Aus der Klinik für Anästhesiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Pannen

Das Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon in der pharmakologischen Konditionierung: Dosisabhängige Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens

Dissertation

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

vorgelegt von Kitti Maas

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. Dr. André Heinen

Für meine Familie.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Torregroza C, **Maas K**, Feige K, Raupach A, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R

Combination of the Phosphodiesterase-Inhibitors Sildenafil and Milrinone Induces Cardioprotection with Various Conditioning Strategies Journal of Cardiovascular Pharmacology: September 24, 2020 doi: 10.1097/FJC.00000000000919 [1]

Zusammenfassung

Ischämische Prä- (PC) und Postkonditionierung (POC) stellen potente Strategien dar, die das Herz in experimentellen Versuchen gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden schützen können. Diese Kardioprotektion durch ischämische Konditionierung kann pharmakologisch imitiert werden, beispielsweise durch die Gabe der Phosphodiesterase-Inhibitoren Sildenafil (Sil) und Milrinon (Mil). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Sil-vermittelte PC einen konzentrationsabhängigen Effekt hat und ob die kombinierte Gabe von Sil und Mil zu einer gesteigerten Infarktgrößenreduktion führt.

Die Versuche wurden an 70 isolierten Wistar-Rattenherzen durchgeführt. Hierfür wurden die Herzen an eine Langendorff-Anlage angeschlossen und mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Alle Herzen durchliefen 30 Minuten Einpendelungsphase, 33 Minuten globale Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Ziel des ersten Versuchsteils war es einen konzentrationsabhängigen Effekt von Sil zu untersuchen sowie eine nicht-protektive Dosis von Mil zu identifizieren. Hierfür wurden die Herzen für jeweils 10 Minuten mit aufsteigender Dosierung Sil (0,1-1 μ M) oder mit Mil in einer Dosierung von 0,1 μ M präkonditioniert.

Im zweiten Versuchsteil wurden die beiden Phosphodiesterase-Hemmer in protektiven $(0,3\mu M$ Sil und 1 μ M Mil) und nicht-protektiven Dosierungen kombiniert. Die Kombination erfolgte sowohl mittels Gabe beider Medikamente als PC, aber auch separat – bedeutet Sil als PC und Mil als POC.

Im ersten Versuchsteil betrug die Kontrollinfarktgröße (Con) 53,8±4%. Diese wurde nicht signifikant reduziert durch die Gabe von 0,1µM Sil (49,6±14%, ns) oder 0,1µM Mil (49,3±10%, ns). 0,3µM Sil reduzierte die Infarktgröße auf 35,2±9% (p<0,05 vs. Con). Eine weitere Erhöhung der Sil Dosierung (1µM) reduzierte die Infarktgröße, führte jedoch zu keiner stärkeren Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu 0,3µM Sil (36,2±2%; p<0,05 vs. Con; ns vs. 0,3µM Sil). Im zweiten Versuchsteil betrug die Infarktgröße in der Kontrollgruppe 55,2±9%. Diese wurde signifikant reduziert durch die Applikation von 0.3μ M Sil ($34.5\pm13\%$, p < 0.05) sowie 3µM Mil (33,8±8%). Die kombinierte Gabe der protektiven Dosierungen als PC (0,3µM Sil und 3µM Mil) zeigte eine Reduktion der Infarktgröße auf 37,6±6% (p<0,05 vs. Con). Im Vergleich zu der Einzelgabe der beiden Phosphodiesterase-Hemmer konnte die Kombination jedoch die Infarktgrößenreduktion nicht verstärken (37,6±6% ns vs. 0,3 µM Sil und 3µM Mil). Die zeitlich getrennte Applikation der protektiven Dosen erreichte eine Infarktgröße von 34,1±6% (p<0,05 vs. Con). Interessanterweise führte die kombinierte Gabe der nichtprotektiven Dosen sowohl als PC $(32,5\pm6\%; p<0.05 \text{ vs. Con})$, aber auch in Kombination Sil PC und Mil POC (34,1±10%; p<0,05 vs. Con) ebenfalls zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion.

Es wurde gezeigt, dass der kardioprotektive Effekt von Sil in der PC im Sinne eines on-off-Phänomen dosisabhängig ist und nicht durch eine Konzentrationssteigerung verstärkt werden kann. Außerdem wurde demonstriert dass die kombinierte Gabe von protektiven Dosen weder in der PC noch in der Kombination PC und POC eine größere Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens bewirkt als die Einzelgabe der Substanzen. Allerdings zeigt die simultane Gabe von nicht-protektiven Konzentrationen Sil und Mil eine ebenso ausgeprägte Infarktgrößenreduktion wie durch Konditionierung mittels der protektiven Konzentrationen.

Summary

Ischemic pre- (PC) and postconditioning (POC) are strong measures preserving the heart against ischemia–reperfusion injury in experimental setting but are too invasive and impractical for clinical routine. The cardioprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning can be imitated pharmacologically, for example with the phosphodiesterase inhibitors sildenafil (Sil) and milrinone (Mil). In this study we examined whether preconditioning with Sil is concentration dependent and if the combined application of Sil and Mil leads to an increased infarct size reduction.

Experiments were performed on 70 isolated hearts of male Wistar rats mounted onto a Langendorff system and perfused with Krebs–Henseleit buffer. All hearts underwent 30 minutes of adaption period, 33 minutes global ischemia and 60 minutes of reperfusion. For determination of a concentration-dependent effect of Sil and identification of a non-protective dose of Mil, hearts were perfused with increasing concentrations of Sil (0.1–1 mM) or 0.1μ M Mil over 10 minutes before ischemia.

In a second series of experiments, hearts were treated with 0.3 mM Sil or 1 mM Mil as protective concentrations. Additionally, a combination of protective and non-protective concentrations of Sil and Mil was applied, either both as preconditioning or Sil as pre- and milrinone as postconditioning.

In the first set of experiments, the control group (Con) showed an infarct size of $53.8\pm4\%$. This was not reduced significantly by application of 0.1μ M Sil ($49.6\pm14\%$, ns) or 0.1μ M Mil ($49.3\pm10\%$, ns). 0.3μ M Sil reduced the infarct size to $35.2\pm9\%$ (p<0.05 vs. Con). A concentration of 1μ M Sil also led to an infarct size reduction; however, did not further enhance reduction of myocardial infarction compared to 0.3μ M Sil ($36.2\pm2\%$; p<0.05 vs. Con, ns vs. 0.3μ M Sil). In the second set of experiments, the control group had an infarct size of $55.2\pm9\%$. This was significantly reduced by the application of 0.3μ M Sil ($34.5\pm13\%$, p<0.05 vs. Con) as well as 3μ M Mil ($33.8\pm8\%$, p<0.05 vs. Con). The simultaneous application of the two substances in protective concentrations (0.3μ M Sil and 3μ M Mil) induced an infarct size reduction to $37.6\pm6\%$ (p<0.05 vs. Con). Compared to both PDE inhibitors given individually, a combined treatment did not further enhance infarct size reduction ($37.6\pm6\%$ ns vs. 0.3μ M Sil and 3μ M Mil). The combination of Sil as pre- and Mil as postconditioning in protective concentrations reached an infarct size reduction to $34.1\pm6\%$ (p<0.05 vs. Con). Interestingly the application of non-protective doses as PC ($32.5\pm6\%$; p<0.05 vs. Con) and also the combination Sil-PC and Mil-POC ($34.1\pm10\%$; p<0.05 vs. Con) reduced infarct size significantly.

It was shown that the cardioprotective effect of Sil is concentration dependent and cannot be enhanced by increasing concentration. Furthermore, the combined application of both substances in protective concentrations – neither as PC nor Sil-PC and Mil-POC – could reduce the ischemia-reperfusion injury any further compared to treatment with each PD inhibitor individually. However, combining non-protective doses of Sil and Mil led to an infarct size reduction comparable to conditioning with protective concentrations.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area at risk	mPTP	Mitochondriale
Aqua bidest	Aqua bidestillata		Permeabilitätstransitionspore
ATP	Adenosin-Triphosphat	MW	Mittelwert
cAMP	Zvklisches	NO	Stickstoff-Monoxid
	Adenosinmonophosphat	NP	Nicht protektiv
cGMP	Zyklisches	Р	Protektiv
	Guanosinmonophosphat	РС	Präkonditionierung
CF	Koronarfluss	PDE	Phosphodiesterase
DMSO	Dimethylsulfoxid	PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3'-
dP/dtmax	Maximale intraventrikuläre		Hydroxy-Kinase
	Druckanstiegsgeschwindigkeit	РКА	Proteinkinase A
dP/dtmin	Minimale intraventrikuläre	РКВ	Proteinkinase B
	Druckanstiegsgeschwindigkeit	РКС	Proteinkinase C
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	PKCc	Proteinkingse Co
HF	Herzfrequenz	IKCE	
HZV	Herzzeitvolumen	PKG	Proteinkinase G
КНК	Koronare Herzkrankheit	POC	Postkonditionierung
КНР	Krebs-Henseleit-Puffer	RIPC	Remote ischemic preconditioning
LVPmax	Maximaler linksventrikulärer	RISK	Reperfusion Injury Salvage
2. V 2 max	Druck		Kinase
L VP	Minimaler linksventrikulärer	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
	Druck	RPP	Rate Pressure Product
МАРК	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	SAFE	Survivor Activating Factor
mRKca	Mitochondrialer calciumsensitiver		Enhancement
IIIDIN Ca	Kaliumkanal	SGLT	Natrium-Glucose-2-Kotransporter
Mil	Milrinon	Sil	Sildenafil
тК атр	mitochondrialer ATP-sensitiver	STAT-3	Signal Transducer and Activator
	Kaliumkanal		of Transcription-3
		TNFα	Tumornekrosefaktor alpha

ттс	Triphenyltetrazoliumchlorid	ZETT	Zentrale Einrichtung für
			Tierforschung und
			wissenschaftliche
			Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ischämische Herzerkrankungen	1
1.2 Der Ischämie-Reperfusionsschaden	1
1.3 Kardioprotektion	3
1.3.1 Ischämische Konditionierung	3
1.3.2 Pharmakologische Konditionierung	4
1.3.3 Signalwege der Kardioprotektion	5
1.3.4 Transfer in die Klinik	8
1.4 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff	9
1.5 Phosphodiesteraseinhibitoren	10
1.5.1 Sildenafil	10
1.5.2 Milrinon	12
1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit	14
2. Material	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Medikamente	15
2.3 Chemikalien	16
2.4 Gase	18
2.5 Laborgeräte	19
2.6 Langendorff-Anlage	20
2.7 Verbrauchsmaterialien	22
2.8 Elektronische Datenverarbeitung	24
3. Methodik	25
3.1 Vorbereitung der Versuche	25
3.2 Aufbau der Langendorff-Anlage	26
3.3 Versuchsablauf	28
3.3.1 Versuchsteil 1: Dosisfindung	29
3.3.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon	30
3.4 Hämodynamische Auswertung	32
3.5 Ermittlung der Infarktgröße mittels TTC-Färbung	33
3.6 Statistik	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Dosisfindungsstudie	35
4.1.1 Infarktgrößen	35

4.1.2 Hämodynamik	
4.1.3 Eigenschaften der Versuchstiere	
4.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon	40
4.2.1 Infarktgrößen	40
4.2.2 Hämodynamik	41
4.2.3 Eigenschaften der Versuchstiere	44
5. Diskussion	46
5.1 Diskussion der Methodik	47
5.1.1 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff	47
5.1.2 Krebs-Henseleit Puffer	49
5.1.3 Versuchstiere und Narkose	50
5.2 Diskussion der Ergebnisse	
5.2.1 Konzentrationseffekt der Sildenafil-Präkonditionierung	
5.2.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon	53
5.2.3 Hämodynamische Veränderungen	
5.3 Limitierungen	59
5.4 Schlussfolgerungen	60
6. Literaturverzeichnis	61

1. Einleitung

1.1 Ischämische Herzerkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit 37,0% (Stand 2017, Deutschland) die führende Todesursache in der industrialisierten Welt, allen voran die ischämische oder koronare Herzkrankheit (KHK) [2]. Die Exazerbation der KHK in Form des akuten Myokardinfarktes verläuft trotz optimaler Therapie in 10% letal und resultiert bei jedem vierten Patienten in akutem Herzversagen [3]. Unabdingbar für die Therapie des akuten Myokardinfarktes ist heutzutage die frühe myokardiale Reperfusion mit Hilfe der Perkutanen Koronarintervention oder der Thrombolyse. Jegliche Form der regionalen oder globalen myokardialen Ischämie, nicht nur bei Auftreten eines akuten Myokardinfarktes, sondern zum Beispiel auch bei herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation und Herzstillstand, führt zu Schädigungen des Myokards [4]. Obwohl die frühe Reperfusion die Infarktgröße und das klinische Outcome wesentlich verbessert, vermittelt sie auch Schaden an Kardiomyozyten. Bis zu 50% des finalen Infarktes werden durch die Reperfusion selbst verursacht, sodass ihr Benefit reduziert wird [3]. Dieser Mechanismus, der als Ischämie-Reperfusionsschaden bezeichnet wird, dient vielleicht im Ansatz als Erklärung für die hohe Letalität trotz optimaler Therapie bei einem Myokardinfarkt [3].

1.2 Der Ischämie-Reperfusionsschaden

Erstmals wurde der Ischämie-Reperfusionsschaden 1973 von Hearse und Kollegen als "Sauerstoff Paradoxon" beschrieben [5, 6]. Sie beobachteten, dass die Perfusion des isolierten Rattenherzen mit hypoxischem Puffer wenig Einfluss auf das Myokard hatte, die darauffolgende Reperfusion mit sauerstoffreichem Puffer jedoch zu rapidem Zelluntergang führte [5, 6]. Die tatsächliche Bedeutung der Reperfusion am Ischämie-Reperfusionsschaden zeigt sich außerdem daran, dass Interventionen, welche erst während der Reperfusion stattfinden, wie es beispielsweise bei der ischämischen Postkonditionierung (POC) der Fall ist, in der Lage sind das Ausmaß des Infarktes signifikant zu reduzieren [7].

Die Signalwege, über die der Ischämie-Reperfusionsschaden vermittelt wird, sind noch nicht abschließend geklärt [3, 8]. Es werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen diskutiert, die dem Ischämie-Reperfusionsschaden zugrunde liegen, unter anderem das Calpain-System [8], zytosolischer und mitochondrialer Calciumüberschuss [3, 8], oxidativer Stress [3, 8] und Inflammation [3]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens abhängig ist von Dauer und Prägnanz der Ischämie sowie der nachfolgenden Reperfusion [9].

Neri und Kollegen haben den Beitrag von oxidativem Stress zum Ischämie-Reperfusionsschaden wie folgt zusammengefasst: Die durch die Ischämie induzierte Hypoxie führt zu einer reduzierten Adenosin-Triphosphat (ATP)-Synthese und einem Ungleichgewicht der Ionenpumpenfunktion. Dies resultiert wiederum in einem Überangebot an Calcium- und Natrium-Ionen, in einer Aktivierung der anaeroben Glykolyse und insgesamt in einer Ansäuerung des Gewebes. Diese Veränderungen allein führen bereits zum Zelluntergang der Kardiomyozyten. Zudem kommt es durch die wiederkehrende Sauerstoffversorgung zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), da Enzyme wie die NADPH-Oxidase und Superoxidproduzierende Enzyme in frühen Phasen der Ischämie vermehrt aktiviert und hochreguliert werden. Die ROS vermitteln wiederum Zellschaden und Zelluntergang über die Aktivierung von Metallproteinasen und Calpainen sowie über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) [8].

Die mPTP ist eine nicht-selektive Pore in der mitochondrialen Membran [3] und führt bei Öffnung zum schnellen Einstrom von Molekülen bis 1,5kDa. Dies führt wiederum über den osmotischen Druck zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und letztlich zum nekrotischen Zelltod [10]. Die Öffnung der mPTP kann zusätzlich auch über die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren indirekt zum Zelluntergang beitragen [8].

Ein weiterer Mechanismus, welcher zum Ischämie-Reperfusionsschaden führt, wird durch die F_1 - F_0 -ATPase vermittelt. Diese ist hauptverantwortlich für die ATP-Produktion in Kardiomyozyten. Für die ATP-Produktion ist jedoch ein Protonengradient entlang der inneren Mitochondrienmembran notwendig, welcher bei Sauerstoffmangel einbricht.

Dadurch kommt es bei Hypoxie statt zu einer ATP-Produktion zur Hydrolyse von ATP. Mit Beginn der Reperfusion kommt es zur Wiederaufnahme der Synthase-Aktivität der F_1 - F_0 -ATPase, das während der Ischämie aufgebaute ATP-Defizit muss aber zunächst ausgeglichen werden [11]. Hemmt man die F_1 - F_0 -Hydrolase spezifisch, so kann der Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant reduziert werden, die ATP-Speicher sind schneller wieder aufgefüllt und es kommt zu einer Reduktion der Infarktgröße [12].

1.3 Kardioprotektion

Um das Herz vor Ischämie-Reperfusionsschäden zu schützen, wurden in den vergangenen Jahren verschiedenste Strategien der Kardioprotektion entwickelt, allen voran die ischämische Präkonditionierung (PC) [13]. Aus diesem Konzept heraus wurden später die ischämische Fernkonditionierung [14] und die pharmakologische Konditionierung [15] entwickelt. Seither wurden bereits viele Signalwege der Kardioprotektion offengelegt, Interaktionen zwischen verschiedenen Signalen müssen jedoch noch weiter untersucht werden [15]. Neben den unterschiedlichen Mechanismen der Konditionierung kann diese auch nach Zeitpunkt der Applikation in Prä-, Peri- und Postkonditionierung unterschieden werden.

1.3.1 Ischämische Konditionierung

Bereits 1986 beschrieben Charles Murry und Kollegen den Effekt der ischämischen Präkonditionierung [13]. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von kurzen Phasen der subletalen Ischämie und Reperfusion, die vor einer großen globalen Ischämie stattfinden. In diesen Pionierversuchen der ischämischen Konditionierung wurde eine kardiale Ischämie *in vivo* an Hunden herbeigeführt und die Infarktgröße nach alleiniger 40-minütiger Ischämie verglichen mit der Infarktgröße nach vorheriger 4-maliger jeweils 5 Minuten langer Ischämie und Reperfusion. Die Infarktgröße der *area at risk* (AAR) konnte durch die Präkonditionierung von 29,4±4,4% auf 7,3±2,1% reduziert werden (p<0.001) [13].

