

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

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

Der kardioprotektive Effekt der Dexmedetomidin-induzierten Postkonditionierung

Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit und Rolle
des Zeitpunktes der Applikation

Dissertation

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

vorgelegt von

Nicole Gabi Majewski

2023

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

gez.: Nicole Gabi Majewski

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

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

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Meiner Familie gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit: Sebastian Bunte, Friederike Behmenburg, **Nicole Majewski**, Martin Stroethoff, Annika Raupach, Alexander Mathes, André Heinen, Markus W. Hollmann and Ragnar Huhn „*Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury*“ *Anesthesia & Analgesia* 130(1): p 90-98, January 2020.

Zusammenfassung

Myokardiale Ischämien sind meist akute und nicht terminierbare Ereignisse. Aufgrund dessen, kann die Postkonditionierung (PoC) einen effektiven Weg darstellen, um eine Kardioprotektion durchzuführen. Die ischämische PoC ist jedoch ein invasives Verfahren und im klinischen Alltag nicht praktikabel. Daher ist die pharmakologische PoC eine mögliche Alternative. Es wurde bereits in vorherigen Studien gezeigt, dass der α 2-Agonist Dexmedetomidin (Dex) in der PoC einen kardioprotektiven Effekt erzielt. Die bisherigen Studien untersuchten jedoch nicht, die niedrigste Konzentration die einen kardioprotektiven Effekt erzielt und ob der Beginn des Zeitpunktes der Gabe von Dex und/oder die Dauer der Gabe Einfluss auf die kardioprotektive Wirkung haben. Das Ziel dieser Studie war daher zum einen die niedrigste kardioprotektive Konzentration von Dex zu detektieren und zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Applikation und die Dauer der Gabe Einfluss auf den kardioprotektiven Effekt haben.

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten *in vitro* durchgeführt. Die Rattenherzen wurden an einer Langendorff-Anlage mit Krebs-Henseleit-Lösung bei einem konstanten Druck von 80mmHg perfundiert. Die Herzen unterliefen eine globale Ischämie von 33 Minuten (min), gefolgt von 60 min Reperfusion. Am Versuchsende wurden die Infarktgrößen mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt. Um die niedrigste protektive Konzentration von Dex zu detektieren, wurde im ersten Versuchsteil der Studie eine Konzentrationsfindung (0,3-100nM) durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in sieben Gruppen (n=10 pro Gruppe) randomisiert. Basierend auf den Ergebnissen der Konzentrationsfindung wurde im zweiten Versuchsteil der Studie mit 3nM Dex postkonditioniert. Hierbei wurden die Tiere in sechs Gruppen (n=8 pro Gruppe) randomisiert. PoC wurde durch die Applikation von 3nM Dex über 10 min (Dex10) und über die gesamte Reperfusionsphase (Dex60) zu Beginn der Reperfusion induziert. In den weiteren Gruppen wurde Dex in Minute 15, 30 und 45 (Dex15, Dex30, Dex45) der Reperfusion appliziert bis zum Versuchsende.

Dex zeigte in der Konzentration 1nM eine signifikante Reduktion des Infarktareals im Vergleich zur Kontrollgruppe (Con) (Dex1:39±9%, p<0,0001 vs. Con). In der Gruppe Dex3 reduzierte sich die Infarktgröße nicht nur signifikant zur Con, sondern auch zu Dex1 (Dex3:24±7%, p<0,0001 vs. Dex1). Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren signifikanten Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu Dex3 (Dex10:30±6%, p=0,371 vs. Dex3; Dex30:24±7%, p>0,999 vs. Dex3; Dex100:25±5%, p=0,999 vs. Dex3). Die Dex Gabe an verschiedenen Zeitpunkten in der Reperfusion zeigte bei allen Gruppen eine signifikante Infarktgrößenreduktion (Dex10:31±4%, p<0,0001 vs. Con; Dex60:30±4%, p<0,0001 vs. Con; Dex15:25±5%, p<0,0001 vs. Con; Dex30:24±3%, p<0,0001 vs. Con; Dex45:25±4%, p<0,0001 vs. Con). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung.

Dex zeigt in der niedrigsten protektiven Konzentration von 3nM eine signifikante Infarktgrößenreduktion. Der Effekt der Dex-induzierten PoC ist unabhängig vom Zeitpunkt und der Dauer der Gabe in der Reperfusion.

Summary

Myocardial ischemia is mostly an acute event and their timing is not predictable. Because of that postconditioning (PoC) could be an effective cardioprotective intervention. Ischemic PoC is an invasive method and it is not appropriate in the daily clinical practice. Pharmacological PoC could be a more suitable alternative. In previous studies the α_2 -adrenoreceptor agonist, dexmedetomidine (Dex) has been already shown a cardioprotective effect in PoC. The past studies did not test the lowest concentration of Dex with a significant infarct size reduction and whether the time point and/or duration of Dex application in the reperfusion period is of relevance for the cardioprotective effect. The aim of the study was to determine the lowest cardioprotective concentration of Dex and whether time point and/or duration of Dex application has an impact on the effect size of cardio protection.

The experiments conducted with male Hearts of Wistar rats *in vitro*. The rat hearts were connected to the Langendorff-system perfused with Krebs-Henseleit-buffer at a constant pressure of 80mmHg. All hearts were subjected to 33 minutes (min) of global ischemia and afterwards to 60 min of reperfusion. In the end infarct size was determined by triphenyltetrazolium chloride staining. To detect the lowest cardioprotective concentration of Dex we perfuse the hearts, in the first part of the study, with various concentrations of Dex (0,3-100nM) at the onset of reperfusion for 10 min. Rats were randomized into seven groups (n=10 per group). Based on these results, the second part of the study was conducted with 3nM Dex. Rats were randomized into six groups (n=8 per group). Application of Dex started directly at the onset of reperfusion for 10 min (Dex10) and for the whole time of reperfusion (Dex60). In the other groups application of Dex started 15 min (Dex15), 30 min (Dex30) or 45 min (Dex45) after the start of reperfusion and lasted always until the end of the reperfusion period.

Dex reduces the infarct size significant in the concentration of 1nM compared to the control group (Con) (Dex1:39±9%, p<0,0001 vs. Con). Dex3 reduces the infarct size not only significant to Con, but also compared to Dex1 (Dex3:24±7%, p<0,0001 vs. Dex1). Higher concentrations did not confer stronger protection compared to Dex3 (Dex10:30±6%, p=0,371 vs. Dex3; Dex30:24±7%, p>0,999 vs. Dex3; Dex100:25±5%, p=0,999 vs. Dex3). Different starting times and/or durations of application resulted in similar infarct size reduction (Dex10:31±4%, p<0,0001 vs. Con; Dex60:30±4%, p<0,0001 vs. Con; Dex15:25±5%, p<0,0001 vs. Con; Dex30:24±3%, p<0,0001 vs. Con; Dex45:25±4%; p<0,0001 vs. Con). All data are mean±standard deviation.

Dex shows in the lowest concentration of 3nM a significant infarct size reduction. The cardioprotective effect is independent of time and duration of application in the reperfusion period.

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl₂	Calciumchlorid
CF	Koronarfluss
CK-MB	Kreatinkinase-MB
Con	Kontrollgruppe
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Dex	Dexmedetomidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt max	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extrazelluläre Signal regulierte Kinase
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
g	Gramm
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HCL	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
IE	internationale Einheit
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPoC	ischämische Postkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Januskinase
KCL	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
KHL	Krebs-Herzleit-Lösung
KOH	Kaliumhydroxid

LDH	Lactatdehydrogenase
LVEDP	<i>left ventricular enddiastolic pressure</i> (= linksventrikulärer enddiastolischer Druck)
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i> (=linksventrikulär entwickelter Druck)
LVSP	<i>left ventricular systolic pressure</i> (= linksventrikulärer systolischer Druck)
µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm
µg/kg/h	Mikrogramm pro Kilogramm pro Stunde
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MgSO₄	Magnesiumsulfat
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
mK_{ATP}	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
mK_{Ca}	mitochondrialer Kalzium-abhängiger Kaliumkanal
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mM	Molare Masse
µM	Mikromolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmHg/s	Millimeter-Quecksilbersäule pro Sekunde
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nukleären Faktor-κB
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff
PC	Präkonditionierung
PCI	perkutane koronare Intervention
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>

PI3K	Phosphoinostide-3-Kinase
PoC	Postkonditionierung
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s.	siehe
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SD	Standardabweichung
sog.	so genannt
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt
TLR4	toll-like Rezeptor 4
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TNF-α	Tumornekrosefaktors- α
u.a.	unter anderem
vs.	versus
ZETT	zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
5HD	5-Hydroxysäure

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen und dessen Auswirkungen	1
1.2	Ischämie-/Reperfusionsschaden.....	2
1.3	Präkonditionierung als Möglichkeit zur Kardioprotektion.....	2
1.4	Dexmedetomidin und dessen Eigenschaften	3
1.5	Postkonditionierung als Möglichkeit zur Kardioprotektion	3
1.6	Signalwege der Konditionierung	4
1.7	Ziele der Arbeit.....	4
2	Material und Methoden.....	6
2.1	Versuchstiere	6
2.2	Krebs-Henseleit-Lösung	6
2.3	Langendorff-Anlage.....	7
2.4	Versuchsprotokoll.....	8
2.4.1	Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	8
2.4.2	Einfluss des Zeitpunktes und die Dauer der Gabe von Dexmedetomidin	9
2.5	Infarktgrößenmessung	10
2.6	Datenverarbeitung und Auswertung	11
2.7	Tabellarische Übersicht	13
2.7.1	Langendorff-Anlage.....	13
2.7.2	Laborgeräte	14
2.7.3	Pharmaka	14
2.7.4	Chemikalien	15
2.7.5	Gase	15
2.7.6	Computer und Software	16
3	Ergebnisse.....	17
3.1	Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	17

3.1.1	Tier- und Herzcharakteristika	17
3.1.2	Infarktgrößen	18
3.1.3	Effekt der unterschiedlichen Konzentrationen auf die Hämodynamik...	19
3.2	Einfluss des Zeitpunktes und die Dauer der Gabe von Dexmedetomidin	22
3.2.1	Tier- und Herzcharakteristika	22
3.2.2	Infarktgrößen	22
3.2.3	Effekt der unterschiedlichen Zeitpunkte und Dauer auf die Hämodynamik 24	
4	Diskussion.....	26
4.1	Konzentrationsabhängigkeit von Dexmedetomidin.....	26
4.2	Einfluss des Zeitpunktes und der Dauer der Gabe von Dexmedetomidin.....	28
4.3	Kardioprotektion durch Dexmedetomidin	31
4.4	Limitierung	32
4.5	Material- und Methodenkritik.....	33
4.5.1	Langendorff-Anlage.....	33
4.5.2	Krebs-Henseleit-Lösung	34
4.6	Schlussfolgerung und klinischer Ausblick	35
	Literaturverzeichnis	36
	Tabellenverzeichnis	42
	Abbildungsverzeichnis	43
	Danksagung	44

1 Einleitung

Im Jahr 2020 verstarben insgesamt 985 572 Menschen in Deutschland. Die häufigste Todesursache ging mit 34,3% und einer Anzahl von 338 001 Menschen auf eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems zurück ¹.

Die wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren für das Auftreten einer solchen Erkrankung sind arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas, sowie einige gesundheitsbeeinträchtigende Verhaltensweisen wie z.B. Rauchen oder körperliche Inaktivität ².

Trotz der beeinflussbaren Risikofaktoren und der vermeidbaren gesundheitsschädlichen Verhaltensweisen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen seit Jahren weltweit die häufigste Todesursache.

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und dessen Auswirkungen

Laut statistischem Bundesamt verstarben im Jahr 2020 in Deutschland insgesamt 121 462 an einer ischämischen Herzkrankheit ³.

Eine kardiale Ischämie bezeichnet pathophysiologisch eine Minderdurchblutung des Myokards und somit eine Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch. Die häufigste Ursache von Ischämien ist die Atherosklerose. Manifestiert sich diese an den Koronarien bezeichnet man dies als koronare Herzerkrankung (KHK). Rupturiert ein instabiler, atherosklerotischer Plaque führt dies zu einem Verschluss der betroffenen Koronararterie und somit zu einer akuten Myokardischämie des zu versorgenden Herzmuskelabschnittes. Wird nun die Ischämietoleranz des Gewebes überschritten, entsteht eine Nekrose des betroffenen Myokards und folglich ein Myokardinfarkt ⁴.

Die *European Society of Cardiology* (ESC) empfiehlt bei einem akuten Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) im Elektrokardiogramm (EKG) die schnellstmögliche Reperfusionstherapie mittels perkutaner Koronarintervention (PCI), um so die Perfusion des umliegenden Gewebes wieder herzustellen ⁵.

1.2 Ischämie-/Reperfusionsschaden

Paradoxerweise sorgt jedoch, neben der Ischämie, auch die Reperfusion für einen Myokardschaden. Dies wird als Ischämie- und Reperfusionsschaden (I/R)-Schaden zusammengefasst. In einer Studie von Yellon et al. beschrieben die Autoren vier pathophysiologische Mechanismen des I/R-Schadens u.a. die Reperfusion-induzierte Arrhythmie und das myokardiale *Stunning*⁶. Myokardiales *Stunning* beschreibt eine prolongierte myokardiale Dysfunktion, die bei der Reperfusion des vorher ischämischen Myokards auftritt⁷. Als weiteren pathophysiologischen Mechanismus beschrieben Yellon et al. die mikrovaskuläre Obstruktion⁶. Diese wird durch direkte kapilläre Schädigungen, externe kapilläre Kompression aufgrund von Ödemen in den Kardiomyozyten und Endothelzellen und durch Mikroembolisationen hervorgerufen. Als vierten pathophysiologischen Mechanismus beschrieben sie die letale myokardiale Reperfusionsschädigung⁶. Hierbei kommt es zum Zelltod der Kardiomyozyten. Als Mediatoren dieser Schädigungen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS), ein Überschuss an intrazellulärem Kalzium, die schnelle Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes und Entzündungsreaktionen diskutiert⁶. Diese führen zu einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP). Die mPTP ist ein nicht-selektiver Kanal in der inneren Membran des Mitochondriums. Öffnet sich dieser Kanal kann das Membranpotential nicht mehr aufrecht gehalten werden, sodass keine oxidative Phosphorylierung mehr stattfindet und kein Adenosintriphosphat (ATP) mehr gebildet wird. Dies wiederum führt zum Zelltod.

