330-1336.
- Saklani, R., A. Jaggi and N. Singh (2010). "Pharmacological preconditioning by milrinone: memory preserving and neuroprotective effect in ischemia-reperfusion injury in mice." Arch Pharm Res **33**(7): 1049-1057.
- Saleem, F., I. C. Rowe and M. J. Shipston (2009). "Characterization of BK channel splice variants using membrane potential dyes." Br J Pharmacol **156**(1): 143-152.
- Sampieri, R., E. Fuentes, E. D. Carrillo, A. Hernandez, M. C. Garcia and J. A. Sanchez (2019). "Pharmacological Preconditioning Using Diazoxide Regulates Store-Operated Ca(2+) Channels in Adult Rat Cardiomyocytes." Front Physiol **10**: 1589.
- Sanada, S., M. Kitakaze, P. J. Papst, H. Asanuma, K. Node, S. Takashima, M. Asakura, H. Ogita, Y. Liao, Y. Sakata, A. Ogai, T. Fukushima, J. Yamada, Y. Shinozaki, T. Kuzuya, H. Mori, N. Terada and M. Horii (2001). "Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase." Circulation **104**(6): 705-710.
- Sanchez, M. and O. B. McManus (1996). "Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel." Neuropharmacology **35**(7): 963-968.
- Sato, T., B. O'Rourke and E. Marban (1998). "Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C." Circ Res **83**(1): 110-114.
- Sato, T., N. Sasaki, J. Seharaseyon, B. O'Rourke and E. Marban (2000). "Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection." Circulation **101**(20): 2418-2423.
- Satoh, H. and M. Endoh (1990). "Effects of a new cardioprotective agent 1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-5-[imidazo (1,2-a) pyridin-6-yl]-3-pyridine carbonitrile hydrochloride monohydrate (E-1020) on contractile force and cyclic AMP metabolism in canine ventricular muscle." Jpn J Pharmacol **52**(2): 215-224.
- Shim, Y. H. (2010). "Cardioprotection and ageing." Korean J Anesthesiol **58**(3): 223-230.

Siebert, V., J. Allencherril, Y. Ye, X. H. T. Wehrens and Y. Birnbaum (2019). "The Role of Non-coding RNAs in Ischemic Myocardial Reperfusion Injury." Cardiovasc Drugs Ther **33**(4): 489-498.

Singh, H., R. Lu, J. C. Bopassa, A. L. Meredith, E. Stefani and L. Toro (2013). "MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(26): 10836-10841.

Smith, C. O., K. Nehrke and P. S. Brookes (2017). "The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection." Biochem J **474**(12): 2067-2094.

Soltysinska, E., B. H. Bentzen, M. Barthmes, H. Hattel, A. B. Thrush, M. E. Harper, K. Qvortrup, F. J. Larsen, T. A. Schiffer, J. Losa-Reyna, J. Straubinger, A. Kniess, M. B. Thomsen, A. Bruggemann, S. Fenske, M. Biel, P. Ruth, C. Wahl-Schott, R. C. Boushel, S. P. Olesen and R. Lukowski (2014). "KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury." PLoS One **9**(7): e103402.

Stefani, E., M. Ottolia, F. Noceti, R. Olcese, M. Wallner, R. Latorre and L. Toro (1997). "Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺channel (hslo)." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5427-5431.

Stokfisz, K., A. Ledakowicz-Polak, M. Zagorski and M. Zielinska (2017). "Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience." Adv Med Sci **62**(2): 307-316.

Stowe, D. F., M. Aldakkak, A. K. Camara, M. L. Riess, A. Heinen, S. G. Varadarajan and M. T. Jiang (2006). "Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H434-440.

Stowe, D. F., M. Yang, J. S. Heisner and A. K. S. Camara (2017). "Endogenous and Agonist-induced Opening of Mitochondrial Big Versus Small Ca²⁺-sensitive K⁺ Channels on Cardiac Cell and Mitochondrial Protection." J Cardiovasc Pharmacol **70**(5): 314-328.

Strobaek, D., C. Hougaard, T. H. Johansen, U. S. Sorensen, E. O. Nielsen, K. S. Nielsen, R. D. Taylor, P. Pedarzani and P. Christophersen (2006). "Inhibitory gating modulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by the synthetic compound (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current in hippocampal CA1 neurons." Mol Pharmacol **70**(5): 1771-1782.

Stroethoff, M., I. Christoph, F. Behmenburg, A. Raupach, S. Bunte, S. Senpolat, A. Heinen, M. W. Hollmann, A. Mathes and R. Huhn (2018). "Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels." J Cardiovasc Pharmacol **72**(2): 106-111.

Szteyn, K. and H. Singh (2020). "BKCa Channels as Targets for Cardioprotection." Antioxidants (Basel) **9**(8).

- Tanonaka, K., T. Iwai, K. Motegi and S. Takeo (2003). "Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart." Cardiovasc Res **57**(2): 416-425.
- Testai, L., S. Rapposelli, A. Martelli, M. C. Breschi and V. Calderone (2015). "Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs." Med Res Rev **35**(3): 520-553.
- Torregroza, C., K. Feige, L. Schneider, S. Bunte, M. Stroethoff, A. Heinen, M. W. Hollmann, R. Huhn and A. Raupach (2020). "Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart." J Clin Med **9**(5).
- Torregroza, C., A. Raupach, K. Feige, N. C. Weber, M. W. Hollmann and R. Huhn (2020). "Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches." Anesth Analg **131**(6): 1765-1780.
- Toufektsian, M. C., S. Morel, S. Tanguy, A. Jeunet, J. de Leiris and F. Boucher (2003). "Involvement of reactive oxygen species in cardiac preconditioning in rats." Antioxid Redox Signal **5**(1): 115-122.
- Trankle, C., C. J. Thurber, S. Toldo and A. Abbate (2016). "Mitochondrial Membrane Permeability Inhibitors in Acute Myocardial Infarction: Still Awaiting Translation." JACC Basic Transl Sci **1**(6): 524-535.
- Usta, C., B. Eksert, I. Golbasi, Z. Bigat and S. S. Ozdem (2006). "The role of potassium channels in the vasodilatory effect of levosimendan in human internal thoracic arteries." Eur J Cardiothorac Surg **30**(2): 329-332.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, J. E. Thatcher, J. M. DiMaio, R. H. Naseem, W. S. Marshall, J. A. Hill and E. N. Olson (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13027-13032.
- Velema, W. A., W. Szymanski and B. L. Feringa (2014). "Photopharmacology: beyond proof of principle." J Am Chem Soc **136**(6): 2178-2191.
- Virag, L., O. Hala, A. Marton, A. Varro and J. G. Papp (1996). "Cardiac electrophysiological effects of levosimendan, a new calcium sensitizer." Gen Pharmacol **27**(3): 551-556.
- Wang, C., D. Weihrauch, D. A. Schwabe, M. Bienengraeber, D. C. Warltier, J. R. Kersten, P. F. Pratt, Jr. and P. S. Pagel (2006). "Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in rats." Anesth Analg **103**(2): 281-288, table of contents.
- Warltier, D. C., M. H. al-Wathiqui, J. P. Kampine and W. T. Schmelting (1988). "Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane." Anesthesiology **69**(4): 552-565.

Wu, Y., H. Liu and X. Wang (2020). "Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury." Life Sci: 118628.

Xu, W., Y. Liu, S. Wang, T. McDonald, J. E. Van Eyk, A. Sidor and B. O'Rourke (2002). "Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane." Science **298**(5595): 1029-1033.

Yellon, D. M. and D. J. Hausenloy (2007). "Myocardial reperfusion injury." N Engl J Med **357**(11): 1121-1135.

Yin, C., F. N. Salloum and R. C. Kukreja (2009). "A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70." Circ Res **104**(5): 572-575.

Yin, J., X. Liu, R. Wang, M. Ge, L. Xie, J. Zhai, Z. Dai, Y. Li and S. Wang (2020). "Isoflurane Postconditioning Upregulates Phosphorylated Connexin 43 in the Middle Cerebral Artery Occlusion Model and Is Probably Associated with the TGF-beta1/Smad2/3 Signaling Pathway." Biomed Res Int **2020**: 3451215.

Yoshikawa, Y., N. Hirata, R. Kawaguchi, Y. Tokinaga and M. Yamakage (2018). "Dexmedetomidine Maintains Its Direct Cardioprotective Effect Against Ischemia/Reperfusion Injury in Hypertensive Hypertrophied Myocardium." Anesth Analg **126**(2): 443-452.

Yu, M., S. L. Liu, P. B. Sun, H. Pan, C. L. Tian and L. H. Zhang (2016). "Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels." Acta Pharmacol Sin **37**(1): 56-66.

Yuan, F., H. Fu, K. Sun, S. Wu and T. Dong (2017). "Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel." Metab Brain Dis **32**(2): 539-546.

Zhao, Z. Q., J. S. Corvera, M. E. Halkos, F. Kerendi, N. P. Wang, R. A. Guyton and J. Vinten-Johansen (2003). "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H579-588.

Zhou, Y. and C. J. Lingle (2014). "Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism." J Gen Physiol **144**(5): 415-440.

Zhu, J., K. Yao, Q. Wang, J. Guo, H. Shi, L. Ma, H. Liu, W. Gao, Y. Zou and J. Ge (2016). "Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4." Cell Physiol Biochem **39**(6): 2364-2380.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Herrn Universitätsprofessor Benedikt Pannen, für das in mich gesetzte Vertrauen, die Unterstützung und die Förderung, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Ich möchte mich bei Professor Ragnar Huhn bedanken, der mich immer unterstützt und gefördert hat. Mein Dank gilt natürlich auch allen Mitgliedern der AG Kardioprotektion: Dr. Friederike Behmenburg, Dr. Martin Ströthoff, Dr. Sebastian Bunte, Dr. Carolin Torregroza, Dr. Katharina Feige, und den zahlreichen Doktoranden. Ohne diese AG-Mitglieder wären die Studien dieser Schrift nicht so schnell und erfolgreich zustande gekommen.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern der Experimentellen Anästhesiologie für den interessanten Wissensaustausch, die selbstverständliche Hilfe und die tolle Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich beim „harten“ Kern bedanken: Professorin Inge Bauer möchte ich für die Unterstützung in jeglicher Beziehung und das allzeit offene Ohr danken. Bei Dr. Anna Herminghaus möchte ich mich für den unbezahlbaren Austausch unter Wissenschaftlerinnen und für den Beistand in jeglichen Situationen bedanken. PD Dr. Sebastian Temme möchte ich für seine Hilfsbereitschaft danken. Claudia Dohle und Birgitt Berke, vielen Dank für eure praktische Hilfe im turbulenten Laboralltag.

PD Dr. Dr. Andre Heinen möchte ich sehr für seine ehrliche und verlässliche Unterstützung, die wissenschaftlichen Diskussionen und das Öffnen einiger Türen danken.

Besonderer Dank geht auch an Jan Olligs für die akribischen Korrekturen. Du glaubst immer an mich und stärkst mir den Rücken - im wahrsten Sinne des Wortes. Welch ein Glück, dass es DGK-Rucksäcke gibt!

8. Originalarbeiten

Für alle Abbildungen und Tabellen der Originalarbeiten sind Genehmigungen zur Modifizierung und Verwendung eingeholt worden.



MiR-21-5p but not miR-1-3p expression is modulated by preconditioning in a rat model of myocardial infarction

Annika Raupach¹ · Carolin Torregroza¹ · Julia Niestegge¹ · Katharina Feige¹ · Swantje Klemm-Meyer¹ · Inge Bauer¹ · Timo Brandenburger¹ · Hilbert Grievink² · André Heinen³ · Ragnar Huhn¹

Received: 19 May 2020 / Accepted: 2 August 2020 / Published online: 12 August 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Isoflurane (Iso) preconditioning (PC) is known to be cardioprotective against ischemia/reperfusion (I/R) injury. It was previously shown that microRNA-21-5p (miR-21-5p) is regulated by Iso-PC. It is unclear, if expression of cardiac enriched miR-1-3p is also affected by Iso-PC, and associated with activation of HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha). Male Wistar rats (n = 6–8) were randomly assigned to treatment with or without 1 MAC Iso for 30 min, followed by 25 min of regional myocardial ischemia, with 120 min reperfusion. At the end of reperfusion, myocardial expression of miR-1-3p, miR-21-5p and mRNAs of two HIF-1 α -dependent genes, VEGF (vascular endothelial growth factor) and HO-1 (heme oxygenase-1), were determined by quantitative PCR. Protein expression of a miR-21 target gene, PDCD4 (programmed cell death protein 4), was assessed by western blot analysis. Infarct sizes were analyzed with triphenyltetrazoliumchloride staining. MiR-21-5p expression was increased by Iso, whereas expression of miR-1-3p was not altered. The expression of VEGF but not HO-1 was induced by Iso. Iso-PC reduced infarct sizes compared to untreated controls. No regulation of miRNA and mRNA expression was detected after I/R. PDCD4 protein expression was not affected after Iso exposure. Expression of miR-21-5p, in contrast to miR-1-3p, is altered during this early time point of Iso-PC. HIF1 α signaling seems to be involved in miR-21-5p regulation.

Keywords Isoflurane · Preconditioning · miR-1-3p · miR-21-5p · HIF1 α

Introduction

Cardiac diseases are the leading cause of death in the United States [1] and are initiated or often accompanied by ischemia-reperfusion (I/R) injury. Murry et al. discovered that short intervals of I/R prior to global ischemia reduce I/R injury [2], a phenomenon named ischemic preconditioning (IPC). The effect of IPC can be mimicked pharmacologically. Volatile anesthetics, like isoflurane (Iso), show cardioprotective effects via reducing infarct size in *in vivo* models [3, 4].

The underlying mechanisms of preconditioning (PC) are yet not fully understood. Evidence suggests, that microRNAs (miRNAs), a class of small non coding RNAs, serve as mediators for preconditioning and influence the protective effect of preconditioning via regulation of apoptosis-related proteins (reviewed in [5]). Yin et al. showed that IPC, followed by I/R, induces expression of miRNAs, e.g. miR-1a-3p, -21a-5p and -24-3p [6]. In 2015, Qiao et al. demonstrated that isoflurane exposure upregulates miR-21a-5p expression in mouse hearts [7]. Olson et al. underlined this finding with similar results in rat hearts [8]. Mir-21 plays a critical role in Iso-PC demonstrated by a failed reduction in infarct size after Iso-PC in knock out mice of miR-21 [8]. This group also showed that cardioprotection by Iso is mediated by the Akt/nitric oxide synthase (NOS)/mitochondrial permeability transition pore (mPTP) pathway [7]. The expression of miR-21 during PC may be regulated by HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha), which was shown through an induction of HIF1 α and miR-21 expression induced by hypoxia or renal ischemic preconditioning [9]. Isoflurane is also able to induce HIF1 α under normoxic conditions, which was shown

✉ Carolin Torregroza
carolin.torregroza@med.uni-duesseldorf.de

¹ Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

² Cyclotron/Radiochemistry/MicroPET Unit, Hadassah Hebrew University Hospital, 91120 Jerusalem, Israel

³ Department of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

in vivo in rat brains and in vitro in primary rat neurons [10]. HIF1 α transcriptionally enhances miR-21 promoter activity by binding to its promoter region. Additionally, there exists a regulatory feedback loop via the PTEN (Phosphatase and Tensin homolog)/Akt pathway, which reduces HIF1 α expression due to miR-21-5p inhibition [11]. MiR-21-5p itself is able to bind directly to PDCD4 (programmed cell death protein 4), resulting in an anti-apoptotic effect in cardiomyocytes after hypoxia and reoxygenation, mimicking I/R injury in vitro [12]. Zhu et al. supported the assumption that PDCD4 is involved in cardioprotection, showing a clear decrease of PDCD4 protein by ischemic postconditioning in rats [13].

The cardiac enriched miR-1-3p is upregulated during acute myocardial infarction [14] and belongs to the most commonly described regulated miRNAs in the context of preconditioning [5]. Brandenburger et al. showed that miR-1-3p was downregulated by remote IPC alone, I/R, or a combination of both, after 120 min of reperfusion in the area at risk (AAR), while expression remained unaffected in the non-AAR. Interestingly, after 360 min of reperfusion, miR-1-3p expression increased in the non-AAR [15]. This indicates that miR-1-3p expression is time, treatment, and localization dependent.

To our knowledge, it is not clear whether miR-1-3p expression is altered by Iso and if this plays a potential role in the cardioprotective effect of Iso-PC. To analyze these aims we measured miR-1-3p and miR-21-5p expression under (1) isoflurane exposure alone and (2) additional I/R treatment, in rats in vivo. Additionally, (3) possible HIF1 α mediated miR-1-3p and miR-21-5p regulation was

investigated through two HIF1 α targets, VEGF (vascular endothelial growth factor) and HO-1 (heme oxygenase-1), and (4) possible consequences on the direct miR-21-5p target PDCD4 were analyzed.

Materials and methods

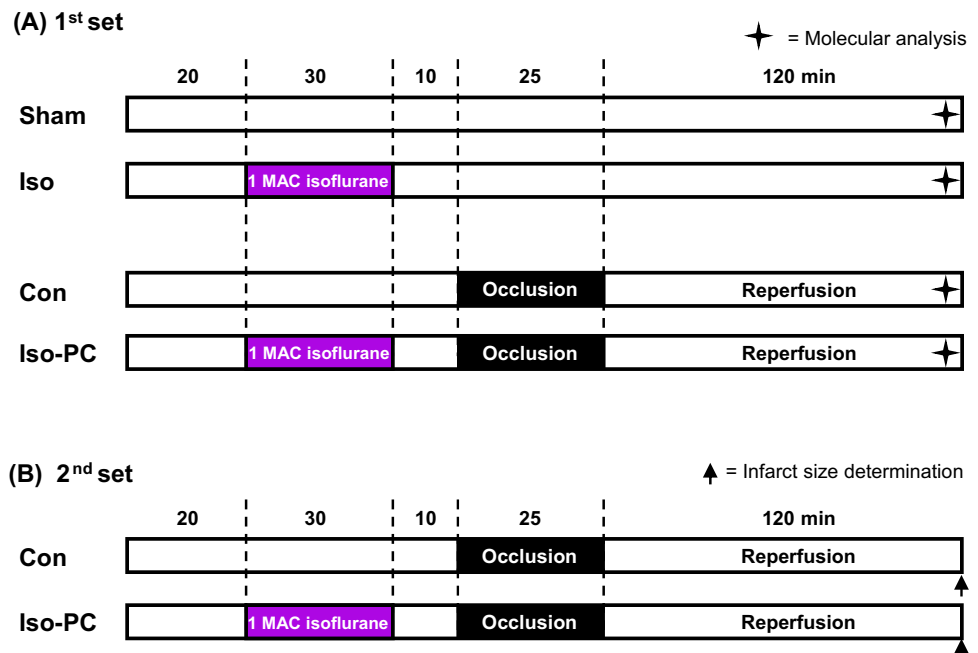
Animal experiments

In accordance with the German legislation on protection of animals and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85–23, revised 1996) animal experiments were performed. Experiments were done as described in detail in the study of Heinen et al. [16]. Briefly, 12 weeks old, male Wistar rats were anesthetized by an intraperitoneal pentobarbital (Narcoren, Merial, Germany) injection (80 mg/kg body weight). For maintenance of anesthesia, pentobarbital was infused continuously via a jugular catheter (40 mg/kg/hour). An arterial line was inserted via the left carotid artery. A lateral left-sided thoracotomy was performed, and a suture (5–0) was looped around the left anterior descending coronary artery (LAD).

Surgery protocol

In a first set of experiments, rats were randomized into four groups (n = 6/group; Fig. 1A). The Sham group received anesthesia and thoracotomy, but no further intervention. The Iso group was treated by 30 min inhalation of 1 MAC Iso

Fig. 1 Experimental protocol. **A** 1st set of experiments for harvesting heart tissue for molecular analysis. **B** 2nd set of experiments for infarct size determination. Con control, Iso isoflurane, PC preconditioning



(1.5% Iso (Baxter Deutschland GmbH, Germany), 40% oxygen in compressed air). Animals in the control group (Con) were not preconditioned before 25 min ischemia of LAD and 120 min reperfusion. Isoflurane preconditioned (Iso-PC) rats received 30 min Iso, with a 10 min washout phase, prior to 25 min ischemia (LAD occlusion) and 120 min reperfusion. At the end of the experiments, each animal was injected with 4 mL Evans blue solution in vivo (after occlusion of the LAD) before heart excision, which allows for the separation of the area at risk (AAR) and the area not at risk (non-AAR). Tissue of the non-AAR was used for further expression analysis and was snap frozen in liquid nitrogen.

For infarct size measurements a second set of experiments was performed (Fig. 1B). Rats were randomized to the protocol of Con ($n=8$) and Iso-PC ($n=9$). After reperfusion, hearts were perfused with Evans Blue, excised and stained with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC; # 37130.03, Serva, Germany) solution. The infarct size measurement was carried out, using planimetry, by a blinded investigator [17].

During both sets of experiments, hemodynamic parameters were measured continuously, digitized using an analogue to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz, and recorded on a personal computer using Chart for Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Heart rate (bpm) and mean aortic pressure (mmHg) were statistically analyzed during baseline, ischemia, and reperfusion (15, 30, 120 min).

RNA isolation

From frozen heart tissue total RNA was isolated using TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) according to the manufactures instructions. RNA integrity, purity and concentrations were confirmed by agarose gel analysis and spectrophotometry (absorbance at 260 and 280 nm; NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham (Massachusetts, USA))).

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay

Reverse transcription of total RNA was performed using the High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Germany). The qPCR for miRNA expression was performed with TaqMan® MicroRNA Assays 20X (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol: rno-miR-1-3p (assay ID: 002064), U6 (assay ID: 001973), and hsa-miR-21-5p (assay ID: 000397). The qPCR for mRNA expression was performed with TaqMan® Gene Expression Assays 20X (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol: HO-1 (Rn01536933_m1),

VEGF (Rn01511601_m1), GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Rn01462661_g1). QPCR conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s using an ABI 7300HT thermocycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Germany). The relative expression of miRNAs was calculated using the $\Delta\Delta C_q$ -method [18].

Western blot analysis

Frozen heart tissue was homogenized in lysis buffer (20 mM Tris HCl (Sigma-Aldrich, Germany), 150 mM NaCl (Roth, Germany), 1 mM Na-EDTA (Sigma-Aldrich, Germany), 1 mM EGTA (Roth, Germany), 1% NP40, 2.5 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Germany), 2.5 mM sodium vanadate (Sigma-Aldrich, Germany) and freshly added protease inhibitor mix (Complete; Roche, Germany). After determination of protein concentration via the Lowry method [19] the western blot analysis was performed, as previously described in detail [16]. As primary antibodies were used: rabbit anti PDCD4 (#9535, cell signaling, 1:1000) and mouse anti GAPDH (ab8245, abcam, 1:40,000). For detection chemiluminescence was used via the following secondary antibodies purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.: Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (#711-035-152, 1:10,000) and Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (115-035-003, 1:10,000).

Statistical analysis

For expression analyses we aimed to detect a minimal difference of 20% by *t*-test. The sample size calculation with a power of 80% ($\alpha < 0.05$ (two-tailed)), and a within group standard deviation (SD) of 12% predicted a group size of $n=6$ [20]. For infarct size analysis we aimed to detect a minimal difference of 25% by *t*-test. The sample size calculation with a power of 80%, $\alpha < 0.05$, and a within group standard deviation (SD) of 17% predicted a group size of $n=8$ [20]. To compare hemodynamic parameters between groups or between different time points within groups, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test (SPSS Science Software, Version 12.0.1).

Data are presented as mean \pm SD. Changes between groups were be considered statistically significant if $P < .05$.

Results

Iso exposure: MiR expression

To determine if expression of miR-1-3p is altered by Iso, rats were treated in vivo with or without inhalation of 1 MAC

Iso for 30 min and after 155 min heart tissue was analyzed by qPCR. Furthermore, to confirm previous observations using a similar animal model [8], miR-21-5p expression was measured. Iso significantly increased relative miR-21-5p expression compared to Sham (Fig. 2A) (Iso: $172 \pm 56\%$ vs. Sham: $100 \pm 27\%$, $P < .05$). In contrast to miR-21-5p, miR-1 expression levels remained unchanged after Iso exposure (Fig. 2B) (Iso: $94 \pm 16\%$ vs. Sham: $100 \pm 27\%$, n.s.). The hemodynamic variables, heart rate and mean aortic pressure, were not different between groups or time points (Table 1).

Iso preconditioning: MiR expression and infarct sizes

To examine, if Iso followed by I/R influences the expression of miR-21-5p and miR-1-3p in the non-AAR, rats were preconditioned for 30 min with or without isoflurane followed by I/R. The hemodynamic variables were not different between groups or time points (Table 1). Also miR-21-5p and miR-1-3p expression levels were not differently influenced by Iso preconditioning (Fig. 2C and D).

Furthermore, to confirm the cardioprotective effect of Iso-PC in this model, infarct sizes were determined. PC with isoflurane significantly reduced infarct sizes compared to Con (Con: $65 \pm 12\%$ vs. Iso-PC: $43 \pm 15\%$, $P < .05$) (Fig. 3). Hemodynamic variables (Table 2), heart rate and mean aortic pressure, were not different between Con and Iso-PC at baseline or other time point. Mean aortic pressure was only significantly reduced in Iso-PC at 120 min reperfusion compared to baseline.

HIF1 α signaling

To investigate a potential role of HIF1 α in the regulation of miR-1-3p and -21-5p, HIF1 α -activation was analyzed. We used the HIF1 α target genes HO-1 and VEGF expression as surrogate parameters for HIF1 α -activation [21]. Iso-PC significantly increased VEGF mRNA expression compared to Sham (Iso: $143 \pm 22\%$ vs. Sham: $100 \pm 18\%$, $P < .05$; Fig. 4B), while HO-1 mRNA levels remained unaltered (Iso: $131 \pm 76\%$ vs. Sham: $100 \pm 51\%$; Fig. 4A). Additionally, subsequent I/R intervention revealed similar mRNA expression levels of HO-1 (Iso-PC: $112 \pm 75\%$ vs. Con: $100 \pm 67\%$, n.s.) and VEGF (Iso-PC: $101 \pm 34\%$ vs. Con: $100 \pm 40\%$, n.s.), with or without Iso exposure (Fig. 4C and D).

PDCD4

As a direct target of miR-21-5p we analyzed the protein expression of PDCD4 [9]. Protein amounts of PDCD4 were not affected by Iso treatment compared to Sham (Iso: $128 \pm 41\%$ vs. Sham: $100 \pm 54\%$; n.s.; Fig. 5).

Discussion

The results of the present study demonstrate increased miR-21-5p expression in rat hearts by isoflurane. In contrast, the expression of miR-1-3p was not changed. The expression of HIF1 α target VEGF, but not HO-1, was induced by isoflurane. No differences were detected after I/R. The miR-21-5p target PDCD4 was not affected by the increase of miR-21-5p after isoflurane exposure.

Olson et al. showed an increase of miR-21-5p expression shortly (15 min) after exposure to 30 min Iso [8], whereas in this study the expression was measured 155 min after Iso exposure. Interestingly, this increase was not detectable after I/R in the non-AAR at the same time point. I/R seems to abrogate the miR-21-5p increase in the non-AAR. However, the literature on miR-21-5p is inconsistent and differs depending on the experimental setup and statistical comparisons. Rooji et al. found an upregulation of miR-21-5p three and fourteen days after acute myocardial injury in the border zone and remote myocardium, in comparison to sham operated mice, indicating an upregulation through I/R injury itself [22]. Dong et al. showed a downregulation of miR-21-5p in infarcted areas, but an increase in the border zone, compared to non-infarcted areas [23]. A potential effect of Iso, on miR-21-5p expression after I/R, could have been masked by a concomitant increase of miR-21-5p expression due to I/R itself. This could explain the lack of difference in miR-21-5p in Iso-PC vs. Con. In this study, we focused on the comparison of groups with and without Iso. Interestingly, IPC itself increased miR-21-5p expression and in infarcted hearts IPC inhibited downregulation of miR-21-5p after 6 h of acute myocardial infarction compared to sham control [23]. Taken together, miR-21-5p expression seems to be dependent on the preconditioning mode, measurement time point and tissue area.

The increase of VEGF expression, as an indirect marker of HIF1 α activity, by Iso exposure indicates that HIF1 α could be responsible for miR-21-5p upregulation. This is in line with the findings of Wang et al. showing that protein expression of VEGF, HIF1 α and extracellular signal-regulated kinase (Erk) increased shortly (15 min) after Iso exposure and was sustained at least up to 155 min after Iso exposure [24]. Additionally, Jiang et al. also demonstrated that Iso induces HIF1 α expression [10]. These findings suggest that HIF1 α is involved in Iso-PC.