Die ischämische Präkonditionierung wurde in den darauffolgenden Jahren im Detail untersucht und weiterentwickelt. Da die ischämische PC in der Praxis nur bei antizipierten Ischämien Anwendung finden kann, untersuchten Zhao et al., ob eine ischämische Konditionierung während der frühen Reperfusion. also als Postkonditionierung (POC) ebenfalls kardioprotektiv wirkt und verglichen die ischämische POC mit der ischämischen PC. Sie kamen zu dem Schluss, dass die POC eine vergleichbar große Infarktgrößenreduktion erreicht wie die PC (Con 25±3%, PC 15±2%, p<0,05 vs. Con; POC 14±2%, p<0,05 vs. Con) [16]. Außerdem zeigte die ischämische Konditionierung nicht nur im Hundemodell eine signifikante Infarktgrößenreduktion, sondern unter anderem auch bei Ratten [17], Schweinen [18] und Schafen [19] in *in vivo* sowie *in vitro* Versuchen [17].

Nicht nur im Tiermodell, sondern auch am menschlichen Herzen wirkt die ischämische Prä- und Postkonditionierung kardioprotektiv [3]. Ischämische PC durch *Cross-Clamping* der Aorta vor einem Koronararterien-Bypass konnte den ATP-Verbrauch während der Ischämie signifikant verringern [20]. Nachteil dieser Methode ist jedoch die hohe Invasivität des *Cross-Clamping*.

Um diese Invasivität im klinischen Umfeld zu verhindern, wurde ein weiterer kardioprotektiver Mechanismus aus der ischämischen Präkonditionierung entwickelt, nämlich die ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC). Hierbei wird die Blutzufuhr nicht direkt am Zielorgan sondern weiter entfernt, beispielsweise an einer Extremität mehrfach kurzzeitig unterbunden. Diese Methodik zeigte sich sowohl als Präkonditionierung und als Peri- sowie Postkonditionierung wirksam [21, 22].

1.3.2 Pharmakologische Konditionierung

Bis heute wird versucht, pharmakologische Substanzen zu finden, die in bereits identifizierte Signalwege der ischämischen Konditionierung eingreifen und synergistisch wirken, um so eine Infarktgrößenreduktion zu erreichen.

Als eine der ersten Zielstrukturen identifizierten Liu *et al.* 1991 Adenosin A₁ [23] und kurze Zeit später den Angiotensin II Rezeptor [24]. Des Weiteren wurden unter anderem

Bradykinin [25] und Opioid-Rezeptoren [26] als mögliche Angriffspunkte der pharmakologischen Konditionierung identifiziert. Bereits 1997 wurde den inhalativen Anästhetika Halothan, Enfluran und Isofluran präkonditionierende Eigenschaften zugeschrieben [27], einige Jahre später wurde für Isofluran auch ein protektiver Effekt in der Postkonditionierung entdeckt [28]. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an Medikamenten identifiziert, die zumindest im experimentellen Umfeld kardioprotektiv wirken, zum Beispiel die Thrombozytenaggregationshemmer Ticagrelor und Cangrelor [29], Levosimendan [30], Ramelteon [31] und Simvastatin [32].

Eine weitere Gruppe von Pharmazeutika die kardioprotektiv wirksam sind, sind die Phosphodiesterasehemmer (PDE). Kardioprotektive Effekte wurden unter anderem für die Wirkstoffe Sildenafil (Sil) [33], Tadalafil [34], Vardenafil [35], Milrinon (Mil) [36] und Amrinon [37] beschrieben.

Für einige bereits für andere Indikationen etablierte Medikamente wurde sogar im klinischen Umfeld eine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen. So konnten beispielsweise die Natrium-Glucose-2-Kotransporter (SGLT2) Inhibitoren Dapagliflozin und Empagliflozin die Rate an Hospitalisierung wegen akuter Herzinsuffizienz und kardiovaskulären Todesfällen bei Diabetikern sowie nicht-Diabetikern signifikant reduzieren [38].

Dies sind nur einige Beispiele für Pharmaka, bei denen bereits kardioprotektive Eigenschaften gezeigt wurden. Sie verdeutlichen, mit welcher Intensität geforscht wird, um die myokardiale Protektion durch Konditionierung auch im klinischen Umfeld möglich zu machen.

1.3.3 Signalwege der Kardioprotektion

Für die ischämische und pharmakologische Konditionierung wurden in der Literatur bereits über 100 Signalmoleküle und Signalwege in verschiedenen experimentellen Studien identifiziert [39]. Als eine der ersten Komponenten der Signalkaskade wurde die Proteinkinase C (PKC) beschrieben [15, 24], von welcher viele Isoformen in Kardiomyozyten co-exprimiert werden [40]. Nuñez et al. konnten zeigen, dass die ischämische Präkonditionierung über den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT₁R) und eine Proteinkinase Cε (PKCε)-abhängige Hemmung der mPTP vermittelt wird [41]. Es wird vermutet, dass die kardioprotektiven Signalkaskaden der PKC auch durch die Phosphatidyl-Inositol-3'-Hydroxy-Kinase (PI3K) aktiviert werden können [15, 42].

Ein Signalweg, welcher als essenziell für die Kardioprotektion verschiedener Interventionen und Medikamente identifiziert wurde, ist der Reperfusion Injury Salvage *Kinase* (RISK) Signalweg [7], an welchem die PI3K durch die direkte Aktivierung des Akt Protoonkogens [43] beteiligt ist. Weiterhin beteiligt ist auch die p42/p44 extrasignal-regulated Kinase (Erk 1/2). Beide Kinasen werden durch cellular Phosphorylierung aktiviert [21]. Daraus resultiert eine erhöhte Calcium-Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum [44] und die Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege [45]. Sie aktivieren damit eine Art des programmierten Zellüberlebens [3] und schützen Kardiomyozyten vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden [7]. Ebenso interagiert die PI3K mit der Proteinkinase B (PKB). Die hieraus resultierende Kardioprotektion wird vermittelt durch einen Anstieg des intrazellulären Stickstoffmonoxid (NO)-Levels in den Kardiomyozyten [15]. Ein weiterer Signalweg, welcher als Bestandteil der Kardioprotektion durch ischämische Konditionierung identifiziert wurde, ist der Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) Signalweg, welcher über eine Aktivierung des Tumornekrosefaktors α (TNF α) sowie des Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT) dem Ischämie-Reperfusionsschaden entgegen wirkt [46]. Sowohl der RISK, als auch der SAFE Signalweg scheinen eine gemeinsame Endstrecke im Mitochondrium zu haben, wo sie über eine Hemmung der mPTP den damit einhergehenden Zelluntergang der Kardiomyozyten verhindern [47, 48]. Trotz dieser gemeinsamen Endstrecke ist es möglich, beide Signalwege getrennt voneinander zu aktivieren [49].

Als weiterer Mediator der ischämischen und pharmakologischen Konditionierung die verschiedenen mitochondrialen Kaliumkanäle, insbesondere wurden der mitochondriale ATP-abhängige (mKATP) und calciumabhängige (mBK_{Ca}) Kaliumkanal identifiziert. Die Öffnung führt des **mK**ATP zur Depolarisation der Mitochondrienmembran, verlangsamter ATP-Produktion, beschleunigter Zellatmung, Freisetzung von akkumuliertem Calcium, Zellschwellung und Stimulation des Ausstroms von Intermembranproteinen [50]. Außerdem kommt es zu einem Anstieg der ROS-Produktion, wodurch die mitochondriale Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ) aktiviert wird. Diese wiederum hemmt die mPTP, sodass der Zelluntergang reduziert wird [51]. Der mKATP ist nicht nur Zielstruktur der PKCɛ, sondern auch der Proteinkinase G (PKG) [15]. Neben der PKC und PKB wurden auch die Proteinkinasen A (PKA) und G als Bestandteil von kardioprotektiven Signalwegen dargelegt [52, 53].

Insbesondere die Aktivierung von mBK_{Ca} wurde als essenziell für kardioprotektive Signalwege beschrieben [54]. Der mBK_{Ca} hat eine hohe Leitfähigkeit und findet sich in Kardiomyozyten der Koronargefäße [55, 56], wo er unter anderem für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich ist [56].



Kardiomyozyt

Abb. 1: Signalwege der Kardioprotektion

Dargestellt sind vereinfacht die Signalwege der Kardioprotektion im Kardiomyozyten. Im RISK Signalweg werden unspezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) durch kardioprotektive Stimuli aktiviert und führt letztlich zu einer Hemmung der mPTP und Aktivierung der mK_{ATP} sowie mBK_{Ca}. Im SAFE Signalweg konnten bereits die Rezeptoren gp 130 sowie der TNF- α Rezeptor TNF-R2 identifiziert werden, welche letztendlich zu einer Hemmung der mPTP führen (modifiziert nach [57]).

1.3.4 Transfer in die Klinik

Viele der identifizierten kardioprotektiven Interventionen zeigten im experimentellen Setting vielversprechende Ergebnisse. In größer angelegten klinischen Studien blieben diese Vorteile bei Applikation von entsprechenden Medikamenten oder Regimen jedoch aus [58]. Hierfür werden vielfältige Gründe diskutiert, wie beispielsweise der Einfluss von Anästhesieverfahren auf kardioprotektive Effekte. In diesem Kontext wurde die RIPheart Studie durchgeführt, eine prospektive doppel-verblindete Multicenterstudie, welche RIPC vor elektiven kardiochirurgischen Operationen mit einer Sham-Intervention verglich. Bei dieser Studie konnten keine Vorteile bezüglich der Mortalität, dem Auftreten von Myokardinfarkten, Schlaganfällen oder akutem Nierenversagen bis zur Entlassung durch RIPC nachgewiesen werden [59]. In einer zweiten Analyse der RIPheart Studie zeigten die Autoren, dass die erwartete humorale Antwort auf den Stimulus RIPC unter Propofol-Narkose ausblieb. Daraus schlossen sie, dass Propofol die Kardioprotektion von RIPC blockiert [60]. Diese Hypothese wird außerdem dadurch gestützt, dass Kottenberg et al. im direkten Vergleich zeigen konnten, dass RIPC vor herzchirurgischen Eingriffen mit Isofluran-Narkose in der Lage ist, den myokardialen Schaden zu begrenzen, während dieser Effekt bei einer totalen intravenösen Anästhesie mit Propofol ausblieb [61]. Ein weiterer wichtiger Umstand, der für die schlechte Übertragbarkeit der verschiedenen kardioprotektiven Mechanismen in die Klinik verantwortlich gemacht wird, ist die Differenz zwischen dem Alter der Versuchstiere und dem Patientenalter. Mit fortschreitendem Alter steigen sowohl Morbidität als auch Mortalität des akuten Myokardinfarktes [62], sodass ältere Patienten besonders stark von kardioprotektiven Strategien im klinischen Alltag profitieren würden. Im Gegensatz hierzu werden experimentelle Studien zu kardioprotektiven Signalwegen jedoch in der Regel an jungen gesunden Versuchstieren durchgeführt. Bereits 1996 konnten Abete et al. zeigen, dass die ischämische Präkonditionierung zwar einen positiven Effekt auf die postischämische myokardiale Dysfunktion von jungen Rattenherzen (6 Monate alt) hat, dieser Effekt bei alten Rattenherzen (24 Monate alt) jedoch ausbleibt [63]. Ebenso zeigte auch RIPC keine Infarktgrößenreduktion im gealterten Rattenherz [64]. Verantwortlich für die ausbleibenden protektiven Effekte scheinen unter anderem eine fehlende Hemmung der mPTP-Öffnung in alternden Herzen [65] sowie altersabhängige Unterschiede in Spiegeln von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und PKA-

Aktivität zu sein [66]. Weitere Faktoren, die für den schwierigen Transfer der Kardioprotektion in den klinischen Alltag vermutet werden, sind unter anderem fehlende Komorbiditäten und Komedikationen im Tierversuch [67] sowie Geschlecht [68] und Adipositas [67].

Ein möglicher Ansatz, um kardioprotektive Effekte auch in das klinische Umfeld zu übertragen, ist die Kombination mehrerer Konditionierungsstrategien [67], welche ihre Kardioprotektion eventuell auch über verschiedene Zielstrukturen vermitteln [3].

1.4 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

Eine der "am meisten benutzten und zitierten experimentellen Methoden […] im Bereich der physiologischen, pharmakologischen und klinischen Forschung" ist das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff [69]. Diese Methode ermöglicht die isolierte Betrachtung des Säugetierherzen ex vivo. Das Herz wird hierbei retrograd über die Aorta perfundiert. Durch den Perfusionsdruck kommt es zum Verschluss der Aortenklappe und somit zur Perfusion der oberhalb liegenden Koronargefäße. Dadurch bleibt der linke Ventrikel leer, nur im rechten Ventrikel sammelt sich Perfusat und das Myokard wird adäquat versorgt. Über den sinus coronarius kann das Effluat anschließend wieder abfließen. Bei unbeschädigtem Erregungsleitungssystem und Verwendung eines geeigneten Perfusats kommt es zur Wiederaufnahme der Kontraktion des Myokards [69]. Die zur Perfusion nötigen Bedingungen definierte Oskar Langendorff bereits 1895: Die Perfusion sollte mit einem gleichmäßigen Druck geschehen und das Perfusat eine gleichbleibende Temperatur aufweisen. Außerdem müsse der Versuch in einem entsprechend temperierten Raum stattfinden und das Herz vor Austrocknung geschützt werden [70]. Zur Erfassung des linksventrikulären Druckes wird heutzutage in der Regel ein Ballonkatheter über das linke Herzohr eingeführt [69]. Idealerweise findet die Perfusion mit Blut des entsprechenden Tieres statt, eine ebenso etablierte Methode ist jedoch die Perfusion des Herzen mit modifizierter Ringer-Lösung, wie zum Beispiel Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) [69].

1.5 Phosphodiesteraseinhibitoren

Phosphodiesterasen sind Zink- und Magnesium-abhängige Hydrolasen [71], die zyklische Nukleosidmonophosphat (cAMP und zyklisches Guanosimonophosphat (cGMP)) zu Nukleosiden (Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP)) abbauen. Aktuell sind mindestens 11 Isoenzyme der PDE bekannt [72], die sich sowohl in ihren enzymatischen Eigenschaften als auch in ihrem pharmakologischen Profil unterscheiden [73]. In dieser Arbeit sind die Phosphodiesterasen PDE III und PDE V von besonderer Bedeutung. Die PDE III ist cAMP spezifisch und wird durch cGMP inhibiert. Sie ist in Herz-, Lungen-, Leber- und Fettgewebe sowie in Thrombozyten und inflammatorischen Zellen exprimiert [72]. Außerdem ist die PDE III an der Regulation der Insulin- und Leptin-Sekretion beteiligt [73]. Die cGMP-spezifische PDE V findet man in Lungengewebe, Thrombozyten und vaskulären glatten Muskelzellen, unter anderem im *Corpus Cavernosus* [72].

Inhibitoren der Phosphodiesterasen finden aufgrund ihres hämodynamischen Wirkprofils insbesondere in der Intensivmedizin eine breite Anwendung. Sie erhöhen das Herzzeitvolumen (HZV) und die intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt) [74], ohne über β -adrenerge Rezeptoren zu wirken [75]. Außerdem senken sie den systemischen und pulmonalen vaskulären Widerstand, ohne großen Einfluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch zu haben [74]. Die klinische Anwendbarkeit von Phosphodiesteraseinhibitoren als kardioprotektive Substanzen ist bisher jedoch wenig erforscht.

1.5.1 Sildenafil

Ein spezifischer Hemmstoff der PDE V ist Sildenafil. Es wurde 1998 vom USamerikanischen Pharmakonzern Pfizer unter dem Namen Viagra® als Therapeutikum bei erektiler Dysfunktion auf den Markt gebracht [76]. Sil findet außerdem Anwendung bei milder bis moderater pulmonaler Hypertension [77]. Diese Einsatzgebiete erklären sich durch die Lokalisation der PDE V im *Corpus Cavernosum* und in den glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße. Durch ihre Hemmung kommt es zu einem erhöhten cGMP-Spiegel, wodurch die PKG stimuliert wird. Diese wiederum initiiert eine Protein-Phosphorylierungs-Kaskade und resultiert in einem Abfall der intrazellulären Ionenkonzentrationen, was schließlich zu einer Dilatation der Arterien führt [71].

Der kardioprotektive Effekt von Sil wurde erstmals 2002 von Ramzi Ockaili und Kollegen im Kaninchen-Modell gezeigt. Sie applizierten den Tieren entweder 30 Minuten (akute Phase) oder 24 Stunden (verzögerte Phase) vor einer 30-minütigen Ischämie 0,7 mg pro Kilogramm Körpergewicht Sildenafil-Citrat intravenös und ließen darauf 3 Stunden der Reperfusion folgen. Die Autoren konnten zeigen, dass Sil die Infarktgröße von 33,8% in der Kontrollgruppe auf 10,8% in der akuten Phase Gruppe und auf 19,9% in der verzögerten Phase Gruppe reduziert. Außerdem wurden ähnliche Effekte bei oraler Applikation von Sil beobachtet. Eine Kardioprotektion durch Sildenafil wird auf die Öffnung des mK_{ATP} zurückgeführt, da die Applikation des mK_{ATP}-Blockers 5-Hydroxydecanoat die Infarktreduktion vollständig aufhebt [78]. Ebenso wurde auch bei der Postkonditionierung mit Sil eine Kardioprotektion beobachtet. Auch hier konnte die Beteiligung des mK_{ATP}-Kanals an der Infarktgrößenreduktion gezeigt werden [35]. Außerdem wurde eine Induktion von NO-Synthase-Isoformen, insbesondere der induzierbaren NO-Synthase, als essenzielle Komponente des Signalweges der Kardioprotektion von Sil herausgearbeitet [79].

Neben der Beteiligung der mK_{ATP} Kanäle konnte später auch ein Einfluss der mBK_{Ca} Kanäle gezeigt werden [33]. Im isolierten Rattenherz wurde eine Infarktreduktion um 17% bei Applikation von Sil in einer Konzentration von 3 μ M gezeigt. Dieser kardioprotektive Effekt wurde aufgehoben, wenn durch Gabe von Paxilline (1 μ M) der mBK_{Ca}-Kanal geblockt wurde. Auch die Blockierung der PKG mittels KT5823 führte zu einer Aufhebung der Sil-induzierten Kardioprotektion. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Applikation von Sil über die Aktivierung der PKG und die Öffnung des mBK_{Ca}-Kanals kardioprotektiv wirkt [33] (siehe Abb. 2).