1.3 Präkonditionierung als Möglichkeit zur Kardioprotektion

Erstmals zeigten 1986 Murry et al. anhand eines Tiermodells, dass man die Größe des Infarktareals reduzieren kann und somit das Herz vor einem I/R-Schaden schützen kann⁸. Kurze Intervalle einer I/R sorgten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Con) für eine Infarktgrößenreduktion um etwa 75%. Dieser Prozess wurde als ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet⁸.

Neben einer kurzen Ischämie, die im klinischen Alltag nicht praktikabel ist, kann das Herz auch durch andere Stimuli präkonditioniert werden. Kardioprotektive Eigenschaften wurden u.a. für volatile Anästhetika wie Sevofluran⁹ und die Pharmaka Adenosin¹⁰ und Levosimendan¹¹ beschrieben. Auch das in dieser Forschungsarbeit verwendete

Medikament Dexmedetomidin (Dex) zeigte einen kardioprotektiven Effekt in früheren Forschungsarbeiten^{12, 13}.

1.4 Dexmedetomidin und dessen Eigenschaften

Dex ist ein hoch selektiver α_2 -Adrenorezeptor-Agonist, der für Kurz- und Langzeitsedierungen eingesetzt wird. Die Dosierung wird an die gewünschte Sedierungstiefe körperrgewichtsadaptiert angepasst¹⁴. Dex hat einen sedativen-, analgetischen- und Opioid sparenden Effekt¹⁵. Es zeigt einen analgetischen Effekt besonders bei gesunden Probanden¹⁶ und einen Opioid sparenden Effekt bei intensivmedizinischen Patienten¹⁷. Dex besitzt den Vorteil, dass es bei gesunden^{16, 18} wie auch bei intensivmedizinischen Patienten¹⁹ im Gegensatz zu anderen Sedativa wie z.B. Propofol einen geringeren atemdepressiven Effekt hat²⁰ und sich dadurch postoperative Beatmungszeiten verkürzen lassen²⁰. Zusätzlich kann es das Auftreten eines postoperativen Delirs vermindern²¹. Gleichzeitig steigert es jedoch das Risiko einer Hypotonie und einer Bradykardie²².

1.5 Postkonditionierung als Möglichkeit zur Kardioprotektion

Da myokardiale Ischämien häufig ein akutes und meist nicht terminierbares Ereignis sind und eine IPC in diesen Fällen nicht praktikabel ist, wären postischämische Interventionen mögliche Alternativen. Hier ist die Postkonditionierung (PoC) von großem Interesse.

Eine Arbeitsgruppe um Zhao et al. verglich 2003 in einem *in vivo* Hundemodell das Verfahren der IPC mit dem der ischämischen Postkonditionierung (IPoC)²³. Hierzu setzten sie Hundeherzen in der Gruppe der IPC einer Ischämie von 5 Minuten (min) gefolgt von einer 10-minütigen Reperfusion aus, bevor die eigentliche Ischämie von 60 min begann. In der Gruppe der IPoC folgte auf die 60 min Ischämiezeit ein Zyklus von 30 Sekunden Reperfusion gefolgt von 30 Sekunden erneuter Ischämiephase. Die IPoC bestand insgesamt aus drei Zyklen von Ischämie und Reperfusion. Zhao et al. zeigten in ihrer Studie nicht nur eine deutliche Infarktgrößenreduktion in der Gruppe der IPC, sondern auch in der Gruppe der IPoC²³. Die Infarktgrößen waren sowohl in der Gruppe der IPC ($15\pm 2\%$, $P < 0,05$ vs. Con), als auch in der Gruppe der IPoC ($14\pm 2\%$, $P < 0,05$ vs. Con) im Vergleich mit der Con ($25\pm 3\%$) signifikant kleiner.

Die IPoC ist als mögliches Verfahren einen I/R-Schaden zu vermindern aufgrund der Invasivität im klinischen Alltag nicht praktikabel. Pharmaka wie die volatilen Anästhetika Isofluran^{24, 25} und Sevofluran²⁶, Levosimendan oder der Phosphodiesterase-3-Hemmer Milrinon^{27, 28} zeigten in vorherigen Forschungsarbeiten kardioprotektive Eigenschaften. Auch für Dex konnten kardioprotektive Eigenschaften im Rahmen einer PoC gezeigt werden²⁹.

1.6 Signalwege der Konditionierung

Die genauen Signaltransduktionswege der myokardialen Konditionierung sind bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt. Verschiedene Signalwege, die durch den kardioprotektiven Stimulus aktiviert werden, wurden in den letzten Jahren identifiziert. Hier zu nennen sind u.a. der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg^{30, 31} und der *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)-Signalweg³². Der RISK-Signalweg führt durch Phosphorylierung unterschiedlicher Kinasen u.a. Proteinkinase B (Akt), der extrazellulär regulierten Kinase (ERK1/2) und der Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) zu einer verzögerten Öffnung der mPTP^{30, 31}. Der SAFE-Signalweg führt über eine Aktivierung der Januskinase (JAK) zu einer Phosphorylierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)³². Endeffektor dieser Signaltransduktionswege ist das Mitochondrium und die Regulation seiner Funktion. Durch eine verzögerte Öffnung der mPTP, bleibt die Integrität der Mitochondrienmembran und damit auch die aerobe Energiegewinnung erhalten. Dies führt zu einem verzögerten Zelluntergang^{33, 34}.

1.7 Ziele der Arbeit

Wie beschrieben, sind kardiale Ischämien meist akute und nicht terminierbare Ereignisse. Die sofortige Reperfusion als kausale Therapie ist im klinischen Alltag nicht immer möglich. Um Patienten während dieses kardialen ischämischen Ereignisses vor einem I/R-Schaden zu schützen ist die Gabe von kardioprotektiven Substanzen von großem Interesse. Doch auch die Applikation dieser ist im klinischen Alltag nicht immer exakt mit Beginn der Reperfusion möglich. Daher stellte sich gerade in Bezug auf eine spätere klinische Anwendung die Frage, ob eine zeitlich verzögert Gabe von dem in dieser Studie

untersuchtem Medikament Dex und die Dauer der Gabe einen Einfluss auf den kardioprotektiven Effekt in der PoC haben.

Vor der Untersuchung der zeitlich verzögerten Gabe und der Dauer der Applikation fokussierten wir uns auf die Bestimmung der niedrigsten kardioprotektiven Konzentration von Dex, die eine signifikante Infarktgrößenreduktion erzielte. Höhere Konzentrationen eines Medikamentes erhöhen die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Nebenwirkungen. Die Detektion der niedrigsten protektiven Konzentration von Dex ist daher auch in Bezug auf eine spätere klinische Anwendung von großer Relevanz.

Die hier vorliegende Studie separiert sich in zwei aufeinander folgende Versuchsteile mit folgenden Fragestellungen:

1. Welches ist die niedrigste protektive Konzentration von Dex, die einen kardioprotektiven Effekt durch PoC erzielt?
2. Welchen Einfluss hat der Zeitpunkt der Gabe und die Dauer der Applikation von Dex in der Reperfusion auf den kardioprotektiven Effekt?

Zur Beantwortung der Fragestellungen, wählten wir einen experimentellen Versuchsaufbau am isolierten Rattenherzen an der Langendorff-Anlage. Die Ischämie wurde global induziert. Im ersten Teil der Studie wurde zunächst eine Konzentrationsfindungsstudie durchgeführt. Im zweiten Teil der Studie folgte die Gabe von Dex zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion. Die Infarktgrößen wurden am Ende der Versuche mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbung bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten aus der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf (Aktenzeichen des ZETT: O 27/12) durchgeführt.

Die Ratten waren zum Versuchszeitpunkt 3-4 Monate alt mit einem durchschnittlichen Gewicht von 300 ± 50 g. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Einzelkäfigen unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur $22\pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50\pm 5\%$, Luftumwälzrate 16-20-mal pro Stunde). Die künstliche Beleuchtung wurde mit einer Intensität von 300-320 Lux erzeugt und unterlag einem Tag-Nacht-Wechsel alle 12 Stunden. Als Einstreu der Käfige wurde ein entkeimtes Weichholzgranulat verwendet (LASvendi, Soest) und die Tiere wurden mit einem Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert, dass zusammen mit keimfreiem Trinkwasser *ad libitum* bereitstand.

Die Ratten wurden für die Versuchsreihen mit einer Mischung aus Pentobarbital-Natrium (90mg/kg) und 0,2ml Heparin ($0,2\text{ml} \triangleq 1000\text{IE}$) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert und antikoaguliert. Nach Erreichen einer tiefen Sedierung und erloschenen Schutzreflexen, wurde das Körpergewicht der Ratte bestimmt und sie tierschutzgerecht mittels Guillotine dekapitiert. Nach der Dekapitation wurde mittels Sternotomie der Thorax eröffnet, das Herz an der Aorta ascendens exzidiert, an der Langendorff-Anlage befestigt und retrograd perfundiert.

2.2 Krebs-Henseleit-Lösung

Zur kontinuierlichen retrograden Perfusion der Koronarien wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHL) verwendet.

Als Grundlage diente destilliertes Wasser, in dem die folgenden Stoffe gelöst wurden:

118mM Natriumchlorid (NaCl), 4,7mM Kaliumchlorid (KCL), 1,2mM Magnesiumsulfat (MgSO_4), 1,2mM Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), 25mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), 0,5mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 2,25mM Calciumchlorid (CaCl_2), 11mM Glucose und 1mM Laktat.

Während der Versuchsdurchführung wurde die Lösung kontinuierlich mit Carbogen, bestehend aus 95% O_2 und 5% CO_2 begast und durch ein von außen umhüllendem

Wasserbad auf 37°C erwärmt. Durch die Zuführung des Carbogens wurde ein Sauerstoffpartialdruck von 540-620mmHg, ein Kohlenstoffdioxidpartialdruck von 35-38mmHg und ein pH-Wert von 7,38-7,43 erreicht.

2.3 Langendorff-Anlage

Als Langendorff-Anlage bezeichnet man ein Modell, in dem ein Säugetierherz retrograd perfundiert wird, um dieses isoliert vom Gesamtorganismus zu untersuchen. Oscar Langendorff beschrieb dieses Modell 1895 und konnte erfolgreich Versuche mit isolierten Säugetierherzen durchführen³⁵. Auch heute noch ist die Langendorff-Anlage ein häufig genutztes Modell in Versuchsreihen³⁶.

Ein konstanter Perfusionsdruck von 80mmHg wurde via hydrostatischer Säule erzielt. Um Wärmeverlust zu vermeiden, wurde die Langendorff-Anlage von Wärmekammern umspült. Über einen am linken Vorhofsohr applizierten, luftleeren mit 0,9% isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Ballon wurden via Druckaufnehmer hämodynamische Parameter bestimmt. Über die Füllmenge des Ballons wurde zu Beginn jedes Versuches ein linksventrikulärer enddiastolischer Druck (*left ventricular enddiastolic pressure*, LVEDP in mmHg) von 4-6mmHg eingestellt.

Hämodynamische Daten wie der systolische linksventrikuläre Druck (*left ventricular systolic pressure*, LVSP in mmHg), der LVEDP, die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt max in mmHg/s) und die Herzfrequenz (HF) wurden aufgezeichnet. Der absolut entwickelte Druck (*left ventricular developed pressure*, LVDP in mmHg) wurde im Anschluss manuell ausgerechnet (LVSP-LVEDP=LVDP). Die gemessenen Daten wurden mit dem Computerprogramm LabChart© Pro v. 8.0.5 aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Der Koronarfluss (CF) wurde während des gesamten Versuches zu definierten Zeitpunkten manuell durch das Wiegen der aus dem Koronarsinus geflossenen KHL bestimmt.

Pharmaka konnten über eine sich an der Langendorff-Anlage befindlichen Spritzenpumpe kontinuierlich appliziert werden.

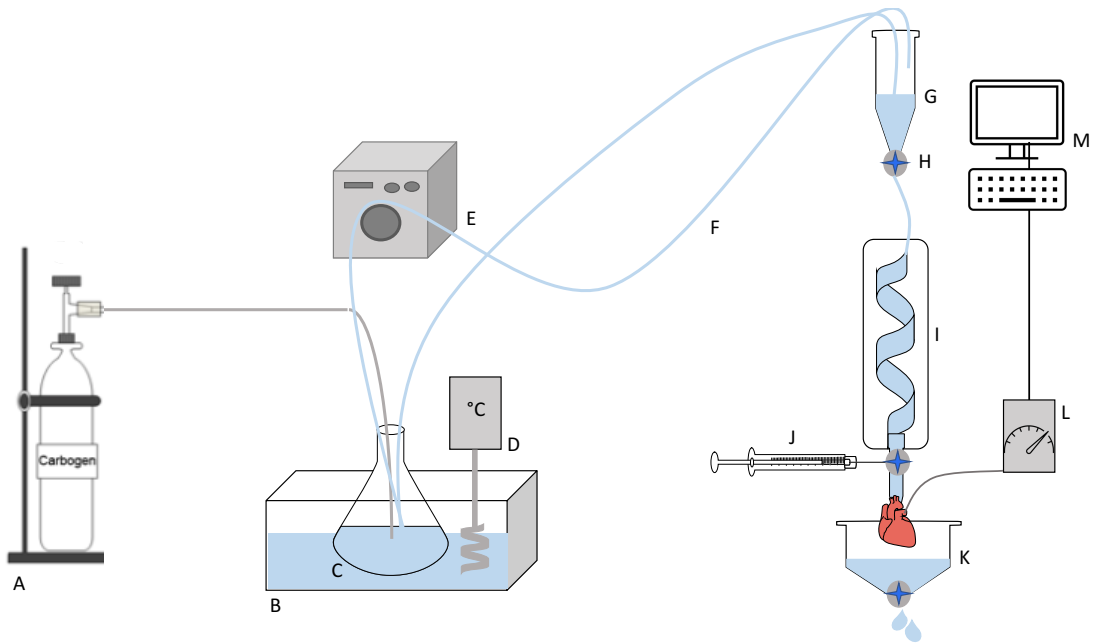


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Langendorff-Anlage

Glaskolben (C) mit Carbogen (A) begaster Krebs-Henseleit-Lösung (KHL). Dieser Glaskolben wird von einem Wasserbehälter (B) erwärmt (D). Eine Pumpe (E) transportiert die KHL über ein Schlauchsystem (F) und einen Luftfänger (G) durch einen Dreiwegehahn (H) in einen spiralförmigen, von außen gewärmten Glaskolben (I). Über eine Perfusorspritze (J) können Medikamente über einen Dreiwegehahn appliziert werden. Die aus den Koronarien fließende KHL kann über einen Auffangbehälter (K) aufgefangen und gemessen werden. Über einen im linken Ventrikel des Herzens positionierten und mit einem mit einem Druckaufnehmer (L) verbundenen Ballon können hämodynamische Werte auf einen Computer (M) übertragen und aufgezeichnet werden.

