

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

Mechanismen der Milrinon-induzierten Kardioprotektion in der Präkonditionierung

Dissertation

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

vorgelegt von
Julia Olivia Sabine Reinle

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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. Günter Niegisch

Science and everyday life cannot
and should not be separated.

-

Rosalind Franklin

(1920-1958)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Annika Raupach, **Julia Reinle**, Martin Stroethoff, Alexander Mathes, André Heinen, Markus W Hollmann, Ragnar Huhn, Sebastian Bunte (2019), *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms*. Journal of Clinical Medicine, 2019. **8**(4): p. 507.

Zusammenfassung

Das Forschungsgebiet der Kardioprotektion gewinnt aufgrund der steigenden Prävalenz der koronaren Herzerkrankungen und des daraus resultierenden Anstiegs von Myokardinfarkten zunehmend an Bedeutung. Insbesondere die ischämische und pharmakologische Konditionierung, als ein zentraler Teilbereich der kardioprotektiven Forschung, hat in präklinischen Tiermodellen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion der Infarktgröße gezeigt. Hierbei spielen auf zellulärer Ebene unter anderem der mitochondriale Calcium-sensitive Kaliumkanal (mK_{Ca}) sowie die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP) eine zentrale Rolle. In einer Vorstudie konnte für die Postkonditionierung mit dem klinisch etablierten Phosphodiesterase-3-Hemmer Milrinon (Mil) bereits ein kardioprotektiver Effekt, der durch mK_{Ca} -Kanäle vermittelt wird, nachgewiesen werden [1]. Zudem zeigte die Studie einen kardioprotektiven Effekt bei der Präkonditionierung mit Milrinon, wobei 1 μ M als die niedrigste wirksame Dosis identifiziert wurde. Ziel der vorliegenden Studie ist es, die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Milrinon-induzierten Präkonditionierung im Tiermodell zu untersuchen.

Für diese Studie wurden die Herzen von männlichen Wistar-Ratten (250-350g) in acht Gruppen (n=7-8) randomisiert und nach dem Modell des isoliert, perfundierten Herzen (Langendorff Apparatur) untersucht. Die Herzen wurden mit einem konstanten Druck von 80mmHg mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) perfundiert. Nach einer initialen Stabilisierungsphase erhielten die Herzen zunächst eine 10-minütige medikamentöse Präkonditionierung, gefolgt von einer 33-minütigen globalen Ischämie und einer 60-minütigen Reperfusionsphase. Im Anschluss erfolgte die planimetrische Auswertung der prozentualen Infarktgröße mit Hilfe einer Tetrazoliumchlorid-Färbung.

Zur Präkonditionierung wurde die Kontrollgruppe (Con) ausschließlich mit einer KHP-Lösung perfundiert. Der Gruppe Mil wurde zur Präkonditionierung 1 μ M Mil appliziert. Zusätzlich wurden spezifische Inhibitoren und Radikalfänger appliziert, um die zugrunde liegenden Mechanismen der Kardioprotektion zu untersuchen. Dazu gehörten der mK_{Ca} -Kanalinhibitor Paxilline (Pax, 1 μ M) und der Radikalfänger N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG, 1 mM), die jeweils einzeln sowie in Kombination mit Milrinon (Pax + Mil, MPG + Mil) verabreicht wurden. Darüber hinaus kam der mPTP-Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 0,2 μ M) entweder allein mit Milrinon (Mil + CsA) oder in Kombination mit Milrinon und MPG (MPG + Mil + CsA) zum Einsatz. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Einweg-ANOVA, gefolgt von einem *Tukey-Post-hoc*-Test. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant betrachtet.

Die Kontrollgruppe wies eine durchschnittliche Infarktgröße von 67 ± 6 % auf. Durch die Anwendung von Milrinon konnte die Infarktgröße signifikant auf 32 ± 6 % reduziert werden ($p < 0,05$ vs. Con). Weder Paxilline noch MPG zeigten allein einen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße (Pax: 52 ± 7 %, MPG: 58 ± 5 %; $p > 0,05$ vs. Con). In Kombination mit Milrinon hoben beide jedoch dessen kardioprotektive Wirkung auf (Pax + Mil: 54 ± 5 %, MPG + Mil: 59 ± 7 %; $p < 0,05$ vs. Mil). Hingegen führte die zusätzliche Gabe von Cyclosporin A (CsA) zu einer erneuten Reduktion der Infarktgröße (MPG + Mil + CsA: 35 ± 7 %; $p < 0,05$ vs. Con). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass der kardioprotektive Effekt der pharmakologischen Präkonditionierung mit Milrinon vermutlich über die Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Inhibition der mPTP vermittelt wird. Die genaue Rolle der ROS sowie potenzielle Zwischenschritte in der Signaltransduktion bedürfen weiterer Untersuchung in zukünftigen Studien. Darüber hinaus ist es von entscheidender Bedeutung, die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf in vivo-Modelle zu erforschen, um eine mögliche Anwendung in klinischen Studien zu ermöglichen.

Abstract

Due to the rising prevalence of coronary heart disease and myocardial infarction, the field of cardioprotection is gaining significant importance. Within this area, ischemic and pharmacological conditioning have shown promising results in reducing infarct size in preclinical animal models.

On a cellular level, key components such as the mitochondrial calcium-sensitive potassium channel (mKCa) and the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) play a crucial role. A preliminary study has already demonstrated that postconditioning with the clinically established phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone (Mil) exerts a cardioprotective effect, mediated through mKCa channels. Furthermore, the same study indicated a cardioprotective effect when using milrinone for preconditioning, with 1 μ M being identified as the lowest effective dose. Based on these findings, the present study aims to elucidate the specific cellular mechanisms underlying milrinone-mediated preconditioning in animal models.

For this study, hearts from male Wistar rats (250–350 g) were randomly assigned to one of eight groups (n=7–8) and evaluated using the isolated, perfused heart model (Langendorff apparatus). The hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer (KHP) at a constant pressure of 80 mmHg. Following a stabilization period, the hearts underwent 10 minutes of pharmacological preconditioning, followed by 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. Infarct size was subsequently assessed using a planimetric approach, with tetrazolium chloride staining.

For preconditioning, the control group (Con) was perfused solely with KHP, while the Mil group received 1 μ M milrinone (Mil). Additionally, the mKCa channel inhibitor Paxilline (Pax, 1 μ M) and the free radical scavenger N-2-mercaptopropionylglycine (MPG, 1 mM) were administered individually and in combination with Mil (Pax + Mil, MPG + Mil). Moreover, the mPTP inhibitor cyclosporine A (CsA, 0.2 μ M) was applied in combination with Mil (Mil + CsA) or with both Mil and MPG (MPG + Mil + CsA).

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with p-values less than 0.05 considered statistically significant.

In the control group, infarct sizes averaged $67 \pm 6\%$. Milrinone treatment significantly reduced infarct size to $32 \pm 6\%$ ($p < 0.05$ vs. Con). Neither Pax nor MPG alone had a significant impact on infarct size (Pax: $52 \pm 7\%$, MPG: $58 \pm 5\%$; $p > 0.05$ vs. Con). However, when combined with Mil, both Pax and MPG negated the cardioprotective effects of Milrinone (Pax + Mil: $54 \pm 5\%$, MPG + Mil: $59 \pm 7\%$; $p < 0.05$ vs. Mil). In contrast, CsA reduced infarct size when co-administered with Mil and MPG (MPG + Mil + CsA: $35 \pm 7\%$; $p < 0.05$ vs. Con).

The results of this study indicate that the cardioprotective effects of pharmacological preconditioning with milrinone are likely mediated through the activation of the mKCa channel, the generation of reactive oxygen species (ROS), and the inhibition of mPTP. Further studies are needed to explore the exact role of ROS and potential intermediate steps in the signal transduction pathway. Additionally, future research should focus on translating these findings into in vivo models to assess the potential for clinical application.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
AMISTAD	<i>Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine</i>
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
AP	<i>Angina pectoris</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BGS	Bundes-Gesundheitssurvey
BL	<i>baseline</i> -Phase
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CABG	<i>coronary artery bypass grafting</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con	Kontrollgruppe
CsA	Cyclosporin A
CYP	Cytochrom P450
DEGS1	Studie zur Gesundheit der Erwachsenen in Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
g	Gramm
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IP	Ischämie <i>peak</i>
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IR-Schaden	Ischämie/Reperfusion-induzierter Schaden
KCl	Kaliumchlorid
KCNMA1	<i>Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1</i>
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LCA	Linke Koronararterie
LVP	linksventrikulärer Druck
m(B)K _{Ca}	Mitochondrialer calciumsensitive Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
M, mM, μM, nM	molar, milli~, mikro~, nano~
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mil	Milrinon
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MPG	N-(2-Mercaptopropionyl)glycin
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
n	Anzahl

Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NS11021	N'-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl-phenyl)]thiourea
NS1619	<i>1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one</i>
NSTEMI	<i>Non-ST-segment elevation myocardial infarction</i>
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert
Pax	Paxillin
PC	Postkonditionierungsphase
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i>
PDE-III	Phosphodiesterase-III
PKA	Proteinkinase A
RCX	<i>Ramus circumflexus</i>
Rep	Reperfusionphase
RIPC	Ischämische Fernkonditionierung
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SAFE	<i>Survival activating factor enhancement</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie und Therapie	1
1.2	Kardioprotektion durch Präkonditionierung.....	3
1.2.1	Ischämische Präkonditionierung (IPC)	3
1.2.2	Kardioprotektive Signaltransduktion	4
1.2.3	Der Ischämie/Reperfusion-induzierte Schaden und die Rolle der mPTP.....	5
1.2.4	Der mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (mK _{Ca}).....	8
1.2.5	Pharmakologische Präkonditionierung	9
1.2.6	Milrinon	11
1.3	Ziele der Arbeit.....	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Angaben zu den Versuchstieren	14
2.2	Chirurgisches Vorgehen	14
2.3	Aufbau der Langendorff-Anlage.....	14
2.4	Versuchsprotokoll	17
2.5	Hämodynamisches Monitoring	19
2.6	Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung	20
2.7	Materialien und Chemikalien	21
2.8	Statistische Auswertung	23
3.	Ergebnisse	24
3.1	Versuchstiere.....	24
3.2	Ischämie <i>peaks</i>	25
3.3	Hämodynamische Parameter	26
3.4	Infarktgrößen	28
4.	Diskussion	30
4.1	Material und Methoden.....	31
4.1.1	Studienaufbau.....	31
4.2	Ergebnisse	35
4.2.1	Kardioprotektive Effekte von Milrinon	35
4.2.2	Mechanismen der Milrinon-induzierten Kardioprotektion.....	36
4.3	Limitationen	39
4.4	Ausblick	42
5.	Literaturverzeichnis	45

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

1.1.1 Definition

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist gekennzeichnet durch progressive atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien. Diese Ablagerungen führen zu einer zunehmenden Verengung (Stenose) der Herzkranzgefäße, die den Herzmuskel mit Blut und Sauerstoff versorgen. Infolgedessen kommt es zu einer eingeschränkten bis hin zu einer vollständigen Unterversorgung des Myokardgewebes mit Sauerstoff. Dieser Sauerstoffmangel bewirkt den Untergang von Herzmuskelzellen, eine sogenannte Myokardischämie, die sich klinisch in verschiedenen Formen äußern kann.[2].

In der Regel wird zwischen einer chronischen und einer akuten Form der KHK unterschieden[2]. Bei der chronischen KHK kann die Myokardischämie asymptomatisch verlaufen (stille Ischämie) oder sich gelegentlich durch eine symptomatische stabile Angina pectoris (AP) äußern. Das Leitsymptom der typischen AP sind stechende, druck- und atemunabhängige Schmerzen im linken Brustbereich, die häufig in den linken Arm, den Oberbauch (epigastrisch) sowie in den Kiefer- und Halsbereich ausstrahlen [1]. Obwohl die chronische KHK zeitweise beschwerdefreie Intervalle aufweisen kann, ist sie progredient und kann jederzeit in eine akute Form übergehen, die eine lebensbedrohliche Notfallsituation darstellt.

Unter einer akuten KHK versteht man das akute Koronarsyndrom (ACS), das definiert wird durch eine instabile *Angina pectoris*, dem Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt mit Anstieg von Troponin (*non-ST-segment elevation myocardial infarction*, NSTEMI) sowie dem STEMI (ST-Streckenhebungsinfarkt mit Troponinanstieg). Dieses akute Notfallereignis bedarf in jedem Fall einer umfassenden, multimodalen Therapie und ist auch bei zügiger Einleitung umfangreicher Notfallmaßnahmen mit einer hohen Mortalität, Morbidität und Spätfolgen verbunden[3].

1.1.2 Epidemiologie und Therapie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Todesursache dar. Im Jahr 2019 verstarben laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ca. 8,9 Millionen Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung. Dies entsprach 16% aller globalen Todesfälle in diesem Jahr [4]. Haupttodesursache sind dabei seit mehr als 15 Jahren die langfristigen gesundheitlichen Folgen von Herzinfarkt und Schlaganfällen. In Deutschland sind kardiovaskuläre Erkrankungen für ca. 40% aller Sterbefälle jährlich verantwortlich [5]. Tabelle 1 zeigt die zehn häufigsten Todesfälle durch

Herz-Kreislaufkrankungen im Jahr 2016. Aus den Daten wird ersichtlich, dass die Mehrheit der herz-kreislaufbedingten Todesfälle auf die koronare Herzerkrankung (KHK) und ihre Folge, den akuten Myokardinfarkt, zurückzuführen ist. Die DEGS1-Studie untersuchte von 2008-2011 die Lebenszeitprävalenz von Herzinfarkt und KHK in Deutschland[6]. Demnach lag die Lebenszeitprävalenz eines Herzinfarkts bei 4,7% (Frauen 2,5%; Männer 7%) und die einer KHK bei 9,3% (Frauen 6,4%; Männer 12,3%). Im Vergleich zum Bundes-Gesundheitssurvey 1998 (BGS98) zeigte sich ein leichter Anstieg der Lebenszeitprävalenz für Herzinfarkt bei Männern, während die Prävalenz der KHK bei Frauen geringfügig abnahm. Gleichzeitig wurden erste Erfolge in der kardiovaskulären Prävention und Therapie deutlich, da sowohl die Inzidenz des Herzinfarkts als auch die Mortalitätsraten sanken, während die Prävalenz der KHK weitgehend konstant blieb. Präventive Ansätze stellen neben einer generellen Senkung von kardiovaskulären Risikofaktoren durch Optimierung der Ernährung, sportliche Betätigung und Optimierung der Blutdruck- und Lipidwerte auch die Sekundärprophylaxe durch die Gabe von Thrombozytenfunktionshemmern wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel dar. In der Akuttherapie hat sich in vielen Ländern die perkutane Koronarangiographie (PCI) etabliert, um die Reperfusion verschlossener Koronararterien wiederherzustellen.

Bereits im Jahr 2002 berechneten Wiesner *et al.* in ihrer Studie „Vorausrechnungen des Herzinfarktgeschehens in Deutschland“, dass der kardiologische Versorgungsbedarf bis 2050 allein aufgrund des demografischen Wandels erheblich ansteigen würde[7]. Dies verdeutlicht nicht nur den Bedarf an bereits etablierten Therapiemethoden, sondern auch die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Weiterentwicklung in der kardiologischen Forschung, um den zukünftigen Anforderungen gerecht zu werden.

Um den steigenden Versorgungsbedarf in der Zukunft bewältigen zu können, ist es unerlässlich, neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Ein wichtiger Forschungsbereich in diesem Zusammenhang ist die Kardioprotektion. Diese konzentriert sich insbesondere auf die Entwicklung von Maßnahmen, die die Auswirkungen eines potenziellen Myokardinfarkts verringern und die Schädigung des Herzmuskelgewebes minimieren sollen.

Tabelle 1 Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen 2022 [8]

Todesursache (Codierung nach ICD-10)	Anteil in %
Chronisch ischämische Herzkrankheit (I25)	21,7
Akuter Myokardinfarkt (I21)	13,0
Herzinsuffizienz (I50)	10,5
Hypertensive Herzkrankheit (I11)	7,1
Vorhofflattern und Vorhofflimmern (I48)	6,6
Hirnfarkt (I63)	4,5
Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit (I69)	3,8
Hypertensive Herz- und Nierenkrankheit (I13)	3,2
Nicht-rheumatische Aortenklappenkrankheiten (I35)	3,0
Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet (I64)	2,9

1.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Das Forschungsfeld der Kardioprotektion zielt darauf ab, Strategien zu entwickeln, die das Outcome eines Myokardinfarkts durch eine Reduktion des morphologischen und funktionellen Verlusts der Herzfunktion verbessern. Eine vielversprechende Methode in diesem Kontext stellt die sogenannte Konditionierung dar. Die Konditionierung umfasst die gezielte Anwendung unterschiedlicher physischer oder pharmakologischer Stimuli auf Zellen, um adaptive Mechanismen zu induzieren. Diese Anpassungen sollen die Zellen befähigen, auf extreme Belastungen wie ischämische Episoden vorbereitet zu sein und dadurch Schäden zu minimieren. Im folgenden Kapitel werden insbesondere die Konzepte der ischämischen und pharmakologischen Präkonditionierung detailliert erläutert, da sie eine zentrale Rolle in der aktuellen kardioprotektiven Forschung einnehmen.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung (IPC)

Eine vielversprechende Strategie, um das Herz vor den schädlichen Auswirkungen eines bevorstehenden Myokardinfarkts zu schützen, ist die ischämische Präkonditionierung.

Murry *et al.* zeigten 1986 erstmals in tierexperimentellen Studien an Hunden, dass wiederholte, kurze Episoden lokaler Ischämie die Infarktgröße nach einem Infarktereignis signifikant reduzieren können[9]. Hierfür wurde der Begriff der ischämischen Präkonditionierung (IPC) geprägt. Man geht davon aus, dass diese kurzen, nicht-letalen Ischämieepisoden das Gewebe auf eine längerfristige Ischämie vorbereiten, also präkonditionieren und dadurch einen kardioprotektiven Effekt erzielen. Murry *et al.*

induzierten jeweils vier 5-minütige Ischämiephasen zur Präkonditionierung durch die kurzfristige Okklusion einer Koronararterie, gefolgt von einer langfristigen 40-minütigen Ischämiephase. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur die längerfristige Ischämie ohne Präkonditionierung erfuhr, konnte die Infarktgröße der präkonditionierten Herzen um bis zu 75 % reduziert werden[9].

Die Anwendung der IPC in der klinischen Praxis ist jedoch stark eingeschränkt, da das Verfahren maximal invasiv ist und mit erheblichen Risiken verbunden ist. Aufgrund dieser Limitationen ist die ursprüngliche Form der IPC nicht direkt auf Patient:innen übertragbar. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen gesucht, die das Prinzip der IPC in einen klinisch praktikablen Kontext übertragen könnten. Eine vielversprechende Option ist die pharmakologische Präkonditionierung, die im Gegensatz zur IPC nicht-invasiv ist und somit für den klinischen Einsatz besser geeignet erscheint. Um jedoch Ansatzpunkte für eine pharmakologische Intervention zu identifizieren, ist ein detailliertes Verständnis der zugrunde liegenden kardioprotektiven Signaltransduktionswege entscheidend.