Bisher fehlen jedoch große klinische Studien zur Untersuchung der kardioprotektiven Effekte von Sil am Menschen. In einer kleinen Kohorte aus 39 Kindern, bei denen ein Ventrikelseptumdefekt operativ verschlossen wurde, zeigte die präoperative Applikation von Sil keinen verringerten myokardialen Schaden [80].

1.5.2 Milrinon

Aufgrund der vermehrten Expression der PDE III in den Atemwegen und dem Herz-Kreislauf-System wurde sie schon früh als möglicher Angriffspunkt zur Therapie von asthmatischen und kardiovaskulären Erkrankungen erkannt [72]. Ein spezifischer Hemmstoff der PDE III ist Milrinon. Es ist ein Bipyridin Derivat und verursacht über eine Hemmung der PDE III ein Anfluten von cAMP im Myokard [75]. Hierdurch werden die cAMP-abhängige PKA und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) phosphoryliert und die Konzentration an intrazellulärem Calcium steigt [81]. Außerdem erhöht Mil die Calciumsensitivität von kontraktilen Zellen [74].

Mil wird zur Therapie der schweren Herzinsuffizienz aufgrund seiner zwei Hauptwirkungen im kardiovaskulären System eingesetzt: Vasodilatation und Inotropie [82]. Es wirkt 15 bis 30 Mal stärker positiv inotrop als Amrinon [74] und unabhängig von β -adrenergen Rezeptoren. Somit ist es sowohl bei vorheriger β -Rezeptor Blockade als auch bei herab regulierten β -Rezeptoren wirksam, wie es bei der Herzinsuffizienz meist der Fall ist [74]. Durch die PDE-III-Inhibition kommt es außerdem zu einem erhöhten HZV und die intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit steigt [8]. Mil senkt zudem den systemischen und pulmonalen vaskulären Widerstand, ohne den myokardialen Sauerstoffverbrauch zu erhöhen [9].

Die kardioprotektiven Eigenschaften von Mil wurden erstmals 2001 von Shoji Sanada und Kollegen im Hundemodell beschrieben. Die Autoren legten dar, dass die Präkonditionierung mittels Olprinon und Mil über die Aktivierung der PKA zur Infarktgrößenreduktion führt [81]. Ebenso wird der kardioprotektive Effekt von Mil durch darauffolgende p38 MAPK Aktivierung vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei spezifischer Hemmung der p38 MAPK durch SB203580 keine Infarktgrößenreduktion eintritt [81].

Dieser kardioprotektive Effekt wurde später im Langendorff-Modell an isolierten Rattenherzen bestätigt. Sowohl die Präkonditionierung [36] als auch die Postkonditionierung [83] zeigten eine signifikante Infarktgrößenreduktion. Milinduzierte Postkonditionierung zeigt einen Konzentrations-abhängigen Effekt und wird unter anderem über die Öffnung des mBK_{Ca} vermittelt. Eine Konzentration von 1 μ M Mil als Postkonditionierung zeigte eine signifikante Infarktgrößenreduktion. Dieser Effekt

12

konnte jedoch weder durch niedrigere noch durch höhere Konzentrationen verstärkt werden. Es wurde gezeigt, dass die selektive Blockade des mBK_{Ca} durch Paxilline die Infarktreduktion durch Mil vollständig aufhebt [83]. Der mBK_{Ca} wird zu Teilen von der PKA21 reguliert und hat somit einen gemeinsamen Signalweg mit Mil. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Mil-induzierte Kardioprotektion über eine Hochregulation der PKA und anschließende Öffnung der mBK_{Ca} Kanäle [83] vermittelt wird (siehe Abb. 2)

Die Organprotektion von Mil wurde nicht nur für das Myokard gezeigt, sondern unter anderem auch für Leber [84], Niere [85] und Gehirn [86]. Studienergebnisse, die die Übertragung des kardioprotektiven Effekts von Milrinon in die Klinik zeigen, liegen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vor.



Abb. 2: Signalwege der Sil- und Mil- vermittelten Kardioprotektion

Sildenafil hemmt die PDE V, wodurch es zu einem Konzentrationsanstieg des cGMPs und einer anschließenden Zunahme der PKG-Aktivität kommt. Milrinon hemmt hingegen die PDE III, wodurch die Konzentration von cAMP und die Aktivität der PKA ansteigen. Beide Proteinkinasen führen schließlich über eine gemeinsame Endstrecke zu einer Öffnung des mBK_{Ca} und hierüber zu einer Infarktgrößenreduktion.

1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Myokardinfarkte haben trotz verbesserter Therapie und frühen Reperfusionsstrategien noch heute eine hohe Letalität [3]. Um den Ischämie-Reperfusionsschaden zu vermindern, müssen Strategien wie die pharmakologische Konditionierung Einzug in die Klinik erhalten. Hierbei sind Substanzen zu bevorzugen, welche bereits im klinischen Setting etabliert sind. Sowohl Sil als auch Mil werden routinemäßig in der Therapie der pulmonalen Hypertonie und schweren Herzinsuffizienz im perioperativen und intensivmedizinischen Setting angewendet. In Tierversuchen wurden die dosisabhängigen kardioprotektiven Eigenschaften von Mil als Prä- [36, 81] und Postkonditionierung [83] bereits in einigen Vorstudien nachgewiesen [33, 87]. Bisher gibt es jedoch keine Studien dazu, ob Sil einen dosis-abhängigen Effekt hat. Deshalb lautet die Fragestellung des ersten Versuchsteiles:

Hat Sildenafil in der Präkonditionierung einen dosis-abhängigen kardioprotektiven Effekt und welche ist die niedrigste kardioprotektive Konzentration von Sildenafil?

Da im klinischen Setting Phosphodiesterase-Hemmer routinemäßig in Kombination appliziert werden, insbesondere auch bei Patienten, die Sil bereits in der oralen Prämedikation einnehmen, wurden im zweiten Versuchsteil folgende Fragen untersucht:

Gibt es einen additiven Effekt bei der kombinierten Gabe von Sildenafil und Milrinon?

Ist der kardioprotektive Effekt bei der kombinierten Gabe von nicht-protektiven Dosen Sildenafil und Milrinon als Prä- und / oder Postkonditionierung vergleichbar mit dem Effekt bei Gabe von protektiven Dosen?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde das isolierte Langendorff-Modell eingesetzt. Im ersten Versuchsteil wurde eine Dosisfindungsstudie für Sil durchgeführt sowie eine nicht-protektive Mil-Dosis untersucht. Anschließend wurden im zweiten Versuchsteil die bekannten protektiven und nicht-protektiven Konzentrationen von Sil und Mil als Prä- und / oder Postkonditionierung miteinander kombiniert.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Die Herzentnahme wurde bei insgesamt 70 männlichen Wistar Ratten im Alter von zwei bis drei Monaten durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Versuche 250g bis 350g wogen. Bis zum Versuchstag wurde den Versuchstieren mindestens 8 Tage Akklimatisierungszeit in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben Düsseldorf (ZETT, Leiter: Prof. Dr. Sager) gewährt, dort wurde ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten. Sie erhielten Alleinfuttermittel für Mäuse-Zucht (sniff Spezialdiäten GmbH, Soest Deutschland) und keimfreies, angesäuertes Wasser (pH 2,6-3,0) ad libitum. Die Haltung erfolgte in Kleintierkäfigen mit maximal vier Tieren, die mit Cosypet® Unterstreu für Kleintiere ausgestreut waren und täglich gereinigt wurden. Nur Tiere, die keine Krankheitsanzeichen zeigten, wurden für die Versuche verwendet. Die Tierhaltung unterlag den gesetzlichen Vorgaben der Europäischen Union, die Einhaltung dieser Vorgaben wurde durch die Tierschutzbeauftragten der ZETT überwacht. Unter der Projektnummer O27/12 (05/2012) lag eine Genehmigung zur Organentnahme der ZETT vor.

2.2 Medikamente

Heparin-Natrium	25.000 I.E./ml
	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
	Deutschland
	Artikelnr.: 2047217
Milrinon	Bio-Techne GmbH
	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
	Artikelnr.: 1504
	Molekulargewicht: 215,73 g/mol
	$Summen formel: C_{12}H_9N_3O_{1/4}H_2O$

Pentobarbital-Natrium	16g/100ml
	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH &
	Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
	Artikelnr. 798-594
Sildenafilcitratsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,
	Deutschland
	Artikelnr.: PZ0003
	Molekulargewicht: 666,70 g/mol
	Summenformel: C22H30N6O4S C6H8O7

2.3 Chemikalien

Calciumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt,
	Deutschland
	Artikelnr. 1023780500
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
	Deutschland
	Artikelnr. A997.2
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
	Deutschland
	Artikelnr.: D8418
	Molekulargewicht: 78,13 g/mol
	Summenformel: (CH ₃) ₂ SO
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
	Deutschland
	Artikelnr. 8040.3
Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Artikelnr.: 1040022500

Kaliumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr. 1049360500
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr. 104873
L(+)-Natriumlactate	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr. A1004.0100
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr. P027.1
NaCl 0,9%	Isotonische Kochsalzlösung 500ml Plastipur Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland Artikelnr.: B23042A
Natriumchlorid	VWR Chemicals Internationals GmbH, Leuven, Belgien Artikelnr. 27810.295
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr. 8551.1
Pufferlösung pH 4.01	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland Artikelnr.: 108700
Pufferlösung pH 7.00±0.02	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: P713.1

Salzsäure 25%	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt,
	Deutschland
	Artikelnr.: 1000321Z324416
Triphenyltetrazoliumchlorid	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride
	SERVA Electrophoresis GmbH,
	Heidelberg, Deutschland
	Artikelnummer: 37130.02
	Summenformel: C ₁₉ H ₁₅ C ₁ N ₄
	Molekulargewicht: 334.79
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
	Deutschland
	Artikelnr.: 5429.3
	Summenformel: C ₄ H ₁₁ NO ₃
	Molekulargewicht: 121,14 g/mol

2.4 Gase

Carbogen	Carbogen Lab
	5% Kohlendioxid (CO ₂), 95% Sauerstoff
	(O ₂)
	Linde AG, Pullach, Deutschland
Stickstoff	Stickstoff 5.0
	Reinheit ≥99,999%
	Linde AG, Pullach, Deutschland

2.5 Laborgeräte

Blutgasanalyse-Gerät	ABL 800 Flex Plus Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland Artikelnr.: 989-963
Digitalthermometer	<i>GTH 1160 Digitalthermometer</i> Greisinger electronic
Laborwaage	<i>Scout Pro SPU202</i> Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA Artikelnr.: 10162802
Magnet-Heizrührer	<i>MR Hei-Tec</i> Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland Artikelnr.: HEID_10002
pH-Meter	<i>Digital pH-Meter 646</i> Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland Artikelnr.: 162222028856
pH-Meter-Sensor	<i>In-Lab</i> ® <i>Expert pro-ISM</i> Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland Artikelnr.: 30014096
Präzisionswaagen	<i>LA 230S Analysenwaage</i> Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Artikelnr.: 33313 <i>KERN 440-45N</i> KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland

2.6 Langendorff-Anlage

Aortenkanüle	Aortic Metal Cannula with Luer Taper for Small Rat Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA Artikelnr.: 73-2868 Außendurchmesser 2,0mm
Aufsatz für Schlauchpumpe	Pump Head, R2 Two Channel Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland Artikelnr.: F117949
Bulldogklemme	Bulldogklemme gerade, Maullänge 12mm Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland Artikelnr.: BH020R
Druckaufnehmer	<i>BP Transducer/ Cable Kit</i> AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich Artikelnr.: MLT1199
Druckeichgerät	<i>Druckeichgerät (auch für Tipkatheter)</i> Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland Type 367, Seriennr.: 97110
Glaswaren	Duran® Protect Laborflasche 5000ml DWK Life Sciences GmbH, Wertheim am Main, Deutschland Artikelnr.: 218057357 Duran® Original Laborflasche 2000ml DWK Life Sciences GmbH, Wertheim am Main, Deutschland Artikelnr.: 218016357 Duran® Original Laborflasche 500ml
	Durante Originai Ladorflasche 300ml

	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim am	
	Main, Deutschland	
	Artikelnr.: 218014459	
Heizspirale	Handgeblasen	
Infusionspumpen	Perfusor [®] Space	
	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,	
	Deutschland	
	Artikelnr.: 8713030	
	Perfusor®fm	
	B. Braun Melsungen AG, Melsungen,	
	Deutschland	
	Artikelnr.: 8713820	
Kleintierguillotine	UGO BASILE S.R.L., Biological Research	
	Apparatus, Comerio VA, Italien, Modell	
	7950, Serien-Nr.: 04501212070	
Luftfänger	Handgeblasen	
Luftfänger Metalldreiwegehahn	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL-	
Luftfänger Metalldreiwegehahn	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen	
Luftfänger Metalldreiwegehahn	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg,	
Luftfänger Metalldreiwegehahn	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland	
Luftfänger Metalldreiwegehahn	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 TYGON, Flexible Plastic Tubing	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 TYGON, Flexible Plastic Tubing Innendurchmesser: 6,0mm,	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 TYGON, Flexible Plastic Tubing Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny,	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: ACF1S1504-C	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: ACF1S1504-C <i>Tube VERSILIC 5x8mm</i>	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: ACF1S1504-C <i>Tube VERSILIC 5x8mm</i> Innendurchmesser: 5,0mm,	
Luftfänger Metalldreiwegehahn Perfusatschläuche	Handgeblasen NeoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL- Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286 <i>TYGON, Flexible Plastic Tubing</i> Innendurchmesser: 6,0mm, Außendurchmesser: 9,0mm, Dicke 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: ACF1S1504-C <i>Tube VERSILIC 5x8mm</i> Innendurchmesser: 5,0mm, Außendurchmesser: 8,0mm, Dicke: 1,5mm	

	Frankreich
	Artikelnr.: 760420-10
Schlauch für Schlauchpumpe	Tubing, 3.18mm Innendurchmesser, PVC,
	Black/White
	Gilson International B.V., Limburg an der
	Lahn, Deutschland
	Artikelnr.: F117949
Schlauchpumpe	Minipuls 3 Peristaltic Pumps
	Gilson International B.V., Limburg an der
	Lahn, Deutschland
	Artikelnr.: GFAM00051
Umwälzthermostat	Julabo ME-6
	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach,
	Deutschland
	Artikelnr.: 9162506
Wärmeschild	Handgeblasen
Wasserbad	GFL Wasserbad Typ 1001
	Gesellschaft für Labortechnik GmbH &
	Co., Burgwedel, Deutschland
	Artikelnr.: 10386177
Umwälzthermostat	Julabo EC-5
	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach,
	Deutschland

2.7 Verbrauchsmaterialien

Dreiwegehahn

Discofix® C B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 16494 C

Fäden	Nicht resorbierbare Polyesterfäden, für den Veterinärmedizinischen Gebrauch Resorba, Nürnberg, Deutschland Artikelnr.: 3252321
Kanülen	 Sterican® Einmalkanülen Gr. 1 Durchmesser: 0,9mm, Länge: 40mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4657519 Sterican® Einmalkanülen Gr. 14 Durchmesser 0,6mm, Länge: 30mm B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4657640
Perfusorleitung	Original Perfusor® Line, Type IV- Standard-PE B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Innendurchmesser: 1,0mm, Länge: 150cm Artikelnr.: 8722935
Skalpell	Skalpellgriff, 135mm, Nr. 4, unsteril, wiederverwendbar B. Braun AESCULAP AG, Tuttlingen, Deutschland Artikelnr.: BB084R <i>Carbon Steel Skalpellklingen #21</i> B. Braun AESCULAP AG, Tuttlingen, Deutschland Artikelnr.: BB521

2.8 Elektronische Datenverarbeitung

Brückenverstärker	Bridge Amp
	AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes
	Königreich
	Artikelnr.: FE221-1255
	Bridge Amp
	AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes
	Königreich
	Artikelnr.: 5480
LabChart 8	AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes
	Königreich
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation, Redmond, WA,
	USA
PowerLab	PowerLab 4/26
	AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes
	Königreich
	PowerLab 8/30
	AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes
	Königreich
Flachbettscanner	CanoScan LiDE700F, Canon, Krefeld,
	Deutschland
Planimetrie-Software	Sigma Scan Pro 5, Systat Software GmbH,
	Erkrath, Deutschland

3. Methodik

3.1 Vorbereitung der Versuche

An jedem Versuchstag wurde zunächst der zur Perfusion notwendige modifizierte KHP in 51 *Aqua bidestillata (Aqua bidest)* angesetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 1). Die richtige Zusammensetzung des Puffers wurde vor jedem Versuch mit Hilfe einer Blutgasanalyse (ABL 800 Flex Plus, Radiometer, Krefeld, Deutschland) überprüft, sowohl im kalten Zustand als auch nach Erhitzung auf 37°C und Begasung mit Carbogen (Blutgasanalyse-Ergebnisse siehe Tabelle 2). Die Langendorff-Anlage wurde vor Versuchsbeginn kalibriert, hierfür wurde der Druckaufnehmer zunächst auf den Umgebungsluftdruck als Nullpunkt geeicht und dann mit einem Druck-Eichgerät nach GAUER (Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) zweipunktkalibriert. Im Anschluss daran wurde die Anlage mit KHP befüllt und mittels einer 20ml Spritze (Omnifix® Luer Solo 20ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vollständig entlüftet.

Vor Aufnahme der Versuche wurden Sil und Mil zunächst in ihrem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und eine Grundlösung angelegt. Diese Lösung wurde dann unmittelbar vor Beginn eines Versuches mit KHP verdünnt, bis die erforderlichen Konzentrationen erreicht wurden, sodass die Konzentration von DMSO am Herzen in allen Versuchen maximal 0,06% betrug..