2.4 Versuchsprotokoll

2.4.1 Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Im ersten Teil der Versuchsreihe wurde durch PoC mit verschiedenen Dex Konzentrationen, die niedrigste protektive Konzentration ermittelt, die einen kardioprotektiven Effekt erzielt. Diese Konzentration wurden im anschließenden zweiten Versuchsteil für die weiteren Versuche verwendet.

Das an der Langendorff-Anlage befestigte Rattenherz durchlief zu Beginn jedes Versuches eine 20-minütige Eingewöhnungsphase (Baseline) (s. Abbildung 2). Im Anschluss folgte eine 33-minütige globale Ischämiephase durch Pausieren des koronaren Zuflusses. Nach Beendigung der Ischämiephase und zu Beginn der Reperfusionphase wurde Dex mittels Perfusor kontinuierlich 10 min in der entsprechenden Konzentration appliziert. Die Konzentration in den einzelnen Gruppen waren 0,3nM (Dex0,3), 1nM (Dex1), 3nM (Dex3), 10nM (Dex10), 30nM (Dex30) und 100nM (Dex100). In der Con wurde zu Beginn der Reperfusion 10 min KHL zusätzlich über einen Perfusor

appliziert. Die Rattenherzen wurden randomisiert einer der genannten Gruppen zugeordnet. Die Laufrate des Perfusor entsprach 1% des vorher manuell gemessenen CF. Nach 10 min PoC mit Dex wurde das Herz weitere 50 min nur mit KHL reperfundiert. Die Messungen des CF wurden in min 15, 30, 45 und kurz vor Ende der Reperfusion durchgeführt.

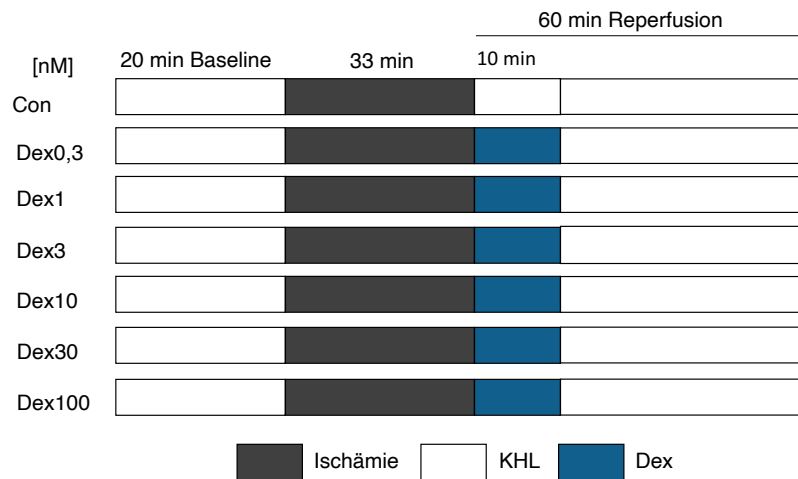


Abbildung 2: Experimentelles Protokoll zur Konzentrationsfindung durch Postkonditionierung mit Dexmedetomidin

Con=Kontrollgruppe, KHL=Krebs-Henseleit-Lösung, Dex=Dexmedetomidin in nM.

Dex0,3=0,3nM; Dex1=1nM; Dex3=3nM; Dex10=10nM, Dex30=30nM; Dex100=100nM Gabe sofort mit Beginn der Reperfusion für 10 Minuten.

2.4.2 Einfluss des Zeitpunktes und die Dauer der Gabe von Dexmedetomidin

Im zweiten Teil der Versuchsreihe wurde der Einfluss des Zeitpunktes und die Dauer der Gabe von Dex auf den kardioprotektiven Effekt untersucht. Der Versuchsaufbau entsprach bis zum Ende der Ischämie dem der Konzentrationsfindung. Basierend auf dem ersten Versuchsteil wurde als niedrigste protektive Konzentration 3nM Dex (Dex3) für den zweiten Versuchsteil verwendet.

Die Rattenherzen wurden randomisiert einer von sechs Gruppen zugeordnet (s. Abbildung 3):

In der Con wurden innerhalb der ersten 10 min der Reperfusion zusätzlich über einen Perfusor reine KHL appliziert.

In der Versuchsgruppe Dex10 wurde, wie in der Konzentrationsfindungsgruppe Dex in der Konzentration 3nM 10 min zu Beginn der Reperfusion appliziert.

In der Versuchsgruppe Dex60 wurde Dex in der Konzentration 3nM für 60 min der Reperfusion appliziert.

In der Versuchsgruppe Dex15 wurde die Applikation von 3nM Dex in min 15 der Reperfusion begonnen und für die übrigen 45 min der Reperfusion weitergeführt.

In der Versuchsgruppe Dex30 wurde die Applikation von 3nM Dex in min 30 der Reperfusion gestartet und für die übrigen 30 min der Reperfusion beibehalten.

In der Versuchsgruppe Dex45 wurde die Applikation mit 3nM Dex in min 45 der Reperfusion begonnen und für die übrigen 15 min der Reperfusion weitergeführt.

Innerhalb der Reperfusion wurde wie im ersten Versuchsteil in min 15, 30, 45 und kurz vor Ende der Reperfusion der CF ermittelt.

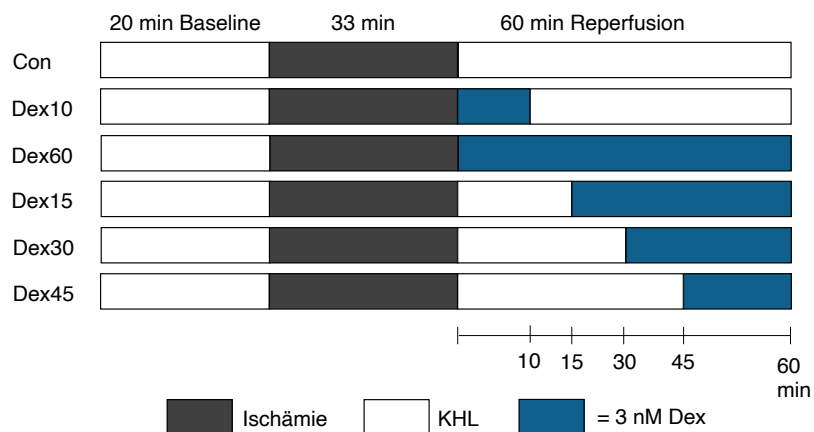


Abbildung 3: Experimentelles Protokoll zu Dauer und Zeitpunkt der Applikation von Dexmedetomidin 3nM

Con=Kontrollgruppe, KHL=Krebs-Henseleit-Lösung, 3nM Dex=Dexmedetomidin 3nM.

Dex10=Applikation von 3nM Dexmedetomidin (Dex) für 10 Minuten (min) direkt zu Beginn der Reperfusion; Dex60=Applikation von 3nM Dex für 60 min direkt zu Beginn der Reperfusion, Dex15=Start in min 15 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion; Dex30=Start in min 30 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion; Dex45=Start in min 45 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion.

2.5 Infarktgrößenmessung

Nach Beendigung der Versuche wurden die Herzen an ihrer Basis von der Langendorff-Anlage entfernt und bei -80°C eingefroren. Zur Färbung wurden die Herzen

axial in gleichmäßige 1-2mm dicke Scheiben geschnitten und mit einer 0,75%igen TTC-Lösung für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Scheiben für mindestens 4 Stunden in einer 4%igen Formaldehydlösung (100ml 37% Formalin gemischt mit 900ml destilliertem Wasser) fixiert.

Zur Herstellung einer 0,75%igen Lösung, wurden 0,75g TTC gemeinsam mit 1,41g Trishydroxymethylaminomethan und 100ml 0,9% isotonischer Kochsalzlösung gemischt. Diese Mischung wurde in einem Glasgefäß, lichtgeschützt auf 37°C mittels einer Wärmeplatte erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur, wurde der pH mit Hilfe eines pH-Meters auf 7,42 eingestellt. Der pH wurde durch Titration von 37%iger Salzsäure (HCL) oder Kalilauge (KOH) angepasst.



Abbildung 4: Triphenyltetrazoliumchlorid angefärbte Herzscheiben eines Rattenherz als Beispiel

Rattenherz geschnitten in sieben dünne Scheiben. Die axialen Schnitte wurde von der Herzbasis (rechts) bis zur Apex des Herzens (links) aufgereiht. Die hellen ungefärbten Bereiche zeigen nicht vitale Infarktareale im Herzmuskel, die rötlichen Bereiche stellen vitale Herzmuskulatur dar.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die einzelnen Scheiben als hochauflösende Bilddatei eingescannt. Die Infarktgrößen wurden mit Hilfe des Planimetrieprogrammes SigmaScan© bestimmt. Die Auswertung erfolgte randomisiert und von zwei unabhängigen Untersuchern. Die Infarktgröße wurde in Prozent des linken Ventrikels angegeben.

2.6 Datenverarbeitung und Auswertung

Die Versuche wurden kontinuierlich mit der Software LabChart® aufgezeichnet. Mittels dem Programm LabChart Reader® wurden die Aufzeichnungen ausgelesen und relevante Messpunkte sowie manuell bestimmte Parameter per Microsoft Excel® tabellarisch zusammengefasst (s. Tabelle 3-6 und 9-12). Die graphische Darstellung wie auch die statistischen Berechnungen erfolgte mittels GraphPad Prism®.

Für unseren ersten Versuchsteil kalkulierten wir eine Gruppengröße von $n=10$ pro Gruppe und für den zweiten $n=8$ pro Gruppe. Dies wurde mit Hilfe der GraphPad Software berechnet. Für beide Teile wurde ein mittlerer Differenzwert von 25% und eine Standardabweichung von 15% angesetzt. Die mittlere Differenz und die Standardabweichung basierten auf eine von unserer Arbeitsgruppe vorherig durchgeführten Studie³⁷. Die Gruppenzugehörigkeit erfolgte randomisiert. Die hämodynamischen Parameter wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two way ANOVA) und Tukey post hoc Test ausgewertet. Die Infarktgröße wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) und Bonferroni post hoc Test für beide Versuchsteile durchgeführt. Tier- und Herzcharakteristika wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) und Tukey post hoc Test analysiert. Die Daten sind als Mittelwert±Standardabweichung (MW±SD) angegeben. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich bei $p<0,05$.

2.7 Tabellarische Übersicht

2.7.1 Langendorff-Anlage

Brückenverstärker	Bridge Amp, FE221, AD Instruments, Oxford, England
Druckaufnehmer	Aterial pressur transducer APT300, Hugo Sachs Elektronik, Harvard, USA Glourd P23 ID, USA
Einhängethermostat	Julabo MW-4, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Guillotine	Kleintierdekupitator, Modell 7950, Ugo Basile S.R.L., Gemonio, Italien
Kanülen	Sterican®Einmal-Injektionskanülen 0,40x20mm, Braun, Melsungen, Deutschland Sterican®Einmal-Injektionskanülen 0,90x40mm, Braun, Melsungen, Deutschland
Offener Wasserbaderhitzer	Julabo EC-5, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Perfusor	Perfusor® Space, Braun, Melsungen, Deutschland Perfusor®secura FT, Braun, Melsungen, Deutschland
Perfusorspritzen	Original Perfusor Syringe 50ml, Braun, Melsungen, Deutschland
Perfusorschläuche	Verbindungsleitungen 1x2x150mm, Braun, Melsungen, Deutschland
Pinzette	Aesculap®Surgical Instruments, Braun, Melsungen, Deutschland
Schere	Aesculap®Surgical Instruments, Braun, Melsungen, Deutschland

Schlauchpumpe	Miniplus 3 Abimde peristaltic pump, Gilson, Middleton, USA
Spezialschlauch für Schlauchpumpe	Tygon Tube R3607(3,18 mm Innendurchmesser), Saint-Gobain, Akron, Ohio, USA
Spritzen	Omnifix®-F 0,01ml-1ml/Luer Solo Omnifix® 3ml/Luer Lock Solo Omnifix® 5ml/Luer Lock Solo Omnifix® 10ml/Luer Lock Solo, Braun, Melsungen, Deutschland
USB-Datenerfassung	PowerLab 8/35, AD Instruments, Oxford, England
3-Wegehahn	Discofix®, Braun, Melsungen, Deutschland

2.7.2 Laborgeräte

Blutgasanalyseautomat	ABL 800, Radiometer, Willich, Deutschland
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1150 C, Knick, Berlin-Zehlendorf, Deutschland
Laborwaage	BP 1200, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage	SECURA 224-1S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646#4498, Knick, Berlin, Deutschland

2.7.3 Pharmaka

Dexmedetomidin hydrochloride	MW 236,74, Sigma®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Heparin Natrium	25.000IE/5ml, Rotexmedica®, Panpharma Group, Luitré, Frankreich

Pentobarbital-Natrium	16g/10ml, Narocoren® für Tiere, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
-----------------------	--

2.7.4 Chemikalien

Calcium Chloride (CaCl ₂)	Merck®, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glucose (D-Glucose)	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung 37%	Merck® KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9%	Fresenius Kabi®, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Fulka Chemika Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck®, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lactat (L-Laktat-Natriumsalz)	Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₂ +7H ₂ O)	Sigma-Aldrich®, Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Prolabo, Leuven, Belgien
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend 37%	Reinheit ≥ 37%, Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Reinheit ≥ 99%, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Reinheit ≥ 99%, Roth®, Karlsruhe, Deutschland

2.7.5 Gase

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

2.7.6 Computer und Software

Aufzeichnungssoftware	LabChart© Pro v. 8.0.5 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Sydney, Australien
Planimetriesoftware	SigmaScan© v. 5 SPSS Inc., San Jose, Kalifornien, USA
Scanner	CanoScan© LIDE 700F, Canon, Krefeld, Deutschland
Statistiksoftware	GraphPad© PrismR 6.01, Graph Pad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Im ersten Versuchsteil der Arbeit war es Ziel die niedrigste protektive Konzentration von Dex zu detektieren, die zu einer signifikanten Infarktgrößenreduzierung führt.