1.2.2 Kardioprotektive Signaltransduktion

Aufbauend auf den Erkenntnissen der ischämischen Präkonditionierung (IPC) rückt nun die Erforschung der zugrunde liegenden kardioprotektiven Signaltransduktionswege in den Fokus, um gezielte pharmakologische Interventionen entwickeln zu können, die die schützenden Mechanismen der IPC klinisch nutzbar machen.

Es existiert mittlerweile eine Vielzahl an Studien, die sich intensiv mit den molekularen Mechanismen der Kardioprotektion und der detaillierten Erforschung der zugrunde liegenden kardioprotektiven Signaltransduktionswege befassen. Obwohl bereits zahlreiche auslösende Faktoren identifiziert wurden, die auf verschiedene zelluläre Zielstrukturen wirken, sind die genauen Mechanismen bislang nur unvollständig aufgeklärt und bleiben daher Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen.

Heusch *et al.* fasste 2015 die bis zu diesem Zeitpunkt bekannten molekularen Mechanismen der Kardioprotektion zusammen und bot damit einen umfassenden Überblick über den aktuellen Wissensstand in diesem Forschungsbereich[10]. In seiner Übersicht beschreibt er physikalische und chemische Reize sowie humorale und neuronale Mediatoren als zentrale Stimuli für die Konditionierung. Intrazellulär verläuft die Signaltransduktion meist über zwei Wege, die als *survival activating factor enhancement* (SAFE)-Signalweg und als *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalweg bekannt sind. Über den SAFE-Signalweg wird der TNF α -Rezeptor-2 durch den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) aktiviert und leitet eine intrazelluläre Phosphorylierung der Januskinase und der *Signal Transducer and Activator of Transcription* 3 (STAT3) ein. Dieser kann dann wiederum in den Nukleus oder in die Mitochondrien transfundieren und dort als Transkriptionsfaktor

aktiv werden [11]. Zudem reguliert STAT3 die intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Elektronenkettenaktivität und die Aktivität der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP)[11].

Die Mitochondrien fungieren ebenfalls als Endeffektoren des zweiten Signalwegs, dem *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Pathway. Dieser Signalweg wird durch die Bindung von Mediatoren an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert, was über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung von Proteinkinase C, endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Glykogensynthase-Kinase 3 Beta (GSK3 β) führt. Diese Aktivierungen modulieren wiederum die Funktion der Mitochondrien, insbesondere in Bezug auf die mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP)[12]. Obwohl die beschriebenen Signalwege unabhängig voneinander wirken können, wurden auch Interaktionen zwischen ihnen nachgewiesen[11]. Da beide Signalkaskaden ihren kardioprotektiven Effekt auf mitochondrialer Ebene in den Kardiomyozyten ausüben, werden die Mitochondrien als Schlüsselorganell der Kardioprotektion betrachtet [13]. Im Folgenden liegt daher der Fokus auf den mitochondrialen Prozessen, da diese, im Gegensatz zu Eingriffen auf die Genexpression, einen vielversprechenden und vor allem schnellen Effekt auf ischämische Stimuli erwarten lassen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mitochondrien eine zentrale Rolle in den kardioprotektiven Signalwegen spielen und als Schlüsselorganell für die Modulation zellulärer Reaktionen auf ischämische Ereignisse gelten. Besonders die mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP) nimmt hierbei eine entscheidende Funktion ein, da sie als kritischer Faktor für die Entstehung von Zellschäden während der Ischämie und Reperfusion betrachtet wird.

1.2.3 Der Ischämie/Reperfusions-induzierte Schaden und die Rolle der mPTP

Es konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass das Ausmaß des Herzschadens nicht allein von der Sauerstoffunterversorgung während der Ischämie, sondern zu einem erheblichen Teil auch von der nachfolgenden Reperfusion abhängt. Dieser Mechanismus wird als Ischämie/Reperfusions-Schaden (I/R-Schaden) bezeichnet. So geht man davon aus, dass bis zu 50% des späteren Infarktareals auf den IR-Schaden zurückzuführen ist [14].

Im Rahmen der einsetzenden Hypoxie adaptieren sich die myokardialen Zellen über eine Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen an die Sauerstoffunterversorgung, um sich vor dem Zelluntergang zu schützen. Der IR-Schaden wird infolgedessen von verschiedenen Mediatoren induziert. Hierzu zählen unter anderem oxidativer Stress, intrazellulärer Calciumüberschuss, Öffnen der mPTP sowie die Hyperkontraktion der Kardiomyozyten [15]. Unter hypoxischen Bedingungen versucht die Zelle, ihren Energiebedarf durch die

Umstellung auf die anaerobe Glykolyse weiterhin zu decken. Das hierdurch anfallende Laktat führt zum Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Um dem entgegenzuwirken, transportiert die Zelle Protonen (H^+) über den Na^+-H^+ -Austauscher nach außen. Dies führt jedoch zu einer Akkumulation von Natrium (Na^+) in der Zelle, welches durch den Na^+-Ca^{2+} -Austauscher nach außen transportiert wird, was wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Infolge dieser Mechanismen kommt es zu einem erniedrigten pH-Wert und einem erhöhten intrazellulären Calcium. Während der erniedrigte pH-Wert die mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP) geschlossen hält, führt die hohe intrazelluläre Calciumkonzentration zu einer Hyperkontraktur der Kardiomyozyten. Jennings *et al.* konnten durch eine histologische Untersuchung an isolierten ischämischen Hundeherzen zeigen, dass eine Störung dieser Anpassungsvorgänge in Schwellung der Zellen, Myofibrillenkontraktur, Störung des Sarkolemms sowie intramitochondrialen Calcium-Phosphat-Kristallen resultierte[16].

Kommt es nun zum Wiedereinsetzen der Durchblutung, erhöht sich das Sauerstoffangebot, das erneut zur aeroben Glykolyse zur Verfügung steht, wodurch auch der pH schnell wieder auf physiologische Werte ansteigt. Dadurch verliert sich allerdings seine inhibitorische Wirkung auf die mPTP-Öffnung und die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten wird beendet. Es kommt zur Öffnung der mPTP und letztendlich zur Apoptoseinduktion der Zelle (s.u.)[12].

Zudem führt die Wiederaufnahme der Aktivität der Elektronentransportkette in den Mitochondrien zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle [14]. Die Rolle von ROS in der mitochondrialen Kardioprotektion ist komplex und ambivalent. Hohe Konzentrationen von ROS fördern den IR-Schaden, da sie oxidative Schäden verursachen und die Öffnung der mPTP begünstigen, was zur Apoptose führt. Auf der anderen Seite wirken niedrige Konzentrationen von ROS kardioprotektiv, da sie die mPTP nur transient öffnen, wodurch vorübergehende Anpassungsmechanismen gefördert und die Zellhomöostase unterstützt wird[10]. Im Rahmen der Reperfusion wird ROS durch die erneut aktive Atmungskette und Xanthinoxidasen gebildet. Das gebildete ROS führt einerseits zur langfristigen Öffnung der mPTP, andererseits zur Neutrophilenaktivierung und zur Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums. Hierdurch steigt der intrazelluläre Calciumspiegel noch weiter an, wodurch es zu Schäden an der Zellmembran, Enzymdenaturierungen sowie oxidativen Schäden an der DNA kommt[17]. Durch einen Überschuss von Calcium in den Mitochondrien trägt der Calciumüberschuss weiterhin auch zur Öffnung der mPTP bei [14]. Nach den bisherigen Erkenntnissen zur komplexen Rolle von ROS und den regulatorischen Mechanismen, die während der Ischämie und Reperfusion in den Mitochondrien ablaufen, rückt die mPTP somit als zentraler Akteur der Zellhomöostase in den Fokus, da sie vermutlich den Endpunkt der kardioprotektiven

Signalkaskade darstellt. Bei der mPTP handelt es sich um einen sogenannten *Megachannel*, der an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und sich durch seine große Leitfähigkeit auszeichnet. Durch die wiedereinsetzende Reperfusion wird die mPTP langfristig geöffnet, wodurch das Membranpotential an der inneren Mitochondrienmembran aufgelöst wird. Dadurch kommt es zu einer Schwellung der Matrix, die in einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran resultiert. Die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran löst ihrerseits u.a. die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranspalt in das Zytosol der Zelle aus, wodurch die zelluläre Apoptose eingeleitet wird. Demnach führt der beschriebene Mechanismus durch die Öffnung der mPTP zum Untergang der myokardialen Zelle. Eine vorübergehende Öffnung der mPTP ist unter physiologischen Bedingungen ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der ROS-Homöostase oder zur Regulierung der intrazellulären Calciumkonzentration. Diese transienten Öffnungen unterstützen die Zellfunktion und tragen zur Anpassung an metabolische Veränderungen bei, ohne dabei langfristige Schäden zu verursachen. [10]. Die fatale, langfristige mPTP-Öffnung wird durch mehrere Faktoren ausgelöst, darunter die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran, erhöhte Konzentrationen von ROS sowie Veränderungen des pH-Wertes [13]. Aufgrund dieser entscheidenden Rolle stellt die mPTP eine zentrale Zielstruktur in der Kardioprotektion dar. Dies wird durch Experimente unterstützt, in denen die gezielte Inhibition der mPTP durch Cyclosporin A (CsA) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führte, wodurch die Bedeutung der mPTP als therapeutisches Ziel unterstrichen wird [18]. Die Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP gelingt unter anderem durch die Aktivierung des mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanals (mK_{Ca}) [19]. Dieser Kanal ist ebenfalls an der inneren Mitochondrienmembran von Kardiomyozyten lokalisiert und wirkt durch die Stabilisierung der mPTP kardioprotektiv im Sinne einer Reduktion des IR-Schadens[19]. Angesichts der entscheidenden Rolle des mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanals (mK_{Ca}) bei der Regulierung der mPTP-Öffnung und dem Schutz der Zellen vor ischämiebedingten Schäden könnte es von großem Interesse sein, gezielt pharmakologische Ansätze zur Aktivierung dieses Kanals zu entwickeln. Daher könnte die Aktivierung des mK_{Ca}-Kanals durch ein Pharmakon eine vielversprechende Strategie darstellen, um dessen kardioprotektiven Effekt therapeutisch zu nutzen.