An increase of miR-1-3p expression due to Iso exposure was not detected, indicating that miR-1-3p does not seem to play a critical role in Iso-PC. But there is evidence for a role of miR-1-3p in other forms of PC. Brandenburger et al. showed that remote IPC (RIPC) alone led to an early downregulation (165 min after conditioning),

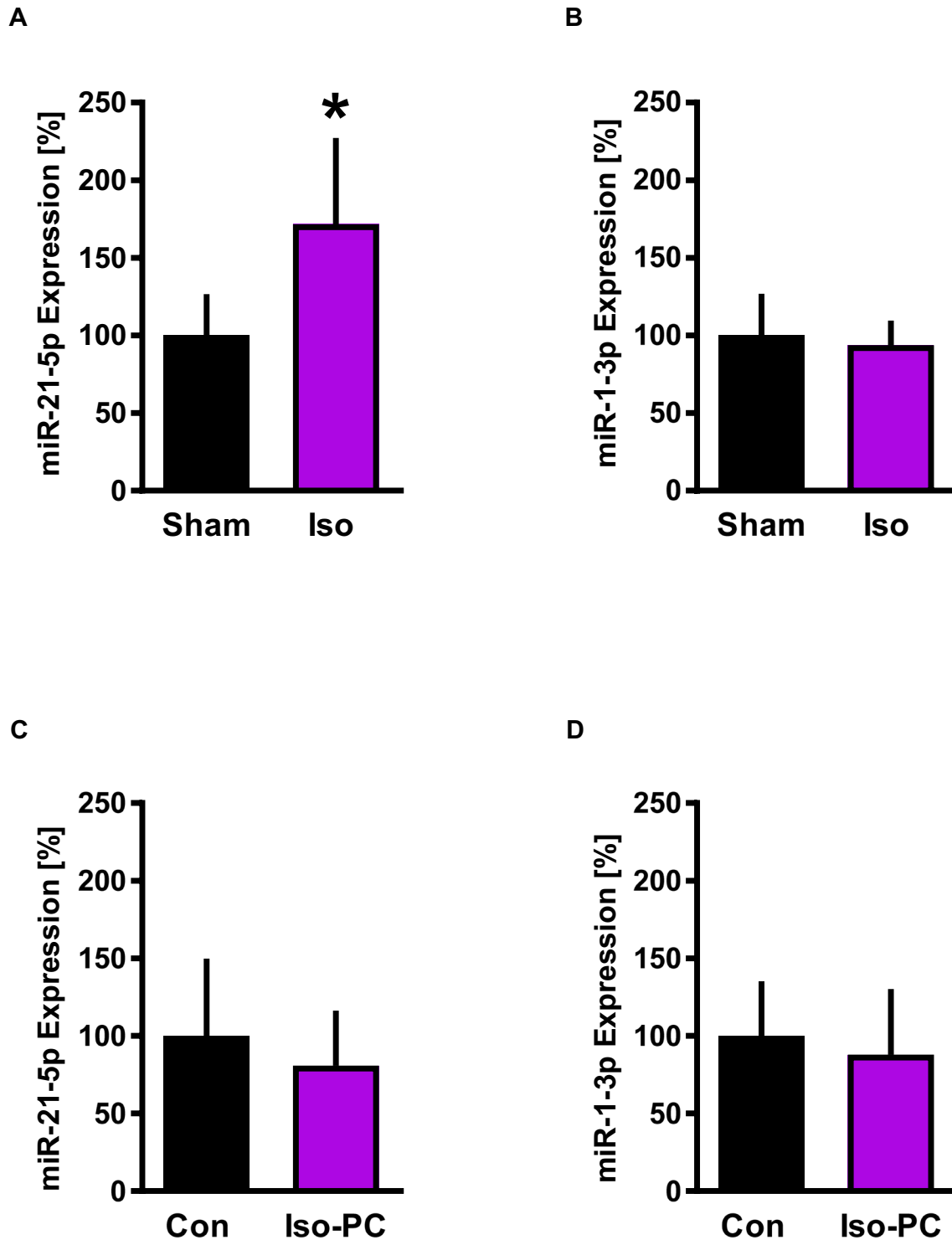


Fig. 2 MiR expression analysis in heart tissue. A/B: Expression of miR-21-5p **A** and miR-1-3p **B** without (Sham) or with isoflurane (Iso). C/D: miR-21-5p **C** and miR-1-3p **D** expression following

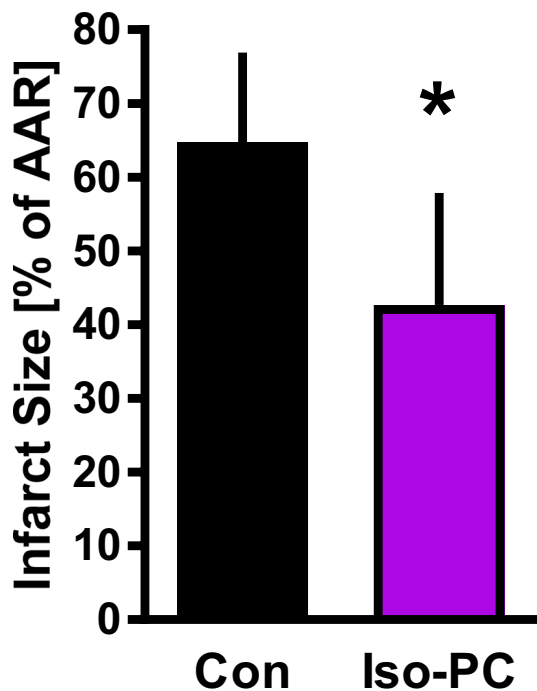
regional myocardial ischemia without (Con) or with (Iso-PC) isoflurane pretreatment. Data are mean \pm SD. n = 6 per group. *P < .05 vs Sham

Table 1 Hemodynamic variables (1st set of experiments; molecular analysis)

	Baseline	Ischemia	Reperfusion		
		24	15	60	120
Heart rate (bpm)					
Sham	427 ± 20		409 ± 33	403 ± 20	392 ± 20
Iso	402 ± 20		378 ± 29	390 ± 32	373 ± 18
Con	364 ± 74	407 ± 18	370 ± 94	381 ± 35	342 ± 75
Iso-PC	400 ± 31	392 ± 37	392 ± 39	425 ± 34	384 ± 30
Mean aortic pressure (mmHg)					
Sham	116 ± 7		104 ± 24	102 ± 22	92 ± 30
Iso	118 ± 13		114 ± 17	105 ± 26	81 ± 15
Con	106 ± 17	113 ± 11	117 ± 13	106 ± 5	84 ± 29
Iso-PC	115 ± 37	117 ± 18	116 ± 20	107 ± 24	93 ± 31

Data are mean ± SD

Con control, Iso isoflurane, PC preconditioning

**Fig. 3** Infarct size measurement. Infarct size of control hearts (Con) and hearts preconditioned with isoflurane (Iso-PC). Data are mean ± SD. Con (n=8); Iso-PC (n=9) per group. *P < .05 vs Con

but later upregulation (405 min) of miR-1-3p expression [15]. Additional I/R intervention did not influence miR-1-3p expression at the early time point. In contrast, after 6 h miR-1-3p expression was upregulated indicating a

Table 2 Hemodynamic variables (2nd set of experiments; infarct size analysis)

	Baseline	Ischemia	Reperfusion		
		24	15	60	120
Heart Rate (bpm)					
Con	397 ± 24	379 ± 60	378 ± 65	382 ± 43	393 ± 53
Iso-PC	379 ± 41	336 ± 50	340 ± 57	344 ± 57	332 ± 56
Mean aortic pressure (mmHg)					
Con	114 ± 21	116 ± 22	114 ± 29	114 ± 20	102 ± 21
Iso-PC	130 ± 16	102 ± 27	104 ± 28	105 ± 25	86 ± 18*

Data are mean ± SD

Con control, Iso-PC isoflurane preconditioning

*P < .05 vs. Baseline

time-dependent regulation of miR-1-3p in the non-AAR after I/R. Dong et al. also found an upregulation of miR-1-3p levels after 6 h, in an *in vivo* rat model of left coronary artery ligation [23]. In this study, miR-1-3p expression was measured after 2.5 h Iso exposure which was possibly too early to detect an influence on expression. Thus, at early time points miR-1-3p expression does not seem to be regulated by Iso, but a regulation at later time points might be possible.

To examine a downstream response of miR-21-5p upregulation, the protein expression of PDCD4 was analyzed. It was previously shown that knockdown of miR-21 increased PDCD4 expression, and the activity of its own downstream target NF-κB (nuclear factor-kappa B), in mice organs (e.g. heart and kidney) [9]. In this study, upregulation of miR-21-5p was not associated with a decrease in the protein expression of PDCD4. This could be due to the time point of tissue harvesting. The time span is possibly too short to detect changes in protein expression and other studies used later time points. Two independent groups measured the PDCD4 expression 24 h after knockdown of miR-21 expression in mice organs [9] or isolated rat cardiomyocytes [23] and found an upregulation of PDCD4 expression. The latter group could also show that PDCD4 has a pro-apoptotic effect, which was suppressed by miR-21-5p resulting in the miR-21-5p cardioprotective effect during myocardial infarction [23]. PDCD4 expression is not only regulated by miR-21-5p, but also at the level of transcription, translation and protein degradation [25], therefore mechanisms influenced by isoflurane with opposing effects than miR-21-5p could be responsible for maintaining the PDCD4 expression. For example, isoflurane is able to increase transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) levels [26], which in turn induces apoptosis via PDCD4 overexpression [25].

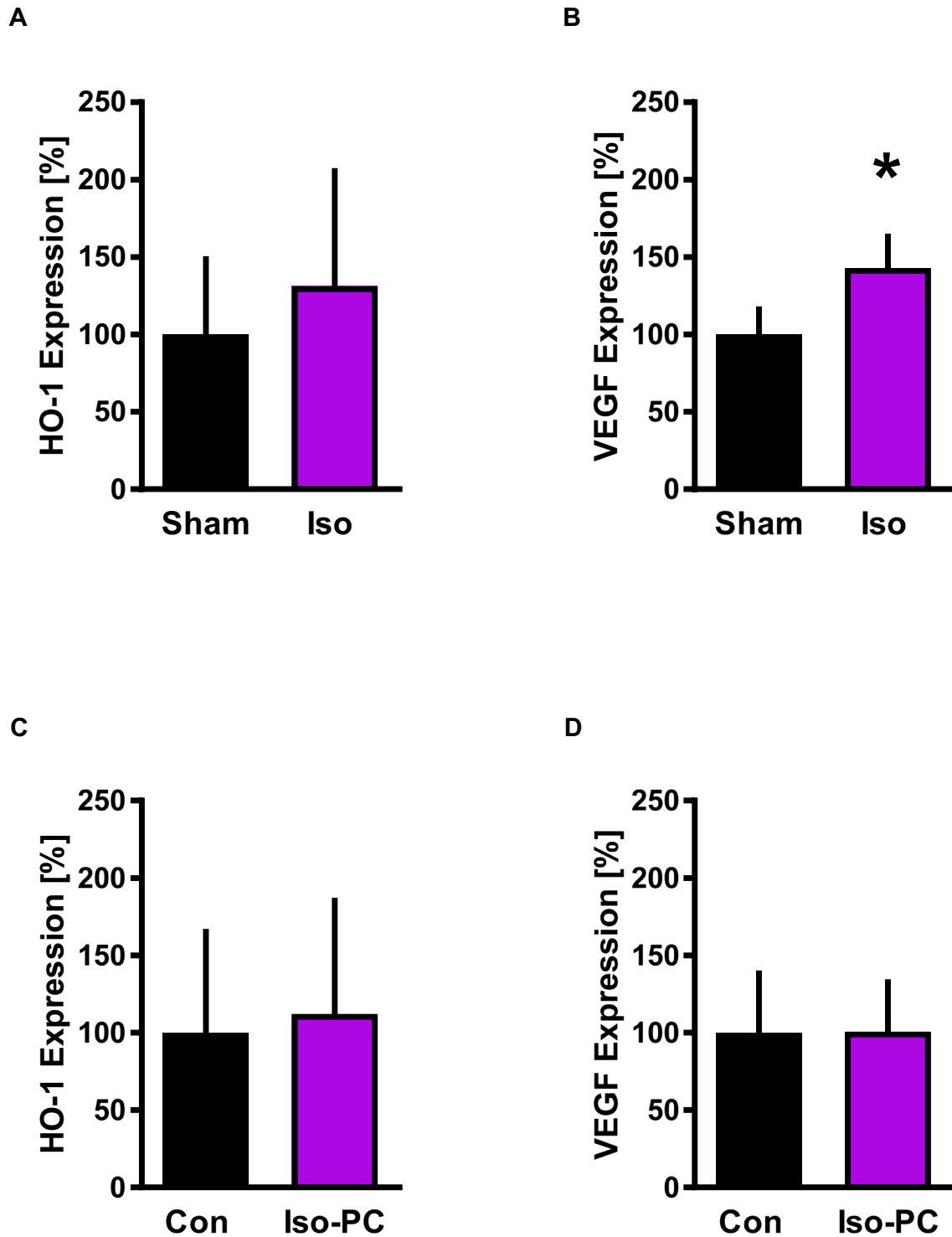


Fig. 4 VEGF and HO-1 expression. A/B: HO-1 A and VEGF B mRNA expression without (Sham) or with isoflurane (Iso). C/D: HO-1 C and VEGF D mRNA expression following regional myo-

cardial ischemia without (Con) or with isoflurane (Iso-PC). Data are mean \pm SD. n = 6 per group. *P < .05 vs Sham

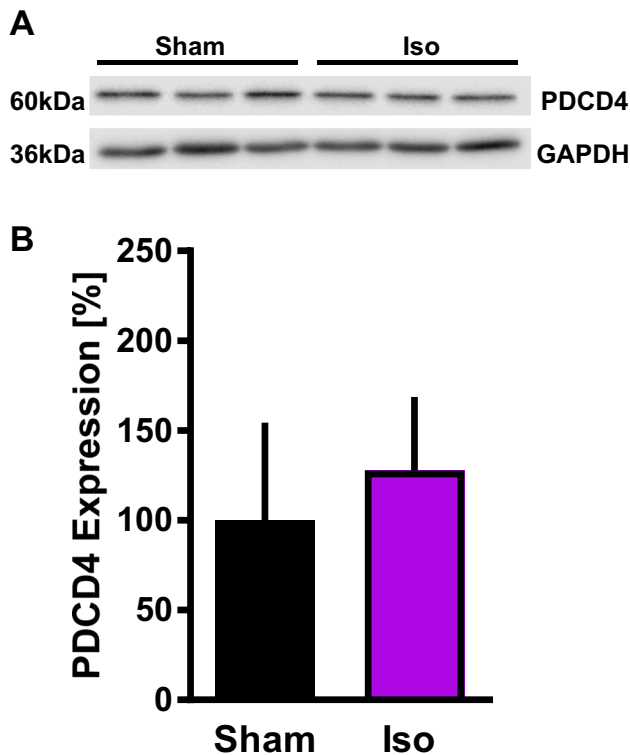


Fig. 5 PDCD4 protein expression without (Sham) or with isoflurane (Iso) pretreatment. **A** Representative western blot analysis. GAPDH served as loading control. **B** Quantification of western blot analysis. Data are mean \pm SD. $n=6$ per group

Conclusions

MiR-1-3p does not seem to play a critical role during the early phase of Iso-PC. In this period miR-21-5p signaling appears to be more prominent.

Acknowledgements Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Authors' contributions RH, HG, IB designed the study and interpreted the data. CT, AR, KF wrote the manuscript. JN and TB performed and analyzed miR, mRNA, and protein expression experiments. SKM and AH performed animal experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by departmental funding only.

Data Availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The Ministry for Environment, Agriculture, Conservation and Consumer Protection of the State of North Rhine-Westphalia (LANUV) approved this animal study (AZ 87-51.04.2010.A307).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Deling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Shay CM, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, VanWagner LB, Tsao CW, American Heart Association Council on E, Prevention Statistics Stroke Statistics C S (2020) Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* 141(9):e139–e596. doi:<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757>
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124–1136. doi:<https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124>
- Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE (2002) Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1):H61–H68. doi:<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01040.2001>
- Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC (1997) Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 87(2):361–370. doi:<https://doi.org/10.1097/0000542-199708000-00024>
- Kohns M, Huhn R, Bauer I, Brandenburger T (2018) Mirna-Mediated Mechanisms of Cardiac Protection in Ischemic and Remote Ischemic Preconditioning - A Qualitative Systematic Review. *Shock*. doi:<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001156>
- Yin C, Salloum FN, Kukreja RC (2009) A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Circ Res* 104(5):572–575. doi:<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193250>
- Qiao S, Olson JM, Paterson M, Yan Y, Zaja I, Liu Y, Riess ML, Kersten JR, Liang M, Warltier DC, Bosnjak ZJ, Ge ZD (2015) MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury via Akt/Nitric Oxide Synthase/Mitochondrial Permeability Transition Pore Pathway. *Anesthesiology* 123(4):786–798. doi:<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000807>

8. Olson JM, Yan Y, Bai X, Ge ZD, Liang M, Kriegel AJ, Twaroski DM, Bosnjak ZJ (2015) Up-regulation of microRNA-21 mediates isoflurane-induced protection of cardiomyocytes. *Anesthesiology* 122(4):795–805. doi:<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000567>
9. Jia P, Wu X, Dai Y, Teng J, Fang Y, Hu J, Zou J, Liang M, Ding X (2017) MicroRNA-21 Is Required for Local and Remote Ischemic Preconditioning in Multiple Organ Protection Against Sepsis. *Crit Care Med* 45(7):e703–e710. doi:<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002363>
10. Jiang H, Huang Y, Xu H, Sun Y, Han N, Li QF (2012) Hypoxia inducible factor-1 α is involved in the neurodegeneration induced by isoflurane in the brain of neonatal rats. *J Neurochem* 120(3):453–460. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07589.x>
11. Liu Y, Nie H, Zhang K, Ma D, Yang G, Zheng Z, Liu K, Yu B, Zhai C, Yang S (2014) A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes. *FEBS Lett* 588(17):3137–3146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.067>
12. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, Chun B, Zhuang J, Zhang C (2010) Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* 87(3):431–439. doi:<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq082>
13. Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, Liu H, Gao W, Zou Y, Ge J (2016) Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4. *Cell Physiol Biochem* 39(6):2364–2380. doi:<https://doi.org/10.1159/000452506>
14. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B (2010) Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):73–77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.005>
15. Brandenburger T, Grievink H, Heinen N, Barthel F, Huhn R, Stachuletz F, Kohns M, Pannen B, Bauer I (2014) Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo. *Shock* 42(3):234–238. doi:<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000201>
16. Heinen NM, Putz VE, Gorgens JI, Huhn R, Gruber Y, Barthuber C, Preckel B, Pannen BH, Bauer I (2011) Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock* 36(1):45–53. doi:<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31821d8e77>
17. Behnenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Holmann MW, Berger MM (2015) Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS One* 10(12):e0144737. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144737>
18. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
20. Chow SSI, Wang H (2008) *Sample Size Calculations in Clinical Research*. 2nd Ed. Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series. page 58
21. Berger MM, Huhn R, Oei GT, Heinen A, Winzer A, Bauer I, Preckel B, Weber NC, Schlack W, Hollmann MW (2010) Hypoxia induces late preconditioning in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* 113(6):1351–1360. doi:<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181fce7ea>
22. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35):13027–13032. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>
23. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C (2009) MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem* 284(43):29514–29525. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027896>
24. Wang C, Weihrauch D, Schwabe DA, Bienengraeber M, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF Jr, Pagel PS (2006) Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression in rats. *Anesth Analg* 103(2):281–288. doi:<https://doi.org/10.1213/01.ane.0000226094.94877.98> table of contents.
25. Matsuhashi S, Manirujjaman M, Hamajima H, Ozaki I (2019) Control Mechanisms of the Tumor Suppressor PDCD4: Expression and Functions. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms20092304>
26. Yin J, Liu X, Wang R, Ge M, Xie L, Zhai J, Dai Z, Li Y, Wang S (2020) Isoflurane Postconditioning Upregulates Phosphorylated Connexin 43 in the Middle Cerebral Artery Occlusion Model and Is Probably Associated with the TGF- β 1/Smad2/3 Signaling Pathway. *Biomed Res Int* 2020:3451215. <https://doi.org/10.1155/2020/3451215>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms

Annika Raupach ¹ , Julia Reinle ¹, Martin Stroethoff ^{1,*}, Alexander Mathes ², André Heinen ³, Markus W. Hollmann ⁴, Ragnar Huhn ¹ and Sebastian Bunte ¹

¹ Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de (A.R.); Julia.Reinle@uni-duesseldorf.de (J.R.);

Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de (R.H.); Sebastian.Bunte@med.uni-duesseldorf.de (S.B.)

² Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Cologne, Kerpener Str. 62, 50937 Cologne, Germany; Alexander.Mathes@uk-koeln.de

³ Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@uni-duesseldorf.de

⁴ Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; M.W.Hollmann@amc.uva.nl

* Correspondence: Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de; Tel.: +49-211-81-08900

Received: 27 February 2019; Accepted: 10 April 2019; Published: 12 April 2019



Abstract: The activation of mitochondrial calcium-sensitive potassium (mBK_{Ca}) channels is crucially involved in cardioprotection induced by preconditioning. For milrinone (Mil)-induced preconditioning, the involvement of mBK_{Ca}-channels and further mitochondrial signaling is unknown. We hypothesize that (1) Mil-induced preconditioning is concentration-dependent and (2) that the activation of mBK_{Ca}-channels, release of reactive oxygen species (ROS), and the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) could be involved. Isolated hearts of male Wistar rats were perfused with Krebs-Henseleit buffer and underwent 33 min of ischemia followed by 60 min of reperfusion. For determination of a concentration-dependent effect of Mil, hearts were perfused with different concentrations of Mil (0.3–10 μ M) over 10 min before ischemia. In a second set of experiments, in addition to controls, hearts were pretreated with the lowest protective concentration of 1 μ M Mil either alone or combined with the mBK_{Ca}-channel blocker paxilline (Pax + Mil), or paxilline alone (Pax). In additional groups, Mil was administered with and without the ROS scavenger N-2-mercaptopyropionylglycine (MPG + Mil, MPG) or the mPTP inhibitor cyclosporine A (MPG + Mil + CsA, CsA + Mil), respectively. Infarct sizes were determined by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The lowest and most cardioprotective concentration was 1 μ M Mil (Mil 1: $32 \pm 6\%$; $p < 0.05$ vs. Con: $63 \pm 8\%$ and Mil 0.3: $49 \pm 6\%$). Pax and MPG blocked the infarct size reduction of Mil (Pax + Mil: $53 \pm 6\%$, MPG + Mil: $59 \pm 7\%$; $p < 0.05$ vs. Mil: $34 \pm 6\%$) without having an effect on infarct size when administered alone (Pax: $53 \pm 7\%$, MPG: $58 \pm 5\%$; ns vs. Con). The combined administration of CsA completely restored the MPG-inhibited cardioprotection of Mil (MPG + Mil + CsA: $35 \pm 7\%$, $p < 0.05$ vs. MPG + Mil). Milrinone concentration-dependently induces preconditioning. Cardioprotection is mediated by the activation of mBK_{Ca}-channels, release of ROS and mPTP inhibition.

Keywords: milrinone; preconditioning; cardioprotection; reperfusion injury; mPTP

1. Introduction

Milrinone (Mil) is a phosphodiesterase 3 (PDE3) inhibitor which is used in cardiac surgeries as an inotropic and pulmonary vasodilator agent [1]. Inhibition of PDE3 increases the concentration of cyclic

adenosine monophosphate (cAMP) [2], resulting in the activation of protein kinase A (PKA), followed by an increase of intracellular calcium (Ca^{2+}) levels [3]. In 2001, Sanada et al. firstly described a cardioprotective effect of Mil preconditioning on ischemia/reperfusion (I/R) injury in a canine model [3]. The cardioprotection by Mil was mediated by a cAMP-, PKA-, and mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanism. A protective effect of Mil preconditioning on I/R injury was also shown for liver and brain. Kume et al. improved hepatic microcirculation after warm I/R injury in a rat model via pretreatment with Mil [4]. A neuroprotective effect of Mil by pharmacological preconditioning was shown in a mouse model of 24 h I/R cerebral injury [5]. Mil reduced cerebral infarct sizes and reversed I/R-induced impairments of memory and motor coordination.

Recently, we showed that postconditioning with Mil induces cardioprotection, requiring the activation of mitochondrial large conductance calcium-sensitive potassium (mBK_{Ca}) channels in an in-vitro rat model [6], indicating a crucial role for mitochondria in Mil postconditioning. For myocardial conditioning, it is suggested that mitochondria serve as the common target of cardioprotective signaling, whereas different signaling pathways into and inside mitochondria influence mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening (reviewed in [7]). mPTP opening at the onset of reperfusion after ischemia is crucial for cell death in myocardial injury [8]. Inhibition of mPTP opening by ischemic as well as pharmacological-induced conditioning results in reduced infarct sizes [9]. Matsumoto et al. demonstrated that Mil postconditioning is also mediated by inhibition of mPTP opening [10]. Amongst others, radical oxygen species (ROS) induce mPTP opening [7]. During ischemia, ROS formation is mostly induced by mitochondria and is further increased at the onset of reperfusion [7]. High amounts of ROS are detrimental for I/R injury. However, low amounts of ROS during ischemic preconditioning (IPC) are essential for the IPC-induced infarct size reduction [11].

Although Sanada et al. described the first steps in the signaling pathway of Mil preconditioning, the following signaling into and inside mitochondria was not the objective of their study. Therefore, we set out to determine the lowest cardioprotective concentration of Mil and the underlying mechanisms involved in Mil-induced preconditioning. We hypothesize that cardioprotection by Mil is concentration-dependent and that the activation of mBK_{Ca} -channels, ROS release and the mPTP is involved in this phenomenon.

2. Material and Methods

The study was conducted on the baseline of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (Publication number 85-23, revised 1996). The animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Duesseldorf, Germany (project number O27/12).

2.1. Surgical Preparation

The procedure was performed as described in detail previously [12]. Male Wistar rats (2–3 months old) were randomized into the respective groups and anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight; Narcoren, Merial, Germany). After decapitation by a guillotine and thoracotomy, hearts were isolated and mounted on a Langendorff system with constant pressure (80 mmHg) and perfused with a modified Krebs-Henseleit solution (KHB: 116 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM MgSO_4 , 1.17 mM KH_2PO_4 , 24.9 mM NaHCO_3 , 2.5 mM CaCl_2 , 8.3 mM glucose, and 2.2 mM pyruvate at 37 °C). Pressure measurements were realized via a fluid-filled balloon. The end-diastolic pressure was set at 1–4 mmHg. All hearts underwent the following protocol: 20 min of equilibration, 10 min application of substances, 33 min of ischemia, 60 min of reperfusion. Hemodynamic variables were measured continuously, digitized using an analogue-to-digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz, and recorded on a personal computer using Chart for Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).

After reperfusion, hearts were stained with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution and the infarct size measurement was determined by a blinded investigator using planimetry [13].

2.2. Experimental Protocol

All hearts in both parts of the study underwent 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion.

In the first part of this study, we determined a concentration-dependent effect of milrinone. We randomly assigned the hearts to five groups ($n = 7-9$ per group, Figure 1):

- Control (Con): Hearts received no further treatment.
- Milrinone (Mil): Hearts were perfused with 0.3, 1, 3, and 10 μM Mil for 10 min before ischemia.

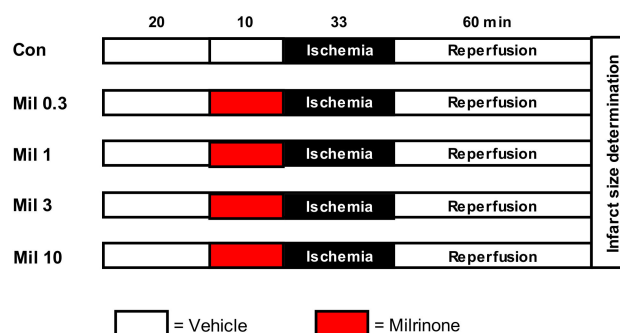


Figure 1. Experimental scheme from part one of the study: Con = Control; Mil = Milrinone.