Es wurden die Konzentrationen 0,3nM (Dex0,3), 1nM (Dex1), 3nM (Dex3), 10nM (Dex10), 30nM (Dex30) und 100nM (Dex100) untersucht und mit der Con verglichen.

3.1.1 Tier- und Herzcharakteristika

	n	Körpergewicht (g)	Herztrockengewicht (g)	Herznassgewicht (g)	Zeitpunkt der maximal ischämischen Kontraktion (min)	Höhe der maximal ischämischen Kontraktion (mmHg)
Con	10	323±14	0,08±0,01	1,65±0,16	18±1	63±13
Dex0,3	10	297±19*	0,10±0,01	1,49±0,13	17±3	58±9
Dex1	10	310±18	0,10±0,01	1,62±0,09	18±2	52±17
Dex3	10	305±15	0,10±0,01	1,59±0,10	19±3	42±10*
Dex10	10	300±14	0,08±0,01	1,51±0,18	17±1	52±18
Dex30	10	304±27	0,10±0,01	1,52±0,13	17±2	54±8
Dex100	10	311±23	0,09±0,01	1,52±0,10	18±3	50±11

Tabelle 1: Übersicht der Tier- und Herzgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion des ersten Versuchsteils der Studie (Konzentrationsfindung Dexmedetomidin)

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Kontrollgruppe (Con).

Tier- und Herzcharakteristika sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich Trocken- und Nassgewichte der Rattenherzen. Auch in Bezug auf den Zeitpunkt der maximal ischämischen Kontraktion zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Das Körpergewicht der Ratten war in der Gruppe Dex0,3 im Vergleich zur Con signifikant niedriger (p<0,05 vs. Con). In den anderen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied diesbezüglich.

In der Gruppe Dex3 war die Höhe der maximal ischämischen Kontraktion signifikant niedriger im Vergleich zur Con (p<0,05 vs. Con). Bei den übrigen Gruppen zeigte sich dieser Unterschied nicht.

3.1.2 Infarktgrößen

Die Infarktgrößen sind in Abbildung 5 und in Tabelle 2 zusammengefasst. In der Con betrug diese im Mittel $62\pm 4\%$. Bei der Gruppe Dex0,3 zeigte sich im Vergleich zur Con bei einer Infarktgröße mit einem Mittelwert von $59\pm 6\%$ keine signifikante Infarktgrößenreduktion. In der Gruppe Dex1 zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion mit einem Mittelwert von $39\pm 9\%$ im Vergleich zur Con ($p < 0,0001$ vs. Con). In der Gruppe Dex3 reduzierte sich die Infarktgröße nicht nur signifikant zur Con ($p < 0,0001$ vs. Con), sondern auch zur Gruppe Dex1 auf einen Mittelwert von $24\pm 7\%$ ($p < 0,0001$ vs. Dex1). Höhere Dex Konzentrationen (Dex10, Dex30, Dex100) zeigten keine weitere signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu Dex3 (Dex10: $30\pm 6\%$, $p = 0,371$ vs. Dex3; Dex30: $24\pm 7\%$ $p > 0,999$ vs. Dex3; Dex100: $25\pm 5\%$ $p = 0,999$ vs. Dex3).

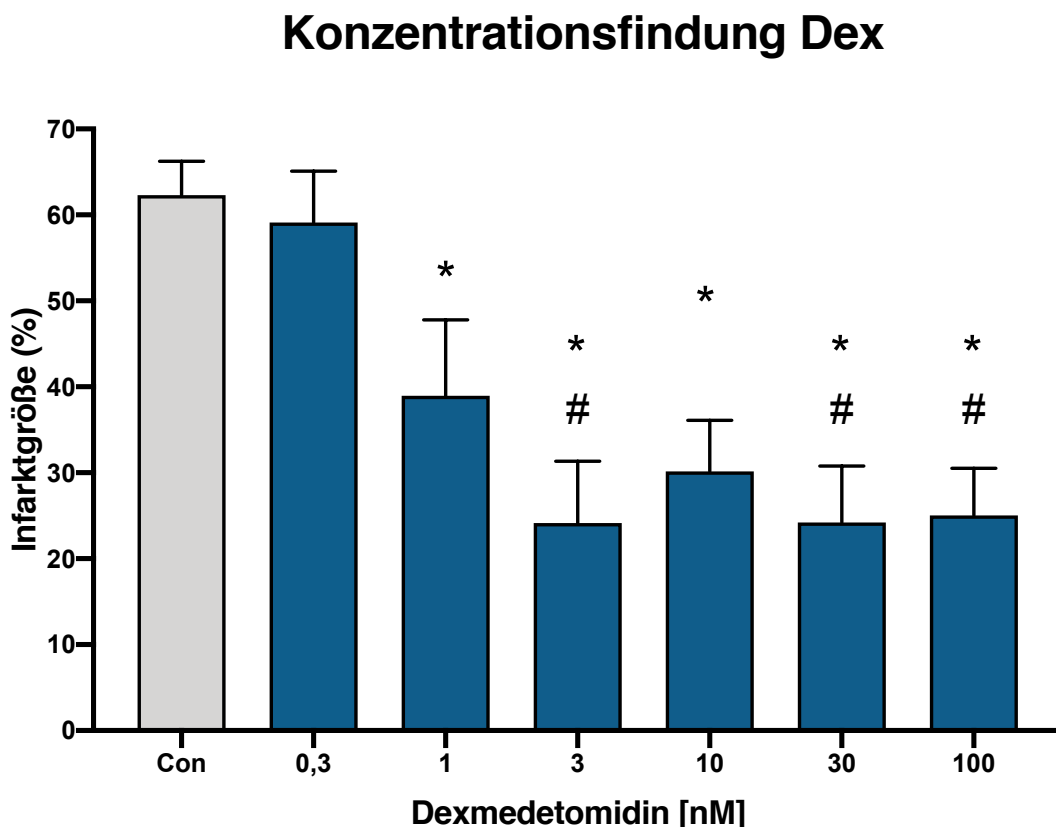


Abbildung 5: Infarktgrößen Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Dargestellt sind alle Infarktgrößen in Prozent der einzelnen Konzentrationen von Dexmedetomidin (Dex). Dex0,3=0,3nM; Dex1=1nM; Dex3=3nM; Dex10=10nM; Dex30=30nM; Dex100=100nM Gabe sofort mit Beginn der Reperfusion für 10 Minuten. Die Werte sind dargestellt in Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0,0001$ vs. Kontrollgruppe (Con), # $p < 0,0001$ vs. Dex1.

	Con	Dex0,3	Dex1	Dex3	Dex10	Dex30	Dex100
Infarktgröße (%)	62±4	59±6	39±9	24±7	30±6	24±7	25±5

Tabelle 2: Infarktgrößen Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Alle Werte sind angegeben in Prozent als Mittelwert±Standardabweichung.

3.1.3 Effekt der unterschiedlichen Konzentrationen auf die Hämodynamik

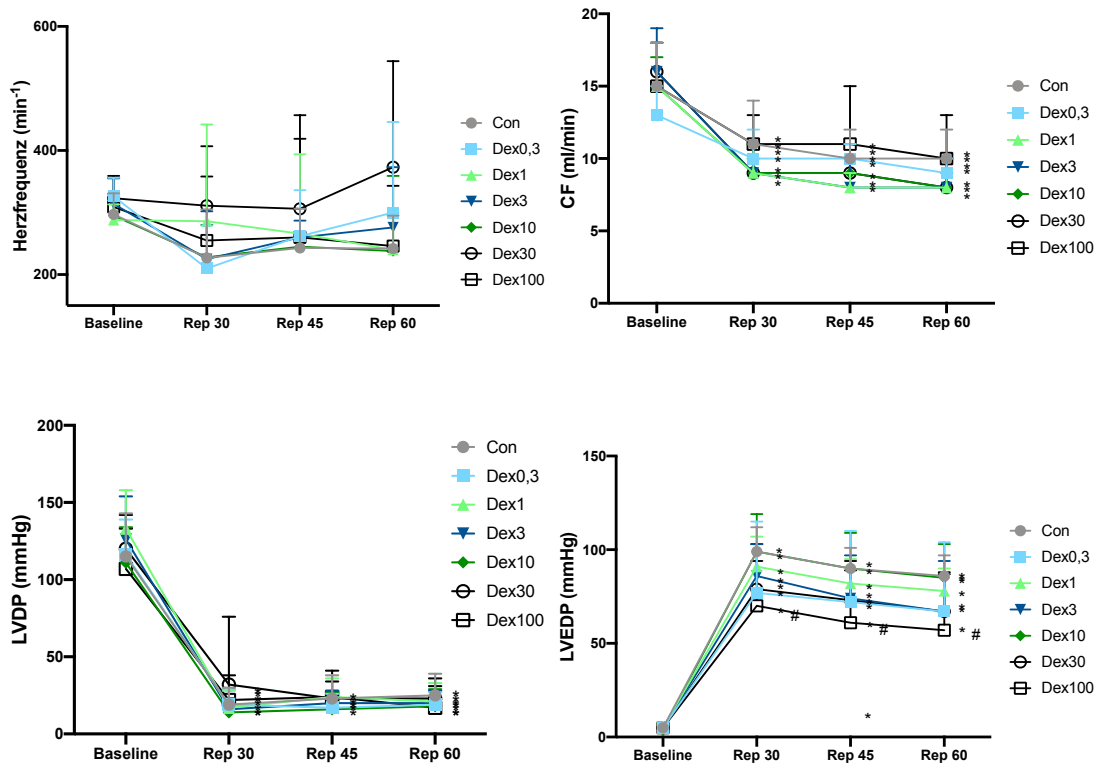


Abbildung 6: Hämodynamische Daten der Kontrollgruppe und der Postkonditionierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexmedetomidin

Dargestellt sind die hämodynamischen Daten Herzfrequenz (HF in min⁻¹), Koronarfluss (CF in ml/min), *left ventricular developed pressure* (LVDP in mmHg), *left ventricular enddiastolic pressure* (LVEDP in mmHg) der Konzentrationsfindung mit Dexmedetomidin.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline, # p<0,05 vs. Kontrollgruppe (Con).

<u>HF (min⁻¹)</u>	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	297±34	227±78	243±63	242±53
Dex0,3	326±30	210±69	262±74	300±146
Dex1	288±25	286±156	266±128	240±59
Dex3	314±41	225±77	260±27	276±97
Dex10	295±35	228±52	245±24	238±121
Dex30	323±36	311±96	306±151	373±171
Dex100	309±47	255±103	260±159	246±97

Tabelle 3: Herzfrequenz (HF in min⁻¹) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung.

<u>CF (ml/min)</u>	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	15±3	11±3*	10±2*	10±2*
Dex0,3	13±2	10±2*	10±1*	9±1*
Dex1	15±3	9±1*	8±1*	8±1*
Dex3	16±3	9±1*	8±2*	8±1*
Dex10	15±2	9±2*	9±2*	8±2*
Dex30	16±2	9±2*	9±2*	8±2*
Dex100	15±3	11±2*	11±4*	10±3*

Tabelle 4: Koronarfluss (CF in ml/min) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline.

<u>LVDP (mmHg)</u>	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	115±28	19±11*	23±15*	25±14*
Dex0,3	116±23	19±10*	17±9*	19±8*
Dex1	133±25	17±11*	24±12*	21±12*
Dex3	126±28	16±7*	20±8*	20±8*
Dex10	111±23	14±9*	16±11*	18±11*
Dex30	120±22	32±44*	23±11*	23±13*
Dex100	107±26	22±16*	24±17*	17±14*

Tabelle 5: left ventricular developed pressure (LVDP in mmHg) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline.

LVEDP (mmHg)	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	5±2	99±13*	90±11*	86±11*
Dex0,3	5±1	77±38*	72±38*	67±37*
Dex1	5±3	91±16*	82±13*	78±12*
Dex3	5±2	86±17*	74±23*	67±27*
Dex10	4±2	99±20*	90±19*	85±18*
Dex30	5±2	79±24*	73±21*	67±21*
Dex100	5±2	70±24*#	61±28*#	57±30*#

Tabelle 6: left ventricular enddiastolic pressure (LVEDP in mmHg) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline; # p<0,05 vs. Kontrollgruppe (Con).

Innerhalb der Versuchsgruppe verringerte sich die HF kontinuierlich ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (s. Abbildung 6, Tabelle 3). Während der Reperfusion war der LVEDP signifikant höher verglichen mit der Baseline (p<0,05 vs. Baseline). In der Gruppe Dex100 war der LVEDP zusätzlich signifikant niedriger im Vergleich zur Con (p<0,05 vs. Con) (s. Abbildung 6, Tabelle 6). Der LVDP (s. Tabelle 5) wie auch der CF (s. Tabelle 4) verringerten sich signifikant nach der Ischämie (p<0,05 vs. Baseline) (s. Abbildung 6).

3.2 Einfluss des Zeitpunktes und die Dauer der Gabe von Dexmedetomidin

Im zweiten Versuchsteil der Studie wurde untersucht welchen Einfluss der Zeitpunkt und die Dauer der Gabe von Dex auf die Infarktgrößenreduktion haben. Hierzu wurde die im ersten Versuchsteil bestimmte niedrigste protektive Konzentration von 3nM Dex zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlicher Dauer appliziert.

