

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

Der Mechanismus der Dexmedetomidin-induzierten
pharmakologischen Postkonditionierung an isolierten Rattenherzen
am Langendorff-Modell

Dissertation

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

vorgelegt von

Elif Karakurt

2023

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter/in: Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere die ischämische Herzerkrankung, zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Reperfusion nach einem ischämischen Ereignis kann im entsprechenden Organ neben einer Besserung des Gewebezustandes auch zu zusätzlichen Zellschäden führen. Dabei können durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Erhöhung der Endothelpermeabilität und Ödembildung intrazelluläre Schäden verursacht werden. Eine Protektion des Herzens vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) kann durch eine pharmakologische Postkonditionierung erzielt werden. Im Rahmen einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass eine Behandlung mit dem α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten Dexmedetomidin (Dex) als Postkonditionierung die Herzen vor einem I/R-Schaden schützt, wobei die Protektion unabhängig von dem Zeitpunkt und der Dauer der Dex-Gabe während der Reperusionsphase ist. Der mitochondriale ATP-aktivierende (mK_{ATP}) und der Calcium-aktivierende Kaliumkanal (mK_{Ca}) spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des kardioprotektiven Effekts von verschiedenen Pharmaka, indem sie die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) hemmen. Für die Dex-induzierte Präkonditionierung konnte gezeigt werden, dass die kardioprotektive Wirkung durch einen mK_{Ca} -Kanallocker aufgehoben wird, was auf eine Beteiligung dieser Kanäle hinweist. Folglich untersucht diese Arbeit, ob eine Kardioprotektion durch Behandlung mit Dex zu unterschiedlichen Phasen der Reperfusion durch mK_{ATP} und/oder mK_{Ca} vermittelt wird.

Diese tierexperimentelle Studie wurde an isolierten Herzen von 2 Monate alten Wistar-Ratten durchgeführt. Für die Durchführung der Organentnahme lag eine Erlaubnis (Aktenzeichen: O27/12) der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf vor. Die Rattenherzen wurden mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Pufferlösung bei einem konstanten Druck von 80 mmHg retrograd über die Aorta perfundiert, nachdem an sie an einer Langendorff-Anlage angeschlossen wurden. Die isolierten Herzen durchliefen eine globale Ischämiephase von 33 Minuten, gefolgt von einer Reperusionsphase von 60 Minuten. Eine 10-minütige Behandlungsphase, als Postkonditionierung, wurde direkt (früh) oder 30 Minuten (spät) nach Beginn der Reperfusion begonnen. Die Versuchstiere wurden in neun Gruppen randomisiert (je Gruppe $n = 10$). Die Kontrollherzen (Con) erhielten zu den beiden Phasen nur Krebs-Henseleit-Pufferlösung. In der frühen Behandlungsphase wurden die Herzen alleine mit 3 nM Dex, 100 μ M mK_{ATP} -Kanallocker (5-Hydroxydecanoat (5HD)), 1 μ M mK_{Ca} -Kanallocker (Paxillin (Pax)) oder mit entsprechenden Kombinationen (5HD + Dex, Pax + Dex) behandelt. Die Versuchsgruppen der späten Behandlungsphase erhielten Dex alleine (Dex30') oder in Kombination mit den entsprechenden Blockern (5HD + Dex30', Pax + Dex30'). Im Anschluss wurden die Herzen mit 0,75% Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung gefärbt und die Infarktgröße mittels planimetrischer Messung bestimmt. Die hämodynamischen Parameter wurden während der Versuche aufgezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte über ein- und zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und einen Tukey-Post-hoc-Test ($p < 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Während der frühen Behandlungsphase wurde die Dex-induzierte kardioprotektive Wirkung, gezeigt als Infarktgrößenreduktion (Con: $57 \pm 9\%$, Dex: $31 \pm 7\%$; $p < 0,0001$ vs. Con), durch 5HD (5HD + Dex: $52 \pm 6\%$; $p < 0,0001$ vs. Dex) und Pax (Pax + Dex: $53 \pm 4\%$; $p < 0,0001$ vs. Dex) vollständig aufgehoben. Die alleinige Gabe der beiden Blocker hatte dagegen keinen Einfluss auf die Infarktgröße (5HD: $54 \pm 8\%$, Pax: $53 \pm 11\%$). Während der späten Behandlungsphase wurde die Infarktgrößenreduktion von Dex (Dex30': $33 \pm 10\%$, $p < 0,0001$ vs. Con) durch Pax (Pax + Dex30': $58 \pm 7\%$, $p < 0,0001$ vs. Dex30') vollständig aufgehoben.

Die Dex-vermittelte Kardioprotektion wurde durch Gabe von 5HD in der späten Reperfusion nicht blockiert (5HD + Dex30': $36 \pm 7\%$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass während der frühen Phase der Reperfusion eine Kardioprotektion durch Dex-Gabe über mK_{ATP} und mK_{Ca} vermittelt wird. Im Gegensatz dazu scheint in der späten Phase der Reperfusion die kardioprotektive Wirkung über den mK_{Ca} , nicht jedoch über den mK_{ATP} induziert zu werden.

Abstract

Cardiovascular diseases, especially ischemic heart disease, are among the leading causes of death worldwide. Restored reperfusion after an ischemic event can lead to additional cell damage in the corresponding organ in addition to improvement of tissue condition. Intracellular damage may be caused by the release of reactive oxygen species, activation of neutrophil granulocytes, increase in endothelial permeability, and edema formation. Protection of the heart from Ischemia-Reperfusion (I/R)-Injury can be achieved by pharmacological postconditioning. A previous study by our group found that treatment with the α 2-adrenoreceptor agonist dexmedetomidine (Dex) as postconditioning protected hearts from I/R-Injury. Interestingly cardioprotection was independent of the timing and duration of Dex administration during the reperfusion phase. The mitochondrial ATP-activating (mK_{ATP}) and calcium-activating potassium (mK_{Ca}) channels play important roles in mediating the cardioprotective effect of various drugs by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). To date, only preconditioning studies with Dex have demonstrated that the cardioprotective effect was abrogated by an mK_{Ca} channel blocker, suggesting the involvement of these channels. Consequently, this work investigates whether cardioprotection by treatment with Dex is mediated by mK_{ATP} and/or mK_{Ca} at different stages of reperfusion.

This experimental animal study was performed on isolated hearts from 2-month-old Wistar rats. Permission (file number: O27/12) for organ harvesting was given by the Central Facility for Animal Research and Scientific Animal Welfare (ZETT), University Hospital Düsseldorf. The isolated hearts were connected to a Langendorff device and perfused retrogradely via the aorta with modified Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. All hearts underwent a 33-minute global ischemia followed by a 60-minute reperfusion phase. A 10-minute treatment phase, as postconditioning, was started immediately (early) or 30 minutes (late) after the onset of reperfusion. The experimental animals were randomized into nine groups ($n = 10$ per group). Control hearts (Con) received only Krebs-Henseleit buffer during the two phases. In the early treatment phase, hearts were treated with 3 nM Dex alone, 100 μ M mK_{ATP} channel blocker (5-hydroxydecanoate (5HD)), 1 μ M mK_{Ca} channel blocker (paxillin (Pax)), or appropriate combinations (5HD + Dex, Pax + Dex). Hearts in the late treatment phase groups received Dex alone (Dex30') or in combination with the corresponding blockers (5HD + Dex30', Pax + Dex30'). Hearts were then stained with 0.75% triphenyltetrazolium chloride solution and the infarct size was measured planimetrically. Throughout the experiment, hemodynamic parameters were noted. Statistical analysis was performed by one- and two-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm standard deviation. During the early treatment-phase, Dex-induced cardioprotection, measured by infarct size reduction (Con: $57 \pm 9\%$, Dex: $31\% \pm 7\%$; $p < 0.0001$ vs. Con) was completely abolished by 5HD (5HD + Dex: $52 \pm 6\%$; $p < 0.0001$ vs. Dex) and Pax (Pax + Dex: $53 \pm 4\%$; $p < 0.0001$ vs. Dex), whereas neither blocker alone had any effect on infarct size (5HD: $54 \pm 8\%$, Pax: $53 \pm 11\%$). During the late treatment phase, the infarct size reduction of Dex (Dex30': $33 \pm 10\%$, $p < 0.0001$ vs Con) was fully blocked by Pax (Pax + Dex30': $58 \pm 7\%$, $p < 0.0001$ vs Dex30'), whereas 5HD treatment had no effect on Dex-induced cardioprotection (5HD + Dex30': $36 \pm 7\%$).

The results suggest that during the early phase of reperfusion, cardioprotection is mediated by Dex administration through mK_{ATP} and mK_{Ca} . In contrast, during the late phase of reperfusion, the cardioprotective effect appears to be induced via mK_{Ca} but not by mK_{ATP} .

Abkürzungsverzeichnis

5HD	5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz
AAR	Area at Risk
ACS	akutes Koronarsyndrom
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCS	chronisches Koronarsyndrom
CF	Koronarfluss
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK-MB	Kreatinkinase in Herzmuskelzellen
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con	Kontrollgruppe
cTnI	kardiales Troponin C
cTnT	kardiales Troponin T
Dex	Dexmedetomidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
ERK p42/p44	Extrazellulär regulierte Kinasen p42/p44
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FWOP	<i>First Window of Preconditioning</i>
Glu	Glucose
gp130	Glykoprotein gp130
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3β	Glykogensynthasekinase-3β
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HMGB1	High-Mobility Group Protein B1
I/R-Schaden	Ischämie-Reperfusionsschaden
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL6	Interleukin-6
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPostC	ischämische Postkonditionierung
IS-Peak	Ischämie-Maximum
Jak	Januskinase
K ⁺	Kalium-Ion
K _{ATP}	ATP-gesteuerter Kalium-Kanal
K _{Ca}	Calcium-aktivierender Kalium-Kanal

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
KHP	Krebs-Henseleit-Pufferlösung
Lac	Laktat
LVDP	linksventrikulärer Druck
MAD	mittlerer arterieller Druck
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MI	Myokardinfarkt
mK _{ATP}	mitochondrialer ATP-sensitiver Kalium-Kanal
mK _{Ca}	mitochondrialer Calcium-sensitiver Kalium-Kanal
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
NPR	natriuretischer Peptidrezeptor
O ₂	Sauerstoff
P70S6K	Ribosomale-p70S6-Kinase
Pax	Paxillin
PCI	perkutane Koronarintervention
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC _ε	Proteinkinase C-epsilon
PKG	Proteinkinase G
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PPostC	pharmakologische Postkonditionierung
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
RIPostC	<i>Remote Ischemic Postconditioning</i>
RISK	Reperfusion-Injury-Salvage-Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAFE	<i>Survival-Activating-Factor-Enhancement</i>
sarK _{ATP}	sarkolemmaler ATP-gesteuerte Kalium-Kanal
SD	Standardabweichung
SERCA	sarko-/endoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription-Protein 3
SWOP	<i>Second Window of Preconditioning</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

TNF-R	TNF-Rezeptor
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen. Weitere Abkürzungen werden im Text erläutert. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzerkrankung	1
1.2	Kardioprotektion	2
1.2.1	Ischämie-Reperfusionsschaden	2
1.2.2	Ischämische Prä- und Postkonditionierung	5
1.2.3	Pharmakologische Postkonditionierung	9
1.3	Dexmedetomidin	9
1.4	Mitochondriale Kalium-Kanäle und -Blocker	11
1.4.1	Mitochondrialer ATP-sensitiver Kalium-Kanal (mK _{ATP})	11
1.4.2	mK _{ATP} -Blocker: 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz	11
1.4.3	Mitochondrialer Calcium-sensitiver Kalium-Kanal (mK _{Ca})	12
1.4.4	mK _{Ca} -Blocker: Paxillin	12
1.5	Ziele und Fragestellung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Versuchstiere	14
2.1.2	Besteck und Pipetten	15
2.1.3	Langendorff-Anlage	16
2.1.4	Laborgeräte	17
2.1.5	Gase	17
2.1.6	Pharmaka	18
2.1.7	Chemikalien	18
2.1.8	Computer und Software	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Versuchsaufbau (Langendorff-Anlage)	21
2.2.2	Versuchsablauf	24
2.2.3	Infarktgrößen-Auswertung	29
2.2.4	Hämodynamische Auswertung	29
2.2.5	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Körpergewicht, Herzgewicht und Ischämieparameter	31
3.2	Effekt auf die Infarktgröße	32
3.3	Effekt auf die Hämodynamik	33
4	Diskussion	35
4.1	Diskussion der Ergebnisse	35
4.1.1	Infarktgröße und Hämodynamik	35

4.1.2	Mitochondriale Kalium-Kanäle.....	37
4.2	Diskussion von Material und Methoden	41
4.2.1	Das Langendorff-Modell und die TTC-Färbung.....	41
4.2.2	Perfusion mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung	44
4.2.3	Sedierung mit Pentobarbital	46
4.2.4	Dexmedetomidin	46
4.3	Limitierung	50
4.4	Schlussfolgerung.....	51
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52
6	Danksagung.....	68

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen, dabei führen die ischämischen Herzerkrankungen die Statistiken weiter an [1]. Der Terminus „koronare Herzerkrankung“ (KHK) bezeichnet einen pathologischen Prozess, der durch eine Ansammlung von atherosklerotischen Plaques in den epikardialen Arterien gekennzeichnet ist [2]. Mit den neuen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) von 2019 wurde der Begriff KHK zugunsten des „chronischen Koronarsyndroms“ (CCS) modifiziert und steht damit als Gegenstück zum „akuten Koronarsyndrom“ (ACS) [3]. Die häufigste Folge eines CCS ist eine Stenose der Koronargefäße, die zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung des Myokards führt [4]. Die zumeist chronische Erkrankung kann durch eine Plaque-Ruptur oder Erosion zu einem akuten atherothrombotischen Ereignis führen [2], welches bei einem endgültigen Verschluss des Herzkranzgefäßes in einer ischämischen Myokardnekrose bzw. in einem ischämischen Myokardinfarkt (MI) resultiert [5]. Eine Vielzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren, die zu einer vorzeitigen Arteriosklerose führen, sind bekannt; dazu zählen u.a. cholesterinreiche Ernährung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus [4]. Im Zusammenspiel mit akuten Faktoren, wie plötzliche Anstrengung oder Stress-Situationen, können sie einen akuten Myokardinfarkt auslösen [5]. Der Prozess der arteriosklerotischen Veränderungen kann u.a. durch Anpassung des Lebensstils oder pharmakologische Therapien aufgehalten werden. Invasive Eingriffe können wiederum eine mögliche Stabilisierung oder Regression der Erkrankung erzielen [2]. Dem Statistischen Bundesamt zufolge lag im Jahre 2021 in Deutschland die Mortalität des CCS bei 21,9 % und die Zahl der verstorbenen Patienten bei über 74.000. Die zweithäufigste Todesursache war der akute Myokardinfarkt mit 13,3-prozentiger Mortalität [6]. In der Therapie des akuten und des chronischen Koronarsyndroms hat sich die perkutane Koronarintervention (PCI) mit Stent-Implantation als Goldstandard etabliert und wird dementsprechend in den europäischen Leitlinien empfohlen [5]. Die PCI, auch bekannt als Koronarangioplastie, erfolgt über einen perkutanen, transluminalen Zugang eines arteriellen Gefäßes (i.d.R. die *Arteria femoralis* oder die *Arteria radialis*) mit dem Ziel der Reperfusion der Koronargefäße und Verhinderung einer Myokardnekrose [7]. Trotz PCI oder Thrombolyse konnten jedoch Mortalität und Morbidität noch nicht ausreichend gesenkt werden. Eine Ursache hierfür scheint der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden zu sein, welcher

beschreibt, dass die therapeutische Reperfusion selbst einen großen Anteil zu der resultierenden Infarktgröße beiträgt. Deshalb bedarf es einer alternativen Methode, die das Herz vor einem solchen Reperfusionsschaden schützt [8].

1.2 Kardioprotektion

1.2.1 Ischämie-Reperfusionsschaden

Eine Ischämie ist als eine Mangeldurchblutung oder eine vollständig aufgehobene Durchblutung eines Gewebes definiert [9]. Dabei ist die Ätiologie der Ischämie vielfältig, u.a. führt dazu eine Gefäßstenose, arterielle Embolie oder periphere arterielle Verschlusskrankheit. Diese Prozesse können potentiell zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung, zu einer Veränderung im Zellstoffwechsel und letztlich zur Gewebsnekrose führen. Eine wiederhergestellte Durchblutung (Reperfusion) im entsprechenden Organ kann neben einer Besserung des Gewebezustandes jedoch auch zu zusätzlichen Zellschäden führen [10]. Das Ausmaß der Zellfunktionsstörung bis hin zum Zelltod hängt dabei von der Größe und der Dauer der Ischämie und der Reperfusion ab [9]. Alle toxischen Ereignisse, die eine Zelle während einer Ischämie und einer anschließenden Reperfusion erfährt, werden unter dem Begriff „Ischämie-Reperfusionsschaden“ (I/R-Schaden) zusammengefasst [11]. Im Rahmen einer Ischämie wird der Stoffwechsel der Zellen aufgrund des vorliegenden Sauerstoffmangels von aerob auf anaerob umgestellt, was wiederum vielfältige Folgen auf zellulärer Ebene beinhaltet (Abb.1a): Durch die Unterbrechung der sauerstoffabhängigen oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette sinkt der zelluläre Adenosintriphosphat (ATP) -Gehalt, was zum Ausfall der ATP-abhängigen Transportmechanismen führt (z. B. Na^+/K^+ -ATPase) [12]. Die fehlende Perfusion und das durch die anaerobe Glykolyse entstehende Laktat [13] führen zur Akkumulation von sauren Metaboliten mit der Folge einer intrazellulären Azidose. Die Zelle kompensiert diese Azidose über eine Pufferung mittels Na^+/H^+ -Austauschers, was in einem Anstieg des intrazellulären Natriumgehalts resultiert [14]. Durch den erhöhten Natriumwert wird wiederum der $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher entgegen seiner ursprünglichen Richtung aktiviert, sodass Natrium aus der Zelle heraus in den Extrazellulärraum und Calcium in die Zelle hinein transportiert wird [15]. Die intrazelluläre Azidose selbst führt zudem zur Schließung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) [9, 15] und aktiviert die intrazellulären Proteasen (z. B. Calpaine), die eine Schädigung der Myofibrillen verursachen und entsprechend Hyperkontraktur- und Kontrakturbandnekrosen hervorrufen [9]. Der Grad

der Gewebeverletzung ist abhängig von der Stärke der reduzierten Blutversorgung und der Dauer der Ischämieperiode [16].

Durch eine Reperfusion mit oxygeniertem Blut wird eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die die Gewebeverletzung potentiell verstärken können [9] (Abb. 1b): Mit der wiederhergestellten Sauerstoffzufuhr wird die Xanthin-Oxidase aktiviert, wodurch neben Hypoxanthin und Harnsäure auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt werden [17]. Unter ROS wird eine Vielzahl von Sauerstoffradikalen zusammengefasst, wie z. B. Hyperoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale [18]. Diese können den Postischämie-Schaden weiter erhöhen, indem sie u.a. durch Lipidoxidation die Zellmembranen verletzen [19] und intrazelluläre Schäden verursachen, wie beispielsweise die Zerstörung des DNA [15]. Durch ROS werden zudem neutrophile Granulozyten aktiviert [18, 20, 21], welche wiederum durch ihre eigene NADPH-Oxidase zusätzlich ROS bilden. Im weiteren Verlauf kommt es durch den hohen ROS-Spiegel zu weiteren Gewebeschäden [22], zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität [23, 24] und zu einer Ödembildung [25, 26]. Die durch die Hypoxie entstandene Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) verursacht während der Reperfusion einen intrazellulären Calcium-Anstieg und führt zu einer zusätzlichen Schädigung der Zellmembran, der Enzyme und der DNA [15]. Laktat, welches während der Hypoxie angereichert wurde, wird über den Na^+/H^+ -Austauscher ausgewaschen. Dadurch wird der physiologische pH-Wert wiederhergestellt und die hemmende Wirkung auf die mPTP-Öffnung und die Kontraktur der Kardiomyozyten aufgehoben. Die Wiederherstellung des Membranpotentials der Mitochondrien führt dort zu einem Einstrom von Calcium in die Mitochondrien, welches eine Öffnung der mPTP induziert [15]. Das Zusammenspiel all dieser postischämischen Reaktionen resultiert schließlich in eine Modulation der mPTP, welche eine Haupteinflussgröße für den I/R-Schaden darstellt. Die mPTP befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran und ist ein nicht-selektiver Kanal. Dieser depolarisiert beim Öffnen die innere Mitochondrienmembran und entkoppelt die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette. Dabei wird der Zufluss von gelösten Stoffen und Wasser eingeleitet, welches zu einer Schwellung der mitochondrialen Matrix führt. Dies hat zur Folge, dass die Mitochondrien platzen und schließlich der Zelltod eintritt [27-29]. Aufgrund der o.g. Mediatoren und des Stellenwerts der mPTP beim I/R-Schaden ist die Forschung an diesen Prozessen und an den entsprechenden Einflussfaktoren für die Kardioprotektion von großer Bedeutung.