The second part of the study was designed to investigate the underlying mechanism of Mil-induced preconditioning. Based on the results of part one, we used a concentration of 1 μM Mil as that was the lowest cardioprotective concentration. Rat hearts were randomly assigned to eight groups ($n = 7-9$ per group, Figure 2):

- Control (Con): Hearts received no further treatment.
- Milrinone (Mil): Hearts were perfused with 1 μM Mil only for 10 min before ischemia.
- Paxilline + milrinone (Pax + Mil): Hearts were perfused with the mBK_{Ca}-channel inhibitor Pax (1 μM) [6] combined with 1 μM Mil for 10 min before ischemia.
- Paxilline (Pax): Hearts were perfused with 1 μM Pax only for 10 min.
- N-2-mercaptopropionylglycine + milrinone (MPG + Mil): Hearts were perfused with the ROS scavenger MPG (1 mM) [14] combined with 1 μM Mil for 10 min before ischemia.
- N-2-mercaptopropionylglycine (MPG): Hearts were perfused with 1 mM MPG only for 10 min.
- N-2-mercaptopropionylglycine + milrinone + cyclosporine A (MPG + Mil + CsA): Hearts were perfused with 1 mM MPG [14] combined with 1 μM Mil and 0.2 μM CsA [15] for 10 min before ischemia.
- Milrinone + cyclosporine A (Mil + CsA): Hearts were perfused with 1 μM Mil and 0.2 μM CsA [15] for 10 min before ischemia.

After reperfusion, hearts were weighed to evaluate the wet weight and cut into 7 transverse slices (1–2 mm), starting from the cardiac apex to just before the cardiac valvular plane. The slices were stained for 15 min with 0.75% TTC solution and fixed in HCl for 24 h. The slices were scanned and the size of the infarcted area was determined by planimetry using SigmaScan Pro 5 computer software (SPSS Science Software, Chicago, IL, USA). At the end, heart slices were dried and weighted for dry weights.

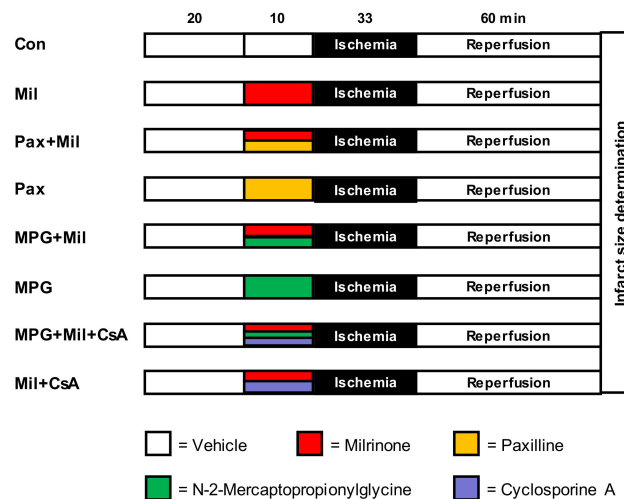


Figure 2. Experimental scheme from part two of the study: Con = Control; Mil = Milrinone; Pax = Paxilline; MPG = N-2-mercaptopropionylglycine; CsA = Cyclosporine A.

2.3. Statistical Analysis

Sample size calculations revealed a group size of $n = 8$ for detecting a 25% mean difference and a standard deviation of 13% in infarct size with a power of 80% ($\alpha < 0.05$ (two-tailed)).

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). To compare hemodynamic variables between groups or between different time points within groups, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). An investigator blinded to the experimental groups determined the infarct sizes. A one-way ANOVA was chosen, followed by a Tukey post hoc test to analyze infarct size. Changes were regarded statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Animal Characteristics

Table 1 shows body weight, wet and dry heart weight and level and time of maximal ischemic contracture of both parts of the study.

Table 1. Weights and ischemic contracture.

	"	Body Weight (g)	Heart Weight Dry (g)	Heart Weight Wet (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Con	9	284 \pm 22	0.12 \pm 0.02	1.27 \pm 0.13	16 \pm 2	69 \pm 25
Mil 0.3	9	287 \pm 14	0.13 \pm 0.01	1.37 \pm 0.07	16 \pm 2	58 \pm 12
Mil 1	7	285 \pm 20	0.13 \pm 0.02	1.33 \pm 0.11	17 \pm 2	55 \pm 12
Mil 3	7	278 \pm 18	0.13 \pm 0.02	1.36 \pm 0.19	18 \pm 4	74 \pm 22
Mil 10	7	286 \pm 28	0.14 \pm 0.01	1.33 \pm 0.20	17 \pm 3	60 \pm 18
Con	9	299 \pm 17	0.14 \pm 0.02	1.35 \pm 0.08	17 \pm 2	61 \pm 9
Mil	9	287 \pm 14	0.13 \pm 0.01	1.35 \pm 0.09	16 \pm 2	58 \pm 17
Pax + Mil	7	284 \pm 19	0.13 \pm 0.01	1.33 \pm 0.08	17 \pm 2	63 \pm 14
Pax	9	297 \pm 13	0.14 \pm 0.02	1.29 \pm 0.11	17 \pm 1	62 \pm 15
MPG + Mil	9	297 \pm 14	0.14 \pm 0.01	1.35 \pm 0.06	16 \pm 1	59 \pm 15
MPG	9	293 \pm 15	0.15 \pm 0.02	1.33 \pm 0.07	16 \pm 1	70 \pm 12
MPG + Mil + CsA	9	293 \pm 18	0.13 \pm 0.01	1.27 \pm 0.10	16 \pm 2	63 \pm 23
Mil + CsA	9	299 \pm 19	0.13 \pm 0.01	1.32 \pm 0.11	16 \pm 2	59 \pm 18

Data are mean \pm SD. Con = Control; Mil = Milrinone; Pax = Paxilline; MPG = N-2-mercaptopropionylglycine; CsA = Cyclosporine A.

3.2. Infarct Size—Concentration Effect of Milrinone Preconditioning

To determine the lowest and most cardioprotective dose of Mil preconditioning, rat hearts were preconditioned with different concentrations of Mil followed by infarct size determination. As shown in Figure 3, the infarct size in the control group was $63 \pm 8\%$ (Con). Preconditioning with $0.3 \mu\text{M}$ Mil reduced the infarct size significantly compared to the control (Mil 0.3: $49 \pm 6\%$, $p < 0.05$ vs. Con). The $1 \mu\text{M}$ Mil concentration reduced the infarct size to a greater extent than $0.3 \mu\text{M}$ Mil (Mil 1: $32 \pm 6\%$; $p < 0.05$ vs. Mil 0.3), while higher Mil concentrations were not able to further reduce the infarct size (Mil 3: $32 \pm 6\%$, Mil 10: $34 \pm 4\%$; ns vs. Mil 1). In further experiments, $1 \mu\text{M}$ Mil was used as the lowest and most cardioprotective dose of Mil.

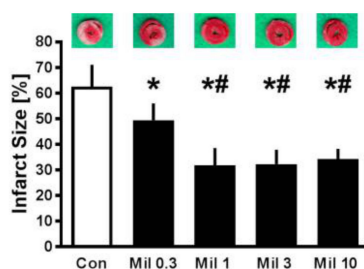


Figure 3. Infarct size measurement. The infarct size of controls (Con) and different concentrations of milrinone (Mil) preconditioning. For each group, an exemplary heart slice is shown. Data are mean ± SD. * $p < 0.05$ vs. Con, # $p < 0.05$ vs. Mil.

3.3. Infarct Size—Mechanism of Milrinone Preconditioning

In the second part, the underlying mechanism of Mil preconditioning was determined. Mil reduced the reproducible infarct size in preconditioned hearts compared to that of Con hearts (Con: $57 \pm 6\%$ vs. Mil: $34 \pm 6\%$; $p < 0.05$, Figure 4). Mil failed to reduce the infarct size both in combination with the mBK_{Ca} -blocker Pax and with the radical scavenger MPG (Pax + Mil: $53 \pm 6\%$, MPG + Mil: $59 \pm 7\%$; ns. vs. Con). Furthermore, Pax and MPG did not have an effect on infarct sizes when administered alone (Pax: $53 \pm 7\%$, MPG: $58 \pm 5\%$; ns. vs. Con). The additional administration of the mPTP inhibitor CsA in the presence of Mil and MPG reduced the infarct size (MPG + Mil + CsA: $35 \pm 7\%$; $p < 0.05$ vs. MPG + Mil), whereas CsA administration did not further enhance the infarct size reduction of Mil alone (Mil + CsA: $31 \pm 10\%$; ns. vs. Mil). Recently, we demonstrated that CsA alone induced infarct size reduction in a comparable experimental setup in isolated rat heart [15]. Due to animal ethics reasons, we did not include this group.

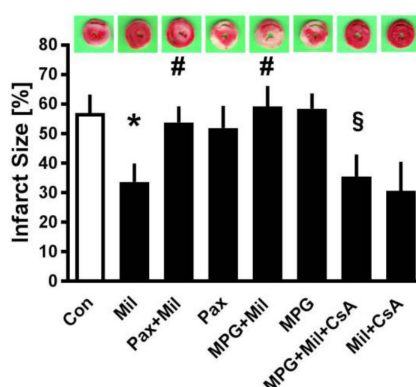


Figure 4. Infarct size measurement. The infarct size of controls (Con) and preconditioning with milrinone (Mil), with or without the mBK_{Ca} -channel inhibitor paxilline (Pax), the ROS scavenger N-2-mercaptpropionylglycine (MPG) and/or the mPTP inhibitor Cyclosporine A (CsA). For each group, an exemplary heart slice is shown. Data are mean ± SD. * $p < 0.05$ vs. Con, # $p < 0.05$ vs. Mil, § $p < 0.05$ vs. MPG + Mil.

3.4. Cardiac Function

Hemodynamic data from part one of the study are shown in Table 2 and data from part two are shown in Table 3. In part one of the study, phasic left ventricular pressure (LVP) and coronary flow were statistically different from baseline after ischemia and during reperfusion. Coronary flow was significantly different in the Mil 0.3 and Mil 10 group compared to Con before ischemia. The hemodynamic variables of part two of the study demonstrated a similar picture. Phasic LVP and coronary flow were statistically different from baseline after ischemia and during reperfusion. Before ischemia, phasic LVP was significantly different in the Pax + Mil and MPG + Mil + CsA groups compared to Con. No differences were determined in heart rate between the experimental groups in part two.

Table 2. Hemodynamic variables.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
Heart Rate (bpm)				
Con	311 ± 37	302 ± 30	244 ± 46 *	248 ± 34 *
Mil 0.3	313 ± 27	316 ± 32	262 ± 54	285 ± 47
Mil 1	301 ± 21	282 ± 36	252 ± 36	232 ± 68
Mil 3	315 ± 32	344 ± 38	231 ± 78	275 ± 72
Mil 10	325 ± 61	328 ± 45	258 ± 43	263 ± 40
Phasic LVP (mmHg)				
Con	117 ± 20	125 ± 23	26 ± 12 *	27 ± 12 *
Mil 0.3	123 ± 16	123 ± 15	24 ± 11 *	22 ± 7 *
Mil 1	137 ± 9	138 ± 12	17 ± 5 *	29 ± 5 *
Mil 3	129 ± 21	131 ± 19	31 ± 11 *	36 ± 8 *
Mil 10	118 ± 21	130 ± 28	22 ± 14 *	25 ± 12 *
Coronary flow (ml * min ⁻¹)				
Con	13 ± 3	13 ± 2	7 ± 2 *	6 ± 1 *
Mil 0.3	17 ± 2 #	17 ± 2 #	9 ± 2 *	7 ± 2 *
Mil 1	14 ± 2	14 ± 2	8 ± 1 *	6 ± 1 *
Mil 3	13 ± 4	15 ± 3	8 ± 1 *	7 ± 1 *
Mil 10	14 ± 2	16 ± 2 #	8 ± 1 *	7 ± 1 *

Data are mean ± SD. Con = Control; Mil = Milrinone; PC = Preconditioning; LVP = Left ventricular pressure. * $p < 0.05$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. Con.

Table 3. Hemodynamic variables.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
Heart Rate (bpm)				
Con	275 ± 28	264 ± 13	237 ± 65	234 ± 45
Mil	282 ± 34	289 ± 37	260 ± 54	235 ± 46
Pax + Mil	322 ± 29	314 ± 22	280 ± 70	249 ± 40
Pax	298 ± 30	260 ± 36	230 ± 41	233 ± 47
MPG + Mil	301 ± 35	294 ± 39	274 ± 65	227 ± 44
MPG	294 ± 41	284 ± 40	218 ± 71	229 ± 82
MPG + Mil + CsA	314 ± 34	288 ± 42	253 ± 53	222 ± 72
Mil + CsA	299 ± 30	295 ± 26	251 ± 69	204 ± 51

Table 3. Cont.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
	Phasic LVP (mmHg)			
Con	146 ± 19	151 ± 22	18 ± 15 *	21 ± 8 *
Mil	148 ± 23	144 ± 20	23 ± 11 *	32 ± 14 *
Pax + Mil	131 ± 10	122 ± 24 #	25 ± 9 *	35 ± 12 *
Pax	144 ± 24	126 ± 25	30 ± 10 *	35 ± 12 *
MPG + Mil	141 ± 15	157 ± 24	23 ± 15 *	26 ± 16 *
MPG	134 ± 18	148 ± 18	18 ± 7 *	24 ± 8 *
MPG + Mil + CsA	132 ± 33	125 ± 38 #	22 ± 13 *	22 ± 10 *
Mil + CsA	133 ± 22	139 ± 36	26 ± 7 *	33 ± 11 *
	Coronary flow (ml * min ⁻¹)			
Con	16 ± 2	16 ± 3	8 ± 2 *	7 ± 2 *
Mil	16 ± 2	17 ± 2	8 ± 2 *	7 ± 2 *
Pax + Mil	16 ± 4	14 ± 2	9 ± 3 *	8 ± 4 *
Pax	16 ± 2	13 ± 3	8 ± 2 *	7 ± 2 *
MPG + Mil	17 ± 3	19 ± 2	7 ± 2 *	6 ± 2 *
MPG	15 ± 2	17 ± 2	7 ± 3 *	6 ± 3 *
MPG + Mil + CsA	15 ± 3	17 ± 5	6 ± 2 *	5 ± 3 *
Mil + CsA	15 ± 4	16 ± 4	7 ± 2 *	6 ± 2 *

Data are mean±SD. Con = Control; Mil = Milrinone; Pax = Paxilline; MPG = N-2-mercaptopyrionylglycine; CsA = Cyclosporine A; PC = Preconditioning; LVP = Left ventricular pressure. * $p < 0.05$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. Con.

4. Discussion

The results of this study show that preconditioning with Mil has a concentration-dependent cardioprotective effect. The 1 μ M Mil concentration represents the lowest and most cardioprotective concentration. The underlying mechanism of Mil preconditioning is mediated via the activation of mBK_{Ca}-channels and the release of free oxygen radicals. Inhibition of mPTP opening seems to play a crucial role in the context of Mil-induced preconditioning.

Mil preconditioning revealed a concentration-dependent effect. The infarct size reduction by Mil 0.3 μ M was amplified by 1 μ M Mil, but higher Mil concentrations (3, 10 μ M) did not induce a further infarct size reduction. Although it is unlikely, we cannot rule out that higher concentrations than 10 μ M of Mil might induce a more pronounced infarct size-reducing effect. Previously, we demonstrated that Mil administration after global ischemia and at the onset of reperfusion was also cardioprotective [6]. Here, the lowest cardioprotective dose was 3 μ M Mil, whereas 0.3 and 1 μ M Mil was not protective. Thus, preconditioning needs lower concentrations of Mil to reduce infarct size than postconditioning with Mil.

The lowest and most cardioprotective concentration of 1 μ M (211 ng/mL) Mil in the present study is at the lower limit of clinically relevant Mil plasma levels. In humans, plasma concentrations of 100–300 ng/mL (0.5–1.4 μ M) Mil improve cardiac index in a dose-dependent manner, whereas concentrations above 500 ng/mL (2.4 μ M) had only little additional benefit [16,17]. Interestingly, in patients with stage D heart failure, a plasma concentration of 450 ng/ μ L (2.1 μ M) Mil was measured using a mean infusion rate of 0.4 μ g/kg/min [17], which is a clinically used maintenance dosage in the upper range. An in vivo rat study showed an infarct size reduction using an infusion rate of 5 μ g/kg/min Mil over 10 min (1/10 of the recommended loading dose) starting 5 min before reperfusion [18]. Thus, the required 1 μ M Mil plasma concentration to induce cardioprotection will be easily reached by clinically used dosages.

In the present study, the mBK_{Ca}-channel blocker Pax inhibited the infarct size-reducing effect of Mil, indicating that mitochondria are involved in the underlying mechanism via the activation of mBK_{Ca}-channels. Pax is an indole diterpene belonging to a family of tremorgenic mycotoxins from *Penicillium paxilli* and serves as a positive allosteric modulator of BK_{Ca}-channels [19]. Pax binds to the

α -subunit of BK_{Ca}-channels ($K_i = 1.9$ nM for block of currents in α -subunit-expressing oocytes) and enhances the binding of charybdotoxin to BK_{Ca}-channels in vascular smooth muscle [20]. Inhibition by Pax involves a strong stabilization of closed conformations and Pax binds more tightly to the closed conformation, favoring occupancy of closed-channel conformations, and it is proposed that it binds to a superficial position near the entrance to the central cavity [21]. We used Pax in a concentration of 1 μ M, which is sufficient for the specific inhibition of BK_{Ca}-channels. Saleem et al. demonstrated that Pax inhibits splice variants of BK_{Ca}-channels with similar IC₅₀s (0.35–0.70 μ mol·L⁻¹) [22]. Pax also inhibits different isoforms of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) with IC₅₀s ranging between 5 and 50 μ M [23], thus at least five times higher than that used in our experiments. Similar effects were reported for cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptors. Pax, as a reversible inhibitor, inhibits the amount or extent of InsP₃-induced Ca²⁺ release, at sub-maximal concentrations of InsP₃, in a biphasic manner consistent with two inhibition constants (K_i 's 6.7 and ≥ 400 μ M) [24]. Taken together, a treatment with 1 μ M Pax should result in specific inhibition of BK_{Ca}-channels.

The role of mBK_{Ca}-channels in cardioprotection is controversially discussed. Nevertheless, existing literature underline the importance of these channels in cardioprotection [25]. For example, IPC failed to reduce infarct size in *KCNMA1*^{-/-} mice compared to wildtype mice [26]. *KCNMA1*^{-/-} mice carry a global inactivation of the *KCNMA1* gene, which encodes the pore-forming α -subunit of BK_{Ca}-channels [27]. A role of mBK_{Ca}-channels in cardioprotection is also supported by studies employing the BK_{Ca}-channel activator NS1619. The latter protects the heart from I/R injury in various species [25], for example in mice and rats [28,29]. The importance of mBK_{Ca}-channels in cardioprotection is further supported by its preserved cardioprotective effect in the aged heart. Heinen et al. showed a reduction of infarct sizes by BK_{Ca}-channel activator NS1619 in both young and aged rats [29], indicating an age-independent cardioprotection. In contrast, ischemic and pharmacological pre as well as postconditioning failed in the aged myocardium (reviewed in [30]).

The opening of mBK_{Ca}-channels influences, amongst others, levels of ROS. A loss of mBK_{Ca}-channels increases post-anoxic ROS levels in isolated cardiomyocyte mitochondria of *KCNMA1*^{-/-} mice [26]. Heinen et al. demonstrated that NS1619 decreased ROS production in cardiac mitochondria, whereas Pax incompletely inhibited the reduction in ROS formation [31]. In the present study, the ROS scavenger MPG abolished the infarct size reduction by Mil, indicating a crucial role for ROS in cardioprotection induced by Mil preconditioning. Thus, ROS production by mBK_{Ca}-channel activation is involved in Mil cardioprotection. This finding supports previous studies postulating that the opening of mBK_{Ca}-channels influences ROS levels. Baines et al. [32] support our findings with the ROS scavenger MPG in an isolated, perfused rabbit heart model. Treatment with 300 μ M MPG (infusion over 15 min, starting 20 min before regional ischemia) abolished infarct size reduction by ischemic preconditioning, whereas MPG had no effect on infarct size when administered alone. Data from an in vivo rat study revealed similar results with MPG [33]. Vigneron et al. demonstrated that 1 mM MPG inhibited infarct size reduction by ischemic preconditioning or pharmacological preconditioning by the selective mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium (mitoK_{ATP}) activator diazoxide in an isolated perfused mouse heart model [34]. Tanonaka et al. showed contradictory results to our study with an infarct size reduction by MPG alone [35]. The results of the study by Tanonaka et al. [35] are not comparable to our study due to small but important differences in the study design. In this study, the same concentration of 1 mM MPG was used, but MPG was applied over 30 min instead of 10 min before ischemia. This longer duration of application resulted in a decrease in left ventricular developed pressure (LVDP) from start until end of the MPG treatment for over 60%. In the present study, no decrease in phasic LVP with 10 min application before ischemia was detectable. In addition, in the current study, a phasic LVP of around 150 mmHg for control and 1 mM-treated animals during preconditioning was measured. In contrast, Tanonaka et al. reported a pre-ischemic LVDP of 75 mmHg in control and 50 mmHg in 1 mM MPG-treated animals [35]. This massive decrease in LVDP by 1 mM MPG may represent an ischemic preconditioning-induced cardioprotection. Taken together, the opposing results to the preconditioning effect of MPG in both studies may arise from

different hemodynamic situations due to the study design. We cannot eliminate an impact of the residual antioxidant effects of MPG in the reperfusion phase. However, we would expect that an antioxidative effect of MPG during early phase of reperfusion would be cardioprotective.

mPTP opening triggers cell death and results in a large myocardial infarct size. In the present study, inhibition of mPTP opening with CsA in the presence of Mil and the ROS scavenger MPG reduces infarct sizes compared to Con or Mil and MPG. On the other hand, there is no additive effect of CsA in combination with Mil on infarct size reduction, suggesting that both substances mediate infarct size reduction via the same (inhibition of mPTP opening) and not two different pathways. We cannot conclude an involvement of mPTP opening in Mil-induced protection by our experiments, but we base our assumption on the known involvement of the mPTP in cardioprotection, which is mediated by mBK_{Ca}-channels. The activation of mBK_{Ca}-channels regulates mitochondrial bioenergetics, leading to an increase in ROS production. This, in turn, serves as a trigger/mediator of the conditioning intervention, resulting in a strong decrease in the detrimental burst of ROS during early reperfusion [31,36]. ROS levels again trigger mPTP opening, which is widely accepted as an endpoint of cardioprotective mitochondrial signaling [7]. In addition, Matsumoto et al. recently showed an involvement of the mPTP in Mil-induced postconditioning. The infarct size reduction by Mil-induced postconditioning was abolished by the mPTP opener atractyloside in an in vivo rat I/R injury model [10]. Taken together, the results of the current study might suggest an inhibition of mPTP opening by Mil preconditioning.

An effect of pentobarbital anesthesia on the preconditioning effect of milrinone can be excluded. All animals received the same anesthesia induction; thus, with respect to infarct size, it must be seen as a systematic error in all groups and could, therefore, not explain the observed differences in infarct size. However, the continuous administration of pentobarbital for anesthesia maintenance has no effect on infarct size reduction by preconditioning interventions [37].

The Langendorff model of an isolated, perfused rat heart was chosen in this study, because of its advantages in studying pathological cardiac conditions such as I/R injury. It is a routinely used model for studying the direct effect of drugs on the heart and making results comparable to prior studies. An alternative approach would have been an in vivo model, but the Langendorff model was preferred for the following reasons. The heart can be investigated without systemic influences from other organs, regulation of circulation or from the nervous system. Therefore, the direct actions of a drug (here milrinone) on the heart (e.g., infarct size) are revealed (reviewed in [38]). On the other hand, the conditions of ischemia and reperfusion, such as duration, are highly reproducible. This is also true for drug application, temperature, buffer conditions and so on. Whether resident immune cell populations contribute to the detected damage or the observed cardioprotection is unclear. There is evidence for an interaction of conditioning interventions/BK_{Ca}-channel activation and the immune system. Dai et al. showed that the activation of BK_{Ca}-channels reduced I/R-induced leukocyte rolling and adhesion in an intestinal I/R mouse model [39]. However, whether milrinone affects immune cell functions is beyond the scope of the present study.

This study has several limitations. We did not measure ROS levels in our experiments, meaning that we are only able to speculate about differences in ROS levels due to I/R, Mil preconditioning, or MPG application. However, ROS levels increase after reperfusion, while IPC attenuates ROS levels [40]. On the other hand, small amounts of ROS are essential for cardioprotection [41]. Furthermore, we did not verify the involvement of mBK_{Ca}-channels in this model, for example, with an mBK_{Ca}-channel opener, such as NS1619. Since we already showed that NS1619 preconditioning is cardioprotective in vitro and in vivo, these experiments were deemed unnecessary and therefore unethical [28]. However, a loss of Mil-induced cardioprotection in *KCNMA1*^{-/-} mice would give the explicit proof for the involvement of mBK_{Ca}-channels in Mil preconditioning. In addition, we omitted a further verification of mPTP involvement, e.g., with application of the mPTP opener atractyloside. For Mil postconditioning, Matsumoto et al. previously demonstrated a loss of infarct size reduction due to atractyloside [10]. Thus, we assumed a similar effect for Mil preconditioning.

Cardioprotective strategies such as preconditioning are of tremendous interest in the hospital setting, in particular to patients suffering from various comorbidities. Many of these comorbidities limit the effectivity of cardioprotective interventions, making it difficult to determine what exactly causes failed cardioprotection. Therefore, this study was designed to determine the underlying mechanisms of milrinone-induced cardioprotection under healthy conditions. In a following step, the exact interactions within the signaling cascade leading to failed cardioprotection in a diseased state should be elucidated.

Taken together, Mil-induced preconditioning reduced infarct size after I/R injury in a concentration-dependent manner and this cardioprotective effect is mediated by the activation of mBK_{Ca}-channels, ROS release and inhibition of mPTP opening. Further intermediate steps and possible additional mediators in the signaling cascade of Mil-induced cardioprotection need to be elucidated.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., A.R. and R.H.; methodology, S.B. and A.R.; formal analysis, S.B., M.S., A.H. and R.H.; investigation, J.R. and S.B.; writing—original draft preparation, A.R. and R.H.; writing—review and editing, A.M. and M.W.H. (in partial fulfillment of the requirements for an MD thesis (J.R.)).

