

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

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

**Der Mechanismus der Mannitol-induzierten
pharmakologischen Kardioprotektion an isolierten
Rattenherzen in vitro**

Dissertation

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

vorgelegt von

Janine Elisa Pütz geb. Rubbert

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

Für meine Tochter Charlotte

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Feige, Katharina; **Rubbert, Janine**; Raupach, Annika; Stroethoff, Martin; Heinen, André; Hollmann, Markus W.; Huhn, Ragnar; Torregroza, Carolin, (2021), Cardioprotective Properties of Mannitol—Involvement of Mitochondrial Potassium Channels.

International Journal of Molecular Sciences, (Volume 22, Issues 5) 2395-2405

(1)

Zusammenfassung

Die myokardiale Ischämie und ihre Folgen stellen auch heute noch die weltweit häufigste Todesursache dar. Daher ist die Entwicklung von Behandlungsstrategien zur Verbesserung des Outcomes betroffener Patienten von besonderem Interesse. Paradoxerweise sind nicht nur Schäden durch die Minderperfusion des Herzmuskelgewebes prognostisch relevant, sondern auch die darauffolgende angestrebte Reperfusion. Über komplexe intrazelluläre Vorgänge führt die Reperfusion zu einer weiteren Vergrößerung des Infarktareals. Dieses Phänomen wird als Ischämie- und Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet. Strategien die das Herz vor diesem I/R Schaden schützen, werden als Kardioprotektion definiert. Der Mechanismus der ischämischen Prä- und Postkonditionierung (IPC und IPoC) führt über Aktivierung kardioprotektiver Signalkaskaden in experimentellen Studien zu einer Reduktion der Infarktgröße nach I/R Schaden. Aufgrund der hohen Invasivität ist eine Übertragung in den klinischen Alltag jedoch unpraktikabel. Die Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung (PC und PoC) ist weniger invasiv und führt ebenfalls zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion. Durch die geringe Invasivität lässt sich diese Konditionierungsstrategie in der Klinik anwenden und hat dadurch eine hohe Relevanz in der aktuellen Forschung. Das Osmodiuretikum Mannitol wird im klinischen Setting regelhaft in der Neurochirurgie, aber auch in der Kardiochirurgie, Ophthalmologie oder der Nephrologie eingesetzt. Neben diesen klinischen Indikationen werden verschiedene organprotektive Eigenschaften, wie z.B. die perioperative Neuroprotektion, beschrieben. Einzelne experimentelle Studien deuten zudem auf kardioprotektive Eigenschaften von Mannitol hin, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht hinreichend untersucht wurden. Für verschiedene pharmakologische Konditionierungsstrategien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung mitochondrialer Kalium (mKATP)-Kanäle an der Vermittlung kardioprotektiver Effekte beteiligt ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Mannitol-induzierte Prä- und Postkonditionierung zu einer Reduktion der Myokardinfarktgröße nach I/R-Schaden führt und ob diese Kardioprotektion durch die mKATP-Kanäle vermittelt wird. Die Studie wurde an isoliert perfundierten Herzen männlicher junger Wistar-Ratten an der Langendorff-Apparatur unter Genehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlicher Tierschutzaufgaben (Aktenzeichen: O 27/12) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in 7 Gruppen randomisiert. Jedes Herz durchlief 33 Minuten globale Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Die Kontrollherzen erhielten lediglich Krebs-Henseleit-Puffer als Trägerflüssigkeit (Kon). Die pharmakologische Prä- (Mannitol PC) und Postkonditionierung (Mannitol PoC) wurde durch die Verabreichung von 11 mmol/L Mannitol für 10 Minuten vor der Ischämie oder unmittelbar zu Beginn der Reperfusion erreicht. In weiteren Gruppen wurde der mKATP-Kanalblocker 5-Hydroxydecanoate (5HD) mit und ohne Mannitol appliziert, um den potenziellen zugrundeliegenden kardioprotektiven Mechanismus zu untersuchen. Der primäre Endpunkt war die Infarktgröße im Verhältnis zum linken Ventrikel, ermittelt durch Färbung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung. Durch die pharmakologische Prä- und Postkonditionierung mit Mannitol wurde eine signifikante Reduktion der Infarktgröße erreicht (Mannitol PC $31 \pm 4\%$ und Mannitol PoC $35 \pm 6\%$, $p < 0,05$ vs. Kon $57 \pm 9\%$). Dieser Effekt konnte durch die Gabe von 5HD wieder aufgehoben werden (Mannitol + 5HD PC $59 \pm 8\%$, $p < 0,05$ vs. Mannitol PC und Mannitol + 5HD PoC $59 \pm 10\%$, $p < 0,05$ vs. Mannitol PoC). Die isolierte Gabe von 5HD hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (5HD PC $60 \pm 14\%$ und 5HD PoC $54 \pm 14\%$). Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass Mannitol kardioprotektive Eigenschaften besitzt und dieser Effekt über die mKATP-Kanäle vermittelt wird. Da Mannitol bereits klinisch eingesetzt wird, stellt es somit einen vielversprechenden Ansatz für klinische Studien der Kardioprotektion dar.

Summary

Myocardial ischemia and its consequences are still the most common cause of death worldwide. Therefore, the development of treatment strategies to improve the outcomes of affected patients is of particular interest. Paradoxically, not only damage caused by reduced blood flow to the heart muscle tissue is prognostically relevant, but also the subsequent desired reperfusion. Through complex intracellular processes, reperfusion leads to further enlargement of the infarct area. This phenomenon is known as ischemia- and reperfusion injury (I/R injury). Strategies that protect the heart from this I/R injury are referred to as cardioprotection. The mechanism of ischemic preconditioning and postconditioning (IPC and IPoC) leads to an infarct size reduction after I/R injury in experimental studies, but it is too invasive for clinical practice. Pharmacological preconditioning and postconditioning (PC and PoC) are less invasive and also result in a significant reduction in infarct size. Due to its low invasiveness, this conditioning strategy can be applied in the clinic and is therefore highly relevant in current research. The osmotic diuretic mannitol is routinely used in the clinical setting in neurosurgery, as well as in cardiac surgery, ophthalmology, and nephrology. In addition to these clinical indications, various organ-protective properties, such as perioperative neuroprotection, have been described. Experimental studies also suggest cardioprotective properties of mannitol, although the underlying mechanisms have not yet been fully investigated. For various pharmacological conditioning strategies, it has been shown that the activation of mitochondrial potassium (mKATP) channels is involved in mediating cardioprotective effects. Therefore, this study investigated whether mannitol-induced preconditioning and postconditioning lead to a reduction in myocardial infarct size after I/R injury and whether this cardioprotection is mediated by mKATP channels. The study was conducted on isolated perfused hearts of male young Wistar rats using the Langendorff apparatus under the approval of the Central Unit for Animal Research and Scientific Animal Welfare Tasks (file number: O 27/12). The animals were randomized into 7 groups. Each heart underwent 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. The control hearts received only Krebs-Henseleit buffer as a vehicle (Kon). Pharmacological preconditioning (Mannitol PC) and postconditioning (Mannitol PoC) were achieved by administering 11 mmol/L mannitol for 10 minutes before ischemia or immediately at the start of reperfusion, respectively. In additional groups, the mKATP channel blocker 5-hydroxydecanoate (5HD) was administered with and without mannitol to investigate the potential underlying cardioprotective mechanism. The primary endpoint was infarct size relative to the left ventricle, determined by staining using triphenyltetrazolium chloride solution. Pharmacological preconditioning and postconditioning with mannitol resulted in a significant reduction in infarct size (Mannitol PC 31±4% and Man-PoC 35±6%, $p < 0.05$ vs. Kon 57±9%). This effect was reversed by the administration of 5HD (Mannitol + 5HD PC 59±8%, $p < 0.05$ vs. Mannitol PC and Mannitol + 5HD PoC 59±10%, $p < 0.05$ vs. Mannitol PoC). The isolated administration of 5HD had no influence on infarct size (5HD PC 60±14% and 5HD PoC 54±14%). The results of the study suggest that mannitol possesses cardioprotective properties and this effect is mediated through mKATP channels. Since mannitol is already clinically used, it represents a promising approach for clinical studies on cardioprotection.

Abkürzungen

5HD	5-Hydroxydecanoate
A1R	Adenosin-1-Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
CABG	koronararterielle Bypass
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta
HF	Herzfrequenz
I/R-Schaden	Ischämie-/Reperfusionsschaden
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPoC	ischämische Postkonditionierung
JAK	Januskinase
KATP-Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KHK	koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KIR	einwärtsgerichteter K ⁺ -Kanal
LVP	Linksventrikuläre Druck
MDA	Malondialdehyd
mK-Kanal	mitochondrialer Kaliumkanäle
mKATP-Kanal	mitochondrialen ATP-abhängiger Kaliumkanal

mKCa-Kanal	Calcium-sensitiven Kaliumkanal
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
NaCl	Natriumchlorid
PCI	perkutane coronare Intervention
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
RISK	reperfusion injury salvage kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	survivor activating factor enhancement
SGLT2	Natrium-Glucose-2-Kotransporter
STAT3	Signalwandler- und Transkriptionsaktivator 3
SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
TNF-R2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologische Grundlagen	1
1.2	Theoretische Grundlagen	3
1.2.1	Ischämie- und Reperfusionsschaden	3
1.2.2	Ischämische Prä- und Postkonditionierung	5
1.2.3	Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung	7
1.2.4	Mechanismen der Kardioprotektion	8
1.2.5	ATP- abhängige Kaliumkanäle	10
1.2.6	Mannitol	11
1.2.7	5-Hydroxydecanoate	12
1.3	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Angaben zu den Versuchstieren	14
2.2	Aktenzeichen der ZETT	14
2.3	Materialien	15
2.3.1	Chemikalien und Medikamente	15
2.3.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien	16
2.3.3	Geräte	17
2.3.4	Langendorff-Apparatur	19
2.3.5	Software	22
2.4	Methoden	23
2.4.1	Langendorff-Versuch	23
2.4.2	Präparation der Rattenherzen	25
2.4.3	Allgemeiner Versuchsablauf	26
2.4.4	Die Versuchsgruppen	27
2.4.5	Färbung der Herzen	29
2.4.6	Bestimmung der Infarktgrößen	30
2.4.7	Bestimmung der hämodynamischen Parameter	31
2.4.8	Statistische Auswertung	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Eigenschaften der Tiere	32
3.2	Infarktgrößen	32
3.3	Kardiale Funktion	34
4	Diskussion	36
4.1	Diskussion der Ergebnisse	36
4.1.1	Mannitol-induzierte Kardioprotektion	36
4.1.2	mKATP-Kanal	39
4.1.3	Hämodynamik	40
4.2	Diskussion des Versuchsaufbaus	42
4.2.1	Langendorff-Versuch	42
4.2.2	Globale Ischämie	43
4.2.3	Krebs-Henseleit-Puffer	44
4.2.4	Pentobarbital	45
4.3	Limitationen	46
4.4	Schlussfolgerung	47
5	Literaturverzeichnis	48
6	Abbildungsverzeichnis	54
7	Tabellenverzeichnis	55

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische Grundlagen

Myokardiale Ischämien und ihre Folgen stellen mit ca. 23 % auch heute noch die weltweit häufigste Todesursache dar (2). Zwar sinkt auf Grund prozessualen Verbesserungen sowie Fortschritten in der Forschung (3) in den letzten Jahren die Mortalität nach einem Herzinfarkt (4), jedoch bleibt die Prognose für betroffene Patienten häufig ungünstig (5). Deshalb sollte in der medikamentösen Therapie weiterhin eine ständige Anpassung und Optimierung erfolgen. Dies erfordert weitere neue Studien, die auch bereits klinisch eingesetzte Medikamente in Bezug auf ihre Wirksamkeit bei myokardialen Ischämien untersuchen.

Die Ursache dieser myokardialen Ischämien liegt häufig in der koronaren Herzerkrankung (KHK) oder einem Myokardinfarkt. Die KHK entsteht durch Arteriosklerose, die zu Ablagerungen von Plaques in den Herzkranzgefäßen führt und somit flusslimitierende Koronarstenosen verursacht. Der Myokardinfarkt ist eine ischämische Myokardnekrose, meist infolge einer KHK mit hochgradiger Stenose oder einem kompletten Verschluss einer Koronararterie (6). Diese Beeinträchtigung des normalen Blutflusses zum Herzmuskel resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen dem Sauerstoffbedarf und -angebot. Das Missverhältnis führt dazu, dass es im Zellstoffwechsel aufgrund anaerober Prozesse zur Entwicklung einer Gewebsnekrose kommt.

Neben der medikamentösen Therapie oder der Anpassung des Lebensstils ist die Revaskularisation der Herzkranzgefäße zentraler Bestandteil der Behandlung einer KHK oder eines Myokardinfarktes (6). Diese Revaskularisation erfolgt entweder durch eine perkutane coronare Intervention (PCI) oder eine koronararterielle Bypass (CABG)-Operation. Die PCI ist Therapie der Wahl bei einfachen Koronarstenosen, doch bei Patienten mit komplexen Dreigefäßerkrankung oder Hauptstammerkrankung sollte eine CABG-Operation bevorzugt werden (6). Um diesen invasiven Eingriff durchführen zu können, muss intraoperativ in den meisten Fällen eine Kardioplegie eingesetzt werden, um das operative Prozedere zu ermöglichen. Doch auch bei diesem iatrogen ausgelösten

Einleitung

Herzstillstand kommt es zu einer Ischämie mit einer darauffolgender Reperfusion. Zwar beginnt die Unterversorgung erst nachdem das Herz aufgehört hat zu schlagen, gekühlt wird und damit einen reduzierten Energieumsatz hat, doch nach 5-10 Minuten beginnt auch hier die Zellschädigung (7).

1.2 Theoretische Grundlagen

1.2.1 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der Myokardschaden infolge einer Ischämie ist nachvollziehbar, doch paradoxerweise kann auch die therapeutisch angestrebte Reperfusion nachweislich zu weiteren, potenziell vermeidbaren Schäden führen. Dieses Phänomen wird als Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet (8) und beruht auf komplexen intrazellulären Vorgängen (Abb. 1, Abb. 2). Durch die Minderperfusion der Zellen und den dadurch fehlenden Sauerstoff werden Stoffwechselfvorgänge, wie die Glykolyse, auf anaerob umgestellt. Dadurch kommt es zu einem Mangel an Adenosintriophosphat (ATP) und vermehrtem Anfall von Laktat. Diese Laktatanhäufung bewirkt die Absenkung des pH-Wertes auf unter 7,0 (9). Um diese Azidose zu korrigieren, findet unter anderem ein Austausch von Protonen (H⁺) gegen Natrium-Ionen statt. Die resultierende Anhäufung von Natrium innerhalb der Zelle bewirkt eine Umkehrung des Natrium-Calcium-Austauschers, was zur Elimination von Natrium aus der Zelle beiträgt, aber gleichzeitig zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt (9, 10). Diese Veränderungen in der Zelle führen zu einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) (9). Die mPTP ist eine unspezifische Pore zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran, die Molekülen bis zu einem Gewicht von 1500 Da den Durchtritt ermöglicht. Bleibt die mPTP länger geöffnet, kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials. Dies führt dazu, dass Wasser dem osmotischen Gradienten folgend in das Mitochondrium eindringt, was eine Schwellung und letztlich das Aufbrechen der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge hat (10). Das Ausmaß des Gewebeschadens variiert je nach Stärke des Blutversorgungsabfalls und der Dauer der Ischämie (11).

Bei der Reperfusion und der erneuten Zufuhr von Sauerstoff wird der pH-Wert durch die Wiederaufnahme aerober Prozesse fast sofort wieder normalisiert und es kommt zu einer langanhaltenden Öffnung der mPTP. Diese verändert das mitochondriale Membranpotential. Zudem kommt es zum Einstrom von Wasser in die Mitochondrien, was zu einer Schwellung und schlussendlich zum Untergang der Mitochondrien führt (12). Dabei werden proapoptotische Faktoren freigesetzt und es kommt zum

Einleitung

Zelltod (10). Diese schnelle pH-Wert-Veränderung, der bestehende Überschuss an intrazellulärem Calcium und auch die durch oxidativen Stress freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine entscheidende Rolle im Ausmaß des I/R Schadens.

Auf Grund dieser Erkenntnisse ist es von großer Bedeutung, weitere Ansätze zur Vermeidung eben dieser Reperfusionsschäden zu finden.