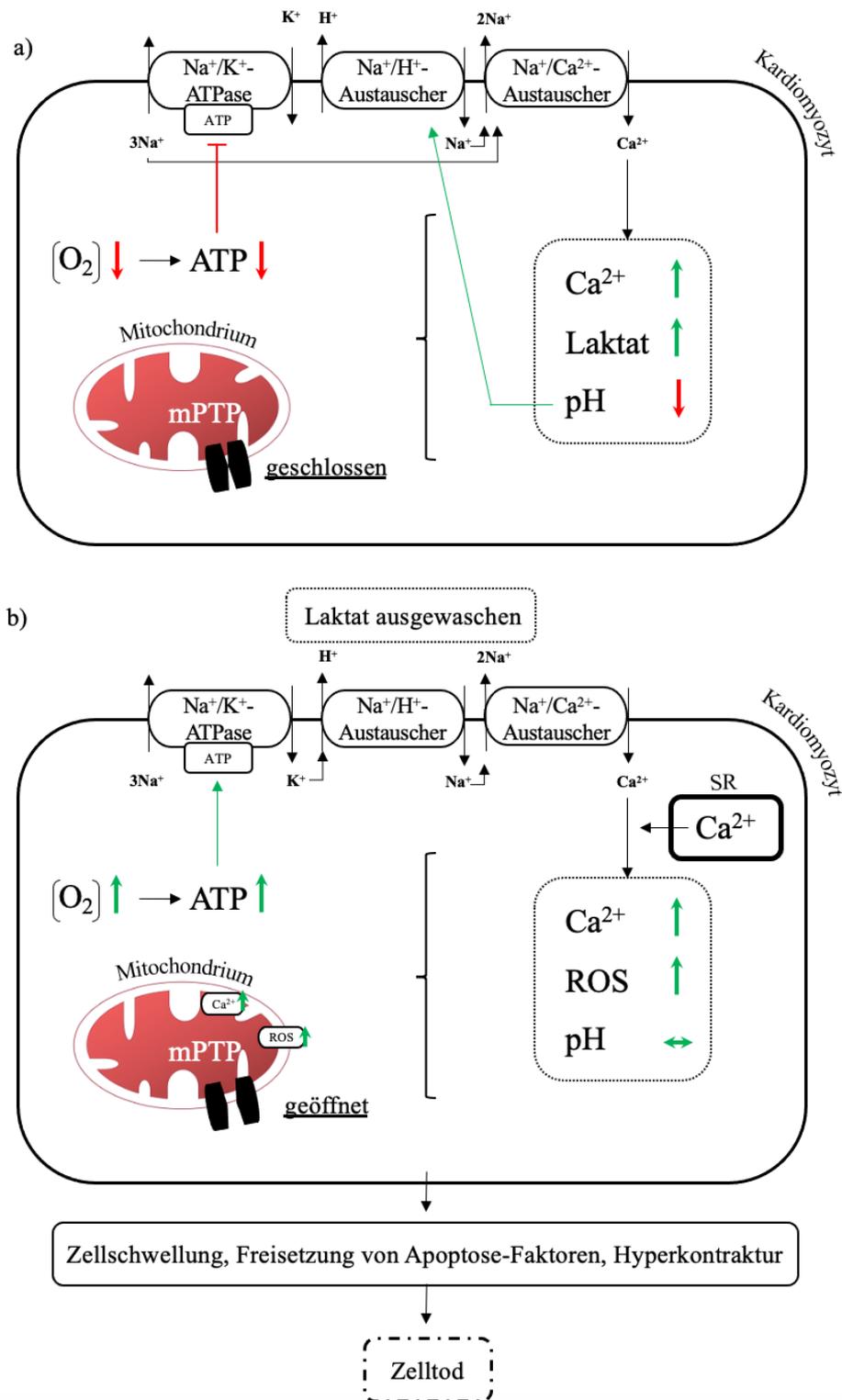


Abb. 1: Schematische Darstellung a) des myokardialen Ischämieschadens und b) des anschließenden Reperfusionsschadens. Modifiziert nach Hausenloy et al. 2013 [15] und Torregroza et al. [30].

Pathophysiologische Abläufe in Kardiomyozyten während der Ischämie und anschließender Reperfusion. ATP = Adenosintriphosphat; Ca^{2+} = Calcium-Ionen; H^+ = Wasserstoff-Ionen; Na^+ = Natrium-Ionen; mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore; O_2 = Sauerstoff; ROS = reaktive Sauerstoffspezies; SR = sarkoplasmatisches Retikulum

1.2.2 Ischämische Prä- und Postkonditionierung

Maroko et al. beschrieben in den 1970er Jahren die Reperfusion der Koronararterien erstmals als wirksamster Eingriff zur Begrenzung der Infarktgröße nach einem akuten Koronarverschluss [31-33]. Sie untersuchten dabei an Hunden, die Aktivität der myokardialen Kreatinphosphatkinase und die Größe des Myokardinfarkts nach einer Koronararterien-Okklusion und anschließender Reperfusion. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich ab einer dreistündigen Koronararterien-Reperfusion das Enzym Kreatinphosphatkinase sowie das histologische und funktionelle Myokardgewebe signifikant erholen konnte [31-33]. Im Jahr 1985 untersuchten Murry et al. das Phänomen der Präkonditionierung mittels mehrerer kurzer ischämischer Episoden, welches sich später unter dem Begriff der ischämischen Präkonditionierung (IPC) etabliert hat. Diese Methode zeigte eine Verringerung der Myokardinfarktgröße mittels kurzer Abfolgen von Ischämie und Reperfusion vor der infarktinduzierenden Ischämie an Hunderversuchen [8]. Dabei wurden vier Zyklen mit jeweils 5-minütigen abwechselnden Episoden von Koronarverschluss und Reperfusion durchgeführt, gefolgt von einer 40-minütigen (Abb. 2.1) bzw. 180-minütigen Ischämie und einer Reperfusion über vier Tage. Dabei konnte eine deutliche Infarktgrößenreduzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden (Abb. 2.2) [8].

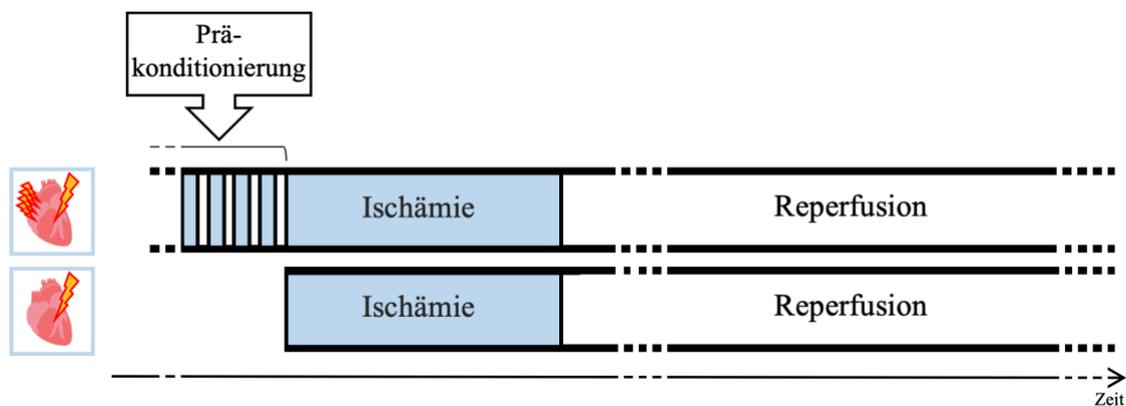


Abb. 2.1: Experimentelles Design der ischämischen Präkonditionierung. Modifiziert nach Murry et al. 1986 [8].

In einer Versuchsreihe wurde bei den Versuchstieren der IPC-Gruppe eine Präkonditionierung mit vier Zyklen aus jeweils einem 5-minütigen Koronarverschluss und einer 5-minütigen Reperfusion durchgeführt, gefolgt von einem anhaltenden 40-minütigen Verschluss. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine einzige 40-minütige Okklusion. Beide Gruppen erhielten nach der 40-minütigen Okklusion eine 4-tägige Reperfusion.

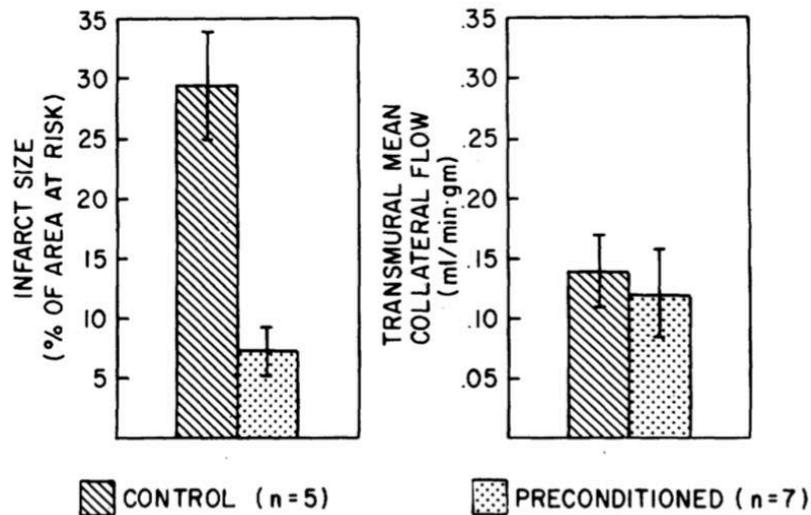


Abb. 2.2: Infarktgröße und kollateraler Blutfluss in der 40-minütigen Studie nach Murry et al. 1986 [8].

Links: Infarktgröße als Prozentsatz der ischämischen Myokardfläche in Kontrollherzen (gestreifter Balken) und in präkonditionierten Herzen (gepunkteter Balken). Die Infarktgröße bei den Kontrolltieren betrug im Durchschnitt 29,4 %. Die Infarktgröße in den präkonditionierten Herzen betrug im Durchschnitt nur 7,3 % (präkonditioniert vs. Kontrolle, $p < 0,001$). Rechts: Der transmurale mittlere kollaterale Blutfluss unterschied sich in den beiden Gruppen nicht signifikant. Die Balken stellen Gruppenmittelwerte + Standardmessfehler dar.

Die kardioprotektive Wirkung eines IPC-Stimulus zeichnet sich durch ein zweiphasiges Muster aus: Es gibt ein erstes Schutzfenster (*First Window of Protection, FWOP*) [34-36] unmittelbar nach der Ischämie, aber auch ein zweites Schutzfenster (*Second Window of Protection, SWOP*), welches bis zu 96 Stunden nach dem I/R-Schaden anhält [37]. Die Methode der IPC, welche bei verschiedenen Spezies wie Nagetieren, Schweinen, Kaninchen, Meerschweinchen und Schafen reproduzierbar ist [38], lässt sich auf eine Vielzahl von Organen (wie z. B. Gehirn, Darm, Haut, Skelettmuskel, Netzhaut, Niere, Blase und Leber) übertragen und führt auch hier über endogene Schutzmechanismen auf zellulärer und mitochondrialer Ebene zu einer Protektion [39]. Die IPC-induzierte Kardioprotektion beruht auf einer Vielzahl endogener Prozesse, welche über passive und aktive Veränderungen in den Zellen [40, 41] in den Zellen zur Verhinderung von Apoptose der Kardiomyozyten führen. Zu den passiven Veränderungen zählt die verlängerte intrazelluläre Azidose [42, 43], wodurch wiederum eine intrazelluläre Calcium-Überladung [44], die Hyperkontraktur [45] und die Öffnung der mPTP [42, 46] verhindert werden. Zu den aktiven Veränderungen zählen die *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)- Signalkaskade [40, 47-49] und die *Survival Activating Factor Enhancement* (SAFE)- Signalkaskade [50-53]. Beide Signalkaskaden führen auf unterschiedlichen Wegen zu einer Kardioprotektion, entweder durch Inhibition der Öffnung der mPTP [54] oder durch Aktivierung von Zielgenen in der Transkriptionskaskade [51] (Abb. 3):

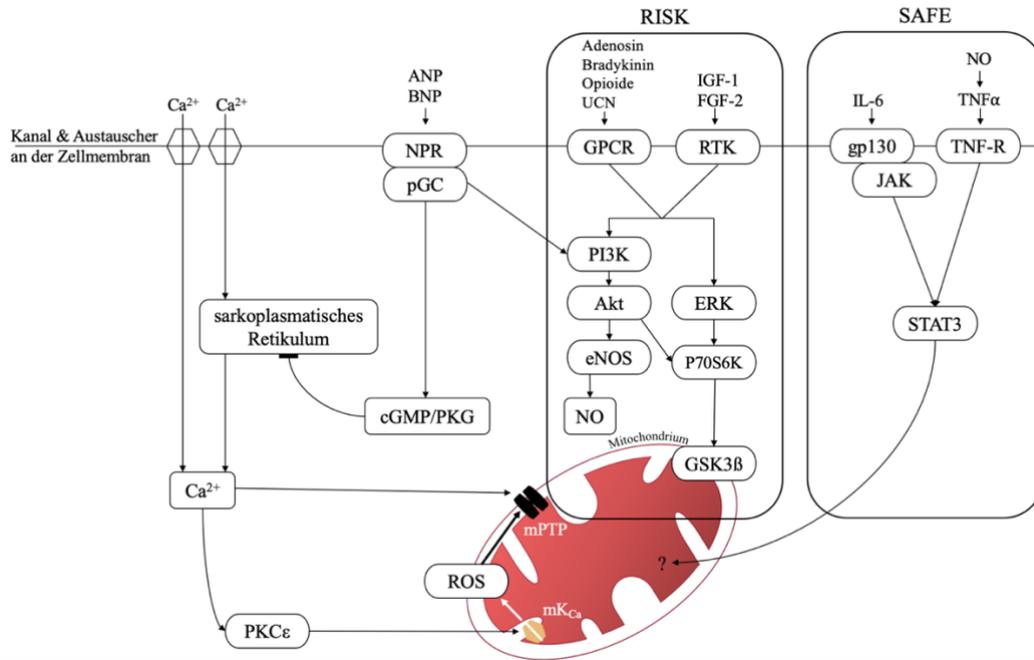


Abb. 3: Signalwege in der Prä- und Postkonditionierung. Modifiziert nach Ovize et al. 2010 [44].

Neben den bekannten endogenen Faktoren können auch exogene Mediatoren über die Aktivierung verschiedener Kinase-Signalwege die ischämische Konditionierung aktivieren, deren Signale alle im Mitochondrium enden.

Akt = Proteinkinase B; Ca²⁺ = Calcium; cGMP/PKG = cGMP-abhängige Proteinkinase oder Proteinkinase G; eNOS = endotheliale Stickoxidsynthase; ERK p42/p44 = extrazellulär regulierte Kinasen; GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor; gp130 = Glykoprotein-gp130; GSK3β = Glykogensynthasekinase-3β; IL6 = Interleukin-6; JAK = Januskinase; mPTP = mitochondriale Permeabilitätsübergangspore; NO = Stickstoffmonoxid; NPR = natriuretischer Peptidrezeptor; RTK = Rezeptortyrosinkinase; pGC = partikuläre Guanylylcyclase; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; PKCε = Proteinkinase C-epsilon; P70S6K = ribosomale p70S6 -Kinase; STAT3 = Signal Transducers and Activators of Transcription-Protein 3; TNF-R = TNF-Rezeptor

Im Rahmen der ischämischen Konditionierung kommt es zur Freisetzung verschiedener extrazellulärer Faktoren (Adenosin, Bradykinin und Opioidpeptide), Peptidwachstumsfaktoren (IGF-1 und FGF-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), welche über eine Bindung an Zelloberflächenrezeptoren die Aktivierung der Kinase-Signalwege induzieren. Beim RISK-Weg werden über distale Komponenten der Kaskade, zu denen Stickstoffmonoxid (NO) und die Hemmung von Glykogensynthasekinase-3 β (GSK3 β) gehören, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt) und extrazellulär regulierte Kinasen (ERK p42/p44) aktiviert und schließlich die mPTP-Öffnung während der Reperfusion gehemmt. Zudem führt die Aktivierung eines intramitochondrialen Pools von Proteinkinase C-epsilon (PKC ϵ) zur Öffnung des mitochondrialen ATP-aktivierenden Kalium-Kanals (K_{ATP}), was in einem leichten Anstieg der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) resultiert und ebenfalls eine mPTP-Hemmung bewirkt [44]. Während eine übermäßige Produktion von ROS zu einer Verstärkung des I/R-Schadens über die Aktivierung der mPTP führt, scheint jedoch die Freisetzung geringer Mengen von ROS zu Beginn der Reperfusion protektiv zu sein [55]. Der SAFE-Signalweg stellt die zweite entscheidende Signalkaskade bei der ischämischen Konditionierung dar (Abb. 3).

Die Hauptkomponenten des SAFE-Signalwegs sind der TNF-Rezeptor und die Januskinase (JAK), welche zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *Signal Transducers and Activators of Transcription-Protein 3* (STAT3) führen. Es wird vermutet, dass STAT3 nach der Translokation in den Zellkern die Transkription von Faktoren steuert, die eine Kardioprotektion bewirken. Die genaue Reihenfolge der Elemente in diesen Kaskaden und das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Signalwegen sind jedoch noch nicht abschließend erforscht [44].

Während die Durchführung der Präkonditionierung im experimentellen Rahmen erfolgreich eine Infarktgrößenreduktion erzielen konnte, bleibt sie für das klinische Umfeld in weiten Teilen impraktikabel. Der Myokardinfarkt stellt zumeist ein unvorhersehbares, akutes Ereignis dar. Daher wäre eine Konditionierung als Schutz gegen den I/R-Schaden vor dem infarktinduzierenden Ereignis nicht mehr möglich. Um diese Problematik zu umgehen wurde 2002 von Vinten-Johansen die ischämische Postkonditionierung (IPostC) etabliert. Die subletalen ischämischen Episoden erfolgen hierbei nach einer infarktinduzierenden Myokardischämie [56], und dadurch konnte eine deutliche Infarktgrößenreduzierung erzielt werden [40, 55, 57, 58]. Vergleichbar mit der IPC kann auch die IPostC in weiteren Organen wie Gehirn [59, 60], Niere [61], Lunge [62] und Leber [63] eine Protektion der Organfunktion bewirken.

Die zellulären Mechanismen der ischämischen Prä- und Postkonditionierung werden weitestgehend ähnlich ausgelöst und reduzieren in gleichem Maße die Größe eines Myokardinfarkts [57]. Beide Mechanismen haben jedoch im klinischen Rahmen den Nachteil, durch invasive Vorgehensweisen eine Manipulation an den Gefäßendothelien zu verursachen, mit den potentiellen Folgen einer Plaqueruptur oder -verlagerung, von Koronarendothelschäden, Koronararterienrupturen, Herzrhythmusstörungen oder letalen Verletzungen des Myokards [64]. Aufgrund der hohen Invasivität der ischämischen Konditionierung und der damit eingeschränkten Umsetzbarkeit in der Klinik wurden verschiedene alternative Methoden etabliert: so zum einen die ischämische Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic Preconditioning*, RIPC), bei der sich ein IPC-Stimulus an einem anderen Organ protektiv auf eine nachfolgende Ischämie-Phase im Zielorgan auswirken kann [65], und zum anderen die ischämische Fernpostkonditionierung (*Remote Ischemic Postconditioning*, RIPostC) [66-69]. Eine weitere Alternative ohne jegliche Invasivität stellt die pharmakologische Postkonditionierung dar.

1.2.3 Pharmakologische Postkonditionierung

Eine ischämische Konditionierung stellt ein invasives Verfahren zur Erzielung einer Kardioprotektion dar. Eine praktikable Alternative bietet die pharmakologische Konditionierung, bei der durch Applikation von verschiedenen pharmakologischen Substanzen eine ischämische Konditionierung imitiert wird [70]. Diese Methode kann sowohl vor der Ischämie (Präkonditionierung), als auch nach dem infarktinduzierenden Ereignis (Postkonditionierung) durchgeführt werden [71]. Um eine Kardioprotektion zu erzielen, werden mittels Pharmaka gezielt die oben beschriebenen Signalkaskaden aktiviert [71].

Dabei stellt die pharmakologische Postkonditionierung zu Beginn der Reperfusion – nach stattgefundenem ischämischen Ereignis – eine flexiblere und effizientere Methode dar, als die Präkonditionierung oder ischämische Konditionierung [72].

Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen der SAFE- und RISK-Signalkaskade sowie die Modulierung der mPTP sind nicht abschließend erforscht. Eine pharmakologische Therapie kann die ischämische Konditionierung simulieren, indem sie an einem der Punkte dieser Signalkaskaden ansetzt – auf der Ebene des Rezeptors, der Signaltransduktionswege oder der mPTP [73]. Es gibt eine Vielzahl bekannter Pharmaka, wie z.B. Adenosin [74], Bradykinin [75], Insulin [76-78], Glucagon-Like-Peptid-1 [79, 80], Erythropoetin [81-83], atriale natriuretische Peptide [84, 85] und Medikamente wie z.B. volatile Anästhetika [86-88], Opiode [89], Phosphodiesterase-5-Hemmer [90, 91], Nitroglycerin [92] und Statine [93, 94], bei denen im Rahmen einer pharmakologischen Konditionierung eine signifikante Infarktgrößenreduzierung beobachtet werden konnte [73]. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die pharmakologische Postkonditionierung (PPostC) mit Dexmedetomidin gelegt und hierbei insbesondere auf die molekulare Wirkungsweise in Bezug auf die verschiedenen mitochondrialen Kaliumkanäle [95].

1.3 Dexmedetomidin

Es wurde bereits gezeigt, dass eine auf Dexmedetomidin (Dex) basierende pharmakologische Konditionierung kardioprotektive Wirkung hat [95, 96]. Dex ist ein rechtsdrehendes S-Enantiomer von Medetomidin mit der chemischen Bezeichnung 4-[(1S)-1-(2,3-Dimethylphenyl)ethyl]-1H-Imidazol und wird in der medizinischen Versorgung als Dexmedetomidinhydrochlorid verabreicht [97]. Als selektiver Alpha-2-Adrenorezeptor-

Agonist dient es im noradrenergen Locus coeruleus zur Sedierung [98] und wirkt als Agonist am $\alpha 2B$ -Subtyp des Adrenorezeptors sowie als partieller Agonist an den $\alpha 2A$ - und $\alpha 2C$ -Subtypen am Hirnstamm [99]. Außerdem vermindert Dex die Noradrenalin-Freisetzung, da es auch eine sympatholytische Wirkung hat [100]. Aufgrund der sedierenden und analgetischen Wirkung, ist der Anwendungsbereich von Dex seit etwa 30 Jahren auf das perioperative Umfeld und es wird außerdem für die Sedierung erwachsener intensivmedizinisch behandelter Patienten eingesetzt [101-103]. Zudem wird durch die Dex-Gabe ein deutlicher Analgetikaspargerender Effekt erzielt [98]. Neben den klassischen Sedativa wie Propofol und Midazolam kann Dex ebenfalls im Rahmen der intensivmedizinischen Langzeittherapie eingesetzt werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass während der Dex-Gabe eine verminderte Beatmungs- und Aufwachzeit, Delir-Inzidenz und eine bessere Pflege-Patient-Kommunikation erzielt wurde [98, 104, 105]. Neben diesen positiven Eigenschaften konnte in tierexperimentellen *In vivo*- und *In vitro*-Studien zudem eine Dex-induzierte kardioprotektive Wirkung nach I/R-Schaden demonstriert werden [106-109].