Acknowledgments: We thank T. Lill, M. Falk and L. Goetze for their practical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rong, L.Q.; Rahouma, M.; Abouarab, A.; di Franco, A.; Calautti, N.M.; Fitzgerald, M.M.; Arisha, M.J.; Ibrahim, D.A.; Girardi, L.N.; Pryor, K.O.; et al. Intravenous and Inhaled Milrinone in Adult Cardiac Surgery Patients: A Pairwise and Network Meta-Analysis. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Satoh, H.; Endoh, M. Effects of a new cardiotoxic agent 1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-5-[imidazo (1,2-a) pyridin-6-yl]-3-pyridine carbonitrile hydrochloride monohydrate (E-1020) on contractile force and cyclic AMP metabolism in canine ventricular muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* **1990**, *52*, 215–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sanada, S.; Kitakaze, M.; Papst, P.J.; Asanuma, H.; Node, K.; Takashima, S.; Asakura, M.; Ogita, H.; Liao, Y.; Sakata, Y.; et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: The role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* **2001**, *104*, 705–710. [[CrossRef](#)]
4. Kume, M.; Banafsche, R.; Yamamoto, Y.; Yamaoka, Y.; Nobiling, R.; Gebhard, M.M.; Klar, E. Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone. *J. Surg. Res.* **2006**, *136*, 209–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Saklani, R.; Jaggi, A.; Singh, N. Pharmacological preconditioning by milrinone: Memory preserving and neuroprotective effect in ischemia-reperfusion injury in mice. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 1049–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Behmenburg, F.; Trefz, L.; Dorsch, M.; Strothoff, M.; Mathes, A.; Raupach, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M.; Huhn, R. Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca(2+)-sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **2018**, *32*, 2142–2148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Boengler, K.; Lochnit, G.; Schulz, R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1215–H1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Di Lisa, F.; Menabo, R.; Canton, M.; Barile, M.; Bernardi, P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2571–2575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ong, S.B.; Samangouei, P.; Kalkhoran, S.B.; Hausenloy, D.J. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *78*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Matsumoto, S.; Cho, S.; Tosaka, S.; Higashijima, U.; Maekawa, T.; Hara, T.; Sumikawa, K. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc. Diabetol.* **2012**, *11*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Skyschally, A.; Schulz, R.; Gres, P.; Korth, H.G.; Heusch, G. Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H698–H703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bunte, S.; Behmenburg, F.; Bongartz, A.; Strothoff, M.; Raupach, A.; Heinen, A.; Minol, J.P.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Sixt, S.U. Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca(2+)-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2018**, *32*, 427–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pasdois, P.; Quinlan, C.L.; Rissa, A.; Tariosse, L.; Vinassa, B.; Costa, A.D.; Pierre, S.V.; Dos Santos, P.; Garlid, K.D. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H1470–H1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dorsch, M.; Behmenburg, F.; Raible, M.; Blase, D.; Grievink, H.; Hollmann, M.W.; Heinen, A.; Huhn, R. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151025. [[CrossRef](#)]
16. Bailey, J.M.; Levy, J.H.; Kikura, M.; Szlam, F.; Hug, C.C., Jr. Pharmacokinetics of intravenous milrinone in patients undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology* **1994**, *81*, 616–622. [[CrossRef](#)]
17. Cox, Z.L.; Calcutt, M.W.; Morrison, T.B.; Akers, W.S.; Davis, M.B.; Lenihan, D.J. Elevation of plasma milrinone concentrations in stage D heart failure associated with renal dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2013**, *18*, 433–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Huang, M.H.; Wu, Y.; Nguyen, V.; Rastogi, S.; McConnell, B.K.; Wijaya, C.; Uretsky, B.F.; Poh, K.K.; Tan, H.C.; Fujise, K. Heart protection by combination therapy with esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2011**, *25*, 223–232. [[CrossRef](#)]
19. Yu, M.; Liu, S.L.; Sun, P.B.; Pan, H.; Tian, C.L.; Zhang, L.H. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 56–66. [[CrossRef](#)]
20. Sanchez, M.; McManus, O.B. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 963–968. [[CrossRef](#)]
21. Zhou, Y.; Lingle, C.J. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J. Gen. Physiol.* **2014**, *144*, 415–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Saleem, F.; Rowe, I.C.; Shipston, M.J. Characterization of BK channel splice variants using membrane potential dyes. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 143–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bilmen, J.G.; Wootton, L.L.; Michelangeli, F. The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by paxilline. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *406*, 55–64. [[CrossRef](#)]
24. Longland, C.L.; Dyer, J.L.; Michelangeli, F. The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *408*, 219–225. [[CrossRef](#)]
25. Bentzen, B.H.; Olesen, S.P.; Ronn, L.C.; Grunnet, M. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 389. [[CrossRef](#)]
26. Soltysinska, E.; Bentzen, B.H.; Barthmes, M.; Hattel, H.; Thrush, A.B.; Harper, M.E.; Qvortrup, K.; Larsen, F.J.; Schiffer, T.A.; Losa-Reyna, J.; et al. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sausbier, M.; Hu, H.; Arntz, C.; Feil, S.; Kamm, S.; Adelsberger, H.; Sausbier, U.; Sailer, C.A.; Feil, R.; Hofmann, F.; et al. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9474–9478. [[CrossRef](#)]
28. Behmenburg, F.; Holscher, N.; Flogel, U.; Hollmann, M.W.; Heinen, A.; Huhn, R. Opening of calcium-activated potassium channels improves long-term left-ventricular function after coronary artery occlusion in mice. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *241*, 351–357. [[CrossRef](#)]
29. Heinen, A.; Strothoff, M.; Schmidt, A.; Stracke, N.; Behmenburg, F.; Bauer, I.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp. Gerontol.* **2014**, *56*, 99–105. [[CrossRef](#)]
30. Shim, Y.H. Cardioprotection and ageing. *Korean J. Anesthesiol.* **2010**, *58*, 223–230. [[CrossRef](#)]

31. Heinen, A.; Aldakkak, M.; Stowe, D.F.; Rhodes, S.S.; Riess, M.L.; Varadarajan, S.G.; Camara, A.K. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H1400–H1407. [[CrossRef](#)]
32. Baines, C.P.; Goto, M.; Downey, J.M. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 207–216. [[CrossRef](#)]
33. Toufektsian, M.C.; Morel, S.; Tanguy, S.; Jeunet, A.; de Leiris, J.; Boucher, F. Involvement of reactive oxygen species in cardiac preconditioning in rats. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 115–122. [[CrossRef](#)]
34. Vigneron, F.; Dos Santos, P.; Lemoine, S.; Bonnet, M.; Tariosse, L.; Couffignal, T.; Duplaá, C.; Jaspard-Vinassa, B. GSK-3 β at the crossroads in the signalling of heart preconditioning: Implication of mTOR and Wnt pathways. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *49*–56. [[CrossRef](#)]
35. Tanonaka, K.; Iwai, T.; Motegi, K.; Takeo, S. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *57*, 416–425. [[CrossRef](#)]
36. Stowe, D.F.; Aldakkak, M.; Camara, A.K.; Riess, M.L.; Heinen, A.; Varadarajan, S.G.; Jiang, M.T. Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H434–H440. [[CrossRef](#)]
37. Behmenburg, F.; van Caster, P.; Bunte, S.; Brandenburger, T.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Impact of Anesthetic Regimen on Remote Ischemic Preconditioning in the Rat Heart In Vivo. *Anesth. Analg.* **2018**, *126*, 1377–1380. [[CrossRef](#)]
38. Skrzypiec-Spring, M.; Grotthus, B.; Szelag, A.; Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *55*, 113–126. [[CrossRef](#)]
39. Dai, H.; Wang, M.; Patel, P.N.; Kalogeris, T.; Liu, Y.; Durante, W.; Korthuis, R.J. Preconditioning with the BKCa channel activator NS-1619 prevents ischemia-reperfusion-induced inflammation and mucosal barrier dysfunction: Roles for ROS and heme oxygenase-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2017**, *313*, H988–H999. [[CrossRef](#)]
40. Andrienko, T.; Pasdois, P.; Rossbach, A.; Halestrap, A.P. Real-Time Fluorescence Measurements of ROS and [Ca²⁺] in Ischemic/Reperfused Rat Hearts: Detectable Increases Occur only after Mitochondrial Pore Opening and Are Attenuated by Ischemic Preconditioning. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167300. [[CrossRef](#)]
41. Zhou, T.; Prather, E.R.; Garrison, D.E.; Zuo, L. Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

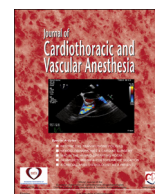


© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia

journal homepage: www.jcvaonline.com

Original Article

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



Friederike Behmenburg, MD^{*}, Lara Trefz^{*}, Marianne Dorsch, MD^{*},
 Martin Ströthoff, MD^{*}, Alexander Mathes, MD, DESA, LLM[†],
 Annika Raupach, PhD^{*}, André Heinen, MD, PhD[‡],
 Markus W. Hollmann, MD, PhD, DEAA[§],
 Marc M. Berger, MD, MBA, DESA^{||,#}, Ragnar Huhn, MD, PhD^{*,1}

^{*}Department of Anesthesiology, University Hospital Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

[†]Department of Anesthesiology, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

[‡]Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

[§]Department of Anesthesiology, Laboratory of Experimental Intensive Care and Anesthesiology (L.E.I.C.A.), Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

^{||}Department of Anesthesiology, Perioperative and General Critical Care Medicine, Salzburg General Hospital, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria

[#]Department of Anesthesiology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

Objectives: Cardioprotection by postconditioning requires activation of mitochondrial large-conductance Ca²⁺-sensitive potassium (mBK_{Ca}) channels. The involvement of these channels in milrinone-induced postconditioning is unknown. The authors determined whether cardioprotection by milrinone-induced postconditioning involves activation of mBK_{Ca} channels in the rat heart in vitro.

Design: Randomized, prospective, blinded laboratory investigation.

Setting: Experimental laboratory.

Participants: Male Wistar rats.

Interventions: Hearts of male Wistar rats were randomized, placed on a Langendorff system, and perfused with Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. All hearts were subjected to 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. At the onset of reperfusion, hearts were perfused with different concentrations of milrinone (0.3–100 μM) for determination of a dose-effect curve. In a second set of experiments, 3 μM milrinone was administered in combination with the mBK_{Ca} channel inhibitor paxilline (1 μM). Infarct size was determined by triphenyltetrazoliumchloride staining.

Measurements and Main Results: In control animals, infarct size was 37 ± 7%. Milrinone at a concentration of 3 μM reduced infarct size to 22 ± 7% (p < 0.05 v control). Higher milrinone concentrations did not confer stronger protection. Paxilline completely blocked milrinone-induced cardioprotection whereas paxilline alone had no effect on infarct size.

Conclusions: This study shows that activation of mBK_{Ca} channels plays a pivotal role in milrinone-induced postconditioning.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: milrinone; postconditioning; reperfusion injury; myocardial infarction

¹Address reprint requests to Ragnar Huhn, MD, PhD, Department of Anesthesiology, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr, 40225 Düsseldorf, Germany.

E-mail address: Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de (R. Huhn).

AFTER A MYOCARDIAL INFARCTION has occurred, restoration of perfusion is crucial for survivability. However, 50% of the final infarct size is caused by reperfusion itself;

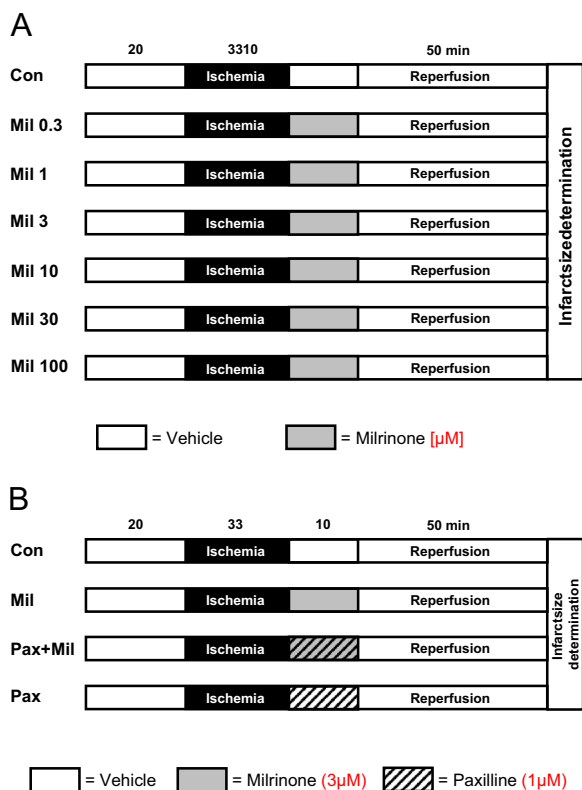


Fig 1. Experimental protocol. (A) Part 1 of the study. (B) Part 2 of the study. Con, control; Mil, milrinone; Pax, paxilline.

thus, reperfusion paradoxically reduces the beneficial effects of restored coronary blood flow.¹ Preconditioning and postconditioning are strategies that have been applied successfully to protect the heart against the consequences of myocardial ischemia and reperfusion injury.²

The phosphodiesterase-3-inhibitor milrinone (Mil) is indicated for the treatment of acute heart failure and cardiogenic shock.³ By inhibiting phosphodiesterase-3, Mil leads to an increase of the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP), resulting in phosphorylation of protein kinases and activation of calcium channels.⁴ Mil has been shown to exert cardioprotective properties and to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury.⁴ This effect of Mil is thought to be mediated by inhibiting cAMP, leading to

phosphorylation of protein kinase A (PKA) and mitogen-activated protein kinase (MAPK).⁴ However, the exact underlying molecular mechanism of Mil-induced cardioprotection is unknown and remains to be determined.

Activation of large-conductance Ca^{2+} -sensitive potassium (BK_{Ca}) channels localized on the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes⁵ previously has been described as essential in the signaling pathway of several cardioprotective interventions.^{6–9} The authors hypothesized that Mil-induced postconditioning involves activation BK_{Ca} channels.

Methods

After approval from the Animal Ethics Committee of the University of Düsseldorf, Germany, the study was performed in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (Publication number 85-23, revised 1996).

Surgical Preparation

The authors performed surgical preparation as specified previously.⁹ In brief, the authors injected the rats with pentobarbital (90 mg/kg) intraperitoneally for anesthesia. Subsequently, rats were thoracotomized for excision of the hearts. The hearts were mounted on a Langendorff system and were perfused at constant pressure (80 mmHg) with a Krebs-Henseleit solution at 37°C.⁶

The authors inserted a fluid filled balloon into the left ventricle and set the end-diastolic pressure at 1 to 4 mmHg. For 20 minutes, the hearts were subjected to an equilibration period. The authors detected a heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), rate pressure product (RPP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and coronary flow continuously. They measured the maximal contracture and the time point of maximal contracture in each experiment during ischemia, which is defined as the point of maximal pressure during ischemia and indicates the degree of myocardial injury.⁶

Table 1
Weights and Ischemic Contracture

	n	Body Weight (g)	Heart Weight Dry (g)	Heart Weight Wet (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Con	10	287 ± 29	0.16 ± 0.02	1.60 ± 0.23	13 ± 2	65 ± 5
Mil 0.3	10	285 ± 24	0.16 ± 0.02	1.46 ± 0.14	14 ± 1	62 ± 6
Mil 1	10	286 ± 24	0.17 ± 0.02	1.56 ± 0.08	13 ± 2	63 ± 6
Mil 3	10	278 ± 25	0.17 ± 0.03	1.48 ± 0.12	13 ± 2	66 ± 8
Mil 10	10	296 ± 32	0.16 ± 0.01	1.62 ± 0.11	14 ± 2	62 ± 9
Mil 30	10	282 ± 23	0.16 ± 0.02	1.55 ± 0.12	13 ± 1	67 ± 10
Mil 100	10	281 ± 21	0.15 ± 0.01	1.49 ± 0.10	13 ± 1	66 ± 7

NOTE. Data are mean ± standard deviation. Abbreviations: Con, control; Mil, milrinone.

Table 2
Weights and Ischemic Contracture

	n	Body Weight (g)	Heart Weight Dry (g)	Heart Weight Wet (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Con	8	288 ± 28	0.17 ± 0.02	1.61 ± 0.14	13 ± 1	63 ± 7
Mil	9	285 ± 23	0.17 ± 0.02	1.55 ± 0.20	13 ± 2	68 ± 11
Pax+Mil	8	282 ± 18	0.15 ± 0.01	1.60 ± 0.21	13 ± 1	64 ± 11
Pax	8	290 ± 15	0.17 ± 0.02	1.68 ± 0.17	14 ± 1	62 ± 9

NOTE. Data are mean ± standard deviation.

Abbreviations: Con, control; Mil, milrinone; Pax, paxilline.

Experimental Protocol

Figure 1 shows the study design. The first part of the study (Fig 1A) was designed for characterization of a dose-effect curve of Mil. The authors randomized the hearts to 1 of 7 groups (n = 10 per group). In the control group (Con), the authors kept the hearts under baseline conditions for 20 minutes followed by 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. Periods of ischemia and reperfusion were chosen according to the authors' established protocol^{10,11} to cause a sufficiently large infarct to reveal relevant cardio-protective effects. Additionally, myocardial damage is not so devastating as to completely impair myocardial function during reperfusion. In groups 2 to 7, Mil was administered at different concentrations (0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 μM) over 10 minutes at the beginning of the reperfusion period.

Based on the results from the first part of the study, the involvement of mBK_{Ca} channels in Mil-induced postconditioning was further investigated with 3 μM Mil (Fig 1B). The authors randomized the hearts into 4 groups (n = 8-9 per group). The hearts were subjected to 33 minutes of global ischemia followed by 60 minutes of reperfusion. Involvement of mBK_{Ca} channels was investigated by administration of the BK_{Ca} channel inhibitor paxilline (Pax, 1 μM)^{8,9,12,13} with or without Mil over 10 minutes at the onset of reperfusion (Fig 1B). The concentration used for paxilline is a standard concentration that has been shown previously to be effective by the authors and others using ischemia-reperfusion models of isolated rat hearts.^{7,9,13}

At the end of the reperfusion period, the hearts were stained with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride solution, and the area with infarction was identified by planimetry.⁶

Statistical Analysis

The calculated sample size (GraphPad StatMate, GraphPad Software, San Diego, CA) was 8 to 10 for detecting a 25% difference in infarct size (power 80%, α < 0.05, two-tailed). The authors detected the hemodynamic parameters during baseline, ischemia, and reperfusion. They used a two-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test (GraphPad Prism, version 6) for comparisons of the hemodynamic parameters between the groups or between the different time points within a group. A researcher blinded to the

experimental groups evaluated the infarct sizes. The infarct sizes were analyzed by one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. The data are presented as mean ± standard deviation (SD). The authors considered changes statistically significant if p < 0.05.

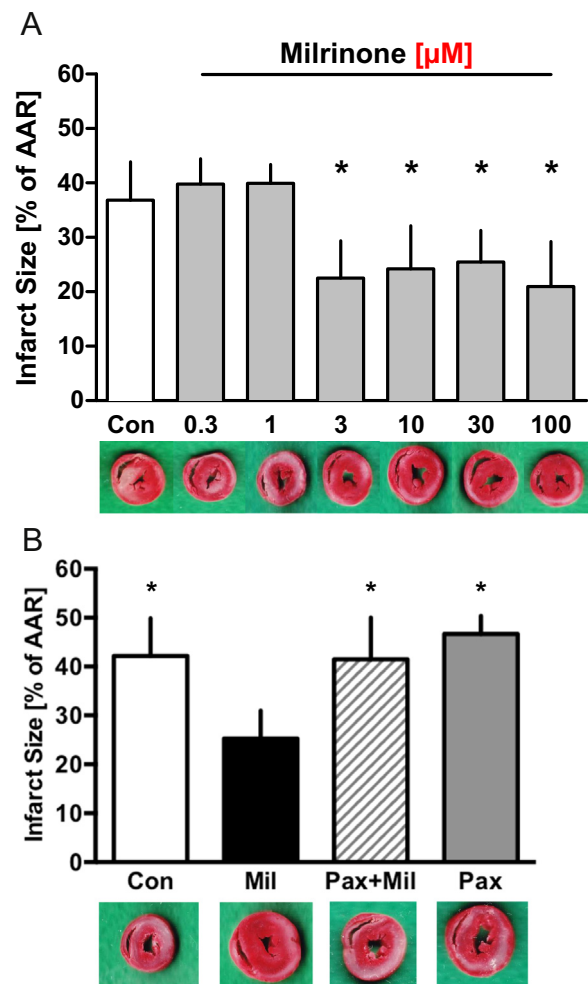


Fig 2. Infarct size measurement. (A) The infarct size of controls (Con) and postconditioning with milrinone (Mil). (B) The infarct size of controls (Con), postconditioning with milrinone (Mil, 3μM), with or without the BK_{Ca}-channel inhibitor paxilline (Pax, 1μM). Data are mean ± standard deviation. *p < 0.05 versus Con and Mil, respectively.

Results

Animal Characteristics

In both parts of the study, there were no differences in body weight or heart weight between the different experimental groups (Tables 1 and 2).

Infarct Size

The control group from part 1 of the study had an infarct size of $37 \pm 7\%$ of the whole heart (Fig 2A). Mil at a concentration of $3 \mu\text{M}$ reduced infarct size to $22 \pm 7\%$ ($p <$

0.05ν Con). Higher concentrations of Mil at 10, 30, and $100 \mu\text{M}$ did not lead to a further infarct size reduction (Mil 10: $24 \pm 8\%$, Mil 30: $25 \pm 6\%$, Mil 100: $21 \pm 8\%$; ns ν Mil 3), and 0.3 and $1 \mu\text{M}$ Mil were not protective (Mil 0.3: $44 \pm 5\%$, Mil 1: $40 \pm 3\%$; ns ν Con).

In part 2 of the study, the infarct size of the control group was $42 \pm 8\%$ (Fig 2B). Postconditioning with $3 \mu\text{M}$ Mil reduced infarct size to $25 \pm 6\%$ ($p < 0.05 \nu$ Con). The BK_{Ca} channel inhibitor paxilline completely abolished the cardioprotective effect of Mil-induced postconditioning (Pax Mil: $42 \pm 9\%$, $p < 0.05 \nu$ Mil). Paxilline alone had no effect on infarct size (Pax: $47 \pm 4\%$, ns ν Con).

Table 3
Hemodynamic Variables

	Baseline	Reperfusion		
		30	45	60
<i>Heart Rate (beats/min)</i>				
Con	326 ± 40	$244 \pm 131^*$	304 ± 76	280 ± 49
Mil 0.3	331 ± 33	285 ± 135	271 ± 56	298 ± 47
Mil 1	333 ± 49	$215 \pm 117^*$	$239 \pm 101^*$	256 ± 69
Mil 3	313 ± 45	$209 \pm 101^*$	285 ± 69	261 ± 35
Mil 10	314 ± 51	261 ± 85	260 ± 39	264 ± 46
Mil 30	322 ± 43	$204 \pm 111^*$	$228 \pm 96^*$	263 ± 72
Mil 100	325 ± 55	$201 \pm 123^*$	248 ± 85	269 ± 102
<i>LVESP (mmHg)</i>				
Con	148 ± 13	$97 \pm 10^*$	$101 \pm 11^*$	$99 \pm 10^*$
Mil 0.3	144 ± 9	$103 \pm 7^*$	$105 \pm 7^*$	$103 \pm 4^*$
Mil 1	139 ± 15	$96 \pm 7^*$	$97 \pm 7^*$	$99 \pm 8^*$
Mil 3	143 ± 12	$101 \pm 10^*$	$101 \pm 11^*$	$101 \pm 9^*$
Mil 10	137 ± 10	$101 \pm 5^*$	$104 \pm 7^*$	$103 \pm 6^*$
Mil 30	145 ± 8	$107 \pm 19^*$	$98 \pm 6^*$	$97 \pm 7^*$
Mil 100	144 ± 13	$97 \pm 8^*$	$100 \pm 10^*$	$98 \pm 7^*$
<i>RPP (bpm\cdotmmHg)</i>				
Con	$47,607 \pm 6,504$	$23,370 \pm 12,891^*$	$30,341 \pm 7,749^*$	$27,381 \pm 4,726^*$
Mil 0.3	$47,413 \pm 3,633$	$29,419 \pm 14,091^*$	$28,581 \pm 7,083^*$	$30,633 \pm 5,746^*$
Mil 1	$45,482 \pm 9,211$	$20,806 \pm 11,537^*$	$23,207 \pm 9,987^*$	$25,088 \pm 6,965^*$
Mil 3	$45,653 \pm 6,505$	$20,694 \pm 9,977^*$	$28,330 \pm 6,722^*$	$25,936 \pm 3,983^*$
Mil 10	$42,925 \pm 6,270$	$26,469 \pm 8,904^*$	$27,186 \pm 5,055^*$	$27,182 \pm 5,299^*$
Mil 30	$45,705 \pm 8,129$	$22,198 \pm 12,497^*$	$22,530 \pm 9,328^*$	$25,686 \pm 6,127^*$
Mil 100	$45,971 \pm 5,506$	$19,848 \pm 12,392^*$	$24,459 \pm 7,924^*$	$26,298 \pm 9,325^*$
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Con	5 ± 2	$86 \pm 7^*$	$82 \pm 7^*$	$81 \pm 6^*$
Mil 0.3	4 ± 2	$83 \pm 5^*$	$79 \pm 6^*$	$77 \pm 5^*$
Mil 1	3 ± 2	$83 \pm 8^*$	$79 \pm 8^*$	$77 \pm 7^*$
Mil 3	5 ± 1	$85 \pm 9^*$	$81 \pm 6^*$	$78 \pm 6^*$
Mil 10	3 ± 2	$88 \pm 7^*$	$83 \pm 6^*$	$81 \pm 5^*$
Mil 30	4 ± 2	$88 \pm 6^*$	$83 \pm 6^*$	$80 \pm 6^*$
Mil 100	4 ± 2	$86 \pm 5^*$	$82 \pm 4^*$	$80 \pm 5^*$
<i>Coronary flow (mL/min)</i>				
Con	16 ± 3	$9 \pm 2^*$	$10 \pm 3^*$	$9 \pm 3^*$
Mil 0.3	15 ± 1	$10 \pm 4^*$	$10 \pm 3^*$	$10 \pm 3^*$
Mil 1	16 ± 3	$10 \pm 3^*$	$10 \pm 3^*$	$11 \pm 3^*$
Mil 3	15 ± 2	$10 \pm 4^*$	$10 \pm 5^*$	$11 \pm 5^*$
Mil 10	15 ± 3	$11 \pm 4^*$	$11 \pm 4^*$	$11 \pm 4^*$
Mil 30	15 ± 2	$11 \pm 4^*$	$10 \pm 4^*$	$9 \pm 3^*$
Mil 100	16 ± 3	$8 \pm 2^*$	$8 \pm 2^*$	$9 \pm 2^*$

NOTE. Data are mean \pm standard deviation.

Abbreviations: Con, control; Mil, milrinone; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVESP, left ventricular end-systolic pressure; RPP, rate pressure product.

* $p < 0.05$ versus baseline.

Cardiac Function

There were no differences in heart rate, LVESP, RPP, LVEDP, and coronary flow between the groups (Tables 3 and 4). After ischemia and during reperfusion, LVESP, RPP, LVEDP, and coronary flow were statistically different from baseline (Tables 3 and 4).

Discussion

The results of the present study show that postconditioning with the phosphodiesterase-3-inhibitor Mil conferred a powerful acute cardioprotective effect in the isolated perfused rat heart. The study further revealed, for the first time, that the signaling cascade underlying Mil-induced postconditioning involves activation of mBK_{Ca} channels.

In the present study, Mil postconditioning reduced myocardial infarction size by about 40%, which is in line with previous studies.^{14,15} The lowest cardioprotective dose of Mil was 3 μM. Interestingly, higher Mil concentrations did not exert an additional cardioprotective effect. To the best of the authors' knowledge, no other study has characterized such a comprehensive dose-effect curve for Mil-induced cardioprotection.

Although Mil reduced myocardial infarct size, it did not improve cardiac parameters and coronary flow. This

phenomenon is in accordance with previous studies, by the authors⁷ and others,¹⁶ that investigated various preconditioning strategies and might be explained by myocardial stunning (ie, a prolonged, posts ischemic dysfunction of viable tissue salvaged by reperfusion).¹⁷

Mil-induced cardioprotection was completely abolished by paxilline, a potent and selective BK_{Ca} channel blocker,^{8,12,13} although paxilline itself had no effect on infarct size. This finding documents the pivotal role of BK_{Ca} channels in Mil-induced cardioprotection. Xu et al showed that BK_{Ca} channels are located on the inner mitochondrial membrane in cardiomyocytes and not in other subcellular structures.⁶ Therefore, the authors' findings suggest that the opening of mitochondrial BK_{Ca} (mBK_{Ca}) channels is particularly crucial for Mil-conferred cardioprotection. BK_{Ca} channels are part of the voltage-gated K⁺ channel superfamily and keep Ca²⁺ homeostasis.¹⁸ They play a pivotal role in protecting the myocardium from ischemic cell death, probably by preventing uncontrolled opening of the mitochondrial transition pore.¹⁹

mBK_{Ca} channels were shown by the authors and others to be crucial downstream targets in the signaling of several cardioprotective interventions.^{6,8,20–22} These channels are in part regulated by PKA²¹ and thus share a common signaling pathway with Mil. It therefore appears possible that Mil induces myocardial protection by upregulation of PKA. A possible signaling cascade of how Mil may protect against

Table 4
Hemodynamic Variables

	Baseline	Reperfusion		
		30	45	60
<i>Heart Rate (beats/min)</i>				
Con	320 ± 54	237 ± 76*	230 ± 84*	228 ± 63*
Mil	356 ± 44	230 ± 134*	242 ± 114*	268 ± 78*
Pax + Mil	344 ± 38	202 ± 115*	235 ± 80*	211 ± 75*
Pax	320 ± 27	292 ± 26	246 ± 53	212 ± 39*
<i>LVESP (mmHg)</i>				
Con	139 ± 10	95 ± 4*	98 ± 8*	93 ± 8*
Mil	137 ± 14	100 ± 7*	98 ± 7*	100 ± 5*
Pax + Mil	140 ± 17	98 ± 6*	94 ± 7*	95 ± 10*
Pax	140 ± 11	95 ± 7*	97 ± 7*	97 ± 5*
<i>RPP (bpm mmHg)</i>				
Con	44,730 ± 8,572	22,769 ± 7,723*	22,551 ± 8,301*	21,408 ± 6,746*
Mil	48,975 ± 9,466	22,730 ± 13,033*	23,725 ± 11,104*	26,630 ± 7,548*
Pax + Mil	48,139 ± 7,939	19,475 ± 10,859*	21,868 ± 6,787*	19,687 ± 6,845*
Pax	45,134 ± 4,766	27,871 ± 3,003*	24,010 ± 5,905*	20,634 ± 4,646*
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Con	2 ± 2	80 ± 4*	72 ± 4*	70 ± 4*
Mil	1 ± 1	73 ± 28*	76 ± 8*	74 ± 7*
Pax + Mil	1 ± 1	70 ± 30*	76 ± 9*	73 ± 8*
Pax	1 ± 1	80 ± 5*	75 ± 6*	72 ± 5*
<i>Coronary flow (mL/min)</i>				
Con	16 ± 2	10 ± 3*	11 ± 3*	10 ± 2*
Mil	16 ± 1	8 ± 1*	8 ± 1*	9 ± 1*
Pax + Mil	16 ± 2	8 ± 2*	8 ± 2*	9 ± 3*
Pax	15 ± 2	9 ± 2*	9 ± 2*	9 ± 2*

NOTE. Data are mean ± standard deviation.