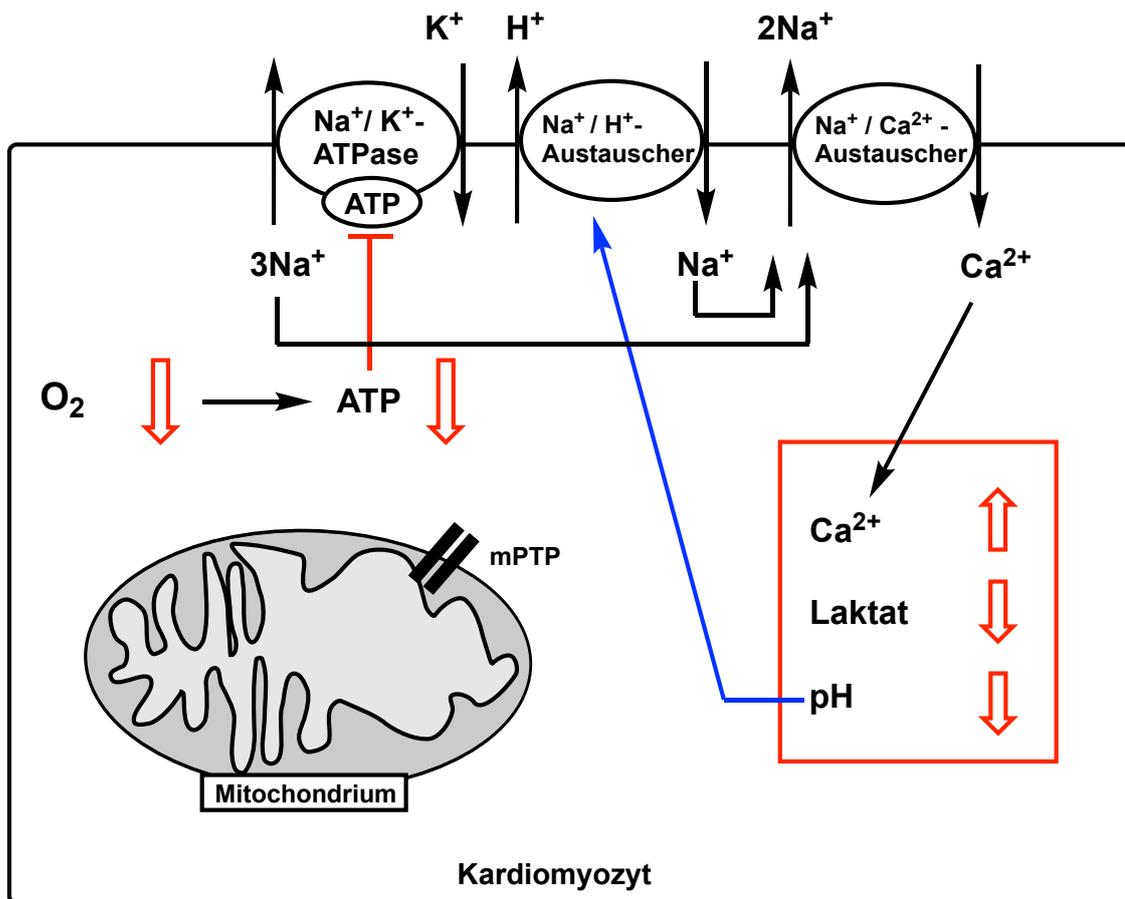


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ischämieschadens

Die Abbildung zeigt schematisch die pathophysiologischen Vorgänge in einem Kardiomyozyten während einer Ischämie. ATP = Adenosinriphosphat; Ca²⁺ = Calcium-Ionen; H⁺ = Wasserstoff-Ionen; Na⁺ = Natrium-Ionen; mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore; O₂ = Sauerstoff; ROS = reaktive Sauerstoffspezies. Modifiziert nach (12) und (9).

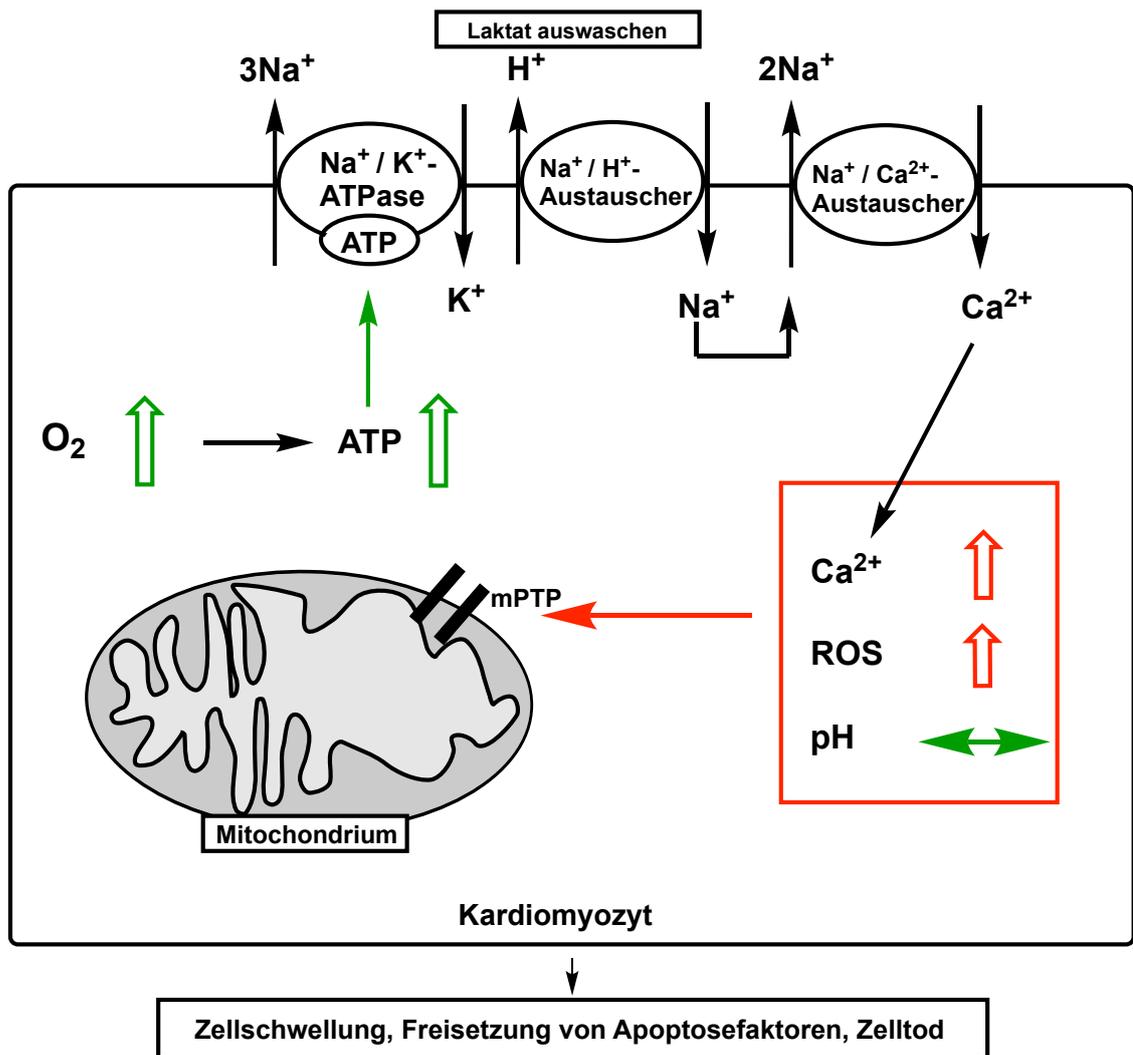


Abb. 2: Schematische Darstellung des Reperfusionsschadens

Die Abbildung zeigt schematisch die pathophysiologischen Vorgänge in einem Kardiomyozyten während der auf eine Ischämie folgende Reperfusion. ATP = Adenosintri-phosphat; Ca²⁺ = Calcium-Ionen; H⁺ = Wasserstoff-Ionen; Na⁺ = Natrium-Ionen; mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore; O₂ = Sauerstoff; ROS = reaktive Sauerstoffspezies. Modifiziert nach (12) und (9).

1.2.2 Ischämische Prä- und Postkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung und Postkonditionierung sind Konzepte der Kardioprotektion, die darauf abzielen, den Schaden zu reduzieren, der durch eine Ischämie und die darauffolgende Reperfusion verursacht wird. Diese Strategien wurden durch Studien wie die von Murry *et al.* (1986) (13) und Zhao *et al.* (2003) (14) eingeführt. Auch heute noch ist die ischämische Konditionierung eine wissenschaftlich wirksame Methode zur Reduktion der Infarktgröße (15).

Einleitung

Die ischämische Präkonditionierung (IPC), wurde 1986 erstmals von Murry *et al.* (13) beschrieben. Sie beinhaltet die Anwendung von drei kurzen nicht letalen ischämischen Phasen, jeweils von 5 Minuten Dauer, gefolgt von einer längeren Ischämie. Diese Methode führte zu einer erstaunlichen Reduktion der Infarktgröße um 75 %. Die Ergebnisse legen nahe, dass vorübergehende und kontrollierte Perioden der subletalen Ischämie einen protektiven Effekt auf das Herz haben können, indem sie es auf die nachfolgende, längere Ischämie vorbereiten.

Darauf aufbauend beschrieben Zhao *et al.* (14) im Jahr 2003 erstmals die ischämische Postkonditionierung (IPoC). Hierbei wurden drei kurze Ischämien von jeweils 30 Sekunden unmittelbar auf eine globale 60-minütige Ischämie angewendet. Die wiederholten kurzen Phasen von Reperfusion und Ischämie, die unmittelbar nach der langen Ischämie erfolgen, führten ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße (14). Dies zeigt, dass auch während der Reperfusion nach einer Ischämie zelluläre Vorgänge moduliert werden können, um den Myokardschaden zu minimieren. Da Ischämien im klinischen Alltag, wie der akute Myokardinfarkt, meist unvorhersehbar sind, gestaltet sich die Umsetzung der IPC als schwierig. Die Erkenntnis über die IPoC war daher bedeutend.

Auch am humanen Herzen konnte eine kardioprotektive Wirkung durch die ischämische Prä- und Postkonditionierung gezeigt werden (16). Ischämische Präkonditionierung durch *Cross-Clamping* der Aorta vor einem Koronararterien-Bypass führte zu einer signifikanten Verringerung des ATP-Verbrauchs während der Ischämie (17). Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch in ihrer hohen Invasivität. Bei jeder Manipulation an einem Gefäß besteht das Risiko von Plaquerupturen, Verletzungen der Intima und Bildung von Thromben während und nach dem Setzen der Klemme. Insgesamt führt diese Methode zu einer verringerten Widerstandsfähigkeit der Gefäße (18).

Diese Forschungsergebnisse haben wichtige Implikationen für die Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung von Herzinfarkten und anderen ischämischen Ereignissen. Die Idee, dass kurzzeitige ischämische Ereignisse eine schützende Wirkung haben können, hat zu weiteren Untersuchungen geführt, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und mögliche klinische Anwendungen zu entwickeln. Auf

Einleitung

Grund ihrer Invasivität lässt sich die klassische ischämische Konditionierung jedoch nicht im klinischen Alltag nutzen. Dies führte zur Entwicklung weiterer kardioprotektiver Strategien basierend auf Gabe pharmakologischer Substanzen.

1.2.3 Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung

Die pharmakologische Prä- und Postkonditionierung (PC und PoC) stellt eine weniger invasive Alternative zur ischämischen Prä- und Postkonditionierung dar und hat sich ebenfalls als effektive Methode zur Reduktion der Infarktgröße erwiesen. Diese Strategie nutzt pharmakologische Substanzen, um ähnlich schützende Effekte wie bei ischämischen Konditionierungsprotokollen zu erzielen.

Ein wegweisender Beitrag zu diesem Bereich stammt von Cason *et al.* (19). In ihrer Studie stellten sie fest, dass das volatile Anästhetikum Isoflurane die Infarktnarbe nach einer Ischämie reduzierte. Isoflurane ist bekannt für seine Fähigkeit, das Nervensystem zu beeinflussen und hat auch schützende Wirkungen gegen ischämische Schäden gezeigt. Obwohl die Reduktion der Infarktgröße durch Isoflurane nicht so stark war wie bei ischämischer Präkonditionierung, waren die Ergebnisse dennoch eindeutig und wiesen darauf hin, dass pharmakologische Ansätze einen signifikanten Schutz bieten können.

Die Grundidee der pharmakologischen Konditionierung wurde durch diese Studie etabliert und wurde seitdem in verschiedenen weiteren Untersuchungen, auch in unserer Arbeitsgruppe, weiterverfolgt (12, 20-22). Bereits 1997 untersuchten Cope *et al.* (23) die kardioprotektiven Eigenschaften der volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran und Isofluran. Andere konditionierende Pharmaka sind Adenosin (24), Bradykinin (25), Dexmedetomidin (26) oder Opioide (27). Neue Studien untersuchten die kardioprotektiven Eigenschaften von den Thrombozytenaggregationshemmern Ticagrelor und Cangrelor (28) und den Natrium-Glucose-2-Kotransporter (SGLT2) Inhibitoren Dapagliflozin und Empagliflozin (29). Diese Fortsetzung der Forschung zeigt das anhaltende Interesse an der Entwicklung von pharmakologischen Strategien zur Verbesserung der kardialen Widerstandsfähigkeit gegenüber Ischämie- und Reperfusionsschäden.

Einleitung

Die Tatsache, dass pharmakologische Prä- und Postkonditionierung weniger invasiv ist, machen sie zu vielversprechenden Optionen für die klinische Anwendung. Die Forschung eröffnet möglicherweise neue Wege für die Behandlung von Patienten mit Herzinfarkten oder anderen ischämischen Erkrankungen, da die Anwendung der pharmakologischen Konditionierung im klinischen Alltag durchaus praktikabel ist.

1.2.4 Mechanismen der Kardioprotektion

Trotz des teils noch unvollständigen Verständnisses über die Mechanismen der Kardioprotektion sind bereits einige wesentliche Mediatoren und Signalübertragungswege identifiziert worden (12, 15, 30). Die wohl wichtigsten Signalwege sind zum einen der *survivor activating factor enhancement* (SAFE)- und zum anderen der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)- Signalweg (12). Nach vielen Jahren der Forschung besteht zudem Übereinstimmung darin, dass die meisten kardioprotektiven Ansätze, unabhängig von den beteiligten Signalwegen, letztendlich auf die Mitochondrien abzielen, um das Herz vor einer Ischämie zu schützen (30, 31).

Durch ischämische Konditionierung werden diverse extrazelluläre Faktoren wie Adenosin, Bradykinin und Opioidpeptide freigesetzt (32). Diese binden an Zelloberflächenrezeptoren und initiieren die Aktivierung der Kinase-Signalwege. Auch pharmakologische Substanzen wie volatile Anästhetika (23, 33), Adenosin (24), Bradykinin (25), Dexmedetomidin (26) oder Opioide (27) führen ebenfalls zu einer Aktivierung der folgenden Signalwege.

Der RISK-Signalweg wurde von Hausenloy *et al.* (34) entdeckt und erforscht. Die Aktivierung von GPCRs führt zu einer erhöhten Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und ihrer nachgeschalteten Ziele, wie beispielsweise die Protein Kinase B (PKB), die Protein Kinase A (PKA) und die extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK). Die PKB phosphoryliert wiederum die Protein Kinase C (PKC), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und die Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta (GSK3 β). Durch die Phosphorylierung und damit Hemmung der GSK3 β wird die Öffnung der mPTP und somit der Zelltod verhindert (30, 31, 35).

Der 2009 von Lecour (36) benannte SAFE-Signalweg ist eine unabhängige Alternative zum RISK-Signalweg, wobei es einige Schnittpunkte zwischen den zwei Signalkaskaden

Einleitung

gibt (37). Interessanterweise erfordern manche Konditionierungsinterventionen die Aktivierung beider Wege, manche wiederum benötigen nur einen der beiden (37). Durch die IPC oder verschiedene pharmakologische Substanzen bindet der TNF- α an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNF-R2), dadurch wird die Januskinase (JAK) phosphoryliert, was dann wiederum zu einer Phosphorylierung des Signalwandler- und Transkriptionsaktivators 3 (STAT3) führt (37). Der dimerisierte und aktivierte STAT3 reguliert das Niveau der ROS, die Funktion der Elektronentransportkette und die Aktivität der mPTP, was schlussendlich den Zelluntergang verhindert.

Neben der Bildung von ROS und der Regulierung der mPTP spielt auch die Öffnung mitochondrialer Kaliumkanäle (mK-Kanal) eine Schlüsselrolle in Konditionierungsstrategien. Diese Kanäle werden in die ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mKATP-Kanal) und die Calcium-sensitiven Kaliumkanäle (mKCa-Kanal) unterteilt. Die Aktivierung von mK-Kanälen, beispielsweise durch eine pharmakologische Konditionierung, führt zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Es wird Kalium in die Zelle transportiert, die Zelle wird hyperpolarisiert und der Calciumtransport nach intrazellulär wird verringert (38). Dies führt letztendlich zu einer Hemmung der mPTP Öffnung und so zur Kardioprotektion.