			Menge auf 5l
Wirkstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Molarität [mM]	Aqua bidest [g]
Natriumchlorid	58,44	118	34,48
Kaliumchlorid	74,55	4,7	1,751
Magnesiumsulfat Heptahydrat	246,48	1,2	1,479
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	1,2	0,817
Natriumhydrogencarbonat	84,01	25	10,501
Ethylendiamintetraessigsäure	292,2	0,5	0,731
D(+)-Glucose	180,19	11	9,909
L(+)-Natriumlactate	112,1	1	0,561
Calciumchlorid	110,99	2,25	1,249

Tabelle 1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers

	Kalter Puffer	Warmer begaster Puffer
pН	7,1 ±0,05	7,4
\mathbf{K}^+	5,7 mmol/l	5,7 mmol/l
Na ⁺	140 mmol/l	140 mmol/l
Ca ²⁺	1,44±0,05 mmol/l	1,33 mmol/l
Cl ⁻	115±2 mmol/l	112 mmol/l
pCO ₂	>40 mmHg	<40 mmHg
Glukose	200 mg/dl	200 mg/dl
Laktat	1 mg/dl	1mg/dl

Tabelle 2: Blutgasanalyse des Krebs-Henseleit-Puffers

3.2 Aufbau der Langendorff-Anlage

Der Puffer wurde in einem Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Burgwedel, Deutschland) auf 37°C erhitzt und mit Carbogen (95% O2, 5% CO2, Linde AG, Pullach) begast, um eine kontinuierliche Oxygenierung sicher zu stellen und einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Das Perfusat wurde von einer Rollenpumpe (Minipuls 3 Peristaltic Pumps, Gilson International B.V., Limburg, Deutschland) durch ein Schlauchsystem hochgezogen. Es wurden Schläuche aus Tygon verwendet, um eine Desoxygenierung des Puffers auf dem Weg zum Herzen zu verhindern. Diesen Schläuchen war eine Luftfalle nachgeschaltet. Sowohl die Luftfalle als auch die darauffolgende Wärmespirale waren mit einem zweiten Wasserbad verbunden, sodass eine konstante Temperatur von 37°C des Krebs-Henseleit-Puffers gewährleistet wurde.
Dahinter waren zwei Dreiwegehähne geschaltet, über welche Perfusoren angeschlossen wurden und vor Versuchsbeginn die Anlage vollständig entlüftet werden konnte. Abschließend befand sich eine metallene Aortenkanüle, an der das Herz befestigt wurde. Um ein Auskühlen zu verhindern, war das Herz selbst von einem ebenfalls mit dem zweiten Wasserbad verbundenen Wärmeschild umgeben. Ein konstanter Perfusionsdruck von 80mmHg wurde aufrechterhalten, indem eine definiert hohe Flüssigkeitssäule hinter den Luftfänger geschaltet war, über die überschüssiger Puffer zurück ins Reservoir laufen konnte.



Abb. 3: Langendorff-Anlage

Der Krebs-Henseleit Puffer (1) wurde im Wasserbad (2) kontinuierlich auf 37°C erhitzt und mit Carbogen (3) begast. Eine Rollenpumpe (4) zog den Puffer durch ein Schlauchsystem zu einem gläsernen Luftfänger (5). Um eine Temperatur von 37°C zu halten, wurde der Puffer durch eine Wärmespirale (6) geleitet. Darauf folgte eine Metallkanüle (7), an die das Rattenherz an der Aorta angeschlossen aufgehängt wurde. Das Herz war umgeben von einem Wärmeschild (8). Im linken Ventrikel war ein Ballon platziert, der über einen Druckaufnehmer hämodynamische Daten aufnahm (9). Um eine Perfusion bei 80mmHg zu gewährleisten, war hinter den Luftfänger eine Flüssigkeitssäule (10) geschaltet, über die überschüssiger Puffer zurück ins Reservoir fließen konnte. Über Dreiwegehähne konnten Perfusoren (11) angeschlossen werden.

3.3 Versuchsablauf

Die Versuche wurden an isoliert perfundierten Rattenherzen an einer Langendorff-Anlage durchgeführt. Zunächst wurde den Versuchstieren zur Sedierung Pentobarbital-Natrium (80mg/kg Körpergewicht, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) intraperitoneal appliziert. Zusätzlich wurden zur Antikoagulation 1.000 I.E. Heparin Natrium (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) injiziert. Nach Ablauf eines Zeitintervalls von fünf Minuten und Erlöschen der Schutzreflexe wurden die Ratten mit einer Kleintierguillotine (UGO BASILE S.R.L., Biological Research Apparatus, Comerio VA, Italien) dekapitiert, eine mediane Thorakotomie durchgeführt und der Thorax mit Hilfe eines Rippenspreizers eröffnet. Anschließend erfolgte das Absetzen des Herzens unterhalb des Abgangs der linken Arteria subclavia. Um eine Embolisierung in den Koronargefäßen zu verhindern, wurde das Herz zunächst in ein 25ml Becherglas mit 10ml 0,9% Kochsalzlösung (Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) überführt.

Im Anschluss an die Organentnahme wurde das Herz an die Langendorff-Anlage angeschlossen. Hierfür wurde die Aorta an einer Aortenkanüle aus Metall (Außendurchmesser 2,0mm, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) zunächst mit einer Bulldogklemme (38 mm, gerade, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) fixiert und mit nichtresorbierbaren Polyesterfäden (Resorba, Nürnberg, Deutschland) an der Kanüle befestigt. Dann wurde das Herz retrograd mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer bei einem konstanten Perfusionsdruck von 80mmHg perfundiert.

Zwischen Dekapitation und Perfusion an der Langendorff-Anlage durften maximal 3 Minuten vergehen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und auszuschließen, dass das Herz bereits vor Versuchsbeginn ischämisch präkonditioniert wurde. Nach Sicherstellung der Perfusion wurde das linke Herzohr eröffnet und ein flüssigkeitsgefüllter Ballonkatheter im linken Ventrikel platziert, der so lange mit Kochsalzlösung gefüllt wurde, bis der enddiastolische Druck 3 bis 8 mmHg betrug. Dieser Ballonkatheter diente der Erfassung der Hämodynamik.

Eine globale Ischämie wurde erzeugt, indem der Zufluss oberhalb der Heizspirale und unmittelbar vor dem Herzen geschlossen wurde und das Wärmeschild mit desoxygeniertem Puffer gefüllt und mit Stickstoff (Stickstoff 5.0, Linde AG, Pulach) begast wurde. Die Begasung mit Stickstoff sollte sicherstellen, dass keine Oxygenierung des Puffers mit der Raumluft stattfinden konnte und somit eine Unterbrechung der Oxygenierung sichergestellt war. Nach Ende des Versuchs wurden die Herzen gewogen und in einer 3ml Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bei -20° konserviert.

Mit Platzierung des Druckaufnahmeballons begann die Versuchszeit. Die ersten 20 Minuten des Versuchs dienten als Einpendelungszeit, nach 10 Minuten durfte der Druckaufnahmeballon nicht mehr manipuliert werden. Zum Zeitpunkt der Baseline (Minute 15) musste die Herzfrequenz (HF) über 250bpm, der maximale linksventrikuläre Druck (LVP_{max}) bei mindestens 80mmHg und der minimale linksventrikuläre Druck (LVP_{min}) zwischen 3 und 8 mmHg liegen. Nach Ablauf der Einpendelungszeit fand eine 10-minütige Intervention (Präkonditionierung) statt, darauf folgte die 33 Minuten lange globale Ischämie. An die Ischämie schloss sich eine 60-minütige Reperfusionsphase an, in der in den ersten 10 Minuten im zweiten Versuchsteil erneut eine Intervention (Postkonditionierung) stattfand (siehe Abb. 4).



Abb. 4: Versuchsablauf

Jedes Herz durchlief 20 Minuten Einpendelungszeit, danach ein 10-minütiges Intervall, in dem eine Intervention stattfand. Darauf folgten 33 Minuten globale Ischämie. Im zweiten Versuchsteil wurde in den ersten 10 Minuten der Reperfusion wieder eine Intervention durchgeführt. Insgesamt durchlief jedes Herz 60 Minuten Reperfusion.

3.3.1 Versuchsteil 1: Dosisfindung

Der erste Versuchsteil war darauf ausgelegt, einen möglichen Konzentrationseffekt von Sildenafil zu ermitteln. Außerdem sollte eine nicht-kardioprotektiver Dosierung von Milrinon in der Präkonditionierung ermittelt werden. Diese Untersuchungen dienten als Voraussetzung für den zweite Versuchsteil. Für den ersten Versuchsteil wurden die Tiere in 5 Gruppen (n=5) randomisiert (Versuchsablauf siehe Abb. 5). Die Kontrollgruppe erhielt in den 10 Minuten Interventionszeit ein Gemisch aus Krebs-Henseleit-Puffer und dem Vehikel DMSO in einer Konzentration von 0,01% am Herzen. Die weiteren Gruppen erhielten Sildenafil in aufsteigenden Konzentrationen. In einer Vorarbeit der gleichen Arbeitsgruppe konnte 1 μ M bereits als protektive Milrinon-Dosis in der Präkonditionierung definiert werden [36]. In dieser Studie wurden jedoch keine niedrigeren Konzentrationen untersucht. Deshalb erhielt die Milrinon-Gruppe 0,1 μ M Mil als vermeintlich nicht-protektive Dosis. Bei den Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration am Herzen bei Zuführung von 1% des Koronarflusses.



Abb. 5: Versuchsablauf Dosisfindung

3.3.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon

Im zweiten Versuchsteil sollte untersucht werden, ob die kombinierte Gabe von Sildenafil und Milrinon einen additiven oder synergistischen kardioprotektiven Effekt hat. Dafür wurden 45 Versuchstiere in insgesamt 7 Gruppen (n=6-7) randomisiert. Die Kontrollgruppe erhielt in beiden Interventionsintervallen nur den Vehikel DMSO in einer Konzentration von 0,06% am Herzen. In zwei weiteren Gruppen wurden die Herzen jeweils mit den niedrigsten protektiven Dosierungen von Sildenafil und Milrinon allein als Präkonditionierungsstimulus perfundiert. Für Sildenafil wurde eine Konzentration von 0,3 µM gewählt, welche im ersten Versuchsteil als niedrigste protektive Dosis ermittelt wurde. Milrinon wurde in einer Dosierung von 1µM in der Präkonditionierung appliziert. Diese Dosierung wurde in einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe als die niedrigste protektive Dosis detektiert. [36]. In weiteren Gruppen wurden die Kombinationen beiden der Phosphodiesterase-Hemmer und verschiedener Konditionierungsstimuli untersucht. Zunächst wurden Sildenafil und Milrinon in kardioprotektiven Dosierungen (0,3µM Sil, 1µM Mil) als Präkonditionierung kombiniert, um einen möglichen additiven Effekt zu untersuchen. Des weiteren wurden Herzen in einer Gruppe mit der Kombination aus zwei nicht-protektiven Dosierungen von Sildenafil und Milrinon vor der Ischämie perfundiert. Ziel war es zu untersuchen, ob diese nichtkardioprotektiven Dosierungen in der Summe einen kardioprotektiven Effekt vermitteln. Die nicht-protektiven Dosierungen (0,1 µM Sil und 0,1µM Mil) der beiden Substanzen wurden im ersten Versuchsteil ermittelt. Die letzten zwei Gruppen dienten dazu herauszufinden, ob eine Kombination aus Prä- und Postkonditionierung in protektiven und nicht-protektiven Dosierungen synergistische bzw. additive kardioprotektive Effekte erzielen kann. Dafür wurden jeweils Sildenafil in der Prä- und Milrinon in der Postkonditionierung appliziert. In einer Versuchsgruppe wurden beide Substanzen in protektiven Dosierungen (Sil 0,3 µM Sil und 3 µM Mil) und in der anderen Gruppe jeweils in nicht-protektiven Dosierungen (Sil 0,1 µM und Mil 1 µM) kombiniert. Die Milrinon Dosierungen wurden hierfür aus einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe zu Konzentrationseffekten des Phosphodiesterase-Hemmers genommen [83].



Abb. 6: Versuchsablauf Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon

3.4 Hämodynamische Auswertung

Die Hämodynamik der Versuchsherzen wurde während des gesamten Versuches über einen mit Kochsalzlösung-gefüllten Ballon überwacht und aufgezeichnet, welcher über das linke Herzohr und die Mitralklappe im linken Ventrikel platziert wurde. Dieser Ballon bestand aus Polyethylen-Folie und war luftfrei mit einem Druckaufnehmer (AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich) verbunden. Dieser war wiederum an einen Brückenverstärker (AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich) angeschlossen, der die hämodynamischen Daten auf den angeschlossenen Computer und das Programm LabChart 8 (AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich) übertrug. Nach Versuchsende wurden die zuvor festgelegten Zeiträume von Minute 14 bis Minute (Baseline) 15, Minute 28 bis 29 (Applikation Präkonditionierung, PC), die vorletzte Minute der Ischämie (Minute 61 bis 62) und Minute 5, 15, 30, 45 und 60 der Reperfusion (Rep 5, 15, 30, 45, 60) markiert und vom Programm LabChart 8 die mittlere HF, der maximale und minimale linksventrikuläre Druck (LVP_{max} und LVP_{min}) und die maximale und minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max} und dP/dt_{min}) kalkuliert. Außerdem wurden der Zeitpunkt sowie die Höhe der maximalen Kontraktur während der Ischämie bestimmt. Diese Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel archiviert und der entwickelte Druck und das Rate Pressure Product (RPP) berechnet. Der Koronarfluss (CF) wurde zu den zuvor genannten Zeitpunkten händisch gemessen. Hierfür wurde das Effluat für jeweils eine Minute gesammelt und gewogen.

3.5 Ermittlung der Infarktgröße mittels TTC-Färbung

Im Anschluss an die Versuche wurden die Herzen bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt. Um die Infarktgrößen bestimmen zu können, wurden die Herzen vom Apex aus in 8 ca. 2mm dicke Scheiben geschnitten. Die Herzscheiben wurden dann in 0,75%iger Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) für 15 Minuten bei 37°C und pH 7,42 inkubiert. Hierauf folgte die Fixierung mit 4%iger Formalinlösung über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurden die Herzscheiben mit einem Flachbettscanner (CanoScan LiDE700F, Canon, Krefeld, Deutschland) digitalisiert. Im Anschluss wurden die Herzen eine Woche lang unter einem Abzug getrocknet, um das Trockengewicht bestimmen zu können. Die Planimetrie wurde von einem verblindeten Untersucher mit Hilfe des Programmes SigmaScan® (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden alle Infarktareale des linken Ventrikels markiert und summiert. Danach wurde das gesamte Areal des linken Ventrikels (AAR) erfasst. Außerdem wurde der Quotient aus Infarkt und linkem Ventrikel gebildet, um den Anteil an infarziertem Gewebe zu ermitteln.

Wirkstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Menge
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	121,14	1,41 g
Triphenyltetrazoliumchlorid	334.79	0,75 g
0,9% NaCl		100 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung der TTC-Färbelösung

3.6 Statistik

Der primäre Endpunkt aller Versuche war die Infarktgrößenreduktion. Zur Bestimmung der Gruppengröße wurde SigmaStat® verwendet, um eine Infarktgrößendifferenz von 25% mit 80%iger Sicherheit bei einem Alphafehler <0,05 und einer angenommenen Standardabweichung von 10% wahrzunehmen. Daraus errechnete sich für die Sildenafil-Dosisfindungsstudie bei fünf Versuchsgruppen eine Gruppengröße von fünf Versuchstieren. Für das Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon wurde Gruppengröße von sieben berechnet. In den Versuchsgruppen Mil P und Sil NP PC + Mil NP POC konnten in der finalen Auswertung jeweils nur sechs von sieben Versuchstieren eingeschlossen werden. Jeweils ein Tier pro Gruppe wurde aus der Versuchsreihe ausgeschlossen, da es die Baseline Kriterien nicht erfüllt hat.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Version 8. Unterschiede in der Infarktgröße sowie Körpergewicht, Herznass- und -trockengewicht, ischämischer Peak und Zeitpunkt des ischämischen Peaks verfahren zwischen den Gruppen wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit *Tukey's post-hoc test* verglichen.

Als sekundärer Endpunkt dienten die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz, maximaler und minimaler linksventrikulärer Druck, der entwickelte Druck, maximale und minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, der Koronarfluss und das Rate Pressure Product. Diese wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit *Tukey's post-hoc test* verglichen.

Es wurde 5% als Signifikanzniveau angenommen (p=<0.05) und alle Daten als Mittelwert und Standardabweichung (Mittelwert \pm SD) dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Dosisfindungsstudie

4.1.1 Infarktgrößen

Die Dosisfindungsstudie hatte zum Ziel, die niedrigste protektive Dosis von Sildenafil in der Präkonditionierung zu identifizieren. Die niedrigste protektive Dosis Milrinon (1 μ M) war aus einer Vorstudie bereits bekannt [36]. Außerdem sollte verifiziert werden, dass eine Dosis von 0,1 μ M Milrinon keinen kardioprotektiven Effekt auslösen kann. Zuletzt verfolgte der erste Versuchsteil außerdem das Ziel, eine nicht-protektive Sildenafilkonzentration zu ermitteln, welche für den zweiten Versuchteil nötig war.

Die Infarktgröße wird als prozentualer Anteil an der Risikofläche (AAR) angegeben. Jeweils 5 Versuchsherzen wurde entweder eine Vehikelsuspension als Kontrolle, eine von drei Sildenafil-Dosierungen (0,1 μ M, 0,3 μ M, 1 μ M) oder 0,1 μ M Milrinon appliziert. Die Kontrollgruppe zeigte eine Infarktgröße von 53,8±4%. Sowohl die eine Konzentration von 0,1 μ M Sildenafil, als auch 0,1 μ M Milrinon konnte die Infarktgröße nicht signifikant reduzieren (Sil 0,1 μ M: 49,6±14%, ns vs. Kontrolle; Mil 0,1 μ M: 49,3±10%, ns vs. Kontrolle). Die niedrigste protektive Sildenafilkonzentration lag bei 0,3 μ M und konnte eine signifikante Infarktgrößenreduktion erreichen (Sil 0,3 μ M: 35,2±9%, p<0,05 vs. Kontrolle). Ebenso reduzierte eine Dosis von 1 μ M Sildenafil den Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant (Sil 1 μ M: 36,2±2%, p<0,05 vs. Kontrolle). Diese Dosis erzielte jedoch keine signifikante weitere Reduktion verglichen mit 0,3 μ M Sildenafil (36,3±2%, ns vs. Sil 0,3 μ M 35,2±9%). Die Infarktgrößen sind in Abb. 7 dargestellt.



Abb. 7: Infarktgrößen Dosisfindung

Dargestellt sind die Infarktgrößen in % mit ihrer Standardabweichung. * kennzeichnet eine signifikante Veränderung zum Kontrollinfarkt. Modifiziert nach [1].

4.1.2 Hämodynamik

Während der Versuche wurde die Herzaktivität kontinuierlich aufgezeichnet. Die Ergebnisse dieser Aufzeichnung werden im Folgenden zusammengefasst. Die Auswertung fand zu definierten Zeitpunkten (Baseline Minute 15, Applikation Präkonditionierung Minute 28, Reperfusion Minute 30 und Minute 60) statt.