1.2.4 Der mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (mK_{Ca})

Der mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanal (mK_{Ca}) wurde als vielversprechender Ansatzpunkt postuliert, der *upstream* der mPTP wirkt und eine zentrale Rolle in der Modulation kardioprotektiver Signalwege spielen könnte. Xu *et al.* beschrieben erstmals, dass es im Rahmen der ischämischen Konditionierung durch eine Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen zu einer Vermittlung von kardioprotektiven Effekten kommt[19]. Hierbei zeigten sie am isolierten Meerschweinchenherzen, dass durch eine Öffnung der mK_{Ca} -Kanäle mit Hilfe des spezifischen Aktivators 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one (NS1619) ein Schutz vor einem IR-Schaden induziert werden kann. Bentzen *et al.* konnten ebenfalls die Beteiligung der mK_{Ca} -Kanäle an der Reduzierung des IR-Schadens zeigen[20].

Kalium spielt in Myozyten eine wesentliche Rolle für die oxidative Phosphorylierung, die zur Sicherstellung der zellulären Energieversorgung notwendig ist. Der Einstrom von Kalium in die Mitochondrien führt aufgrund der osmotischen Verhältnisse und Veränderungen des Membranpotentials gleichzeitig zum Einstrom von Anionen und Wasser. Dies bewirkt ein Anschwellen der Mitochondrien, wodurch die räumliche Anordnung der Komponenten der oxidativen Phosphorylierung optimiert wird und deren Effizienz gesteigert werden kann[20].

Der mK_{Ca} -Kanal ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Er besteht aus vier monomeren α -Untereinheiten, die die Pore bilden sowie einer ergänzenden β -Untereinheit[21]. Die β -Untereinheit ist für die Calcium-Sensitivität des Kanals verantwortlich und bewirkt bei steigenden intrazellulären Calciumkonzentrationen eine verstärkte Aktivität des Kanals. Dies führt zu einem vermehrten Einstrom von Kalium in das Mitochondrium. Infolgedessen wird die Mitochondrienmembran depolarisiert, was den Calciumeinstrom stoppt und so eine übermäßige Akkumulation von Calcium verhindert[22]. Insgesamt trägt dieser Mechanismus dazu bei, den Calciumüberschuss in der Zelle auszugleichen und verhindert in den Mitochondrien die Öffnung der mPTP durch die Aufrechterhaltung einer niedrigen Calciumkonzentration.

Cao *et al.* widmeten sich der Frage, in welcher Abfolge die mK_{Ca} -Kanäle und die mPTP in der Signalkaskade zueinander stehen. Am isolierten Rattenherz konnten sie den kardioprotektiven Effekt von IPC aufheben, indem sie den mK_{Ca} -Kanal mittels Paxillin (Pax) blockierten[23]. Blockierten sie hingegen die mPTP-Öffnung selektiv mit Cyclosporin A (CsA), blieb der IPC-vermittelte kardioprotektive Effekt weiterhin bestehen. Bei einer gleichzeitigen Öffnung des mK_{Ca} -Kanals und der mPTP konnte keine Kardioprotektion beobachtet werden[23]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der mK_{Ca} -Kanal in der

Signalkaskade *upstream* der mPTP lokalisiert ist. Die kardioprotektiven Effekte der IPC werden über die Aktivierung der mK_{Ca} -Kanäle vermittelt, wodurch die mPTP im geschlossenen Zustand stabilisiert wird[20]. Ähnliche Mechanismen werden auch für die pharmakologische Konditionierung angenommen, wobei dies in der Postkonditionierung bereits nachgewiesen werden konnte[1].

Diese Erkenntnisse über die Rolle der $mKCa$ -Kanäle in der kardioprotektiven Signaltransduktion bieten eine solide Grundlage für die Untersuchung pharmakologischer Ansätze, die ähnliche Schutzmechanismen aktivieren könnten. Im nächsten Kapitel wird daher die pharmakologische Präkonditionierung als potenzieller therapeutischer Ansatz näher beleuchtet.

1.2.5 Pharmakologische Präkonditionierung

Die pharmakologische Präkonditionierung bietet eine vielversprechende Möglichkeit, die kardioprotektiven Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung durch gezielte medikamentöse Interventionen zu imitieren, ohne dabei auf invasive Verfahren zurückgreifen zu müssen. Durch die gezielte Applikation eines Pharmakons vor, während oder nach einer längeren Ischämiephase wird versucht, das Myokard so zu konditionieren, dass kardioprotektive Effekte hervorgerufen und somit Zellschäden reduziert werden.

Das Verständnis der molekularen Signalkaskaden ist für die pharmakologische Präkonditionierung unerlässlich, da es den gezielten und effektiven Einsatz spezifischer Pharmaka ermöglicht. Aufgrund des vielversprechenden Potenzials dieser Methode haben sich sowohl experimentelle als auch klinische Studien intensiv mit der pharmakologischen Kardioprotektion beschäftigt.

So identifizierten Singh *et al.* im Langendorff-Modell, dass der kardioprotektive Effekt des Nukleosids Adenosin vermutlich über NO vermittelt wird[24]. Der klinische Nutzen von Adenosin konnte bereits 2005 in der AMISTAD-II Studie gezeigt werden, bei der eine Reduktion des Infarktareals bei Patienten mit STEMI durch die Infusion von $70\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Adenosin zusätzlich zur Koronarintervention im Vergleich zur Kontrollgruppe, die lediglich die standardisierte Intervention erhielt, erzielt werden konnte[25].

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein Hormon, das von Myokardzellen gebildet wird und insbesondere bei der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist, indem es auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt des Körpers Einfluss nimmt. 2003 konnte gezeigt werden, dass ANP ebenfalls in der Präkonditionierung über den *RISK*-Signalweg einen kardioprotektiven Effekt vermittelt[26]. Klinisch wurde dieser Aspekt in der J-WIND Studie aufgegriffen[27]. Hier erfolgte die randomisierte Aufteilung von 1216 Patient:innen mit akutem Myokardinfarkt und Interventionsbedarf in mehrere Gruppen. Die

Kontrollgruppen erhielten neben der leitliniengerechten Intervention lediglich ein Placebo, während die Interventionsgruppen unterschiedliche Dosen an ANP erhielten. Es zeigten sich kleinere Infarktareale, höhere linksventrikuläre Ejektionsfraktionen sowie bessere Langzeitergebnisse (gemessen an Herztod und Rehospitalisierung aufgrund eines kardialen Ereignisses)[27].

Auch für das Zytokin Erythropoetin (EPO), das Schlüsselenzym der Erythropoese, wurde im Rattenmodell gezeigt, dass es einen kardioprotektiven Effekt, vermutlich ebenfalls über den *RISK*-Signalweg vermittelt, bewirkt[28].

Ciclosporin A (CsA), ein klinisch etabliertes Immunsuppressivum, konnte im Langendorff-Modell eine Reduktion der Infarktareale aufweisen[29]. Diese Kardioprotektion vermittelt es in der Präkonditionierung durch eine Stabilisierung der mPTP, wodurch diese geschlossen bleibt und nicht zur Apoptoseinduktion beitragen kann. In einer kleinen klinischen Studie konnten Piot *et al.* diesen Effekt von CsA an Patient:innen mit STEMI nachweisen[30]. Sie zeigten durch CsA-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Kreatinkinase-Werte als Maß für myokardiale Schädigung sowie niedrigere Infarktareale im MRT. Dieser vielversprechende Effekt wurde jedoch in der groß angelegten, multizentrischen CIRCUS-Studie widerlegt. In dieser Studie konnte kein kardioprotektiver Nutzen durch die Anwendung von Cyclosporin A (CsA) bei Patient:innen mit STEMI nachgewiesen werden. [31].

Die offensichtlich häufige Diskrepanz zwischen experimentellen Arbeiten und klinischen Studien, die sich der pharmakologischen Präkonditionierung widmeten, lässt sich mit Betrachtung der jeweiligen Studienkollektive erklären. Während in tierexperimentellen Studien überwiegend Organe von jungen, gesunden und nicht vorerkrankten Tieren untersucht wurden, sehen sich klinische Studien mit älteren, multimorbiden und häufig pharmakologisch vortherafierten Patient:innen konfrontiert. Ferdinandy *et al.* beschrieben in ihrem *Review* unter anderem wie Veränderungen des Alters, Komorbiditäten und Komedikation Einfluss auf den kardioprotektiven Erfolg haben[32]. Demnach nehmen insbesondere altersbedingte Veränderungen Einfluss auf die zytosolischen Signalwege. Durch eine Veränderung des *RISK*-Signalwegs beispielsweise wird die mPTP weniger stabilisiert, öffnet sich schneller und führt somit schneller zum Zelltod[33]. Ebenso führen Veränderungen in der Proteinkinase A (PKA) durch Alterungsprozesse zu einer Abnahme der Wirksamkeit von kardioprotektiven Maßnahmen[34]. Im Zuge dieser Studie konnten Heinen *et al.* allerdings auch feststellen, dass der mK_{Ca} -Kanal von Alterungsprozessen weitgehend unbeeinflusst bleibt und über dessen Öffnung (beispielsweise durch NS1619) dennoch kardioprotektive Effekte im gealterten Herzen vermittelbar sind[35]. Möglicherweise würde die weitere Betrachtung dieses Kanals daher eine Translation in die Klinik erleichtern.