3.2.1 Tier- und Herzcharakteristika

	n	Körpergewicht (g)	Herztrockengewicht (g)	Herznassgewicht (g)	Zeitpunkt der maximal ischämischen Kontraktion (min)	Höhe der maximal ischämischen Kontraktion (mmHg)
Con	8	303±29	0,09±0,02	1,49±0,12	17±1	66±20
Dex10	8	285±12	0,09±0,01	1,46±0,05	16±2	75±16
Dex60	8	273±14*	0,08±0,01	1,40±0,08	17±2	70±14
Dex15	8	294±18	0,09±0,01	1,46±0,05	17±1	64±13
Dex30	8	296±20	0,08±0,01	1,47±0,15	16±2	73±12
Dex45	8	283±10	0,07±0,01	1,41±0,10	17±2	56±12

Tabelle 7: Übersicht der Tier- und Herzgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion des zweiten Versuchsteil der Studie (Einfluss des Startpunktes und der Dauer der Applikation von Dexmedetomidin)

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Kontrollgruppe (Con).

Tier- und Herzcharakteristika sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf das Trocken- und Nassgewicht der Rattenherzen. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Zeitpunkt wie auch der Höhe der maximal ischämischen Kontraktion. In Gruppe Dex60 zeigte sich ein signifikant niedrigeres Rattengewicht im Vergleich zur Con ohne einen Einfluss auf das Trocken- und Nassgewicht der Rattenherzen. In den übrigen Gruppen zeigte sich dieser signifikante Unterschied nicht.

3.2.2 Infarktgrößen

Die Infarktgrößen sind in Abbildung 7 und Tabelle 8 zusammengefasst. In der Con betragen diese im Mittel 66±6%. Es zeigte sich bei allen Gruppen eine signifikante Infarktgrößenreduktion. Bei Dex10 31±4% (p<0,0001 vs. Con) und Dex60 30±4%

($p < 0,0001$ vs. Con). In den zeitlich verzögerten Gaben zeigte sich ein MW von $25 \pm 5\%$ ($p < 0,0001$ vs. Con) bei der Gabe von Dex nach 15 min, $24 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$ vs. Con) nach 30 min und $25 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$ vs. Con) nach 45 min.

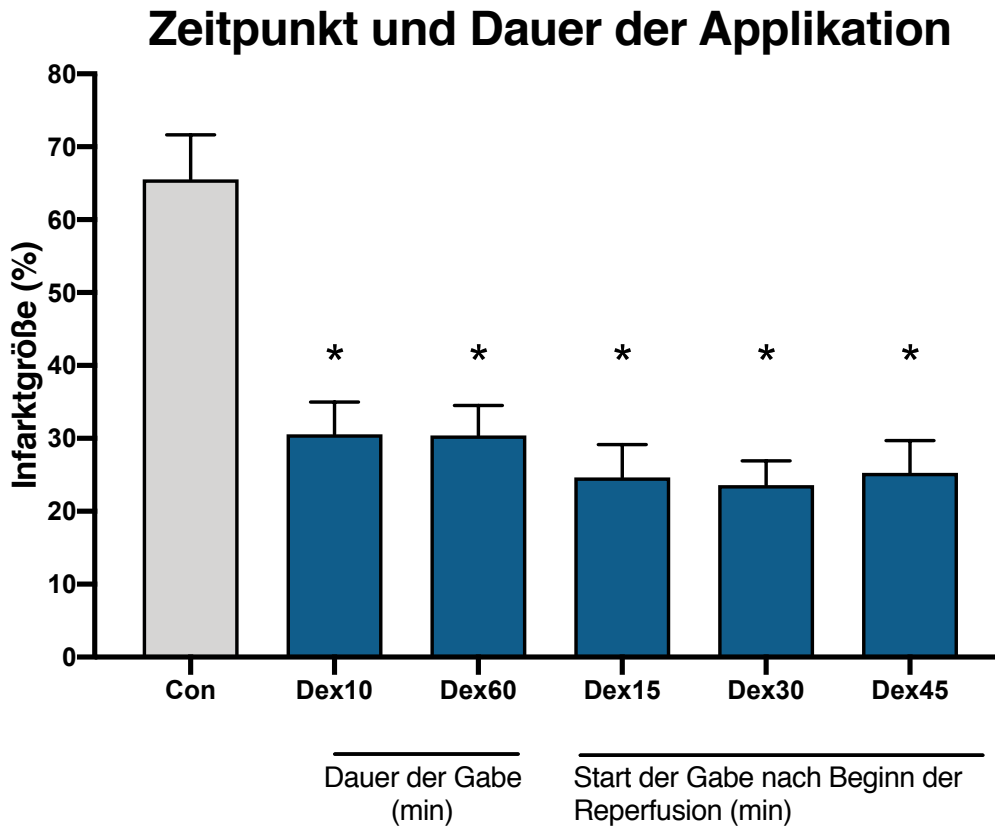


Abbildung 7: Infarktgrößen Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Dargestellt sind alle Infarktgrößen in Prozent der einzelnen Konzentrationen von 3nM Dexmedetomidin (Dex) zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion. Dex10=Applikation von 3nM Dex für 10 Minuten (min) direkt zu Beginn der Reperfusion; Dex60=Applikation von 3nM Dex für 60 min direkt zu Beginn der Reperfusion, Dex15=Start in min 15 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion; Dex30=Start in min 30 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion; Dex45=Start in min 45 nach Beginn der Reperfusion mit der Gabe von 3nM Dex bis zum Ende der Reperfusion.

Die Werte sind dargestellt in Mittelwert±Standardabweichung, * $p < 0,0001$ vs. Kontrollgruppe (Con).

	Con	Dex10	Dex60	Dex15	Dex30	Dex45
Infarktgröße (%)	66±6	31±4	30±4	25±5	24±3	25±4

Tabelle 8: Infarktgrößen Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Alle Werte sind angegeben in Prozent als Mittelwert±Standardabweichung.

3.2.3 Effekt der unterschiedlichen Zeitpunkte und Dauer auf die Hämodynamik

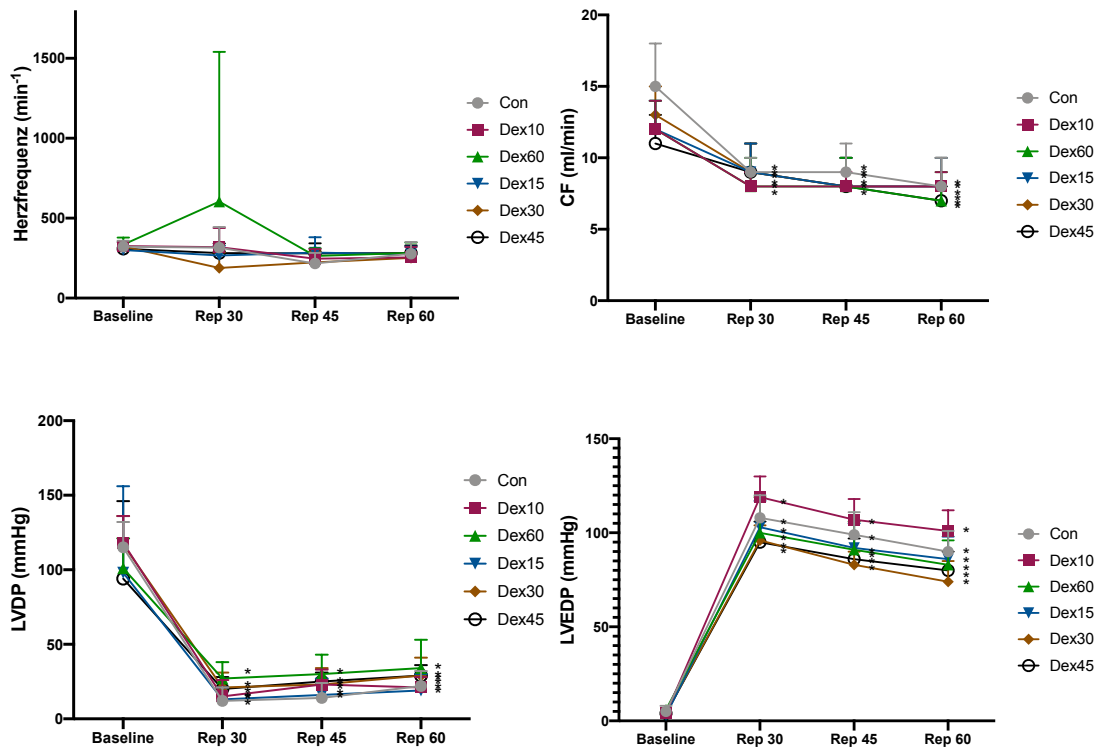


Abbildung 8: Hämodynamische Daten der Kontrollgruppe und der Gabe von 3nM Dexmedetomidin zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unterschiedlicher Dauer in der Reperfusion

Dargestellt sind die hämodynamischen Daten Herzfrequenz (HF in min⁻¹), Koronarfluss (CF in ml/min), *left ventricular developed pressure* (LVDP in mmHg), *left ventricular enddiastolic pressure* (LVEDP in mmHg).

Alle Werte sind angegeben Mittelwert±Standardabweichung, * p < 0,05 vs. Baseline.

<u>HF (min⁻¹)</u>	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	322±37	316±129	217±66	278±73
Dex10	326±30	319±120	247±60	255±65
Dex60	335±44	604±936	264±48	283±65
Dex15	301±29	267±61	285±96	275±48
Dex30	323±30	189±97	224±69	252±33
Dex45	309±42	282±60	280±63	282±48

Tabelle 9: Herzfrequenz (HF in min⁻¹) Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung.

CF (ml/min)	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	15±3	9±1*	9±2*	8±2*
Dex10	12±2	8±1*	8±1*	8±1*
Dex60	12±2	8±2*	8±2*	7±2*
Dex15	12±2	9±2*	8±2*	8±2*
Dex30	13±2	9±2*	8±2*	8±2*
Dex45	11±2	9±2*	8±2*	7±1*

Tabelle 10: Koronarfluss (CF in ml/min) Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline.

LVDP (mmHg)	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	115±17	12±9*	14±10*	22±10*
Dex10	118±18	15±11*	23±10*	21±7*
Dex60	101±20	27±11*	30±13*	34±19*
Dex15	98±58	13±8*	16±11*	19±11*
Dex30	117±19	21±10*	23±11*	29±12*
Dex45	94±52	20±8*	25±6*	29±7*

Tabelle 11: left ventricular developed pressure (LVDP in mmHg) Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline.

LVEDP (mmHg)	Baseline	Rep 30	Rep 45	Rep 60
Con	5±3	108±12*	99±12*	90±11*
Dex10	4±2	119±11*	107±11*	101±11*
Dex60	6±2	100±19*	91±15*	83±13*
Dex15	3±1	103±14*	92±13*	86±12*
Dex30	4±2	96±8*	83±7*	74±11*
Dex45	4±2	95±11*	86±11*	80±10*

Tabelle 12: left ventricular enddiastolic pressure (LVEDP in mmHg) Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, * p<0,05 vs. Baseline.

Innerhalb der Versuchsgruppe verringerte sich die HF kontinuierlich ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 8, Tabelle 9).

Der LVEDP war während der Reperfusion signifikant erhöht (p<0,05 vs. Baseline) (s. Abbildung 8, Tabelle 12).

Der LVDP (s. Tabelle 11) wie auch der CF (s. Tabelle 10) reduzierten sich signifikant nach der Ischämie (p<0,05 vs. Baseline) (s. Abbildung 8).

4 Diskussion

Die Forschungsergebnisse dieser Studie zeigen, dass 3nM Dex die niedrigste kardioprotektive Konzentration ist. Höhere Konzentrationen haben keinen additiven Effekt.

Im zweiten Teil der Forschungsarbeit zeigte sich, dass der Effekt der kardioprotektiven Dex-induzierten PoC unabhängig ist von Zeitpunkt und Dauer der Gabe in der Reperfusion.

Ischämische Herzkrankheiten sind seit Jahren ein hoher Mortalitätsfaktor in Deutschland³. Darüber hinaus steigt aufgrund des aktuellen demographischen Wandels das Alter in der Bevölkerung. Dies führt zu einem erhöhten Auftreten von kardialen Risikopatienten. Strategien zur Kardioprotektion für ein besseres *Outcome* der Patienten sind daher von großem Interesse. Therapeutische Ansatzpunkte, um die Mortalität der ischämischen Herzkrankheiten zu reduzieren spielen eine große Rolle und unterstreichen damit die Relevanz dieser Forschungsarbeit.

In den meisten Fällen ist eine myokardiale Ischämie ein akutes, unvorhergesehenes und nicht terminierbares Ereignis. Pharmakologische Präkonditionierung (PC) als Möglichkeit der Kardioprotektion¹⁰⁻¹², ist in diesen Fällen klinisch nicht praktikabel. Die pharmakologische PoC ist hier eine vielversprechende Intervention, um das Myokard vor einem I/R-Schaden zu schützen.

Aufgrund der möglichen klinischen Anwendung zur Kardioprotektion und positiven Studienergebnissen^{29, 38} sind Daten zur Konzentrationsabhängigkeit und des optimalen Zeitpunktes der Applikation von Dex in der Reperfusion von zentraler Bedeutung.