Abbreviations: Con, control; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVESP, left ventricular end-systolic pressure; Mil, milrinone; Pax, paxilline.

*p < 0.05 versus baseline.

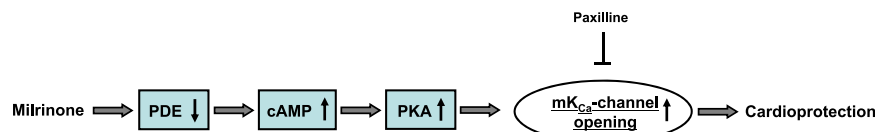


Fig 3. Schematic model of the cardioprotective pathway of milrinone-induced cardioprotection. Paxilline, BK_{Ca}-channel inhibitor; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A.

myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via mBK_{Ca} channel opening is displayed schematically in Figure 3.

Since the end of the last century, enormous progress has been made in understanding the mechanisms underlying myocardial ischemia-reperfusion injury, and several experimental cardioprotective strategies have been developed. However, few have been translated into clinical practice, partially because they need to be applied prior to the onset of an ischemic event, which in most cases (eg, in myocardial infarction) is not predictable. Therefore, cardioprotection by postconditioning strategies appears promising, and Mil might be an ideal choice. Mil is approved for the treatment of acute heart failure and cardiogenic shock²³ and can be administered in situations of hemodynamic instability. Mil is a drug with a desirable side effect profile that is used widely in anesthesia and intensive care medicine with a well-defined pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. Furthermore, the drug is available widely. In acute heart failure, decreased myocardial contractility is a key problem, making positive inotropics an essential part of acute heart failure treatment.²⁴ As a type III phosphodiesterase inhibitor, Mil leads to an increase in calcium ion concentration by inhibiting the degradation of adenosine monophosphate-cAMP and eventually improves myocardial contractility.^{25,26} By increasing cAMP concentration, phosphodiesterase inhibitors also increase the removal of calcium from the vascular smooth muscle cells.²⁷ This, in turn, leads to cellular relaxation and vasodilation. Therefore, in addition to being a positive inotropic, Mil also decreases the afterload. However, the routine use of Mil in the treatment of acute heart failure after myocardial infarction fails because there are concerns that it might induce cardiac arrhythmia.²⁸

Previous studies demonstrated that hyperglycemia abolished cardioprotection induced by pharmacological pre- and post-conditioning strategies.² However, Mil has been shown to reduce infarct size after regional coronary occlusion in the rat heart in vivo still under hyperglycemic conditions.¹⁵ Also aging blocks the cardioprotective properties of various conditioning interventions. The authors previously showed that activation of mBK_{Ca} channels reduced infarct also in the aged heart, highlighting the mBK_{Ca} channel as a promising target for cardioprotection, even if comorbidities are present that could attenuate cardioprotection.²⁰

Few measures were shown to overcome blocked cardioprotection, and one of these measures is activation of mBK_{Ca} channels. Because the authors found that Mil activates mBK_{Ca} channels, the findings of the present study may be of particular clinical relevance. Administration of Mil in situations with myocardial ischemia-reperfusion seems to be a promising approach, but decoding of the underlying mechanisms is

required for generating more specific clinical interventions that are potent for protecting the heart against an ischemia-reperfusion injury.

Limitations

To characterize the signaling pathway underlying Mil-induced cardioprotection, the BK_{Ca} channel blocker paxilline was used. Paxilline is a potent and well-established specific blocker of BK_{Ca} channels.^{7–9,13} Its inhibitory effect is dependent on the open probability of BK channels, so the measures that shift BK gating to more negative potentials reduce the inhibitory effect of paxilline. The IC₅₀ for paxilline has been shown to shift from around 10 nM when channels are largely closed to near 10 μM when maximal channel open probability is approached.²⁹ This should be considered when paxilline is used as a diagnostic tool for the presence of BK channels. However, the authors found that paxilline effectively reduced the cardioprotective effect of Mil, and the dose used is a standard dose that has been used frequently by the authors and others.^{7,9,30}

Conclusion

The results of the present study demonstrate that Mil-induced postconditioning confers powerful myocardial protection by postconditioning. This effect is maximal with 3 μM Mil and cannot be increased further by higher concentrations. Furthermore, it was found that Mil-induced postconditioning involves activation of mBK_{Ca} channels.

References

- 1 Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121–35.
- 2 Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, et al. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev* 2014;66:1142–74.
- 3 Sunny MY, Yunus M, Karim HMR, et al. Comparison of levosimendan, milrinone and dobutamine in treating low cardiac output syndrome following valve replacement surgeries with cardiopulmonary bypass. *J Clin Diagn Res* 2016;10:UC05–8.
- 4 Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: The role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 2001;104:705–10.
- 5 Bentzen BH, Osadchii O, Jespersen T, et al. Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Pflugers Arch* 2009;457:979–88.

- 6 Xu W, Liu Y, Wang S, et al. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 2002;298:1029–33.
- 7 Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, et al. Impact of mitochondrial Ca²⁺-sensitive potassium (mbkca) channels in sildenafil-induced cardioprotection in rats. *PLoS One* 2015;10:e0144737.
- 8 Frässdorf J, Huhn R, Niersmann C, et al. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth* 2010;57:767–73.
- 9 Huhn R, Heinen A, Weber NC, et al. Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mKCa channels. *Br J Anaesth* 2010;105:589–95.
- 10 Behmenburg F, Pickert E, Mathes A, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine in rats is dose-dependent and mediated by BKCa channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2017;69:228–35.
- 11 Dorsch M, Behmenburg F, Raible M, et al. Morphine-induced preconditioning: involvement of protein kinase A and mitochondrial permeability transition pore. *PLoS One* 2016;11:e0151025.
- 12 Sanchez M, McManus OB. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 1996;35:963–8.
- 13 Wang X, Fisher PW, Xi L, et al. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:105–13.
- 14 Huang M-H, Wu Y, Nguyen V, et al. Heart protection by combination therapy with esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011;25:223–32.
- 15 Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, et al. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:4.
- 16 Das A, Xi L, Kukreja RC. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *J Biol Chem* 2008;283:29572–85.
- 17 Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: Prolonged, post-ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66:1146–9.
- 18 Kukreja RC, Salloum FN, Das A, et al. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol* 2011;16:e30–5.
- 19 Balderas E, Zhang J, Stefani E, et al. Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol* 2015;6:104.
- 20 Heinen A, Ströthoff M, Schmidt A, et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol* 2014;56:99–105.
- 21 Huhn R, Weber NC, Preckel B, et al. Age-related loss of cardiac preconditioning: Impact of protein kinase A. *Exp Gerontol* 2012;47:116–21.
- 22 Shintani Y, Node K, Asanuma H, et al. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:1213–8.
- 23 Tariq S, Aronow WS. Use of inotropic agents in treatment of systolic heart failure. *Int J Mol Sci* 2015;16:29060–8.
- 24 Partovian C, Gleim SR, Mody PS, et al. Hospital patterns of use of positive inotropic agents in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1402–9.
- 25 Alousi AA, Johnson DC. Pharmacology of the bipyridines: Amrinone and milrinone. *Circulation* 1986;73:III10–24.
- 26 Shipley JB, Hess ML. Inotropic therapy for the failing myocardium. *Clin Cardiol* 1995;18:615–9.
- 27 Silver PJ, Harris AL, Canniff PC, et al. Phosphodiesterase isozyme inhibition, activation of the cAMP system, and positive inotropy mediated by milrinone in isolated guinea pig cardiac muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:530–40.
- 28 DiBianco R, Shabetai R, Kostuk W, et al. A comparison of oral milrinone, digoxin, and their combination in the treatment of patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1989;320:677–83.
- 29 Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol* 2014;144:415–40.
- 30 Wang X, Yin C, Xi L, et al. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H2070–7.



Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca^{2+} -Sensitive Potassium (mBK_{Ca}) Channels

Sebastian Bunte¹ · Friederike Behmenburg¹ · Anton Bongartz¹ · Martin Stroethoff¹ · Annika Raupach¹ · André Heinen² · Jan-Philipp Minol³ · Markus W. Hollmann⁴ · Ragnar Huhn¹ · Stephan U. Sixt¹

Published online: 17 August 2018

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Activation of mitochondrial large-conductance Ca^{2+} -sensitive potassium (mBK_{Ca})-channels is a crucial step for cardioprotection by preconditioning. Whether activation of these channels is involved in levosimendan-induced preconditioning is unknown. We investigated if cardioprotection by levosimendan requires activation of mBK_{Ca} -channels in the rat heart in vitro.

Methods In a prospective blinded experimental laboratory investigation, hearts of male Wistar rats were randomized and placed on a Langendorff system, perfused with Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. All hearts were subjected to 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion. Before ischemia, hearts were perfused with different concentrations of levosimendan (0.03–1 μM) for determination of a dose-effect curve. In a second set of experiments, 0.3 μM levosimendan was administered in combination with the mBK_{Ca} -channel inhibitor paxilline (1 μM). Infarct size was determined by TTC staining.

Results In control, animal's infarct size was $58 \pm 7\%$. Levosimendan at a concentration of 0.3 μM reduced infarct size to $30 \pm 7\%$ ($P < 0.05$ vs. control). Higher concentrations with 1 μM levosimendan did not confer stronger protection. Paxilline completely blocked levosimendan-induced cardioprotection while paxilline alone had no effect on infarct size.

Conclusions This study shows that activation of mBK_{Ca} -channels plays a pivotal role in levosimendan-induced preconditioning.

Keywords Levosimendan · Preconditioning · Reperfusion injury · Myocardial infarction

Introduction

Ischemia is a critical and current problem related to myocardial infarction. Not only the ischemia but also reperfusion has proven as relevant for the severity of infarction size.

To protect the heart from these harmful influences, preconditioning strategies were shown as a promising strategy [1, 2]. Murry et al. determined for the first time the protective effect

of ischemic preconditioning over 30 years ago [1]. Ischemic preconditioning, composed of short alternate phases of myocardial ischemia and reperfusion before a longer ischemic period, represents the most intense stimulus leading to infarct size reduction, unfortunately, the intervention is extremely invasive and impracticable for clinical use. In contrast to ischemic preconditioning, pharmacological preconditioning mimics the effect of ischemic preconditioning without being so invasive. Several drug classes have been found to induce preconditioning (e.g., volatile anesthetics, nitrates, beta blockers, adenosine by a particular mechanism [3]). Cao and colleagues showed in 2005 that ischemic preconditioning is abolished by blockade of the mitochondrial calcium-sensitive potassium (mBK_{Ca})-channel [4]. Further studies reveal that these channels are not only important for ischemic preconditioning. In 2016, Kinoshita et al. noticed that isoflurane-induced postconditioning activates mBK_{Ca} -channels but that there is no cardioprotective effect while these channels are blocked by the selective mBK_{Ca} -channel blocker iberiotoxin [5]. Caimmi et al. found out that levosimendan causes significant reduction of infarction size if it is infused in the coronary

✉ Ragnar Huhn
Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de

¹ Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

² Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

³ Department of Cardiovascular Surgery, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

⁴ Department of Anesthesiology, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 Amsterdam, AZ, Netherlands

artery for 15 min before ischemia [6]. Levosimendan is a myofilament calcium sensitizer. The drug interacts with cardiac troponin c that leads to a higher sensitivity for Ca^{2+} in cardiomyocytes. As a consequence, levosimendan causes a positive inotropic effect without influencing the diastolic function [7]. Furthermore, levosimendan activates ATP-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells causing a vasodilatory effect that has also a positive impact on coronary perfusion. Levosimendan is clinically used for the treatment of acute cardiac failure. Along with Caimmi et al., further studies have shown cardioprotective effects of levosimendan but the underlying molecular mechanism is not completely known [7].

The aim of our study was first to determine whether preconditioning with levosimendan is dose-dependent and a second to evaluate if the cardioprotective effect of levosimendan leads to an activation of large-conductance calcium-sensitive potassium (mBK_{Ca})-channels.

Methods

The study was conducted on the baseline of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the National Institutes of Health (Publication number 85-23, revised 1996). The approval of the Animal Ethics Committee of the University of Duesseldorf, Germany has been granted.

Surgical Preparation

The surgical preparation was performed as described previously [8]. Male Wistar rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (90 mg/kg). Hereafter, animals were thoracotomized for the removal of the hearts. The hearts were mounted on a Langendorff system and perfused with a Krebs-Henseleit solution. For the time of the experiment, a constant pressure (80 mmHg) and temperature (37 °C) was maintained [9]. We inserted a fluid-filled balloon into the left ventricle and kept an end-diastolic pressure of 1–4 mmHg. The hearts underwent an equilibration period for 20 min. The heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) were measured continuously and digitized using an analog to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz. The data were continuously recorded on a personal computer using Chart for Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). The coronary flow was detected by time-dependent collection of the coronary effluent. The maximal contracture and the time point of maximal contracture were measured in each experiment during ischemia [9].

Experimental Protocol

In the first part of the study, we designed a protocol for determining a dose-effect curve of levosimendan (Fig. 1a). Therefore, we randomly assigned hearts into five groups ($n = 8$ per group).

After surgical preparation, all hearts underwent baseline conditions for 20 and 33 min of global ischemia followed by 60 min of reperfusion. Hearts in the control group (Con) received no further intervention. Preconditioning groups were perfused with levosimendan (Lev) with different concentrations (0.03, 0.1, 0.3, and 1 μM) over 10 min before global ischemia. Based on the findings of part 1, we chose the levosimendan concentration of 0.3 μM for further investigations. In this second part, we randomly assigned hearts into four groups ($n = 8$ per group). Control hearts were left untreated again. To investigate the involvement of mBK_{Ca} channels, the selective inhibitor paxilline (Pax, 1 μM) [8, 10–13] was given with and without levosimendan before global ischemia (Fig. 1b). Afterwards, the hearts were dyed with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution. The infarct size measurement was carried out using planimetry [9].

Statistical Analysis

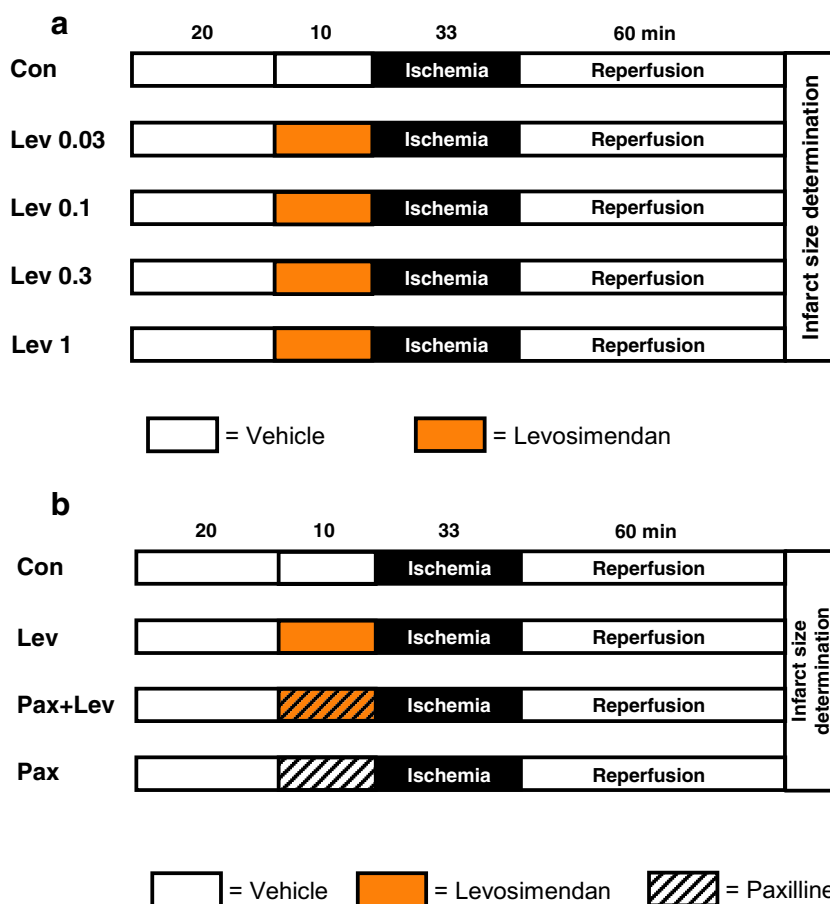
Calculation of sample size was done by using GraphPad StatMate™ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and resulted in a group size of $n = 8$ for detecting a 25% difference in infarct size with a power of 80% ($\alpha < 0.05$ (two-tailed)). Hemodynamic parameters were measured continuously and detected during baseline, ischemia, and reperfusion. To compare hemodynamic parameters between groups or between different time points within groups, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test (SPSS Science Software, Version 12.0.1). The infarct sizes were determined by an investigator blinded to the experimental groups. A one-way analysis (ANOVA) was chosen, followed by a Tukey post hoc test to analyze infarct size. Data are presented as mean \pm SD. Changes were regarded statistically significant if $P < 0.05$.

Results

Animal Characteristics

In part 1 of the study, mean body weight of the animals was 298 ± 21 g, and in part 2, weight was nearly the same (297 ± 23 g). Tables 1 and 2 show time and level of ischemic contracture from both parts of the study. There were no differences in time of maximal ischemic contracture between the experimental groups. The level of maximal ischemic

Fig. 1 a, b Experimental protocol. Figure 1a shows part 1 of the study: Con = control, Levo = levosimendan; Fig. 1b shows part 2 of the study: Con = control, Levo = levosimendan, Pax = paxilline



contracture of the Pax + Lev group was statistically different compared to Con- and Pax group (Table 2).

Infarct Size

Infarct size in control hearts from part 1 was $58 \pm 7\%$ of the whole heart (Fig. 2a). The strongest cardioprotective effect with the lowest dose of Levosimendan (Lev) was detected at a concentration of $0.3 \mu\text{M}$. Infarct size was reduced to $30 \pm 7\%$ ($P < 0.05$ vs. Con). A higher concentration of levosimendan with $1 \mu\text{M}$ did not lead to a further infarct size reduction (Lev 1: $30 \pm 5\%$; ns vs. Lev 0.3), while $0.1 \mu\text{M}$ levosimendan also reduced infarct size (Lev 0.1: $47 \pm 9\%$, $P < 0.05$ vs. Con) but the effect of $0.3 \mu\text{M}$ levosimendan was more pronounced compared to $0.1 \mu\text{M}$ (Lev 0.1: $47 \pm 9\%$, $P < 0.05$ vs. Lev 0.3). Levosimendan with a concentration of $0.03 \mu\text{M}$ was not protective (Lev 0.03: $55 \pm 6\%$; ns vs. Con).

Figure 2b shows infarct sizes from part 2 of the study investigating the involvement of mBK_{Ca} -channels in levosimendan-induced preconditioning. Infarct size of the control group was $64 \pm 5\%$. Administration of $0.3 \mu\text{M}$ levosimendan reduced infarct size to $27 \pm 4\%$ ($P < 0.05$ vs. Con). The cardioprotective effect of levosimendan was

completely abrogated by the mBK_{Ca} -channel inhibitor paxilline (Pax + Lev: $62 \pm 7\%$, $P < 0.05$ vs. Mil) while the blocker alone had no effect on infarct size (Pax: $56 \pm 6\%$, ns vs. Con).

Cardiac Function

Hemodynamic data from both parts of the study are shown in Tables 3 and 4. Furthermore, Fig. 3 shows hemodynamics from part 2 of the study. Heart rate, LVESP, and LVEDP were continuously recorded. Coronary flow was measured via time-dependent collection of the coronary effluent. Values were compared to both baseline values of the same group (time effect) and to values of the other groups at the same time point (group effect). After ischemia and during reperfusion, LVEDP and coronary flow were statistically different from baseline in all groups in both parts of the study (Tables 3 and 4, Fig. 3). In part 1 of the study, heart rate was statistically different compared to baseline after ischemia (Table 3). Coronary flow increased before ischemia in the Lev 0.3 and Lev 1 group (Table 3).

Table 1 Ischemic contracture

	<i>n</i>	Time of max. ischemic contracture (min)	Level of max. ischemic contracture (mmHg)
Con	8	17 ± 1	59 ± 12
Lev 0.03	8	18 ± 2	46 ± 8
Lev 0.1	8	16 ± 2	57 ± 10
Lev 0.3	8	15 ± 1	58 ± 10
Lev 1	8	16 ± 1	66 ± 14

Data are mean ± SD

Con control, *Lev* levosimendan

Discussion

Our present results show that the use of levosimendan as preconditioning stimulus leads to dose-dependent powerful reduction in infarct size. This cardioprotective effect of levosimendan requires activation of mBK_{Ca}-channels.

Levosimendan is a calcium sensitizer [7] that increases sensitivity for Ca²⁺ in cardiomyocytes without elevating the intracellular calcium levels [14]. Besides the calcium sensitizing effect of levosimendan, Virag et al. could demonstrate that this drug also has electrophysiological effects similar to those of phosphodiesterase inhibitors [15]. The authors could show that levosimendan had no influence on potassium currents whereas they detected an effect on the inward calcium current in guinea pig ventricular muscles. A comparable effect of levosimendan on calcium current was shown by Ajiro et al. These authors investigated studied human atrial cells and showed that compared to rabbit atrial cells, the effect of levosimendan on L-type Ca²⁺ currents was more pronounced. In our study, the effect of levosimendan in rat atrial and ventricular cells was negligible.

Levosimendan is used for treatment of acute heart failure and Levin et al. demonstrated that preoperative use of levosimendan can lower mortality [16]. Besides the improvement of heart function, Papp et al. showed that levosimendan can lower the incidence of ventricular arrhythmias after regional ischemia and reperfusion injury [17]. The authors demonstrated in dogs in vivo that levosimendan compared to milrinone attenuated among others the number of ventricular premature beats, tachycardia, and fibrillation. Furthermore,

levosimendan improved the overall survival rate. Preconditioning properties of levosimendan were shown by Lepran et al. [18]. The authors demonstrated in the isolated rabbit heart that levosimendan significantly reduced infarct size but the effect was not as distinct as shown by ischemic preconditioning [18].

The present study reveals that preconditioning by levosimendan reduced infarct size by about 50%. The most cardioprotective dose of levosimendan was 0.3 μM. An increased dose of 1 μM could not induce a stronger protective effect. To our knowledge, there is no study available investigating a dose-effect of levosimendan in terms of preconditioning.

Our results furthermore highlight that the activation of mBK_{Ca}-channels is a key element in the signaling cascade of levosimendan-induced preconditioning. mBK_{Ca}-channels are located in the inner mitochondrial membrane [19] and belong to the supercategory of voltage-gated potassium channels and their function is the maintenance of the calcium homeostasis [20, 21].

Behmenburg et al. showed that reduction of infarct size induced by sildenafil in rat hearts depends on activation of these channels [9]. Furthermore, Frassdorf et al. demonstrated comparable results for preconditioning by morphine [13]. It seems that activation of mBK_{Ca}-channels plays a crucial role in context of pharmacological preconditioning. Our results further demonstrate that the administration of paxilline completely abrogates the cardioprotective effect of levosimendan. Paxilline is a strong and selective mBK_{Ca}-channel blocker [10–12]. This mycotoxin produced by the

Table 2 Ischemic contracture

	<i>n</i>	Time of max. ischemic contracture (min)	Level of max. ischemic contracture (mmHg)
Con	8	16 ± 2	60 ± 18*
Lev	8	16 ± 3	67 ± 10
Pax+Lev	8	16 ± 2	81 ± 15
Pax	8	18 ± 1	61 ± 11*

Data are mean ± SD

Con control, *Lev* levosimendan, *Pax* paxilline

**P* < 0.05 vs. Pax + Lev

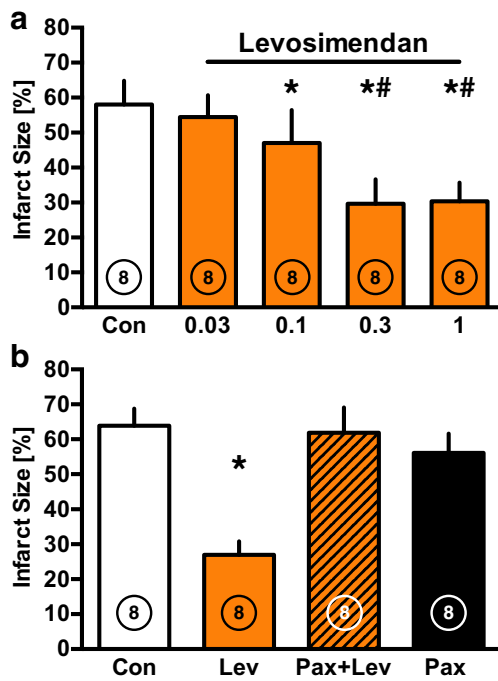


Fig. 2 a, b Infarct size measurement. Figure 1a shows the infarct size of controls (Con) and preconditioning with levosimendan (Levo); Fig. 1b shows the infarct size of controls (Con), preconditioning with levosimendan (Levo) with or without the mBK_{Ca}-channel inhibitor paxilline (Pax). Data are mean ± SD. **P* < 0.05 vs. Con and #*P* < 0.05 vs. Lev 0.1, respectively

fungus *Penicillium Paxilli* blocks all subunits of mBK_{Ca}-channels [22] confirming our conclusion that levosimendan induces preconditioning via activation of these channels. In addition to the mBK_{Ca}-channel, another mitochondrial channel has been described in conjunction with preconditioning. The ATP-sensitive potassium (K_{ATP})-channel plays an important role in cardioprotection [23]. Yokoshiki et al. investigated different doses of levosimendan and could show that levosimendan activated K_{ATP}-channels in isolated rat ventricular cells [24]. The effect of levosimendan was completely abolished by the K_{ATP}-channel blocker glibenclamide. Kaheinen and colleagues could show in guinea pigs in vitro that activation of K_{ATP}-channels also induces coronary vasodilatation [25]. This effect was noncompetitively blocked by glybenclamide without affecting the positive influence on contraction.