Für den Phosphodiesterase-III-Hemmer Milrinon konnte bereits nachgewiesen werden, dass seine kardioprotektive Wirkung in der Postkonditionierung über den mKCa-Kanal vermittelt wird [1]. In der vorliegenden Studie bestand daher das Ziel darin zu klären, ob dieser Mechanismus auch in der Präkonditionierung über den mKCa-Kanal wirksam ist.

1.2.6 Milrinon

Milrinon ist ein Pharmakon aus der Gruppe der Phosphodiesterasehemmer, das aktuell zur Kurzzeittherapie bei schwerer Herzinsuffizienz zugelassen ist. Abbildung 1 veranschaulicht die Wirkweise von Milrinon im Kardiomyozyten. Durch die Hemmung der Phosphodiesterase-III (PDE-III) wird der Abbau des *second messenger* cAMP vermindert[36]. Dies führt im Myokard zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration, wodurch eine positive Inotropie bewirkt wird. Im peripheren glatten Gefäßmuskel reduziert die Verminderung des zytosolischen Calciums den Gefäßtonus, was zu einer Vasodilatation und einer Senkung der kardialen Vor- und Nachlast führt. Insgesamt verbessert Milrinon die kardiale Auswurfleistung, ohne den myokardialen Sauerstoffbedarf zu steigern, weshalb es erfolgreich in der Therapie der schweren Herzinsuffizienz eingesetzt wird [37].

Aufgrund mitunter schwerer Nebenwirkungen, beispielsweise das hohe arrhythmogene Potential von PDE-Inhibitoren, wird Milrinon zurzeit nur bei therapierefraktären Herzinsuffizienzen für eine maximale Dauer von zwei bis fünf Tagen unter kontinuierlicher Monitorüberwachung eingesetzt.

Bereits 2001 konnten Sanada *et al.* einen kardioprotektiven Effekt von Milrinon im Hundemodell zeigen[38]. Milrinon zeigt nicht nur im kardiovaskulären System protektive Effekte, sondern auch in anderen Organsystemen bei Ischämie/Reperfusion-induziertem Schaden, wie beispielsweise in den Studien von Kume *et al.* und Saklanie *et al.* nachgewiesen wurde. Kume *et al.* untersuchten protektive Effekte des Milrinons auf die Leber männlicher Wistar-Ratten nach einer I/R-*injury*[39]. Sie konnten eine Protektion der Hepatozyten feststellen und begründeten diese mit einer Verbesserung des Energiehaushaltes sowie einer Reduzierung der Freisetzung von hepatischen Enzymen. Zudem stellten sie Ähnlichkeiten der Milrinon-Präkonditionierung mit der physiologischen ischämischen Präkonditionierung fest[39]. Saklanie *et al.* postulierten einen neuroprotektiven Effekt von Milrinon nach I/R-Schaden[40]. Den neuroprotektiven Effekt maßen sie anhand von reduzierter Infarktgröße, Schutz vor Gedächtnisverlust sowie einer Verbesserung der Motorkoordination. In der Studie wurde dieser neuroprotektive Effekt auf die durch Milrinon induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zurückgeführt[40].

Für den Einsatz in der pharmakologischen **Post**konditionierung konnte im experimentellen Modell bereits gezeigt werden, dass Milrinon einen kardioprotektiven Effekt besitzt. Bei der pharmakologischen Postkonditionierung wird, ähnlich wie bei der Präkonditionierung, ein potenziell protektives Pharmakon verabreicht, um die Infarktgröße des Myokards zu reduzieren. Im Gegensatz zur Präkonditionierung erfolgt die Applikation des Pharmakons jedoch nach der ischämischen Phase des Herzens, um die Schäden nach der Reperfusion zu minimieren.

Matsumoto *et al.* zeigten, dass der kardioprotektive Effekt der Postkonditionierung durch eine Inhibition der mPTP vermittelt wird[41]. Darüber hinaus konnte Behmenburg *et al.* nachweisen, dass mK_{Ca} -Kanäle an den kardioprotektiven Wirkungen von Milrinon in der Postkonditionierung beteiligt sind[1].

Der Wirkmechanismus und der Effekt von Milrinon in der Präkonditionierung wurden bisher jedoch noch nicht untersucht und waren daher Gegenstand unserer Studie [42].

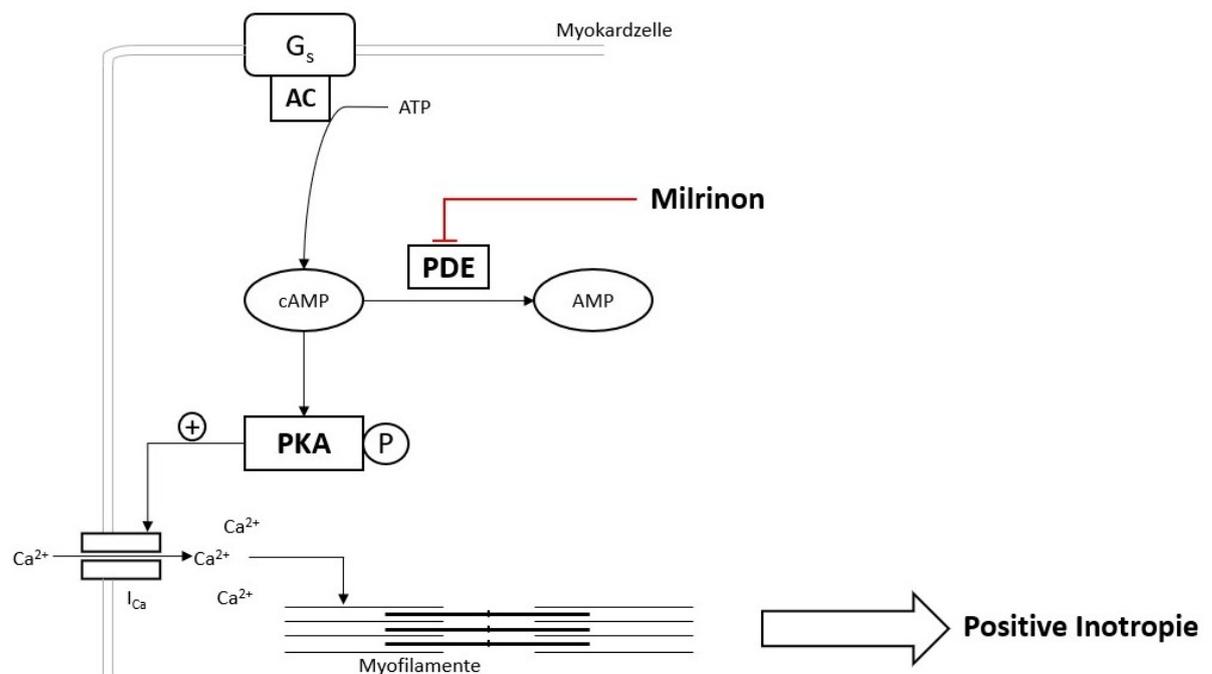


Abb. 1: **Wirkweise von Milrinon im Kardiomyozyt**, modifiziert nach [43]. Durch die Inhibition der PDE durch Milrinon wird der Abbau von cAMP verhindert. Somit steht mehr cAMP zur Phosphorylierung der PKA zur Verfügung. Dadurch bleibt der spannungsabhängige Calciumkanal länger geöffnet, mehr Calcium strömt in die Zelle und die Myofilamente haben eine höhere Kontraktionskraft.

G_s = stimulierendes G-Protein; AC = Adenylcyclase; ATP = Adenosintri-phosphat; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; PDE = Phosphodiesterase; AMP = Adenosinmonophosphat; PKA = Proteinkinase A; P = Phosphat; I_{Ca} = spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanal.

1.3 Ziele der Arbeit

Die genauen zellulären Mechanismen der Kardioprotektion sind trotz intensiver Forschung bisher nicht vollständig aufgeklärt. Für eine erfolgreiche zukünftige klinische Anwendung ist es jedoch essenziell, die vollständige Signalkaskade zu identifizieren, um potenzielle Störfaktoren, die den bisherigen klinischen Erfolg der Kardioprotektion begrenzen, zu eliminieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, folgende Hypothesen zu überprüfen:

1. Milrinon vermittelt, analog zur Postkonditionierung, auch in der Präkonditionierung einen kardioprotektiven Effekt auf das Rattenherz im Langendorff-Modell.
2. Der kardioprotektive Effekt von Milrinon wird über den mK_{Ca} -Kanal initiiert und setzt sich *downstream* über die mPTP fort.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde ein experimenteller Ansatz im Langendorff-Herzmodell verwendet, bei dem ein etabliertes Präkonditionierungsprotokoll zur Bestimmung der Infarktgrößen und hämodynamischen Parameter in verschiedenen Versuchsgruppen eingesetzt wurde. Zudem erfolgte die gezielte pharmakologische Blockade der mPTP und des mK_{Ca} -Kanals, um eine jeweilige Beteiligung der Kanäle an der kardioprotektiven Signalkaskade zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Angaben zu den Versuchstieren

Für die Studie wurden 72 gesunde, 2-3 Monate alte, männliche Wistar Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 bis 350g verwendet. Die Versuche wurden gemäß dem Leitfaden der „*Guide for the Care and Use Of Laboratory Animals*“, publiziert durch das *National Institute of Health* durchgeführt.