4.1 Konzentrationsabhängigkeit von Dexmedetomidin

2016 wurde in einer Studie von Cheng et al. der kardioprotektive Effekt von Dex in der PoC untersucht³⁸. Diese zeigten eine Reduktion der kardialen Parameter Troponin (cTnI), Kreatinkinase-MB (CK-MB), Malondialdehyd (MDA) und zusätzlich eine signifikante Infarktgrößenreduktion. In deren Studie, einem *in vivo* Rattenmodell, verwendeten die Autoren zur Behandlung der Ratten Dex Dosierungen von 5, 10 und 20µg/kg. Diese Dosierung ist deutlich höher als im klinischen Alltag beim Menschen empfohlen. Hier ist die Herstellerempfehlung eine maximale Dosierung von

1,4µg/kg/h³⁹. Unsere Forschungsarbeit fokussierte sich auf die niedrigste protektive Konzentration, bei der Dex eine signifikante Infarktgrößenreduzierung induziert. Bereits bei der Gabe von 1nM Dex zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduzierung im Vergleich zur Con. Die Konzentration von 3nM zeigte zusätzlich eine signifikante Infarktgrößenreduktion nicht nur im Vergleich zur Con, sondern auch im Vergleich zu 1nM Dex. Höhere Konzentrationen von Dex zeigten alle eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Con jedoch keine weitere im Vergleich zu 3nM Dex. Daher entschieden wir uns im zweiten Versuchsteil für eine Konzentration von 3nM Dex. Eine Studie von Okada et al.⁴⁰ sowie eine Forschungsarbeit aus unserer Arbeitsgruppe¹³ zeigten ein vergleichbares Ausmaß der Infarktgrößenreduktion durch Konditionierung mit Dex. Okada et al. verglichen in ihrer Studie Dex mit dem α 2-Antagonisten Yohimbin⁴⁰. Ihre Ergebnisse zeigten, dass Dex den CF, wie auch die Infarktgröße der untersuchten Rattenherzen signifikant reduzierte. Yohimbin zeigte diesen Effekt nicht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass α 2-adrenerge Stimulation der Grund für den kardioprotektiven Effekt von Dex ist⁴⁰.

In einer Studie von Cheng et al.³⁸ zeigten die Autoren, dass die PoC durch Dex durch eine Aktivierung von *Phosphatidylinositol-3 kinase/Protein kinase B* (PI3K/Akt) vermittelt wird. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Gabe von Dex in der PoC zu einer erhöhten Expression von phosphoryliertem Akt und GSK3 β führt. Bei einer Applikation des PI3K-Inhibitor Wortmannin kam es zu keiner erhöhten Expression der Kinasen. Die Aktivierung von Akt und GSK3 β , die Bestandteil des RISK-Signalweges sind⁴¹, erfordert eine vorgeschaltete G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivierung. Die Ergebnisse ihrer Studie weisen daher indirekt auf eine Rezeptoraktivierung durch Dex hin.

Es könnte davon ausgegangen werden, dass es zu einem stärkeren kardioprotektiven Effekt kommt, wenn mehr Rezeptoren stimuliert werden. Wenn jedoch alle Rezeptoren mit Dex besetzt sind und ein maximaler Stimulus induziert ist, führen steigende Konzentrationen von Dex zu keiner stärkeren Infarktgrößenreduktion. Dieses Phänomen konnte schon in einer früheren Forschungsarbeit in Bezug auf pharmakologische Konditionierung gezeigt werden und zeigt sich auch in unserer Studie. Die Arbeit von Stroethoff et al. untersuchte den kardioprotektiven Effekt des Melatonin-Rezeptor-Agonisten Ramelteon in der PC⁴². Ziel ihrer Studie war es die niedrigste Konzentration von Ramelteon zu detektieren, die eine signifikante Infarktgrößenreduzierung erzielt. Es zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion

bei einer Konzentration von $0,03\mu\text{M}$ im Vergleich zur Con. Höhere Konzentrationen ($0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$) zeigten wie in unserer Studie keinen stärkeren Effekt. Die Applikation höherer Konzentrationen eines Pharmakons steigern das Auftreten von unerwünschten Wirkungen. In einer Studie von Ebert et al.⁴³ untersuchten die Autoren die Wirkung von aufsteigenden Dex Konzentrationen an zehn männlichen Personen. Die Autoren zeigten, dass steigende Konzentrationen von Dex zu einem progressiven Anstieg der Sedierungstiefe wie auch der Analgesie führten, gleichzeitig kam es zu einem Abfall der HF und des Herzzeitvolumens (HZV). Auch die Erinnerung der männlichen Teilnehmer war durch die Gabe von höheren Dex Konzentrationen massiv beeinträchtigt. Daher war es in unserer Forschungsarbeit von großem Interesse, auch in Bezug auf eine potenziell klinische Anwendung, die niedrigste Konzentration von Dex zu detektieren, die einen kardioprotektiven Effekt erzielt, um das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren.

4.2 Einfluss des Zeitpunktes und der Dauer der Gabe von Dexmedetomidin

Da Dex, laut Herstellerempfehlung kontinuierlich appliziert werden soll, untersuchten wir, ob der kardioprotektive Effekt von Dex von der Dauer der Applikation abhängig ist. In einer Studie von Berger et al. konnte die kontinuierliche Gabe des volatilen Anästhetikums Sevofluran die Infarktgröße an Rattenherzen *in vivo* nicht reduzieren. Die PC mit einer 3x5-minütigen Applikation von Sevofluran führte im Gegensatz dazu zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion⁹.

Da eine myokardiale Ischämie ein meist nicht vorhersehbares Ereignis ist, ist die verzögerte Gabe von Dex in der Reperfusion klinisch relevant. Die in unserer Studie zeitlich verzögerte Applikation von Dex imitiert eine verzögerte Gabe im klinischen Alltag nach einer Reperfusion. Die aus dieser Studie resultierenden Ergebnisse bieten Ansatz für weitere klinische Forschungen.

Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, dass eine Applikation von Dex über 10 min direkt zu Beginn der Reperfusion die Infarktgröße genauso signifikant reduziert wie eine 60-minütige Gabe von Dex. Die 10-minütige Dex Gabe reicht demnach aus, um eine signifikante Infarktgrößenreduktion zu erzielen. Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse, dass der Zeitpunkt der Applikation in der Reperfusion den kardioprotektiven Effekt nicht beeinflusst. Die PoC mit Dex direkt zu Beginn der Reperfusion, wie auch der Start der

Applikation von Dex in min 15, 30 oder auch 45 in der Reperfusion führten gleichermaßen zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion. Der Mechanismus dieses Zeitpunkt unabhängigen Effektes ist noch nicht vollständig geklärt.

Eine Studie von Barsukevich et al. von 2015 untersuchte den Effekt der IPoC zu unterschiedlichen Startpunkten ⁴⁴. Die Autoren zeigten, dass der kardioprotektive Effekt der IPoC unabhängig vom Zeitpunkt der Intervention in der Reperfusion war. Auch unsere Ergebnisse der pharmakologischen PoC zeigen, dass nicht nur die sofortige Gabe von Dex sondern auch eine verzögerte Applikation zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führt und stimmen mit den Ergebnissen von Barsukevich et al. überein. Die Autoren untersuchten in ihrer Studie zusätzlich, die Beteiligung des RISK- und SAFE-Signalweges, wie auch des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}) an der IPoC ⁴⁴. Sie setzten Rattenherzen einer Ischämie von 30 min gefolgt von 6x10 Sekunden Reperfusion und Ischämie zu unterschiedlichen Zeiten in der Reperfusion aus. Den IPoC-Beginn nach 10 Sekunden und 10 min bezeichneten sie als frühen Beginn und den nach 30 und 45 min als späten Beginn. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition des RISK-Signalweges den kardioprotektiven Effekt bei einem frühen IPoC Beginn aufhob. Die Inhibition des SAFE-Signalweges zeigte keinen Effekt. Inhibition des mK_{ATP} verhinderte beim frühen IPoC Beginn die Kardioprotektion, zeigte bei der späten IPoC jedoch keinen Effekt. Ein früherer Beginn der IPoC führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung von PI3K-Akt und ERK1/2, ein später Beginn zeigte diesen Anstieg nicht. Welcher Mechanismus für den Erfolg der IPoC im späten Beginn nach 30 bzw. 45 min verantwortlich war, wurde in dieser Studie nicht untersucht.

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe von Raupach et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine verzögerte Gabe von Dex in der Reperfusion einen kardioprotektiven Effekt erzielt ²⁹. Rattenherzen wurden durch eine 10-minütige Dex Gabe zum einen direkt zu Beginn und 30 min nach Beginn der Reperfusion postkonditioniert. Zusätzlich wurde in dieser Studie die Beteiligung des mK_{ATP} und des mitochondrialen Kalzium-abhängigen Kaliumkanals (mK_{Ca}) an der Dex induzierten Kardioprotektion untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der kardioprotektive Effekt von Dex in der frühen Reperfusion direkt nach der Ischämie durch die Gabe des mK_{ATP} -Blockers 5-Hydroxydecansäure (5HD) und dem mK_{Ca} -Blocker Paxilline aufgehoben werden konnte. Hingegen war der kardioprotektive Effekt in der späten Reperfusion 30 min nach der Ischämie nur durch die Gabe von Paxilline zu verhindern. 5HD erzielte diesen Effekt

zu diesem Zeitpunkt nicht mehr. Eine Untersuchung des zu Grunde liegenden Mechanismus des kardioprotektiven Effektes der zeitlich verzögerten Applikation von Dex führten wir in unserer Studie nicht durch.

In einer Studie von Steuer et al. wurden Patienten nach einer Bypass Operation entweder mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran oder dem Narkotikum Propofol für 4 Stunden postoperativ postkonditioniert⁴⁵. Sie detektierten niedrigere Troponin T Werte nach einer PoC mit Sevofluran. Verglichen mit der Sevoflurangruppe zeigte sich bei den Patienten, die eine PoC mit Propofol erhielten höhere Troponin T Werte.

Nach einer myokardialen Ischämie ist der Zeitpunkt von Beginn der Ischämie bis zur Reperfusion von großer Relevanz für das spätere *Outcome* des Patienten⁴⁶. Unserer Forschungsergebnisse zeigen, dass eine verspätete Applikation von Dex zur Kardioprotektion nach solch einem Ereignis möglicherweise beitragen könnte. Dies unterstreicht die klinische Relevanz dieser Studie. Die Reperfusionsperiode unserer Studie betrug 60 min. Aussagen zu kardioprotektiven Eigenschaften sind daher nur zu diesem von uns untersuchten Zeitraum möglich.

Unsere Studie zeigte keine Verbesserung der kardialen Funktion durch die PoC mit Dex. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein sog. myokardiales *Stunning* nach längerer I/R⁴⁷. Ein myokardiales *Stunning* kann die kardiale Funktion für mehrere Tage bis zu einer möglichen Erholung beeinflussen. Dennoch stehen unsere Ergebnisse im Kontrast zu denen von Riquelme et al.⁴⁸. Die Autoren beschreiben eine Erholung der kardialen Funktion nach einer PC mit Dex. Sie führten eine 25-minütige PC mit Dex in der Dosierung 10nM durch, gefolgt von 30 min Ischämie und einer anschließenden Reperfusion von 120 min. Mögliche Gründe der heterogenen Ergebnisse der Studien neben den unterschiedlichen Konditionierungsverfahren sind zum einen, dass Riquelme et al.⁴⁸ eine höhere Konzentration von Dex in ihrer Studie verwendeten. Zum anderen betrug ihre Ischämiezeit 30 min unsere 33 min. Außerdem war ihre Reperfusionszeit mit 120 min doppelt so lang wie die in unserer Arbeit. Basierend auf einer Studie von Ferrera et al.⁴⁹ entschieden wir uns für eine Reperfusionszeit von 60 min, da die Autoren zeigen konnten, dass diese Zeit ausreicht, um die Infarktgröße zu detektieren.

Im ersten Teil unserer Forschungsarbeit zeigte sich in der Auswertung der hämodynamischen Daten ein signifikant niedrigerer mittlerer Druck bei der Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion im linken Ventrikel in der Dex3 Gruppe verglichen

mit dem der Con. Niedrigere Kontraktionsdrücke im linken Ventrikel können die Infarktgröße beeinflussen. Hervorzuheben ist hier, dass höhere Konzentrationen von Dex die Infarktgrößen im selben Maße, wie in der Gruppe Dex3 reduzierten und sich auch die Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion bei den höheren Konzentrationen von Dex (10nM, 30nM und 100nM) im Vergleich zur Con nicht signifikant änderten. Im zweiten Versuchsteil unserer Studie wiederholten wir die 10-minütige PoC zu Beginn der Reperfusion mit Dex 3nM (Dex10). Hier zeigte sich der signifikante Unterschied im Vergleich zur Con, wie in der Dex3 Gruppe im ersten Teil der Studie nicht.

Der experimentelle Aufbau in beiden Teilen der Forschungsarbeit, wie auch die experimentellen Bedingungen waren in allen Versuchen bis zur Reperfusion identisch, sodass die Infarktgrößenreduktion nur auf die Applikation von Dex zurückzuführen ist.

4.3 Kardioprotektion durch Dexmedetomidin

Neben einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe¹³ finden sich in der Literatur weitere Studien über den kardioprotektiven Effekt von Dex^{12, 48, 50, 51}.

Zusätzlich zeigte Dex in anderen Studien, dass es auch auf andere Organe eine protektive Wirkung hat. So zeigten Balci et al.⁵² den protektiven Effekt auf die Nieren, eine Arbeitsgruppe um Zhang et al.⁵³ einen schützenden Effekt auf die Lunge und Luo et al.²⁰ auf das Gehirn.

Gao et al. zeigten in einem *in vitro* Model, dass die PC mit Dex myokardiale Zellen vor einem I/R-Schaden schützt⁵⁰. Die Autoren untersuchten, die Aktivität des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH), die Expression des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β), wie auch die Aktivität des toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und des Transkriptionsfaktors Nukleären Faktor- κ B (NF- κ B). Die Aktivität bzw. die Expression dieser Marker verringerten sich bei einer PC mit Dex und schützten damit die myokardialen Zellen vor einem I/R-Schaden. Zusätzlich führte eine Elimination von TLR4 zu einer Reduktion des I/R-Schadens und unterstütze den kardioprotektiven Effekt von Dex. Eine Überexpression von TLR4 hob den kardioprotektiven Effekt von Dex auf. Die Autoren kamen zu dem Entschluss, dass der kardioprotektive Effekt von Dex auf eine Unterdrückung der TLR4 Rezeptoraktivität zurückzuführen ist⁵⁰.

In einer Studie von Riquelme et al. präkonditionierten die Autoren isoliert perfundierte Rattenherzen mit 10nM Dex für 25 min und bestimmten im Anschluss die Infarktgröße.