Neben der klassischen pharmakologischen Präkonditionierung durch Dex-Gabe [106, 107] vor einem Infarkt spielt für den klinischen Einsatz insbesondere die pharmakologische Postkonditionierung eine wichtige Rolle [96]: Mit Blick auf die zukünftige Anwendbarkeit und die Unvorhersehbarkeit, wann ein Myokardinfarkt auftritt, beobachteten Bunte et al. die infarktgrößenreduzierende Wirkung von Dex während einer PPostC. Sie bestimmten neben der konzentrationsabhängigen Wirkung auch den idealen Zeitpunkt und Dauer der Dex-Gabe [96]. Für die Versuche erhielten isolierte Rattenherzen eine 33-minütige globale Ischämie und eine 60-minütige Reperfusion. Zu Beginn der Reperfusion wurden die Herzen mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (0,3-100 nM) perfundiert. In dieser Konzentrationsfindungsstudie zeigte sich 3 nM Dex als niedrigste und wirksamste kardioprotektive Konzentration [96]. Die kardioprotektiven Eigenschaften waren zudem unabhängig vom Zeitpunkt und der Dauer der Dex-Gabe in der Reperusionsphase. Die Ergebnisse von Bunte et al. stellen dabei den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Während die bisherige Studienlage keine Auskunft über die zugrundeliegenden molekularen Kaskaden bei der pharmakologischen Postkonditionierung gibt, untersucht diese Studie die Wirkung auf makroskopischer Infarktebene und die Auswirkung des Applikationszeitpunkt. In dieser Arbeit wurde daher der Mechanismus der Dex-induzierten Postkonditionierung mit Fokus auf die mitochondrialen Kalium-Kanäle untersucht.

1.4 Mitochondriale Kalium-Kanäle und -Blocker

1.4.1 Mitochondrialer ATP-sensitiver Kalium-Kanal (mK_{ATP})

Der mitochondriale ATP-sensitive Kalium-Kanal (mK_{ATP}) nimmt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Kardioprotektion ein [110-114]. Dieser Kanal ist in der inneren Mitochondrienmembran (mK_{ATP}) lokalisiert [115] und besteht aus drei porenbildenden α -Untereinheiten, die für die ATP-definierende Eigenschaft verantwortlich sind, sowie aus einer kanalmodulierenden β -Untereinheit [116]. In einer Vielzahl von Studien konnte bereits gezeigt werden, dass geöffnete ATP-gesteuerte Kalium-Kanäle (K_{ATP}) das Herz vor einem I/R-Schaden schützen [110-114]. Ursprünglich wurde angenommen, dass bei der IPC-induzierten Kardioprotektion der sarkolemmale ATP-gesteuerte Kalium-Kanal ($sarK_{ATP}$) eine wichtige Rolle spielt. Zum Zeitpunkt dieser frühen Beobachtungen wurde allerdings nicht erkannt, dass Kardiomyozyten zwei verschiedene Arten von K_{ATP} -Kanälen enthalten, den $sarK_{ATP}$ - und den mK_{ATP} -Kanal, und dass beide unterschiedliche pharmakologische Profile aufweisen [39]. Neuere Studien haben gezeigt, dass der mK_{ATP} -Kanal neben anderen Kalium-Kanälen ein entscheidender Vermittler für die Kardioprotektion [117-119] in intakten Herzen [37, 120-122] und isolierten Kardiomyozyten [123] ist. Die Beteiligung der mK_{ATP} -Kanäle und ihre Wirkung auf die mPTP in Kardiomyozyten während einer ischämischen Postkonditionierung konnten Barsukevich et al. nachweisen [124]. Das Öffnen der mK_{ATP} führte in der frühen Reperfusion über mehrere Schritte zum Schließen der mPTP und damit über die im Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Mechanismen zur Reduktion eines I/R-Schadens [124-126]. Diese Ergebnisse bilden eine wesentliche Grundlage für die aktuelle Arbeit.

1.4.2 mK_{ATP} -Blocker: 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz

Das 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz (5HD) ist ein natürlicher Lipidbestandteil von Milch [127, 128] und bekannt als ein Antiarrhythmikum der Klasse III [129]. 5HD wird als spezifischer Inhibitor von mK_{ATP} -Kanälen verwendet, der die Kardioprotektion durch verschiedene Konditionierungsreize unterdrückt [117, 119, 130-132].

McCullough et al. zeigten mithilfe der Einzelkanal-Patch-Clamp-Technik, dass die Zugabe von 100 μ M 5HD die ATP-induzierten Schübe der Kanalöffnung deutlich reduzierte und beobachteten verlängerte Schließzeit des Kanals [129]. Mit der Verwendung dieser Konzentration konnten wir in einer anderen Studie eine Ramelteon-induzierte Kardioprotektion

vollständig aufheben [119]. Wir verwendeten daher in dieser Arbeit für 5HD eine Konzentration von 100 μM , welche für eine Hemmung von mK_{ATP} -Kanälen ausreichend ist.

1.4.3 Mitochondrialer Calcium-sensitiver Kalium-Kanal (mK_{Ca})

Der mitochondriale Calcium-sensitive Kalium-Kanal (mK_{Ca}) ist neben dem mK_{ATP} -Kanal an den Signalwegen der Kardioprotektion beteiligt [118]. Der mK_{Ca} besteht aus drei porenbildenden α -Untereinheiten und einer zusätzlichen β -Untereinheit, die eine modulatorische Funktion für die Kanalöffnung hat und empfindlich für Kanalblockern ist [116, 123, 133, 134]. Er wird durch intrazellulären Calcium-Anstieg und Membrandepolarisation aktiviert [122, 123, 135, 136] und kommt in unterschiedlichen Gewebetypen vor (Herz, Gehirn und Muskelgewebe) [118, 134, 137-139]. Xu et al. zeigten erstmals, dass das Öffnen von mK_{Ca} -Kanälen eine signifikante Verringerung der Infarktgröße nach schwerer globaler I/R-Schädigung zum ersten Mal in perfundierten Kaninchenherzen bewirkt [118]. Über die Anzahl der mK_{Ca} -Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran wird die Kalium-Aufnahme in die Mitochondrien reguliert [56]. Für die IPC, welche die mitochondriale Bioenergetik nach I/R-Schaden im Tierexperiment deutlich verbessert [140], konnte eine Beteiligung der mK_{Ca} -Kanäle nachgewiesen werden [118, 141, 142]. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die mK_{Ca} -Kanäle auch an der IPostC beteiligt sind [143, 144] und zu Beginn der Reperfusion durch ihre Aktivierung die Öffnung der mPTP inhibieren. Dadurch wird die ROS-Bildung sowie die intrazelluläre Calcium-Überladung verhindert und schließlich einem I/R-Schaden entgegengewirkt [144]. Nicht nur das Öffnen beider Kanäle – mK_{ATP} und mK_{Ca} – erhöht die mitochondriale Aufnahme von Kalium und wirkt kardioprotektiv [145], sondern auch die alleinige Aktivierung des mK_{Ca} führt zu einer Kardioprotektion [142].

1.4.4 mK_{Ca} -Blocker: Paxillin

Paxillin (Pax) gehört zu den Indolalkaloiden aus dem Pilz *Penicillium paxilli* [146-149] und ist ein allgemeiner Blocker von Calcium-aktivierenden Kalium-Kanälen (K_{Ca}) [133, 146, 150], der häufig zur Untersuchung der physiologischen Rolle dieser Kanäle verwendet wird [151-154].

Für diese Arbeit wurde eine Pax-Konzentration von 1 μM verwendet, welche ausreichend für die spezifische Hemmung von K_{Ca} -Kanälen ist. Diese Konzentration blockiert wirksam die kardioprotektive Wirkung verschiedener Konditionierungsstimuli und wurde in unserer Gruppe routinemäßig und erfolgreich eingesetzt [109, 119, 149, 155-158].

1.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Aus Vorstudien war bekannt, dass eine pharmakologische Postkonditionierung mit Dex einen infarktgrößenreduzierenden Effekt hat [159], und dass diese Kardioprotektion unabhängig von Zeitpunkt und Dauer des I/R-Schadens ist [96]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der kardioprotektiven Wirkung von Dex in der Reperfusion sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Da bekannt ist, dass die mK_{Ca} - und mK_{ATP} -Kanäle an der Vermittlung einer Kardioprotektion beteiligt sein können [124], ergaben sich die folgenden beiden Forschungsfragen [95]:

- Sind bei einer Kardioprotektion durch eine Postkonditionierung mit Dex die mK_{Ca} - und/oder der mK_{ATP} -Kanäle beteiligt?
- Wird diese Kardioprotektion bei Behandlung mit Dex während der frühen oder späten Reperfusion über unterschiedliche mitochondriale Kalium-Kanäle vermittelt?

Diese Fragestellung wurde mithilfe von spezifischen Blockern der mitochondrialen Kalium-Kanäle (mK_{ATP} und/oder mK_{Ca}) in Kombination mit einer Dex-induzierten Postkonditionierung an isoliert perfundierten Rattenherz untersucht. Der für diese Studie gewählte primäre Endpunkt ist die Infarktgröße. Als sekundäre Endpunkte wurden die hämodynamischen Parameter betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere stammen aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf (internes Aktenzeichen: O27/12 vom 27.02.2019). Es wurden ausschließlich männliche ca. 2 Monate alte Wistar-Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich) für die Studie verwendet. Vor Versuchsbeginn befanden sich die Ratten für mindestens acht Tage in der ZETT unter regelmäßiger tierärztlicher Kontrolle und wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. In klimatisierten Räumen (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %) wurden die Tiere in Käfigen mit entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat gehalten und erhielten Alleinfuttermittel und keimfreies, auf einen pH-Wert von 3 angesäuertes Wasser *ad libitum*.

2.1.2 Besteck und Pipetten

Besteck und Pipetten	Modell	Hersteller und Hauptstandort
Präparierschere groß	Aesculap DUROTIP® Präparierschere Mayo BC252R 170 mm	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Präparierschere klein	Aesculap DUROTIP® Präparierschere BC257R 115 mm	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Pinzette groß	Aesculap Tissue Forcep BD587R	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Pinzette klein	2mal Aesculap Micro Dressing Forceps OC022R	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Guillotine	Kleintierdekapitator Modell 7950	Ugo Basile, Comero, Italien
Thorax-Retraktor	Aesculap Weitlaner-Retraktor BV101R	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Klemme klein	Arterienklemme Bulldogklemme Diefenbach BH020R 38 mm und 12 mm	Braun Melsungen Melsungen, Deutschland
Klingenbesteck zum Schneiden	Aesculap Skalpellgriffe BB084R	Aesculap Inc., Pennsylvania, USA
Klinge zum Schneiden	sterile Skalpellklingen #21	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Pipette Eppendorf 2,5- 5000µl	Eppendorf-Research und -Plus variable Pipette	Eppendorf SE, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann-Laborgeräte GmbH und Co, Eberstadt, Deutschland
Serologische Pipette	Costar® Stripette (Non-Pyrogenic 2 ml in 2/10)	Corning Inc., Corning, USA
Einweg-Pipette	Pateur-Pipette 3 ml	VWR, Leuven, Belgien
Eppendorf Mehrfachdispenser	Eppendorf-Multipipette® Plus	Eppendorf SE, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Combitip	2mal Eppendorf Combitips (1,0- 50 ml)	Eppendorf SE, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

2.1.3 Langendorff-Anlage

Material	Modell	Hersteller und Hauptstandort
Spezialschlauch für Schlauchpumpe	PhthalateFree® PVC Pump Tubes (3,18 mm Innendurchmesser)	Gilson, Middelton, USA
Schlauchpumpe	Minipuls 3 Peristaltic Pump 2 Channels	Gilson, Middelton, USA
1.Perfusatschlauch	Tygon Tube E-3603 (3,2 mm Innendurchmesser, 1,6 mm Wanddicke)	Saint-Gobain, Charny, Frankreich
2.Perfusatschlauch	Tygon Tube (6 mm Innendurchmesser, 1,5 mm Wanddicke)	Saint-Gobain, Charny, Frankreich
3.Perfusatschlauch	Tube Versilic 5 x 8 mm	Saint-Gobain, Charny, Frankreich
1.Perfusor	Perfusor® Space	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
2.Perfusor	Perfusor® fm	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Perfusatflasche 5000 ml	Schott Duran 5000 ml	Duran, Wertheim, Deutschland
Perfusatflasche 2000 ml	Schott Duran 2000 ml	Duran, Wertheim, Deutschland
Perfusatflasche 5000 ml	Schott Duran 5000 ml	Duran, Wertheim, Deutschland
Perfusatflasche 2000 ml	Schott Duran 2000 ml	Duran, Wertheim, Deutschland
Umwälzthermostat	Julabo MW-6	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Einhängethermostat	Julabo EC	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Druckaufnehmer	Arterial Pressure Transducer APT300, 73-3866	Havard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Folie für Ballon	Polyethylen-Folie	
Schläuche für Ballon	Fine Bore Polythene Tubing	Smith Medical International Ltd., Kent, Vereinigtes Königreich
Fäden für Herzen und Ballon	Resorba® Polyester grün, nicht resorbierbar, geflochtene Fäden	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Sinterglasfritte	25 cm Länge	

Luftfänger	7,5 cm Länge, 5 cm Breite 12,5 cm Länge, 6,5 cm Breite
Wärmekolben	14,5 cm Länge x 3 cm Breite, 10 Windungen 28 cm Länge x 3,5 cm Breite, 23 Windungen
Wärmeschild	4 cm Innendurchmesser, 6 cm Breite x 6 cm Länge

2.1.4 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller und Hauptstandort
Blutgasanalyseautomat	ABL 800 Flex	Radiometer, Willich, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ646 #4498	Knick, Berlin, Deutschland
pH-Sensor	InLab [®] Sensors	Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1160	Greisinger, Regenstauf, Deutschland
1.Laborwaage	Scout Pro SPU202, max. 200g	Ohaus Corporation, Pine Brook, New Jersey, USA
2.Laborwaage	Model: 440-45N, max. 1000g	Kern und Sohn, Balingen, Deutschland
Präzisionswaage	Secura [®] La230s	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Druckeichgerät	Druckeichgerät Typ 367	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad Modell 1001	GFL GmbH und Co., Hannover, Deutschland
Magnetrührer mit Temperatursensor	Heidolph Typ MR HEI-Tech	Heidolph Instruments, Schwalbach, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	MiliQ [®] -Biocel	Milipore Corporation, Massachusetts, USA

2.1.5 Gase

Gas	Hersteller und Hauptstandort
Carbogen (5% CO ₂ + 95% O ₂)	Linde AG, München, Deutschland
Stickstoff 5.0 (N ₂)	Linde AG, München, Deutschland

2.1.6 Pharmaka

Wirkstoff	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	CAS- Nummer	Hersteller und Hauptstandort
Paxillin	C ₂₂ H ₃₃ NO ₄	435,56	57186-25-1	Sigma-Alderich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dexmedetomidin (Dexdor®)	C ₁₃ H ₁₆ N ₂	236,74	145108-58-3	Sigma-Alderich Chemie GmbH, München, Deutschland
5-Hydroxy- decansäure- Natriumsalz	C ₁₀ H ₁₉ NaO ₃	210,25	71186-53-3	Sigma-Alderich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pentobarbital- Injektionslösung (Narcoren® für Tiere)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃		76-74-4	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Heparin-Natrium Injektionslösung 25.000 I.E./5ml			9041-08-1	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

2.1.7 Chemikalien

Chemikalien/Lösungen	Summenformel	Molekular- gewicht [g/mol]	CAS- Nummer	Hersteller und Hauptstandort
Natriumchlorid Reinheit ≥ 99%	NaCl	58,11	7647-14-5	VWR BDH Chemicals, Leuven, Belgien
Kaliumchlorid Reinheit ≥ 99,5%	KCl	74,56	7447-40-7	Fluka GmbH, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat- heptahydrat Reinheit ≥ 99%	MgSO ₄ + 7 H ₂ O	246,48	10034-99-8	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumhydrogenphosphat Reinheit $\geq 99,5\%$	KH_2PO_4	136,09	7778-77-0	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat Reinheit $\geq 99,5\%$	NaHCO_3	84,01	144-55-8	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) Reinheit $\geq 99\%$	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	292,25	60-00-4	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose (wasserfrei) Reinheit $\geq 99,5\%$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	50-99-7	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Laktat-Natriumsalz Reinheit $\geq 99\%$	$\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$	112,06	867-56-1	PanReac&AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid Reinheit $\geq 98\%$	CaCl_2	110,98	10043-52-4	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Reinheit $\geq 99,9\%$,	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	78,13	67-68-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd 37% Reinheit $\geq 37\%$	CH_2O		50-00-0	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Reinheit $\geq 99\%$,	$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$	334,79	298-96-4	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylamino- methan (TRIS) Reinheit $\geq 99,9\%$,	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	121,14	77-86-1	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumhydroxidplättchen	KOH	56,11	1310-58-3	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37% Reinheit 37%, Eichlösung – pH 4 (Technischer Puffer pH 4.01 Modell TEP4) Eichlösung – pH 7 (Pufferlösung pH 7,00 ± 0,02)	HCl		7647-01-0	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland WTW, Weilheim, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.8 Computer und Software

Computer und Software	Modell	Hersteller und Sitz des Herstellers
Rechner	Chieftec-Paola und Chieftec-Avistorn	Chieftec, Düsseldorf, Deutschland
PC-Monitor	LG-Flatron, Model: E2210PMW und. Model: L1942TEU	LG, Seoul, Südkorea
Flachbettscanner	CanonScan [®] LIDE 700F	Canon, Krefeld, Deutschland
Brückenverstärker	Bridge Amp, Model: FE22 und Model: ML110	AD Instruments, New South Wales, Australien
Datenerfassung	PowerLab 4/26 und. 8/30	AD Instruments, New South Wales, Australien
Aufzeichnungssoftware	LabChart [®] Pro v. 8.0.5	ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Sydney, Australia
Statistiksoftware	GraphPad [®] V7.01 und GraphPad StateMate [™]	GraphPad Software, San Diego, California, USA
Planimetriesoftware	SigmaScan [®] v. 5	SPSS Inc., San Jose, California, USA
Excel-Tabellenkalkulation	Microsoft Excel [®]	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

2.2 Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Versuche, darunter die Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung des Projekts, wurden in der Klinik für Anästhesiologie der Uniklinik Düsseldorf durchgeführt [95].

2.2.1 Versuchsaufbau (Langendorff-Anlage)

Die Koronargefäße der isolierten Rattenherzen wurden kontinuierlich retrograd mit einer modifizierten Puffer-Lösung nach Krebs und Henseleit (KHP) perfundiert. Diese Lösung imitiert das Blutplasma und diente als Transportmedium für die Pharmaka. Der zu jedem Versuch neu angesetzte Puffer wurde in doppeldestilliertem Wasser mittels der unten aufgeführten Chemikalien (Tabelle 1) hergestellt.

Tabelle 1: Stoffe und entsprechende Mengenangabe zur Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Pufferlösung (5l)

Stoff	Summenformel	Menge [g] auf 5l	Molarität [mM]
Natriumchlorid	NaCl	34,48	118
Kaliumchlorid	KCl	1,751	4,7
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO ₄ + 7 H ₂ O	1,479	1,2
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	0,817	1,2
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	10,501	25
Ethylendiamintetraacetat	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,731	0,5
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	9,909	11
L-Laktat-Natriumsalz	C ₃ H ₅ NaO ₃	0,561	1
Calciumchlorid	CaCl ₂	1,249	2,25

g = Gramm; l = Liter; mM = Millimol

Nach dem Rühren des kalten Puffers wurde mithilfe eines Blutgasanalyseautomaten (BGA-Automat) die Elektrolytkonzentration überprüft. Wenn die Werte des kalten Puffers den Sollwerten (Tabelle 2) entsprachen, wurde der Puffer für den Versuch verwendet. Um die Temperatur am Herzen der Körpertemperatur anzupassen, wurde der Puffer in einem Perfusatbehälter im Wasserbad temperaturkontrolliert auf 45 °C erwärmt.