Weder in der Herzfrequenz noch beim systolischen linksventrikulären Druck zeigten sich während der Reperfusion im Vergleich zur *baseline* signifikante Unterschiede. Der enddiastolische Druck war in allen Gruppen während der Reperfusion verglichen mit der jeweiligen *baseline* signifikant erhöht. Das RPP, welches das Produkt aus Herzfrequenz und systolischem Druck darstellt, hat sich damit einhergehend nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu war der Koronarfluss in allen Gruppen während der Reperfusion signifikant reduziert. Allerdings zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen keine

signifikanten Unterschiede. Alle hämodynamischen Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Abb. 8 zeigt die Druckentwicklung im Zeitverlauf der Versuche.

			Reperfusion		
	Baseline	Applikation PC	Min. 30	Min. 60	
Herzfrequenz					
[bpm]					
Kontrolle	319 ± 23	282 ± 25	279 ± 82	276 ± 47	
Sil 0,1µM	281 ± 10	275 ± 28	278 ± 39	238 ± 65	
Sil 0,3µM	316 ± 37	320 ± 41	136 ± 132	212 ± 122	
Sil 1µM	315 ± 39	334 ± 44	210 ± 122	212 ± 117	
Mil 0,1µM	278 ± 34	266 ± 40	198 ± 140	197 ± 117	
LVP _{max}					
[mmHg]					
Kontrolle	109 ± 42	110 ± 47	116 ± 16	113 ± 22	
Sil 0,1µM	145 ± 29	166 ± 22	146 ± 21	139 ± 16	
Sil 0,3µM	124 ± 35	147 ± 51	140 ± 25	127 ± 38	
Sil 1µM	116 ± 19	125 ± 22	110 ± 23	109 ± 20	
Mil 0,1µM	106 ± 28	131 37	141 ± 27	130 ± 24	
LVP _{min}					
[mmHg]					
Kontrolle	3 ± 2	3 ± 2	87 ± 19*	73 ± 17*	
Sil 0,1µM	4 ± 2	4 ± 2	$128 \pm 19*$	$105 \pm 14*$	
Sil 0,3µM	4 ± 4	2 ± 8	$129 \pm 23*$	$88 \pm 21*$	
Sil 1µM	4 ± 2	10 ± 12	$91 \pm 25*$	$82 \pm 21*$	
Mil 0,1µM	4 ± 2	5 ± 1	$103 \pm 30*$	$90 \pm 25*$	
Rate pressure					
product					
[bpm*mmHg]					
Kontrolle	33977 ± 11448	30261 ± 10707	33004 ± 11996	30580 ± 4501	
Sil 0,1µM	40549 ± 7962	45739 ± 8636	40087 ± 5173	32569 ± 8256	
Sil 0,3µM	38845 ± 10537	46028 ± 12808	20587 ± 20189	29883 ± 18464	
Sil 1µM	36262 ± 5509	41938 ± 10546	22555 ± 14638	21761 ± 14607	
Mil 0,1µM	29311 ± 7809	34729 ± 11218	26126 ± 16812	25497 ± 15114	
Koronarfluss					
[ml/min]					
Kontrolle	$9,2 \pm 1,0$	7,6 ± 1	$6,8 \pm 1,3*$	6,5 ± 1,4*	
Sil 0,1µM	$11,14 \pm 1,7$	$12,7 \pm 2$	$9,5 \pm 5*$	$7,2 \pm 1,4*$	
Sil 0,3µM	$14,8 \pm 8,7$	$16,4 \pm 9$	$10,1 \pm 9,5*$	$10,1 \pm 9,7*$	
Sil 1µM	$12,9 \pm 2,8$	$14,8 \pm 5$	$8,2 \pm 3,9*$	$7,5 \pm 3,4*$	
Mil 0,1µM	$10,7 \pm 2,2$	$11,5 \pm 3$	6,1 ± 1,3*	5,6 ± 1,3*	

Tabelle 4: Hämodynamik Dosisfindung

Dargestellt sind die gemessenen hämodynamischen Parameter Herzfrequenz in Schlägen pro Minute [bpm], der maximale und minimale linksventrikuläre Druck (LVP) in mm Wassersäule [mmHg], das Rate pressure product [bpm*mmHg] und der gemessene Koronarfluss in ml pro Minute [ml/min] zur Baseline Minute 15, während der Applikation der Präkonditionierung Minute 29 und in Minute 30 und 60 der Reperfusion. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. * kennzeichnet signifikante Änderungen zur jeweiligen Baseline. Modifiziert nach [1].



Abb. 8: Druckentwicklung Dosisfindung

Dargestellt ist für jede Gruppe die Druckentwicklung in mmHg zu den Zeitpunkten der Baseline Minute 15, während der Präkonditionierung Minute 29, während der Ischämie Minute 62 sowie in Minute 5, 15, 30, 45 und 60 der Reperfusion. Modifiziert nach [1].

4.1.3 Eigenschaften der Versuchstiere

Neben der Infarktgröße und der Hämodynamik wurden alle Versuchstiere vor Versuchsbeginn gewogen. Außerdem wurden Herznass- und Herztrockengewicht und der Zeitpunkt der maximalen Kontraktur bestimmt. Die Versuchstiere zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Körpergewicht. Ebenso unterschieden sich die verwendeten Herzen weder in ihrem Trocken-, noch in ihrem Nassgewicht. Auch im Zeitpunkt und der Höhe der maximalen Kontraktur gab es keine signifikanten Abweichungen. Alle Werte sind in Tabelle 5 dargestellt.

					Zeitpunkt Ischämie	Ischämie Peak
		Rattengewicht	Herznassgewicht	Herztrockengewicht	Peak	[mmHg]
	n	[g]	[g]	[g]	[min]	
Kontrolle	5	284 ± 7	$1,24 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,014$	18 ± 3	61 ± 19
Sildenafil						
0,1µM	5	278 ± 17	$1,17 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,009$	15 ± 2	90 ± 11
Sildenafil						
0,3µM	5	301 ± 6	$1,21 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,015$	17 ± 2	84 ± 19
Sildenafil						
1µM	5	288 ± 12	$1,\!19 \pm 0,\!03$	$0,14 \pm 0,017$	16 ± 2	60 ± 24
Milrinon						
0,1µM	5	296 ± 9	$1,19 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,016$	16 ±2	81 ± 15
				Į.		

Tabelle 5: Eigenschaften der Versuchstiere Dosisfindung

Dargestellt sind das Gewicht der Versuchstiere, das Herznass- und Herztrockengewicht (Gramm) sowie der Zeitpunkt und die Ausprägung des Ischämie Peaks. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Modifiziert nach [1].

4.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon

4.2.1 Infarktgrößen

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon bei Applikation von unterschiedlichen Dosierungen sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Prä- vs. Postkonditionierung) untersucht. Im Fokus stand die Frage, ob es einen additiven kardioprotektiven Effekt gibt und ob die applizierte Dosis sowie der Zeitpunkt der Applikation einen Einfluss auf die Stärke der Infarktgrößenreduktion haben. Die Infarktgröße in der Kontrollgruppe lag bei 55,2±9%. Alle anderen Gruppen zeigten im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens. Hierbei ergab sich für die Einzelgabe von Sildenafil in der Präkonditionierung eine Infarktgröße von $34,5\pm13\%$ (p<0,05 vs. Kontrolle) und von $33,8\pm8\%$ für Milrinon (p<0,05 vs. Kontrolle). Die kombinierte Gabe dieser beiden Dosierungen erzielte keine weitere Infarktreduktion im Vergleich zur Einzelgabe der Substanzen (Sil P + Mil P: $37,6\pm6\%$ ns. vs. Sil P; ns vs. Mil P). Auch die gleichzeitige Applikation der nicht-protektiven Sildenafil und Milrinon Dosis zeigte einen vergleichbar starken kardioprotektiven Effekt (Sil NP + Mil NP: 32,5±6, ns vs. Sil P + Mil P). Zuletzt konnte auch die Kombination von Prä- und Postkonditionierung in protektiven sowie nicht-protektiven Dosierungen einen protektiven Effekt hervorrufen (Sil P PC + Mil P POC: $34,1\pm6\%$, p<0,05 vs. Kontrolle; Sil NP PC + Mil NP POC: $34,1\pm10\%$, p<0,05 vs. Kontrolle; Sil NP PC + Mil NP POC: $34,1\pm10\%$, p<0,05 vs. Kontrolle). Alle Infarktgrößen sind in Abb. 9 dargestellt.



Abb. 9: Infarktgröße Sildenafil und Milrinon Kombinationsgabe

Dargestellt sind die Infarktgrößen in % mit ihrer Standardabweichung. * kennzeichnet eine signifikante Veränderung zum Kontrollinfarkt. Modifiziert nach [1].

4.2.2 Hämodynamik

Ebenso wie in der Dosisfindungsstudie wurde auch im zweiten Versuchsteil die Hämodynamik untersucht. Keine Gruppe zeigte eine signifikante Änderung der Herzfrequenz im Vergleich zu ihrer *baseline*. Es gab in keiner Gruppe eine Änderung des systolischen linksventrikulären Druckes. Keine Gruppe zeigte eine bedeutende Änderung im RPP. Der diastolische linksventrikuläre Druck hingegen stieg während der Reperfusion in allen Gruppen signifikant an, verglichen zur jeweiligen *baseline*. Der CF sank außer in der Sil P PC + Mil P PC Gruppe in allen Gruppen signifikant zum Ende der Reperfusion. In der Sil P PC + Mil P PC und der Sil P Gruppe zeigte sich zudem während der Präkonditionierung ein signifikanter Anstieg des Koronarflusses im Vergleich zur jeweiligen *baseline* Messung. Alle erhobenen Werte sind in Tabelle 6 ersichtlich. Die Druckentwicklung während des Versuchsablaufes ist in Abb. 10 dargestellt.

			Reperfusion		
	Baseline	РС	Min. 30	Min. 60	
Herzfrequenz [bpm]					
Kontrolle	290 ± 66	288 ± 55	149 ± 137	166 ± 95	
Sildenafil P	297 ± 39	303 ± 24	246 ± 70	263 ± 53	
Milrinon P	272 ± 30	273 ± 37	246 ± 54	212 ± 55	
Sil P + Mil P	290 ± 34	317 ± 25	257 ± 98	227 ± 61	
Sil NP + Mil NP	303 ± 36	291 ± 28	256 ± 54	250 ± 26	
Sil P PC + Mil P POC	306 ± 45	317 ± 37	250 ± 44	241 ± 66	
Sil NP PC + Mil NP POC	305 ± 38	305 ± 15	243 ± 57	266 ± 28	
LVP _{max} [mmHg]					
Kontrolle	127 ± 30	131 ± 38	127 ± 28	120 ± 29	
Sildenafil P	123 ± 34	150 ± 33	154 ± 24	149 ± 22	
Milrinon P	125 ± 28	156 ± 41	161 ± 14	153 ± 16	
Sil P + Mil P	111 ± 29	151 ± 35	160 ± 25	143 ± 22	
Sil NP + Mil NP	98 ± 23	117 ± 27	174 ± 20	166 ± 18	
Sil P PC + Mil P POC	139 ± 58	164 ± 56	194 ± 30	171 ± 29	
Sil NP PC + Mil NP POC	96 ± 17	112 ± 25	156 ± 15	144 ± 16	
LVP _{min} [mmHg]					
Kontrolle	4.2 ± 2.3	4.2 ± 2	$112.7 \pm 21.2*$	95.3 ± 16.8*	
Sildenafil P	3.8 ± 1.4	3.4 ± 2	$115.0 \pm 23.9^{*}$	$95.3 \pm 19.2*$	
Milrinon P	5.0 ± 1.2	6.3 ± 3	$115.1 \pm 17.8^*$	$98.5 \pm 17.1*$	
Sil P + Mil P	$5,3 \pm 3,2$	8.7 ± 11	$122.2 \pm 17.8^{*}$	$1042 \pm 22*$	
	0,0 0,2	0,, 11	122,2 17,0	$116,2 \pm$	
Sil NP + Mil NP	$3,1 \pm 3,2$	$3,3 \pm 5$	$138,7 \pm 16,1*$	13,2*	
		• • •		$118,2 \pm$	
Sil P PC + Mil P POC	$3,5 \pm 2,3$	$2,9 \pm 3$	$142,3 \pm 23,1*$	19,7*	
Sil NP PC + Mil NP POC	$4,1 \pm 2,1$	$2,8 \pm 3$	$123,1 \pm 27,3*$	$98,5 \pm 24,0*$	
[hnm*mmHg]					
		37882 ±	19285 ±	21017 ±	
Kontrolle	37166 ± 11837	12761	19438	13427	
		45669 ±	37711 ±	39115 ±	
Sildenafil P	36905 ± 12878	12392	10371	9763	
Milrinon P	33858 ± 7168	41735 + 8932	39207 + 7253	32103 ± 7378	
	55050 - 7100	$47458 \pm$	$36937 \pm$	$32847 \pm$	
Sil P + Mil P	31832 ± 7125	10120	18359	10758	
				$41327 \pm$	
Sil NP + Mil NP	29576 ± 8135	33837 ± 7401	44248 ± 9562	3798	
Sil P PC + Mil P POC	43910 ± 23086	53402 ± 22045	44468 ± 18496	42026 ± 15481	
Shiri i e + Miiri i Oe	45910 ± 25080	229+3 25573 ±	$22879 \pm$	$28837 \pm$	
Sil NP PC + Mil NP POC	21696 ± 13689	16774	19549	18471	
Koronarfluss [ml/min]					
Kontrolle	$11,1 \pm 1,5$	$11,5 \pm 2$	$5,8 \pm 0,8*$	$5,9 \pm 1,0*$	
Sildenafil P	$10,5 \pm 1,1$	$13,5 \pm 1*$	$7,3 \pm 1,3*$	$6,7 \pm 1,3*$	
Milrinon P	$9,0 \pm 1,3$	$9,8 \pm 2$	6,1 ± 1,3*	$5,3 \pm 1,1*$	
Sil P + Mil P	$8,4 \pm 1,3$	$13,3 \pm 2*$	$9,0 \pm 3,1$	$8,4 \pm 3,4$	
Sil NP + Mil NP	$9,0 \pm 2,1$	$9,8 \pm 2$	$5,3 \pm 1,9*$	$4,5 \pm 1,8*$	
Sil P PC + Mil P POC	$9,2 \pm 2,9$	$11,3 \pm 3$	$7,0 \pm 1,5$	5,5 ± 1,3*	
Sil NP PC + Mil NP POC	9,7 ± 1,6	$11,3 \pm 2$	$7,3 \pm 1,3*$	$6,4 \pm 1,2*$	

Tabelle 6: Hämodynamik Sildenafil und Milrinon Kombinationsgabe

Dargestellt sind die gemessenen hämodynamischen Parameter Herzfrequenz in Schlägen pro Minute [bpm], der maximale und minimale linksventrikuläre Druck (LVP) in mm Wassersäule [mmHg], das *Rate pressure product* [bpm*mmHg] und der gemessene Koronarfluss in ml pro Minute [ml/min] zur Baseline Minute 15, während der Applikation der Präkonditionierung Minute 29 und in Minute 30 und 60 der Reperfusion. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. * kennzeichnet signifikante Änderungen zur jeweiligen Baseline. Modifiziert nach [1].



Abbildung 10: Druckentwicklung Sildenafil und Milrinon Kombinationsgabe

Dargestellt ist für jede Gruppe die Druckentwicklung in mmHg zu den Zeitpunkten der Baseline Minute 15, während der Präkonditionierung Minute 29, während der Ischämie Minute 62 sowie in Minute 5, 15, 30, 45 und 60 der Reperfusion. Modifiziert nach [1].

4.2.3 Eigenschaften der Versuchstiere

Auch im zweiten Versuchsteil wurden die Versuchstiere und Herzen sowie die maximale ischämische Kontraktur für alle Gruppen verglichen. Bezüglich aller Eigenschaften zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Tabelle 7).

	n	Rattengewicht [g]	Herznassgewicht [g]	Herztrockengewicht [g]	Zeitpunkt Ischämie Peak [min]	Ischämie Peak [mmHg]
Kontrolle	5	294 ± 28	$1,19 \pm 0,04$	0,14±0,02	15 ± 2	84 ± 12
Sildenafil P	7	279 ± 20	$1,19 \pm 0,05$	0,13±0,01	16 ± 2	95 ± 31
Milrinon P	6	298 ± 12	1,20 ± 0,02	0,14 ± 0,02	16 ± 2	104 ± 21
Sil P + Mil P	7	278 ± 10	1,20 ± 0,02	$0,14 \pm 0,02$	15 ± 2	103 ± 26
Sil NP + Mil NP	7	295 ± 11	$1,21 \pm 0,02$	0,12 ± 0,01	16 ± 1	110 ± 17
Sil P PC + Mil P POC	7	294 ± 7	1,20 ± 0,01	0,12 ± 0,02	16 ± 1	114 ± 22
Sil NP PC + Mil NP POC	6	292 ± 15	1,17±0,03	0,13 ± 0,01	16 ± 1	88 ± 17

Tabelle 7: Eigenschaften der Versuchstiere Sildenafil und Milrinon Kombinationsgabe

Dargestellt sind das Gewicht der Versuchstiere, das Herznass- und Herztrockengewicht (Gramm) sowie der Zeitpunkt und die Ausprägung des Ischämie Peaks. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

5. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Kombination der beiden Phosphodiesterase-Inhibitoren Sildenafil und Milrinon einen additiven kardioprotektiven Effekt hat. Aufgrund ihrer klinischen Anwendung wurde nicht nur die simultane Applikation, sondern auch die zeitlich getrennte Gabe untersucht. Außerdem sollte ermittelt werden, ob die kombinierte Gabe von niedrigeren, einzeln nicht-protektiv wirksamen Konzentrationen ebenfalls eine Infarktreduktion erzielen kann. Dies hätte den Vorteil, die applizierten Dosen und damit verbundene Nebenwirkungen möglichst gering halten zu können. Diese Fragestellungen sollten im Langendorff-Modell an isoliert perfundierten Rattenherzen beantwortet werden.

Im ersten Versuchsteil wurde zunächst der kardioprotektive Effekt von Sil im Langendorff-Modell, welcher bereits in Vorstudien gezeigt wurde [33], bestätigt und eine Konzentration von 0,3µM als niedrigste protektive Dosis identifiziert. Außerdem wurde gezeigt, dass eine weitere Steigerung der Dosis keine zusätzliche Infarktgrößenreduktion bewirkt. Ebenso wurden nicht-protektive Konzentrationen Sil und Mil identifiziert. Diese Dosierungen dienten als Grundlage für den zweiten Versuchsteil.