Pharmacological preconditioning seems to be a promising strategy to protect patients from myocardial ischemia and reperfusion injury in the clinic. Unfortunately, the transfer from this protective intervention into clinical routine was not successful until to date. One reason for difficulties in transferring laboratory results to the clinic could be the fact that an experimental environment can only depict parts of the real clinical situation in humans. In contrast to the laboratory setup, where influence factors and disturbances can be excluded from the outset, patients in the clinical situation suffer from

Table 3 Hemodynamic variables

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
<i>Heart rate (bpm)</i>				
Con	309 ± 49	300 ± 33	212 ± 83*	192 ± 85*
Lev 0.03	313 ± 45	315 ± 28	279 ± 68	210 ± 59*
Lev 0.1	310 ± 36	327 ± 43	219 ± 86*	210 ± 73*
Lev 0.3	301 ± 26	320 ± 17	229 ± 74*	204 ± 87*
Lev 1	311 ± 34	327 ± 34	227 ± 64*	193 ± 59*
<i>LVESP (mmHg)</i>				
Con	120 ± 22	119 ± 21	105 ± 15	93 ± 15*
Lev 0.03	106 ± 21	106 ± 23	101 ± 7	92 ± 7
Lev 0.1	112 ± 19	125 ± 17	98 ± 11	89 ± 9*
Lev 0.3	108 ± 26	118 ± 34	104 ± 14	95 ± 15
Lev 1	114 ± 22	123 ± 25	110 ± 14	98 ± 13
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Con	4 ± 3	4 ± 3	94 ± 13*	79 ± 11*
Lev 0.03	5 ± 3	6 ± 5	93 ± 11*	79 ± 8*
Lev 0.1	2 ± 2	2 ± 3	83 ± 20*	69 ± 17*
Lev 0.3	3 ± 2	3 ± 4	89 ± 10*	77 ± 10*
Lev 1	3 ± 2	3 ± 3	101 ± 15*	87 ± 12*
<i>Coronary flow (ml*min⁻¹)</i>				
Con	16 ± 3	16 ± 2	9 ± 3*	8 ± 1*
Lev 0.03	17 ± 4	18 ± 4	9 ± 2*	8 ± 2*
Lev 0.1	15 ± 4	18 ± 4	8 ± 1*	7 ± 1*
Lev 0.3	15 ± 4	19 ± 4*	10 ± 2*	9 ± 2*
Lev 1	14 ± 2	20 ± 3*	10 ± 1*	9 ± 1*

Data are mean ± SD

Con control, Lev levosimendan

**P* < 0.05 versus baseline

comorbidities and potential confounders of cardioprotection. Confounders and influencing factors can be of variable origin. Lange et al. could show that, e.g., beta blockers abolish cardioprotection induced by desflurane preconditioning [26]. The same group demonstrated that also propofol abolished the protective effects of desflurane [27]. Beyond that, the antidiabetic drug glibenclamide was shown to abrogate cardioprotection by ischemic preconditioning [28]. In addition to co-medications, there are other factors that have an influence on cardioprotection. Age was shown to influence cardioprotection by preconditioning. Schulman et al. demonstrated loss of ischemic preconditioning in the aged heart [29]. There are other studies confirming aging as a factor that influences cardioprotective interventions negatively [30]. We could previously demonstrate that pharmacological activation of mBK_{Ca}-channels with the selective channel activator NS1619 leads to a reduction of myocardial infarct size even in the aged rat heart [31]. The fact that activation of the

Table 4 Hemodynamic variables

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
<i>Heart rate (bpm)</i>				
Con	332 ± 40	325 ± 30	255 ± 26	237 ± 73
Lev	322 ± 46	322 ± 63	216 ± 64	218 ± 48
Pax + Lev	317 ± 39	319 ± 58	216 ± 78	205 ± 70
Pax	326 ± 82	318 ± 86	215 ± 69	196 ± 72*
<i>LVESP (mmHg)</i>				
Con	109 ± 17	113 ± 24	106 ± 27	90 ± 23
Lev	112 ± 20	122 ± 16	112 ± 13	102 ± 16
Pax + Lev	105 ± 18	134 ± 34	123 ± 22	108 ± 23
Pax	113 ± 18	111 ± 17	113 ± 14	107 ± 14
<i>LVEDP (mmHg)</i>				
Con	4 ± 2	3 ± 2	95 ± 28*	79 ± 25*
Lev	3 ± 1	2 ± 1	99 ± 12*	82 ± 13*
Pax + Lev	6 ± 2	5 ± 3	111 ± 23*	94 ± 21*
Pax	4 ± 1	5 ± 3	98 ± 12*	85 ± 13*
<i>Coronary flow (ml*min⁻¹)</i>				
Con	15 ± 3	16 ± 4	8 ± 2*	7 ± 2*
Lev	13 ± 3	14 ± 3	7 ± 2*	6 ± 2*
Pax + Lev	15 ± 3	16 ± 3	11 ± 5	9 ± 5*
Pax	16 ± 4	14 ± 5	9 ± 3*	8 ± 3*

Data are mean ± SD

Con control, Lev levosimendan, Pax paxilline

* $P < 0.05$ versus baseline

mBK_{Ca}-channels can also produce cardioprotection in the presence of influencing factors such as age highlight the relevance of this channel in the field of preconditioning and demonstrate a clear difference to cardioprotection mediated by K_{ATP}-channels, where less activation was found with increasing age [32]. Furthermore, Heinen et al. could not only show that infarct size was reduced in old rats if mBK_{Ca}-channels were activated by NS1619, but also reduction was to the same extent as in young rats [33]. Especially, these results highlight the special importance of mBK_{Ca}-channels as a relevant and promising target structure for cardioprotection even if interfering factors are present.

Of course, age is just one of many known comorbidities influencing cardioprotection. Diabetes and hyperglycemia, respectively [34, 35], also block myocardial protection by preconditioning and this blockade could not be overcome by the use of levosimendan [36]. As described above, concomitant medications that block cardioprotective effects in the patient additionally form an obstacle for successful cardioprotection. Nevertheless, mBK_{Ca}-channels represent an interesting and promising target for cardioprotection as well in the diseased myocardium. Further research should focus on investigating

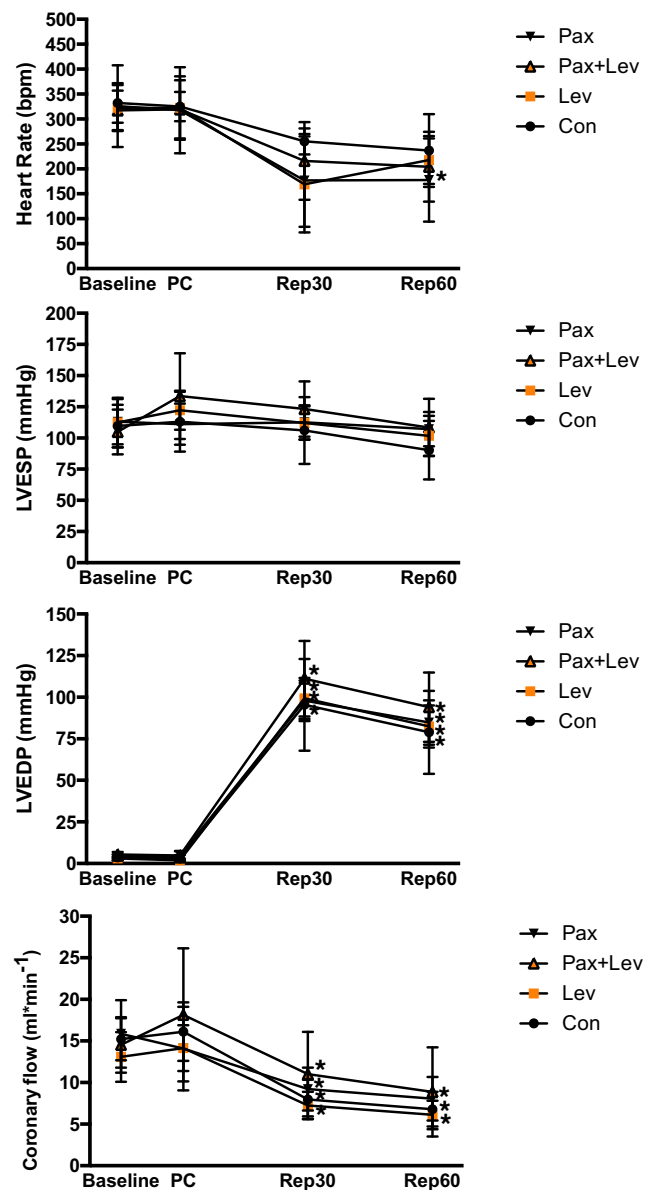


Fig. 3 Hemodynamic data. Figure shows hemodynamic parameters of controls (Con), preconditioning with levosimendan (Levo) with or without the selective mBK_{Ca}-channel blocker paxilline (Pax). Data are mean ± SD. * $P < 0.05$ vs. baseline

the specific site in the signaling pathway inhibited by concomitant diseases and concomitant medical therapies.

Conclusion

The results of our current study show that the calcium sensitizer levosimendan induces cardioprotection when administered as a preconditioning treatment. The protective effect of levosimendan is most pronounced with a dosage of 0.3 μM. Furthermore, activation of mBK_{Ca}-channels is a pivotal step in the signaling pathway of levosimendan-induced preconditioning.

Funding This study was supported by institutional and departmental sources.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124–36.
- Yellon DM, Alkhalaf AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342(8866):276–7.
- Santillo E, Migale M, Postacchini D, Balestrini F, Incalzi RA. Cardioprotection by conditioning mimetic drugs. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2016;15(1):15–30.
- Cao CM, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong TM. Calcium-activated Potassium Channel triggers Cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(2):644–50.
- Kinoshita M, Tsutsumi YM, Fukuta K, Kasai A, Tanaka K. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *J Med Investig*. 2016;63(1–2):80–4.
- Caimmi PP, Molinari C, Uberti F, Micalizzi E, Valente G, Mary DA, et al. Intracoronary levosimendan prevents myocardial ischemic damages and activates survival signaling through ATP-sensitive potassium channel and nitric oxide. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;39(4):59–67.
- Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, et al. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol*. 2012;159(2):82–7.
- Huhn R, Heinen A, Weber NC, Schlack W, Preckel B, Hollmann MW. Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(ca) channels. *Brit J Anaesth*. 2010;105(5):589–95.
- Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Hollmann MW, et al. Impact of mitochondrial Ca²⁺-sensitive potassium (mBKCa) channels in sildenafil-induced Cardioprotection in rats. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144737.
- Sanchez M, McManus OB. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology*. 1996;35(7):963–8.
- 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*. 2008;44(1):105–13.
- Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol*. 2014;144(5):415–40.
- Frassdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, et al. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(ca) channels. *Can J Anaesth*. 2010;57(8):767–73.
- Brixius K, Reicke S, Schwinger RH. Beneficial effects of the ca(2+) sensitizer levosimendan in human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(1):H131–7.
- Virag L, Hala O, Marton A, Varro A, Papp JG. Cardiac electrophysiological effects of levosimendan, a new calcium sensitizer. *Gen Pharmacol*. 1996;27(3):551–6.
- Levin R, Degrange M, Del Mazo C, Tanus E, Porcile R. Preoperative levosimendan decreases mortality and the development of low cardiac output in high-risk patients with severe left ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Exp Clin Cardiol*. 2012;17(3):125–30.
- Papp JG, Pollesello P, Varro AF, Vegh AS. Effect of levosimendan and milrinone on regional myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2006;11(2):129–35.
- Lepran I, Pollesello P, Vajda S, Varro A, Papp JG. Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;48(4):148–52.
- Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, et al. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science*. 2002;298(5595):1029–33.
- Kukreja RC, Salloum FN, Das A, Koka S, Ockaili RA, Xi L. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2011;16(4):30–5.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):557–94.
- Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, et al. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci*. 2001;21(24):9585–97.
- Aggarwal S, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Role of ATP-sensitive potassium channels in remote ischemic preconditioning induced tissue protection. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017;22(5):467–75.
- Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(1):375–83.
- Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. Levosimendan increases diastolic coronary flow in isolated Guinea-pig heart by opening ATP-sensitive potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;37(4):367–74.
- Lange M, Redel A, Smul TM, Lotz C, Nefzger T, Stumpner J, et al. Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;23(5):607–13.
- Smul TM, Stumpner J, Blomeyer C, Lotz C, Redel A, Lange M, et al. Propofol inhibits desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011;25(2):276–81.
- Thornton JD, Thornton CS, Sterling DL, Downey JM. Blockade of ATP-sensitive potassium channels increases infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*. 1993;72(1):44–9.
- Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H1630–H6.
- Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*. 2007;59(4):418–58.
- Heinen A, Strothoff M, Schmidt A, Stracke N, Behmenburg F, Bauer I, et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(ca) signaling pathway. *Exp Gerontol*. 2014;56:99–105.
- Mio Y, Bienengraeber MW, Marinovic J, Gutterman DD, Rakic M, Bosnjak ZJ, et al. Age-related attenuation of isoflurane preconditioning in human atrial cardiomyocytes: roles for mitochondrial

- respiration and sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activity. *Anesthesiology*. 2008;108(4):612–20.
33. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, et al. Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase a. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):116–21.
 34. Galagudza MM, Nekrasova MK, Syrenskii AV, Nifontov EM. Resistance of the myocardium to ischemia and the efficacy of ischemic preconditioning in experimental diabetes mellitus. *Neurosci Behav Physiol*. 2007;37(5):489–93.
 35. Kristiansen SB, Lofgren B, Stottrup NB, Khatir D, Nielsen-Kudsk JE, Nielsen TT, et al. Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47(10):1716–21.
 36. Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, Higashijima U, Maekawa T, Hara T, et al. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:4.



Impact of Ca²⁺-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning

Martin Stroethoff¹ · Sebastian Bunte¹ · Annika Raupach¹ · Margit van de Snepscheut¹ · Carolin Torregroza¹ · André Heinen² · Alexander Mathes³ · Markus W. Hollmann⁴ · Ragnar Huhn¹ · Stephan U. Sixt¹

Published online: 8 November 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose Small and big conductance Ca²⁺-sensitive potassium (K_{Ca}) channels are involved in cardioprotective measures aiming at reducing myocardial reperfusion injury. For levosimendan, infarct size-reducing effects were shown. Whether activation of these channels is involved in levosimendan-induced postconditioning is unknown. We hypothesized that levosimendan exerts a concentration-dependent cardioprotective effect and that both types of Ca²⁺-sensitive potassium channels are involved.

Methods In a prospective blinded experimental laboratory investigation, hearts of male Wistar rats were randomized and placed on a Langendorff system, perfused with Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. All hearts were subjected to 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion. At the onset of reperfusion, hearts were perfused with various concentrations of levosimendan (0.03–1 μM) in order to determine a concentration-response relationship. To elucidate the involvement of K_{Ca}-channels for the observed cardioprotection, in the second set of experiments, 0.3 μM levosimendan was administered in combination with the subtype-specific K_{Ca}-channel inhibitors paxilline (1 μM, big K_{Ca}-channel) and NS8593 (0.1 μM, small K_{Ca}-channel) respectively. Infarct size was determined by tetrazolium chloride (TTC) staining.

Results Infarct size in controls was 60 ± 7% and 59 ± 6% respectively. Levosimendan at a concentration of 0.3 μM reduced infarct size to 30 ± 5% (*P* < 0.0001 vs. control). Higher concentrations of levosimendan did not induce a stronger effect. Paxilline but not NS8593 completely abolished levosimendan-induced cardioprotection while both substances alone had no effect on infarct size.

Conclusions Cardioprotection by levosimendan-induced postconditioning shows a binary phenomenon, either ineffective or with maximal effect. The cardioprotective effect requires activation of big but not small K_{Ca} channels.

Keywords Pharmacology · Ca²⁺ sensitizer · Cardioprotection

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10557-019-06908-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ragnar Huhn
Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de

¹ Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

² Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

³ Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Cologne, Kerpener Str. 62, 50937 Cologne, Germany

⁴ Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1100 DD Amsterdam, Netherlands

Introduction

After myocardial infarction, the restoration of coronary blood flow is crucial for the survival of the patient. Myocardial ischemia is mostly not predictable making cardioprotective strategies for these situations necessary. Cardioprotection against ischemia and reperfusion injury can be achieved by postconditioning, an intervention that occurs at the end of an ischemic period and the onset of reperfusion. Zhao et al. [1] described the phenomenon of ischemic postconditioning where short cycles of ischemia and reperfusion at the onset of reperfusion-induced significant infarct size reduction. The effect of ischemic postconditioning can be mimicked pharmacologically, e.g., with volatile anesthetics [2] or opioids [3]. Also for calcium (Ca²⁺) sensitizer, levosimendan cardioprotective properties were shown [4]. A cardioprotective effect by levosimendan postconditioning was

described by du Toit et al. [5]. The authors showed in isolated Guinea pigs hearts an involvement of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway and ATP-sensitive potassium (K_{ATP})-channels. Matsumoto et al. demonstrated an involvement of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and a decrease of the cardioprotective effect of levosimendan-induced conditioning by hyperglycemia [6]. Levosimendan is a positive inotropic drug without any effect on diastolic function [7]. An interaction of levosimendan with cardiac troponin C causes an increased sensitivity for Ca^{2+} in cardiomyocytes. Clinically, levosimendan is indicated for the treatment of heart failure. Whether cardioprotection by levosimendan-induced postconditioning is concentration-dependent is unknown.

Activation of Ca^{2+} -sensitive potassium channels was shown to be involved in cardioprotection by postconditioning induced by the volatile anesthetic isoflurane [8]. One can distinguish between big (BK_{Ca}) and small (SK_{Ca}) conductance calcium-sensitive potassium channels. Opening of BK_{Ca} channels is related to increased cytosolic Ca^{2+} and a voltage gradient [9]. SK_{Ca} channels are voltage-independent and activation of these channels triggers an interaction of calmodulin in the C-terminus region [10]. Stowe et al. demonstrated that BK_{Ca} and SK_{Ca} channels activated by respective agonists independently from each other induced significant infarct size reduction [11]. Whether both types of Ca^{2+} -sensitive potassium channels play a role in levosimendan-induced postconditioning has not been investigated so far.

In the present study, we set out to determine the lowest cardioprotective concentration of levosimendan and the underlying mechanism involved in levosimendan-induced cardioprotection against ischemia and reperfusion injury. We hypothesize that the infarct size-reducing effect of levosimendan is concentration-dependent and that activation of small and/or big conductance Ca^{2+} -sensitive potassium channels is required for its cardioprotective property.

Methods

The study was performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (publication number 85-23, revised 1996) and was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Duesseldorf (O 27/12), Germany. Experiments were done and results were reported in accordance with the ARRIVE guidelines.

Surgical Preparation

Surgical preparation was performed as described previously [3]. Male Wistar rats (mean body weight part one, 287 ± 16 g; part two, 317 ± 23 g) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (90 mg/kg). Hereafter, animals were

thoracotomized for the removal of the hearts. The hearts were mounted on a Langendorff system and perfused with Krebs-Henseleit solution, enriched with 95% O_2 and 5% CO_2 . The solution contains (in mM) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 $MgSO_4$, 1.17 KH_2PO_4 , 24.9 $NaHCO_3$, 2.52 $CaCl_2$, 0.5 EDTA, 11 glucose, and 1 lactate at 37 °C. For the duration of the experiments, a constant pressure (80 mmHg) and temperature (37 °C) was maintained [12]. We inserted a fluid-filled balloon into the left ventricle and kept an end-diastolic pressure of 2–8 mmHg. The hearts underwent an equilibration period of 20 min. We measured heart rate, maximal left ventricular pressure (LVP max), coronary flow and minimal left ventricular pressure (LVP min) continuously and digitized it at a sampling rate of 500 Hz by use of an analogue to digital converter system (PowerLab/8SP, ADInstrument Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Left ventricular-developed pressure (LVDP) was calculated as maximal LVP–minimal LVP. Data were continuously recorded on a personal computer using Chart for Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia).

Experimental Protocol

After surgical preparation, all hearts underwent a baseline period of 20 min and 33 min of global ischemia followed by 60 min of reperfusion. Global ischemia of 33 min was achieved by stopping coronary perfusion (no-flow ischemia) of the heart with Krebs-Henseleit buffer for 33 min. Furthermore, the heart was surrounded by oxygen-free buffer solution to prevent diffusion of oxygen from the outside into the myocardium. Start of reperfusion was induced by removing the surrounding buffer and restoring the coronary perfusion of the heart.

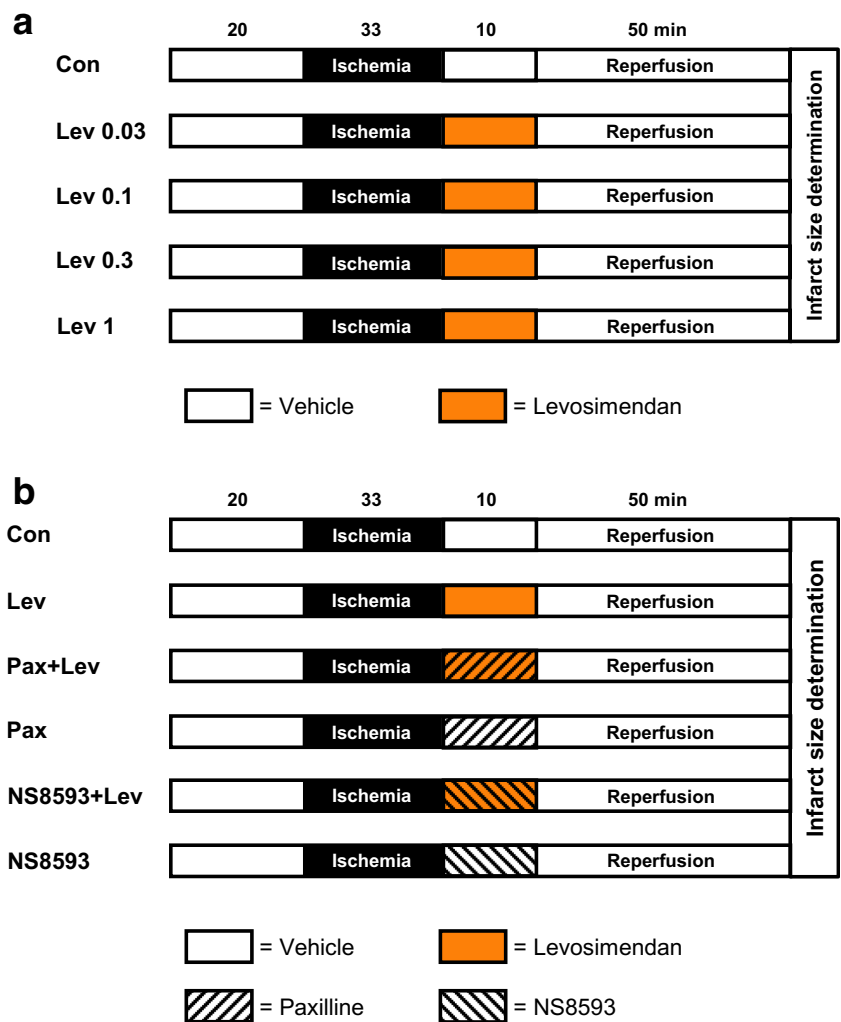
Global ischemia caused a sufficient infarct size, representing the primary endpoint of this study, to show relevant cardioprotective effects. Additionally, this degree of myocardial damage does not completely impair myocardial function during reperfusion.

The present study was divided into two parts. In the first part, we determined the lowest cardioprotective concentration of levosimendan needed for infarct size reduction. Hearts were randomly assigned to five groups ($n = 6$ per group, Fig. 1a):

- Control (Con): Hearts received no further treatment.
- Levosimendan (Lev): Hearts were perfused with 0.03, 0.1, 0.3, and 1 μM Lev for 10 min at the onset of reperfusion.

Levosimendan in a concentration of 0.3 μM showed the strongest infarct size-reducing effect, thus this concentration was chosen for part two of the study assessing the underlying mechanism of levosimendan-induced postconditioning. Hearts were randomly assigned to six groups ($n = 5$ –6 per group, Fig. 1b):

Fig. 1 a, b Experimental protocol. **a** Part 1 of the study: Con = control, Lev = levosimendan; **b** Part 2 of the study: Con = control, Lev = levosimendan, Pax = paxilline; NS8593 = N-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-benzimidazol-2-amine hydrochloride



- Control (Con, $n = 6$): Hearts received no further treatment.
- Levosimendan (Lev, $n = 6$): Hearts were perfused with 0.3 μM Lev for 10 min at the onset of reperfusion.
- Paxilline + Levosimendan (Pax + Lev, $n = 6$): Hearts were perfused with the BK_{Ca} -channel inhibitor paxilline in a concentration of 1 μM [13] combined with 0.3 μM Lev for 10 min at the onset of reperfusion.
- Paxilline (Pax, $n = 6$): Hearts were perfused with 1 μM Pax for 10 min only, to rule out an intrinsic effect of Pax on infarct size.
- NS8593 + Levosimendan (NS8593 + Lev, $n = 6$): Hearts were perfused with the SK_{Ca} -channel inhibitor NS8593 (N-[(1R)-1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-Benzimidazol-2-amine hydrochloride) in a concentration of 0.1 μM [14] combined with 0.3 μM Lev for 10 min at the onset of reperfusion.
- NS8593 (NS8593, $n = 5$): Hearts were perfused with 0.1 μM NS8593 for 10 min only, to rule out an intrinsic effect of NS8593 on infarct size.

At the end of reperfusion, hearts were cut into transverse slices, starting from the cardiac apex to just before the cardiac valvular plane. The slices were stained with 0.75% TTC solution. The size of the infarcted area was determined by planimetry using SigmaScan Pro 5 computer software (SPSS Science Software, Chicago, IL) by two blinded investigators. For this purpose, the individual TTC stained slices were scanned and infarction area was manually determined on the computer by selecting the infarcted and non-infarcted area. The non-vital infarction area appears colorless and the vital non-infarcted area of the myocardium red. Infarct size was calculated as percentage of infarcted area to non-infarcted area from the whole heart.

Statistical Analysis

Calculation of sample size was done by using GraphPad StatMate™ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and resulted in a group size of $n = 6$ for detecting a 25% difference in infarct size with a power of 80% ($\alpha < 0.05$ (two-tailed)).

Hemodynamic variables were measured continuously and detected during baseline, ischemia, and reperfusion. To compare hemodynamic variables between groups or between different time points within groups, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). An investigator blinded to the experimental groups determined the infarct sizes. A one-way ANOVA was chosen, followed by a Tukey post hoc test to analyze infarct size. Data are presented as mean \pm SD. Differences were regarded as statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Infarct Size—Concentration-Related Effect of Levosimendan Postconditioning

Figure 2a illustrates infarct sizes for various concentrations of levosimendan. Control hearts showed an infarct size of $60 \pm$

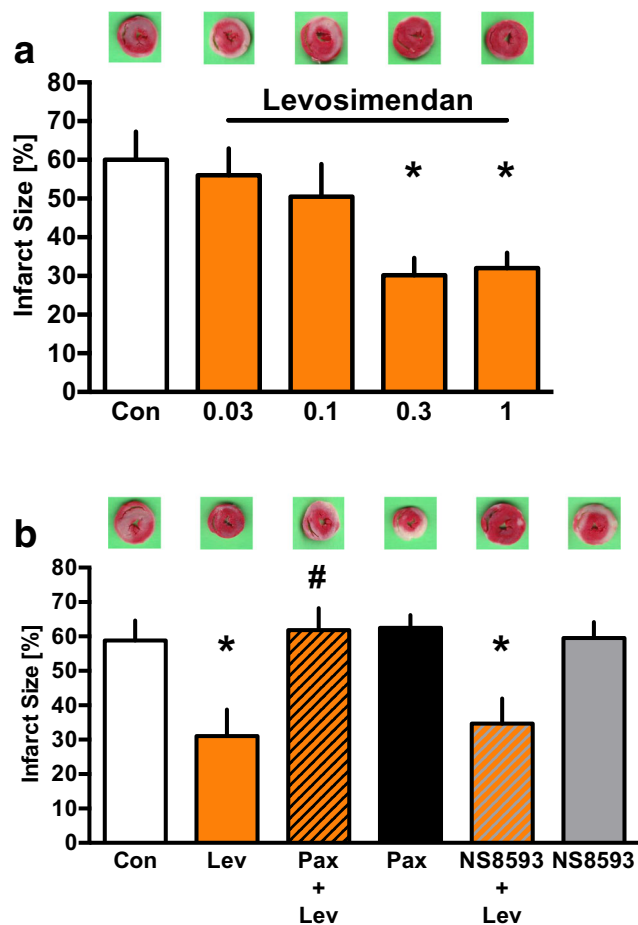


Fig. 2 a, b Infarct size measurement. **a** The infarct size of controls (Con) and levosimendan (Lev); **b** the infarct size of controls (Con), levosimendan (Lev) with or without the K_{Ca} -channel inhibitors paxilline (Pax) and NS8593 (NS8593). Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs. Con and # $P < 0.05$ vs. Lev respectively

7%. The lowest cardioprotective concentration of levosimendan was $0.3 \mu\text{M}$ with an infarct size of $30 \pm 5\%$ ($P < 0.0001$ vs. Con). Increasing the concentration to $1 \mu\text{M}$ did not lead to a further infarct size reduction (Lev 1: $32 \pm 4\%$; $p = 0.9871$ vs. Lev 0.3). Lower concentrations than $0.3 \mu\text{M}$ did not induce cardioprotection (Lev 0.1: $50 \pm 8\%$; $p = 0.1111$ vs. Con and Lev 0.03: $56 \pm 7\%$; $p = 0.8197$ vs. Con).

Infarct Size—Mechanism of Levosimendan Postconditioning

Figure 2b represents infarct sizes from part two of the study assessing the involvement of BK_{Ca} and/or SK_{Ca} channels in levosimendan-induced postconditioning. Infarct size of the control group was $59 \pm 6\%$. Administration of $0.3 \mu\text{M}$ levosimendan reduced infarct size to $31 \pm 8\%$ ($P < 0.0001$ vs. Con). The cardioprotective effect of levosimendan was completely abrogated by the BK_{Ca} -channel inhibitor paxilline (Pax + Lev: $62 \pm 6\%$, $P < 0.0001$ vs. Lev) but not by the SK_{Ca} -channel inhibitor NS8593 (NS8593 + Lev: $35 \pm 7\%$, $P = 0.9021$ vs. Lev). Both inhibitors alone had no effect on infarct size (Pax: $62 \pm 4\%$; $P = 0.9021$ vs. Con and NS8593: $60 \pm 4\%$; $P > 0.9999$ vs. Con).