Tabelle 2: Sollwerte der modifizierten Krebs-Henseleit-Pufferlösung im kalten und warmen Zustand

Messwerte	kalter Puffer	warmer Puffer
pH	7,01 ± 0,05	7,3-7,4
Kalium	5,7 mmol/l	5,7 mmol/l
Natrium	140 mmol/l	140 mmol/l
Calcium	1,44 ± 0,05 mmol/l	1,33 mmol/l
Chlorid	115 ± 2 mmol/l	112 mmol/l
Glukose	200 mg/dl	>200 mg/dl
Laktat	>1 mmol/l	1 mmol/l
CO ₂ -Partialdruck	>40 mmHg	<40 mmHg

CO₂ = Kohlenstoffdioxid; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule; mmol/l = Millimolar pro Liter; mg/dl = Milligramm pro Deziliter

Zusätzlich wurde der Puffer zur Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Wertes und zur Oxygenierung kontinuierlich über eine Glasfritte mit Carbogen (5 % CO₂ und 95 % O₂, 200 ml/min) begast, wodurch ein O₂-Partialdruck von 580 ± 40 mmHg, ein CO₂-Partialdruck von 36,5 ± 1,5 mmHg und ein pH-Wert von 7,4 ± 0,05 erzielt wurden. Der pH-Wert und die Elektrolyte des erwärmten Puffers (ca. 38 °C) wurden vor dem Versuch erneut mittels BGA überprüft (vgl. Tabelle 2), um eine mögliche Veränderung am Puffer rechtzeitig zu entdecken. Mithilfe einer Peristaltikpumpe wurde der Puffer in die Anlage eingebracht. Die Anlage bestand aus zwei Kreisläufen (Abb. 4): Der erste Perfusatkreislauf gewährleistete durch eine Wassersäule einen konstanten Perfusionsdruck von 80 mmHg (entsprechend dem mittleren arteriellen Druck, MAD = 80 mmHg). In einer definierten Höhe war ein Überlaufbecken angebracht, durch welches das Perfusat wieder im Perfusatbehälter aufgefangen und erneut über die Peristaltikpumpe in die Anlage gepumpt wurde. Der zweite Perfusatkreislauf war über einen Dreiwegehahn mit dem Herzen verbunden. Dabei wurde das Perfusat, welches durch die Koronargefäße des Herzens geflossen war, verworfen (*Non-circulating-constant-Pressure-Langendorff-System*). Das Perfusat durchlief zwei Wärmeaustauscher auf seinem Weg zum Herzen, das durch ein separates, auf 38,5 °C erhitztes Wasserbad vor äußerer Abkühlung geschützt wurden. Eine dieser Wärmekammern fungierte gleichzeitig auch als Luftfänger, um Luftblasen im System und somit auch Embolien der Koronargefäße zu verhindern. Zur Gewährleistung einer konstanten Umgebungstemperatur des Herzens diente ein Wärmeschild, der ebenfalls von dem separaten Wasserbad erwärmt wurde. Ein Druckaufnehmer maß über einen mit isotoner Kochsalzlösung (0,9 %) befüllten Ballon im linken Ventrikel des Herzens die mechanische Herzaktion und Hämodynamik. Vor Versuchsbeginn wurde der Ballon auf

Höhe seiner späteren Endposition gegen den atmosphärischen Druck kalibriert. Der Druckaufnehmer war mit einer PowerLab-Station verbunden, in welcher die gemessenen Werte wie Herzfrequenz, linksventrikulärer Druck, Anstiegsgeschwindigkeit und ischämisches Kontrakturmaximum festgehalten und die entsprechenden Diagramme und eine Grafik mit dem Programm LabChart Pro v.8.05 dargestellt wurden. Zu festgelegten Zeiten wurde dann zur Bestimmung des Koronarflusses (*coronary flow*, CF) das koronare Effluat bzw. Perfusat aus dem Koronarvenensinus des Herzens gesammelt und gemessen. Die Applikation von Substanzen und Medikamenten erfolgte über Dreiwegehähne und Perfusoren entsprechend dem Studienprotokoll. Die Anlagen wurde nach jedem Versuchstag mit gekochtem doppeldestilliertem Wasser und einmal wöchentlich mit 1,5-prozentiger Salzsäure gereinigt.

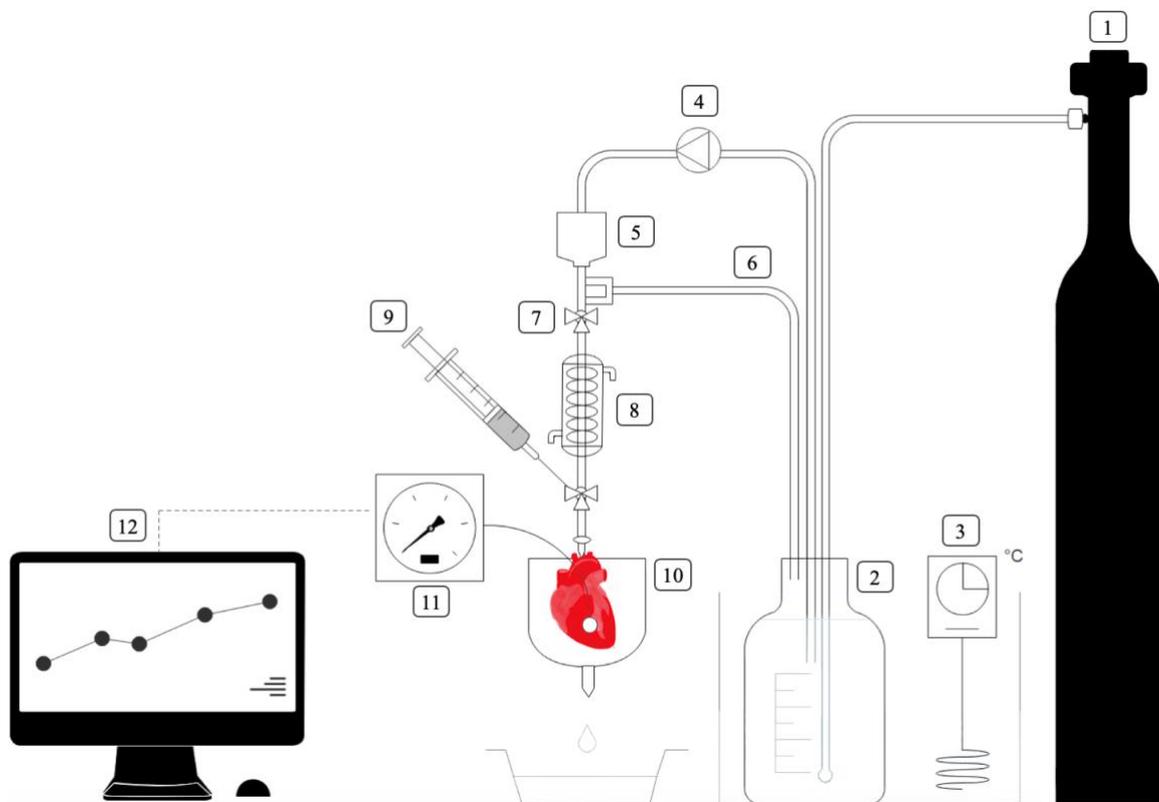


Abb. 4: Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage.

Modell (nicht maßstabsgetreu) der Langendorff-Präparation: Carbogen (1) begast über eine Glasfritte den Krebs-Henseleit-Puffer in einer 2000 ml Perfusatflasche (2). Dieser wird im Wasserbad mit einem Einhängethermostat (3) auf 37,5 °C erhitzt und über eine Schlauchpumpe (4) angesaugt und in die Anlage befördert. Die aufsteigenden Luftblasen werden mittels einer Luftfalle (5) aus dem System entfernt. Über ein Überlaufbecken (6) wird das Perfusat in der Perfusatflasche (2) wieder aufgefangen. Unterhalb der Luftfalle ist ein Dreiwegehahn (7) angebracht, für das spätere Einleiten der globalen Ischämie. Der Puffer wird über einen zweiten Wärmekreislauf (8) warmgehalten. Die Medikamentenapplikation erfolgt über Perfusoren (8), die über Perfusionschläuche an die Anlage verbunden sind. Das Rattenherz wird über die Aorta ascendens an eine Kanüle angeknötet und mit dem erwärmten Puffer retrograd perfundiert. Die Umgebungstemperatur des Herzens wird über eine Wärmekammer (10) konstant gehalten. Mithilfe eines flüssigkeitsgefüllten Ballons im linken Ventrikel mit angeschlossenem Druckaufnehmer (11) wird die Hämodynamik an einer PowerLab-Station (12) aufgezeichnet und reguliert.

2.2.2 Versuchsablauf

2.2.2.1 Anästhesie und Präparation der Versuchstiere

Vor Versuchsbeginn wurden die Ratten gewogen und anschließend mittels intraperitonealer Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital sediert. Das Pentobarbital wurde zuvor mit isotoner Natriumchlorid-Lösung im Verhältnis 1/10 verdünnt und enthielt zusätzlich 1000 I.E. unfraktioniertes Heparin. Die Ratten durchliefen nach Ausfall der Schutzreflexe und der Dekapitation durch die Guillotine, eine mediane Thorakotomie. Nach der Entfernung des Thymus wurde das Herz und die Aorta ascendens freipräpariert. Das Herz wurde am *Truncus brachiocephalicus dexter* abgesetzt und zur Vorbeugung von Embolien der Koronargefäße sofort in ein 50 ml fassendes Becherglas mit 0,9%-iger Kochsalzlösung überführt. Danach wurde das Herz über die Aorta an die Metallkanüle der Langendorff-Anlage angebracht und mittels Fadenschlinge fixiert. Dabei durfte die Metallkanüle nicht zu weit retrograd fixiert werden, da sonst die Koronarien verlegt und die Aortenklappe beschädigt werden konnte. Um eine mögliche ischämische Prækonditionierung zu vermeiden, durfte die Dauer der gesamten Prozedur von Dekapitation bis Perfusion an der Langendorff-Anlage maximal 3 Minuten betragen.

2.2.2.2 Druckeinstellung und Substanzapplikation am Rattenherzen

Mittels einer Inzision des linken Herzohres wurde über die Mitralklappe ein Ballon im linken Ventrikel platziert. Die Soll-Zeit zur Positionierung des Ballons durfte dabei nicht mehr als fünf Minuten betragen. Der minimale enddiastolische linksventrikuläre Druck wurde manuell auf 3–6 mmHg eingestellt, wenn nicht das einzelne Herz Druckunterschiede aufweist. Die Medikamenten- und Blockerapplikation erfolgte über Dreiwegehähne und Perfusoren entsprechend dem experimentellen Design (vgl. Abb. 5).

2.2.2.3 Versuchsablauf

Für die Durchführung der Studie wurde ein experimentelles Design mit insgesamt 9 Gruppen à 10 Versuchstieren (Abb. 5) aufgestellt. Die Rattenherzen wurden auf die einzelnen Gruppen randomisiert zugeordnet. Alle Herzen durchliefen nach 15-minütiger Adaption eine 33-minütige globale Ischämie und eine anschließende 60-minütige Reperfusion. Die Medikamente wurden unmittelbar im Anschluss an die Ischämie für 10 Minuten oder ab der 30. Minute in der Reperfusion für 10 Minuten über einen Perfusor appliziert. Die Flussrate der Perfusoren wurde

auf 1 % des Koronarflusses, der zuvor in der 10. Minute bestimmt wurde, festgelegt. In der Kontrollgruppe wurde direkt nach der globalen Ischämie bzw. ab der 30. Minute in der Reperfusion für jeweils 10 Minuten anstelle eines Medikaments die KHP-Lösung verabreicht. Die Behandlungsgruppen erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit Dex nach Reperfusionbeginn oder nach 30 Minuten in Kombination mit dem mK_{Ca} -Blocker Pax oder dem mK_{ATP} -Blocker 5HD. In einer vorherigen Dosiswirkungsstudie konnte gezeigt werden, dass 3 nM Dex die niedrigste Konzentration mit der größten kardioprotektiven Wirkung darstellt, wobei dies unabhängig von Zeitpunkt und Dauer der Dex-Gabe nach der Ischämie war [96]. Die Endkonzentration von 100 μ M 5HD am Herzen wurde aus den Ergebnissen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe übernommen [119]. Das 5HD wurde deshalb erst als 40 mM Stock im doppeldestillierten Wasser angesetzt, woraus dann mit Krebs-Henseleit-Puffer die Spritzenkonzentration auf 10 mM 5HD verdünnt wurde. Bei Flussrate von 1 % des Koronarflusses wurde damit eine Endkonzentration von 100 μ M 5HD am Herzen erreicht. Die Endkonzentration für Pax wurde wie bei 5HD ebenfalls aus Studien unserer Arbeitsgruppe übernommen: es wurde als 10 mM Stock mit Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt wurde und im Anschluss weiter mit Krebs-Henseleit-Puffer in der Perfusorspritze auf eine Endkonzentration von 1 μ M am Herzen verdünnt [119]. Alle Versuchsgruppen erhielten neben der Medikamentenkonzentration zusätzlich 1 % DMSO als Vehikel. So konnte ein möglicher Einfluss von DMSO auf die Infarktgröße ausgeschlossen werden. Die Konzentrationen können dem Pipettierschema in Tabelle 3 entnommen werden.

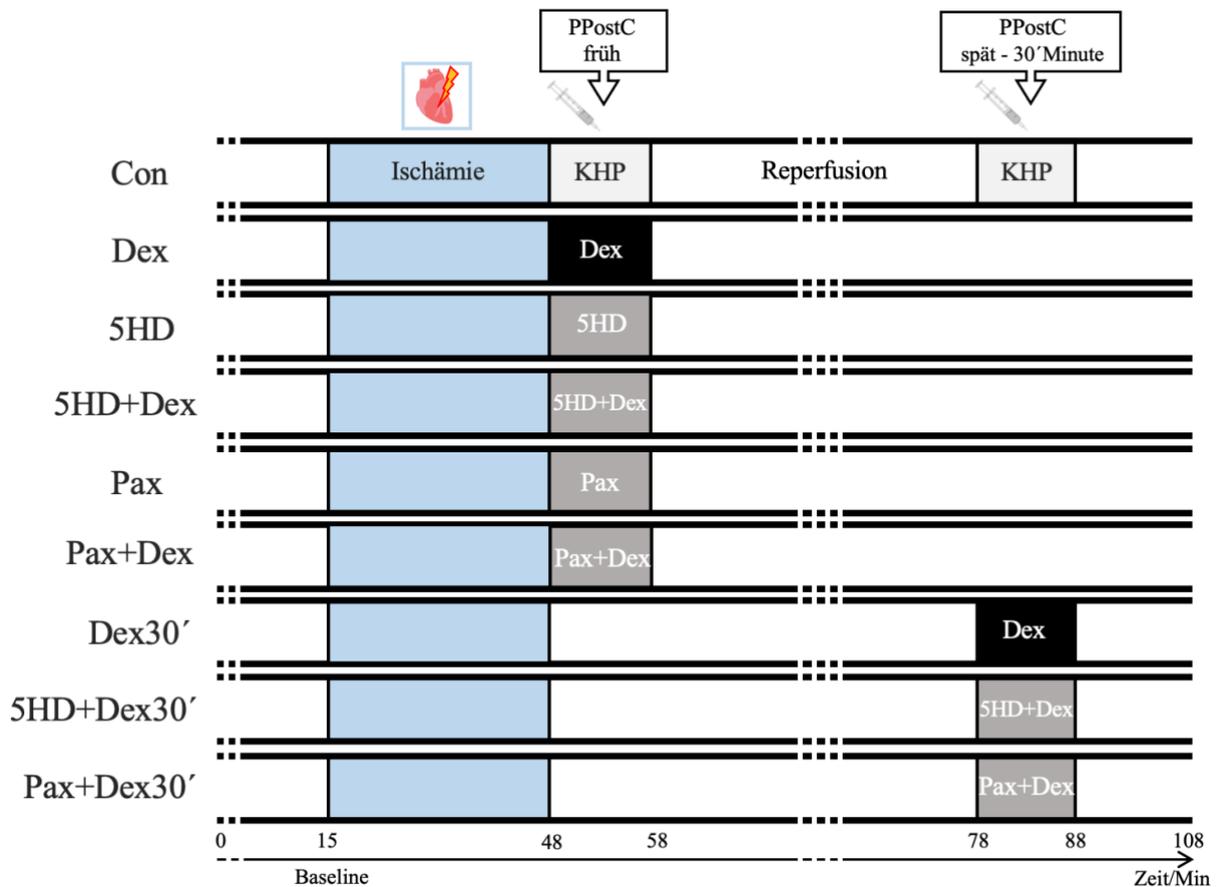


Abb. 5: Experimentelles Design. Modifiziert nach Raupach et al. 2021 [95].

Gezeigt wird die Versuchsreihe der Kontrollgruppe, die im Anschluss an die globale Ischämie für die ersten 10 Minuten (früh) und ab der 30. Minute in der Reperfusion (spät) die Krebs-Henseleit-Pufferlösung mit 1% DMSO über die Perfusoren erhalten. In der frühen PPostC-Reperusionsphase erhalten folgende Versuchsgruppen nur in dieser Phase für 10 Minuten das entsprechende Medikament über einen Perfusor: Dex, 5HD, 5HD + Dex, Pax und Pax + Dex. Für die späte Reperusionsphase gibt es nur drei Versuchsgruppen, die ab der 30. Minute für 10 Minuten mit dem entsprechenden Medikament perfundiert wurden: Dex30', 5HD + Dex30' und Pax + Dex30'. Dex = Dexmedetomidin; DMSO = Dimethylsulfoxid; Pax = Paxillin; PPostC = pharmakologische Postkonditionierung; 5HD = 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz; 30' = zur 30. Minute in der Reperusionsphase

Tabelle 3: Pipettierschema

Gezeigt werden die Volumina der Medikamente und Lösungsmittel für die Perfusorspritzen. Pro Gruppe wurden zwei Perfusoren verwendet, dementsprechend wurden für 5-ml-Spritzen die o.g. Volumina der Medikamente und Lösungen pipettiert.

Gruppe	KHP [µl]	DMSO [µl]	Dex [µl]	Pax [µl]	5HD [µl]
Con					
Perfuser 1: KHP → 1% DMSO	4950	50	-	-	-
Perfuser 2: KHP	5000	-	-	-	-
Dex / Dex30' (3nM)					
Perfuser 1: Dex	4985	-	15	-	-
Perfuser 2: KHP → 1% DMSO	4950	50	-	-	-
5HD (1µM)					
Perfuser 1: 5HD	3750	-	-	-	1250
Perfuser 2: KHP → 1% DMSO	4950	50	-	-	-
Pax (1µM)					
Perfuser 1: Pax → 1% DMSO	4950	-	-	50	-
Perfuser 2: KHP	5000	-	-	-	-
5HD+Dex / 5HD+Dex30'					
Perfuser 1: 5HD	3750	-	-	-	1250
Perfuser 2: Dex → 1% DMSO	4935	50	15	-	-
Pax+Dex / Pax+Dex30'					
Perfuser 1: Pax → 1% DMSO	4950	-	-	50	-
Perfuser 2: Dex	4985	-	15	-	-

Con = Kontrollgruppe; Dex = Dexmedetomidin; DMSO = Dimethylsulfoxid; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; Pax = Paxillin; PPostC = Pharmakologische Postkonditionierung; 5HD = 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz; 30' = zur 30. Minute in der Reperfusionphase; µl = Mikroliter; nM = Nanomol; µM = Mikromol

2.2.2.4 TTC-Färbung und Infarktgrößenbestimmung

Für die Infarktgrößenbestimmung wurde nach Messung des Herznassgewichts das Herz bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, und später wurden mithilfe der Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung die Infarktareale dargestellt. Für die Färbelösung wurde 0,75-prozentige Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung in TRIS-haltiger Pufferlösung in einem Magnetrührer mit Temperatursensor unter Lichtschutz auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, dabei musste der pH-Wert exakt auf 7,42 eingestellt werden. Dafür wurde je nach Bedarf verdünnte Salzsäure und verdünntes Kaliumhydroxid zur Anpassung des pH-Werts verwendet. Der Farbumschlag der Färbelösung erfolgte durch eine Redoxreaktion: Das Tetrazolium ist im oxidierten Zustand farblos. In vitalen Zellen produzieren aktive Dehydrogenasen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), welches das farblose Tetrazolium zu rotem Formazan reduziert. Als Folge wird das vitale Gewebe rot gefärbt, und totes Gewebe bleibt weiß bzw. ungefärbt.

Tabelle 4: Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbelösung: Material und Mengenangaben der 0,75%igen TTC-Färbelösung für 100 ml

Stoffe für TTC-Färbelösung	für 100 ml
TRIS-Puffer	1,41 g
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	0,75 g
Natriumchlorid-Infusionslösung 0,9%	add 100 ml
1 oder 5mol Salzsäure	je nach Bedarf (senkt den pH-Wert)
4mol Kaliumhydroxid	je nach Bedarf (erhöht den pH-Wert)

g = Gramm; ml = Milliliter; mol = Molar; % = Prozent

Für den Färbeprozess wurden die eingefrorenen Rattenherzen mit einem Skalpell in 8 axiale Scheiben von je 2 mm Dicke geschnitten. Anschließend wurden die Scheiben auf einer Lochplatte in der TTC-Färbelösung in einem Wärmebad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 15 Minuten erfolgte die Fixierung in 4-prozentiger Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur für 20 Stunden. Nach der Fixierung wurden die Herzscheiben für die Infarktgrößenbestimmung mit hochauflösenden einem Fotoscanner erfasst (Abb. 6).



Abb. 6: Herzschnitte.

Die Rattenherzen wurden in 8 Scheiben geschnitten, gefärbt und anschließend in Formaldehyd-Lösung fixiert. Die Reihe zeigt die Herzscheiben, die von der Basis nach Apex sortiert sind.

2.2.3 Infarktgrößen-Auswertung

Die Infarktgrößenbestimmung bzw. Planimetrie der Herzscheiben wurde mit der Software SigmaScan erhoben. Dabei wurden zur Bestimmung der Infarktgröße und zur besseren Unterscheidung der Gewebe die Farbsättigung und der Kontrast für alle Bilder gleichermaßen angepasst. Die Infarktareale waren als weiß-gräuliche und das vitale Gewebe als rötliche Areale sichtbar (Abb. 6). Die Flächen der Infarktareale des linken Ventrikels sowie Gesamtfläche des linken Ventrikels aller Herzscheiben eines Herzens wurden bestimmt und jeweils addiert. Anschließend wurde die Infarktgröße ins Verhältnis zur Gesamtfläche des linken Ventrikels aller Herzscheiben gesetzt. Das Ergebnis dieser Division ergab die prozentuale Infarktgröße eines Herzens. Diese Auswertung wurde von einem verblindeten Untersucher durchgeführt.

2.2.4 Häodynamische Auswertung

Über den im linken Ventrikel platzierten Ballon wurden der minimale und der maximale linksventrikuläre Druck sowie die Herzfrequenz (Herzschläge pro Minute) über die gesamte Versuchsdauer aufgezeichnet. Die weiteren Parameter wurden aus diesen Werten berechnet bzw. abgeleitet. Im Tabellenkalkulationsprogramm wurden die häodynamischen Werte wie die Herzfrequenz, maximaler linksventrikulärer Druck und Koronarfluss (Tabelle 5) zu definierten Zeiten tabellarisch zusammengetragen.