Eine Genehmigung zur Organentnahme liegt mit dem Aktenzeichen O27/12 der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität vor.

2.2 Chirurgisches Vorgehen

Nach einer intraperitonealen Sedierung der Versuchstiere mit 90 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital sowie Heparinisierung mit 0,2ml Heparin/ Ratte erfolgte die Dekapitation mittels Guillotine und die anschließende Organentnahme. Hierzu wurde eine Thorakotomie durchgeführt, die Aorta vor dem Abgang der *Arteria brachiocephalica* abgesetzt und das Herz entnommen. Das entnommene Herz wurde durch Kanülierung der *Aorta ascendens* an die Langendorff-Anlage überführt und über diesen Zugang eine retrograde Perfusion des Herzens mit Krebs-Henseleit-Puffer bei konstantem Druck von 80 mmHg sichergestellt.

Die Ischämiezeit unter Organentnahme, d.h. der zeitliche Abstand zwischen Dekapitation und erneute Reperfusion an der Langendorff-Anlage betrug maximal drei Minuten.

Um ein kontinuierliches hämodynamisches Monitoring durchführen zu können, wurde das linke Herzohr identifiziert, abgetrennt und ein mit 0,9%igem NaCl gefüllter Ballon in den linken Ventrikel vorgeschoben. Durch dessen vorsichtige Befüllung wurde ein enddiastolischer Druck von 4-8 mmHg eingestellt, wodurch mithilfe eines Manometers die Druckverhältnisse im linken Ventrikel aufgezeichnet werden konnten.

2.3 Aufbau der Langendorff-Anlage

Als Grundlage für die Koronarperfusion wurde ein Puffer gewählt, der hinsichtlich seiner Elektrolyt-Konzentration sowie seines pH-Wertes dem Blut ähnlich ist (Zusammensetzung siehe Tabelle 2). Die Zusammensetzung des sogenannten Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) wurde vor Versuchsbeginn sowie regelmäßig während der Versuchsdurchführung durch eine Blutgasanalyse (BGA) überprüft.

Die Abbildung 2 stellt den Aufbau der verwendeten Langendorff-Anlage schematisch dar. Durch eine Wärmepumpe werden die doppelwandigen Elemente der Anlage, Luftfalle,

Wärmeaustauschspirale und Wärmemantel mit 37°C warmen Wasser umspült. Der Puffer wird in einem Wasserbad, das auf 45°C geheizt wird, erwärmt und mit Carbogen begast. Aus dem KHP-Reservoir wird der Puffer in eine Luftfalle geleitet. Durch eine erwärmte Wärmeaustauschspirale fließt die Pufferlösung schließlich mit einem konstanten Druck von 80mmHg zur Kanüle, an der die Herzen an der Aorta mittels Fädenligaturen befestigt sind. Vor der Kanüle befinden sich zwei Drei-Wege-Hähne, über die die Applikation der Medikamente mittels Perfusoren abhängig vom Koronarfluss gesteuert wird. Das Herz wird umgeben von einem erwärmten Wärmemantel, der einerseits eine konstante Herztemperatur realisiert, andererseits als Reservoir für die Ischämiepuffer während der Ischämiezeit dient. Als Ischämiepuffer fungiert KHP, der konstant mit Stickstoffgas begast wird. Durch einen Abfluss am Wärmemantel wird der Abfluss des Koronarflusses gewährleistet.

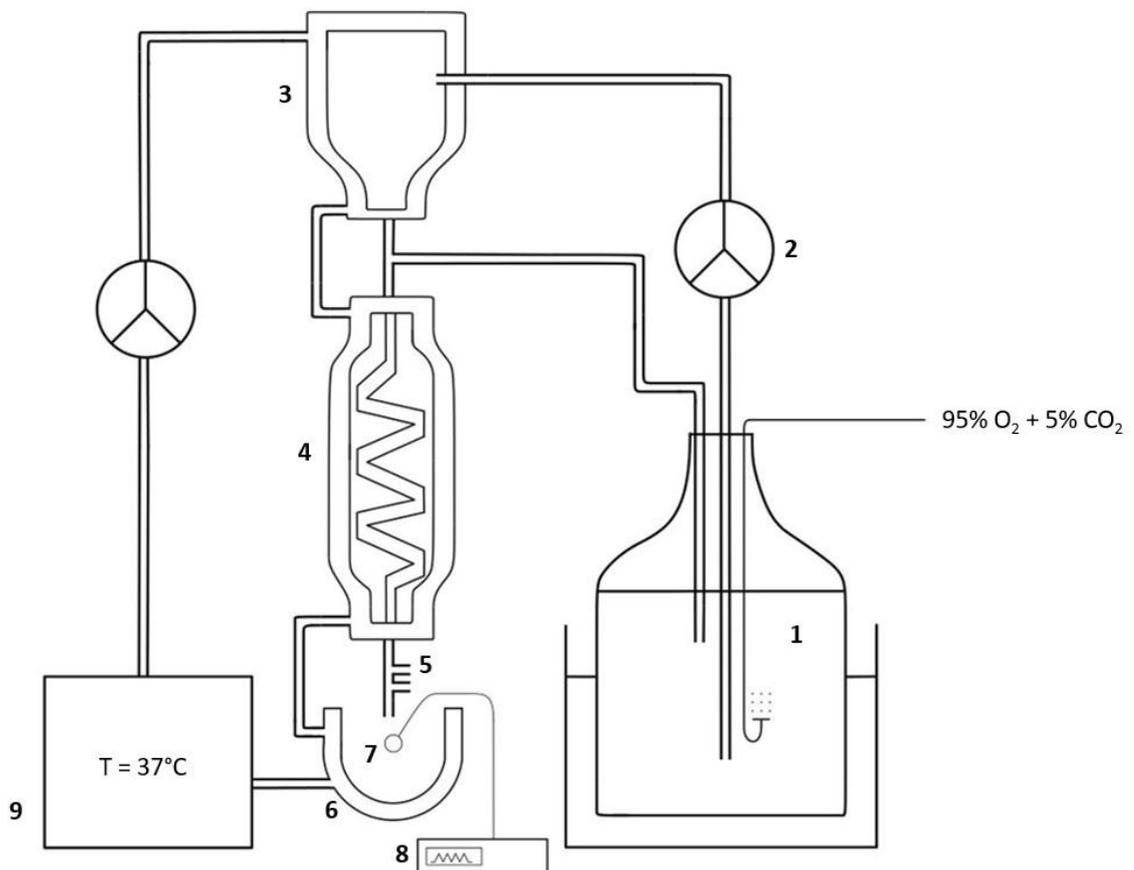


Abb. 2 **Schematische Darstellung der Langendorff-Anlage.** 1) Reservoir mit Krebs-Henseleit-Puffer, unter kontinuierlicher Begasung mit 95% O₂ + 5% CO₂ und Erwärmung auf 37°C mittels Wasserbad; 2) Peristaltikpumpe; 3) Luftfalle; 4) Wärmeaustauschspirale; 5) Perfusorzugang für Medikamente; 6) Wärmemantel; 7) Flüssigkeitsgefüllter Druckabnahmeballon, platziert im linken Ventrikel; 8) *Transducer* zur Detektion des linksventrikulären Drucks sowie Bestimmung der Herzfrequenz; 9) Wärmepumpe, die über ein doppelwandiges System ein Aufheizen der Anlage auf 37°C realisiert und einer Abkühlung der Pufferlösung entgegenwirkt

Tabelle 2 Zusammensetzung des Krebs-Henseleit Puffers für 5L [43]

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [g/mol]	[g]
NaCl	58,44	118	34,48
KCl	74,55	4,7	1,751
MgSO ₄ + 7 H ₂ O	246,48	1,2	1,479
KH ₂ PO ₄	136,09	1,2	0,817
NaHCO ₃ [CHNaO ₃]	84,01	25	10,501
EDTA	292,2	0,5	0,731
Glucose	180,16	11	9,909
Laktat	112,1	1	0,561
CaCl ₂	110,99	2,25	1,249

2.4 Versuchsprotokoll

Die Randomisierung der Versuchstiere erfolgte in 8 Gruppen mit jeweils 9 Tieren pro Gruppe. Abbildung 3 stellt das Studienprotokoll schematisch dar.

Zur Kontrolle wurde einer Gruppe (Con) nur Vehikel (KHP + DMSO) verabreicht. In den Gruppen, die jeweils nur ein Pharmakon erhielten (Mil, Pax, MPG) erfolgte ab Minute 20 die 10-minütige Gabe des gruppenspezifischen Pharmakons sowie zusätzlich Vehikel (KHP + DMSO).

In den Agonist-Antagonist-Gruppen (Mil + Pax, Mil + MPG, Pax + CsA, Mil + MPG + CsA) erfolgte zur Minute 19 die Gabe des Antagonisten (Pax, MPG, MPG + CsA, CsA), ab Minute 20 erfolgte zusätzlich die Gabe des Agonisten (Mil) bis zur Minute 30.