Cardiac Function

There were no differences in heart rate, LVDP, and coronary flow between the groups (Tables 1 and 2). After ischemia and during reperfusion, LVDP and coronary flow were statistically different from baseline in all groups in both parts of the study (Tables 1 and 2). In part two of the study, heart rate was statistically different compared to baseline after ischemia in the Pax + Lev group and in the Pax group (Table 2). LVP min, dP/dt max, and dP/dt min were statistically different during the reperfusion period compared to baseline (Supplement Table S1 and S2).

Discussion

The results of the current study demonstrate that postconditioning with the calcium-sensitizer levosimendan shows a binary phenomenon, either ineffective or with maximal effect. The lowest cardioprotective concentration of levosimendan in our study model was $0.3 \mu\text{M}$. We are the first to demonstrate that this cardioprotective effect requires activation of BK_{Ca} but not SK_{Ca} channels.

Cardioprotective interventions by postconditioning are promising because the majority of myocardial ischemic events cannot be predicted. Although short cycles of ischemia and reperfusion are a very strong stimulus to induce infarct size reduction—with the exception of cardiac surgery and cardiolog- ical interventions—such measure is not feasible for the

Table 1 Hemodynamic variables

	Baseline	Reperfusion				
		5	15	30	45	60
Heart rate (bpm)						
Con	293 ± 8	212 ± 42	181 ± 57	224 ± 55	217 ± 37	217 ± 39
Lev 0.03	296 ± 20	191 ± 63	219 ± 93	226 ± 85	217 ± 48	214 ± 33
Lev 0.1	292 ± 34	246 ± 37	242 ± 70	209 ± 66	213 ± 72	205 ± 56
Lev 0.3	307 ± 43	211 ± 70	270 ± 32	237 ± 73	237 ± 82	220 ± 68
Lev 1	294 ± 27	280 ± 43	236 ± 21	267 ± 39	231 ± 45	237 ± 31
Left ventricular–developed pressure (mmHg)						
Con	140 ± 11	11 ± 8*	15 ± 11*	25 ± 7*	29 ± 3*	37 ± 5*
Lev 0.03	137 ± 7	17 ± 7*	20 ± 10*	27 ± 11*	34 ± 13*	32 ± 17*
Lev 0.1	128 ± 22	18 ± 8*	16 ± 12*	27 ± 12*	26 ± 8*	30 ± 6*
Lev 0.3	132 ± 20	18 ± 15*	23 ± 18*	25 ± 19*	21 ± 12*	25 ± 11*
Lev 1	144 ± 18	13 ± 17*	11 ± 15*	18 ± 15*	23 ± 17*	23 ± 13*
Coronary flow (ml min ⁻¹)						
Con	14 ± 2	9 ± 1*	8 ± 1*	7 ± 1*	6 ± 1*	6 ± 1*
Lev 0.03	13 ± 2	8 ± 2*	8 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 2*	6 ± 2*
Lev 0.1	14 ± 1	9 ± 1*	9 ± 1*	8 ± 1*	7 ± 1*	7 ± 1*
Lev 0.3	15 ± 2	11 ± 2*	10 ± 3*	9 ± 3*	8 ± 2*	7 ± 2*
Lev 1	14 ± 2	10 ± 4*	8 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 2*	6 ± 1*

Data are mean ± SD. Con = control; Lev = levosimendan

* $P < 0.05$ versus baseline

clinical scenario. Fortunately, cardioprotection achieved by ischemic stimuli can be mimicked pharmacologically thereby inducing a comparable infarct size reduction.

Levosimendan is clinically used for patients with heart failure and leads, when administered preoperatively, to lower mortality [15]. It increases the calcium sensitivity by binding to troponin C and has a positive inotropic effect, without influencing relaxation in the diastole. In addition, it opens ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) in the smooth vascular muscles, lowering pre- and afterload by vasodilation. Hönisch et al. demonstrated postconditioning properties of levosimendan in the rat heart in vivo [4]. The infarct size reduction was in the same range as with ischemic postconditioning but the combination of both interventions did not lead to a more pronounced cardioprotective effect. In addition, this group showed that cardioprotection was mediated by PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) pathway and activation of K_{ATP} -channels.

The current results show that the lowest cardioprotective concentration of levosimendan in our model is 0.3 μ M and an increase in concentration to 1 μ M had no additional effect. Employing the lowest effective concentration of levosimendan allows for maximal cardioprotection by minimizing possible drug-related side effects. Concentration-dependent effects of levosimendan postconditioning have not been studied so far. Based on our results, the effect of levosimendan-induced cardioprotection is more concentration-related than dependent

as we detected an on-off phenomenon, either ineffective or with maximal effect.

Involvement of K_{Ca} -channel activation in cardioprotection was described by us [3, 13] and others [8, 16]. Stowe et al. demonstrated in the isolated heart model using global ischemia that activation of BK_{Ca} and SK_{Ca} channels independently from each other confers cardioprotection [11]. In the present study, also global ischemia was used. In the Langendorff model, both forms, regional and global, of ischemia are used [17–19]. With a direct comparison of both ischemia forms, Kim et al. demonstrated that global ischemia induced larger infarct sizes than regional ischemia [20]. Due to this larger infarct sizes, an excellent discrimination between viable and infarcted area is possible. A further advantage of global ischemia is the high reproducibility due to equal severity and extent of ischemia. In particular, induction of regional ischemia is often inconsistent in localization and severity. Interestingly we detected a strong effect of levosimendan on infarct size but no hemodynamic improvement during the reperfusion period. Consistent with current literature [21], for isolated perfused hearts, infarct size seems the most sensitive marker to assess cardioprotection. The exact reason for this is unclear, but the occurrence of myocardial stunning is often discussed, especially after global ischemia.

The study by Stowe et al. showed that cardioprotection induced by the BK_{Ca} -channel activator NS1619 was not affected by the SK_{Ca} -channel inhibitor NS8593 and vice versa [11].

Table 2 Hemodynamic variables

	Baseline	Reperfusion				
		5	15	30	45	60
Heart rate (bpm)						
Con	274 ± 13	219 ± 67	243 ± 42	270 ± 68	204 ± 23	197 ± 41
Lev	293 ± 29	234 ± 74	242 ± 52	246 ± 35	228 ± 44	241 ± 44
Pax + Lev	316 ± 38	247 ± 76	237 ± 45	227 ± 59	180 ± 65*	214 ± 49*
Pax	279 ± 23	234 ± 99	153 ± 60*	173 ± 58*	156 ± 63*	209 ± 70
NS8593 + Lev	292 ± 24	251 ± 71	237 ± 59	254 ± 48	218 ± 78	235 ± 32
NS8593	292 ± 43	174 ± 53*	169 ± 58*	182 ± 74*	216 ± 58	232 ± 59
Left ventricular-developed pressure (mmHg)						
Con	145 ± 20	11 ± 5*	14 ± 6*	24 ± 16*	33 ± 12*	38 ± 10*
Lev	131 ± 10	19 ± 8*	23 ± 12*	33 ± 10*	34 ± 11*	31 ± 14*
Pax + Lev	127 ± 26	16 ± 7*	24 ± 5*	28 ± 8*	38 ± 7*	32 ± 5*
Pax	138 ± 21	13 ± 8*	17 ± 15*	22 ± 20*	25 ± 8*	29 ± 12*
NS8593 + Lev	128 ± 16	17 ± 9*	16 ± 9*	22 ± 12*	33 ± 12*	39 ± 11*
NS8593	131 ± 30	14 ± 4*	14 ± 4*	22 ± 11*	24 ± 11*	31 ± 10*
Coronary flow (ml min ⁻¹)						
Con	14 ± 2	11 ± 3*	10 ± 3*	9 ± 3*	8 ± 3*	7 ± 3*
Lev	13 ± 2	9 ± 3*	9 ± 2*	8 ± 1*	8 ± 1*	8 ± 1*
Pax + Lev	15 ± 3	8 ± 2*	8 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 2*	6 ± 2*
Pax	14 ± 2	9 ± 2*	8 ± 1*	8 ± 1*	7 ± 1*	7 ± 1*
NS8593 + Lev	14 ± 2	11 ± 3*	10 ± 2*	9 ± 2*	8 ± 2*	8 ± 2*
NS8593	13 ± 3	9 ± 2*	8 ± 1*	7 ± 1*	7 ± 1*	6 ± 1*

Data are mean ± SD. Con = control; Lev = levosimendan; Pax = paxilline

* $P < 0.05$ versus baseline

Furthermore, simultaneous activation of BK_{Ca} and SK_{Ca} channels did not further enhance the infarct size reducing effect [11]. Our results emphasize that activation of K_{Ca} channels play a pivotal role in pharmacological postconditioning induced by levosimendan. Interestingly, the results further demonstrate that only BK_{Ca} channels are crucial for the cardioprotective effect as the SK_{Ca}-channel inhibitor NS8593 had no influence on the infarct size reduction induced by levosimendan. Only the blocker of BK_{Ca}-channels paxilline completely abrogated the effect of levosimendan. Paxilline is a mycotoxin produced by the fungus *Penicillium paxilli* blocking all subunits of BK_{Ca} channels [22] selectively [23–25]. In contrast to the results by Stowe et al. [11], where activation by selective agonists of both channels led to infarct size reduction, levosimendan's cardioprotective effect might be mainly conferred via activation of BK_{Ca} channels and inhibition of SK_{Ca} channels would have very little impact. Another explanation could be that inhibition of the signaling pathway downstream of SK_{Ca}-channel activation with subsequent loss of cardioprotection would elucidate an involvement of these channels in levosimendan conditioning. It is important to distinguish between both channels due to their differential activation depending on the actual status of the cell. BK_{Ca} channels are voltage-gated and directly regulated by Ca²⁺. In contrast, SK_{Ca} channels are voltage-independent and are

indirectly regulated by Ca²⁺ via calmodulin. Both K_{Ca} channels regulate mitochondrial bioenergetics but are activated during different conditions of the cell [11]. Thus, time point and mode of activation seem to be important. The importance to distinguish both channels is also visible by their specific inhibitors and activators. The study by Stowe et al. demonstrated that the cardioprotective effect of BK_{Ca}- and SK_{Ca}-channel activation was completely abolished by the administration of the O₂⁻ dismutator TBAP (Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin). TBAP hereby interferes with the signaling pathway downstream of K_{Ca}-channel activation demonstrating that O₂⁻ are released by activation of BK_{Ca} and SK_{Ca} channels suggesting that both channels share a common final step in cardioprotection. However, the exact involvement of SK_{Ca} channels in levosimendan postconditioning has to be investigated in a future study.

Activation of BK_{Ca}-channels seems to represent a crucial step in the signaling cascade of pharmacological postconditioning. Previously, we could show that these channels are also involved in morphine-induced postconditioning [3].

As aforementioned, ischemic postconditioning is not feasible for the clinical setting making pharmacological postconditioning an interesting and promising option for myocardial protection in the clinic. Unfortunately, these promising interventions are not

implemented in the clinic yet. Results from a controlled experimental setup, focusing on one specific aspect such as infarct size reduction and excluding confounding factors such as concomitant diseases or effect-modulating medications, are difficult to extrapolate to the clinical setting. Drugs like beta-blockers or the antidiabetic glibenclamide were shown to abrogate infarct size reduction by the volatile anesthetic desflurane [26, 27]. Furthermore, age was shown to have an impact on cardioprotective properties of conditioning interventions [28]. Many cardioprotective interventions, ischemically or pharmacologically, failed to reduce infarct size in the aged heart (for review see [29]). Aging might interfere with cardioprotective signaling pathways suggesting that downstream activation within the signaling cascades might be promising for myocardial protection of the aged heart. Previously, we demonstrated that activation of BK_{Ca} channels with NS1619 reduced infarct size in the aged rat heart in vivo and that the extent of infarct size reduction, employing the same concentration of the BK_{Ca}-channel activator, was comparable to young rats [30]. Particularly, these results emphasize BK_{Ca} channels as an important and promising target for myocardial protection making future research in this field indispensable.

Diabetes and hyperglycemia were also shown to abolish cardioprotection by conditioning interventions [31, 32]. Matsumoto et al. demonstrated that hyperglycemia raised the threshold for postconditioning with levosimendan [6]. Only a ten times higher concentration of levosimendan was able to restore the hyperglycemia-induced abrogated cardioprotective effect [6]. Whether BK_{Ca}-channel activation of levosimendan or other effects of this drug were responsible for cardioprotection under hyperglycemia can only be speculated.

Limitations

An animal in vitro study has several limitations. Considering the hemodynamic data, we measure the isovolumetric work of the heart, thus only the intrinsic properties of the rat heart, without neurohumoral and peripheral vascular influence. Thus, it is difficult to transfer this isovolumetric working Langendorff heart to the clinical situation. However, and that is, in turn, the advantage of the model, as we detected no differences in hemodynamic variables between the groups, we can conclude that the infarct size reduction is due to the effect of levosimendan.

Levosimendan is a clinically used inotropic drug for the treatment of heart failure. Against this background, next to its inotropic activity, cardioprotective properties of levosimendan would be particularly attractive. In this context, one has to consider that we have examined the hearts of young and healthy rats. Patients who would benefit from such an intervention are usually old, multimorbid, and take several different medications representing possible confounders for cardioprotection. Therefore, our results cannot be related to

the clinic immediately, but suggest a possible direction and open up new possibilities for levosimendan, which should be considered.

Conclusion

The current results show that the calcium-sensitizer levosimendan induces cardioprotection by postconditioning in a more concentration-related than a concentration-dependent manner. The lowest cardioprotective concentration inducing the strongest cardioprotective effect was 0.3 μM. Furthermore, it seems that activation of BK_{Ca} channels but not SK_{Ca} channels is an elementary step in the signaling cascade of myocardial protection induced by levosimendan.

Acknowledgments In partial fulfillment of the requirements for an MD thesis (M. van de Snepscheut). We thank J. Reinle and L. Goetze for their practical support.

Funding Information This study was supported by institutional and departmental sources.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H579–88.
2. Steurer MP, Steurer MA, Baulig W, Piegeler T, Schlapfer M, Spahn DR, et al. Late pharmacologic conditioning with volatile anesthetics after cardiac surgery. *Crit Care.* 2012;16(5):R191.
3. 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.* 2010;105(5):589–95.
4. Honisch A, Theuring N, Ebner B, Wagner C, Strasser RH, Weinbrenner C. Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(2):155–67.
5. du Toit EF, Genis A, Opie LH, Pollesello P, Lochner A. A role for the RISK pathway and K (ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):41–50.
6. Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, Higashijima U, Maekawa T, Hara T, et al. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but

- not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:4.
7. Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, et al. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol.* 2012;159(2):82–7.
 8. Kinoshita M, Tsutsumi YM, Fukuta K, Kasai A, Tanaka K. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *J Med Investig.* 2016;63(1–2):80–4.
 9. Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R, et al. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channel (hsl_o). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5427–31.
 10. Jenkins DP, Strobaek D, Hougaard C, Jensen ML, Hummel R, Sorensen US, et al. Negative gating modulation by (R)-N-(benzimidazo[1,2-yl]-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) depends on residues in the inner pore vestibule: pharmacological evidence of deep-pore gating of K⁺ (Ca)₂ channels. *Mol Pharmacol.* 2011;79(6):899–909.
 11. Stowe DF, Yang M, Heisner JS, Camara AKS. Endogenous and agonist-induced opening of mitochondrial big versus small Ca²⁺-sensitive K⁺ channels on cardiac cell and mitochondrial protection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;70(5):314–28.
 12. Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Hollmann MW, et al. Impact of mitochondrial Ca²⁺-sensitive potassium (mBKCa) channels in sildenafil-induced cardioprotection in rats. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144737.
 13. Behmenburg F, Trefz L, Dorsch M, Strothoff M, Mathes A, Raupach A, et al. Milrinone-induced postconditioning requires activation of mitochondrial Ca(2+)-sensitive potassium (mBKCa) channels. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2018;32(5):2142–8.
 14. Pasdois P, Quinlan CL, Rissa A, Tariosse L, Vinassa B, Costa AD, et al. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1470–8.
 15. Levin R, Degrange M, Del Mazo C, Tanus E, Porcile R. Preoperative levosimendan decreases mortality and the development of low cardiac output in high-risk patients with severe left ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Exp Clin Cardiol.* 2012;17(3):125–30.
 16. Shintani Y, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Asano Y, et al. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(6):1213–8.
 17. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):940–50.
 18. Najafi M, Noroozi E, Javadi A, Badalzadeh R. Anti-arrhythmogenic and anti-inflammatory effects of troxerutin in ischemia/reperfusion injury of diabetic myocardium. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:385–91.
 19. Leistner M, Sommer S, Kanofsky P, Leyh R, Sommer SP. Ischemia time impacts on respiratory chain functions and Ca(2+)-handling of cardiac subsarcolemmal mitochondria subjected to ischemia reperfusion injury. *J Cardiothorac Surg.* 2019;14(1):92.
 20. Kim JH, Kim J, Park YH, Chun KJ, Kim JS, Jang YH, et al. Cardiodynamics and infarct size in regional and global ischemic isolated heart model: comparison of 1 hour and 2 hours reperfusion. *Korean Circ J.* 2012;42(9):600–5.
 21. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM Jr, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;314(4):H812–H838.
 22. Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, et al. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci.* 2001;21(24):9585–97.
 23. Sanchez M, McManus OB. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology.* 1996;35(7):963–8.
 24. 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.* 2008;44(1):105–13.
 25. Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol.* 2014;144(5):415–40.
 26. Lange M, Redel A, Smul TM, Lotz C, Nefzger T, Stumpner J, et al. Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009;23(5):607–13.
 27. Thornton JD, Thornton CS, Sterling DL, Downey JM. Blockade of ATP-sensitive potassium channels increases infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res.* 1993;72(1):44–9.
 28. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(4):H1630–6.
 29. Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Brookes PS, Nehrke K. Ischemic preconditioning: the role of mitochondria and aging. *Exp Gerontol.* 2012;47(1):1–7.
 30. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, et al. Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A. *Exp Gerontol.* 2012;47(1):116–21.
 31. Huhn R, Heinen A, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B, Weber NC. Cyclosporine A administered during reperfusion fails to restore cardioprotection in prediabetic Zucker obese rats in vivo. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(10):706–12.
 32. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Anaesth.* 2008;100(4):465–71.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Dexmedetomidine Provides Cardioprotection During Early or Late Reperfusion Mediated by Different Mitochondrial K⁺-Channels

Annika Raupach, PhD,* Elif Karakurt, Cand Med,* Carolin Torregroza, MD,* Sebastian Bunte, MD,*† Katharina Feige, MD,* Martin Stroethoff, MD,* Timo Brandenburger, MD,* André Heinen MD, PhD,‡ Markus W. Hollmann, MD, PhD, DEAA,§ and Ragnar Huhn, MD, PhD*

BACKGROUND: Cardioprotective interventions—such as pharmacological postconditioning—are a promising strategy to reduce deleterious consequences of ischemia and reperfusion injury (I/RI) in the heart, especially as timing and onset of myocardial infarction are unpredictable. Pharmacological postconditioning by treatment with dexmedetomidine (Dex), an α_2 -adrenoreceptor agonist, during reperfusion protects hearts from I/RI, independently of time point and duration of application during the reperfusion phase. The mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mK_{ATP}) and mitochondrial large-conductance calcium-sensitive potassium channel (mBK_{Ca}) play a pivotal role in mediating this cardioprotective effect. Therefore, we investigated whether Dex-induced cardioprotection during early or late reperfusion is mediated variously by these mitochondrial K⁺-channels.

METHODS: Hearts of male Wistar rats were randomized into 8 groups and underwent a protocol of 15 minutes adaption, 33 minutes ischemia, and 60 minutes reperfusion in an in vitro Langendorff-system. A 10-minute treatment phase was started directly (first subgroup, early reperfusion) or 30 minutes (second subgroup, late reperfusion) after the onset of reperfusion. Control (Con) hearts received vehicle only. In the first subgroup, hearts were treated with 3 nM Dex, 100 μ M mK_{ATP}-channel blocker 5-hydroxydecanoate (5HD) or 1 μ M mBK_{Ca}-channel blocker Paxilline (Pax) alone or with respective combinations (5HD + Dex, Pax + Dex). Hearts of the second subgroup received Dex alone (Dex30') or in combination with the respective blockers (5HD + Dex30', Pax + Dex30'). Infarct size was determined with triphenyltetrazoliumchloride staining. Hemodynamic variables were recorded during the whole experiment.

RESULTS: During early reperfusion (first subgroup), the infarct size reducing effect of Dex (Con: 57% \pm 9%, Dex: 31% \pm 7%; $P < .0001$ versus Con) was completely abolished by 5HD and Pax (52% \pm 6%; Pax + Dex: 53% \pm 4%; each $P < .0001$ versus Dex), while both blockers alone had no effect on infarct size (5HD: 54% \pm 8%, Pax: 53% \pm 11%). During late reperfusion (second subgroup) the protective effect of Dex (Dex30': 33% \pm 10%, $P < .0001$ versus Con) was fully abrogated by Pax (Pax + Dex30': 58% \pm 7%, $P < .0001$ versus Dex30'), whereas 5HD did not block cardioprotection (5HD + Dex30': 36% \pm 7%). Between groups and within each group throughout reperfusion no significant differences in hemodynamic variables were detected.

CONCLUSIONS: Cardioprotection by treatment with Dex during early reperfusion seems to be mediated by both mitochondrial K⁺-channels, whereas during late reperfusion only mBK_{Ca}-channels are involved. (Anesth Analg XXX;XXX:00–00)

KEY POINTS

- **Question:** Is cardioprotection by treatment with dexmedetomidine during early or late reperfusion mediated differently by mitochondrial K⁺-channels?
- **Findings:** Cardioprotection by treatment with dexmedetomidine during early reperfusion is mediated by activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mK_{ATP})- and mitochondrial large-conductance calcium-sensitive potassium (mBK_{Ca})-channels, whereas only mBK_{Ca}-channels are required during the late reperfusion phase.
- **Meaning:** Cardioprotection during reperfusion could be targeted and improved by different drugs.

From the *Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany; †Department of Internal Medicine, Elbe Clinics Stade-Buxtehude, Stade, Germany; ‡Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Duesseldorf, Germany; and §Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Amsterdam, the Netherlands.

Accepted for publication July 21, 2020.

Copyright © 2020 International Anesthesia Research Society
DOI: 10.1213/ANE.00000000000005148

Funding: None.

The authors declare no conflicts of interest.

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Markus W. Hollmann, MD, PhD, DEAA, Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam, the Netherlands. Address e-mail to whollmann@amsterdamumc.nl.

GLOSSARY

5HD = 5-hydroxydecanoate; **ANOVA** = analysis of variance; **ATP** = adenosine triphosphate; **bpm** = beats per minute; **Con** = control; **Dex** = dexmedetomidine; **Dex30'** = dexmedetomidine after 30 minutes; **I/RI** = ischemia and reperfusion injury; **IPC** = ischemic preconditioning; **IpoC** = ischemic postconditioning; **KCNMA** = potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1; **KHB** = Krebs-Henseleit solution; **LVEDP** = left ventricular end-diastolic pressure; **LVDP** = left ventricular developed pressure; **MITOK-KO** = knock out of the gene MITOK (also known as *CCDC51*); **mBK_{Ca}** = mitochondrial large-conductance calcium-sensitive potassium channel; **(mK_{ATP})-channel** = mitochondrial ATP-sensitive K⁺; **NIH** = National Institute of Health; **Pax** = paxilline; **PoCDex** = postconditioning with dexmedetomidine; **PreCDex** = preconditioning with dexmedetomidine; **ROS** = reactive oxygen species; **SD** = standard deviation; **TTC** = triphenyltetrazoliumchloride; **WT** = wild type

Cardioprotective interventions like pharmacological pre- or postconditioning are promising strategies to reduce the deleterious consequences of ischemia and reperfusion injury (I/RI).¹ However, translating these experimental trials to the clinical setting is highly challenging. For conditioning with the highly specific α 2-adrenoreceptor agonist dexmedetomidine (Dex), cardioprotective properties have been shown in several studies.²⁻⁴ Previously, we demonstrated that the cardioprotective effect of preconditioning with Dex (PreCDex) was abolished by paxilline (Pax)—a mitochondrial large-conductance calcium-sensitive K⁺ (mBK_{Ca})-channel blocker—indicating an involvement of these channels.⁵ Moreover, postconditioning with Dex (PoCDex) also protects hearts against I/RI independent of time point and duration of application during reperfusion.³

It is widely accepted that mitochondria are the end effector of cardioprotective strategies.⁶ Activation of mitochondrial potassium channels plays an important role in mediating cardioprotection.⁷ The mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mK_{ATP})-channel was initially described to be an effective target conferring cardioprotection by means of applying K_{ATP}-channel opener in the setting of I/RI.^{8,9} Inhibition of channel opening with specific blockers—such as 5-hydroxydecanoate (5HD)—abolishes pharmacological-induced conditioning strategies.^{10,11}

A considerable role in cardioprotection for the mBK_{Ca}-channel was shown by a decrease of infarct size induced by mBK_{Ca}-channel activator NS1619, whereas Pax reversed this reduction.¹² The importance of this channel was further underlined by the loss of cardioprotection conferred by ischemic preconditioning (IPC) in *KCNMA1*^{-/-} mice,¹³ carrying an inactivation of the potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1 (*KCNMA1*) gene, which encodes the pore-forming α -subunit of mBK_{Ca}-channels.¹⁴ The mechanisms are still unknown, but there are hints that opening affects mitochondrial calcium accumulation, reactive oxygen species (ROS) production, and oxidative phosphorylation.¹⁵

For cardioprotection induced by PreCDex, an involvement of mK_{ATP}¹⁶ as well as mBK_{Ca}-channels⁵ is described. However, whether these channels also play

a role during PoCDex remains unknown. For IPC, Barsukevich et al¹⁷ demonstrated that cardioprotective properties seem to be mediated by mK_{ATP}-channels when the ischemic stimulus is applied immediately after the onset of reperfusion but not at later time points indicating a time-dependent requirement. Referring to our own study, showing PoCDex being completely independent of time point and duration of application during reperfusion,³ the question arises whether and to what extent a time-dependent requirement of mK_{ATP}- or mBK_{Ca}-channels exists in PoCDex.

We hypothesized that PoCDex (1) involves activation of mK_{ATP} as well as mBK_{Ca}-channels and that (2) activation of these channels is required for cardioprotection induced by treatment with Dex at different time points during reperfusion.

METHODS

The present study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12). The animals were obtained from the breeding facility at the Central Animal Research Facility of the Heinrich Heine University Duesseldorf.

Surgical Preparation and Langendorff Model

The procedure was performed as described in detail previously.¹⁸ Wistar rats (male, 2–3 months old, for further characteristics see Table 1) were randomized into the respective groups and anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight; Narcoren, Merial, Germany). After decapitation and thoracotomy, hearts were isolated and mounted on a Langendorff system with constant aortic pressure (80 mm Hg) and perfused with a modified Krebs-Henseleit solution (KHB; 116 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄, 1.17 mM KH₂PO₄, 24.9 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 8.3 mM glucose, and 2.2 mM pyruvate at 37°C). Ischemia was induced by stopping perfusion with KHB and by surrounding the heart with KHB aerated with nitrogen. Initiating

Table 1. Weights and Ischemic Contracture

	n	Body Weight (g)	Heart Weight Dry (g)	Heart Weight Wet (g)	Time of Maximum Ischemic Contracture (min)	Level of Maximum Ischemic Contracture (mm Hg)
Con	10	296 ± 18	0.12 ± 0.03	1.28 ± 0.04	17 ± 2	66 ± 10
First subgroup (early reperfusion)						
Dex	10	301 ± 14	0.09 ± 0.01	1.31 ± 0.04	17 ± 1	68 ± 7
5HD + Dex	10	300 ± 30	0.10 ± 0.02	1.30 ± 0.06	17 ± 2	60 ± 15
5HD	10	304 ± 28	0.10 ± 0.02	1.30 ± 0.04	18 ± 4	68 ± 8
Pax + Dex	9	305 ± 33	0.11 ± 0.01	1.31 ± 0.06	17 ± 3	68 ± 21
Pax	9	295 ± 27	0.11 ± 0.03	1.30 ± 0.07	17 ± 2	71 ± 15
Second subgroup (late reperfusion)						
Dex30'	10	299 ± 11	0.11 ± 0.04	1.28 ± 0.04	17 ± 2	59 ± 8
5HD + Dex30'	10	311 ± 24	0.10 ± 0.02	1.33 ± 0.05	18 ± 2	70 ± 13
Pax + Dex30'	9	302 ± 18	0.10 ± 0.02	1.31 ± 0.05	18 ± 2	65 ± 7

Data are mean ± SD.