Die mPTP befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, doch ihr molekularer Aufbau ist bisher nicht eindeutig geklärt. Bei einer hohen intrazellulären Calciumkonzentration, meist durch anaerobe Bedingungen und einen daraus resultierenden ATP-Mangel, kommt es zur Öffnung der mPTP. Diese Öffnung führt dazu, dass Moleküle kleiner als 1,5 kDa die mitochondriale Membran passieren können. Die daraus resultierende Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung verursacht einen ATP-Mangel, der zum Zelluntergang führt. Die langanhaltende Öffnung der mPTP wird heutzutage als Hauptverursacher für Reperfusionsschäden angenommen, weshalb die mPTP ein zentrales Ziel der Kardioprotektion darstellt (39). Eine temporäre Öffnung ist Teil der kardioprotektiven Mechanismen, doch eine anhaltende Öffnung führt zu Schwellung und Schädigung der Mitochondrien sowie zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren (30).

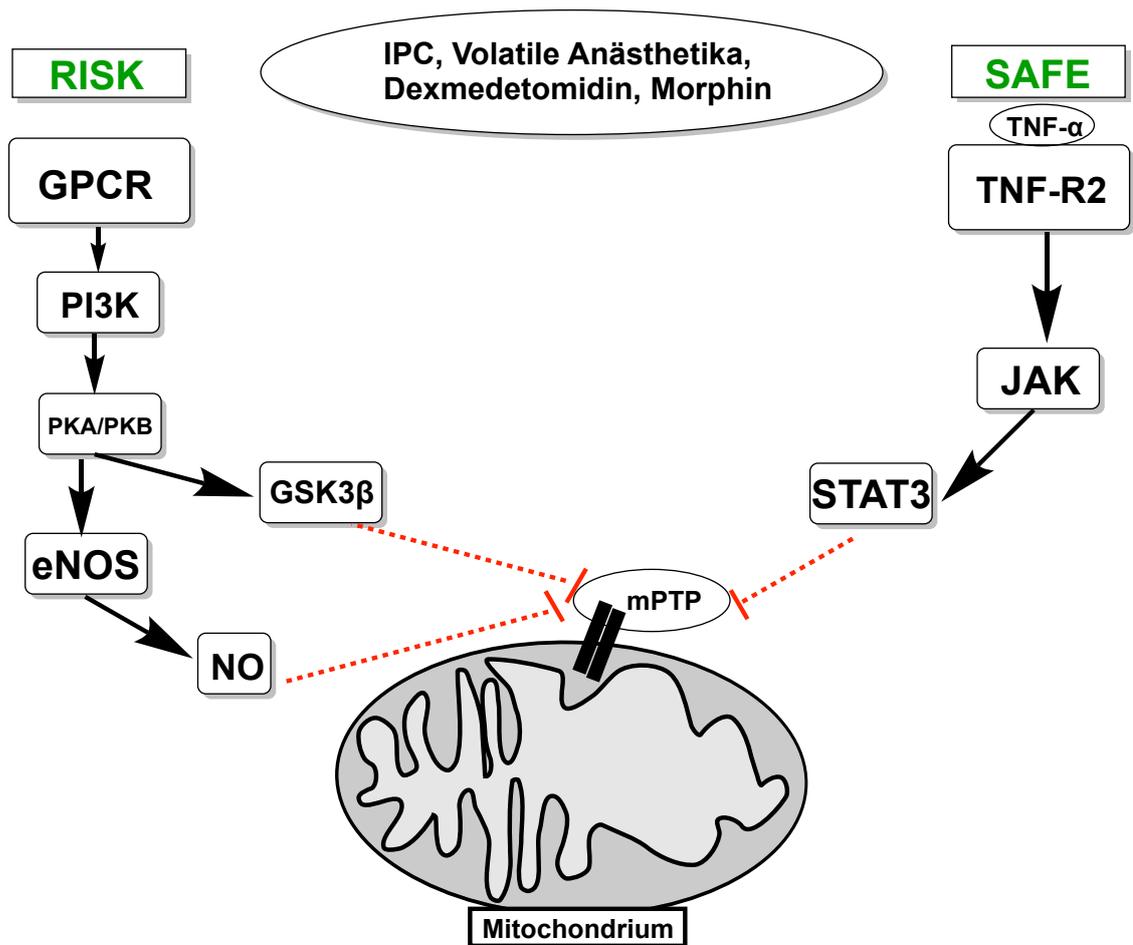


Abb. 3: Schematische Darstellung des RISK und SAFE Signalwegs

Die Abbildung zeigt in vereinfachter Form schematisch die Vorgänge des RISK und SAFE Signalweges. IPC = ischämische Präkonditionierung, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren = GPCRs, Phosphatidylinositol-3-Kinase = PI3K, Protein Kinase A = PKA, Protein Kinase B = PKB, Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta = GSK3 β , endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase = eNOS, Stickstoffmonoxid = NO, Tumornekrosefaktor-alpha = TNF- α , Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 = TNF-R2, Januskinase = JAK, Signalwandler- und Transkriptionsaktivator 3 = STAT3. Modifiziert nach (12).

1.2.5 ATP- abhängige Kaliumkanäle

Die ATP- abhängigen Kaliumkanäle (KATP-Kanäle) sind in vielen verschiedenen Geweben, unter anderem den Herzmuskelzellen, den Blutgefäßen, der Bauchspeicheldrüse, der Skelettmuskulatur und den Neuronen vorhanden und haben eine wichtige physiologische Rolle (40). Grundsätzlich ist ein KATP-Kanal ein Oktamer, der sich aus zwei mal vier Untereinheiten zusammensetzt. Diese bestehen wiederum aus vier Untereinheiten einwärtsgerichteter K⁺-Kanäle (KIR) (KIR6.1/6.2) und vier

Einleitung

Untereinheiten Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR) (SUR1/2A/2B). Die KATP-Kanäle regulieren sowohl das Zellvolumen als auch die Dauer des Aktionspotentials (38).

Sie können in zwei Hauptgruppen unterschieden werden. Die einen finden sich auf der Zellmembran und die anderen auf der Mitochondrienmembran (40). Diese mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mKATP-Kanäle) sind entscheidend an der mitochondrialen Funktion beteiligt und beeinflussen das Organellenvolumen und das Membranpotential (41-45). Gross *et al.* (46) beschrieben bereits 1992, dass die mKATP-Kanäle an der Regulierung des koronaren Blutflusses beteiligt sein könnten. Sie scheinen zudem eine entscheidende Rolle während einer Hypoxie und Ischämie zu spielen. Barsukevich *et al.* (47) konnten die Rolle der mKATP-Kanäle und ihren Effekt auf die mPTP der Kardiomyozyten während der ischämischen Postkonditionierung nachweisen. Die Aktivierung der mKATP-Kanäle zu Beginn der Reperfusion bewirkte den Wiederverschluss der mPTP. Weitere Studien zeigen ebenfalls, dass die mKATP-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Kardioprotektion durch Konditionierung haben (31, 43, 48-52) und dass die Blockade dieser Kanäle, bspw. mittels 5-Hydroxydecanoate (5HD), nachweislich zur Aufhebung der Infarktreaktion führt (12, 49).

1.2.6 Mannitol

Mannitol ist eine hyperosmolare Lösung und ein osmotherapeutisches Mittel, das nur spärlich metabolisiert und hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden wird (53). Der sechskettige Zuckeralkohol Mannitol kommt auf Grund seiner osmotischen Wirkung bereits häufig klinisch zum Einsatz. Mannitol wird meist intravenös verabreicht, bspw. bei der Prophylaxe von Nierenversagen (54). Inhalativ kann Mannitol zur Sekretolyse bei Mukoviszidose eingesetzt werden (55). Auch die orale Applikation bei Obstipationen hat sich bewährt (55). Die bisher größte klinische Relevanz besitzt Mannitol jedoch bei der Therapie von Hirnödemen (56-59). Es wird angenommen, dass das Osmodiuretikum das Hirnvolumen durch Reduzierung des Gesamtwassergehalts und damit des Blutvolumens und durch seine vasokonstriktive Wirkung verringert (59). Darüber hinaus kann Mannitol die zerebrale Perfusion verbessern, indem es die Viskosität verringert und die Rheologie der roten Blutkörperchen verändert (59). Die klinisch eingesetzte intravenöse Dosierung beträgt 1-2 g Mannitol pro Kilogramm Körpergewicht (55). Nebenwirkungen,

Einleitung

wie Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, Hyper- und Dehydratationen oder hämodynamische Veränderungen treten in der Regel nur bei Überdosierungen auf (55).

Auch in der Kardiochirurgie hat Mannitol durch seine Eigenschaften als Radikalfänger sowie durch seinen osmotischen Effekt bereits eine gewisse Relevanz und wird häufig den kardioplegischen Lösungen zugesetzt. Durch seine hohe Osmolarität soll es Ödemen vorbeugen (60-62) und die freien Radikale nach der Reperfusion reduzieren (63, 64).

Die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol wurden über Jahre in verschiedenen Tierarten und Experimenten untersucht, meist im Zusammenhang mit seinen hyperosmolaren Eigenschaften oder radikalfangenden Merkmalen (65, 66). Neben bekannten Signalweg-Kaskaden spielt oxidativer Stress durch ROS eine Schlüsselrolle bei einem I/R-Schaden (12, 30, 67). Obwohl niedrige ROS-Spiegel für die Kardioprotektion benötigt werden, kann eine übermäßige ROS-Bildung letztendlich zum Zelltod nach einem I/R-Schaden führen. Mannitol, als effektiver freier Radikalfänger bekannt, reguliert wahrscheinlich die ROS-Spiegel während Ischämie und Reperfusion und verleiht dadurch seine organschützenden Eigenschaften. Bisher fehlen jedoch umfassende Daten zu möglichen weiteren Mechanismen der durch Mannitol verursachten Kardioprotektion.

1.2.7 5-Hydroxydecanoate

5HD ist ein selektiver Blocker der mKATP-Kanäle (21, 68-71). Voraussetzung für diese Hemmung ist jedoch das Vorhandensein von ATP (72). Auchampach *et al.* (49) zeigten 1992 erstmalig, dass die Infarktgrößenreduktion durch Präkonditionierung mit der Applikation von 5HD vollständig aufgehoben werden kann. Eine Dosis von 100 μ M, wie in dieser Arbeit verwendet, führt nachweislich zu einer vollständigen Blockade der mKATP-Kanäle (43). Eine Vielzahl von Folgestudien, auch in unserer Arbeitsgruppe, konnten ebenfalls zeigen, dass es durch 5HD zu einer Blockade der pharmakologischen Konditionierung kommt (26).

1.3 Ziel der Arbeit

In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Mannitol kardioprotektive Eigenschaften besitzt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind zum aktuellen Zeitpunkt jedoch noch nicht vollständig verstanden. Darüber hinaus sind auch der Zeitpunkt, die Dauer und die Konzentration der Mannitol-Gabe in den bisher durchgeführten Studien uneinheitlich.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den kardioprotektiven Effekt von Mannitol mittels Prä- und Postkonditionierung mit Einsatz einer klinischen Dosierung zu untersuchen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob die mKATP-Kanäle die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol vermitteln. Hierzu wurde der spezifische mKATP Kanal Blocker 5HD in Kombination mit Mannitol eingesetzt. Den primären Endpunkt der Studie stellt die Infarktgröße des linken Ventrikels dar. Als sekundäre Endpunkte wurden die hämodynamischen Parameter untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Angaben zu den Versuchstieren

Bei den Versuchen wurden ausschließlich junge (2-3 Monate alt) gesunde männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 295 ± 33 g verwendet. Ein Teil dieser Tiere stammte von Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich, während der andere Teil aus der Zucht der Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) bezogen wurde. Die Zucht der ZETT wurde ebenfalls mit Tieren von Janvier Labs etabliert.

Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % gehalten. Die Lichtbestrahlung erfolgte in einem 12h Wechsel für den Tag-Nacht-Rhythmus.

Die Tiere erhielten Alleinfuttermittel für Ratten, autoklavierbar (Ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest, Deutschland) und Stadtwasser ozonisiert und mit HCl auf pH 2,8-3 angesäuert *ad libitum*.

Die Tiere wurden in Makrolon Rattenkäfigen Typ 4 mit 1800 cm² gehalten (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland und Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland). Als Einstreu wurde JELUXYL HW 300/500 (JELU-WERK, Rosenberg, Deutschland) verwendet.

2.2 Aktenzeichen der ZETT

Ein Tierversuchskundekurs wurde am 04.06.2020 in der ZETT absolviert. Unter der Referenznummer O 27/12 (Datum: 05/2012) liegt eine Anzeigegenehmigung der ZETT für die Organentnahme der Versuchstiere vor.

2.3 Materialien

2.3.1 Chemikalien und Medikamente

In den folgenden Tabellen (Tabelle 1 - Tabelle 3) sind die Medikamente sowie Chemikalien im Allgemeinen und für den Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Medikamente

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle bei den Versuchen verwendeten Medikamente.

Medikament	Hersteller
5-Hydroxydecanoic acid sodium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
D-Mannitol (C₆H₁₄O₆)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium 5.000I.E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pentobarbital-Natrium (Narcoren) 16g/100ml	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien für den Krebs-Henseleit-Puffer

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Chemikalien, die zur Herstellung für den Krebs-Henseleit-Puffer benötigt werden.

Chemikalie	Hersteller
Calciumchlorid (CaCl₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose (C₆H₁₂O₆)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C₁₀H₁₆N₂O₈)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO₂ + 7H₂O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International bvba, Leuven, Belgium

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Lactate (C₃H₅NaO₃)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien für die Färbung

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Chemikalien, die bei der Färbung der Herzen verwendet wurden.

Chemikalie	Hersteller
Sigma 7-9 (TRIS) (C₄H₁₁NO₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (C₁₉H₁₅ClN₄)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland

2.3.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Tabelle 4 legt dar, welche Verbrauchsmaterialien bei den Versuchen genutzt wurden.

Tabelle 4: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Verbrauchsmaterialien, die bei den Versuchen genutzt wurden.

Material	Hersteller
Aqua Care Wasserbadschutz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Baysilone-Paste 35g	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Dreiwegehahn	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalkanülen 23G x 1 1/4, 20G 1 1/2	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kabelbinder	Sapiseico S.r.l., Saonara, Italien
Krankenunterlage	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Leukoplast	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Mullkompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland

Neodisher IP Spray	Dr. Weigert GmbH & Co.KG, Hamburg, Deutschland
Perfusorschlauch 150cm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Perfusorspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PFA-Schlauch 0,5x1mm	Welabo GmbH, Nettetal, Deutschland
Polyesterfaden (nicht resorbierbar)	Resorba Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland
Probenröhre 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 1ml, 2ml, 3ml, 5ml, 10ml, 20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Skalpellklingen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transpore Fixierpflaster	3M Company, Saint Paul, Minnesota, Vereinigte Staaten
Wells Zellgewebe Kultur	Jiangsu Huida Medical Instruments Co.,Ltd., Jiangsu Yancheng, China

2.3.3 Geräte

Die folgende Tabelle (Tabelle 5) gibt eine Übersicht über alle bei den Versuchen eingesetzten Geräte.

Tabelle 5: Allgemeine Geräte

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Geräte, die bei den Versuchen genutzt wurden.

Gerät	Hersteller
Analysewaage LA 230S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Becherglas 150ml	VWR International, Delaware Valley, USA
Bulldog Clip BH020R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Blutgasanalysator ABL 800 Felix	Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland
Chirurgische Schere BC252R, BC257R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

Material und Methoden

Digital Thermometer GTH 1160	GHM GROUP - Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Druckeichgerät 367	Hugo Sachs Elektronik -Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Fadenschere BC060R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Guillotine Model 7950	Udo Basile S.R.L., Gemonio VA, Italien
Laborglasgewindeflasche 2000ml	Kavalierglass, a.s., Tschechische Republik
Laborglasgewindeflasche 5000ml, 2000ml, 500ml	DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & CO, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & CO, Schwabach, Deutschland
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Perfusor	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pinzette BD589, OC021R, BD239, BB084R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Rippenspreizer	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Scanner CanonScan LiDE 700F	Canon, Ōta, Präfektur Tokio, Japan
Vortex Mixer	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, Vereinigte Staaten
Waage 440-45N	Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Waage Scout Pro	Ohaus Corporation, New Jersey, USA
Wasserbad 1001	Gesellschaft für Labortechnik m.b.H.&Co., Hannover-Vinnhorst, Deutschland

2.3.4 Langendorff-Apparatur

Die Versuchsreihen dieser Forschungsarbeit wurden unter Verwendung der Langendorff-Apparatur durchgeführt. Langendorff stellte 1895 erstmals die Möglichkeit vor, isolierte Säugetierherzen zu perfundieren, welches eine bedeutende Verbesserung bei der Untersuchung der Herzfunktionen ermöglichte. Diese Methode der extrakorporalen Perfusion erfordert einen konstanten Perfusionsdruck und eine weitgehend stabile Temperatur des Perfusats (73).