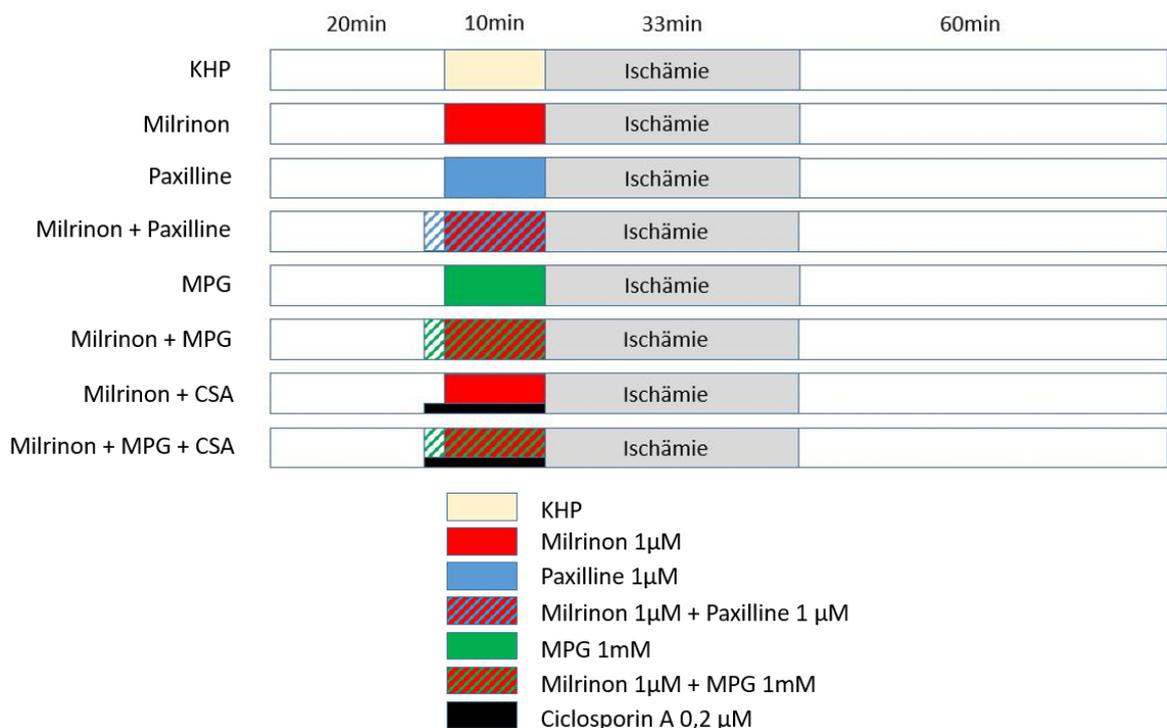


Abb. 3 **Studienprotokoll**. Nach zwanzigminütiger Stabilisierungsphase jeweils zehnteilige Gabe des jeweiligen Pharmakons, gefolgt von 33min Ischämie und 60min Reperfusionzeit. Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte nach Versuchsende.

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; MPG = N-(2-Mercaptopropionyl)glycin

Jede Gruppe durchlief jeweils eine Stabilisierungsphase von 20 Minuten, in der eine Stabilisierung des Druckes sowie der Herzfrequenz angestrebt wurden. Hierbei galten Maximaldrücke ≤ 80 mmHg sowie Herzfrequenzen ≤ 250 Schläge/min zum Ende der Stabilisierungsphase als Ausschlusskriterium.

Zu Beginn erfolgte die Perfusion ausschließlich mit Carbogen-begastem, 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer. Die Applikation der Medikamente erfolgte durch Perfusoren, deren Laufrate 1% des Koronardurchflusses betrug, der zur Minute 15 gemessen wurde.

Die Tabelle 3 gibt Auskunft über die genaue Dosierung der Pharmaka in den einzelnen Gruppen.

Tabelle 3 **Dosierung der jeweiligen Pharmaka in den einzelnen Gruppen.** 5ml Stock B. Abkürzungen: KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; CsA = Cyclosporin A; DMSO = Dimethylsulfoxid

Gruppe	Perfusor 1	Perfusor 2
KHP-Kontrolle	117,5µl DMSO in 4882,5µl KHP	117,5µl DMSO in 4882,5µl KHP
Milrinon	12,5µl 40mM Milrinon + 123,75µl DMSO in 4863,75µl KHP	100µl DMSO in 4900µl KHP
Paxillin	50µl 10mM Paxillin + 50µl DMSO in 4900µl KHP	135µl DMSO in 4865µl KHP
Milrinon + Paxillin	50µl 10mM Paxillin + 50µl DMSO in 4900µl KHP	12,5µl 40mM Milrinon + 123,75µl DMSO in 4863,75µl KHP
MPG	81,5mg MPG in 4900µl KHP gelöst, dann 100µl DMSO	135µl DMSO in 4865µl KHP
Milrinon + MPG	81,5mg MPG in 4900µl KHP gelöst, dann 100µl DMSO	12,5µl 40mM Milrinon + 123,75µl DMSO in 4863,75µl KHP
Milrinon + MPG + CsA	81,5mg MPG in 4900µl KHP gelöst, dann 100µl DMSO + 5µl 20mM CsA	12,5µl 40mM Milrinon + 123,75µl DMSO in 4863,75µl KHP
Milrinon + CsA	5µl 20mM CsA + 95 µl DMSO in 4900µl KHP	12,5µl 40mM Milrinon + 123,75µl DMSO in 4863,75µl KHP

Ab Minute 30 wurde eine 33-minütige Ischämie induziert. Hierzu wurde die Koronarperfusion an der Langendorff-Anlage unterbunden und das Herz mit einem Ischämiepuffer umspült.

Nach der Ischämiephase erfolgte umgehend die 60-minütige Reperfusion der Herzen. Hierfür wurde der Ischämiepuffer entfernt und die Koronarperfusion wiederhergestellt. Etwaige Herzrhythmusstörungen, wie Kammerflimmern, wurden in der Reperfusionsphase durch gezielte mechanische Intervention in Form von Schnipsen gegen den rechten Ventrikel behoben.

Nach Beendigung der Reperfusion wurden die Herzen von der Anlage abgehängt, das Nassgewicht per Waage bestimmt und bei -20°C eingefroren.

2.5 Hämodynamisches Monitoring

Das hämodynamische Monitoring erfolgte über den, bereits in 2.2 erwähnten, Druckabnahmeballon im linken Ventrikel. Über einen Verstärker (*BridgeAmp* [Firma ADInstruments; Oxford, UK]) und *PowerLab 4/26* (Firma ADInstruments; Oxford, UK) misst dieser Ballon den linksventrikulären Druck und bestimmt die Herzfrequenz. Diese Daten werden durch LabChart (Version 8 [Firma ADInstruments; Oxford, UK]) aufgezeichnet und nach Versuchsende ausgewertet. Hierzu erfolgte die Bestimmung der Herzfrequenz, des maximalen und minimalen linksventrikulären Drucks, des maximalen und minimalen Druckanstiegs an unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs. Diese Zeiten setzten sich zusammen aus einer *baseline*-Phase (BL) vor Medikamentengabe, einer *postconditioning*-Phase (PC) nach Medikamentengabe vor der Ischämie, der letzten Minute der Ischämie sowie alle 15min in der Reperfusionphase (Rep15-60).

Zudem wurden die Koronarflüsse zu den Zeiten BL, PC, Rep15, 30, 45 und 60 durch einminütiges Auffangen des Durchflusses und anschließendem Wiegen bestimmt.

2.6 Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Infarktgröße der Herzen bestimmt. Hierzu erfolgte zunächst die Färbung mit dem Redoxfarbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und anschließend wurde die Infarktgröße mittels Planimetrie digital bestimmt.

Für die Färbung wurden die Herzen zunächst in jeweils 8 Scheiben pro Herz mit einer Dicke von 1-2mm transversal geschnitten, in 24-Loch-Platten für 15min bei 37°C mit einer 75%igen TTC-Färbelösung in 1,4%igem TRIS-Puffer bei pH 7,42 inkubiert und anschließend 24h lang in einer 4%igen Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Triphenyltetrazoliumchlorid gilt als Vitalfarbstoff, da vitale Zellen von TTC durch zelleigene Dehydrogenasen der Atmungskette unter der Aufnahme von zwei Elektronen und einem Proton zu rotem Formazan reduziert werden, während er bei avitalem Gewebe in seiner oxidierten Form farblos verbleibt. Hierdurch ist die Unterscheidung zwischen vitalem Myokardgewebe, das sich rot darstellt, und Infarktgewebe gut möglich, da untergegangenes, infarziertes Gewebe aufgrund mangelnder funktionstüchtiger Dehydrogenasen nicht reduziert wird und daher farblos bleibt. Nach Fixierung erfolgte die Digitalisierung der Herzspitzen mittels Fotoscanner. Mittels Planimetrie durch die Software SigmaScan Pro5® (SPSS Science Software, Chicago, IL, USA) wurden dann die Infarktareale im Transversalschnitt erfasst. Hierzu wurde die infarzierte Fläche des linken Ventrikels zeichnerisch ermittelt und im Verhältnis zur Gesamtfläche des linken Ventrikels gesetzt. Das Verhältnis von infarziertem Gewebe zu vitalem Gewebe ergab demnach die Infarktgröße eines jeden Herzens. Um die Reliabilität der Planimetrie zu sichern, wurde dieser Prozess jeweils von zwei verblindeten Untersuchern durchgeführt.