Im zweiten Versuchsteil wurden zunächst die kardioprotektiven Eigenschaften von Sil und Mil bestätigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe beider Substanzen in protektiven Dosen weder in der Präkonditionierung noch in der kombinierten Prä- und Postkonditionierung eine größere Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens bewirkt als die einzelne Gabe. Allerdings zeigte die Gabe von nicht-protektiven Konzentrationen eine ebenso ausgeprägte Infarktreduktion wie die Gabe der Substanzen in höheren Konzentrationen.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau geht auf die ersten Untersuchungen am "überlebenden Säugetierherzen" durch Oskar Langendorff 1895 zurück [70]. Seit ihrer Erfindung ist diese Methode weit verbreitet und gut etabliert, im vergangenen Jahrhundert wurde sie ausgiebig verbessert und weiterentwickelt [69]. Sie hat ihren größten Vorteil darin, dass die gewonnenen Ergebnisse eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen und die Präparation einfach, wenig zeitaufwendig und kostengünstig ist. Außerdem ermöglicht das isoliert perfundierte Herz ein breites Spektrum an messbaren Parametern wie zum Beispiel Kontraktilität, Herzfrequenz, Morphologie und elektrische Aktivität des Herzens. Auch aufgrund der kontrollierbaren Applikation von Ischämie und Reperfusion wird diese Methode gerne verwendet. Ein weiterer Vorteil des Langendorff Versuches ist die isolierte Betrachtung des Herzens unabhängig von systemischen Einflüssen [88]. Aufgrund der myokardialen Lage des autonomen Schrittmachersystems des Herzens kann das an die Langendorff Anlage angeschlossene Herz autonom schlagen und unterliegt dabei weder dem Einfluss des zentralen oder autonomen Nervensystems noch dem systemischen Blutfluss. Dies bietet den Vorteil, dass isoliert der direkte Einfluss einer Substanz auf verschiedene kardiale Messparameter geprüft werden kann [88].

Trotz der vielen Vorteile dieser Methode ist es wichtig, sich ihrer Limitierungen bewusst zu sein. Hierbei seien vor allem das Fehlen von natürlichen humoralen Einflüssen sowie neuronalen Regulationen, aber auch die hohen Koronarflüsse und mögliche Ödembildung bei der Verwendung von zellfreien Perfusaten zu nennen. Schwierigkeiten können auch bei der Präparation des Herzens auftreten. Sie erfordert ein gewisses feinmotorisches Geschick und Übung, da bereits leichte Quetschungen das Herz nachhaltig schädigen können. Außerdem besteht bei der Präparation die Gefahr, das Herz bereits ischämisch zu präkonditionieren [88].

Im Langendorff Modell kann zwischen zwei Perfusionsarten unterschieden werden: der Perfusion mit konstantem Druck und der mit konstantem Fluss. In dieser Arbeit wurde die Perfusion mit einem konstanten Druck von 80mmHg gewählt. Diese Art der Perfusion hat den Vorteil, dass autoregulatorische Mechanismen, die den Fluss durch vermehrte Herzarbeit erhöhen, stattfinden und dadurch geringgradige Ischämien verhindert werden können [89]. Deshalb sollte für Arbeiten, die sich mit dem Ausmaß von Ischämien beschäftigen, eine Perfusion mit konstantem Druck bevorzugt werden [69, 90].

Eine häufige Fehlerquelle ist die mikrobiologische Kontamination der Anlage und eine durch Endotoxine beeinflusste Veränderung der Herzleistung [91]. Um diesem Fehler entgegenzuwirken, wurde die Anlage täglich nach Versuchsabschluss gründlich gereinigt und es wurden alle Bestandteile, bei denen die Gefahr der Abnutzung bestand, regelmäßig ausgetauscht.

Häufigste Anwendung des Langendorff-Modells ist heutzutage die Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens [91]. Dabei gilt die Messung der Infarktgröße als Goldstandard zur Objektivierung des Ischämie-Reperfusionsschadens. Die Ausprägung der Infarktgröße korreliert dabei im klinischen Alltag mit der Mortalität und der Hospitalisierungsrate aufgrund akuter Herzinsuffizienz innerhalb des ersten Jahres. Die Infarktgröße ist deshalb sowohl als Endpunkt in klinischen Studien als auch als prognostischer Marker geeignet [92]. Andere im klinischen Alltag eingesetzte prognostische Marker wie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und der endsystolische Volumenindex sind hingegen schlechtere Prädiktoren für zukünftige kardiale Ereignisse [93].

Bei der Induktion einer Ischämie kann grundsätzlich zwischen der globalen und der regionalen Ischämie unterschieden werden. In dieser Arbeit wurde die Induktion einer globalen Ischämie gewählt, welche dem Szenario des *cardiac arrest* während herzchirurgischen Eingriffen entspricht, nicht aber den typischen Bedingungen eines akuten Myokardinfarktes. Die Herbeiführung einer regionalen Ischämie entspricht zwar dem klinischen Bild eines akuten Koronararterienverschlusses, hat jedoch anderweitige Nachteile: der Verschluss einer Koronararterie mittels Ligatur kann Gefäßschäden anrichten und die Reperfusion nach Wiedereröffnung der Ligatur erschweren [94]. Außerdem muss die Platzierung der Ligatur sehr konstant geschehen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren [91]. Aufgrund der geringeren Fehleranfälligkeit und untersucherunabhängigen Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde für diese Arbeit die globale Ischämie als Modell gewählt.

5.1.2 Krebs-Henseleit Puffer

Der am häufigsten verwendete kristalloide Puffer, welcher zur Perfusion von isolierten Organen wie auch dem Herzen verwendet wird, ist der Krebs-Henseleit Puffer [95]. Dieser geht auf die 1932 von Hans Adolf Krebs und Kurt Henseleit erstmals verwendete sauerstoffhaltige physiologische Pufferlösung zurück [96]. KHP ist eine modifizierte Ringerlösung [69] und hat somit einen geringeren onkotischen Druck als Blut. Dieser könnte durch die Beigabe von Fettsäuren angehoben werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Fettsäuren in wässrigen Lösungen sowie des ausgeprägten Schäumens bei Begasung, die der Koronarperfusion schaden würde, wird dies jedoch in der Regel unterlassen [95]. Der daraus resultierende niedrige onkotische Druck führt einerseits zur Bildung von myokardialen Ödemen [97] und andererseits zu einem enorm erhöhten Koronarfluss bei erniedrigtem Gefäßwiderstand in den Koronargefäßen [98]. Des Weiteren hat das isoliert perfundierte Herz nur eine geringe Koronarreserve [99]. Die Versuchsdauer sollte zwei Stunden nicht überschreiten, da die myokardialen Ödeme und der erhöhte Koronarfluss ansonsten einen Einfluss auf die Herzfunktion nehmen würden. Bei längeren Versuchen sollte deshalb eine Echtblutlösung präferiert werden [99]. Das Verfahren der Gewinnung, Aufbereitung und Re-Applikation der Echtblutlösung ist jedoch wesentlich zeit- und kostenaufwendiger und anfälliger für Störungen als die Verwendung von KHP [69]. Zu bevorzugen ist dieser Aufbau jedoch für länger andauernde Versuche, da erythrozytenfrei perfundierte Herzen eine generell deutlich schlechtere Funktion sowie eine geringere funktionelle Stabilität als blutperfundierte Herzen aufweisen [100]. Um die myokardiale Ödembildung zu bewerten, hätte das Herzgewicht direkt nach Exzision sowie nach Versuchsende verglichen werden können. Da als primärer Endpunkt jedoch die Infarktgröße gewählt wurde, wurde auf die Verlängerung der Ischämie-Zeit vor Einbringung in die Langendorff-Anlage zugunsten einer Gewichtserfassung verzichtet.

Klassischer KHP setzt sich wie folgt zusammen: 118,5 mM NaCl, 25,0 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 11 mM Glukose und 2,5 mM CaCl₂ [91]. Die hohe Konzentration an Glukose, welche einer diabetischen Stoffwechsellage nahekommt, lässt sich dadurch begründen, dass ausschließlich Glucose als Energielieferant verwendet wird. Aufgrund der zuvor genannten Gefahr der Schaumbildung bei Begasung werden in der Regel keine freien Fettsäuren beigegeben, obwohl diese die präferierte Energiequelle des Herzens sind [91]. In der vorliegenden Arbeit wurde von der Zusammensetzung des klassischen KHPs abgewichen und die Kalziumchlorid-Konzentration unmodifizierten KHP angepasst. Im ist die Kalziumchlorid-Konzentration mit 2,5mM deutlich höher als die physiologische Konzentration von 1,3mM ionisiertem Kalzium [98] im Rattenblut, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Krebs und Henseleit den hohen Anteil an gebundenem Kalzium nicht eingerechnet haben [91]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine niedrigere Kalziumchlorid-Konzentration als im klassischen KHP gewählt, sodass die Konzentration des freien Kalziums im warmen begasten Puffer bei 1,33 mM lag. Diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung hat sich über Jahre in Versuchen dieser Arbeitsgruppe etabliert und wurde bereits in einer Vielzahl an Vorstudien erfolgreich angewandt.

Ein weiterer Aspekt, welcher bei der Verwendung von KHP als Perfusat bedacht werden muss, ist die geringe Sauerstofftransportkapazität. Diese ist insbesondere niedrig, weil der Puffer keine sauerstofftransportierenden Teilchen enthält [101]. Um dem Puffer trotzdem zu jedem Zeitpunkt genügend Sauerstoff zuzufügen, wurde dieser kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, bis der Sauerstoffpartialdruck über 500mmHg lag. Ebenso wie die korrekte Zusammensetzung des Puffers wurde auch die adäquate Begasung vor jedem Versuchsbeginn mittels Blutgasanalyse überprüft.

Aufgrund der Empfindlichkeit der isolierten Herzen auf Temperaturänderungen wurde die Temperatur des Puffers in allen Versuchen durch den Einsatz eines Wasserbades kontinuierlich bei 37°C gehalten. Einerseits bewirkt eine Hypothermie einen positiv inotropen Effekt [102], andererseits konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Hypothermie von 26°C [103], als auch Hyperthermien von 42°C konditionierend wirken und das Herz vor Ischämie-Reperfusionsschäden schützen können [104].

5.1.3 Versuchstiere und Narkose

In allen Versuchen dieser Arbeit wurden männliche, zwei bis drei Monate alte Wistar Ratten verwendet, welche zum Zeitpunkt der Versuche 250 bis 350g wogen. Theoretisch eignen sich Herzen von allen endothermen Tieren für die Anwendung im LangendorffVersuch [69]. Von der Verwendung größerer Tierspezies wird jedoch aus Praktikabilitätsgründen in der Regel abgesehen [88]. Für *in vitro* Versuche sind Ratten die am häufigsten verwendete Spezies, was an der einfachen Handhabung der Versuchstiere und den geringen Beschaffungs- und Haltungskosten liegt [88]. Ein möglicher Nachteil ist jedoch das kurze Aktionspotential des Rattenmyokards. Damit ist es wesentlich sensibler für das Auftreten von Arrhythmien, welche jedoch einfacher durch Defibrillation beendet werden können. Dies erschwert vor allem die Untersuchung des Auftretens von Arrhythmien, nicht jedoch des Ischämie-Reperfusionsschadens [105].

Ein weiterer Aspekt, welcher bei der Interpretation der vorliegenden Versuche Beachtung finden muss, ist die Verwendung von männlichen, jungen und gesunden Versuchstieren. Sowohl das Auftreten von ischämischen Herzkrankheiten [2], als auch Mortalität und Morbidität des akuten Myokardinfarktes [62], nehmen mit zunehmendem Alter deutlich zu. Die Anwendung von kardioprotektiven Strategien auf gealterte Versuchstiere gestaltet sich jedoch als schwierig [63]. Ursächlich hierfür scheinen verschiedene gestörte Signalwege zu sein [65, 66]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht für den Erfolg kardioprotektiver Strategien mitentscheidend ist und bei weiblichen Versuchstieren eine deutlich weniger ausgeprägte Infarktgrößenreduktion auftritt [68]. Um zunächst den isolierten kardioprotektiven Effekt der untersuchten Substanzen zu beurteilen, wurden aus diesen Gründen männliche, junge, gesunde Versuchstiere verwendet. Somit konnten die Störfaktoren Alter und Geschlecht sowie ein möglicher Einfluss von Vorerkrankungen und Komedikationen [67] ausgeschlossen werden. Bevor ein Transfer in die Klinik möglich wäre, müssten diese Faktoren jedoch in Folgestudien untersucht werden.

Ein Einfluss der Sedierung der Versuchstiere mittels Pentobarbital kann als kardioprotektiver Störfaktor ausgeschlossen werden. Die Versuchstiere in allen Gruppen erhielten die gleiche Dosis, sodass es sich um einen systemischen Störfaktor in allen Gruppen handelt, welcher das Auftreten der unterschiedlichen Infarktgrößen nicht erklären kann. Aus anderen Untersuchungen ist außerdem bekannt, dass die kontinuierliche Applikation von Pentobarbital zur Narkoseführung keinen Einfluss auf die Infarktgrößenreduktion durch konditionierende Maßnahmen hat [106].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Konzentrationseffekt der Sildenafil-Präkonditionierung

In der Dosisfindungsstudie, dem ersten Versuchsteil dieser Arbeit, konnte der bereits beschriebene [33, 78] protektive Effekt von Sildenafil bestätigt werden. Im Vergleich zu einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2015 [33] konnte mit einer 10-fach geringeren Konzentration (0,3µM VS. 3µM) Sildenafil eine signifikante Infarktgrößenreduktion erzielt werden. Eine niedrigere Konzentration von 0,1µM führte zu keiner Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentrationserhöhung über 0,3 µM bewirkte jedoch keine weitere Steigerung der Kardioprotektion. Dies lässt eine Sättigung der beteiligten Rezeptoren und Signalkaskaden im Sinne eines An-Aus-Phänomens vermuten [1].

In klinischen Studien zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie wurden Sildenafil-Plasmakonzentrationen von 10ng/ml bis 500 ng/ml untersucht, wobei bei Konzentrationen über 100 ng/ml keine weitere Verbesserung des pulmonalarteriellen Widerstandes erreicht werden kann [107]. Beachtet man die Molare Masse von Sildenafil (474,6 g/mol) sowie die Plasmabindung und Pharmakokinetik, errechnet sich aus 0,3 μ M eine Plasmakonzentration von 142 ng/ml in der Ratte. Somit ist die in unserer Studie eingesetzte Konzentration etwas höher, jedoch vergleichbar mit üblichen klinischen Dosierungen bei der Therapie des pulmonalen Hypertonus [108, 109]

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Sil antihypertrophe sowie kardioprotektive Effekte hat, welche auf die Hemmung der Hydrolyse von cGMP durch Hemmung der Phosphodiesterase V und einer damit verbundenen Vasodilatation zurück gehen [33, 110]. Der Anstieg von cGMP führt zu einer Aktivierung der PKG und einer sich anschließenden Öffnung des mBKCa-Kanals [33]. Darüber hinaus ist die Öffnung des mK_{ATP}-Kanals [78] sowie die induzierbare NO-Synthase [79] an der Kardioprotektion von Sil beteiligt. Es wurde zudem gezeigt, dass auch PKA-induzierte Signalwege eine Rolle bei der Sil-induzierten Infarktgrößenreduktion spielen [111]. Außerdem schützt die Gabe von Sil das Herz durch die Reduktion von Nekrosen und Apoptosen vor Ischämie-induzierter Kardiomyopathie [112]. Des Weiteren konnte der koronare Gefäßwiderstand sowie die Hämodynamik durch Sil verbessert werden [113].

Im klinischen Alltag gehört Sildenafil zur Standardtherapie der pulmonal-arteriellen Hypertonie [114]. Sein Einsatz zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen ist bisher jedoch auf den Rahmen von Studien begrenzt. Die RELAX Studie, eine randomisiert kontrollierte Multicenterstudie, die den Effekt einer Langzeittherapie von Sildenafil bei Patienten mit Herzinsuffizienz bei erhaltener Ejektionsfraktion untersucht hat, konnte keinen Vorteil hinsichtlich der maximalen oder submaximalen körperlichen Belastungsfähigkeit, dem klinischen Zustand, der Lebensqualität, dem Remodelling des linken Ventrikels, diastolischen Funktionsmarkern oder dem pulmonal-arteriellen systolischen Druck zeigen [115]. Ebenso konnte eine Präkonditionierung mit Sil in einer kleinen Studie mit 39 Kindern, welche Sil vor einem operativen Eingriff mit aortic cross clamping erhielten, den myokardialen Schaden nicht reduzieren und keine Verbesserung der Herzleistung erzielen [80]. Für ein ausgewähltes Patientenkollektiv, welches neben einer Herzinsuffizienz NYHA II-III mit erhaltener Ejektionsfraktion >50% auch einen erhöhten pulmonal-vaskulären Druck >40mmHg, einen pulmonal-vaskulären Widerstand von >3 Wood Einheiten und/oder einen transpulmonalen Gradienten >15mmHg aufwies, konnte jedoch eine Verbesserung der körperlichen Belastungsfähigkeit, pulmonaler hämodynamischen Parameter sowie der rechtsventrikulären Funktion gezeigt werden [116]. Zum jetzigen Zeitpunkt fehlen groß angelegte klinische Studien zum Einsatz von Sildenafil im Zusammenhang mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden. Anderson et al. konnten jedoch in einer retrospektiven Analyse zeigen, dass Typ 2 Diabetiker, welche im Vorfeld oder während des Analyse-Zeitraumes einen Myokardinfarkt hatten, eine geringere Mortalität aufwiesen sowie seltener erneut Myokardinfarkte erlitten, wenn sie mit Sildenafil behandelt wurden [117]. Diese vielversprechenden ersten klinischen Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass Sildenafil zumindest bei ausgewählten Patientengruppen einen möglichen Ansatz zur Verbesserung des Outcomes nach Myokardinfarkt darstellt. Um diese Frage weiter zu klären, sind jedoch weitere Studien mit größeren Patientenkohorten notwendig.