Die innovative Entwicklung setzte Langendorff im Jahr 1897 fort, als er erfolgreich Vollblut des untersuchten Tieres durch mit Kochsalz verdünntes Blut ersetzte. Damit gelang es ihm, das Herz über mehrere Stunden isoliert schlagen zu lassen. Dies war ein entscheidender Schritt, der die Grundlage für die heutzutage noch häufig eingesetzte Langendorff-Apparatur schuf (74). Obwohl die Methode im Laufe der Zeit mehrfach modifiziert wurde, hat sich ihr Grundprinzip bis heute erhalten. Durch eine Kanüle, die in die aufsteigende Aorta eingeführt wird, gelangt Blut oder in der Regel eine kristalline Perfusionslösung ins Herz, und zwar entweder unter konstantem Druck oder konstantem Fluss. Der rückwärts gerichtete Fluss schließt die Aortenklappe, sodass das Perfusat über die Aortenklappenwurzel-Öffnungen direkt in die Koronararterien geleitet wird. Nach dem Durchlauf durch den Koronarkreislauf sammelt sich das ausströmende Perfusat im rechten Vorhof an, von dort fließt es über den Koronarsinus ab (75).

Heutzutage wird das Herz weiterhin idealerweise mit Eigenblut des Tieres perfundiert, welches jedoch schwierig und zeitaufwändig ist. Eine Alternative zum Einsatz von Vollblut ist daher die Perfusion mittels Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), wie in dieser Arbeit verwendet. Der KHP gilt neben Vollblut als die beste Option für die Perfusion eines isolierten Säugetierherzens. Es handelt sich hierbei um eine kristalloide Lösung mit ähnlicher ionischer Zusammensetzung wie das Blutplasma. Allerdings enthält der KHP keine Eiweiße und hat somit einen niedrigeren kolloidosmotischen Druck und eine geringere Viskosität (75). Die genaue Zusammensetzung des verwendeten KHP zeigt Tabelle 6.

Um die hämodynamischen Parameter zu erheben, wird über das linke Herzohr ein Ballonkatheter in den linken Ventrikel eingeführt. Andere messbare Parameter bei

Material und Methoden

Versuchen mit der Langendorff-Anlage sind der Ventrikeldurchmesser, der mittlere Koronarfluss, verschiedene bioelektrische Parameter sowie der Herzrhythmus (76).

Tabelle 6: Konzentration Krebs-Henseleit-Puffer

Die Tabelle zeigt wie viel Gramm der Chemikalie auf 5 Liter zweifach destilliertes Wasser gegeben wurde.

Chemikalie	Menge
Natriumchlorid (NaCl)	34,48g
Kaliumchlorid (KCL)	1,751g
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO₂ + 7H₂O)	1,479g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	0,817g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	10,501g
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C₁₀H₁₆N₂O₈)	0,731g
D-Glucose (C₆H₁₂O₆)	9,909g
Sodium Lactate (C₃H₅NaO₃)	0,561g
Calciumchlorid (CaCl₂)	1,249g

Tabelle 7: Geräte und Materialien der Langendorff-Apparatur

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Geräte und Materialien, die in der Langendorff-Apparatur verbaut sind.

Material	Hersteller
BridgeAmp ML 110	ADInstruments, Sydney, Australien
Druckaufnehmer MLT0699	ADInstruments, Sydney, Australien
Heizspirale	Handgeblasen
Luer-Lock-Schlauchadapter	Harvard Apparatus, Cambridge, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Luftfänger	Handgeblasen
Metall-Dreiwegehahn	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Peristaltikpumpe MINIPLUS3	Fa. Gilson, Middleton, USA
PowerLab 8/30	ADInstruments, Sydney, Australien
PVC Schlauch 3,16mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Silikonschlauch 5x8mm	Saint-Globain Performance Plastics France, Charny, Frankreich
Temperatur-Laborregler EC	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Tygon Schlauch E-3603 3, ID: 18mm,6mm	Saint-Globain Performance Plastics France, Charny, Frankreich
Umwälzthermostat MW-6	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Wärmeschild	Handgeblasen

2.3.5 Software

Zur Aufzeichnung der Versuche wurde LabChart (v8.1.14. Hersteller ADInstruments, Sydney, Australien) verwendet. Dieses Datenanalyseprogramm zeichnete während der Dauer des Versuchs konsequent den linksventrikulären Druck (LVP), in der Abb. 4 rot dargestellt, und die Herzfrequenz (HF), in der Abb. 4 blau dargestellt, auf.

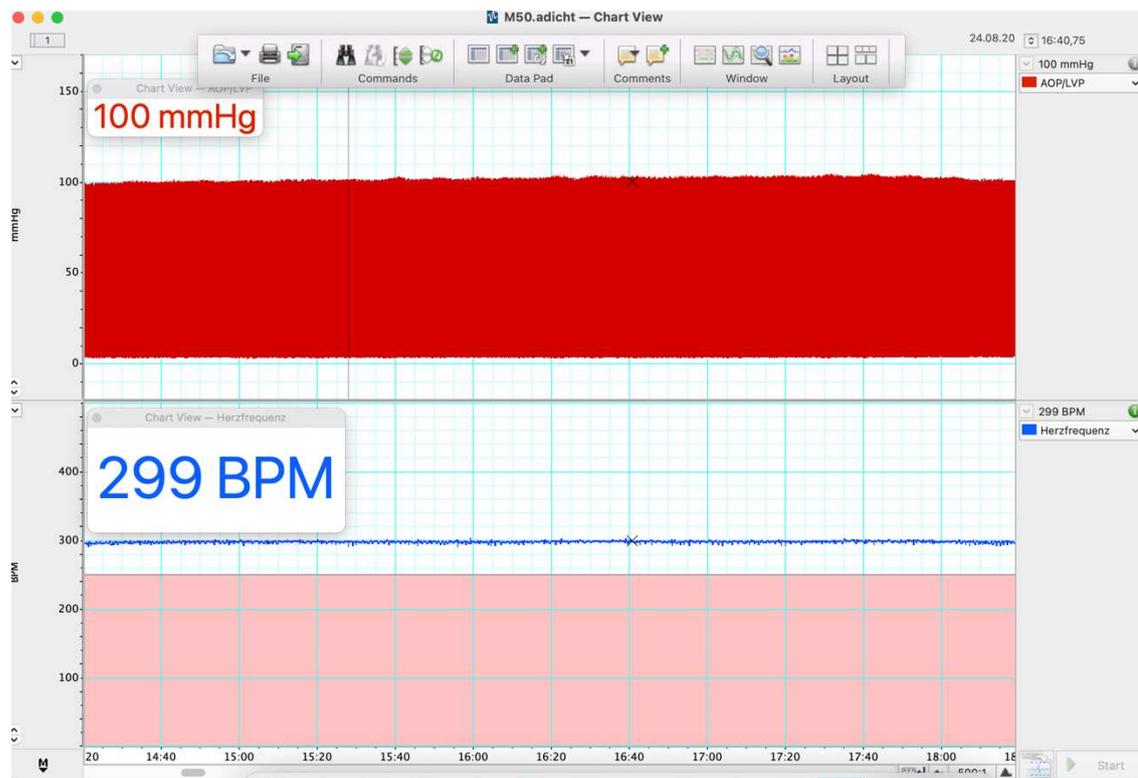


Abb. 4: LabChart

Die Abbildung zeigt beispielhaft die Darstellung in LabChart des linksventrikulären Drucks (rot) und der Herzfrequenz (blau). Die Herzfrequenz ist in beats per minute (BPM) angegeben und der linksventrikuläre Druck in mmHg.

2.4 Methoden

2.4.1 Langendorff-Versuch

Die Langendorff-Apparatur ermöglicht es, das Herz außerhalb des Körpers zu isolieren und unter kontrollierten Bedingungen zu perfundieren, welches wiederum eine präzise Untersuchung verschiedener Herzparameter ermöglicht. Einen umfassenden Überblick über den Aufbau dieser Apparatur zeigt Abb. 5. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Komponenten der Anlage gibt Tabelle 7.

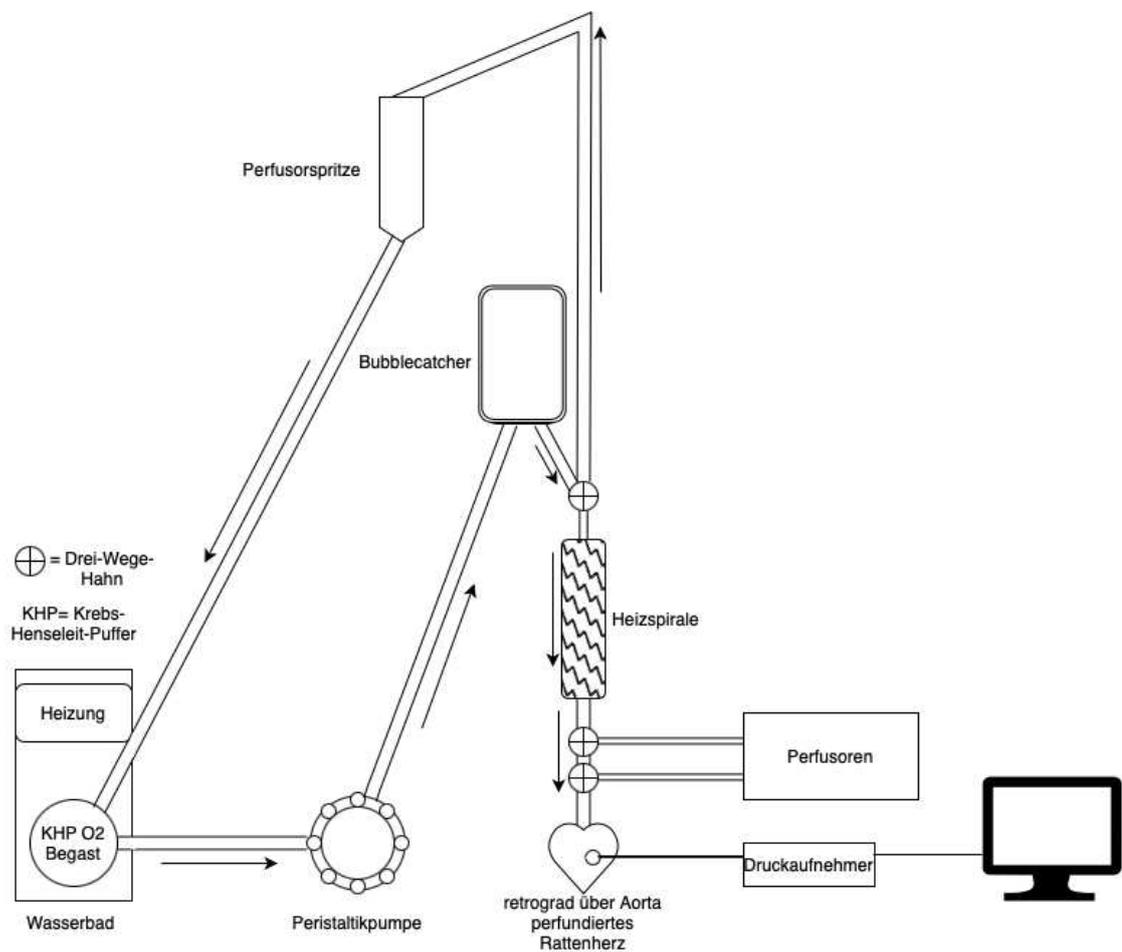


Abb. 5: Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der Langendorff-Apparatur. Die Pfeile zeigen die Flussrichtung des Krebs-Henseleit-Puffers.

Die Versuche an der Langendorff-Apparatur sollten immer unter den gleichen Voraussetzungen ablaufen. Der KHP wurde morgens selbst angesetzt. Dazu wurden 5 Liter zweifach destilliertes Wasser in eine 5 Liter Laborglasgewindeflasche (Tabelle 5)

Material und Methoden

gefüllt und die Chemikalien (Tabelle 2) in der folgenden Konzentration hinzugegeben, siehe Tabelle 2. Die Chemikalien wurden mittels Analysewaage (Tabelle 5) sorgfältig abgewogen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Versuchsdurchführung ist das Vorliegen standardisierter Umgebungsparameter, insbesondere in Bezug auf den pH-Wert und die Temperatur des KHP. Daher wurde vor jedem Versuchsbeginn eine Blutgasanalyse (BGA) angefertigt. Diese sollte optimalerweise wie folgt aussehen, pH: $7,01 \pm 0,05$, K^+ : 5,7 mmol/l, Na: 140 mmol/l, Ca^{2+} : $1,44 \pm 0,05$ mmol/l, Cl^- : 115 ± 2 mmol/l, pCO_2 : >40 mmHg, Glukose ~ 200 mg/dl. Wenn die BGA keine großen Abweichungen zeigte, wurde der KHP in eine 2 Liter Laborglasgewindeflasche (Tabelle 5) umgefüllt und in das Wasserbad (Tabelle 5) gestellt. Dieses Wasserbad wurde mittels Temperatur-Laborregler (Tabelle 7) auf $45^\circ C$ erwärmt. Sobald der KHP in das Wasserbad gestellt wurde, wurde er mit Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) (UN3156, Hersteller: Linde AG, Pullach, Deutschland) über eine Glasfritte begast. Nachdem der KHP eine Temperatur von $36^\circ C$ erreichte, wurde eine neue BGA angefertigt. Diese sollte wie folgt aussehen, pH: 7,3-7,4, K^+ : 5,7 mmol/l, Na: 140 mmol/l, Ca^{2+} : 1,33 mmol/l, Cl: 112 mmol/l, pCO_2 : < 40 mmHg, Glukose > 200 mg/dl und Laktat ~ 1 mmol/l. Um den Ischämie-Puffer vorzubereiten, wurde KHP in eine 500 ml Laborglasgewindeflasche gefüllt und ebenfalls in das Wasserbad gestellt. Dieser wurde nun mit Stickstoff (UN1066, Hersteller: Linde AG, Pullach, Deutschland) begast.

Anschließend konnte die Langendorff-Apparatur befüllt werden. Dazu wurde der mit Sauerstoff begaste KHP aus der im Wasserbad befindlichen Laborglasgewindeflasche über die Peristaltikpumpe (Tabelle 7) in die Anlage gepumpt. Das gesamte System muss zu Versuchsbeginn luftleer sein, um eine Luftembolie des Herzens zu vermeiden. Um die restlichen Luftblasen aus der Anlage zu entfernen, wurde mit einer 10 oder 20 ml Spritze (Tabelle 4) nach und nach Puffer aus der Anlage gezogen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Luftblasen mehr in der Langendorff-Apparatur vorhanden waren.

Die Anlage und auch die Druckaufnehmer mussten jeden Morgen geeicht und kontrolliert werden. Hierzu wurde das Druckeichgerät (Tabelle 5) an den Dreiwegehahn am Druckaufnehmer angeschlossen. Der Dreiwegehahn (Tabelle 4) wurde zunächst zur

Material und Methoden

Atmosphäre hin geöffnet und der Druck wurde in dem Programm LabChart genullt. Anschließend wurde der Dreiwegehahn in Richtung des Druckeichgeräts geöffnet. Dieses wurde dann auf 150 mmHg aufgepumpt. So konnte der Druck auf 150 mmHg geeicht werden. Auch der Ballon und der Druckaufnehmer selbst mussten jeden Morgen auf Unversehrtheit und Nichtvorhandensein von Luftblasen überprüft werden. Vor Versuchsbeginn wurden die Medikamente und Perfusoren für die einzelnen Versuchsgruppen vorbereitet. Die Raumtemperatur sollte möglichst konstant warmgehalten werden und die Fenster sollten geschlossen bleiben, um jegliche Zugluft zu vermeiden.

2.4.2 Präparation der Rattenherzen

Zu Beginn der Versuche wurden die Ratten gewogen und anschließend erfolgte die Sedierung mittels intraperitonealer Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital. Zusätzlich erhielten die Ratten 1000 IE unfraktioniertes Heparin, um eine Thrombenbildung zu vermeiden. Exakt 5 Minuten nach der Injektion wurde die Ratte unter Verwendung einer Guillotine (Tabelle 5) dekapitiert. Unmittelbar im Anschluss erfolgte eine mediane Thorakotomie, um das Rattenherz freizulegen. Das Herz wurde mit einer Pinzette (Tabelle 5) an der Aorta gegriffen und mit Hilfe einer Schere (Tabelle 5) aus dem Thorax der Ratte entfernt. Anschließend wurde das Herz in ein mit Natriumchlorid (NaCl) (Tabelle 1) gefülltes Becherglas (Tabelle 5) gegeben und vorsichtig zu der Langendorff-Apparatur transportiert.