Abbreviations: 5HD, 5-hydroxydecanoate; Con, control; Dex, dexmedetomidine; Dex30', dexmedetomidine after 30 minutes; Pax, paxilline; SD, standard deviation.

reperfusion, heart perfusion with KHB was restored, and the ischemic buffer bath removed from the heart. Pressure measurements were performed via a normal saline-filled balloon placed in the left ventricle. The left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was set at 4–6 mm Hg. Continuously, hemodynamic data (heart rate and left ventricular pressure) were measured, digitized using an analog to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz, and recorded on a personal computer using Labchart 8.0 for Windows. The left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated by subtracting LVEDP from left ventricular end-systolic pressure. Coronary flow was measured via the collection of coronary effluent over distinct time.

After reperfusion, frozen hearts were cut into transverse slices (2 mm), resulting in 8 slices per heart, stained with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution (15 minutes, 37°C, pH 7.42), and dried in 4% formalin overnight.¹⁹ A blinded investigator determined the infarct area and the total area of the left ventricle for each slice by using planimetry.¹⁹ Per heart, the overall infarct area and the total area of the left ventricle—each as the sum from all 8 slices—were calculated. Infarct size was expressed as a percentage of total infarct area per total area of the left ventricle.

Experimental Setting

To determine if both potassium channels are involved in Dex-induced postconditioning and if these channels are required differently during particular stages of reperfusion, PoCDex treatment during early or late reperfusion was combined with 5HD, an mK_{ATP}-channel blocker, or with Pax, a mBK_{Ca}-channel blocker (Figure 1). In a previous study, we demonstrated that a concentration of 100 μM 5HD completely abolished the infarct size reducing effect of the cardioprotective drug ramelteon.¹⁰ Similarly, 1 μM of Pax completely abrogated cardioprotection by ramelteon.¹⁰ Referring to these previous studies, we used the same—proven to be effective—concentrations of the 2 blockers in this study. At the beginning of the

experiments, animals were randomized into 9 groups. In the first subgroup, hearts were treated immediately at the onset of reperfusion (early reperfusion), in the second subgroup, hearts were treated with Dex after 30 minutes (Dex30') of reperfusion (late reperfusion). The Dex was administered for 10 minutes. All substances or respective vehicles were administered with syringe pumps (Perfusor Space, B. Braun, Melsungen, Germany) by using a flow rate of 1% of the coronary flow. All hearts underwent the following protocol: 15 minutes equilibration, 33 minutes ischemia, 60 minutes reperfusion (Figure 1).

Control (Con). Hearts received vehicle during both treatment phases.

First Subgroup (Early Reperfusion)

All groups received a specific treatment during early reperfusion and additional vehicle during late reperfusion.

Dexmedetomidine (Dex). Hearts were treated with 3 nM Dex. This Dex concentration was previously determined as the lowest concentration inducing the strongest cardioprotective effect demonstrated by a concentration-effect analysis using the same experimental conditions.³

5-Hydroxydecanoate + Dexmedetomidine (5HD + Dex). Hearts were treated with a combination of 100 μM 5HD¹⁰—a mK_{ATP}-channel inhibitor—and 3 nM Dex.

5-Hydroxydecanoate (5HD). Hearts were treated with 100 μM 5HD only.

Paxilline + Dexmedetomidine (Pax + Dex). Hearts were treated with a combination of 1 μM Pax¹⁰—a mBK_{Ca}-channel inhibitor—and 3 nM Dex.

Paxilline (Pax). Hearts were treated with 1μM Pax only.

Second Subgroup (Late Reperfusion)

All groups received vehicle during early reperfusion and a specific treatment during late reperfusion. The

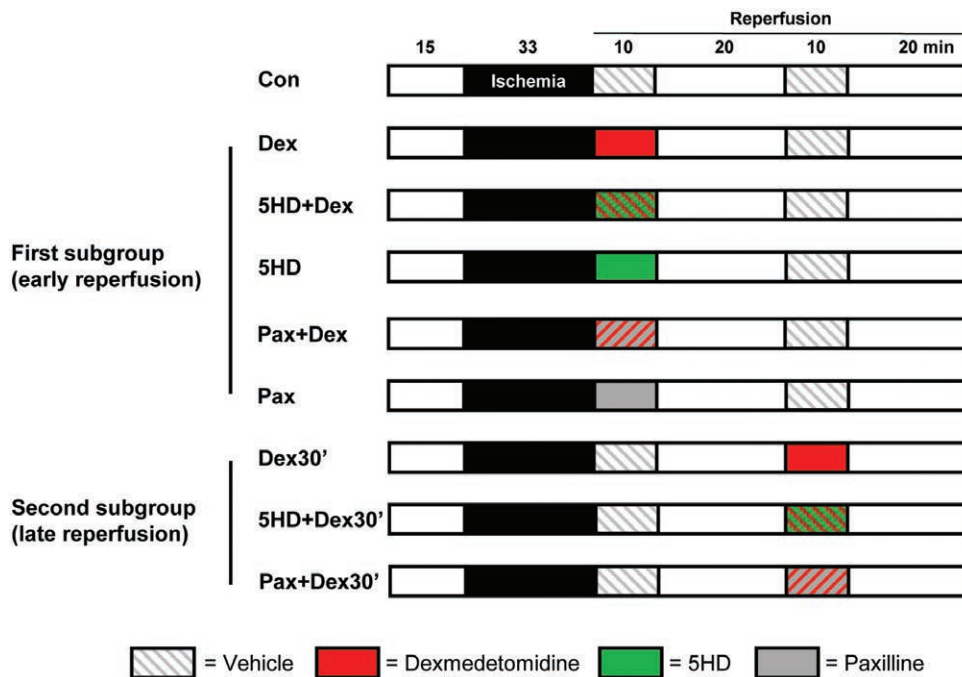


Figure 1. Experimental protocol. 5HD indicates 5-hydroxydecanoate; Con, control; Dex, dexmedetomidine; Dex30', dexmedetomidine after 30 minutes; Pax, paxilline.

treatment during late reperfusion started 30 minutes after the onset of reperfusion. This time point was selected based on the findings of Barsukevich et al¹⁷ showing that cardioprotection induced by ischemic postconditioning (IPoC) applied 30 minutes after initiating reperfusion, in contrast to earlier time points, was independent of mK_{ATP} -channels.

Dexmedetomidine (Dex30'). Hearts were treated with 3 nM Dex only.

5-Hydroxydecanoate + Dexmedetomidine (5HD + Dex30'). Hearts were treated with a combination of 100 μ M 5HD¹⁰ and 3 nM Dex.

Paxilline + Dexmedetomidine (Pax + Dex30'). Hearts were treated with a combination of 1 μ M Pax¹⁰ and 3 nM Dex.

Statistical Analysis

All animals were randomized into 9 groups at the beginning of experiments—independent of respective subgroup, thus, hearts were evaluated in an overall statistical analysis. All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The calculated sample size (GraphPad StatMate GraphPad Software, San Diego, CA) of the study was $n = 10$ for detecting a 25% mean difference and a SD of 15% in infarct size (power 80%, $\alpha < .05$ [2-tailed]). For a comparison of hemodynamic data between groups or between different time points within groups, we used a 2-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's post hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA). The data

shown in Table 1 were analyzed by a 1-way ANOVA with Tukey's post hoc test. A researcher blinded to the experimental groups evaluated the infarct sizes. For analysis of infarct sizes, a 1-way ANOVA was chosen, followed by a Tukey' post hoc test. Changes were regarded as statistically significant if $P < .05$.

RESULTS

Animal Characteristics

Table 1 depicts body weight, wet and dry weight, as well as time and level of maximal contracture of the randomized animals. No significant differences were detected in all parameters between groups. In the respective groups Pax + Dex, Pax, and Pax + Dex30', 1 heart per group was excluded from further analysis because it did not fulfill the qualitative characteristics (threshold values of heart rate and LVDP) for measurements with the Langendorff-system.

Infarct Size Measurements

In control (Con) hearts—treated with vehicle only—the infarct size was $57\% \pm 9\%$. In the first subgroup, PoCDex (group Dex) during early reperfusion reduced the infarct size to $31\% \pm 7\%$ ($P < .0001$ versus Con, Figure 2). This reduction was completely abolished by simultaneous application of 5HD or Pax (5HD + Dex: $52\% \pm 6\%$; Pax + Dex: $53\% \pm 4\%$, both $P < .0001$ versus Dex). Both blockers alone however, had no effect on infarct size (5HD: $54\% \pm 8\%$, $P = .987$ versus Con; Pax: $53\% \pm 11\%$, $P = .947$ versus Con). In the second subgroup, Dex-induced postconditioning during late

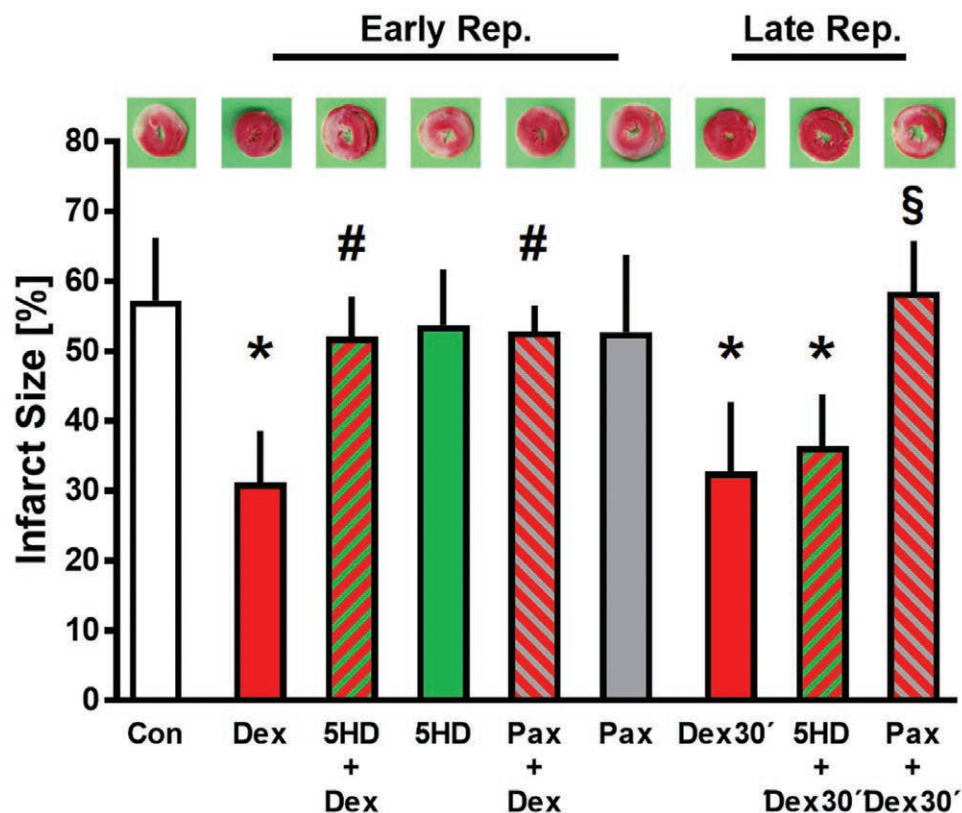


Figure 2. Infarct size measurements of hearts treated during early (first subgroup) and late (second subgroup) reperfusion (Rep.). Figure shows the infarct size of treatment with different combinations of vehicle, Dex, or inhibitors. * $P < .05$ versus Con, # $P < .05$ versus Dex, § $P < .05$ versus Dex30'. 5HD indicates 5-hydroxydecanoate; Con, control; Dex, dexmedetomidine; Dex30', dexmedetomidine after 30 minutes; Pax, paxilline.

reperfusion significantly reduced infarct size compared to Con group (Dex30': $33\% \pm 10\%$, $P < .0001$ versus Con). Simultaneous application of 5HD had no effect on the Dex-induced reduction of infarct size (5HD + Dex30': $36\% \pm 7\%$, $P < .0001$ versus Con). In contrast, Pax administration fully abolished the cardioprotective effect of treatment with Dex during late reperfusion (Pax + Dex30': $58\% \pm 7\%$, $P < .0001$ versus Dex30').

Cardiac Function

The hemodynamic variables of all groups are shown in Table 2. Between groups and within each group throughout reperfusion, no significant differences were observed for heart rate, LVDP, LVEDP, and coronary flow. During reperfusion, in all groups, both LVDP and coronary flow significantly decreased, whereas LVEDP significantly increased compared to baseline.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that both mK_{ATP} - and mBK_{Ca} -channels are involved in the infarct size reducing effect of PoCDex. Specific blockers of mK_{ATP} - and mBK_{Ca} -channels inhibit cardioprotection by treatment with Dex during early reperfusion (first subgroup). In contrast, treatment with Dex during late reperfusion (second subgroup) is inhibited by mBK_{Ca} -channel

blockade while inhibition of mK_{ATP} -channels has no influence on PoCDex at this time point. These results suggest that PoCDex during early reperfusion involves activation of both K^+ -channels, whereas during late reperfusion, the cardioprotective effect seems to be mediated by activation of mBK_{Ca} -channels only.

In the present study, the mBK_{Ca} -channel inhibitor Pax abolished infarct size reduction by Dex completely irrespective of the time point of Dex administration indicating a requirement of the mBK_{Ca} -channel for cardioprotection during the whole reperfusion period. Pax is a positive allosteric modulator of mBK_{Ca} -channels resulting in a strong stabilization of a closed channel conformation.^{20,21} Pax also inhibits different isoforms of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase²² and cerebellar inositol 1,4,5,-trisphosphate receptors,²³ but in at least 5 times higher concentrations than used in the present study. Therefore, it can be expected that 1 μ M Pax induces a specific inhibition of mBK_{Ca} -channels. Furthermore, in comparable studies of other groups investigating mBK_{Ca} -channel involvement, this concentration was also efficient for successful inhibition.^{24,25}

Our results—demonstrating a requirement of mBK_{Ca} -channels in the reduction of infarct size by PoCDex—match the findings of our previous study

Table 2. Hemodynamic Variables

	Baseline	Reperfusion		
		30 min	45 min	60 min
Heart rate (bpm)				
Con	307 ± 36	270 ± 92	244 ± 70	256 ± 81
First subgroup (early reperfusion)				
Dex	302 ± 53	259 ± 68	244 ± 65	210 ± 73
5HD + Dex	322 ± 28	249 ± 77	235 ± 73	252 ± 73
5HD	291 ± 33	226 ± 68	256 ± 63	255 ± 51
Pax + Dex	296 ± 41	176 ± 52	191 ± 46	217 ± 81
Pax	286 ± 29	207 ± 49	234 ± 60	219 ± 67
Second subgroup (late reperfusion)				
Dex30'	304 ± 37	259 ± 33	207 ± 65	242 ± 42
5HD + Dex30'	289 ± 44	217 ± 71	229 ± 62	233 ± 65
Pax + Dex30'	303 ± 46	234 ± 51	218 ± 72	244 ± 61
LVDP (mm Hg)				
Con	136 ± 26	39 ± 27 ^a	47 ± 22 ^a	46 ± 22 ^a
First subgroup (early reperfusion)				
Dex	148 ± 25	30 ± 11 ^a	39 ± 12 ^a	39 ± 15 ^a
5HD + Dex	118 ± 27	32 ± 18 ^a	34 ± 19 ^a	32 ± 17 ^a
5HD	151 ± 27	33 ± 14 ^a	36 ± 15 ^a	34 ± 17 ^a
Pax + Dex	126 ± 27	30 ± 13 ^a	36 ± 13 ^a	30 ± 17 ^a
Pax	145 ± 32	37 ± 9 ^a	42 ± 13 ^a	42 ± 15 ^a
Second subgroup (late reperfusion)				
Dex30'	127 ± 24	39 ± 20 ^a	36 ± 24 ^a	35 ± 18 ^a
5HD + Dex30'	138 ± 35	37 ± 14 ^a	33 ± 17 ^a	30 ± 17 ^a
Pax + Dex30'	133 ± 23	32 ± 16 ^a	28 ± 15 ^a	26 ± 16 ^a
Coronary flow (mL/min)				
Con	16 ± 3	10 ± 3 ^a	9 ± 2 ^a	8 ± 2 ^a
First subgroup (early reperfusion)				
Dex	17 ± 2	9 ± 3 ^a	8 ± 3 ^a	7 ± 2 ^a
5HD + Dex	16 ± 3	8 ± 2 ^a	7 ± 2 ^a	6 ± 2 ^a
5HD	16 ± 3	9 ± 3 ^a	8 ± 2 ^a	7 ± 2 ^a
Pax + Dex	15 ± 3	6 ± 1 ^a	6 ± 1 ^a	5 ± 1 ^a
Pax	16 ± 2	8 ± 3 ^a	8 ± 3 ^a	8 ± 3 ^a
Second subgroup (late reperfusion)				
Dex30'	16 ± 3	9 ± 2 ^a	8 ± 2 ^a	7 ± 2 ^a
5HD + Dex30'	15 ± 3	8 ± 2 ^a	7 ± 2 ^a	6 ± 1 ^a
Pax + Dex30'	17 ± 3	9 ± 3 ^a	8 ± 3 ^a	8 ± 3 ^a

Data are mean ± SD.

Abbreviations: 5HD, 5-hydroxydecanoate; bpm, beats per minute; Con, control; Dex, dexmedetomidine; Dex30', dexmedetomidine after 30 minutes; LVDP, left ventricular developed pressure; Pax, paxilline; SD, standard deviation.

^aP < .05 versus baseline.

on PreCDex, where cardioprotection was also blunted by the mBK_{Ca}-channel blocker Pax.⁵ Additionally, the involvement of mBK_{Ca}-channels in pharmacological-induced conditioning with various drugs has been verified in several earlier studies from others⁷ and our own group.^{26,27} Our finding that mBK_{Ca}-channels are required for cardioprotection induced by Dex during the whole reperfusion period emphasizes the high relevance of this channel for pharmacological conditioning. Furthermore, the importance of mBK_{Ca}-channels for cardioprotection is shown, among others, by the observation that hearts of transgenic mice, expressing an activated form of BK_{Ca}-channels in mitochondria, are protected against I/RI.²⁸ Infarct size of these transgenic hearts was comparable to preconditioned wild type (WT) hearts, while preconditioned transgenic hearts ultimately revealed the smallest infarct size. In the field of cardioprotection, the mBK_{Ca}-channel is a very promising target, especially due to its

maintained protective properties in the aged heart. In a previous study, we demonstrated a reduction of infarct size with the mBK_{Ca}-channel opener NS1619 in young as well as in aged rats,²⁹ while pharmacological and ischemic conditioning has failed to induce cardioprotection in aged hearts.³⁰

The mK_{ATP}-channel inhibitor 5HD blunted the protective effect of PoCDex during the early reperfusion phase, indicating an involvement for these channels at this time point. 5-HD acts on the same binding site as ATP but does not modulate the binding of ATP itself.³¹ Recently, the subunits of the mK_{ATP}-channel were reconstructed, and when forming a complete channel, a concentration of 100 μM 5HD showed a full blockage.³² Therefore, applying 100 μM 5HD should be sufficient for effective and specific inhibition of the mK_{ATP}-channels. In addition, several previous studies successfully investigated the involvement of mK_{ATP}-channel in cardioprotection by using equal or even lower concentrations of 5HD.^{10,33–35}

Our results—demonstrating an involvement of mK_{ATP}-channels in cardioprotection by treatment with Dex—are also in line with findings from a number of studies showing Dex-induced versatile organ protective effects transmitted by mK_{ATP}-channels. For cerebral I/RI, Yuan et al¹⁶ recently showed protection by Dex via activating mK_{ATP}-channels in an in vivo rat model. Administration of Dex before ischemia protects the brain from I/RI, whereas additional application of 5HD abolished this effect.¹⁶ This is underlined by Minaei et al³⁶ showing a neuroprotective effect of Dex in an in vivo rat Parkinson model, which was blunted by the mK_{ATP}-channel inhibitor glibenclamide.

A crucial role for mK_{ATP}-channels in cardioprotection induced by different stimuli is described in various studies.^{10,11,32,37,38} In hearts from mice lacking mK_{ATP} activity (knock out of the gene MITOK [MITOK-KO]), pharmacological preconditioning with diazoxide failed to induce protection, whereas hearts from WT mice were protected.³² Interestingly, hearts from MITOK-KO mice were more sensitive to I/RI compared to WT hearts.³² Sato et al³⁹ demonstrated that 5HD specifically blocked mitochondrial and not surface K_{ATP}-channels.

The finding that mK_{ATP}-channels are only involved in postconditioning during early and not late reperfusion is in line with a study from Barsukevich et al.¹⁷ They showed that cardioprotection by IPoC directly or 10 minutes after the onset of reperfusion was abolished by 5HD, whereas 5HD had no effect on cardioprotection by IPoC started 30 or 45 minutes after ischemia.¹⁷ With the current study, we present the mBK_{Ca}-channel as a mediator for Dex-induced cardioprotection in the late reperfusion phase. However, further studies are needed to show whether the mBK_{Ca}-channel has a comparable impact in the late reperfusion phase of IPoC.

The LVDP was reduced significantly in all groups compared to baseline, indicating posts ischemic contractile dysfunction. Between groups, differences in LVDP were not detectable despite clear changes in infarct size. This suggests that in our model, PoCDex is cardioprotective by reducing cell death and probably not by diminishing contractile dysfunction. Both events are often a result of the same mechanisms, but notably, protection against contractile dysfunction is not the same as against cell death.⁴⁰ For a valid conclusion about an effect of Dex on contractile dysfunction, an in vivo model of I/RI is required and is planned for future studies.

In conclusion, our findings suggest that cardioprotection induced by PoCDex during early reperfusion is mediated by activation of mK_{ATP} and mBK_{Ca} -channels, whereas only mBK_{Ca} -channels are required during the late reperfusion phase. Referring to a possible influence of comedication on activation of K^+ -channels as well as the time point of Dex application during reperfusion, this could be of essential interest in translating cardioprotection by PoCDex into the clinical setting. ■■

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Osameh Jalajel (Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr 5, 40225 Duesseldorf, Germany) for his practical support.

DISCLOSURES

Name: Annika Raupach, PhD.

Contribution: This Author helped to design the study, analyzed the data, and write the manuscript.

Name: Elif Karakurt, Cand Med.

Contribution: This author helped to perform the experiments.

Name: Carolin Torregroza, MD.

Contribution: This author helped to perform the experiments and to write the paper.

Name: Sebastian Bunte, MD.

Contribution: This author helped to analyze and interpret the data.

Name: Katharina Feige, MD.

Contribution: This Author helped analyze the data.

Name: Martin Stroethoff, MD.

Contribution: This author helped to analyze the data.

Name: Timo Brandenburger, MD.

Contribution: This author helped to revise the manuscript.

Name: André Heinen MD, PhD.

Contribution: This author helped to design the study.

Name: Markus W. Hollmann, MD, PhD, DEAA.

Contribution: This author helped to analyze and interpret the data and finally edited the manuscript.

Name: Ragnar Huhn, MD, PhD.

Contribution: This author helped to design the study, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript.

This manuscript was handled by: Alexander Zarbock, MD.

REFERENCES

- Caricati-Neto A, Errante PR, Menezes-Rodrigues FS. Recent advances in pharmacological and non-pharmacological strategies of cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4002.
- Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in the intensive care setting. *Drugs.* 2015;75:1119–1130.
- Bunte S, Behnenburg F, Majewski N, et al. Characteristics of dexmedetomidine postconditioning in the field of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesth Analg.* 2020;130:90–98.
- Yoshikawa Y, Hirata N, Kawaguchi R, Tokinaga Y, Yamakage M. Dexmedetomidine maintains its direct cardioprotective effect against ischemia/reperfusion injury in hypertensive hypertrophied myocardium. *Anesth Analg.* 2018;126:443–452.
- Behnenburg F, Pickert E, Mathes A, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine in rats is dose-dependent and mediated by $bkca$ channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;69:228–235.
- Boengler K, Lochner G, Schulz R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315:H1215–H1231.
- Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V. Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med Res Rev.* 2015;35:520–553.
- Grover GJ, D’Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:145–152.
- Yao Z, Gross GJ. Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation.* 1994;89:1769–1775.
- Stroethoff M, Christoph I, Behnenburg F, et al. Melatonin receptor agonist ramelteon reduces ischemia-reperfusion injury through activation of mitochondrial potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018;72:106–111.
- Obal D, Dettwiler S, Favocchia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg.* 2005;101:1252–1260.
- Xu W, Liu Y, Wang S, et al. Cytoprotective role of Ca^{2+} -activated K^+ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* 2002;298:1029–1033.
- Soltysinska E, Bentzen BH, Barthmes M, et al. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 2014;9:e103402.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, et al. Cerebellar ataxia and purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^+ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:9474–9478.
- Bentzen BH, Olesen SP, Rønn LC, Grunnet M. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol.* 2014;5:389.
- Yuan F, Fu H, Sun K, Wu S, Dong T. Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Metab Brain Dis.* 2017;32:539–546.
- Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, et al. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2015;110:452.
- Raupach A, Reinle J, Stroethoff M, et al. Milrinone-induced pharmacological preconditioning in cardioprotection: hints for a role of mitochondrial mechanisms. *J Clin Med* 2019;8:507
- Behnenburg F, Dorsch M, Huhn R, et al. Impact of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium ($mBKCa$) channels in sildenafil-induced cardioprotection in rats. *PLoS One.* 2015;10:e0144737.
- Yu M, Liu SL, Sun PB, Pan H, Tian CL, Zhang LH. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37:56–66.
- Zhou Y, Lingle CJ. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. *J Gen Physiol.* 2014;144:415–440.

22. Bilmen JG, Wootton LL, Michelangeli F. The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by paxilline. *Arch Biochem Biophys*. 2002;406:55–64.
23. Longland CL, Dyer JL, Michelangeli F. The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *Eur J Pharmacol*. 2000;408:219–225.
24. Zhang JY, Cheng K, Lai D, et al. Cardiac sodium/calcium exchanger preconditioning promotes anti-arrhythmic and cardioprotective effects through mitochondrial calcium-activated potassium channel. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:10239–10249.
25. Wojtovich AP, Sherman TA, Nadtochiy SM, Urciuoli WR, Brookes PS, Nehrke K. SLO-2 is cytoprotective and contributes to mitochondrial potassium transport. *PLoS One*. 2011;6:e28287.
26. Bunte S, Behmenburg F, Bongartz A, et al. Preconditioning by levosimendan is mediated by activation of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium (mBKCa) channels. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018;32:427–434.
27. Behmenburg F, Trefz L, Dorsch M, et al. Milrinone-induced postconditioning requires activation of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium (mBKCa) channels. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018;32:2142–2148.
28. Goswami SK, Ponnalagu D, Hussain AT, et al. Expression and activation of BKCa channels in mice protects against ischemia-reperfusion injury of isolated hearts by modulating mitochondrial function. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:194.
29. Heinen A, Ströthoff M, Schmidt A, et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol*. 2014;56:99–105.
30. Shim YH. Cardioprotection and ageing. *Korean J Anesthesiol*. 2010;58:223–230.
31. Notsu T, Tanaka I, Takano M, Noma A. Blockade of the ATP-sensitive K^+ channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;260:702–708.
32. Paggio A, Checchetto V, Campo A, et al. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature*. 2019;572:609–613.
33. Cao S, Liu Y, Wang H, et al. Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ*. 2016;4:e1706.
34. Li W, Wu N, Shu W, Jia D, Jia P. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Exp Ther Med*. 2015;10:2197–2205.
35. Lucchinetti E, Jamnicki M, Fischer G, Zaugg M. Preconditioning by isoflurane retains its protection against ischemia-reperfusion injury in postinfarct remodeled rat hearts. *Anesth Analg*. 2008;106:17–23.
36. Minaei A, Haghdoost-Yazdi H. Dexmedetomidine attenuates the induction and reverses the progress of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism; involvement of KATP channels, alpha 2 adrenoceptors and anti-inflammatory mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;382:114743.
37. Aggarwal S, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Role of ATP-sensitive potassium channels in remote ischemic preconditioning induced tissue protection. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017;22:467–475.
38. Krolikowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS. Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesth Analg*. 2005;101:1590–1596.
39. 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*. 2005;111:198–203.
40. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM Jr, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314:H812–H838.