5.2.2 Zusammenwirken von Sildenafil und Milrinon

Im zweiten Versuchsteil konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination von protektiven Dosen Sil und Mil verglichen mit den jeweiligen Einzeldosen keine weitere Infarktgrößenreduktion bewirkt. Allerdings führte die kombinierte Gabe beider Substanzen in wesentlich niedrigeren, einzeln nicht protektiven Konzentrationen zu einer ebenso ausgeprägten Infarktgrößenreduktion. Die Erkenntnis, dass die Kombination von mehreren Substanzen in nicht-protektiven Dosen bereits kardioprotektive Eigenschaften besitzt, ist für die Übertragung in die Klinik bezüglich möglicher Ko-Medikationen und Nebenwirkungen von besonderer Bedeutung.

Für einige Substanzen und Konditionierungsstrategien, welche im experimentellen Setting eine vielversprechende Kardioprotektion zeigten, konnte in *Proof of concept* Studien zunächst der Nachweis erbracht werden, dass der myokardiale Schaden durch ihre Anwendung reduziert werden kann [118-120]. Groß angelegte randomisiert kontrollierte Multicenterstudien lieferten jedoch neutrale oder negative Ergebnisse für verschiedene Konditionierungsstrategien [59, 120-123].

Ein möglicher Ansatz, um trotz uneindeutiger klinischer Ergebnisse einen Transfer der Konditionierung in die Klinik zu ermöglichen, ist deshalb die Kombination von mehreren Konditionierungsstrategien. Hierzu gibt es bereits einige experimentelle sowie klinische Studien, die eben diese Kombinationen untersuchen. Yao Lu et al. konnten darlegen, dass die Kombination von einem einzelnen 5-minütigen Zyklus RIPC und niedrig dosiertem Morphin (0,1mg/kg Körpergewicht) eine ebenso ausgeprägte Infarktgrößenreduktion bewirkt wie drei entsprechende Zyklen RIPC. Sie schlussfolgerten, dass Morphin über Opioid- und mKATP-Rezeptoren die Effektschwelle der Kardioprotektion senkt [124]. Die einmalige Präkonditionierung mit dem kardioprotektiven Edelgas Helium [125, 126] in Kombination mit niedrig dosiertem Morphin erzeugte im Kaninchenherzen eine ebenso ausgeprägte Infarktgrößenreduktion wie die Applikation von drei Zyklen Helium allein. niedrige Dosis Morphin (0,1mg/kg) bewirkte allein jedoch keinen Diese kardioprotektiven Effekt. Außerdem wurde der ausgeprägte Effekt der Kombination von Morphin und Helium durch die Antagonisierung mit Naloxon vollständig aufgehoben [127]. Daraus lässt sich folgern, dass Morphin nicht nur die Konditionierungsschwelle der RIPC senkt [124], sondern ebenso die von Helium [127]. Ferner verstärkt die Kombination von Isofluran und höher dosiertem Morphin (0,3mg/kg) die Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu Isofluran oder Morphin allein [128].

Einen vielversprechenden Ansatz zur Erprobung der Kombination multipler kardioprotektiven Mechanismen verfolgten sechs französische Kliniken mit

54

Thoraxchirurgie in einer randomisierten prospektiven Studie. Sie kombinierten insgesamt fünf kardioprotektive perioperative Strategien bei Patienten, die für einen Eingriff an der Aortenklappe an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden mussten. Diese Patienten verglichen sie mit einer Gruppe, die keine Konditionierungsstrategien durchlief. Als kardioprotektive Strategien wählten die Autoren folgende Interventionen: inhalative Anästhesie mit Sevofluran, RIPC nach Anästhesieeinleitung mit drei 5minütigen Abfolgen von Auf- und Abpumpen einer Blutdruckmanschette am Oberarm, kontinuierliche intravenöse Insulin-Infusion, um eine Normoglykämie bei 140mg/dl sicherzustellen, Anpassung der Sauerstoffzufuhr an der Herz-Lungen-Maschine, sodass der Blut-pH 5 Minuten vor unclamping \leq 7,30 betrug und vorsichtige Reperfusion über einen Zeitraum von 2 Minuten nach unclamping. Als primären Endpunkt wählten die Autoren die 72 Stunden area under the curve des hoch sensiblen kardialen Troponin I. Die Kombination dieser Vielzahl an Konditionierungsmechanismen konnte jedoch für den gewählten primären Endpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigen [125]. Als wichtige Limitation dieser Studie ist die rein willkürliche Auswahl der Konditionierungsmechanismen zu nennen. Die jeweiligen Strategien werden über unterschiedliche Signalwege vermittelt und könnten sich gegenseitig aufheben.

Der Einsatz von Sil im perioperativen Umfeld findet in einer Vielzahl der Fälle bereits präoperativ statt. Eine Befragung von deutschen Krankenhäusern, welche koronare Bypass-Chirurgien durchführen, ergab, dass sich bei ca. 10% der Patienten bereits präoperativ eine PAH zeigt. Häufigste Ursache der PAH ist eine Linksherzinsuffizienz [128]. Die Patienten, bei denen die PAH bereits präoperativ therapiert wurde, erhielten in 71,1% Sil als orale Dauermedikation [129]. Somit kann erwartet werden, dass eine relevante Anzahl an Patienten bereits vor kardiochirurgischen Eingriffen mit Sil therapiert wird. Selbst Patienten, bei denen die PAH erst im Rahmen der präoperativen Untersuchungen diagnostiziert wird, sollen unmittelbar einer entsprechenden Therapie unterzogen werden [130]. Somit könnten mit Sil prämedizierte Patienten von einem möglichen additiven kardioprotektiven Effekt von Sil und Mil profitieren. Im Gegensatz dazu wird Mil häufig erst postoperativ nach Abgang von der Herz-Lungen-Maschine zur Steigerung der Inotopie eingesetzt. Aus diesen unterschiedlichen perioperativen Einsätzen von Sil und Mil ergibt sich die Grundlage in dieser Studie für die Untersuchung einer zeitlich getrennten Applikation von Sil als Prä- und Mil als Postkonditionierung.

Aufgrund des routinierten Einsatzes von Sil und Mil insbesondere bei kardiochirurgischen Patienten wäre eine mögliche Applikation kurz vor einem geplanten Koronararterienverschloss oder einer Bypassoperation sowie auch die postoperative Gabe von Mil zur Vermittlung eines kardioprotektiven Effektes durchaus denkbar (inhaltlich übernommen aus [1]).

Die Kardioprotektion von Mil wird vermittelt über cAMP-, PKA- und MAPK-Aktivierung [81]. Huang et al. zeigten 2011, dass die gleichzeitige intravenöse Applikation von Mil und dem β-Blocker Esmolol während der letzten 5 Minuten einer 30-minütigen Ischämie und den ersten 5 Minuten der darauffolgenden 4-stündigen Reperfusionsphase eine stärkere Infarktgrößenreduktion am Rattenherz bewirkt als die jeweils alleinige Gabe eines der beiden Medikamente. Diese Kardioprotektion wurde vollständig blockiert sowohl durch die Applikation eines PKA-Inhibitors (Rp-cAMPS), als auch bei Gabe eines AKT 1/2-Kinase-Inhibitors [129]. Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination verschiedener Konditionierungsstrategien ein geeigneter Ansatz ist, um den Ischämie-Reperfusionsschaden weiter zu minimieren [1]. Sowohl die Mil- als auch die Sil-vermittelte Infarktgrößenreduktion werden teilweise über die Aktivierung verschiedener mK⁺ Kanäle und die Öffnung der mPTP bewirkt [33, 83]. Als PDE III-Inhibitor wirkt Mil vornehmlich über eine Akkumulation von cAMP [75] mit darauffolgender PKA-Aktivierung [81], während Sil eine cGMP Ansammlung, PKG-Phosphorylierung und mK_{ATP} Kanal Öffnung bewirkt [33, 71]. Über einen Crosstalk zwischen PDEs in Kardiomyozyten [130] kann eine Aktivierung der PDE III und der daraus resultierende Anstieg an cGMP jedoch die Ausschüttung von cAMP modulieren [131]. Die Gabe von Sil kann somit indirekt über eine Erhöhung des cGMPs eine cAMP-Akkumulation und PKA-Phosphorylierung bewirken [130]. Durch die kombinierte Gabe mit Mil, welches ebenfalls zu einer PKA-Aktivierung führt, könnte somit eine ausreichend starke Aktivierung der mBK_{Ca}-Kanäle und damit ein kardioprotektiver Effekt erzielt werden (inhaltlich übernommen aus [1]).

Aufgrund der gemeinsamen Signalwege, über die die kardioprotektiven Effekte von Sil und Mil vermittelt werden. könnte eine Kombination dieser beiden Konditionierungsstrategien vielversprechender ein Ansatz sein. um die Infarktgrößenreduktion aus dem experimentellen Setting in den klinischen Alltag zu integrieren. Unsere Arbeit legt nah, dass bereits die Kombination von nicht-protektiven signifikante Reduktion Konzentrationen Sil und Mil eine des Ischämie-

56

Reperfusionsschadens bewirkt. Insbesondere in Anbetracht der Nebenwirkungsprofile beider Medikamente könnte die Applikation niedriger Dosen eine Reduktion möglicher unerwünschter Arzneimittelwirkungen minimieren. Es gilt, insbesondere Nebenwirkungen wie das Auftreten von ventrikulären Tachykardien [132] und der daraus resultierenden hämodynamischen Instabilität bestmöglich zu vermeiden. Die dosisabhängige Ausprägung vieler dieser Nebenwirkungen [133] müssen insbesondere bei der kombinierten Applikation beachtet werden. Die Erkenntnis, dass bereits die Kombination von niedrigen Konzentrationen ausreicht, um einen protektiven Effekt zu erzielen, könnte diesem Problem vorbeugen oder zumindest die Häufigkeit und Ausprägung dieser Nebenwirkungen reduzieren (inhaltlich übernommen aus [1]).

Bis eine Übertragung in den klinischen Alltag möglich ist, bedarf es jedoch noch einiger weiterer Forschung. Neben Erkenntnissen zur genauen Signaltransduktion der kombinierten Gabe von Sil und Mil müssen auch klinisch relevante Einflussfaktoren wie Alter, Komorbiditäten und Komedikationen erforscht werden.

Außerdem müsste eine mögliche Abschwächung oder Aufhebung der einzelnen kardioprotektiven Strategien weiter untersucht und für Sil und Mil ausgeschlossen werden. Eine Aufhebung kardioprotektiver Effekte ist insbesondere für das intravenöse Hypnotikum Propofol beschrieben. Behmenburg et al. konnten darlegen, dass die RIPC-vermittelte Infarktgrößenreduktion im *in vivo* Rattenmodell durch eine totale intravenöse Anästhesie mit Propofol vollständig aufgehoben wird [105]. Es wurde gezeigt, dass diese Hemmung der Infarktgrößenreduktion durch eine inhibierte Ausschüttung von humoralen Faktoren bewirkt wird [125]. Neben dem kardioprotektiven Effekt von RIPC wird auch die Mil-vermittelte Infarktgrößenreduktion durch eine Propofol-Narkose sowie durch die Applikation von Dexmedetomidin blockiert [126]. Dies sollte bei einer möglichen Übertragung in das klinische Umfeld unbedingt Beachtung finden. Eine volatile Narkose mit Sevofluran hingegen blockierte die Kardioprotektion von Milrinon nicht [126] und sollte bei einer möglichen klinischen Anwendung präferiert verwendet werden.

5.2.3 Hämodynamische Veränderungen

Sowohl in der Dosisfindungsstudie als auch bei der kombinierten Applikation von Sil und Mil zeigen unsere Ergebnisse, dass sich die Herzfrequenz, das RPP, LVPmax und LVPmin sowie der Koronarfluss zu keinem Zeitpunkt zwischen den einzelnen Gruppen unterscheiden. Der LVPmin war in allen Gruppen nach der Reperfusion signifikant erhöht und der Koronarfluss erniedrigt. Alle anderen Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Ischämie auf. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Untersuchungen der Kardioprotektion von Sildenafil [33] und Milrinon [83]. Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass Sildenafil in kardioprotektiver Dosis sowie die Kombination von Sil und Mil zumindest kurzzeitig weder einen negativen noch einen positiven Einfluss auf die kardiale Funktionsfähigkeit haben. Dieses könnte bedeuten, dass die antiischämische Therapie mit Sildenafil und Milrinon in diesen Konzentrationen keine kreislaufrelevanten Nebenwirkungen aufweist, müsste jedoch in ausführlicheren klinischen Studien geprüft werden.

Ein möglicher Ansatz, um die isolierte Verbesserung der Infarktgröße, nicht aber der hämodynamischen Parameter zu erklären, ist das sogenannte myocardial stunning [134]. Dieser Begriff bezeichnet den Zustand des Myokards, welches nach vorrübergehender myokardialer Ischämie eine reversible kontraktile Dysfunktion erleidet. Der Blutfluss ist währenddessen bereits fast vollständig wiederhergestellt und es kommt zu keiner metabolischen Verschlechterung [135]. Nach Koronararterienverschluss fällt die myokardiale ATP-Konzentration, sobald die Kreatinphosphat-Speicher aufgebraucht sind [136]. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Metaboliten wie Adenosin, Hypoxanthin und Inosin [137], welche während der Reperfusion aus dem Myokard gewaschen werden. Da die Erholung des Myokards parallel zur Erholung der ATP Spiegel erfolgt, scheint zumindest ein Faktor, der das myocardial stunning bedingt, die Regeneration der ATP Speicher zu sein [134]. Weitere Elemente, welche das myocardial stunning bedingen, sind die Freisetzung freier Radikale [138], erhöhte Calcium-Spiegel [139] sowie autoregulatorische Einflüsse [140]. Im Gegensatz zur abrupten Ischämie, wie sie in den vorliegenden Versuchen Anwendung findet, scheint eine graduelle Ischämie der Akinesie des Myokards vorzubeugen [141]. Konditionierungsmechanismen wie RIPC zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse zur Reduktion des myocardial stunning [142].

Sowohl in der Dosisfindungsstudie als auch in den Untersuchungen zum Zusammenwirken von Sil und Mil fiel die Druckentwicklung im linken Ventrikel zum Zeitpunkt der Ischämie auf 0 mmHg und erholte sich im Laufe der Reperfusion nur langsam, erreichte jedoch nicht ihren Ausgangswert. Um die vollständige Wiederherstellung der linksventrikulären Funktion zu beobachten, hätte die Reperfusionsphase im Versuchsablauf deutlich länger dauern müssen. Da bei Verwendung von zellfreien Perfusaten die Funktion des Herzens über einen längeren Zeitraum abnimmt (siehe Kapitel 5.1.2 Krebs-Henseleit-Puffer) und die Beobachtung der linksventrikulären Funktion nicht zu den primären Endpunkten gehörte, wurde hiervon abgesehen. Außerdem konnte von Ferrera et al. gezeigt werden, dass sich bei Verlängerung der Reperfusionszeit von 60 auf 120 Minuten keine verbesserte Hämodynamik zeigt und die Infarktgröße, welche den Goldstandard als primären Endpunkt darstellt, durch eine längere Reperfusionsdauer nicht beeinflusst wird [143].

5.3 Limitierungen

Eine wichtige Limitierung dieser Arbeit stellt die generell schwierige Übertragbarkeit von experimentellen Tierversuchsstudien in den klinischen Alltag dar. Somit können die Ergebnisse dieser Arbeit ohne weiterführende Untersuchungen lediglich als Hinweis auf eine mögliche Anwendbarkeit in der Klinik interpretiert werden. Außerdem müssen die Eigenheiten der Spezies Ratte und ihrer Myokardphysiologie beachtet werden, wenn eine Übertragung auf andere Spezies erfolgen soll. Die isolierte Betrachtung des perfundierten Herzen nach Langendorff hat zwar den Vorteil, dass sie eine Vielzahl an Störfaktoren wie vegetative oder neuronale Einflüsse ausschließt, andererseits wäre es denkbar, dass eben jene den Effekt der Präkonditionierung vollständig aufheben. Außerdem können verschiedene Pathomechanismen in diversen Spezies dafür sorgen, dass einerseits die Konditionierung mit Sildenafil oder Milrinon generell ihre Wirkung verliert oder abgeschwächt wird, andererseits aber auch der kombinierte Effekt nicht auftritt.

Eine weitere Limitierung besteht in der Auswahl der Versuchstiere. Während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich männliche, junge und gesunde Versuchstiere ausgewählt wurden, treten die ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt in der Regel bei älteren Patienten auf [62]. Um zunächst den isolierten kardioprotektiven

Effekt von Sil und Mil unabhängig von Störfaktoren wie Alter und Komorbidität beurteilen zu können, wurde jedoch auf diese Versuchstier-Kohorte zurückgegriffen. Bevor ein Transfer der vorliegenden Ergebnisse in die Klinik möglich erscheint, sollten jedoch zunächst Folgestudien mit Untersuchung der Substanzen sowie beteiligten Signalkaskaden an alten Versuchstieren und unter dem Einfluss verschiedener Komorbiditäten durchgeführt werden.

5.4 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Präkonditionierung mit dem PDE-V-Inhibitor Sildenafil einen starken, konzentrationsabhängigen Stimulus zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens darstellt und diese durch die Sättigung der beteiligten Rezeptoren nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip funktioniert. Außerdem erwies sich, dass die Kombination von Sildenafil und Milrinon in niedrigen, nicht-protektiven Konzentrationen eine ebenso ausgeprägte Infarktgrößenreduktion erzielt wie die Gabe deutlich höherer, protektiver Konzentrationen.