Das Aufhängen der Herzen an der Langendorff-Anlage erfolgte immer innerhalb von maximal 3 Minuten nach Dekapitation, um eine ischämische Präkonditionierung zu vermeiden. An dem Metall-Dreiwegehahn (Tabelle 7) wurde das Herz mit einem Polyesterfaden (Tabelle 4) aufgehängt. Dazu wurde das Herz aus dem Becherglas vorsichtig mit einer Pinzette (Tabelle 5) auf eine Mullkomresse (Tabelle 4) gelegt. Anschließend wurde die Aorta ascendens identifiziert und über den unteren Teil des Metall-Dreiwegehahns (Tabelle 7) gezogen. Dort wurde dann die Aorta ascendens mit zwei chirurgischen Knoten befestigt. Dabei war es wichtig, die Aorta ascendens nicht zu hoch aufzuhängen, um die Aortenklappe nicht zu durchstechen. Sobald die zwei chirurgischen Knoten zugezogen wurden, wurde der Metall-Dreiwegehahn (Tabelle 7) aufgedreht und das Herz wurde mit KHP versorgt. Die Aortenklappe schließt nun durch

Material und Methoden

den Perfusionsdruck und die Herzkranzgefäße können ausreichend, mit einem konstanten Druck von 80 mmHg und einer konstanten Temperatur von 37 °C, perfundiert werden.

Um den LVP und die HF zu messen, wurde ein kleiner Ballonkatheter über Eröffnung des linken Vorhofohres, durch den Vorhof in die linke Kammer des Herzens eingeführt. Dieser Messballon war mit dem Druckaufnehmer (Tabelle 7) verbunden. Um den Ballon einführen zu können, wurde das linke Herzohr mit einer Schere (Tabelle 5) abgetrennt und der Ballon über den linken Vorhof vorsichtig in den linken Ventrikel geschoben. Danach wurde dieser Messballon luftblasenfrei mit destilliertem Wasser gefüllt und ein enddiastolischer Druck von 4-6 mmHg adjustiert. Der Druckaufnehmer war über den Bridge Amp (Tabelle 7) und den PowerLab (Tabelle 7) mit dem PC verbunden, um so den LVP und die HF über das Programm LabChart 8.0 für Windows (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) darzustellen. Schließlich konnten der Versuch und die Aufzeichnung gestartet werden.

2.4.3 Allgemeiner Versuchsablauf

Sobald die nötigen Vorbereitungen getroffen waren, wurde der Versuch gestartet. Die Flussrate der Perfusoren wurde auf 1 % des koronaren Durchflusses zum Zeitpunkt der Baseline (Minute 10) eingestellt. Der koronare Durchfluss wurde immer zu den festgelegten Zeitpunkten gemessen. Zum Zeitpunkt der Baseline, der Präkonditionierung, in Minute 30 der Reperfusion und in Minute 60 der Reperfusion wurde eine Minute lang der KHP aufgefangen, der zuvor das Herz perfundierte. Dazu wurde ein Becherglas (Tabelle 5) unter das Wärmeschild (Tabelle 7) gestellt und der Dreiwegehahn (Tabelle 4) nach unten geöffnet. Der koronare Durchfluss wurde auch zur Auswertung der Hämodynamik herangezogen.

25 Minuten nach Beginn des Versuchs wurde eine globale Ischämie erzeugt. Dazu wurde der Metall-Dreiwegehahn (Tabelle 7) geschlossen und so die Perfusion gestoppt. Zusätzlich wurde das Wärmeschild (Tabelle 7) mit Stickstoff (Stickstoff 5.0, Linde AG, Pulach) begastem KHP gefüllt. Während der 33-minütigen Ischämie wurde der im Wärmeschild (Tabelle 7) befindliche KHP weiterhin mit Stickstoff (Stickstoff 5.0, Linde AG, Pulach) begast, um jegliche Sauerstoffzufuhr zu verhindern.

Material und Methoden

Für die Reperfusion wurde der Metall-Dreiwegehahn (Tabelle 7) geöffnet und das Herz erneut mit Sauerstoff begastem KHP perfundiert. Außerdem wurde das Wärmeschild (Tabelle 7) wieder geleert. Alle Herzen durchliefen eine 60-minütige Reperfusion.

Nach der 60-minütigen Reperfusion wurde der Versuch beendet und das Herz wurde von dem Metall-Dreiwegehahn (Tabelle 7) behutsam abgeschnitten, auf eine Kompresse (Tabelle 4) gelegt und vorsichtig trockengerieben. Mittels Waage (Tabelle 5) wurde das Nassgewicht des Herzes bestimmt und anschließend in eine zurechtgeschnittene Spritze (Tabelle 4) aufgezogen. Jedes Herz wurde mit Namen und dem Datum beschriftet, bevor es anschließend in einem -20 °C Gefrierschrank eingefroren wurde.

2.4.4 Die Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in sieben randomisierte Gruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt sowohl in der Prä- als auch in der Postkonditionierung lediglich KHP, um sicherzustellen, dass das am Herzen applizierte Volumen identisch mit den Volumina der anderen Gruppen war. Eine Gruppe erhielt 11 mmol/l Mannitol über 10 Minuten als Präkonditionierung und eine weitere erhielt dieselbe Dosis Mannitol als Postkonditionierung. Die gewählte Konzentration von 11 mmol/l beruht auf Ergebnissen von Torregroza *et al.* (77). Ihre Untersuchungen zeigten, dass die Verabreichung von Mannitol in der genannten Dosierung einen ausgeprägten kardioprotektiven Effekt hat. Mit Blick auf die klinische Anwendung korrespondiert die in unserer *in vitro* Studie eingesetzte Mannitol-Konzentration von 11 mmol/l in etwa einer Dosierung von ca. 1 g/kg Körpergewicht und somit der empfohlenen klinischen Dosierung.

Zwei Gruppen wurde 100 µM 5HD verabreicht, einmal als Präkonditionierung und einmal als Postkonditionierung. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die Dosis von 100 µM 5-HD zu einer vollständigen Blockade der mKATP-Kanäle führt (43). Die einzelne Gabe von 5HD wurde genutzt um einen möglichen Einfluss der Substanz selbst auf den I/R Schaden auszuschließen. Eine Gruppe erhielt Mannitol und 5HD als Präkonditionierung und eine andere erhielt diese Kombination als Postkonditionierung. Diese zwei Gruppen dienten der Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen der Mannitol-induzierten Konditionierung. Alle Substanzen wurden mit einer Infusionsrate

Material und Methoden

von 1 % des koronaren Durchflusses verabreicht. Abb. 6 zeigt einen Überblick über die hier beschriebenen Gruppen.

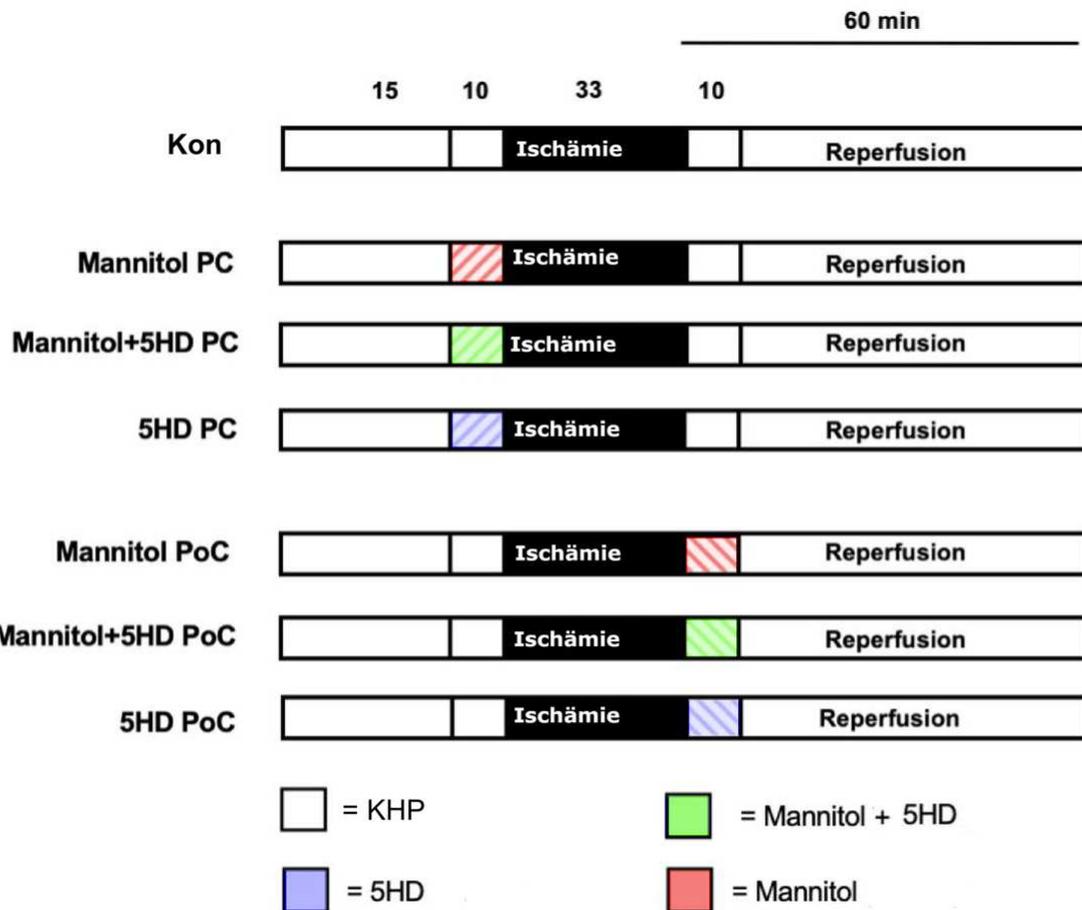


Abb. 6: Versuchsgruppen

Die Abbildung zeigt die 7 Versuchsgruppen und den zeitlichen Ablauf der Versuche. Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, 5HD = 5-Hydroxydecanoate, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung. Modifiziert nach (1).

Jede der in Abb. 6 gezeigten Versuchsgruppen durchlief identische 5 Phasen. Die Versuchsgruppen starteten mit einer 15-minütigen Einpendelungsphase (Baseline bei Minute 15), gefolgt von einer 10-minütigen Intervention (Präkonditionierung). Direkt im Anschluss erfolgte eine globale Ischämie über 33 Minuten. Nach dieser Ischämie folgten wieder 10 Minuten Intervention (Postkonditionierung) zu Beginn der insgesamt 60-minütigen Reperfusion.

Material und Methoden

Kontrolle (Kon): Die Herzen erhielten KHP als Trägerflüssigkeit während der beiden Interventionsphasen (PC und PoC).

Mannitol Präkonditionierung (Mannitol PC): Die Herzen wurden 10 Minuten vor der Ischämie mit 11 mmol/l Mannitol perfundiert.

Mannitol + 5HD Präkonditionierung (Mannitol + 5HD PC): Den Herzen wurde 11 mmol/l Mannitol und 100 μ M 5HD 10 Minuten vor der Ischämie verabreicht.

5HD Präkonditionierung (5HD PC): Die Herzen wurden 10 Minuten vor der Ischämie mit 100 μ M 5HD perfundiert.

Mannitol Postkonditionierung (Mannitol PoC): Die Herzen erhielten über 10 Minuten 11mmol/l Mannitol zu Beginn der Reperfusion.

Mannitol + 5HD Postkonditionierung (Mannitol + 5HD PoC): Die Herzen wurden für 10 Minuten nach der Ischämie mit 11 mmol/l Mannitol und 100 μ M 5HD perfundiert.

5HD Postkonditionierung (5HD PoC): Die Herzen erhielten über 10 Minuten 100 μ M 5HD zu Beginn der Reperfusion.

2.4.5 Färbung der Herzen

Um das Infarktareal der Herzen von dem unbeschädigten Herzmuskelgewebe abzugrenzen, wurden die Herzen mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung angefärbt. TTC ist ein wasserlöslicher Redoxindikator. Vitale Zellen mit intakter Atmungskette reduzieren mittels ihrer Dehydrogenasen das Tetrazolium-Kation zu rotem Formazan (78). So wurde das vitale Herzmuskelgewebe rot gefärbt und die Infarktnarbe blieb farblos.

Um 100 ml der 0,75 % TTC-Färbelösung zu erhalten, wurden 1,41 g Sigma 7-9 (Tabelle 3) und 0,75 g TTC (Tabelle 3) auf 75 ml NaCl 0,9 % (Tabelle 1) gegeben. Die Lösung wurde auf einer Magnetrührplatte (Tabelle 5) gerührt und auf 37 °C erhitzt. Gleichzeitig wurde mit Hilfe eines Digital-pH-Meter (Tabelle 5) der pH-Wert auf genau 7,42 bei exakt 37 °C eingestellt. Hierzu wurde 37 %ige Salzsäure (Tabelle 3) vorsichtig in die TTC-Färbelösung titriert. Sobald der pH-Wert und die Temperatur optimal eingestellt waren, wurde das Volumen der Färbelösung mit NaCl 0,9 % auf genau 100 ml aufgefüllt.

Material und Methoden

Die eingefrorenen Herzen wurden mittels Skalpellklinge (Tabelle 4) in acht jeweils 1-2 mm dicke Scheiben geschnitten. Es wurde an der Herzspitze begonnen und die Scheiben wurden mit der Schnittfläche nach unten in die Wells (Tabelle 4) gelegt. Mit einer Multipipette (Tabelle 5) wurde jeweils 1 ml der TTC-Färbelösung auf die Herzscheiben pipettiert. Anschließend wurden die Wells mit den Herzscheiben 15 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad (Tabelle 5) inkubiert. Nach den 15 Minuten wurden die Herzscheiben aus dem Wasserbad genommen und in eine neue Well-Platte (Tabelle 4) umgelagert. Auch hier musste darauf geachtet werden, dass die Schnittfläche unten liegt. Danach wurde jeweils 1 ml 4 %ige Formaldehydlösung (Tabelle 3) mittels Multipipette (Tabelle 5) auf die Herzscheiben gegeben. Die Herzscheiben verweilten über Nacht (maximal 24 Stunden) in der 4 %igen Formaldehydlösung (Tabelle 3).

Am nächsten Tag wurden die Herzscheiben mit Hilfe eines Flachbettscanners eingescannt, um die Infarktgrößen bestimmen zu können. Hierzu wurden die Herzscheiben mit der Schnittfläche nach unten auf den Scanner (Tabelle 5) gelegt. Alle acht Scheiben eines Herzens wurden nebeneinandergelegt, beginnend mit der Herzspitze. Eine beispielhafte Darstellung der bereits gefärbten und eingescannten Herzen sehen Sie in Abb. 7.



Abb. 7: Gefärbtes und eingescanntes Herz

Die Abbildung zeigt beispielhaft die acht gefärbten und eingescannten Herzscheiben des Herzens „M39“. Links beginnend mit der Herzspitze. Nach rechts gehen die Schnitte immer weiter in Richtung Herzbasis. Die helleren Areale zeigen das abgestorbene Herzmuskelgewebe (Infarktareal) und die roten Bereiche zeigen das intakte Herzmuskelgewebe.

Nachdem die Herzen eingescannt wurden, wurden sie wieder in eine Well-Platte (Tabelle 4) gelegt und dort ca. eine Woche zum Trocknen belassen. Nach dem Trocknen wurde mittels Analysewaage (Tabelle 5) das Herztrockengewicht bestimmt.

2.4.6 Bestimmung der Infarktgrößen

Der Zeichner war bei der Bestimmung der Infarktgrößen verblindet. Für die Zeichnung wurde die Planimetrie-Software SigmaScan Pro5 (SPSS Science Software, Chicago, IL,

Material und Methoden

USA) verwendet. Für jede Herzscheibe wurden der linke Ventrikel und die Infarktareale planimetrisch ermittelt. Aus diesen Ergebnissen wurde ein Mittelwert pro Herz gebildet. Die Infarktgröße stellte so den prozentualen Anteil des Infarktgebietes im Verhältnis zum linken Ventrikel als Risikogebiet dar.

2.4.7 Bestimmung der hämodynamischen Parameter

Als sekundären Endpunkt betrachteten wir hämodynamische Parameter wie die Herzfrequenz, den linksventrikulären Druck und den Koronarfluss. Der im linken Ventrikel platzierte Ballon ermöglichte die kontinuierliche Aufzeichnung des minimalen und maximalen linksventrikulären Drucks sowie der Herzfrequenz über den gesamten Versuchszeitraum. Der koronare Durchfluss wurde zu festgelegten Zeitpunkten gemessen. Während der Baseline, der Präkonditionierungsphase, in Minute 30 der Reperfusion und in Minute 60 der Reperfusion. Hierfür wurde das Effluat eine Minute lang gesammelt und anschließend gewogen.