Zusätzlich untersuchten die Autoren die Dimerisierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) ⁴⁸. Die PC mit Dex führte nicht nur zu einer Reduktion der Infarktgröße, sondern auch zu einer Aktivierung von eNOS und zu einer erhöhten Produktion von NO. Bei gemeinsamer Applikation von Dex und eNOS- und NO-Inhibitoren zeigte sich die Infarktgrößenreduktion nicht ⁴⁸. Diese Studien zeigen mögliche zugrundeliegende Mechanismen der Dex induzierten Kardioprotektion. Riquelme et. al. ⁴⁸ stellten in ihrer Studie die Hypothese auf, dass Dex nur in der PC einen kardioprotektiven Effekt erzielen kann und nicht in der PoC, da NO myokardtoxische Peroxynitrite produziert, wenn es mit Superoxiden in der Reperfusion reagiert. Zusätzlich stützten sie ihre Vermutung der nicht vorhandenen kardioprotektiven Wirkung von Dex in der PoC auf eine Studie aus dem Jahr 2010 von Mimuro et al. ⁵⁴, in der die Autoren bei der Gabe von Dex in der PoC einen Anstieg und keine Reduktion des Infarktareals im Vergleich zur Con detektierten. Unsere Ergebnisse wie auch andere Arbeiten ^{29, 38, 48} widerlegen diese Hypothese.

4.4 Limitierung

Die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der Dex induzierten Kardioprotektion in der PoC erfolgte in dieser Studie nicht.

Wir fokussierten uns auf die Detektion der niedrigsten protektiven Konzentration von Dex und ob der Effekt durch Startpunkt und Dauer der Gabe von Dex in der Reperfusion beeinflusst wird.

Die PoC mit Dex erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Reperfusion (nach 15, 30, 45 min). Die Länge der PoC mit Dex betrug in der Gruppe Dex15 45 min, in der Gruppe Dex30 30 min und in der Gruppe Dex45 15 min. Eine exakt 10-minütige Verabreichung von Dex zu den von uns gewählten Zeitpunkten in der Reperfusion, wäre auch aufgrund der Ergebnisse der Studie von Raupach et al. ²⁹, die zu zwei Zeitpunkten eine exakt 10-minütige PoC mit Dex durchführten, eine interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten.

4.5 Material- und Methodenkritik

In der vorliegenden Studie verwendeten wir ausschließlich gesunde, junge und männliche Ratten. Bei einer Übertragung auf den Menschen im klinischen Alltag entspricht dies nicht dem Patientenkollektiv, welches von einer Kardioprotektion durch PoC im Durchschnitt profitieren würde. Diese Patienten sind meist komorbide, haben ein fortgeschrittenes Alter und sind von unterschiedlichem Geschlecht. Die Untersuchungen dieser Forschungsarbeit dienten der erstmaligen Untersuchung, der niedrigsten kardioprotektiven Konzentration von Dex und ob eine zeitlich verzögerte Gabe von Dex kardioprotektiv wirkt. In anschließenden Studien bietet es sich an, Komorbiditäten als mögliche inhibierende Einflüsse auf den kardioprotektiven Effekt zu untersuchen. Auch die Einnahme von Komedikationen spielen gerade als mögliche Einflussfaktoren bei der pharmakologischen Konditionierung eine große Rolle und wurden in dieser Studie nicht untersucht.

4.5.1 Langendorff-Anlage

Die von Oskar Langendorff entwickelte und benannte Langendorff-Anlage⁵⁵ ist eine weit verbreitete Methode der Perfusion eines isoliert schlagenden Herzen und wird bis heute weltweit genutzt um u.a. zelluläre Signalwege zu untersuchen und pharmakologische Interventionen durchzuführen.

Der Vorteil dieser Methode besteht nicht nur in der guten Erlernbarkeit, sondern auch in der guten Reproduzierbarkeit, Standardisierung der Experimente und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Trotz eines vom Körper isolierten Herzens wird durch diese Methode versucht, annähernd physiologische Bedingungen zu erzielen. Hierfür ist die Umgebung des Herzens von zentraler Bedeutung. Ein wichtiger Faktor ist die Konstanzhaltung der Temperatur des Rattenherzens⁵⁶. Die HF einer Ratte beträgt im Mittel in Ruhe etwa 350 Schläge/min. Schwankungen der Temperatur können zu Änderungen der HF oder auch der kardialen Schlagkraft führen⁵⁷. Hypo- wie auch Hyperthermien können bereits präkonditionierende Effekte zeigen³⁵. Die Konstanzhaltung der Zieltemperatur in der hier vorliegenden Studie wurde zum einen durch Erwärmung der KHL in einem Wärmebad und zum anderen durch mit erwärmter Flüssigkeit ummantelter Perfusionsschläuche erzielt. An der Langendorff-Anlage ist das Herz frei von Einflüssen anderer Organe, der systemischen Zirkulation und von Signalen des zentralen wie auch autonomen

Nervensystems. Vorteil dieser Methode ist, dass wie in unserer Studie bei der Untersuchung der Wirkung von Pharmaka periphere Einflüsse auf das Herz ausgeschlossen werden können. Auch der Einfluss von beispielsweise Sedativa und Analgetika, die bei den Versuchen in einem *in vivo* Modell genutzt werden, spielen bei dieser *in vitro* Methode keine Rolle.

Jedoch weisen die Untersuchungen an der Langendorff-Anlage auch Nachteile auf. Die Sternotomie wie auch die Explantation des Herzens erfordern Routine und Können des Untersuchers um das Herz nicht zu beschädigen. Die Zeit von Explantation bis zur Perfusion an der Langendorff-Anlage sollte bei einem Rattenherz nicht länger als 3 min betragen, da sonst eine Schädigung oder eine ungewollte PC erfolgen kann⁵⁸. Auch kann durch die Kanülierung die Aorta selbst, aber auch die Aortenklappe beschädigt werden⁵⁹. Durch die Isolation vom Körper wird die Lebensdauer des Herzens limitiert. In einer Studie von Sutherland et. al. beschrieben diese eine Verminderung der Kontraktilität und der chronotropen Funktion um 5-10% pro Stunde⁶⁰. Aufgrund dessen ist der Versuchszeitraum an der Langendorff-Anlage beschränkt.

Im Langendorff-Modell gibt es zwei Möglichkeiten der retrograden Perfusion, die druck- und die flusskonstante Perfusion³⁵. In dem von uns gewählten Aufbau wurde durch eine peristaltische Pumpe (s. Abbildung 1, E) die KHL kontinuierlich in das System gepumpt. Ein konstanter Perfusionsdruck von 80mmHg, wurde über einen freien Überlauf in definierter Höhe erzielt. Um die Gefahr einer Luftembolie auszuschließen und einen fehlerfreien Versuchsaufbau zu gewährleisten, ist es von großer Relevanz, dass das Schlausystem der Langendorff-Anlage frei von Luft ist. Ein Untersuchen der Anlage auf Luftblasen und ein ausgiebiges Spülen der Anlage vor Inbetriebnahme minimierten dieses Risiko. Auch ein Luftfänger der in der Anlage (s. Abbildung 1, G) einbaut war reduzierte das Risiko von Luftembolien. Die Applikation der Testsubstanz wurde über einen Perfusor direkt oberhalb des Herzens zugeführt (s. Abbildung 1, J). Hier musste explizit auf einen luftfreien Abschluss geachtet werden.

4.5.2 Krebs-Henseleit-Lösung

Eine der am häufigsten verwendeten Puffer an der Langendorff-Anlage ist die Lösung nach Krebs und Henseleit⁶¹. Die Zusammensetzung aus 118mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 1,2mM KH₂PO₄, 4,25mM NaHCO₃, 2,25mM CaCl₂ und 11mM Glucose imitieren das Blutplasma⁶¹. Voraussetzung für die Anwendung der

Lösung zur Perfusion ist die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂). Dieser sorgt für einen erhöhten Sauerstoffpartialdruck um das Sauerstoffangebot des Herzens aufrecht zu halten und eine pH-Stabilität zu gewährleisten. Da die Sauerstoffkapazität des Puffers im Vergleich zu Blut deutlich geringer ist, ist ein höherer Partialdruck notwendig, um das Herz mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen⁵⁶. Die Ionen- und Substratkonzentrationen in dieser Lösung zeigen deutliche Abweichung zur physiologischen Blutkonzentration aufgrund des Fehlens von Albuminen und anderen Molekülen, die im Blutplasma enthalten sind und Ionen binden⁵⁹. Die enthaltene Glukose dient als Energiequelle⁶². Der geringere onkotische Druck, durch das Fehlen von Albuminen, kann zu interstitiellen Ödemen in den isoliert perfundierten Organen führen⁶³. Alternativ zur KHL ist die Verwendung von Blut möglich. Jedoch ist diese Methode durch einen Filter- und Aufbereitungsprozess deutlich aufwändiger³⁵.

4.6 Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die PoC mit Dex am isolierten Rattenherzen zu einem kardioprotektiven Effekt durch eine signifikante Reduktion des Infarktareals führt. Im ersten Teil unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Konzentration 3nM Dex, als niedrigste Konzentration, das Infarktareal signifikant nicht nur in Bezug auf die Con, sondern auch in Bezug auf die Konzentration von 1nM reduzierte. Höhere Dex Konzentrationen zeigten keine weitere signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu 3nM.

Des Weiteren kamen wir im zweiten Teil unserer Forschungsarbeit zu dem Ergebnis, dass der kardioprotektive Effekt von Dex unabhängig von Zeitpunkt und Dauer der Gabe in der Reperfusion ist.

Unsere Studie wurde *in vitro* an isoliert perfundierten Rattenherzen durchgeführt. Eine direkte Übertragung auf den Menschen ist daher nur bedingt möglich. Da Dex ein in der Klinik weit verbreitetes und viel verwendetes Medikament ist, bieten sich klinische Studien an.

Da die zeitlich verzögerte Gabe von Dex, wie die sofortige Applikation in der Reperfusion einen kardioprotektiven Effekt in unserer Studie zeigten, ist die verzögerte Gabe des Medikamentes im klinischen Alltag eine deutlich praktikablere Option und daher von großem Interesse. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die kardioprotektive Potenz von Dex in der Klinik nutzen zu können.

Literaturverzeichnis

- (1) Destatis, S. B. *Todesursachen* Zitiert am: **14.12.2019** URL: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg234240; 2019.
- (2) Robert Koch-Institut. *Herz-kreislauf-erkrankungen*. **12.09.2022**. https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html.
- (3) Statistisches Bundesamt. *Todesursachen*. **14.10.2022**. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html.
- (4) Thygesen, K.; Alpert, J. S.; Jaffe, A. S.; Simoons, M. L.; Chaitman, B. R.; White, H. D.; Writing Group on the Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. t. U. D. o. M. I.; Thygesen, K.; Alpert, J. S.; White, H. D.; et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* **2012**, *33* (20), 2551-2567. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs184.
- (5) e.V., D. G. f. K.-H.-u. K. *ESC Pocket Guidelines* Zitierts am **14.12.2019** URL: https://leitlinien.dgk.org/files/2018_Pocket_Leitlinie_STEMI_Internetversion_Neu.pdf; 2017.
- (6) Yellon, D. M.; Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **2007**, *357* (11), 1121-1135. DOI: 10.1056/NEJMra071667.
- (7) Kloner, R. A.; Bolli, R.; Marban, E.; Reinlib, L.; Braunwald, E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* **1998**, *97* (18), 1848-1867.
- (8) Murry, C. E.; Jennings, R. B.; Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **1986**, *74* (5), 1124-1136. DOI: 10.1161/01.cir.74.5.1124.
- (9) Berger, M. M.; Huhn, R.; Oei, G. T.; Heinen, A.; Winzer, A.; Bauer, I.; Preckel, B.; Weber, N. C.; Schlack, W.; Hollmann, M. W. Hypoxia induces late preconditioning in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* **2010**, *113* (6), 1351-1360. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181fce7ea.
- (10) Santillo, E.; Migale, M.; Postacchini, D.; Balestrini, F.; Incalzi, R. A. Cardioprotection by Conditioning Mimetic Drugs. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* **2016**, *15* (1), 15-30. DOI: 10.2174/1871523015666160719155122.
- (11) Caimmi, P. P.; Molinari, C.; Uberti, F.; Micalizzi, E.; Valente, G.; Mary, D. A.; Vacca, G.; Grossini, E. Intracoronary levosimendan prevents myocardial ischemic damages and activates survival signaling through ATP-sensitive potassium channel and nitric oxide. *Eur J Cardiothorac Surg* **2011**, *39* (4), e59-67. DOI: 10.1016/j.ejcts.2010.11.044.

Literaturverzeichnis

- (12) Ibacache, M.; Sanchez, G.; Pedrozo, Z.; Galvez, F.; Humeres, C.; Echevarria, G.; Duaso, J.; Hassi, M.; Garcia, L.; Diaz-Araya, G.; et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1822* (4), 537-545. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.12.013.
- (13) Behmenburg, F.; Pickert, E.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M. W.; Huhn, R.; Berger, M. M. The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels. *J Cardiovasc Pharmacol* **2017**, *69* (4), 228-235. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000466.
- (14) Agency, E. M. *Human medicine European public assessment report (EPAR): Dexdor (updated) Date of authorisation: 15/09/2011 Last updated: 25/11/2019; 2019.*
- (15) Keating, G. M. Dexmedetomidine: A Review of Its Use for Sedation in the Intensive Care Setting. *Drugs* **2015**, *75* (10), 1119-1130. DOI: 10.1007/s40265-015-0419-5.
- (16) Ebert, T. J.; Hall, J. E.; Barney, J. A.; Uhrich, T. D.; Colinco, M. D. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology* **2000**, *93* (2), 382-394. DOI: 10.1097/00000542-200008000-00016.
- (17) Venn, R. M.; Grounds, R. M. Comparison between dexmedetomidine and propofol for sedation in the intensive care unit: patient and clinician perceptions. *Br J Anaesth* **2001**, *87* (5), 684-690. DOI: 10.1093/bja/87.5.684.
- (18) Hall, J. E.; Uhrich, T. D.; Barney, J. A.; Arain, S. R.; Ebert, T. J. Sedative, amnestic, and analgesic properties of small-dose dexmedetomidine infusions. *Anesth Analg* **2000**, *90* (3), 699-705. DOI: 10.1097/00000539-200003000-00035.
- (19) Venn, R. M.; Hell, J.; Grounds, R. M. Respiratory effects of dexmedetomidine in the surgical patient requiring intensive care. *Crit Care* **2000**, *4* (5), 302-308. DOI: 10.1186/cc712.
- (20) Luo, C.; Ouyang, M. W.; Fang, Y. Y.; Li, S. J.; Zhou, Q.; Fan, J.; Qin, Z. S.; Tao, T. Dexmedetomidine Protects Mouse Brain from Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibiting Neuronal Autophagy through Up-Regulating HIF-1alpha. *Front Cell Neurosci* **2017**, *11*, 197. DOI: 10.3389/fncel.2017.00197.
- (21) Møller, M. H.; Alhazzani, W.; Lewis, K.; Belley-Cote, E.; Granholm, A.; Centofanti, J.; McIntyre, W. B.; Spence, J.; Al Duhailib, Z.; Needham, D. M. Use of dexmedetomidine for sedation in mechanically ventilated adult ICU patients: a rapid practice guideline. *Intensive Care Medicine* **2022**, *48* (7), 801-810.
- (22) Møller, M. H.; Alhazzani, W.; Lewis, K.; Belley-Cote, E.; Granholm, A.; Centofanti, J.; McIntyre, W. B.; Spence, J.; Al Duhailib, Z.; Needham, D. M. Use of dexmedetomidine for sedation in mechanically ventilated adult ICU patients: a rapid practice guideline. *Intensive Care Medicine* **2022**, 1-10.