Die kombinierte Applikation verschiedener Konditionierungsstimuli könnte einerseits den Transfer der Infarktgrößenreduktion in die Klinik ermöglichen, andererseits durch Gabe niedrigerer Dosen das Auftreten von möglichen kreislaufrelevanten Nebenwirkungen reduzieren. Bis eine Gabe von Sildenafil und Milrinon als kardioprotektive Therapie im klinischen Alltag Anwendung finden kann, bedarf es jedoch klinischer Studien zu den Einflüssen auf die Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens und den beteiligten Signalwegen.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Torregroza, C., et al., *Combination of the Phosphodiesterase-Inhibitors Sildenafil and Milrinone Induces Cardioprotection with Various Conditioning Strategies.* J Cardiovasc Pharmacol, 2020.
- 2. (Destatis), S.B., *Sterbefälle 2017 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10.* 2019. Fachserie 12 Reihe 4.
- 3. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
- 4. Müllenheim, J., *Mechanismen der myokardialen Präkonditionierung und ihre Beeinflussung durch Anästhetika*. GCA-Verlag, 2005: p. 3.
- 5. Cohen, M.V. and J.M. Downey, *Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future.* Br J Pharmacol, 2015. **172**(8): p. 1913-32.
- 6. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release.* J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
- 7. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.* Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
- 8. Neri, M., et al., *Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists.* Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 7018393.
- 9. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
- 10. Hurst, S., J. Hoek, and S.S. Sheu, *Mitochondrial Ca(2+) and regulation of the permeability transition pore*. J Bioenerg Biomembr, 2017. **49**(1): p. 27-47.
- 11. McPherson, C.D., G.N. Pierce, and W.C. Cole, *Ischemic cardioprotection by ATP-sensitive K+ channels involves high-energy phosphate preservation*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 2): p. H1809-18.
- Grover, G.J., et al., Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(4): p. H1747-55.
- 13. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
- 14. Heusch, G., et al., *Remote ischemic conditioning*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(2): p. 177-95.
- 15. Jovanovic, A., *Cardioprotective signalling: Past, present and future.* Eur J Pharmacol, 2018. **833**: p. 314-319.
- 16. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
- 17. Liu, Y. and J.M. Downey, *Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1107-12.
- 18. Schott, R.J., et al., *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium*. Circ Res, 1990. **66**(4): p. 1133-42.

- 19. Tanoue, Y., et al., *Cardioprotective effect of ischemic preconditioning on global myocardial ischemia in a sheep right heart bypass model.* Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **50**(1): p. 23-9.
- 20. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
- 21. Andreka, G., et al., *Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs.* Heart, 2007. **93**(6): p. 749-52.
- 22. Saxena, P., et al., *Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application.* J Card Surg, 2010. **25**(1): p. 127-34.
- 23. Liu, G.S., et al., *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart.* Circulation, 1991. **84**(1): p. 350-6.
- 24. Liu, Y., et al., *Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(3): p. 883-92.
- 25. Wall, T.M., R. Sheehy, and J.C. Hartman, *Role of bradykinin in myocardial preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(2): p. 681-9.
- 26. Schultz, J.E., et al., *Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts.* Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 2): p. H2157-61.
- 27. Cope, D.K., et al., *Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction*. Anesthesiology, 1997. **86**(3): p. 699-709.
- 28. Chiari, P.C., et al., *Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits.* Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 102-9.
- 29. Yang, X.M., et al., *Triple therapy greatly increases myocardial salvage during ischemia/reperfusion in the in situ rat heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 2013. **27**(5): p. 403-12.
- 30. Stroethoff, M., et al., Impact of Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning. Cardiovasc Drugs Ther, 2019. **33**(5): p. 581-588.
- 31. Torregroza, C., et al., Activation of PKG and Akt Is Required for Cardioprotection by Ramelteon-Induced Preconditioning and Is Located Upstream of mKCa-Channels. Int J Mol Sci, 2020. 21(7).
- 32. Di Napoli, P., et al., Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. Cardiovasc Res, 2001. **51**(2): p. 283-93.
- 33. Behmenburg, F., et al., Impact of Mitochondrial Ca2+-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144737.
- 34. Sesti, C., et al., *The phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil reduces myocardial infarct size*. Int J Impot Res, 2007. **19**(1): p. 55-61.
- 35. Salloum, F.N., et al., Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(2): p. 453-8.
- 36. Raupach, A., et al., *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms.* J Clin Med, 2019. **8**(4).
- 37. Rump, A.F., et al., *Beneficial effect of amrinone on the size of acute regional ischemia in isolated rabbit hearts.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 1993. **7**(5): p. 573-8.
- 38. Li, H.Y., Sodium-glucose Cotransporter 2 Inhibitors- a Drug with Anti-diabetic and Cardioprotective Properties. J Diabetes Investig, 2020.
- 39. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning.* Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
- 40. Newton, A.C., C.E. Antal, and S.F. Steinberg, *Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(17): p. 1499-510.
- 41. Nunez, R.E., S. Javadov, and N. Escobales, *Angiotensin II-preconditioning is associated with increased PKCepsilon/PKCdelta ratio and prosurvival kinases in mitochondria*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017. **44**(12): p. 1201-1212.
- 42. Le Good, J.A., et al., *Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3kinase through the protein kinase PDK1*. Science, 1998. **281**(5385): p. 2042-5.
- Ketaki Datta, A.B., Tung O. Chan, and Philip N. Tsichlis, *Akt Is a Direct Target of the Phosphatidylinositol 3-Kinase.* The Journal of Biological Chemistry, 1996.
 271(November 29): p. 30835–30839.
- 44. Abdallah, Y., et al., Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenationinduced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca2+ storage. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 346-53.
- 45. Yellon, D.M. and G.F. Baxter, *Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury?* Trends Cardiovasc Med, 1999. **9**(8): p. 245-9.
- 46. Lecour, S., Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
- 47. Davidson, S.M., et al., *Signalling via the reperfusion injury signalling kinase* (*RISK*) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 414-9.
- 48. Boengler, K., et al., Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(6): p. 771-85.
- 49. Zhao, Y., et al., Cardioprotective Effects of Transfusion of Late-Phase Preconditioned Plasma May Be Induced by Activating the Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway but Not the Survivor Activating Factor Enhancement Pathway in Rats. Oxid Med Cell Longev, 2017. 2017: p. 8526561.
- 50. Holmuhamedov, E.L., et al., *Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels modulate cardiac mitochondrial function*. Am J Physiol, 1998. **275**(5): p. H1567-76.
- 51. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective signaling to mitochondria*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 858-66.
- 52. Sanada, S., et al., *Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C.* Circulation, 2004. **110**(1): p. 51-7.
- 53. Han, J., et al., *ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(4): p. H1545-54.
- 54. Bentzen, B.H., et al., Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury. Pflugers Arch, 2009. **457**(5): p. 979-88.

- 55. Gollasch, M., et al., *K*+ *currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells*. Circulation Research, 1996. **78**(4): p. 676-688.
- 56. Leblanc, N., X. Wan, and P.M. Leung, *Physiological role of Ca(2+)-activated and voltage-dependent K+ currents in rabbit coronary myocytes*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 1): p. C1523-37.
- 57. Torregroza, C., et al., *Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches.* Anesth Analg, 2020. **131**(6): p. 1765-1780.
- 58. Roth, S., et al., *Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
- 59. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
- 60. Ney, J., et al., Remote Ischemic Preconditioning Does Not Affect the Release of Humoral Factors in Propofol-Anesthetized Cardiac Surgery Patients: A Secondary Analysis of the RIPHeart Study. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
- 61. Kottenberg, E., et al., *Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol a clinical trial.* Acta Anaesthesiol Scand, 2012. **56**(1): p. 30-8.
- 62. Devlin, W., et al., Comparison of outcome in patients with acute myocardial infarction aged > 75 years with that in younger patients. Am J Cardiol, 1995. **75**(8): p. 573-6.
- 63. Abete, P., et al., *Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart.* J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(7): p. 1777-86.
- 64. Behmenburg, F., et al., *Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2017. **31**(4): p. 1223-1226.
- 65. Liu, L., et al., *Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A*. Acta Anaesthesiol Scand, 2011. **55**(5): p. 622-30.
- 66. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A.* Exp Gerontol, 2012. **47**(1): p. 116-21.
- 67. Hausenloy, D.J., et al., Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. Cardiovasc Res, 2017. **113**(6): p. 564-585.
- 68. Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent.* J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112.
- 69. Doring, H.J., *The isolated perfused heart according to Langendorff techniquefunction--application.* Physiol Bohemoslov, 1990. **39**(6): p. 481-504.
- 70. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1895. **61**: p. 291-332.
- 71. Li, L., et al., *Structure-Based Discovery of PDEs Inhibitors*. Curr Top Med Chem, 2016. **16**(9): p. 917-33.
- 72. Boswell-Smith, V., D. Spina, and C.P. Page, *Phosphodiesterase inhibitors*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S252-7.
- 73. Soderling, S.H. and J.A. Beavo, *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.* Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 174-9.
- 74. Joel A. Kaplan, D.L.R., Joseph S. Savino, *Pharmacologic Management of Ventricular Dysfunction*. Section V Extracorporal Circulation, 2011: p. 996-1001.

- 75. Satoh, H. and M. Endoh, *Effects of a new cardiotonic 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**(2): p. 215-24.
- 76. Krishnappa, P., et al., *Sildenafil/Viagra in the treatment of premature ejaculation*. Int J Impot Res, 2019. **31**(2): p. 65-70.
- 77. Joel A. Kaplan, D.L.R., Joseph S. Savino, *Treatment Options for Pulmonary Arterial Hypertension*. Section IV Anesthesia and Transesophageal Echocardiogrpahy for Cardiac Surgery, 2011: p. 781-786.
- 78. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H1263-9.
- Salloum, F., et al., Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. Circ Res, 2003. 92(6): p. 595-7.
- 80. Walavalkar, V., et al., *Preoperative Sildenafil administration in children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled preconditioning study.* Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **49**(5): p. 1403-10.
- 81. Sanada, S., et al., Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogenactivated protein kinase. Circulation, 2001. **104**(6): p. 705-10.
- 82. Ludmer, P.L., et al., Separation of the direct myocardial and vasodilator actions of milrinone administered by an intracoronary infusion technique. Circulation, 1986. **73**(1): p. 130-7.
- 83. Behmenburg, F., et al., *Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation* of *Mitochondrial Ca(2+)-sensitive Potassium (mBKCa) Channels*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2018. **32**(5): p. 2142-2148.
- 84. Ikegami, T., et al., *Experimental study of a type 3 phosphodiesterase inhibitor on liver graft function*. Br J Surg, 2001. **88**(1): p. 59-64.
- 85. Nishiki, T., et al., *Effect of milrinone on ischemia-reperfusion injury in the rat kidney*. Transplant Proc, 2011. **43**(5): p. 1489-94.
- 86. Mutoh, T., et al., *Acute cardiac support with intravenous milrinone promotes recovery from early brain injury in a murine model of severe subarachnoid haemorrhage.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017. **44**(4): p. 463-469.
- 87. Kukreja, R.C., *Sildenafil and cardioprotection*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(39): p. 6842-7.
- 88. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **55**(2): p. 113-26.
- 89. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 867-78.
- 90. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 613-27.
- 91. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
- 92. Stone, G.W., et al., *Relationship Between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI: Patient-Level Analysis From 10 Randomized Trials.* J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(14): p. 1674-83.

- 93. Wu, E., et al., Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index: prospective cohort study. Heart, 2008. **94**(6): p. 730-6.
- 94. Avkiran, M. and M.J. Curtis, *Independent dual perfusion of left and right coronary arteries in isolated rat hearts*. Am J Physiol, 1991. **261**(6 Pt 2): p. H2082-90.
- 95. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(2): p. H156-67.
- 96. Hans Adolf Krebs, K.H., Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Klinische Wochenschrift 11. Jahrgang Nr. 18, 1932.
- 97. Vogel, W.M., A.W. Cerel, and C.S. Apstein, *Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran.* J Mol Cell Cardiol, 1986. **18**(12): p. 1207-18.
- 98. Walters, H.L., 3rd, et al., *The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations.* J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(10): p. 1063-77.
- 99. Bratkovsky, S., et al., *Measurement of coronary flow reserve in isolated hearts from mice*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(2): p. 167-72.
- 100. Schmitz-Spanke, S., et al., [The isolated rabbit heart: comparison between five different modifications]. Herz, 2002. 27(8): p. 803-13.
- 101. Bing, R.J., *Some aspects of biochemistry of myocardial infarction.* Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(3): p. 351-5.
- 102. Fukunami, M. and D.J. Hearse, *The inotropic consequences of cooling: studies in the isolated rat heart*. Heart Vessels, 1989. **5**(1): p. 1-9.
- 103. Khaliulin, I., et al., Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. J Physiol, 2007. 581(Pt 3): p. 1147-61.
- 104. Yellon, D.M., et al., *The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(8): p. 895-907.
- 105. Hearse, D.J. and F.J. Sutherland, *Experimental models for the study of cardiovascular function and disease*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 597-603.
- 106. Behmenburg, F., et al., Impact of Anesthetic Regimen on Remote Ischemic Preconditioning in the Rat Heart In Vivo. Anesth Analg, 2018. **126**(4): p. 1377-1380.
- 107. Agency, E.M., *Revatio: EPAR Scientific Discussion.* https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/revatio-eparscientific-discussion en.pdf, Zugriff am 08.06.2022, 2006.
- 108. M.M. Hoeper, H.A.G., M. Gorenflo, E. Grünig, S. Rosenkranz, D. Schranz, *Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie - Europäische Leitlinien*. Der Kardiologe, 2009.
- 109. Nichols, D.J., G.J. Muirhead, and J.A. Harness, *Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality.* Br J Clin Pharmacol, 2002. **53 Suppl 1**: p. 5S-12S.
- 110. Takimoto, E., et al., *Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy.* Nat Med, 2005. **11**(2): p. 214-22.
- 111. Tantini, B., et al., *Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(2): p. 131-8.

- Salloum, F.N., et al., Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008.
 294(3): p. H1398-406.
- 113. Reffelmann, T. and R.A. Kloner, *Effects of sildenafil on myocardial infarct size*, *microvascular function, and acute ischemic left ventricular dilation*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 441-9.
- 114. Galie, N., et al., 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Respir J, 2015. **46**(4): p. 903-75.
- 115. Redfield, M.M., et al., *Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial.* JAMA, 2013. **309**(12): p. 1268-77.
- 116. Belyavskiy, E., et al., Phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil in patients with heart failure with preserved ejection fraction and combined pre- and postcapillary pulmonary hypertension: a randomized open-label pilot study. BMC Cardiovasc Disord, 2020. 20(1): p. 408.
- 117. Anderson, S.G., et al., *Phosphodiesterase type-5 inhibitor use in type 2 diabetes is associated with a reduction in all-cause mortality.* Heart, 2016. **102**(21): p. 1750-1756.
- 118. Frassdorf, J., et al., Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(6): p. 1436-42, 1442 e1-2.
- Bein, B., et al., *The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol.* Anaesthesia, 2008. 63(10): p. 1046-55.
- 120. Roth, S., et al., *Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications*. Anesth Analg, 2020. **131**(6): p. 1751-1764.
- 121. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
- 122. Hong, D.M., et al., Does remote ischaemic preconditioning with postconditioning improve clinical outcomes of patients undergoing cardiac surgery? Remote Ischaemic Preconditioning with Postconditioning Outcome Trial. Eur Heart J, 2014. 35(3): p. 176-83.
- Ottani, F., et al., Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. J Am Coll Cardiol, 2016. 67(4): p. 365-374.
- 124. Lu, Y., et al., *Morphine reduces the threshold of remote ischemic preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury in rats: the role of opioid receptors.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012. **26**(3): p. 403-6.
- 125. Heinen, A., et al., *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) -sensitive potassium channel activation.* Anesthesiology, 2008. **109**(5): p. 830-6.
- 126. Pagel, P.S., et al., *The mechanism of helium-induced preconditioning: a direct role for nitric oxide in rabbits.* Anesth Analg, 2008. **107**(3): p. 762-8.

- 127. Pagel, P.S., et al., Morphine reduces the threshold of helium preconditioning against myocardial infarction: the role of opioid receptors in rabbits. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009. 23(5): p. 619-24.
- 128. Ludwig, L.M., et al., Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. Anesthesiology, 2003. **98**(3): p. 705-11.
- Huang, M.H., et al., *Heart protection by combination therapy with esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011.
 25(3): p. 223-32.
- 130. Zaccolo, M. and M.A. Movsesian, *cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology.* Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1569-78.
- 131. Stangherlin, A., et al., *cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes.* Circ Res, 2011. **108**(8): p. 929-39.
- 132. Chong, L.Y.Z., et al., *Milrinone Dosing and a Culture of Caution in Clinical Practice.* Cardiol Rev, 2018. **26**(1): p. 35-42.
- 133. Goldstein, I., et al., Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1397-404.
- 134. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction.* Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
- 135. Vaidya, Y., S.M. Cavanaugh, and A.S. Dhamoon, *Myocardial Stunning and Hibernation*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
- 136. DeBoer, L.W., et al., *Prolonged derangements of canine myocardial purine metabolism after a brief coronary artery occlusion not associated with anatomic evidence of necrosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(9): p. 5471-5.
- 137. Fox, A.C., et al., *Release of nucleosides from canine and human hearts as an index of prior ischemia.* Am J Cardiol, 1979. **43**(1): p. 52-8.
- 138. Bolli, R. and P.B. McCay, Use of spin traps in intact animals undergoing myocardial ischemia/reperfusion: a new approach to assessing the role of oxygen radicals in myocardial "stunning". Free Radic Res Commun, 1990. **9**(3-6): p. 169-80.
- 139. Marban, E., et al., *Quantification of [Ca2+]i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion.* Circ Res, 1990. **66**(5): p. 1255-67.
- 140. Parajuli, P. and A. Goyal, *Stunned Myocardium*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
- 141. Ito, B.R., Gradual onset of myocardial ischemia results in reduced myocardial infarction. Association with reduced contractile function and metabolic downregulation. Circulation, 1995. **91**(7): p. 2058-70.
- 142. Hoole, S.P., et al., *Remote ischaemic pre-conditioning does not attenuate ischaemic left ventricular dysfunction in humans*. European Journal of Heart Failure, 2009. **11**(5): p. 497-505.
- 143. Ferrera, R., et al., One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. Cardiovasc Drugs Ther, 2009.
 23(4): p. 327-31.

Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Pannen für die Möglichkeit, in seiner Klinik für Anästhesiologie eine Dissertation zu absolvieren.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Dr. Huhn-Wientgen und PD Dr. Dr. Heinen für die Überlassung des Themas und die konstruktive und bereichernde Betreuung bedanken. Frau PD Dr. Annika Raupach danke ich für die persönliche, direkte Betreuung im Labor und das Feedback sowie Problemlösungen zu jeder Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dr. Carolin Torregroza. Vielen Dank für die Geduld, die Du immer mit mir hattest, die Stunden, die du damit verbracht hast, mich weiterzubringen und dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest!

Birgitt Berke und Claudia Dohle möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und jegliche Hilfestellung im Labor danken.

Meinem Mann Lukas danke ich für die seelische Unterstützung über all die Jahre. Danke, dass Du mich in jeder Lebenslage unterstützt und immer weißt, wie Du micht aufmuntern kannst. Ohne Deine fortlaufende Motivation und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken. Euer unerschütterlicher Glaube an mich hat mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Danke, dass Ihr mir den Weg geebnet und diese Dissertation ermöglicht habt.