Tabelle 5: Überblick und Beschreibung der gemessenen häodynamischen Parameter

Häodynamische Werte	Abkürzung	Einheit	Beschreibung
Herzfrequenz	HR	[bpm]	Herzschläge pro Minute
maximaler linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVPmax	[mmHg]	maximaler Druck im linken Herzventrikel, der am Ende der Diastole herrscht und nicht eingestellt wird
Koronarfluss	CF	[ml/min]	koronares Effluat aus dem Koronarvenensinus, der zu definierten Zeiten über eine Minute gemessen wurde

2.2.5 Statistische Auswertung

Die mit der Statistiksoftware berechnete Gruppengröße für die Studie betrug 10 Versuchstiere ($n = 10$) pro Gruppe bei einer Power von 0,8 ($p < 0,05$; Standardabweichung 15 %; zweiseitig), um eine Infarktgrößenänderung von 25 % detektieren zu können. Die Auswertung der hämodynamischen Variablen zu den verschiedenen Zeiten wurde mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und einem Tukey-Post-hoc-Test (GraphPad V7.01) durchgeführt. Die Daten bezüglich des Gewichts, des ischämischen Kontrakturmaximums und der Infarktgröße wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und mit Tukey-Post-hoc-Test analysiert. Änderungen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in Tabelle 6 dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht, Herzgewicht und Ischämieparameter

Von allen Versuchstieren wurden das Körpergewichts sowie das Herztrocken- und -nassgewicht erfasst (Tabelle 5). Zusätzlich wurden auch Zeitpunkt und Höhe der maximalen Kontraktur (IS-Peak) der Myozyten in der globalen Ischämiephase aufgezeichnet. In der Kontrollgruppe lag das Körpergewicht durchschnittlich bei 296 ± 18 g, das Herztrockengewicht bei $0,122 \pm 0,03$ g, das Herznassgewicht bei $1,28 \pm 0,04$ g. Der IS-Peak trat zum Zeitpunkt 17 ± 2 Minuten in der Ischämie auf mit einer maximalen ischämischen Kontraktur von 66 ± 10 mmHg. Bei keinem dieser Parameter wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt [95].

Tabelle 6: Übersicht des Körpergewichts, Herztrocken- und nassgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur. Modifiziert nach Raupach et al. 2021 [95].

	Versuchs- gruppe	n	Körpergewicht [g]	Herztrocken- gewicht [g]	Herznass- gewicht [g]	Zeitpunkt der maximalen ischämischen Kontraktur [Min.]	Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur [mmHg]
	Con	10	296 ± 18	$0,12 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,04$	17 ± 2	66 ± 10
Behandlung in der frühen Reperfusion	Dex	10	301 ± 14	$0,09 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,04$	17 ± 1	68 ± 7
	5HD+Dex	10	300 ± 30	$0,10 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,06$	17 ± 2	60 ± 15
	5HD	10	304 ± 28	$0,10 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,04$	18 ± 4	68 ± 8
	Pax+Dex	9	305 ± 33	$0,11 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,06$	17 ± 3	68 ± 21
	Pax	9	295 ± 27	$0,11 \pm 0,03$	$1,30 \pm 0,07$	17 ± 2	71 ± 15
Behandlung in der späten Reperfusion	Dex30'	10	299 ± 11	$0,11 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,04$	17 ± 2	59 ± 8
	5HD+Dex30'	10	311 ± 24	$0,10 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,05$	18 ± 2	70 ± 13
	Pax+Dex30'	9	302 ± 18	$0,10 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,05$	18 ± 2	65 ± 7

Alle Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

Con = Kontrollgruppe; Dex = Dexmedetomidin-Gruppe; Pax = Paxillin-Gruppe; 5HD = 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz-Gruppe; g = Gramm; Min. = Minute; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule; n = Anzahl; 30' = zur 30. Minute

3.2 Effekt auf die Infarktgröße

Die Infarktgröße ist in Abb. 7 als prozentualer Anteil des Risikogebiets (*Area at Risk*, AAR) angegeben und beträgt in der Kontrollgruppe Con $57 \pm 9 \%$. Durch die Behandlung in der frühen Reperfusionphase mit Dex (Gruppe Dex) wurde die Infarktgröße signifikant auf $31 \pm 7 \%$ ($p < 0,0001$ vs. Con) reduziert [95].

In der frühen Reperfusion inhibierte die zusätzliche Gabe des mK_{ATP} -Blockers 5HD den Infarktgrößen-reduzierenden Effekt von Dex (5HD + Dex: $52 \pm 6 \%$; $p < 0,0001$ vs. Dex). Auch die Kombination des mK_{Ca} -Blockers Pax mit Dex hob die Reduktion der Infarktgröße durch Dex auf (Pax + Dex: $53 \pm 4 \%$, $p < 0,0001$ vs. Dex). Die Infarktgröße wurde durch die Gabe von 5HD oder Pax nicht beeinflusst (5HD: $54 \pm 8 \%$, $p = 0,987$ vs. Con; Pax: $53 \pm 11 \%$, $p = 0,947$ vs. Con). Während der späten Reperfusion reduzierte die Behandlung mit Dex im Vergleich zur Con-Gruppe ebenfalls die Infarktgröße signifikant (Dex30': $33 \pm 10 \%$, $p < 0,0001$ vs. Con). Die gleichzeitige Anwendung von 5HD hatte keinen Einfluss auf die durch Dex induzierte Verringerung der Infarktgröße (5HD + Dex30': $36 \pm 7 \%$, $p < 0,0001$ vs. Con). Im Gegensatz dazu hob die Verabreichung von Pax die kardioprotektive Wirkung von Dex auf (Pax + Dex30': $58 \pm 7 \%$, $p < 0,0001$ vs. Dex30') [95].

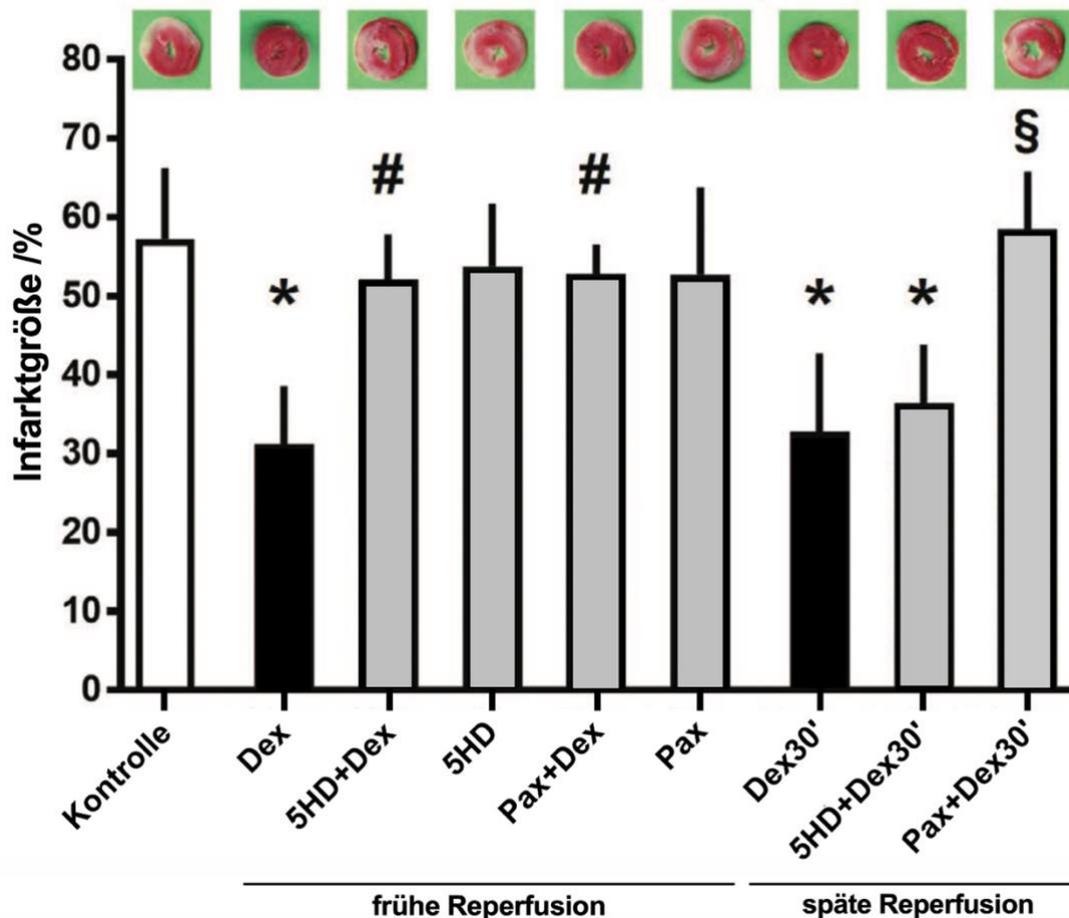


Abb. 7: Infarktgröße in % zum Risikogebiet. Modifiziert nach Raupach et al. 2021 [95].

Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $p < 0,05$ vs. Con- Gruppe; # = $p < 0,05$ vs. Dex-Gruppe; § = $p < 0,05$ gegenüber Dex30' -Gruppe, n=10

Con = Kontrollgruppe; Dex = Dexmedetomidin-Gruppe; Pax = Paxillin-Gruppe; 5HD = 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz-Gruppe; 30' = zur 30. Minute

3.3 Effekt auf die Hämodynamik

Die hämodynamischen Werte (Tabelle 7) der Kontrollgruppe bezogen auf die Herzfrequenz fielen während der Versuchsdauer kontinuierlich nach der Baseline ab (Con zur Baseline: 307 ± 36 bpm; zur 30. Minute: 270 ± 92 bpm; zur 45. Minute: 244 ± 70 bpm; zur 60. Minute: 256 ± 81 bpm). In der frühen und späten Reperfusionphase konnten bei Dex, 5HD, Pax und bei der Kombination beider Blocker mit Dex nach der Baseline ein Abfall der Herzfrequenz festgestellt werden, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied [95].

Der maximale linksventrikuläre Druck (LVDP) in der frühen und späten Reperfusion fiel in der Baseline ebenfalls signifikant ab (Con zur Baseline: 136 ± 26 mmHg; zur 30. Minute: 39 ± 27 mmHg; zur 45. Minute: 47 ± 22 mmHg; zur 60. Minute: 46 ± 22 mmHg) [95]. Parallel dazu fiel auch der Koronarfluss kontinuierlich nach der Baseline ab (Con zur Baseline: 16 ± 3 ml/min; zur 30. Minute: 10 ± 3 ml/min; zur 45. Minute: 9 ± 2 ml/min; zur 60. Minute: 8 ± 2 ml/min) [95].

Tabelle 7: Übersicht der gemessenen hämodynamischen Parameter. Modifiziert nach Raupach et al. 2021 [95].

		Baseline	Reperfusion [Min.]		
			30	45	60
Herzfrequenz [bpm]					
	Con	307 ± 36	270 ± 92	244 ± 70	256 ± 81
Behandlung in der frühen Reperfusion	Dex	302 ± 53	259 ± 68	244 ± 65	210 ± 73
	5HD+Dex	322 ± 28	249 ± 77	235 ± 73	252 ± 73
	5HD	291 ± 33	226 ± 68	256 ± 63	255 ± 51
	Pax+Dex	296 ± 41	176 ± 52	191 ± 46	217 ± 81
	Pax	286 ± 29	207 ± 49	234 ± 60	219 ± 67
Behandlung in der späten Reperfusion	Dex30'	304 ± 37	259 ± 33	207 ± 65	242 ± 42
	5HD+Dex30'	289 ± 44	217 ± 71	229 ± 62	233 ± 65
	Pax+Dex30'	303 ± 46	234 ± 51	218 ± 72	244 ± 61
Maximaler linksventrikulärer Druck [mmHg]					
	Con	136 ± 26	39 ± 27*	47 ± 22*	46 ± 22*
Behandlung in der frühen Reperfusion	Dex	148 ± 25	30 ± 11*	39 ± 12*	39 ± 15*
	5HD+Dex	118 ± 27	32 ± 18*	34 ± 19*	32 ± 17*
	5HD	151 ± 27	33 ± 14*	36 ± 15*	34 ± 17*
	Pax+Dex	126 ± 27	30 ± 13*	36 ± 13*	30 ± 17*
	Pax	145 ± 32	37 ± 9*	42 ± 13*	42 ± 15*
Behandlung in der späten Reperfusion	Dex30'	127 ± 24	39 ± 20*	36 ± 24*	35 ± 18*
	5HD+Dex30'	138 ± 35	37 ± 14*	33 ± 17*	30 ± 17*
	Pax+Dex30'	133 ± 23	32 ± 16*	28 ± 15*	26 ± 16*
Koronarfluss [ml/Min.]					
	Con	16 ± 3	10 ± 3*	9 ± 2*	8 ± 2*
Behandlung in der frühen Reperfusion	Dex	17 ± 2	9 ± 3*	8 ± 3*	7 ± 2*
	5HD+Dex	16 ± 3	8 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 2*
	5HD	16 ± 3	9 ± 3*	8 ± 2*	7 ± 2*
	Pax+Dex	15 ± 3	6 ± 1*	6 ± 1*	5 ± 1*
	Pax	16 ± 2	8 ± 3*	8 ± 3*	8 ± 3*
Behandlung in der späten Reperfusion	Dex30'	16 ± 3	9 ± 2*	8 ± 2*	7 ± 2*
	5HD+Dex30'	15 ± 3	8 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 1*
	Pax+Dex30'	17 ± 3	9 ± 3*	8 ± 3*	8 ± 3*

Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. * = p < 0,05 gegenüber Baseline

bpm = beats per minute (Schläge pro Minute); Min. = Minute; ml/Min. = Milliliter pro Minute; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule;

Con = Kontrollgruppe; Dex = Dexmedetomidin-Gruppe; Pax = Paxillin-Gruppe; 5HD = 5-Hydroxydecansäure-Natriumsalz-Gruppe; 30' = zur 30. Minute

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Infarktgröße und Hämodynamik

Bei der Fragestellung nach einer Beteiligung der mitochondrialen Kalium-Kanäle an der Dex-induzierten Kardioprotektion wurden als primäre und sekundäre Endpunkte die Infarktgröße und die Hämodynamik beurteilt. In den Untersuchungen lag die Infarktgröße bei den Kontrollherzen (Con) bei ca. 60 % lag (siehe Abb. 7). In der Dex-Gruppe konnte während der frühen Reperfusion eine reduzierte Infarktgröße festgestellt werden. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass die Postkonditionierung mit Dex eine Kardioprotektion nach I/R-Schaden vermittelt. Dieser protektive Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von 5HD oder Pax vollständig aufgehoben. Jeweils allein hatten beide Blocker jedoch keinen Einfluss auf die Infarktgröße. In der späten Reperfusion kam es bei der Dex30'-Gruppe im Vergleich zur Con-Gruppe ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße und damit zu Kardioprotektion. Die gleichzeitige Verabreichung von 5HD hatte keinen Einfluss auf die Dex-induzierte Reduktion der Infarktgröße. Im Gegensatz dazu hob die Verabreichung von Pax den kardioprotektiven Effekt der Behandlung mit Dex während der späten Reperfusion vollständig auf [95].

Die hämodynamischen Variablen aller Gruppen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Zwischen den Gruppen und innerhalb jeder Gruppe wurden während der Reperfusion keine signifikanten Unterschiede bei Herzfrequenz, maximalem LVDP und Koronarfluss festgestellt. Während der Reperfusion nahmen in allen Gruppen sowohl LVDP als auch Koronarfluss signifikant ab. Der LVDP war in allen Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert signifikant reduziert, was auf die postischämische Kontraktilitätsstörung aufgrund des Vitalitätsverlust hinweist. Zwischen den Gruppen waren trotz deutlicher Veränderungen der Infarktgröße keine Unterschiede im LVDP nachweisbar [95]. Dies deutet darauf hin, dass die Dex-Postkonditionierung in unserem Modell kardioprotektiv wirkt, indem sie den Zelltod und wahrscheinlich nicht die kontraktile Dysfunktion vermindert. Beide Ereignisse sind oft das Ergebnis derselben Mechanismen, aber der Schutz vor kontraktile Dysfunktion ist nicht identisch mit dem vor dem Zelltod [160]. Unsere Reperusionszeit betrug 60 Minuten, sodass wir lediglich eine Aussage für diese Zeitspanne machen können. Dass wir keine Auswirkungen auf die Herzfunktion feststellen konnten, könnte auf eine sogenannte myokardiale Dysfunktion infolge der verlängerten

Ischämie und Reperfusion zurückzuführen sein [161]. Eine postischämische myokardiale Betäubung nach einem nicht tödlichen Infarkt kann die Herzfunktion mehrere Tage lang beeinträchtigen. Dennoch stehen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu denen von Riquelme et al., die eine verbesserte Erholung der Herzfunktion nach einer Präkonditionierung mit Dex beschreiben [162]. Riquelme et al. führten eine 25-minütige Vorbehandlung mit Dex als Präkonditionierungsstimulus mit einer höheren Dex-Konzentration vor 30 Minuten globaler Ischämie und 120 Minuten Reperfusion durch [162]. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Dex-induzierte Kardioprotektion während der Reperfusionszeit, d. h., der Eingriff erfolgte nach der Ischämie und nicht davor [95]. Daher könnte die in der Studie von Riquelme et al. beobachtete Wirkung auf die Herzfunktion auf bis zu drei Faktoren zurückzuführen sein: (1) höhere Dex-Konzentration, (2) verkürzte Dauer der globalen Ischämie im Vergleich zu unserem Protokoll und (3) doppelt so lange Reperfusionszeit wie in unserer Studie. Einhergehend mit dieser Annahme haben Braunwald et al. eine Art Grenzwertphänomen für die Auswirkung der Ischämie-Dauer auf die myokardiale Erholungszeit beschrieben [161]. Um eine differenzierte Klärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung von Dex auf die kontraktile Dysfunktion zu erreichen, wäre zusätzlich ein *In vivo*-I/R-Modell erforderlich.

4.1.2 Mitochondriale Kalium-Kanäle

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanäle am infarktgrößenreduzierenden Effekt der Dex-induzierten Postkonditionierung beteiligt sind (Abb. 8).

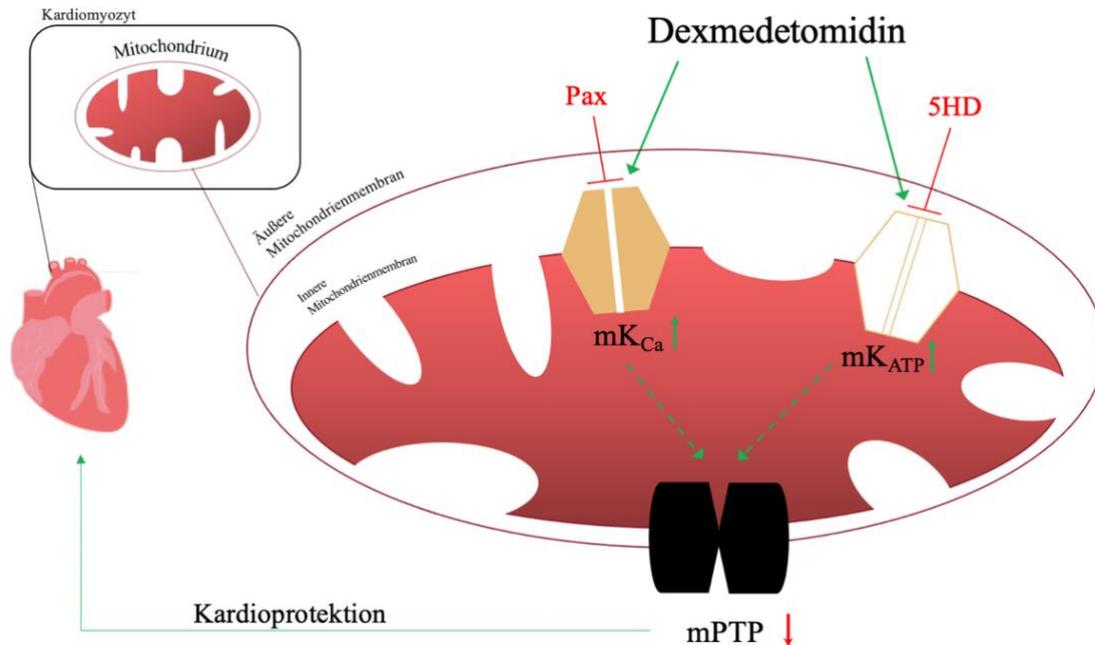


Abb. 8: Mitochondriale Wirkung von Dexmedetomidin.

Dex = Dexmedetomidin; mK_{ATP} = mitochondrialer ATP-aktivierender Kalium-Kanal; mK_{Ca} = mitochondrialer Calcium-aktivierender Kalium-Kanal; $mPTP$ = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore

Während der frühen Reperfusion hemmen spezifische Blocker von mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanälen die Kardioprotektion durch Postkonditionierung mit Dex. Im Gegensatz dazu wird die Postkonditionierung mit Dex während der späten Reperfusion ebenfalls durch die Blockade des mK_{Ca} -Kanals gehemmt, jedoch nicht durch die Blockade der mK_{ATP} -Kanäle. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Postkonditionierung mit Dex während der frühen Reperfusion die Aktivierung beider Kalium-Kanäle beinhaltet, wohingegen der kardioprotektive Effekt während der späten Reperfusion nur durch die Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen vermittelt zu werden scheint [95].

4.1.2.1 Frühe Reperfusionsphase

In der frühen Phase der Reperfusion wird eine Verringerung der Infarktgröße durch Dex mit dem mK_{Ca} -Inhibitor Pax aufgehoben und zeigt somit, dass Dex über den mK_{Ca} -Kanal eine Kardioprotektion vermittelt [95]. Der mK_{Ca} -Kanal gehört zu den spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen und ist für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase über die Steuerung

der Transmembranspannung und der intrazellulären Calcium-Konzentration verantwortlich [90]. Zudem verhindern die mK_{Ca} -Kanäle eine unkontrollierte Öffnung der mitochondrialen Übergangspore und spielen so eine zentrale Rolle beim Schutz des Herzens vor dem ischämischen Zelltod [163].

Pax ist ein positiver allosterischer Modulator von mK_{Ca} -Kanälen, der zu einer starken Stabilisierung der geschlossenen Konformation dieses Kanals führt, denn es hat eine 1000-fach stärkere Affinität für geschlossene Kanäle als für offene [164, 165]. Aufgrund seiner Eigenschaft als potenter und selektiver Inhibitor des mK_{Ca} -Kanals [143, 150, 166, 167] ist Pax ein gängiger Kanalblocker für Studien zur Untersuchung von Medikamenteneinfluss auf die Infarktgröße. Es besteht jedoch keine Zulassung für die klinische Anwendung. Die Pax-Konzentration betrug in dieser Studie 1 μ M und beruht auf Vorstudien, in denen nachgewiesen werden konnte, dass diese Konzentration für die spezifische Hemmung des mK_{Ca} -Kanals ausreicht [168, 169]. Bei dieser Konzentration wurde zudem kein eigener Einfluss von Pax auf die Hämodynamik oder die kardiale Funktion festgestellt. Die Herzfrequenz blieb konstant, der Koronarfluss und der linksventrikuläre Druck sanken in der Pax-Versuchsgruppe genauso wie in den anderen Versuchsgruppen. Beim Einsatz höherer Pax-Konzentrationen können darüber hinaus verschiedene Isoformen der sarko-/endoplasmatischen Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) [170] und der cerebellaren Inosit-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren [133] gehemmt werden. Die Konzentration muss jedoch dafür mindestens fünfmal höher sein als in dieser Studie [95].