2.4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad V7.01. Bei einer Power von 0,8 und einer zweiseitigen Standardabweichung von 15 % wurde eine Gruppengröße von $n=7$ berechnet, um eine Infarktgrößenveränderung von 25 % zu detektieren. Für die Analyse der hämodynamischen Variablen erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und ein Tukey-Post-hoc-Test. Die Infarktgrößen wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test analysiert. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angesehen. Alle Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der Tiere

Es wurden keine Unterschiede zwischen und innerhalb aller Gruppen dieser Studie bezüglich des Körpergewichts, des Nass- und Trockenherzgewichts festgestellt (Tabelle 8) (1).

Tabelle 8: Körper- und Herzgewicht

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über das Körpergewicht, das Herznass- und trocken-gewicht. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD; 5HD = 5-Hydroxydecanoat; PC = Präkonditionierung; PoC = Postkonditionierung. Modifiziert nach (1).

Gruppe	Körpergewicht	Herznassgewicht	Herztrockengewicht
Kontrolle	292g \pm 11g	1,15g \pm 0,5g	0,11g \pm 0,01g
Mannitol PC	295g \pm 22g	1,16g \pm 0,19g	0,12g \pm 0,02g
Mannitol+5HD PC	297g \pm 14g	1,25g \pm 0,10g	0,11g \pm 0,01g
5HD PC	297g \pm 12g	1,18g \pm 0,09g	0,10g \pm 0,02g
Mannitol PoC	290g \pm 14g	1,17g \pm 0,17g	0,10g \pm 0,01g
Mannitol+5HD PoC	302g \pm 20g	1,16g \pm 0,11g	0,09g \pm 0,01g
5HD PoC	288g \pm 10g	1,12 \pm 0,07g	0,11g \pm 0,01g

3.2 Infarktgrößen

Alle Infarktgrößen werden in Abb. 8 dargestellt. Die Kontrollherzen zeigten eine Infarktgröße von $57 \pm 9\%$ des linken Ventrikels. Sowohl die Prä- als auch die Postkonditionierung mit Mannitol verringerten die Infarktgröße signifikant auf $31 \pm 4\%$ (Mannitol PC, $P < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe). Der mKATP-Kanalblocker 5HD hob den kardioprotektiven Effekt von Mannitol-induzierter Prä- (Mannitol + 5HD PC: $59 \pm 8\%$, $P < 0,05$ gegenüber Mannitol PC) und Postkonditionierung (Mannitol + 5HD PoC: $59 \pm 10\%$, $P < 0,05$ gegenüber Mannitol PoC) vollständig auf. Der Kanalblocker selbst hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (5HD PC: $60 \pm 14\%$, nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe und 5HD PoC: $54 \pm 14\%$, nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe) (1).

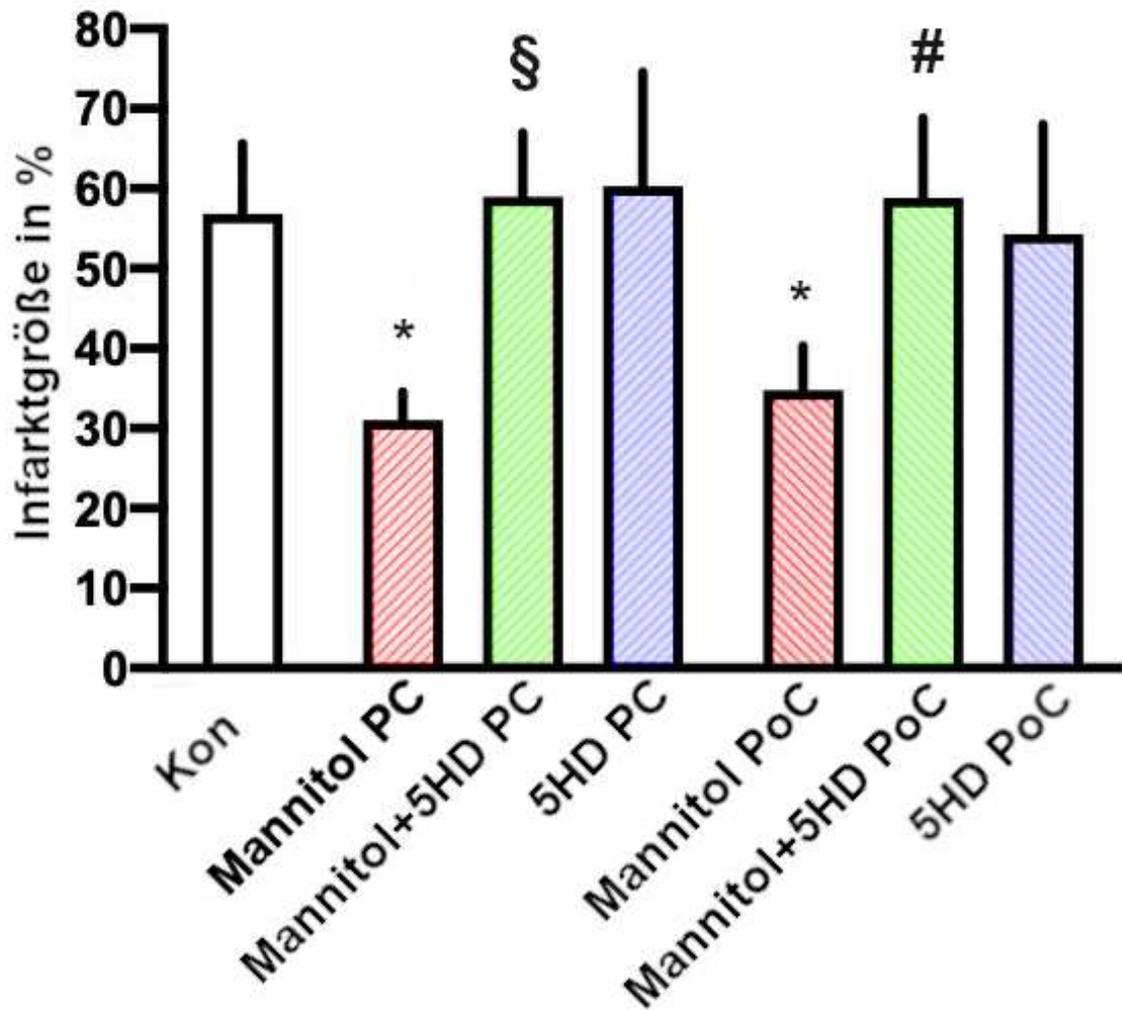


Abb. 8: Infarktgrößen

Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Infarktgröße in Prozent, während auf der x-Achse, die 7 verschiedenen Gruppen aufgetragen sind. Kon = Kontrolle, 5HD = 5-hydroxydecanoate, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. * = $P < 0,05$ gegenüber Kontrolle, § = $P < 0,05$ gegenüber Mannitol PC, # = $P < 0,05$ gegenüber Mannitol PoC. Modifiziert nach (1).

3.3 Kardiale Funktion

Hämodynamische Variablen werden in Tabelle 9 dargestellt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen in der jeweiligen Zeitmessung festgestellt. Die Herzfrequenz sank leicht vom Ausgangswert bis zum Ende der Reperfusionphase, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede innerhalb oder zwischen den Gruppen gemessen. Sowohl der linksventrikuläre Druck als auch der koronare Durchfluss nahm innerhalb jeder Gruppe der Studie während der Reperfusionphase signifikant ab im Vergleich zu den Ausgangswerten (1). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 9: Hämodynamische Variablen

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Hämodynamischen Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung, Rep = Reperfusion, 5-HD = 5-hydroxydecanoate, * = $p < 0,05$ gegenüber Baseline. Modifiziert nach (1).

	Baseline	PC	Rep 30	Rep 60
Herzfrequenz				
Kontrolle	318 \pm 40	318 \pm 51	338 \pm 75	277 \pm 62
Mannitol PC	293 \pm 20	284 \pm 22	273 \pm 56	233 \pm 60
Mannitol+5-HD PC	300 \pm 40	292 \pm 35	291 \pm 58	263 \pm 69
5-HD PC	314 \pm 46	329 \pm 52	275 \pm 46	227 \pm 57
Mannitol PoC	312 \pm 38	306 \pm 21	253 \pm 51	266 \pm 17
Mannitol+5-HD PoC	301 \pm 49	289 \pm 45	288 \pm 63	270 \pm 67
5-HD PoC	297 \pm 30	288 \pm 18	286 \pm 29	242 \pm 37
Linksventrikulärer entwickelter Druck				
Kontrolle	118 \pm 24	122 \pm 22	12 \pm 6*	24 \pm 9*
Mannitol PC	114 \pm 9	111 \pm 23	21 \pm 14*	33 \pm 12*
Mannitol+5-HD PC	112 \pm 12	117 \pm 9	21 \pm 13*	29 \pm 14*
5-HD-PC	114 \pm 10	121 \pm 16	14 \pm 9*	22 \pm 9*
Mannitol PoC	106 \pm 11	119 \pm 16	27 \pm 14*	32 \pm 10*
Mannitol+5-HD PoC	135 \pm 15	145 \pm 15	18 \pm 13*	25 \pm 19*
5-HD PoC	123 \pm 21	133 \pm 16	22 \pm 13*	36 \pm 14*
Koronarer Durchfluss				
Kontrolle	14 \pm 2	14 \pm 2	8 \pm 1*	8 \pm 2*
Mannitol PC	14 \pm 2	14 \pm 4	8 \pm 1*	7 \pm 1*
Mannitol+5-HD PC	14 \pm 3	15 \pm 3	9 \pm 3*	9 \pm 3*

Ergebnisse

5-HD PC	13 ± 2	15 ± 1	$6 \pm 2^*$	$6 \pm 2^*$
Mannitol PoC	14 ± 3	14 ± 3	$8 \pm 2^*$	$7 \pm 1^*$
Mannitol+5-HD PoC	14 ± 2	14 ± 2	$7 \pm 2^*$	$7 \pm 2^*$
5-HD PoC	14 ± 3	13 ± 3	$7 \pm 2^*$	$6 \pm 2^*$

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Mannitol-induzierte Kardioprotektion

Unser experimenteller Versuch zeigt den infarktgrößenreduzierenden Effekt von Mannitol und einen zuvor unbekanntem zugrunde liegenden Mechanismus. In der hier durchgeführten Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Mannitol über einen klassischen Prä- und Postkonditionierungsstimulus und mittels Aktivierung der mKATP Kanäle eine Kardioprotektion bewirkt.

Die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol wurden über mehrere Jahre in verschiedenen Tierarten und experimentellen Aufbauten untersucht. Diese wurden meist seinen hyperosmolaren Eigenschaften oder möglichen radikalfangenden Merkmalen zugeschrieben (65, 66, 79). Magovern *et al.* (66) zeigten, dass eine Reperfusion mit Mannitol zu einem verbesserten Druckaufbau, einem erhöhten Koronarfluss und einem geringeren myokardialen Ödem auf Grund seiner osmotherapeutischen Effekte führte. Studien darüber, wie die Hyperosmolarität die kardiale Funktion beeinflusst, sind jedoch nicht eindeutig. Die intrakoronare Verabreichung von Mannitol in verschiedenen *in vivo* Experimenten verbesserte beispielsweise nicht die Resistenz des Herzens gegen I/R-Schäden (80, 81). Daher lässt sich die kardioprotektive Wirkung von Mannitol nicht nur durch seine hyperosmolaren Eigenschaften erklären.

Neben verschiedenen bekannten Signalwegen wurde oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies als eine Schlüsselrolle bei I/R-Schäden diskutiert. Ouriel *et al.* (79) zeigten, dass Mannitol nicht nur durch seine Hyperosmolarität, sondern vielmehr durch seine Funktion als Radikalfänger kardioprotektiv wirksam ist. Während geringe Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sich positiv auf das Infarktareal nach einer Ischämie auswirken, sind größere Mengen freier Radikale für den Untergang der Herzmuskelzellen mitverantwortlich (12, 30, 67). Ausschlaggebend hierfür ist die mPTP. Große Mengen oxidativen Stresses und damit freier Sauerstoffradikale führen zu einer langanhaltenden Öffnung dieser mPTP. Eine verlängerte Öffnung der mPTP führt zu

Diskussion

einer mitochondrialen Schwellung, Freisetzung proapoptotischer Faktoren und letztendlich zum Zelltod (82). Daher ist die Hemmung der mPTP-Öffnung ein entscheidender Schritt bei der Myokardprotektion (15, 83). Geringere Mengen von ROS hingegen wirken als sekundärer Botenstoff und aktivieren eine Signalkaskade, die kardioprotektiv wirkt (67). Da Mannitol als wirksamer freier Radikalfänger bekannt ist, wurde angenommen, dass die Substanz ihre organprotektiven Eigenschaften über die Regulierung des ROS-Niveaus während Ischämie und Reperfusion vermitteln könnte.

Eine *ex vivo* Studie von Pastukh *et al.* (84) widerspricht jedoch der Theorie, dass Mannitol als Radikalfänger kardioprotektiv sei. In isolierten Kardiomyozyten zeigte die Vorbehandlung mit Mannitol keine Auswirkung auf die Bildung von freien Radikalen während einer Hypoxie. Dennoch führte die Hyperosmolarität durch Mannitol zur Aktivierung des PI3K/ PKB-Signalwegs, was zur Kardioprotektion beitrug (84). Dieser Signalweg ist maßgeblich an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, welche das Wachstum, die Proliferation und den Stoffwechsel der Zellen regulieren. Seine Aktivierung wird durch einen komplexen Prozess mehrstufig kontrolliert (85).

Gardner *et al.* (64) unterstrichen diese Ergebnisse, indem sie den Effekt von Mannitol auf das Sauerstoffparadoxon in einer *in vitro* Studie untersuchten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mannitol die durch Reoxygenierung induzierte Freisetzung von kardialen Biomarkern eher durch osmotische Aktivität reduzierte als aufgrund seiner radikalfangenden Eigenschaften. Daher fehlte bisher eine klare Übereinstimmung über die zugrundeliegenden Mechanismen der durch Mannitol induzierten Myokardprotektion. Darüber hinaus wurden in den Studien zu Mannitol und Kardioprotektion unterschiedliche Konditionierungsstrategien, Zeit oder Dauer der Anwendung sowie unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Diese Variationen und die uneinheitlichen Ergebnisse zugrundeliegender Mechanismen waren die Grundlage der durchgeführten Studie.

Die entsprechende Mannitol-Konzentration von 11 mmol/L, die in dieser Studie verwendet wurde, ermittelten Torregroza *et al.* in einer vorherigen Studie (77). In einem vorläufigen experimentellen Protokoll wurde der Einfluss von Hyperglykämie auf die Kardioprotektion durch Dexmedetomidin untersucht. Um vergleichbare Osmolarität in

Diskussion

allen Experimenten zu gewährleisten, wurden normoglykämische Gruppen mit Mannitol behandelt, welches die gleichen osmolaren Bedingungen zu Hyperglykämie erreichte, ohne die Glukosespiegel zu beeinflussen. Interessanterweise zeigten ihre Ergebnisse, dass 11 mmol/L Mannitol selbst einen starken kardioprotektiven Effekt hatte, der die Infarktgröße signifikant reduzierte. Zálešák *et al.* (62) zeigten ähnliche Ergebnisse wie die oben genannte Studie mit einer vergleichbaren Konzentration. Die in unserer *in vitro* Studie verwendete Mannitol-Konzentration entspricht etwa 1 g/kg Körpergewicht, welches genau mit der routinemäßig verwendeten klinischen Dosierung übereinstimmt.

In Bezug auf den klinischen Alltag stellt Mannitol einen vielversprechenden Konditionierungsansatz dar. Insbesondere bei kardiochirurgischen Patienten erscheinen auf unsere Arbeit aufbauende klinische Studien zu Mannitol erfolgsversprechend. Grundlage solcher klinischen Studien ist das Verständnis zugrundeliegender Mechanismen der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Ferreira, R. *et al.* (86) beobachteten bereits 1989, dass Mannitol in kardioplegischen Lösungen bei CABG-Operationen das Risiko für Herzrhythmusstörungen in den ersten 24 Stunden deutlich reduziert. Hierzu wurden zwei Gruppen untersucht. Die Kontrollgruppe erhielt die gängige kardioplegische Lösung, während der Lösung in der Versuchsgruppe 59,8 mmol/L Mannitol hinzugefügt wurde. In den ersten 24 Stunden traten in der Mannitol Gruppe deutlich weniger Herzrhythmusstörungen auf und ein Vorhofflimmern wurde bei keinem Patienten in der Gruppe verzeichnet. Ferreira, R. *et al.* (86) gingen jedoch davon aus, dass diese Wirkung hauptsächlich durch die Reduktion der freien Radikale hervorgerufen wurde.