- (23) Zhao, Z. Q.; Corvera, J. S.; Halkos, M. E.; Kerendi, F.; Wang, N. P.; Guyton, R. A.; Vinten-Johansen, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2003**, *285* (2), H579-588. DOI: 10.1152/ajpheart.01064.2002.
- (24) Chiari, P. C.; Bienengraeber, M. W.; Pagel, P. S.; Krolikowski, J. G.; Kersten, J. R.; Warltier, D. C. 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), 102-109. DOI: 10.1097/00000542-200501000-00018.
- (25) Kinoshita, M.; Tsutsumi, Y. M.; Fukuta, K.; Kasai, A.; Tanaka, K. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *J Med Invest* **2016**, *63* (1-2), 80-84. DOI: 10.2152/jmi.63.80.
- (26) Zhang, J.; Zhang, J.; Yu, P.; Chen, M.; Peng, Q.; Wang, Z.; Dong, N. Remote Ischaemic Preconditioning and Sevoflurane Postconditioning Synergistically Protect Rats from Myocardial Injury Induced by Ischemia and Reperfusion Partly via Inhibition TLR4/MyD88/NF-kappaB Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *41* (1), 22-32. DOI: 10.1159/000455815.
- (27) Matsumoto, S.; Cho, S.; Tosaka, S.; Higashijima, U.; Maekawa, T.; Hara, T.; Sumikawa, K. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol* **2012**, *11*, 4. DOI: 10.1186/1475-2840-11-4.
- (28) Behmenburg, F.; Trefz, L.; Dorsch, M.; Strothoff, M.; Mathes, A.; Raupach, A.; Heinen, A.; Hollmann, M. W.; Berger, M. M.; Huhn, R. Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca(2+)-sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **2018**, *32* (5), 2142-2148. DOI: 10.1053/j.jvca.2017.11.048.
- (29) Raupach, A.; Karakurt, E.; Torregroza, C.; Bunte, S.; Feige, K.; Stroethoff, M.; Brandenburger, T.; Heinen, A.; Hollmann, M. W.; Huhn, R. Dexmedetomidine provides cardioprotection during early or late reperfusion mediated by different mitochondrial K⁺-channels. *Anesthesia & Analgesia* **2020**, *132* (1), 253-260.
- (30) Hausenloy, D. J.; Tsang, A.; Yellon, D. M. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends in cardiovascular medicine* **2005**, *15* (2), 69-75.
- (31) Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart failure reviews* **2007**, *12*, 217-234.
- (32) Lacerda, L.; Somers, S.; Opie, L. H.; Lecour, S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular research* **2009**, *84* (2), 201-208.

- (33) Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation research* **2015**, *116* (4), 674-699.
- (34) Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nature Reviews Cardiology* **2016**, *13* (4), 193-209.
- (35) Bell, R. M.; Mocanu, M. M.; Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* **2011**, *50* (6), 940-950. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
- (36) Skrzypiec-Spring, M.; Grotthus, B.; Szelag, A.; Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2007**, *55* (2), 113-126. DOI: 10.1016/j.vascn.2006.05.006.
- (37) Behmenburg, F.; Pickert, E.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M. W.; Huhn, R.; Berger, M. M. The cardioprotective effect of dexmedetomidine in rats is dose-dependent and mediated by BKCa channels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **2017**, *69* (4), 228-235.
- (38) Cheng, X. Y.; Gu, X. Y.; Gao, Q.; Zong, Q. F.; Li, X. H.; Zhang, Y. 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), 797-803. DOI: 10.3892/mmr.2016.5345.
- (39) Ratiopharm. *Fachinformation Dexmedetomidin-ratiopharm 100 Mikrogramm/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung*. **14.10.2022**. <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Dexmedetomidin-ratiopharm%20100%20Mikrogrammmil%20Konzentrat%20zur%20Herstellung%20eine r%20Infusionslosung%20-%201.pdf?pzn=11584493> (accessed).
- (40) Okada, H.; Kurita, T.; Mochizuki, T.; Morita, K.; Sato, S. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation* **2007**, *74* (3), 538-545. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2007.01.032.
- (41) Rossello, X.; Yellon, D. M. The RISK pathway and beyond. *Basic research in cardiology* **2018**, *113*, 1-5.
- (42) Stroethoff, M.; Christoph, I.; Behmenburg, F.; Raupach, A.; Bunte, S.; Senpolat, S.; Heinen, A.; Hollmann, M. W.; Mathes, A.; Huhn, R. Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels. *J Cardiovasc Pharmacol* **2018**, *72* (2), 106-111. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000600.
- (43) Ebert, T. J.; Hall, J. E.; Barney, J. A.; Uhrich, T. D.; Colino, M. D. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **2000**, *93* (2), 382-394.

Literaturverzeichnis

- (44) Barsukevich, V.; Basalay, M.; Sanchez, J.; Mrochek, A.; Whittle, J.; Ackland, G. L.; Gourine, A. V.; Gourine, A. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Research in Cardiology* **2015**, *110* (1), 1-11.
- (45) Steurer, M. P.; Steurer, M. A.; Baulig, W.; Piegeler, T.; Schläpfer, M.; Spahn, D. R.; Falk, V.; Dreessen, P.; Theusinger, O. M.; Schmid, E. R. Late pharmacologic conditioning with volatile anesthetics after cardiac surgery. *Critical Care* **2012**, *16*, 1-9.
- (46) McNamara, R. L.; Wang, Y.; Herrin, J.; Curtis, J. P.; Bradley, E. H.; Magid, D. J.; Peterson, E. D.; Blaney, M.; Frederick, P. D.; Krumholz, H. M. Effect of door-to-balloon time on mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *47* (11), 2180-2186.
- (47) Braunwald, E.; Kloner, R. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* **1982**, *66* (6), 1146-1149.
- (48) Riquelme, J. A.; Westermeier, F.; Hall, A. R.; Vicencio, J. M.; Pedrozo, Z.; Ibacache, M.; Fuenzalida, B.; Sobrevia, L.; Davidson, S. M.; Yellon, D. M.; et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism. *Pharmacol Res* **2016**, *103*, 318-327. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.11.004.
- (49) Ferrera, R.; Benhabbouche, S.; Bopassa, J.; Li, B.; Ovize, M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovascular drugs and therapy* **2009**, *23*, 327-331.
- (50) Gao, J. M.; Meng, X. W.; Zhang, J.; Chen, W. R.; Xia, F.; Peng, K.; Ji, F. H. Dexmedetomidine Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Suppressing TLR4-MyD88-NF-kappaB Signaling. *Biomed Res Int* **2017**, *2017*, 1674613. DOI: 10.1155/2017/1674613.
- (51) Peng, K.; Qiu, Y.; Li, J.; Zhang, Z. C.; Ji, F. H. Dexmedetomidine attenuates hypoxia/reoxygenation injury in primary neonatal rat cardiomyocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine* **2017**, *14* (1), 689-695.
- (52) Balci, C.; Akan, M.; Boztas, N.; Ozkardesler, S.; Ergur, B. U.; Guneli, M. E.; Unal, B. Protective effects of dexmedetomidine and remote ischemic preconditioning on renal ischemia reperfusion injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **2017**, *23* (4), 279-286. DOI: 10.5505/tjtes.2016.49103.
- (53) Zhang, W.; Zhang, J. Q.; Meng, F. M.; Xue, F. S. Dexmedetomidine protects against lung ischemia-reperfusion injury by the PI3K/Akt/HIF-1alpha signaling pathway. *J Anesth* **2016**, *30* (5), 826-833. DOI: 10.1007/s00540-016-2214-1.
- (54) Mimuro, S.; Katoh, T.; Suzuki, A.; Yu, S.; Adachi, Y. U.; Uraoka, M.; Sano, H.; Sato, S. Deterioration of myocardial injury due to dexmedetomidine administration after myocardial ischaemia. *Resuscitation* **2010**, *81* (12), 1714-1717.

Literaturverzeichnis

- (55) Tigerstedt, R. Oscar Langendorff. *Ergebnisse der Physiologie* **1909**, 8 (1), 797-812. DOI: 10.1007/bf02321098.
- (56) Liao, R.; Podesser, B. K.; Lim, C. C. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2012**, 303 (2), H156-H167.
- (57) Fukunami, M.; Hearse, D. J. The inotropic consequences of cooling: studies in the isolated rat heart. *Heart and vessels* **1989**, 5, 1-9.
- (58) Minhaz, U.; Koide, S.; Shohtsu, A.; Fujishima, M.; Nakazawa, H. Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic research in cardiology* **1995**, 90, 418-423.
- (59) Skrzypiec-Spring, M.; Grotthus, B.; Szeląg, A.; Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **2007**, 55 (2), 113-126.
- (60) Sutherland, F. J.; Hearse, D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological research* **2000**, 41 (6), 613-627.
- (61) Krebs, H. A.; Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klinische Wochenschrift* **1932**, 11, 757-759.
- (62) Gärtner, K.; Büttner, D.; Döhler, K.; Friedel, R.; Lindena, J.; Trautschold, I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Laboratory animals* **1980**, 14 (3), 267-274.
- (63) Vogel, W. M.; Cerel, A. W.; Apstein, C. S. Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran. *Journal of molecular and cellular cardiology* **1986**, 18 (12), 1207-1218.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Tier- und Herzgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion des ersten Versuchsteils der Studie (Konzentrationsfindung Dexmedetomidin)	17
Tabelle 2: Infarktgrößen Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	19
Tabelle 3: Herzfrequenz (HF in min^{-1}) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin	20
Tabelle 4: Koronarfluss (CF in ml/min) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	20
Tabelle 5: <i>left ventricular developed pressure</i> (LVDP in mmHg) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	20
Tabelle 6: <i>left ventricular enddiastolic pressure</i> (LVEDP in mmHg) Konzentrationsfindung Dexmedetomidin.....	21
Tabelle 7: Übersicht der Tier- und Herzgewichte sowie Zeitpunkt und Höhe der maximalen ischämischen Kontraktion des zweiten Versuchsteil der Studie (Einfluss des Startpunktes und der Dauer der Applikation von Dexmedetomidin)	22
Tabelle 8: Infarktgrößen Zeitpunkt und Dauer der Applikation.....	23
Tabelle 9: Herzfrequenz (HF in min^{-1}) Zeitpunkt und Dauer der Applikation	24
Tabelle 10: Koronarfluss (CF in ml/min) Zeitpunkt und Dauer der Applikation.....	25
Tabelle 11: <i>left ventricular developed pressure</i> (LVDP in mmHg) Zeitpunkt und Dauer der Applikation	25
Tabelle 12: <i>left ventricular enddiastolic pressure</i> (LVEDP in mmHg) Zeitpunkt und Dauer der Applikation	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Langendorff-Anlage.....	8
Abbildung 2: Experimentelles Protokoll zur Konzentrationsfindung durch Postkonditionierung mit Dexmedetomidin.....	9
Abbildung 3: Experimentelles Protokoll zu Dauer und Startpunkt der Applikation von Dexmedetomidin 3nM	10
Abbildung 4: Triphenyltetrazoliumchlorid angefärbte Herzscheiben eines Rattenherz als Beispiel	11
Abbildung 5: Infarktgrößen Konzentrationsfindung Dexmedetomidin	18
Abbildung 6: Hämodynamische Daten der Kontrollgruppe und der Postkonditionierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexmedetomidin	19
Abbildung 7: Infarktgrößen Zeitpunkt und Dauer der Applikation	23
Abbildung 8: Hämodynamische Daten der Kontrollgruppe und der Gabe von 3nM Dexmedetomidin zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unterschiedlicher Dauer in der Reperfusion.....	24

Danksagung

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Pannen, für die Aufnahme in seinem Institut und die Möglichkeit meine Doktorarbeit anzufertigen und Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Betreuung während der experimentellen Arbeit im Labor.

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen und Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen für die Überlassung des Themas. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Betreuern Frau Dr. med. Friederike Behmenburg und Herrn Dr. med. Martin Stroethoff, die mir die gesamte Zeit im Labor wie auch während des Schreibprozesses unterstützend zur Seite standen und allzeit ein offenes Ohr für mich hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Claudia Dohle und Frau Brigitte Berke, die allzeit als Ansprechpartnerinnen im Labor zur Verfügung standen.

Am Ende gilt mein großer Dank an meine Familie, im Besonderen meine Eltern und an meine Schwester, wie auch an meine Freunde. Ihr habt mich das gesamte Studium und in jeder Lebenslage begleitet und unterstützt. Ich hatte immer das Gefühl, dass ich stets auf euch zählen kann und ihr auch in schwierigen Zeiten für mich da wart.

Ohne eure großartige Unterstützung wäre mir das Studium und diese Doktorarbeit nicht in dieser Form möglich gewesen. Ihr habt stets an mich geglaubt.

Ich danke euch von Herzen.