Der mK_{ATP} -Kanal-Inhibitor 5HD vermindert die Protektion der Postkonditionierung mit Dex während der frühen Reperfusionsphase, was auf eine Beteiligung der mK_{ATP} -Kanäle zu diesem Zeitpunkt hinweist. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals eine Beteiligung von mK_{ATP} -Kanälen an der Kardioprotektion durch eine Postkonditionierung mit Dex [95]. Wie bei Pax wurde auch bei 5HD kein eigener Einfluss auf die Herzparameter, die Hämodynamik oder die kardiale Funktion festgestellt [95]. 5HD wird in experimentellen Studien eingesetzt, um die durch mK_{ATP} -Aktivierung induzierte ischämische Konditionierung und Kardioprotektion zu blockieren [117, 171]. Auch bei anderen Organen konnte Dex einen protektiven Effekt mittels mK_{ATP} -Kanäle vermitteln. Bei zerebralem I/R-Schaden zeigten Yuan et al. eine Schutzwirkung von Dex durch Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen in einem *In vivo*-Rattenmodell [172]. Die *intraperitoneale* Injektion von Dex vor der Ischämie schützte das Gehirn vor einem I/R-Schaden, während die zusätzliche Anwendung des mK_{ATP} -Kanalblockers 5HD diesen Effekt

aufhob [172]. Daher scheint Dex eine Öffnung von mK_{ATP} -Kanälen zu induzieren, um seine Organschutzwirkung zu vermitteln. Minaei et al. untersuchten in einem *In vivo*-Ratten-Parkinson-Modell die neuroprotektive Wirkung von Dex. Dabei wurde gezeigt, dass die Dex-Wirkung durch den mK_{ATP} -Kanal-Inhibitor Glibenclamid abgeschwächt wurde [173]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Dex seine Wirkung über den mK_{ATP} -Kanal vermittelt.

Das 5HD wird in experimentellen Studien eingesetzt, um die induzierte ischämische Konditionierung und Kardioprotektion zu blockieren [117, 171]. Es wird vermutet, dass 5HD im Unterschied zu anderen Medikamenten einen gewissen Grad an Ischämie-Selektivität bezüglich der Modulation der gefäßerweiternden und kardiophysiologicalen Wirkung besitzt. McCullough et al. beweisen, dass 5HD zwar an K_{ATP} -Kanälen im Herzmuskel wirken, jedoch keine Affinität zu den Kalium-Kanälen in der glatten Muskulatur besitzen [129]. Die dabei verwendete 5HD-Konzentration von 100 μ M war ausreichend, um die K_{ATP} -Kanäle am Herzen zu inhibieren. [129]. Notsu et al. zeigten, dass die Verabreichung von 5HD eine passende Dosis-Wirkungs-Beziehung mit einem Hill-Koeffizienten von 0,88 zeigt und damit eine Stöchiometrie von 1:1-Bindung am K_{ATP} -Kanal vorliegt [174]. Dabei wirkt 5HD an der gleichen Bindungsstelle wie ATP, doch moduliert es selbst die Bindung von ATP nicht [174]. Stroethoff et al. konnten mittels Ramelteon-induzierten Kardioprotektion mit 100 μ M 5HD [119] die Protektion des Herzens vollständig aufheben, was auf eine Notwendigkeit des mK_{ATP} -Kanals hinweist. Auch anderen Studien bestätigen, dass Kardioprotektion durch RIPC [175], ischämische Prä- und Postkonditionierung [176-178], und pharmakologische Prä- und Postkonditionierung [179] durch 5HD gehemmt wird.

Die mK_{Ca} - und mK_{ATP} -Kanäle sind von hoher Relevanz für die Kardioprotektion, wie in verschiedenen Studien beschrieben wurde [119, 180, 181]. Eine Aktivierung dieser Kanäle führt zur Hemmung der mPTP als entscheidender Schritt in der Signalkaskade der Ramelteon-induzierten Präkonditionierung [119]. Auch Zhao et al. konnten nachweisen, dass der kardioprotektive Effekt durch Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen vermittelt wird und dabei sowohl eine Verringerung der Ca^{2+} -Überladung und der ROS als auch die Hemmung der mPTP-Öffnung erreicht wird. [180]. Mit diesen Studien konnte ein Zusammenspiel zwischen dem mK_{ATP} -Kanal und der mPTP gezeigt werden, das einen entscheidenden Einfluss auf die Kardioprotektion hat.

4.1.2.2 Späte Reperfusionphase

In der späten Reperfusionphase konnte der protektive Effekt von Dex reproduziert werden [95]. Der mK_{Ca}-Kanalblocker Pax hebt die kardioprotektive Wirkung von Dex auf. Das deutet darauf hin, dass der mK_{Ca}-Kanal auch während der späten Reperfusion eine entscheidende Rolle für die Kardioprotektion spielt. Diese Beobachtung unterstreicht die hohe Relevanz dieses Kanals für die Kardioprotektion. Die Bedeutung von mK_{Ca}-Kanälen zeigten Goswami et al. in einer Studie zur Untersuchung der ischämischen Präkonditionierung, an den Herzen von transgenen Mäusen. Sie verglichen die transgenen Mäuse, die eine aktivierte Form von mK_{Ca}-Kanälen in Mitochondrien exprimierten, mit präkonditionierten Herzen von Wildtyp-Mäusen [182]. Dabei stellte man fest, dass präkonditionierte transgene Herzen die kleinste Infarktgröße zeigten und besonders der I/R-Schaden durch verringerte mitochondriale ROS-Produktion reduziert war [182]. Interessanterweise scheint die Funktion der mK_{Ca}-Kanäle nicht durch das Rattenalter beeinflusst zu werden. So zeigten Heinen et al. eine altersunabhängige Kardioprotektion in einem *In vivo*-Rattenmodell mit jungen (2–4 Monate alten) und gealterten (22–24 Monate alten) Wistar-Ratten bei Verwendung des mK_{Ca}-Kanalaktivators NS1619 und des mK_{Ca}-Kanalblockers Iberitoxin [183]. Diese und weitere Studienansätze zeigen somit, dass die pharmakologische Behandlung von mK_{Ca}-Kanälen vor oder nach Myokardischämie eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur ist, um auch das gealterte Herz vor einem I/R-Schaden zu schützen.

Die Dex-induzierte Kardioprotektion wird in der späten Reperfusionphase nicht durch den mK_{ATP}-Kanal-Inhibitor 5HD blockiert. Die Beobachtung, dass mK_{ATP}-Kanäle nur während der frühen und nicht während der späten Reperfusion an der Postkonditionierung beteiligt sind, steht im Einklang mit einer Studie von Barsukevich et al. [124]. Dabei führten sie eine 30-minütige Myokardischämie mit anschließender Postkonditionierung durch. In einer Versuchsgruppe erfolgte eine sofortige ischämische Postkonditionierung (nach 10 Sekunden) und in einer anderen Versuchsgruppe eine frühe ischämische Postkonditionierung (nach 10 Minuten). Dabei handelte es sich bei den Postkonditionierungen um insgesamt sechs Zyklen à 10 Sekunden Ischämie. Die höchste Kardioprotektion konnte bei den beiden beschriebenen Gruppen mit 43% Infarktgrößenreduktion beobachtet werden. Eine verzögerte IPostC, die 30 oder 45 Minuten nach Reperfusionbeginn gestartet wurde, reduzierte ebenfalls die Infarktgröße um 36 bzw. 41%. Dagegen war eine IPostC, die 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion angewendet wurde, unwirksam. Im Anschluss untersuchten die Autoren die zugrundeliegenden Signalwege und zeigten, dass der mK_{ATP}-Kanal-Blocker 5HD die

Kardioprotektion durch sofortige und frühe IPostC aufhob, jedoch keinen Einfluss auf die verzögerte IPostC (30 oder 45 Minuten nach Beginn der Reperfusion) hatte [124]. Die Ergebnisse von Barsukevich et al. unterstreichen damit die Daten dieser aktuellen Studie, dass die frühe und späte Postkonditionierung über verschiedene mitochondriale Kalium-Kanäle vermittelt wird.

4.2 Diskussion von Material und Methoden

4.2.1 Das Langendorff-Modell und die TTC-Färbung

Für die Untersuchung der mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanalbeteiligung zu unterschiedlichen Zeiten der Reperfusion wurde in dieser Studie die *Ex vivo*-Methode nach Langendorff verwendet.

Das Langendorff-Modell wurde für die Perfusion von isolierten Organen entwickelt und ermöglicht die Durchblutung eines isolierten Säugetierherzens durch eine retrograde Perfusion der Koronargefäße [184] und machte somit den entscheidenden Forschungsschritt für die Oxygenierung eines isolierten Herzens über einen längeren Zeitraum [184]. Diese Forschungsmethode wird bis heute vor allem in der Herzphysiologie zur Untersuchung der Blutflussregulation und der kardialen Elektrophysiologie, der Forschung an der Infarktgröße nach pharmakologischer Konditionierung sowie zur Erfassung zellulärer Signalwege eingesetzt [185, 186]. Die Besonderheit der Langendorff-Anlage ist, dass sie über eine Kanüle die Gefäßversorgung retrograd über die Aorta ascendens mithilfe einer oxygenierten Perfusionslösung gewährleistet und dabei einen konstanten hydrostatischen Druck (60–100 mmHg) über die gesamte Versuchszeit ermöglicht. Der vorliegende Druck führt zu einem Verschluss der Aortenklappen, wodurch eine direkte Durchblutung des linken Ventrikels verhindert wird. Das Perfusat wird in die Koronargefäße geleitet, versorgt das über das Myokard das gesamte Herz und tritt durch den Koronarsinus in den rechten Vorhof aus [187]. Der Vorteil des Langendorff-Modells ist die Übersichtlichkeit, Einfachheit und hohe Reproduzierbarkeit des Tierversuchs. Die vollständige Isolierung des Herzens stellt sicher, dass Beeinflussung der kardialen Funktion durch andere Organe, den systemischen Kreislauf oder das Nervensystems ausgeschlossen sind [188]. Daneben kann durch die Einfachheit des Modells ein breites Spektrum an Messungen und Parametern untersucht werden ohne die Organfunktion zu beeinflussen oder einzuschränken [189]. Trotz der Denervierung und des Fehlens anderer peripherer Faktoren durch die Perfusion eines isolierten Organs ermöglicht die Langendorff-Anlage häufig eine Kompensation dieser Faktoren, z.B. durch Katecholamine oder andere Neurotransmitter-Gaben in der entsprechenden Perfusat-Lösung [187]. Außerdem

wird im Gegensatz zur *In vivo*-Methode die unkontrollierbare Freisetzung von Medikamenten nach Einlagerung im Gewebe vermieden und die Studienmedikamente können exakt appliziert werden. Dementsprechend sind die Studienergebnisse einheitlich und somit vergleichbar. Insofern bietet das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff einen exakten Prüfstand für sorgfältig kontrollierte Dosis-Wirkung-Studien zu metabolischen oder pharmakologischen Interventionen [187]. Zudem halten sich der Zeitaufwand und die Kosten für die Experimente gering [188]. Durch Einführung von standardisierten Bedingungen können mögliche Einflussfaktoren begrenzt und eingeschränkt werden; auf diese wird im Folgenden eingegangen. Von der Herzentnahme bis zur Anbringung an die Langendorff-Apparatur bestehen eine Reihe von potentiellen Gefahrenstellen, die die finale Infarktgröße stark beeinflussen können [190]. Das Herz kann beispielsweise während der Explantation komprimiert, beschädigt oder präkonditioniert werden. Daher sind ein entsprechender geübter Handgriff, Routine und Kompetenz entscheidend. Auch spielt der Zeitfaktor eine wichtige Rolle. Die Zeitspanne von 3 Minuten darf von der Herzentnahme bis zur Perfusion nicht überschritten werden, da eine längere Zeit ohne Perfusion (im Sinne einer ischämischen Präkonditionierung) zu verfälschten Infarktgrößen führen kann [190]. Direkt nach der Herzexzision sollte das Herz bis zur Perfusion an der Anlage in einer Natrium-Chlorid-Lösung aufbewahrt werden, um Lufteinschlüsse und damit Embolien zu vermeiden. Bei der Anbringung des Herzens an die Anlage muss auf eine retrograde Fixierung der Aorta geachtet werden, da durch ein zu tiefes Eindringen ein Defekt der Aortenklappe herbeigeführt werden kann [185, 188]. Auch der Einbau des intraventrikulären Messballons kann je nach Herzanatomie das Versuchsergebnis beeinflussen, da es zur Reizung des endokardialen Endothels führen und die linksventrikuläre Funktion beeinflussen kann – mit der Folge einer Verschlechterung der globalen Ventrikelfunktion und anschließender Herzrhythmusstörung. Der Einbau eines Messballon mit einer geringen linksventrikulären Druckeinstellung ist jedoch notwendig, um die Messung der Hämodynamik zu ermöglichen [191]. Die Art der Perfusion am Langendorff-Modell ist ebenfalls entscheidend. In dieser Studie haben wir uns für eine druckkonstante Perfusion an der Langendorff-Anlage entschieden [95]. Durch die druckkontrollierte Perfusion kann das isolierte Herz die eigene Blutflussregulation und den Druck in den Koronararterien während der Reperfusion und der globalen Ischämie lenken, was im Fall der flusskontrollierten Perfusion aufgehoben würde. Demzufolge ist die druckkontrollierte Perfusion bei der Forschung an künstlich induzierter Myokardischämie vorteilhafter [187]. Zusätzlich ist die konstante Herzaktion – im Gegensatz zur flusskonstanten

Perfusion – bei genügend Sauerstoffsättigung und konstantem Perfusatangebot über mehrere Stunden gewährleistet [192, 193]. Ein weiterer Faktor ist die richtige Temperatur, die die Herzaktivität stark beeinflussen kann. Die physiologische Herzfrequenz bei Ratten liegt bei ca. 350 bpm [194]. Für die Versuche ist also eine physiologische, kontinuierliche und konstante Temperatur von 37 °C entscheidend [186], da eine minimale Temperaturabweichung die Inotropie und die Herzfrequenz modulieren [187, 195] und im Extremfall eine präkonditionierende oder sogar eine (verfälschende) kardioprotektive Wirkung haben kann [185]. Das isolierte Rattenherz hat eine große Oberfläche verglichen mit dem Herzvolumen, dementsprechend droht dem Herzen im Normalfall die Unterkühlung [185]. Um eine Unterkühlung zu verhindern, werden die Krebs-Henseleit-Lösung und der Wärmeschild um das Herz herum in zwei eigenständigen Kreisläufen aufgewärmt. Innerhalb der erwärmten Perfusatlösung kann es zudem zu verschiedenen Zeitpunkten an der Langendorff-Anlage zur Entstehung von Luftblasen kommen, da durch die Schlauchpumpe das Perfusat zu Beginn der Versuchsvorbereitung Luftblasen enthalten kann. Um eine entsprechende Luftembolie der Koronararterien zu vermeiden, muss jedoch das Schlauchsystem frei von Luft sein. Dazu wurde der Luftfänger (Abb. 4) in das System integriert, um eventuell Luftblasen aufzufangen und Lufteinschlüsse zu verhindern. Vor jedem Versuch wurde die Anlage von zwei qualifizierten Mitarbeitern der Studie entlüftet und kontrolliert. Neben der möglichen Gefahr der Luftembolie können auch Algen oder ähnliche Mikroben die Koronargefäße verstopfen. Deshalb sollte der gesamte Perfusionskreislauf von der Perfusionsflasche bis zum Herzen so kurz wie möglich gehalten werden. Da die Freisetzung von Endotoxinen aus Mikroben auch die Leistung des isolierten Herzens erheblich manipulieren und die experimentellen Ergebnisse nachteilig beeinflussen kann [185], ist eine entsprechende Reinigung wichtig. Einige Forscher greifen hier auf Breitbandantibiotika in ihren Perfusionsmedien zurück, was jedoch auch kritisiert wird [187]. Bell et al. empfehlen dagegen die täglichen Spülung der Anlage mit über 80 °C heißem Wasser und alle zwei Wochen eine gründlichere Reinigung mit Decon-90 oder 10-prozentiger Salzsäure, um eine zusätzliche Manipulierung auszuschließen. Basierend auf dieser Empfehlung haben wir uns in dieser Studie für die Reinigung nach jedem Tierversuch mit 80 °C heißem, doppeldestilliertem Wasser und einmal wöchentlich mit 1,5-prozentiger Salzsäure und im Anschluss eine Spülung mit doppeldestilliertem Wasser entschieden, um Algen- und Substanzablagerungen zu eliminieren [185].

Die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung ist eine anerkannte und etablierte Methode [196]. Ferrera et al. zeigten, dass eine 60-minütige Reperfusion ausreichend ist, um die

Infarktgröße isolierter Rattenherzen mithilfe von TTC-Färbung zu beurteilen [197]. In dieser Studie betrug die Reperfusionzeit 60 Min. [197], wodurch die Ergebnisse nach TTC-Färbung und Auswertung eine gültige Aussagekraft besitzen [95]. Auch wenn Studien an isolierten perfundierten Herzen wertvolle Informationen darüber liefern können, was unter pathologischen Bedingungen im isolierten Tierherz geschieht, sollte nicht vergessen werden, dass die Übertragung der Resultate auf den Krankheitsverlauf beim *In vivo*-Modell mit entsprechender Vorsicht durchgeführt werden sollte [188].

4.2.2 Perfusion mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung

Eine weitere standardisiertes Element für diese Arbeit ist die bekannte modifizierte Puffer-Lösung nach Krebs und Henseleit. Nachdem 1889 gezeigt wurde, dass Blut - das ursprünglich von Langendorff zur Perfusion der Herzen verwendet wurde - durch ein mit Glukose als Nährstoff angereichertes Salzmedium ersetzt werden kann, wurde von den Forschern Krebs und Henseleit eine Gewebepperfusionslösungen für Säugetiere entwickelt [198]. Sie entwickelten eine physiologische Salzperfluionsflüssigkeit auf Bicarbonat-Basis, die den Gehalt der wichtigsten Ionen von Blutplasma nachbildet und bei 37 °C mit kontinuierlicher Carbogen-Begasung (5 % CO₂ und 95 % O₂) einen pH-Wert von 7,4 aufweist sowie eine ausreichende Sauerstoffkonzentration gewährleistet [189]. Ursprünglich bestand die erste Krebs-Henseleit-Lösung aus einer Mischung aus 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,52 mM CaCl₂ und 11 mM Glukose [199]. Der physiologische Anteil an Glukose im Blut bei Ratten beträgt jedoch 5,6-6,5 mmol/l [200]. Der Grund für den erhöhten Glukosebedarf in der Perfluionslösung ist die Sicherstellung der Energieversorgung des Myokards, da Glukose hier als einziger Energielieferant dient. Kritisch ist zu beobachten, ob der erhöhte Anteil an Glukose einen diabetischen Metabolismus verursacht [185] und in welchem Maße eine vorübergehende erhöhte Glukose-Stoffwechsellage die Infarktgröße beeinflusst. Der Kalium- und der Calcium-Anteil sind ebenfalls nicht physiologisch, da diese normalerweise an Moleküle und Proteine gebunden sind, die bei der Forschung mit perfundierten Herzen jedoch fehlen [188]. Mit den Jahren wurde die Krebs-Henseleit-Lösung modifiziert und zur Erfüllung der Anforderungen bestimmter Studien können zusätzliche Substanzen eingesetzt werden, wie z. B. Insulin, Pyruvat oder Fettsäuren bei KHP-Lösungen mit niedrigem Glukosegehalt [201-203]. Jedoch kann die Perfluionslösung bei Zugabe von Pyruvat und Fettsäuren durch die Carbogen-Begasung aufschäumen und das Embolie-Risiko erhöhen [185]. Deshalb wurde für die Versuche im

Rahmen dieser Arbeit eine modifizierte KHP-Lösung verwendet, aber auf die zusätzliche Substratgabe verzichtet [95].

Trotz der Einfachheit, der Verbreitung und der kostengünstigen Herstellung weisen kristalloide Lösungen wie die KHP-Lösung einige Einschränkungen auf. Sie führen aufgrund der geringen Sauerstofftransportkapazität zu einer stark erhöhten Koronarflussrate im Vergleich zu Vollblut oder mit roten Blutkörperchen angereicherten Lösungen. Die Folge der erhöhten Flussrate ist eine Belastung entlang des Endothels der Koronararterien, und mit dem Fehlen eines kolloidalen osmotischen Drucks kann dies zu einem Gewebeödem am Herzen führen [204]. Außerdem hat das Fehlen der proteinhaltigen, hormonellen und zellulären Komponenten des Blutes ebenfalls Einfluss auf das Myokardgewebe. Bei Tierversuchen mit kurzer Dauer hat das mögliche KHP-induzierte Gewebeödem allerdings keinen signifikanten Einfluss [205] und hat sich als eine gängige Pufferlösung für kurze Studien bewährt [185, 206, 207].