In einer weiteren klinischen Studie von Larsen, M. *et al.* (63) wurde Mannitol in unterschiedlichen Konzentrationen antegrad in die Aortenwurzel von 33 Patienten verabreicht. Unmittelbar danach erhielten die Patienten eine primäre CABG-Operation. Statistisch zeigen die Ergebnisse jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und den unterschiedlichen Konzentrationen. Die Ergebnisse konnten nicht zeigen, dass eine höhere Konzentration von Mannitol in der Kardioplegie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Produktion von Malondialdehyd reduziert. Malondialdehyd ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation und verursacht zelluläre

Diskussion

Schäden und Störungen der Zellmembranen. Hieran könnten weitere klinische Studien anknüpfen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Mannitol-induzierten Kardioprotektion konnten zwischenzeitlich durch eine Folgestudie von Torregroza et al. (87) weiter herausgearbeitet werden. In der Studie mit dem gleichen experimentellen Aufbau und der gleichen Mannitol-Konzentration konnte gezeigt werden, dass die kardioprotektive Wirkung von Mannitol über die Aktivierung von Adenosin-1-Rezeptoren (A1R) vermittelt wird. Interessanterweise haben die Protein Kinase B (PKB) und Protein Kinase G (PKG), welche Mediatoren des RISK Signalweges sind, keinen Einfluss auf die Verringerung des Infarktausmaßes durch Mannitol. Diese Erkenntnisse zeigen, dass zusätzliche Forschung erforderlich ist, um die intrazellulären Mechanismen zu entschlüsseln, die der Aktivierung von mKATP-Kanälen durch Mannitol vorausgehen. Es sind weitere Studien erforderlich, um einen potenziellen Zusammenhang zwischen A1R, PKC und der Aktivierung von mKATP Kanälen im Rahmen der von Mannitol ausgelösten Präkonditionierung zu analysieren.

4.1.2 mKATP-Kanal

Verschiedene intrazelluläre Signalwege sind bekanntermaßen von entscheidender Bedeutung für die Kardioprotektion und es wird angenommen, dass mehrere Mediatoren konvergieren und die Mitochondrien regulieren, die letztendlich Schutz gegen myokardiale I/R-Schäden bieten (31, 67, 83). Neben den verschiedenen intrazellulären Mediatoren wurden die mKATP-Kanäle als ein integraler Bestandteil in der kardialen Konditionierung durch verschiedene ischämische und pharmakologische Reize identifiziert (38, 41, 50, 69). Diese Kanäle sind eng mit der Modulation der mitochondrialen Funktion verbunden, insbesondere im Hinblick auf den energetischen Status, den Elektrolyteinstrom und damit das Membranpotenzial. Die Aktivierung dieser mKATP-Kanäle führt allgemein zu einer Hemmung der mPTP. Eine verlängerte Öffnung der mPTP führt zur mitochondrialen Schwellung, Freisetzung proapoptotischer Faktoren und letztlich zum Zelltod nach I/R-Schäden. Daher ist die Hemmung der mPTP-Öffnung ein Schlüsselschritt im myokardialen Schutz (88).

Diskussion

Im zweiten Teil unserer Arbeit zeigten wir erstmals, dass die mKATP-Kanäle an der kardioprotektiven Wirkung von Mannitol beteiligt sind. McCully *et al.* (52) zeigten, dass die Aktivierung dieser mitochondrialen ATP sensiblen Kanäle bei einer Ischämie einen protektiven Effekt hat. Der Einsatz von 5HD, also die selektive Blockade der mKATP-Kanäle, führt dazu, dass die Infarktgrößenreduktion durch eine Präkonditionierung mit einem mKATP-Kanal Aktivator aufgehoben wird (49, 51, 52). Es wurde bereits herausgefunden, dass 100 μ M 5HD, wie in unseren Experimenten verwendet, zu einer vollständigen Blockade des mKATP-Kanals führt (43). Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass mKATP-Kanäle an der kardioprotektiven Wirkung von Mannitol beteiligt sind, da der mKATP-Kanalinhibitor 5HD die Reduktion der Infarktgröße durch Mannitol vollständig aufheben konnte. Allein hatte 5HD jedoch keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Dies zeigt, dass Mannitol eine Wirkung an den mKATP-Kanälen hat und die Kardioprotektion über die Mannitol-induzierte Aktivierung dieser Kanäle entsteht.

4.1.3 Hämodynamik

In unserer Studie zeigte sich, dass die HF, der LVP sowie der Koronarfluss zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den einzelnen Gruppen variieren. Der LVP sowie der Koronarfluss waren in allen Gruppen nach der Reperfusion erniedrigt. Die HF zeigte keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Ischämie. Deshalb lässt sich vermuten, dass Mannitol in kardioprotektiver Dosierung zumindest kurzfristig weder negative noch positive Auswirkungen auf die kardiale Funktion hat. Die Abnahme des LVP über alle Gruppen entsteht durch die postischämische kontraktile Dysfunktion. Dies deutet darauf hin, dass die antiischämische Therapie mit Mannitol in den Konzentrationen von 1 g/kg Körpergewicht keinen wesentlichen Einfluss auf die kontraktile Dysfunktion hat, aber das Myokard vor dem Zelltod schützt. Eine mögliche Erklärung für die isolierte Verbesserung der Infarktgröße, jedoch nicht der hämodynamischen Parameter, könnte das sogenannte *myocardial stunning* sein. Dies beschreibt den Zustand des Myokards, bei dem es nach vorübergehender Ischämie zu einer reversiblen kontraktilen Dysfunktion kommt (89). Während unserer Studie fiel der LVP während der Ischämie auf 0 mmHg und erholte sich während der Reperfusion nur langsam, erreichte jedoch nicht mehr sein Ausgangsniveau. Eine umfassendere Beobachtung der linksventrikulären Funktion hätte eine erheblich längere

Diskussion

Reperfusionphase erfordert, da das *myocardial stunning* mehrere Tage anhalten kann. In diesem Zusammenhang zeigten Ferrera *et al.* (90), dass eine Verlängerung der Reperfusion von 60 auf 120 Minuten weder zu einer Verbesserung der Hämodynamik führt, noch die Infarktgröße als primären Endpunkt durch eine längere Reperfusion beeinflusst wird. Um einen potenziellen Einfluss von Mannitol auf die kontraktile Dysfunktion zu untersuchen, würde sich am besten ein *in vivo* I/R-Modell eignen. Da die Infarktgrößenbestimmung weiterhin den Goldstandard bei experimentellen Untersuchungen zu Kardioprotektion darstellt, wurde dies als primärer Endpunkt der Studie gewählt (91).

4.2 Diskussion des Versuchsaufbaus

4.2.1 Langendorff-Versuch

Die Langendorff-Anlage ist ein etabliertes Modell zur experimentellen Forschung im Bereich der Kardioprotektion. Die leichte und kostengünstige Handhabung ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit aussagekräftiger Ergebnisse. Zudem können neben der Infarktgrößenreduktion eine Vielzahl an hämodynamischen Parametern gemessen werden (62). Durch die Perfusion eines isolierten, denervierten Herzen werden systemische Einflussfaktoren ausgeschlossen. Dies kann sowohl als Vorteil, aber auch als Nachteil gesehen werden. Zum einen schafft dies gleiche Bedingungen und es macht die Unterscheidung von peripheren und kardialen Reaktionen möglich, zum anderen ist die Übertragung *in vivo* erschwert. Eine Kompensation dieser peripheren Faktoren, beispielsweise durch die Zugabe von Katecholaminen oder anderen Neurotransmittern in die entsprechende Perfusionslösung, ist jedoch möglich (92, 93). Versuche an isolierten Herzen verhindern die unkontrollierte Freisetzung von Medikamenten nach der Einlagerung im Gewebe und die Studienmedikamente können genau appliziert werden. Dies führt zu einheitlichen und somit vergleichbaren Studienergebnissen (93).

Neben den vielen Vorteilen der Langendorff-Anlage bringt das experimentelle Setting einige Limitationen mit und ist anfällig für äußere Einflüsse. Die Herzen müssen zügig präpariert und entnommen werden. Vom Zeitpunkt der Dekapitation bis zur Perfusion des isolierten Herzens sollten maximal 3 Minuten vergehen, da man ansonsten eine ischämische Präkonditionierung, welche die Infarktgröße beeinflusst, nicht ausschließen kann (94). Die Fähigkeiten des Präparateurs und seine Schnelligkeit sind hier maßgeblich. Da das Herz retrograd über die Aorta perfundiert wird, muss beim Fixieren der Aorta darauf geachtet werden, dass die Aortenklappe nicht durchstoßen wird, da bei einem Defekt der Aortenklappe eine retrograde Perfusion nicht mehr möglich wäre. Auch die Manipulation am Herzen sollte möglichst geringgehalten werden, lässt sich jedoch nicht immer vermeiden. Das Einbringen des Messballons in den linken Ventrikel ist beispielsweise eine nicht vermeidbare Manipulation am Herzen. Sie führt möglicherweise zu einer Endothelreizung und kann damit die linksventrikuläre Funktion verschlechtern.

Diskussion

Darüber hinaus ist die gesamte Anlage an sich sehr empfindlich und muss täglich sorgfältig geeicht werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Während eines Versuchs können bereits minimale äußere Einflüsse, wie beispielsweise ein Luftzug oder Temperaturschwankungen, die Herzfunktion beeinflussen und so das Ergebnis verfälschen. Eine gleichbleibende Temperatur ist von großer Bedeutung, weshalb das Herz von einem Wärmeschild umgeben und ein gut regulierter Wasserkreislauf in der Anlage verbaut sein muss. Allgemein kann eine Hypothermie eher toleriert werden als eine Hyperthermie. Doch sollte die Temperatur nach Möglichkeit konstant nahe der normalen Körpertemperatur der Wistar Ratten gehalten werden (75, 93). Auch muss immer akribisch darauf geachtet werden, dass die Anlage luftleer ist und dass sie regelmäßig gereinigt wird. Bereits marginale Mengen Luft können zu einer Luftembolie führen, weshalb der Versuch abgebrochen werden muss, da das Herz hierdurch beeinträchtigt wird. Insgesamt ist ein an der Langendorff-Anlage schlagendes Herz sehr empfindlich und anfällig für Störfaktoren.

4.2.2 Globale Ischämie

Im Rahmen der Untersuchungen an der Langendorff-Anlage gibt es sowohl die Möglichkeit der globalen Ischämie als auch einer regionalen Ischämie. Bei unserer Studie entschieden wir uns dafür, das Herz einer globalen Ischämie zu unterziehen. Diese lässt sich mit einem Herzstillstand bei einer CABG-Operation vergleichen. Eine globale Ischämie erreichten wir durch den Verschluss des Metalldreivegehahns, über den das Herz unmittelbar perfundiert wurde. Außerdem wurde das Wärmeschild mit Stickstoff begastem KHP gefüllt. Der globalen Ischämie gegenüber steht die regionale Ischämie, die durch eine Ligatur einer Koronararterie induziert werden kann. Die Größe der ischämischen Zone kann durch Veränderung der Position des Okklusionspunktes beeinflusst werden (75, 95). Die Reperfusion wird durch die Entfernung der Ligatur erzeugt (95). Jedoch ist es bei dieser Methode von Nachteil, dass das Ausmaß der Ischämien stark variiert kann und abhängig von der Lokalisation der Ligatur ist, weshalb die erzeugten Ischämien nicht unbedingt gleichwertig sind. Ein Vorteil dieser Methode ist jedoch, dass sie mit einer KHK oder einem Myokardinfarkt vergleichbarer ist, da diese Pathologien ebenfalls eine regionale Ischämie erzeugen. Da in der vorliegenden Studie die Infarktgröße und ein der Kardioprotektion zu Grunde liegender

Diskussion

Mechanismus untersucht wurden, eignete sich die Methode der globalen Ischämie besser. Sie ist deutlich praktikabler und einfacher in der Umsetzung.

4.2.3 Krebs-Henseleit-Puffer

Bei der Durchführung experimenteller Studien an isoliert perfundierten Herzen an der Langendorff-Apparatur wird heutzutage meist die modifizierte Pufferlösung nach Krebs und Henseleit verwendet. Diese Perfusionslösung soll die wesentlichen ionischen Inhalte von Blut oder Plasma nachahmen und weist klassischerweise folgende Zusammensetzung auf: NaCl 118,5 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Glukose 11,0 mM und CaCl₂ 2,5 mM (75, 93). Bei der Entwicklung dieser physiologischen Lösung wurde nicht berücksichtigt, dass ein Großteil des Calciums im Blut an Proteine gebunden ist und daher die tatsächliche Konzentration von ionisiertem Calcium im Blutplasma annähernd nur halb so hoch ist wie der empfohlene Wert von 2,5 mM. Deshalb wurde die ionisierte Calciumkonzentrationen weiter angepasst und liegt bei modifizierten KHP im Bereich von 1,2 bis 1,8 mM (93). Die Glukose dient dem mit KHP perfundiertem Herzen als einziger Energielieferant und kann deshalb einen diabetischen Metabolismus verursachen (96). Um diesem Vorgang entgegenzuwirken können verschiedene Substanzen wie beispielsweise Fettsäuren, Pyruvate und Insulin zugesetzt werden (75, 97, 98).

Da der KHP keine sauerstofftransportierenden Teilchen, wie Erythrozyten, enthält (99), ist seine Sauerstofftransportkapazität weitaus geringer als die von Vollblut. Um den Sauerstofftransport trotzdem zu jeder Zeit zu gewährleisten, wurde der KHP kontinuierlich mit Carbogen begast. Die ausreichende Begasung des Puffers wurde vor jedem Versuch mit einer BGA kontrolliert.

Ein weiterer Unterschied zum Blutplasma ist, dass der KHP keine Eiweiße enthält, wodurch sein kolloidosmotischer Druck und seine Viskosität niedriger sind (75). Dies führt zu einer erhöhten Flussgeschwindigkeit durch einen geringeren Widerstand (100, 101) und der Bildung von myokardialen Ödemen (102). Die Zugabe von Fettsäuren könnte dem entgegenwirken. Da jedoch die zusätzliche Gabe von Fettsäuren bei mit Carbogen begastem KHP zu Fettembolien führen kann (96), wurde bei dieser Arbeit darauf verzichtet. Die Versuchsdauer sollte zwei Stunden nicht überschreiten, um zu

Diskussion

verhindern, dass myokardiale Ödeme und erhöhter Koronarfluss die Herzfunktion beeinflussen. Bei längeren Versuchen sollte daher eine Echtblutlösung bevorzugt werden. Die Gewinnung, Aufbereitung und Wiederverwendung der Echtblutlösung sind jedoch wesentlich zeit- und kostenintensiver sowie störungsanfälliger als die Nutzung von KHP (76). Auch die Hämolyse der roten Blutkörperchen, die durch mechanische Zerstörung beim Durchgang des Blutes durch die peristaltische Pumpe verursacht wird, ist ein entscheidender Nachteil bei der Verwendung von Vollblutlösungen (101).

4.2.4 Pentobarbital

Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Infarktgröße an der Langendorff-Anlage sind die eingesetzten Sedativa und das Stresslevel der Wistar Ratten zum Zeitpunkt der Dekapitation. Pentobarbital, wie in unserer Studie verwendet, ist das verbreitetste Betäubungsmittel, wirkt jedoch herabsetzend auf das Herz-Kreislauf-System und die Atmung, was den Gehalt an energiereichen Phosphaten in den Zellen senken kann (93). Trotz dieser potenziellen Nebenwirkungen ist das Medikament aufgrund seiner funktionellen Hemmung der *Formatio reticularis* und damit tiefen Sedierung weiterhin das gängige Euthanasiemittel in der experimentellen Forschung. In einer Vielzahl von Vorstudien zu Kardioprotektion konnte gezeigt werden, dass Pentobarbital selbst keinen Einfluss auf die Infarktgröße hat (103). Ungeachtet der gewählten Methode ist es von großer Bedeutung, Stress bei den Versuchstieren vor Beginn der Betäubung zu vermeiden, da es durch eine Stressreaktion zu Ausschüttung endogener Katecholamine kommen kann. Die Anästhesie sollte möglichst schnell eingeleitet werden und eine vollständige Ausschaltung der Schmerzempfindung gewährleisten (93).

4.3 Limitationen

Wie bei allen experimentellen Studien, müssen auch hier einige wichtige Limitationen betrachtet werden. Die Wahl des isoliert perfundierten Herzen ermöglicht zwar eine Untersuchung unabhängig von systemischen Faktoren und bietet damit wichtige Erkenntnis in der Grundlagenforschung, die Übertragbarkeit auf den Patienten ist jedoch nur sehr eingeschränkt möglich. Eine wesentliche Einschränkung, die zu beachten ist, besteht darin, dass die Untersuchungen an gesunden Herzen durchgeführt wurden, die weder Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes noch andere pathologische Zustände aufwiesen, die häufig mit Herzkrankheiten einhergehen (75). Es wurden lediglich junge, gesunde und männliche Wistar-Ratten verwendet. Dies spiegelt nicht den Durchschnitt der Gesellschaft wider und berücksichtigt keinerlei Komorbiditäten. Endogene Faktoren wie Hormone wurden ebenfalls nicht mit einbezogen. Außerdem erzeugen kardiologische Erkrankungen wie KHK meist eine regionale Ischämie, während die von uns untersuchten Herzen eine globale Ischämie durchliefen. Sie wurden in einer sehr vereinfachten Form in eine Ischämie versetzt und die Ergebnisse lassen sich deshalb nicht einfach *in vivo* übertragen.

Trotz dieser Limitierungen ist die experimentelle Arbeit an der Langendorff-Anlage sehr aufschlussreich für die Forschung. Unsere erzielten Ergebnisse sind eindeutig und es wurde mit größtmöglicher Sorgfalt gearbeitet, um etwaige Störfaktoren auszuschalten. Die erzielten Ergebnisse können daher als valide Grundlage für translationale Studien angenommen werden.

4.4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Mannitol als ein Prä- und Postkonditionierungsstimulus eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nach I/R Schaden bewirkt. Darüber hinaus wurde die Aktivierung der mKATP-Kanäle als zugrundeliegender Mechanismen der Mannitol-induzierten Kardioprotektion herausgearbeitet. Durch die Ergebnisse dieser Studie wurden die bisher bekannten Eigenschaften von Mannitol als Osmodiuretikum und Radikalfänger erweitert und somit ein tieferes Verständnis der Konditionierung mit Mannitol erzielt. Die kardioprotektive Wirkung wurde in dieser *in vitro* Arbeit durch eine Mannitol-Konzentration erreicht, welche in etwa 1 g/kg Körpergewicht und damit der routinemäßigen klinischen Dosierung entspricht.

Da Mannitol sich bereits vielseitig als Osmodiuretikum klinisch bewährt hat, könnten auf Grundlage dieser experimentellen Studie klinische Untersuchungen zur der kardioprotektiven Wirkung von Mannitol durchgeführt werden. Da der akute Myokardinfarkt ein unvorhersehbares Ereignis darstellt, erscheint vor allem die Mannitol-induzierte Postkonditionierung als vielversprechender Ansatz für die pharmakologische Kardioprotektion im klinischen Alltag.

5 Literaturverzeichnis

1. Feige K, Rubbert J, Raupach A, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, et al. Cardioprotective Properties of Mannitol—Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2395.
2. WHO GHE. The top 10 causes of death 2019 [cited 2021 16.03.2021]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
3. Radtke R. Veränderung der Todesfälle aufgrund von Herzinfarkten nach Alter und Geschlecht 2021 *statista.com2023* [Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/521812/umfrage/todesfaelle-aufgrund-von-herzinfarkten-nach-altersgruppe-und-geschlecht/>].
4. Fleck E, Heinemann M, Meinertz T, Bestehorn K, Pott A, Rohjans M. Deutscher Herzbericht. Deutsche Herzstiftung; 2022.
5. Larsen R. Akutes Koronarsyndrom (ACS) und akuter Myokardinfarkt: Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 2016 Jun 14:680-90. doi: 10.1007/978-3-662-50444-4_50.
6. Herold G. *Innere Medizin* 2023/2022.
7. Paulussen F, Hübner G, Grebe D, Bretschneider HJ. [The fine structure of the myocardium during ischemia with depression of the energy requirement by special cardioplegia]. *Klin Wochenschr*. 1968;46(4):165-71.
8. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7018393.
9. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100.
10. Torregroza C, Roth S, Feige K, Lurati Buse G, Hollmann MW, Huhn R. [Perioperative cardioprotection - From bench to bedside : Current experimental evidence and possible reasons for the limited translation into the clinical setting]. *Anaesthesist*. 2021;70(5):401-12.
11. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
12. Torregroza C, Raupach A, Feige K, Weber NC, Hollmann MW, Huhn R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth Analg*. 2020;131(6):1765-80.
13. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
14. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.
15. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(6):70.
16. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(11):1121-35.
17. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342(8866):276-7.

18. Prata MP, Jaldin RG, Lourenção P, Sobreira ML, Yoshida RA, Terra SA, et al. Acute aortic wall injury caused by aortic cross-clamping: morphological and biomechanical study of the aorta in a swine model of three aortic surgery approaches. *J Vasc Bras.* 2020;19:e20190025.
19. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology.* 1997;87(5):1182-90.
20. Raupach A, Reinle J, Stroethoff M, Mathes A, Heinen A, Hollmann MW, et al. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J Clin Med.* 2019;8(4).
21. Stroethoff M, Christoph I, Behmenburg F, Raupach A, Bunte S, Senpolat S, et al. Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018;72(2):106-11.
22. Caricati-Neto A, Errante PR, Menezes-Rodrigues FS. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16).
23. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology.* 1997;86(3):699-709.
24. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84(1):350-6.
25. Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270(2):681-9.
26. Raupach A, Karakurt E, Torregroza C, Bunte S, Feige K, Stroethoff M, et al. Dexmedetomidine Provides Cardioprotection During Early or Late Reperfusion Mediated by Different Mitochondrial K⁺-Channels. *Anesth Analg.* 2021;132(1):253-60.
27. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 2):H2157-61.
28. Yang XM, Cui L, Alhammouri A, Downey JM, Cohen MV. Triple therapy greatly increases myocardial salvage during ischemia/reperfusion in the in situ rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(5):403-12.
29. Li HY. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: A drug with antidiabetic and cardioprotective properties. *J Diabetes Investig.* 2021;12(3):310-2.
30. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015;116(4):674-99.
31. Boengler K, Lochnit G, Schulz R. Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(5):H1215-h31.
32. Schulz R, Post H, Vahlhaus C, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation.* 1998;98(10):1022-9.
33. Preckel B, Schlack W, Comfère T, Obal D, Barthel H, Thämer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth.* 1998;81(6):905-12.
34. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(2):69-75.

35. Rosenberg JH, Werner JH, Moulton MJ, Agrawal DK. Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018;11(4):292-307.
36. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(1):32-40.
37. Hadebe N, Cour M, Lecour S. The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res Cardiol.* 2018;113(2):9.
38. Smith CO, Nehrke K, Brookes PS. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. *Biochem J.* 2017;474(12):2067-94.
39. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(6):821-31.
40. Zhang RY, Jin HF, Tang CS, Du JB. [ATP-sensitive potassium channel and its cardiovascular protection effects]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009;41(2):245-8.
41. Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(1):7-16.
42. Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(3):H921-30.
43. Paggio A, Checchetto V, Campo A, Menabò R, Di Marco G, Di Lisa F, et al. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature.* 2019;572(7771):609-13.
44. Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ, Brookes PS. Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1309-15.
45. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem.* 2018;552:50-9.
46. Gross GJ, Auchampach JA. Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res.* 1992;26(11):1011-6.
47. Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, Mrochek A, Whittle J, Ackland GL, et al. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(1):452.
48. Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1606(1-3):1-21.
49. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res.* 1992;26(11):1054-62.
50. Vishwakarma VK, Upadhyay PK, Chaurasiya HS, Srivasatav RK, Ansari TM, Srivastava V. Mechanistic Pathways of ATP Sensitive Potassium Channels Referring to Cardio-Protective Effects and Cellular Functions. *Drug Res (Stuttg).* 2019;69(7):365-73.
51. Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marbán E. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation.* 2000;101(20):2418-23.
52. McCully JD, Levitsky S. The mitochondrial K(ATP) channel and cardioprotection. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):S667-73.

53. Poullis M. Mannitol and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;47(1):58-62.
54. O'Kane D, Baldwin GS, Bolton DM, Ischia JJ, Patel O. Preconditioning against renal ischaemia reperfusion injury: the failure to translate to the clinic. *J Nephrol.* 2019;32(4):539-47.
55. Seiffert J. Mannitol Gelbe Liste2020 [cited 2023. Available from: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Mannitol_3144#Anwendung.
56. Schilte C, Bouzat P, Millet A, Boucheix P, Pernet-Gallay K, Lemasson B, et al. Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med.* 2015;43(10):2212-8.
57. Farrokh S, Cho SM, Suarez JI. Fluids and hyperosmolar agents in neurocritical care: an update. *Curr Opin Crit Care.* 2019;25(2):105-9.
58. Witherspoon B, Ashby NE. The Use of Mannitol and Hypertonic Saline Therapies in Patients with Elevated Intracranial Pressure: A Review of the Evidence. *Nurs Clin North Am.* 2017;52(2):249-60.
59. Davis M, Lucatorto M. Mannitol revisited. *J Neurosci Nurs.* 1994;26(3):170-4.
60. Consiglio J, Cesnjevar RA, Münch F. Update Myokardprotektion. *Kardiotechnik.* 2020;1.
61. Falck G, Schjott J, Jynge P. Hyperosmotic pretreatment reduces infarct size in the rat heart. *Physiol Res.* 1999;48(5):331-40.
62. Zálešák M, Blažíček P, Pancza D, Gablovský I, Štrbák V, Ravingerová T. Hyperosmotic environment blunts effectivity of ischemic preconditioning against ischemia-reperfusion injury and improves ischemic tolerance in non-preconditioned isolated rat hearts. *Physiol Res.* 2016;65(6):1045-51.
63. Larsen M, Webb G, Kennington S, Kelleher N, Sheppard J, Kuo J, et al. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde. *Perfusion.* 2002;17(1):51-5.
64. Gardner TJ, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers DE. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery.* 1983;94(3):423-7.
65. Garcia-Dorado D, Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res.* 1993;27(9):1555-63.
66. Magovern GJ, Jr., Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation.* 1984;70(3 Pt 2):I91-5.
67. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol.* 2011;3(6):186-200.
68. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 2005;111(2):198-203.
69. Cao S, Liu Y, Wang H, Mao X, Chen J, Liu J, et al. Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ.* 2016;4:e1706.
70. Li W, Wu N, Shu W, Jia D, Jia P. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial

necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Exp Ther Med.* 2015;10(6):2197-205.

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

72. Li X, Rapedius M, Baukowitz T, Liu GX, Srivastava DK, Daut J, et al. 5-Hydroxydecanoate and coenzyme A are inhibitors of native sarcolemmal KATP channels in inside-out patches. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(3):385-91.

73. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 1895;61(6):291-332.

74. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 1897;66(7):355-400.

75. 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):113-26.

76. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiol Bohemoslov.* 1990;39(6):481-504.

77. Torregroza C, Feige K, Schneider L, Bunte S, Stroethoff M, Heinen A, et al. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J Clin Med.* 2020;9(5).

78. Rich PR, Mischis LA, Purton S, Wiskich JT. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiology Letters.* 2001;202(2):181-7.

79. Ouriel K, Ginsburg ME, Patti CS, Pearce FJ, Hicks GL. Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation.* 1985;72(3 Pt 2):li254-8.

80. Carlson RE, Aisen AM, Buda AJ. Effect of reduction in myocardial edema on myocardial blood flow and ventricular function after coronary reperfusion. *Am J Physiol.* 1992;262(3 Pt 2):H641-8.

81. Klein HH, Nebendahl K, Schubothe M, Kreuzer H. Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol.* 1985;80(3):251-9.

82. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular Research.* 2006;70(2):264-73.

83. Di Lisa F, Canton M, Menabò R, Kaludercic N, Bernardi P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007;12(3-4):249-60.

84. Pastukh V, Ricci C, Solodushko V, Mozaffari M, Schaffer SW. Contribution of the PI 3-kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning. *Mol Cell Biochem.* 2005;269(1-2):59-67.

85. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a011189.

86. Ferreira R, Burgos M, Llesuy S, Molteni L, Milei J, Flecha BG, et al. Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 1989;48(1):77-83; discussion -4.

87. Torregroza C, Glashoerster CO, Feige K, Stroethoff M, Raupach A, Heinen A, et al. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(22):12471.

88. Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(7):1316-22.
89. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66(6):1146-9.
90. Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23(4):327-31.
91. Watanabe M, Okada T. Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Methods Mol Biol*. 2018;1816:107-16.
92. Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(2):H156-67.
93. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*. 2000;41(6):613-27.
94. Minhaz U, Koide S, Shohtsu A, Fujishima M, Nakazawa H. Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic Res Cardiol*. 1995;90(5):418-23.
95. Ytrehus K. The ischemic heart--experimental models. *Pharmacol Res*. 2000;42(3):193-203.
96. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(6):940-50.
97. Belke DD, Larsen TS, Lopaschuk GD, Severson DL. Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart. *Am J Physiol*. 1999;277(4):R1210-7.
98. How OJ, Aasum E, Kunnathu S, Severson DL, Myhre ES, Larsen TS. Influence of substrate supply on cardiac efficiency, as measured by pressure-volume analysis in ex vivo mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2979-85.
99. Bing RJ. Some aspects of biochemistry of myocardial infarction. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(3):351-5.
100. Walters HL, 3rd, Digerness SB, Naftel DC, Waggoner JR, 3rd, Blackstone EH, Kirklin JW. The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24(10):1063-77.
101. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. The isolated blood-perfused rat heart: an inappropriate model for the study of ischaemia- and infarction-related ventricular fibrillation. *Br J Pharmacol*. 2002;137(7):1089-99.
102. Vogel WM, Cerel AW, Apstein CS. Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran. *J Mol Cell Cardiol*. 1986;18(12):1207-18.
103. Behmenburg F, van Caster P, Bunte S, Brandenburger T, Heinen A, Hollmann MW, et al. Impact of Anesthetic Regimen on Remote Ischemic Preconditioning in the Rat Heart In Vivo. *Anesth Analg*. 2018;126(4):1377-80.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Ischämieschadens	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des Reperfusionsschadens	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des RISK und SAFE Signalwegs.....	10
Abb. 4: LabChart.....	22
Abb. 5: Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage.....	23
Abb. 6: Versuchsgruppen	28
Abb. 7: Gefärbtes und eingescanntes Herz.....	30
Abb. 8: Infarktgrößen.....	33

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Medikamente	15
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien für den Krebs-Henseleit-Puffer	15
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien für die Färbung.....	16
Tabelle 4: Übersicht der Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 5: Allgemeine Geräte.....	17
Tabelle 6: Konzentration Krebs-Henseleit-Puffer.....	20
Tabelle 7: Geräte und Materialien der Langendorff-Apparatur.....	20
Tabelle 8: Körper- und Herzgewicht.....	32
Tabelle 9: Hämodynamische Variablen.....	34

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Pannen für die Gelegenheit, meine Dissertation in seiner Klinik für Anästhesiologie zu verfassen.

Ich danke auch meinen Betreuern, Prof. Dr. Dr. Huhn-Wientgen und Prof. Dr. Dr. Heinen, für die Themenvergabe und die wertvolle, konstruktive Betreuung.

PD Dr. Annika Raupach danke ich herzlich für die persönliche Unterstützung im Labor sowie für ihr Feedback und ihre lösungsorientierte Hilfe.

Mein aufrichtiger Dank geht an Dr. Dr. Carolin Torregróza. Ich bin dir sehr dankbar für die Geduld, die du mir stets entgegengebracht hast, sowie für die vielen Stunden, die du investiert hast, um mich bei der Erstellung meiner Dissertationsarbeit voranzubringen. Deine persönliche und direkte Betreuung im Labor schätze ich ebenfalls sehr.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Laborteam für die wertvolle Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater, der mich während dieser Zeit nicht nur finanziell unterstützt, sondern mir auch stets motivierend zur Seite gestanden hat und mir somit das Medizinstudium überhaupt ermöglicht hat. Deine Unterstützung und Ermutigung haben mir sehr viel bedeutet und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte meiner Mutter von Herzen danken für ihre unermüdliche emotionale Unterstützung während meines gesamten Studiums. Deine liebevolle Ermutigung und dein Verständnis haben mir in schwierigen Momenten Kraft gegeben und waren eine wichtige Stütze auf meinem Weg.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich von Herzen – für eure Ermunterung, euren Beistand und die vielen kleinen und großen Hilfen auf diesem Weg.

Abschließend danke ich meinem Ehemann für sein Verständnis und seine Geduld während dieser herausfordernden Zeit. Deine Unterstützung und dein einfühlsames Aushalten haben mir enorm geholfen, das Studium und diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Du hattest es nicht immer leicht mit mir.