Eine andere Option wäre bei längerer Versuchsdauer die Perfusion mit blut- oder erythrozytenhaltigen Lösungen [188]. Vollblut ist die physiologischste Variante zur Perfusion des Herzens. Aufgrund seiner Zusammensetzung, des Proteingehalts und der Viskosität befindet sich der Koronarfluss damit auf physiologischem Niveau. Außerdem ist die Sauerstofftransportkapazität von Blut größer und das Risiko der Ödembildung in den Myozyten kleiner als bei der KHP-Lösung, was zu einer effizienteren Sauerstoffversorgung des Myokards führt [188]. Neben einer hohen Sauerstofftransportkapazität bieten die Erythrozyten auch eine Quelle für Antioxidantien und antioxidative Enzyme wie Katalase, die den Gehalt an myokardialem Wasserstoffperoxid und die durch Reperfusion verursachte Schädigung verringern können [208]. Allerdings bestehen auch bei Vollblut Nachteile wie z.B. die komplizierte und teure Aufbereitung [191]. Störfaktoren wie eine Inflammation am Herzen durch neutrophile Granulozyten und Schädigung der Erythrozyten durch schaubildende Begasung können durch Membranoxygenatoren vermieden werden [187]. Dennoch ist eine fortschreitende Hämolyse der roten Blutkörperchen während der Perfusion nicht zu verhindern [209, 210]. Dazu sind große Blutmengen notwendig, die nur durch Unterstützungstiere gewonnen werden können [187, 211-213]. Dabei kann es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Kontamination des Unterstützungstiers durch Endotoxin oder Mikroben in der Umgebung des offenen Herzsystems kommen, wodurch die Herzaktivität stark beeinflusst werden kann [188]. Das durchblutete isolierte Herzpräparat ist zwar ein etabliertes Modell für die Herz-Kreislauf-Forschung und wird erfolgreich bei der Untersuchung verschiedener kardiovaskulärer Pathologien eingesetzt, es wird aber an der Langendorff-Anlage rezirkuliert und bewirkt eine

unumgängliche Hämolyse der Erythrozyten [209, 210]. Durch die Verwendung von kristalloider Perfusionslösung mit roten Blutkörperchen können einige der o. g. Nachteile überwunden werden, jedoch wäre auch hier die Herstellung und Aufbereitung teuer, zeitintensiv und technisch schwierig zu handhaben [188]. Die KHP-Lösung stellt deshalb bei dieser Studie eine qualitative und kostengünstigere Option zur kristalloiden Lösung mit roten Erythrozyten dar [95].

4.2.3 Sedierung mit Pentobarbital

Für die Sedierung der Versuchstiere wurde das Barbiturat-Derivat Pentobarbital (Narcofen) verwendet. Es führt zu einer funktionellen Hemmung der *Formatio reticularis* und zur unspezifischen Hemmung des Zentralnervensystems [214]. Deshalb hat es sich in der Tiermedizin als ein gängiges Euthanasiemittel bewährt und gilt als eine der sichersten Methode zur Euthanasie [215]. Aufgrund des geringen Einflusses, seiner etablierten Wirkung und sicheren Methode wurde das Pentobarbital *intraperitoneal* zum Versuchsbeginn vor der Dekapitation mit einer maximalen Wirkdauer von 5 Minuten injiziert [95].

4.2.4 Dexmedetomidin

Dex ist ein hochselektiver α_2 -Adrenorezeptor-Agonist. Seit seiner Zulassung für die Sedierung auf der Intensivstation haben sich seine Anwendungsmöglichkeiten aufgrund seines Wirkmechanismus, seiner minimalen Auswirkungen auf den Atemantrieb und seines idealen Sicherheitsprofils erheblich erweitert [216]. Zu den Anwendungsgebieten gehören die Prämedikation bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten, die prozedurale Sedierung und die Unterstützung von Allgemein- und Regionalanästhesie, die perioperative Schmerzkontrolle und das postoperative Delirium. Klinische Studien zeigen, dass Dex nur geringe Auswirkungen auf den Atemantrieb hat. Dennoch kann es in Kombination mit anderen Anästhetika eine Atemwegsobstruktion verursachen [216, 217].

Mehrere Studien und Meta-Analysen deuten außerdem darauf hin, dass die Verwendung von Dex im Vergleich zu anderen Sedativa mit weniger Delirium und kognitiven Störungen, einer schnelleren Entwöhnung von der mechanischen Beatmung und einer kürzeren Zeit bis zur Extubation verbunden ist [218, 219]. Seit 2022 liegt jedoch zu Dex ein Rote-Hand-Brief vor. Dieser basiert auf einer randomisierten klinischen Studie, in welcher die Dex-Gabe bei Intensivpatienten jünger als 65 Jahren eine im Vergleich zu anderen Sedativa höhere Mortalität aufwies [220].

Andere Studien zeigten, dass Dex verschiedene Entzündungsprozesse hemmen kann, da es die Aktivität des Immunsystems steigert, während es die systemische Reaktion reduziert und die Zytokinausschüttung senkt. Darüber hinaus kann Dex Herzschäden während der Sepsis lindern, indem es sich positiv auf die Mikrozirkulation auswirkt. Zudem zeigt es eine neuroprotektive Rolle, indem es die Zelltodwege hemmt [216].

Es weist auch bei chirurgischen Patienten verschiedene positive Wirkungen auf, darunter sympatholytische, sedierende, analgetische und opioidsparende Effekte [221, 222]. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Dex während der Herzchirurgie mit einer niedrigeren postoperativen Sterblichkeitsrate und weniger Komplikationen korreliert [221, 223].

Nicht nur die einzelne Verwendung von Dex während herzchirurgischer Eingriffen wirkt kardioprotektiv, sondern auch die Gabe zusammen mit Propofol zeigt einen stärkeren myokardprotektiven Effekt gegen I/R-Schäden als Propofol alleine [224]. Dies zeigt sich in dem niedrigeren Werten von Herzenzymen und stabiler Hämodynamik, darüber hinaus konnte während der Intervention ein geringerer Gesamtbedarf von Fentanyl, früherer postoperativer Extubation und kürzerem Aufenthalt auf der Intensivstation beobachtet werden [224]. Es deckt sich mit einer kürzlich durchgeführten Studie von Mohamed et al [225] zur Untersuchung der Wirkung von Dex auf Myokardschäden während der Bypass-Operation in der pädiatrischen Herzchirurgie. Die Autoren demonstrierten, dass Dex eine schützende Wirkung auf das Myokard hat, was sich in niedrigeren postoperativen Werten von kardialen Biomarkern wie z.B. cTnI, cTnT, CK-MB und Myoglobin zeigte [224, 225].

Bemerkenswert ist, dass die Anästhesie mit Dex unterschiedliche Einflüsse auf die pharmakologische Konditionierung zu haben scheint. In Anwesenheit von Dex wurde die Präkonditionierung mit Milrinon, nicht aber mit Levosimendan, in isolierten Rattenherzen aufgehoben [226]. Darüber hinaus wird die Verringerung der Infarktgröße durch Mannitol abgeschwächt, wenn sie mit der Dex-Präkonditionierung kombiniert wird, während sie voll wirksam ist, wenn Dex in einem Rattenmodell als postkonditionierender Stimulus verabreicht wird [227]. Darüber hinaus scheint die Behandlung mit Dex ihre kardioprotektiven Effekte auch durch die High-mobility-group-protein-1-(HMGB1)-Freisetzung in einem *In vivo*-I/R-Rattenmodell zu entfalten [228]. Die Beteiligung der Stimulation von Acetylcholinrezeptoren am myokardialen I/R-Schaden wurde in der Vergangenheit beschrieben und überprüft [229]. Diese neueren Erkenntnisse legen nahe, dass die Kardioprotektion auch über den cholinergen entzündungshemmenden Weg durch Aktivierung des $\alpha 7$ -nikotinischen Acetylcholinrezeptors ausgelöst wird. Die Überexpression von HMGB1 verschlimmert den I/R-Schaden und hebt

sogar die Dex-induzierte Kardioprotektion auf, was darauf hindeutet, dass neben mPTP das HMGB1 ein Schlüsselprotein bei der Konditionierung am Herzen durch Dex ist [30, 228].

Mit der Absicht, die niedrigste kardioprotektive Konzentration zu ermitteln, die die größte Reduzierung der Infarktgröße bewirkt und gleichzeitig möglichst geringe medikamentenbedingten Nebenwirkungen aufweist, haben wir 3 nM als Konzentration ermittelt [95]. Unsere vorherigen Arbeiten konnten zeigen, dass höhere Dex-Dosen über 3 nM nicht zu einer gesteigerten Kardioprotektion führten. Es wird vermutet, dass bei der Dex-induzierten Kardioprotektion ein rezeptorvermittelter Effekt vorliegt [96]. Die verwendete *In vitro*-Konzentration 3 nM entspricht einer Plasmakonzentration von 8 ng/ml, was genau den klinischen Zielkonzentrationen entspricht [230, 231]. Die Ergebnisse werden durch die von Okada et al. und unserer eigenen Gruppe berichteten Ergebnisse gestützt, die ein vergleichbares Ausmaß der Verringerung der Infarktgröße durch Dex-induzierte Präkonditionierung zeigen [108, 109].

Cheng et al. zeigten, dass die Dex-Nachwirkung über Phosphoinositid-3-Kinase bzw. Proteinkinase B vermittelt wird [232]. Die Aktivierung dieser Signalwege erfordert eine vorgeschaltete Rezeptoraktivität, was ein indirekter Hinweis auf eine rezeptorvermittelte Wirkung der Dex-induzierten Kardioprotektion ist [232]. Eine stärkere Kardioprotektion kann angenommen werden, wenn mehr Rezeptoren stimuliert werden und umgekehrt. Wenn jedoch alle Rezeptoren mit Dex besetzt sind und ein maximaler Stimulus ausgelöst wird, führt eine weitere Erhöhung der Dex-Konzentration nicht zu einer stärkeren Reduktion der Infarktgröße. Dieses Phänomen wurde bereits früher für die pharmakologische Konditionierung beschrieben [119]. Aufgrund der Ergebnisse unserer vorherigen Arbeiten, entschieden wir uns für eine Dex-Gabe über 10 Minuten in der Reperfusion, da diese Zeitspanne ausreichend ist, um die größtmögliche Infarktgrößenreduktion und damit erfolgreiche Kardioprotektion zu bewirken [96].

Diese Arbeit klärt einen Teil der mechanistischen Grundlagen für die Zeitabhängigkeit der Dex-induzierten Kardioprotektion auf. Dies ist ein entscheidender Aspekt bei der Translation in die Klinik. Der Myokardinfarkt und ein damit verbundener I/R-Schaden verläuft akut und lebensbedrohlich. Die Zeit zwischen dem Einsetzen des Ereignisses und dem Beginn der Therapie spielt in der Regel eine zentrale Rolle für das Outcome der Patienten [233]. Im Bereich der RIPostC haben Barsukevich et al. gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der kardioprotektiven Wirksamkeit gibt, unabhängig vom Startzeitpunkt der Intervention [124].

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren vorherigen Ergebnissen für den pharmakologisch induzierten Myokardschutz mittels Dex [96]. Barsukevich et al. haben jedoch einen Unterschied im Signalweg zwischen sofortiger RIpostC und verzögerter RIpostC nachgewiesen [124]. Unsere aktuelle Studie zur Dex-induzierten Postkonditionierung ist im Einklang zu der von Barsukevich et al. bezüglich RIpostC. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass während der frühen Phase der Reperfusion mit Dex-Gabe eine Kardioprotektion über die mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird. Dagegen scheint in der späten Phase der Reperfusion die Dex-induzierte Postkonditionierung über den mK_{Ca} -Kanal, nicht aber über den mK_{ATP} -Kanal herbeigeführt zu werden [95].

Riquelme et al. untersuchten die Beteiligung der endothelialen Stickoxid-(NO)-Synthase (eNOS/NO-Signalweg) im isolierten Rattenherz [162]. Die Autoren fanden heraus, dass die Dex-induzierte Kardioprotektion durch eNOS und die anschließende Produktion von NO vermittelt wurde. Die kardioprotektive Wirkung wurde vollständig aufgehoben, wenn der eNOS/NO-Signalweg pharmakologisch blockiert wurde [162]. Riquelme et al. stellen zudem die Hypothese auf, dass Dex nur durch Präkonditionierung und nicht durch Postkonditionierung eine myokardiale Protektion induzieren kann, da NO nur unter Reperfusionsbedingungen bei der Reaktion mit Superoxid myokardiotoxisches Peroxynitrit produzieren kann [162]. Unsere Ergebnisse widerlegen diese Annahme und legen sogar nahe, die klinischen Auswirkungen der Dex-assoziierten Kardioprotektion in Zukunft zu bestimmen [95].

4.3 Limitierung

In dieser Arbeit wurden als Teil der Signalkaskade gezielt die mK_{ATP} - und mK_{Ca} - Kanäle im Hinblick auf die Dex-induzierte Postkonditionierung untersucht [95]. Auch wenn die Ergebnisse der experimentellen Studien zur Dex-induzierten Kardioprotektion vielversprechend sind, bleibt die Translation weiterhin unzureichend. Es ist erwähnenswert, dass die kardioprotektive Wirkung der Konditionierung in den meisten Fällen bei Vorliegen verschiedener Krankheiten (z. B. Diabetes und Hypertension) und bei älteren Patienten aufgehoben wird [234]. Limitierend ist in dieser Studie, dass die Dex-induzierte Postkonditionierung nur bei jungen gesunden Versuchstieren und nicht bei bestimmten Krankheiten untersucht wurde. Es konnte in Vorstudien gezeigt werden, dass die direkte pharmakologische Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen zu einem kardioprotektiven Effekt auch bei älteren Herzen führt. Daher könnte Dex eine vielversprechende Substanz sein, um eine myokardiale Protektion bei älteren Patienten zu erzielen. Basierend auf diesen Ansatz konnten Torregroza et al. zeigen, dass eine perakute Hyperglykämie vor Ischämie die Dex-induzierte Präkonditionierung nicht beeinträchtigt, während hyperglykämische Bedingungen zum Zeitpunkt der Reperfusion die Postkonditionierung mit Dex blockiert [227].

4.4 Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass die Kardioprotektion durch Dex-Behandlung während einer PPostC in der frühen Reperfusion durch Aktivierung von mK_{ATP} - und mK_{Ca} -Kanälen vermittelt wird, während in der späten Reperfusionsphase für die Kardioprotektion nur mK_{Ca} -Kanäle erforderlich sind [95].

Diese Daten geben erste Hinweise auf den Wirkmechanismus von Dex und mitochondrialen Strukturen, jedoch bleiben für die Durchführung klinischer Studien noch viele Fragen unbeantwortet: Die spezifische Signalkaskade, die der mK_{Ca} - und mK_{ATP} -Kanal-abhängigen Dex-induzierten Kardioprotektion vorgeschaltet ist, bedarf weiterer Abklärung. Das Verständnis und die Erforschung der exakten Signaltransduktionswege zur Protektion des Herzens könnten entscheidend sein, um in Zukunft Patienten mit kardiovaskulärem Risiko und mit Myokardinfarkt optimal therapeutisch behandeln zu können und auf lange Sicht die Konsequenzen und Komplikationen eines Myokardinfarkts zu senken.

Dieses Projekt diene dazu, erste Hypothesen zu überprüfen und Einblicke in mögliche Wirkungsmechanismen von Dex zu erhalten. Da es sich aber um eine randomisiert kontrollierte tierexperimentelle Studie mit gleichmäßiger Verteilung von Störfaktoren und Versuchsgruppen handelt, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen noch abzuklären. Zwar erlauben die vereinheitlichte Durchführung der Laborversuche und die große Versuchsanzahl verlässlichere Ergebnisse als epidemiologische Untersuchungen, aber wie die Postkonditionierung mit Dex bei einem Patienten mit individuellen Vorerkrankungen, schweren Systemerkrankungen und regelmäßiger Medikamenteneinnahme wirkt, ist noch ungewiss. Um ein besseres Verständnis für die Wirkebenen im gesamten menschlichen Organsystem und im Zusammenspiel mit Komorbiditäten und -medikationen zu erhalten, müssten weitere experimentelle und klinische Studien zur Dex-induzierten Kardioprotektion durchgeführt werden. Die jüngsten Projekte unsere Arbeitsgruppe setzen an diesem Thema an: Torregroza et al. [227] konnte unter gleichen experimentellen Bedingungen am isolierten Rattenherzen während einer PPostC nachweisen, dass Komorbiditäten wie Hyperglykämie eine Infarktgrößenreduktion mittels Dex-Gabe inhibieren. Doch inwieweit die Infarktgröße mit Dex bei anderen Systemerkrankungen - von metabolischen bis hin zu entzündlichen Erkrankungen - beeinflusst wird, welche Maßnahmen es zur Vermeidung der Infarktgrößenreduktion gibt und wie die Übertragbarkeit auf den Menschen erfolgen kann, muss noch geklärt werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. WHO, *The Global burden of disease: 2004 update* [zitiert am 05.01.2020].
2. Knuuti, J., et al., *2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes*. Eur Heart J, 2019.
3. Zylka-Menhorn *Europäischer Kardiologenkongress: Die koronare Herzerkrankung ist „alles andere als stabil“*. **Band 116**, S. 1656-1658.
4. Herold, G., *Koronare Herzerkrankung (KHK)*. Innere Medizin. 2018, Köln: Gerd Herold Verlag. S. 238-249.
5. Herold, G., *Myokardinfarkt (MI)*. Innere Medizin. 2018, Köln: Gerd Herold Verlag. S. 251-261.
6. Statistisches-Bundesamt. *Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen [Internet]*. [zitiert am 16.02.2023]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
7. Meier, B., D. Bachmann, and T.F. Luscher, *25 years of coronary angioplasty: almost a fairy tale*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 527-527.
8. 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.
9. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
10. Menger, M.D., D. Steiner, and K. Messmer, *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1892-900.
11. Brömme, H.J., H. Loertzer, and Z. Akçetin, *Der postischämische Reperfusionsschaden - Biochemische und methodische Grundlagen*. Springer-Verlag, 2002.
12. Silver, I.A., *Ion Fluxes in Hypoxic Tissues*. Microvascular Research, 1977. **13**(3): p. 409-420.
13. Heinrich, P.C., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S. 207-208.
14. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
15. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.

16. Bulkley, G.B., *Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review*. Br J Cancer Suppl, 1987. **8**: p. 66-73.
17. Granger, D.N., G. Rutili, and J.M. McCord, *Superoxide radicals in feline intestinal ischemia*. Gastroenterology, 1981. **81**(1): p. 22-9.
18. Grisham, M.B., L.A. Hernandez, and D.N. Granger, *Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia*. Am J Physiol, 1986. **251**(4 Pt 1): p. G567-74.
19. McCord, J.M., *Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation*. J Free Radic Biol Med, 1986. **2**(5-6): p. 307-10.
20. Kaminski, K.A., et al., *Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury*. Int J Cardiol, 2002. **86**(1): p. 41-59.
21. Kevin, L.G., E. Novalija, and D.F. Stowe, *Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice*. Anesth Analg, 2005. **101**(5): p. 1275-87.
22. Weiss, S.J., *Tissue Destruction by Neutrophils*. New England Journal of Medicine, 1989. **320**(6): p. 365-376.
23. Flores, J., et al., *The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute*. J Clin Invest, 1972. **51**(1): p. 118-26.
24. Mazzoni, M.C., et al., *Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion*. Circ Shock, 1990. **31**(4): p. 407-18.
25. Jerome, S.N., T. Akimitsu, and R.J. Korthuis, *Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no-reflow*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 2): p. H1329-36.
26. Jerome, S.N., L. Kong, and R.J. Korthuis, *Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle*. J Invest Surg, 1994. **7**(1): p. 3-16.
27. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 151-4.
28. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
29. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.
30. Torregroza, C., et al., *Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches*. Anesth Analg, 2020. **131**(6): p. 1765-1780.
31. Maroko, P.R., et al., *Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions*. Circulation, 1971. **43**(1): p. 67-82.

32. Maroko, P.R., et al., *Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2710-6.
33. Ginks, W.R., et al., *Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion*. J Clin Invest, 1972. **51**(10): p. 2717-23.
34. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
35. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. Circ Res, 1993. **72**(6): p. 1293-9.
36. Szekeres, L., *Drug-induced delayed cardiac protection against the effects of myocardial ischemia*. Pharmacol Ther, 2005. **108**(3): p. 269-80.
37. Bolli, R., *The late phase of preconditioning*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 972-83.
38. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Preconditioning and postconditioning: new strategies for cardioprotection*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(6): p. 451-9.
39. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
40. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 230-2.
41. Schipke, J.D., et al., *[Postconditioning: a brief review]*. Herz, 2006. **31**(6): p. 600-6.
42. Cohen, M.V., X.M. Yang, and J.M. Downey, *The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis*. Circulation, 2007. **115**(14): p. 1895-903.
43. Hori, M., et al., *Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. Role of transient acidosis during early reperfusion*. Circulation, 1991. **84**(5): p. 2135-45.
44. Ovize, M., et al., *Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 406-23.
45. Inse, J., et al., *Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 923-39.
46. Cohen, M.V., X.M. Yang, and J.M. Downey, *Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 464-71.
47. Yang, X.M., et al., *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1103-10.

48. Schwartz, L.M. and C.J. Lagranha, *Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(3): p. H1011-8.
49. Sivaraman, V., et al., *Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway*. *Basic Res Cardiol*, 2007. **102**(5): p. 453-9.
50. Boengler, K., et al., *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure*. *Pharmacol Ther*, 2008. **120**(2): p. 172-85.
51. 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.
52. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. *Cardiovasc Res*, 2009. **84**(2): p. 201-8.
53. Heusch, G., et al., *Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion*. *Circ Res*, 2011. **109**(11): p. 1302-8.
54. Juhaszova, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(11): p. 1535-49.
55. Sun, H.Y., et al., *Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(4): p. H1900-8.
56. Baxter, G.F. and D.M. Yellon, *Current trends and controversies in ischemia-reperfusion research--meeting report of the Hatter Institute 3rd International Workshop on Cardioprotection*. *Basic Res Cardiol*, 2003. **98**(2): p. 133-6.
57. 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.
58. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 74-85.
59. Wang, J.Y., et al., *Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats*. *Stroke*, 2008. **39**(3): p. 983-90.
60. Xing, B., et al., *Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat*. *Stroke*, 2008. **39**(8): p. 2362-9.
61. Szwarc, I., et al., *Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure*. *Transplant Proc*, 2007. **39**(8): p. 2554-6.

62. Liu, K.X., et al., *Immediate but not delayed postconditioning during reperfusion attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: comparison with ischemic preconditioning*. J Surg Res, 2009. **157**(1): p. e55-62.
63. Sun, K., Z.S. Liu, and Q. Sun, *Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(13): p. 1934-8.
64. Boston, D.R., A. Malouf, and W.H. Barry, *Management of intracoronary thrombosis complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty*. Clin Cardiol, 1996. **19**(7): p. 536-42.
65. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
66. Kerendi, F., et al., *Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(5): p. 404-12.
67. Zhong, H., et al., *Cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning on children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial*. Paediatr Anaesth, 2013. **23**(8): p. 726-33.
68. Crimi, G., et al., *Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial*. JACC Cardiovasc Interv, 2013. **6**(10): p. 1055-63.
69. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm*. Circulation, 2006. **113**(7): p. 1015-9.
70. Caricati-Neto, A., P.R. Errante, and F.S. Menezes-Rodrigues, *Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(16).
71. Heusch, G., *Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning*. Compr Physiol, 2015. **5**(3): p. 1123-45.
72. Wu, Y., H. Liu, and X. Wang, *Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury*. Life Sci, 2021. **264**: p. 118628.
73. Sivaraman, V. and D.M. Yellon, *Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014. **19**(1): p. 83-96.
74. 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.
75. 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.

76. Zhang, H.F., et al., *Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion*. *Apoptosis*, 2004. **9**(6): p. 777-83.
77. Zhang, H.X., et al., *Physiologically tolerable insulin reduces myocardial injury and improves cardiac functional recovery in myocardial ischemic/reperfused dogs*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **48**(6): p. 306-13.
78. Zhu, P., et al., *Glucose-insulin-potassium preserves systolic and diastolic function in ischemia and reperfusion in pigs*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(2): p. H595-603.
79. Bose, A.K., et al., *Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury*. *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 146-51.
80. Matheussen, V., W. Jungraithmayr, and I. De Meester, *Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury*. *Pharmacol Ther*, 2012. **136**(3): p. 267-82.
81. Chong, Z.Z., F. Li, and K. Maiese, *Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity*. *Curr Neurovasc Res*, 2005. **2**(5): p. 387-99.
82. Maiese, K., F. Li, and Z.Z. Chong, *New avenues of exploration for erythropoietin*. *JAMA*, 2005. **293**(1): p. 90-5.
83. Nishihara, M., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 564-70.
84. Yang, X.M., et al., *Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts*. *Basic Res Cardiol*, 2006. **101**(4): p. 311-8.
85. Hong, L., et al., *Atrial natriuretic peptide prevents the mitochondrial permeability transition pore opening by inactivating glycogen synthase kinase 3beta via PKG and PI3K in cardiac H9c2 cells*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **695**(1-3): p. 13-9.
86. Cope, D.K., et al., *Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(3): p. 699-709.
87. Preckel, B., et al., *Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo*. *Br J Anaesth*, 1998. **81**(6): p. 905-12.
88. Frassdorf, J., S. De Hert, and W. Schlack, *Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury*. *Br J Anaesth*, 2009. **103**(1): p. 89-98.
89. 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.
90. Kukreja, R.C., et al., *Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases*. *Exp Clin Cardiol*, 2011. **16**(4): p. e30-5.

91. Reffelmann, T. and R.A. Kloner, *Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective?* Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 204-12.
92. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria.* Circulation, 2008. **118**(19): p. 1915-9.
93. Ikeda, Y., L.H. Young, and A.M. Lefer, *Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, protects ischemic reperfused myocardium in normocholesterolemic rats.* J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41**(4): p. 649-56.
94. Vilahur, G., et al., *Induction of RISK by HMG-CoA reductase inhibition affords cardioprotection after myocardial infarction.* Atherosclerosis, 2009. **206**(1): p. 95-101.
95. Raupach, A., et al., *Dexmedetomidine Provides Cardioprotection During Early or Late Reperfusion Mediated by Different Mitochondrial K⁺-Channels.* Anesth Analg, 2020.
96. Bunte, S., et al., *Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury.* Anesth Analg, 2019.
97. Ihmsen, H. and T.I. Saari, [*Dexmedetomidine. Pharmacokinetics and pharmacodynamics*]. Anaesthesist, 2012. **61**(12): p. 1059-66.
98. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Vol. Vol. 25. 2017. S. 508.
99. Jansson, C.C., et al., *Alpha2-adrenoceptor agonists stimulate high-affinity GTPase activity in a receptor subtype-selective manner.* Eur J Pharmacol, 1999. **374**(1): p. 137-46.
100. Kochs, E., H.A. Adams, and C. Spies, *Anästhesiologie.* George Thieme Verlag. Vol. 2. 2008: George Thieme Verlag. S. 708.
101. Zhang, X., X. Zhao, and Y. Wang, *Dexmedetomidine: a review of applications for cardiac surgery during perioperative period.* J Anesth, 2015. **29**(1): p. 102-11.
102. Afonso, J. and F. Reis, *Dexmedetomidine: current role in anesthesia and intensive care.* Rev Bras Anesthesiol, 2012. **62**(1): p. 118-33.
103. *Dexdor (dexmedetomidine) - An overview of Dexdor and why it is authorised in the EU,* E.M.A.-S.M. Health, Editor. 2018.
104. Jakob, S.M., et al., *Dexmedetomidine vs midazolam or propofol for sedation during prolonged mechanical ventilation: two randomized controlled trials.* JAMA, 2012. **307**(11): p. 1151-60.
105. Riker, R.R., et al., *Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial.* JAMA, 2009. **301**(5): p. 489-99.

106. Roekaerts, P.M., F.W. Prinzen, and S. De Lange, *Beneficial effects of dexmedetomidine on ischaemic myocardium of anaesthetized dogs*. Br J Anaesth, 1996. **77**(3): p. 427-9.
107. Willigers, H.M., et al., *Dexmedetomidine decreases perioperative myocardial lactate release in dogs*. Anesth Analg, 2003. **96**(3): p. 657-64, table of contents.
108. Okada, H., et al., *The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts*. Resuscitation, 2007. **74**(3): p. 538-45.
109. Behmenburg, F., et al., *The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels*. J Cardiovasc Pharmacol, 2017. **69**(4): p. 228-235.
110. Cole, W.C., C.D. McPherson, and D. Sontag, *ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage*. Circ Res, 1991. **69**(3): p. 571-81.
111. Fryer, R.M., et al., *Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H305-12.
112. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, *Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(11): p. 1011-6.
113. Grover, G.J., *Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia*. J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **24 Suppl 4**: p. S18-27.
114. Grover, G.J., et al., *Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **251**(1): p. 98-104.
115. Inoue, I., et al., *ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane*. Nature, 1991. **352**(6332): p. 244-7.
116. Wickenden, A., *K(+) channels as therapeutic drug targets*. Pharmacol Ther, 2002. **94**(1-2): p. 157-82.
117. Liu, Y., et al., *Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?* Circulation, 1998. **97**(24): p. 2463-9.
118. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
119. Stroethoff, M., et al., *Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels*. J Cardiovasc Pharmacol, 2018. **72**(2): p. 106-111.
120. Bolli, R., *Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(11): p. 1897-918.

121. Bolli, R., et al., *The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning.* Circ Res, 1997. **81**(6): p. 1094-107.
122. Brayden, J.E. and M.T. Nelson, *Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels.* Science, 1992. **256**(5056): p. 532-5.
123. Calderone, V., *Large-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels: function, pharmacology and drugs.* Curr Med Chem, 2002. **9**(14): p. 1385-95.
124. Barsukevich, V., et al., *Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning.* Basic Res Cardiol, 2015. **110**(1): p. 452.
125. 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.
126. Piriou, V., et al., *Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition.* Anesthesiology, 2004. **100**(3): p. 581-8.
127. Niho, T., et al., *[Study of mechanism and effect of sodium 5-hydroxydecanoate on experimental ischemic ventricular arrhythmia].* Nihon Yakurigaku Zasshi, 1987. **89**(3): p. 155-67.
128. Notsu, T., et al., *Blockade of the ATP-sensitive K^{+} channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes.* J Pharmacol Exp Ther, 1992. **260**(2): p. 702-8.
129. McCullough, J.R., et al., *Specific block of the anti-ischemic actions of cromakalim by sodium 5-hydroxydecanoate.* Circ Res, 1991. **69**(4): p. 949-58.
130. Jaburek, M., et al., *State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate.* J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13578-82.
131. Obal, D., et al., *The influence of mitochondrial K_{ATP} -channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo.* Anesth Analg, 2005. **101**(5): p. 1252-60.
132. Altunkaynak, H.O. and M. Tecder-Unal, *The role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on cardiovascular effects of thiopental and ketamine in rats.* Bratisl Lek Listy, 2015. **116**(9): p. 567-70.
133. Longland, C.L., J.L. Dyer, and F. Michelangeli, *The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor.* Eur J Pharmacol, 2000. **408**(3): p. 219-25.
134. Lu, T., et al., *Dihydroxyeicosatrienoic acids are potent activators of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in isolated rat coronary arterial myocytes.* J Physiol, 2001. **534**(Pt 3): p. 651-67.

135. Kitazono, T., et al., *Role of potassium channels in cerebral blood vessels*. Stroke, 1995. **26**(9): p. 1713-23.
136. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
137. Adams, P.R., et al., *Intracellular Ca²⁺ activates a fast voltage-sensitive K⁺ current in vertebrate sympathetic neurones*. Nature, 1982. **296**(5859): p. 746-9.
138. Chan, E.C. and O.L. Woodman, *Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(4): p. 925-32.
139. Knaus, H.G., et al., *Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 955-63.
140. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H434-40.
141. Shintani, Y., et al., *Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(6): p. 1213-8.
142. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 644-50.
143. Huhn, R., et al., *Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels*. Br J Anaesth, 2010. **105**(5): p. 589-95.
144. Jin, C., et al., *Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts*. J Physiol Sci, 2012. **62**(4): p. 325-32.
145. Kowaltowski, A.J., et al., *Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H649-57.
146. Knaus, H.G., et al., *Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels*. Biochemistry, 1994. **33**(19): p. 5819-28.
147. Imlach, W.L., et al., *Structural determinants of lolitremis for inhibition of BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*. Eur J Pharmacol, 2009. **605**(1-3): p. 36-45.
148. Cole, R. and R. Cox, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. 1981, New York: Academic Press.
149. Stroethoff, M., et al., *Impact of Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning*. Cardiovasc Drugs Ther, 2019. **33**(5): p. 581-588.

150. Sanchez, M. and O.B. McManus, *Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 963-8.
151. Shao, L.R., et al., *The role of BK-type Ca²⁺-dependent K⁺ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells*. *J Physiol*, 1999. **521 Pt 1**: p. 135-46.
152. Raffaelli, G., et al., *BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus*. *J Physiol*, 2004. **557**(Pt 1): p. 147-57.
153. Tammaro, P., et al., *Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 2004. **143**(2): p. 303-17.
154. Essin, K., et al., *BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages*. *Blood*, 2009. **113**(6): p. 1326-31.
155. Raupach, A., et al., *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms*. *J Clin Med*, 2019. **8**(4).
156. Bunte, S., et al., *Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018. **32**(5): p. 427-434.
157. 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.
158. Behmenburg, F., et al., *Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca²⁺-sensitive Potassium (mBKCa) Channels*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2018. **32**(5): p. 2142-2148.
159. Cheng, X., et al., *Effects of Dexmedetomidine Postconditioning on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats: Role of the PI3K/Akt-Dependent Signaling Pathway*. *J Diabetes Res*, 2018. **2018**: p. 3071959.
160. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **314**(4): p. H812-H838.
161. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. *Circulation*, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
162. Riquelme, J.A., et al., *Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism*. *Pharmacol Res*, 2016. **103**: p. 318-27.
163. Balderas, E., et al., *Mitochondrial BKCa channel*. *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 104.
164. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. *J Gen Physiol*, 2014. **144**(5): p. 415-40.

165. Yu, M., et al., *Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels*. Acta Pharmacol Sin, 2016. **37**(1): p. 56-66.
166. Frassdorf, J., et al., *Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels*. Can J Anaesth, 2010. **57**(8): p. 767-73.
167. Wang, X., et al., *Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(1): p. 105-13.
168. Zhang, J.Y., et al., *Cardiac sodium/calcium exchanger preconditioning promotes anti-arrhythmic and cardioprotective effects through mitochondrial calcium-activated potassium channel*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 10239-49.
169. Wojtovich, A.P., et al., *SLO-2 Is Cytoprotective and Contributes to Mitochondrial Potassium Transport*. Plos One, 2011. **6**(12).
170. Bilmen, J.G., L.L. Wootton, and F. Michelangeli, *The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by paxilline*. Arch Biochem Biophys, 2002. **406**(1): p. 55-64.
171. Garlid, K.D., et al., *Sulfonylurea receptor - K⁺ channel coupling in the mitochondrial K-ATP channel*. Biophysical Journal, 1997. **72**(2): p. Mpo73-Mpo73.
172. Yuan, F., et al., *Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel*. Metab Brain Dis, 2017. **32**(2): p. 539-546.
173. Minaei, A. and H. Haghdoost-Yazdi, *Dexmedetomidine attenuates the induction and reverses the progress of 6-hydroxydopamine- induced parkinsonism; involvement of KATP channels, alpha 2 adrenoceptors and anti-inflammatory mechanisms*. Toxicol Appl Pharmacol, 2019. **382**: p. 114743.
174. Notsu, T., et al., *A cAMP-dependent protein kinase inhibitor modulates the blocking action of ATP and 5-hydroxydecanoate on the ATP-sensitive K⁺ channel*. Life Sci, 1992. **51**(24): p. 1851-6.
175. Jang, Y.H., J.H. Kim, and Y.C. Lee, *Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Play a Role in Reducing Both Myocardial Infarction and Reperfusion Arrhythmia in Remote Ischemic Preconditioned Hearts*. Anesth Pain Med, 2017. **7**(1): p. e42505.
176. Cao, S., et al., *Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts*. PeerJ, 2016. **4**: p. e1706.
177. Schultz, J.E., et al., *The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(3): p. 1055-60.
178. Auchampach, J.A., G.J. Grover, and G.J. Gross, *Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(11): p. 1054-62.

179. Li, W., et al., *Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats*. *Exp Ther Med*, 2015. **10**(6): p. 2197-2205.
180. Zhao, Z., et al., *Pre-treatment of a single high-dose of atorvastatin provided cardioprotection in different ischaemia/reperfusion models via activating mitochondrial KATP channel*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **751**: p. 89-98.
181. Aggarwal, S., et al., *Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Remote Ischemic Preconditioning Induced Tissue Protection*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017. **22**(5): p. 467-475.
182. Goswami, S.K., et al., *Expression and Activation of BKCa Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 194.
183. Heinen, A., et al., *Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway*. *Exp Gerontol*, 2014. **56**: p. 99-105.
184. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. *Pflügers Arch*. **61**, 1895: p. 291-332.
185. 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.
186. 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.
187. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 613-27.
188. 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.
189. de Leiris, J., D.P. Harding, and S. Pestre, *The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischaemia*. *Basic Res Cardiol*, 1984. **79**(3): p. 313-21.
190. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation*. *Basic Res Cardiol*, 1995. **90**(5): p. 418-23.
191. Schmitz-Spanke, S., et al., *[The isolated rabbit heart: comparison between five different modifications]*. *Herz*, 2002. **27**(8): p. 803-13.
192. Neely, J.R., et al., *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart*. *Am J Physiol*, 1967. **212**(4): p. 804-14.
193. Graf, B.M., et al., *Synthetic 8-ornithine-vasopressin, a clinically used vasoconstrictor, causes cardiac effects mainly via changes in coronary flow*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1997. **41**(3): p. 414-21.

194. Dobson, G.P., *On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(8): p. 590-7.
195. 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.
196. Fishbein, M.C., et al., *Early Phase Acute Myocardial Infarct Size Quantification - Validation of the Triphenyl Tetrazolium Chloride Tissue Enzyme Staining Technique*. American Heart Journal, 1981. **101**(5): p. 593-600.
197. 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.
198. Taegtmeier, H., *One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism*. Can J Cardiol, 1995. **11**(11): p. 1030-5.
199. Krebs, H.A. and K. Henseleit, *Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper*. Klinische Wochenschrift, 1932. **11**(18): p. 757-759.
200. Gartner, K., et al., *Stress response of rats to handling and experimental procedures*. Lab Anim, 1980. **14**(3): p. 267-74.
201. Belke, D.D., et al., *Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart*. Am J Physiol, 1999. **277**(4): p. R1210-7.
202. Fischer-Rasokat, U., F. Beyersdorf, and T. Doenst, *Insulin addition after ischemia improves recovery of function equal to ischemic preconditioning in rat heart*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(5): p. 329-36.
203. How, O.J., et al., *Influence of substrate supply on cardiac efficiency, as measured by pressure-volume analysis in ex vivo mouse hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2979-85.
204. Doring, H.J. and H. Dehnert, *The isolated perfused heart according to Langendorff*. BVM-Biomesstechnik Verlag, 1987.
205. 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.
206. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 867-78.
207. Headrick, J.P., et al., *Functional properties and responses to ischaemia-reperfusion in Langendorff perfused mouse heart*. Exp Physiol, 2001. **86**(6): p. 703-16.
208. Wallenstein, S., C.L. Zucker, and J.L. Fleiss, *Some Statistical-Methods Useful in Circulation Research*. Circulation Research, 1980. **47**(1): p. 1-9.

209. Clements-Jewery, H., D.J. Hearse, and M.J. Curtis, *Independent contribution of catecholamines to arrhythmogenesis during evolving infarction in the isolated rat heart*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(3): p. 807-15.
210. Clements-Jewery, H., D.J. Hearse, and M.J. Curtis, *The isolated blood-perfused rat heart: an inappropriate model for the study of ischaemia- and infarction-related ventricular fibrillation*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(7): p. 1089-99.
211. Qiu, Y., A. Manche, and D.J. Hearse, *Contractile and vascular consequences of blood versus crystalloid cardioplegia in the isolated blood-perfused rat heart*. Eur J Cardiothorac Surg, 1993. **7**(3): p. 137-45.
212. Qiu, Y. and D.J. Hearse, *Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **103**(5): p. 960-8.
213. Gamble, W.J., et al., *Myocardial oxygen consumption of blood-perfused, isolated, supported, rat heart*. Am J Physiol, 1970. **219**(3): p. 604-12.
214. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. Vol. 25. 2017. S. 1025.
215. Kirsch, K., J. Palm, and K. Wedel, *Die Tücken des „sanften Todes“*, in *Pharmakovigilanz*. 2016.
216. Castillo, R.L., et al., *Dexmedetomidine Improves Cardiovascular and Ventilatory Outcomes in Critically Ill Patients: Basic and Clinical Approaches*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 1641.
217. Nguyen, V., et al., *Alpha-2 Agonists*. Anesthesiol Clin, 2017. **35**(2): p. 233-245.
218. Yamamoto, T., et al., *Incidence, risk factors, and outcomes for sepsis-associated delirium in patients with mechanical ventilation: A sub-analysis of a multicenter randomized controlled trial*. J Crit Care, 2020. **56**: p. 140-144.
219. Shehabi, Y., et al., *Early Sedation with Dexmedetomidine in Critically Ill Patients*. N Engl J Med, 2019. **380**(26): p. 2506-2517.
220. BfArM. *Rote-Hand-Brief zu Dexmedetomidin: Risiko von erhöhter Mortalität bei Intensivpatienten ≤ 65 Jahren*. [zitiert am 16.02.2023]; Available from: <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2022/rhb-dexmedetomidin.html>.
221. Peng, K., et al., *Dexmedetomidine post-treatment attenuates cardiac ischaemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis through HIF-1alpha signalling*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(1): p. 850-861.
222. Gerlach, A.T., C.V. Murphy, and J.F. Dasta, *An updated focused review of dexmedetomidine in adults*. Ann Pharmacother, 2009. **43**(12): p. 2064-74.
223. Ji, F., et al., *Perioperative dexmedetomidine improves outcomes of cardiac surgery*. Circulation, 2013. **127**(15): p. 1576-84.

224. Elgebaly, A.S., et al., *Cardioprotective effects of propofol-dexmedetomidine in open-heart surgery: A prospective double-blind study*. Ann Card Anaesth, 2020. **23**(2): p. 134-141.
225. *36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine : Brussels, Belgium. 15-18 March 2016*. Crit Care, 2016. **20**(Suppl 2): p. 94.
226. Bunte, S., et al., *Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning*. J Clin Med, 2019. **8**(3).
227. Torregroza, C., et al., *Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
228. Zhang, J., et al., *Effects of dexmedetomidine on myocardial ischemia-reperfusion injury through PI3K-Akt-mTOR signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019. **23**(15): p. 6736-6743.
229. Intachai, K., et al., *Revisiting the Cardioprotective Effects of Acetylcholine Receptor Activation against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
230. Ebert, T.J., et al., *The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans*. Anesthesiology, 2000. **93**(2): p. 382-94.
231. Hannivoort, L.N., et al., *Development of an Optimized Pharmacokinetic Model of Dexmedetomidine Using Target-controlled Infusion in Healthy Volunteers*. Anesthesiology, 2015. **123**(2): p. 357-67.
232. Cheng, X.Y., et al., *Effects of dexmedetomidine postconditioning on myocardial ischemia and the role of the PI3K/Akt-dependent signaling pathway in reperfusion injury*. Mol Med Rep, 2016. **14**(1): p. 797-803.
233. McNamara, R.L., et al., *Effect of door-to-balloon time on mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(11): p. 2180-6.
234. Heinen, A., et al., *Physiological levels of glutamine prevent morphine-induced preconditioning in the isolated rat heart*. Eur J Pharmacol, 2008. **595**(1-3): p. 58-64.

6 Danksagung

Ich möchte mich bei Herr Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen und Frau Prof. Dr. Inge Bauer für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit herzlichst bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Betreuerinnen Frau Dr. Dr. med. Carolin Torregroza und Frau Priv.-Doz. Dr. Annika Raupach für die Unterstützung im Labor und Geduld in den letzten Phasen vor der Fertigstellung der Dissertation danken.

Des Weiteren möchte ich mich beim Laborteam der Klinik für Anästhesiologie des Uniklinikums Düsseldorf für die freundschaftliche und wissenschaftliche Unterstützung und angenehme Arbeitsklima danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die mich während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Benedikt Panne für die Möglichkeit in seiner Klinik experimentell zu forschen.

Zu guter Letzt ein großes Dank an meine Familie, die mich großzügig und selbstverständlich unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Ihnen und allen meinen Liebsten ist diese Arbeit gewidmet.