2.7 Materialien und Chemikalien

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	CAS-Nr.	Hersteller
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	VWR International BVBA (Leuven, Belgien)
Kaliumchlorid	KCl	7447-40-7	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ + 7 H ₂ O	10034-99-8	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	7778-77-0	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	144-55-8	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
D(+)-Glukose (wasserfrei)	C ₆ H ₁₂ O ₆	50-99-7	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	60-00-4	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
(Natrium-)Lactat	C ₃ H ₅ NaO ₃	867-56-1	AppliChem GmbH (Darmstadt) & PanReac Quimica SLU (Barcelona, Spanien)
Calciumchlorid	CaCl ₂	10043-52-4	Merck KGaA (Darmstadt)
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄	298-96-4	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
TRIS Pufferan	C ₄ H ₁₁ NO ₃	77-86-1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
37% Formaldehyd	CH ₂ O	50-00-0	Merck KGaA (Darmstadt)
0,9% Natriumchlorid Lösung	NaCl	7647-14-5	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe)
Carbogen	95% O ₂ + 5% CO ₂		LINDE AG (München)
Stickstoff	N ₂		LINDE AG (München)
Milrinon	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₃ · 1/4 H ₂ O	78415-72-2	TOCRIS bioscience (Bristol, UK)
Paxillin	C ₂₂ H ₃₃ NO ₄	57186-25-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (MPG)	C ₅ H ₉ NO ₃ S	1953-02-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Cyclosporin A	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	59865-13-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	(CH ₃) ₂ SO	67-68-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Pentobarbital (NARCOREN)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	76-74-4	Merial GmbH (Hallbergmoos)

Chemikalie	Summenformel	CAS-Nr.	Hersteller
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5ml		9041-08-1	B.Braun, Melsungen

Tabelle 5 Verwendetes Material

Material	Modell	Hersteller
Wärmepumpe	MW-6	Julabo, Seelbach
Heizelement	EC	Julabo, Seelbach
Blutgasanalyse-Gerät	Radiometer ABL 800 Flex	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Peristaltikpumpe	Minipuls 3	Gilson, Limburg a.d. Lahn
Perfusoren	„Space“ und „Secura“	B. BRAUN, Melsungen
Wärmebad	Klees	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Feinwaage	LA230S	Sartorius AG, Göttingen
pH-Meter	Digital-pH-Meter Typ 646 #4498	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der hämodynamischen Parameter erfolgte die Analyse mittels einer multifaktoriellen Varianzanalyse sowie anschließendem *Tukey post-hoc-test* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Hierbei konnten die hämodynamischen Daten zwischen den Gruppen sowie zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs innerhalb einer Gruppe miteinander verglichen werden.

Die Infarktgrößenauswertung erfolgte wiederum mit einer Einwege-Varianzanalyse (ANOVA) sowie einem *Tukey post-hoc-test*.

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt, ein Unterschied wurde ab einem P-Wert von $P < 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchstiere

Die Körpergewichte der Ratten sowie die trockenen und nassen Herzgewichte wurden in den verschiedenen Versuchsgruppen erfasst. Hinsichtlich des Körpergewichts der Versuchstiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Tabelle 6 fasst die entsprechenden Daten zusammen. Die Ratten erreichten ein medianes Gewicht von 294g (± 16 g). Dabei lag das Herztrockengewicht im Mittel bei 0,14g ($\pm 0,01$ g), das mittlere Herznassgewicht lag bei 1,32g ($\pm 1,0$ g). Es zeigte sich über die Gruppen hinweg keine signifikante Abweichung des Gewichts in den verschiedenen Versuchsgruppen insbesondere im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 6 **Gewichte** Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Abkürzungen: Con= Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxilline; MPG = N-2-Mercaptopropionylglycine; CsA = Cyclosporin A

	n	Rattengewicht [g]	Herztrockengewicht [g]	Herznassgewicht [g]
Con	9	299 \pm 17	0,14 \pm 0,02	1,35 \pm 0,08
Mil	9	287 \pm 14	0,13 \pm 0,01	1,35 \pm 0,09
Mil+Pax	7	284 \pm 19	0,13 \pm 0,01	1,33 \pm 0,08
Pax	9	297 \pm 13	0,14 \pm 0,02	1,29 \pm 0,11
MPG+Mil	9	297 \pm 14	0,14 \pm 0,01	1,35 \pm 0,06
MPG	9	293 \pm 15	0,15 \pm 0,02	1,33 \pm 0,07
MPG+Mil+CsA	9	293 \pm 18	0,13 \pm 0,01	1,27 \pm 0,10
Mil+CsA	9	299 \pm 19	0,13 \pm 0,01	1,32 \pm 0,11

3.2 Ischämiepeaks

Um sicherzustellen, dass alle Herzen eine relevante Ischämie durchlaufen haben, wurde der sogenannte *Ischämiepeak* ermittelt. Der *Ischämiepeak* beschreibt die kardiale Reaktion auf die Sauerstoffunterversorgung, die sich in einer myokardialen Kontraktur äußert. Diese Kontraktur wurde mithilfe eines intraventrikulären Druckabnehmerballons aufgezeichnet, um den Druckanstieg und damit die ischämische Belastung der Herzen zu dokumentieren. Der *Ischämiepeak* wurde im Mittel nach 16 Minuten (± 2 Minuten) erreicht und lag im Mittel bei 62mmHg (± 18 mmHg). Zwischen sämtlichen Versuchsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Zeitpunkts des *Ischämiepeaks* sowie dessen Höhe.

Tabelle 7 **Ischämiepeaks** Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Abkürzungen: Con= Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxilline; MPG = N-2-Mercaptopropionylglycine; CsA = Cyclosporin A

	n	Zeitpunkt des <i>Ischämiepeaks</i> [min]	Höhe des <i>Ischämiepeaks</i> [mmHg]
Con	9	17 \pm 2	61 \pm 9
Mil	9	16 \pm 2	58 \pm 17
Mil+Pax	7	17 \pm 2	63 \pm 14
Pax	9	17 \pm 1	62 \pm 15
MPG+Mil	9	16 \pm 1	59 \pm 15
MPG	9	16 \pm 1	70 \pm 12
MPG+Mil+CsA	9	16 \pm 2	63 \pm 23
Mil+CsA	9	16 \pm 2	59 \pm 18

3.3 Hämodynamische Parameter

Zur Erfassung möglicher Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in Bezug auf die hämodynamischen Parameter wurde ein vergleichender Gruppenvergleich durchgeführt. Dabei wurden die hämodynamischen Daten der einzelnen Gruppen systematisch miteinander verglichen, um signifikante Abweichungen oder Gemeinsamkeiten zu identifizieren.

Tabelle 8 stellt die hämodynamischen Parameter der einzelnen Versuchsgruppen zu vier verschiedenen Messzeitpunkten dar. Diese Messzeitpunkte umfassen die *Baseline*-Phase vor der Medikamentengabe, die Postkonditionierungs-Phase in der letzten Minute der Medikamentenapplikation sowie Minute 30 und Minute 60 der Reperfusionphase.

Die Herzfrequenz zeigte zu keiner Zeit und in keiner der durchgeführten Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied.

Der phasische Linksventrikuläre Druck (LVP) nach der Ischämie, zu Zeiten der Reperfusion, unterschied sich in allen Gruppen signifikant zum LVP während der *Baseline*-Phase vor der Ischämie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich in den Gruppen Pax + Mil sowie MPG + Mil + CsA eine signifikante Reduzierung des LVP zum Zeitpunkt der Postkonditionierung.

Der Koronarfluss war in allen Versuchsgruppen nach der Ischämie im Vergleich zur *Baseline*-Phase signifikant reduziert. Zusammenfassend konnten signifikante Unterschiede innerhalb jeder Gruppe nach der Ischämie festgestellt werden, während zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren. Insgesamt konnte somit durch die Verabreichung der unterschiedlichen Pharmaka kein signifikanter Einfluss auf die hämodynamischen Parameter festgestellt werden.

Tabelle 8 **Hämodynamische Daten** Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

* P <0,05 vs. Baseline; # P <0,05 vs. Con

Abkürzungen: Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxilline; MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin; CsA = Cyclosporin A; LVP = Linksventrikulärer Druck

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

3.4 Infarktgrößen

Der primäre Endpunkt der Studie war die Bestimmung der Infarktgröße, um den kardioprotektiven Effekt von Milrinon in der Präkonditionierung sowie dessen downstream Zielstruktur zu identifizieren. Insgesamt wurden acht Versuchsgruppen mit jeweils neun Tieren untersucht. Das Studienprotokoll war in allen Gruppen identisch, abgesehen von der gruppenspezifischen Applikation der jeweiligen Pharmaka, die den Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen darstellte.

Abbildung 4 stellt die Infarktgrößen in den jeweiligen Versuchsgruppen graphisch dar.

In der Kontrollgruppe (Con), die keine medikamentöse Präkonditionierung erhielt, zeigten sich Infarktareale von $57 \pm 6\%$.

Durch die Gabe des PDEIII-Inhibitors Milrinon ließ sich die Infarktgröße um bis zu 41% auf $34 \pm 6\%$ reduzieren (Con: $57 \pm 6\%$ vs. Mil: $34 \pm 6\%$; $P < 0,05$).

Die Applikation des mK_{Ca} -Kanal-Inhibitors Paxillin sowie des Radikalfängers MPG führte zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgrößen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Pax: $53 \pm 7\%$, MPG: $58 \pm 5\%$; ns. vs. Con). In Kombination mit Milrinon konnten jedoch sowohl Paxillin als auch MPG den Effekt von Milrinon, hinsichtlich Reduktion der Infarktgrößen, aufheben (Pax + Mil: $53 \pm 6\%$, MPG + Mil: $59 \pm 7\%$; ns. vs. Con; $P < 0,05$ vs. Mil).

In der Gruppe MPG + Mil + CsA konnte unter CsA der Effekt von MPG aufgehoben werden und eine Infarktgrößenreduktion auf $35 \pm 7\%$ erreicht werden ($P < 0,05$ vs. Mil + MPG). In Kombination mit CsA zeigte Milrinon keine weitere Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu Milrinon allein (Mil + CsA: $31 \pm 10\%$; ns. vs. Mil).

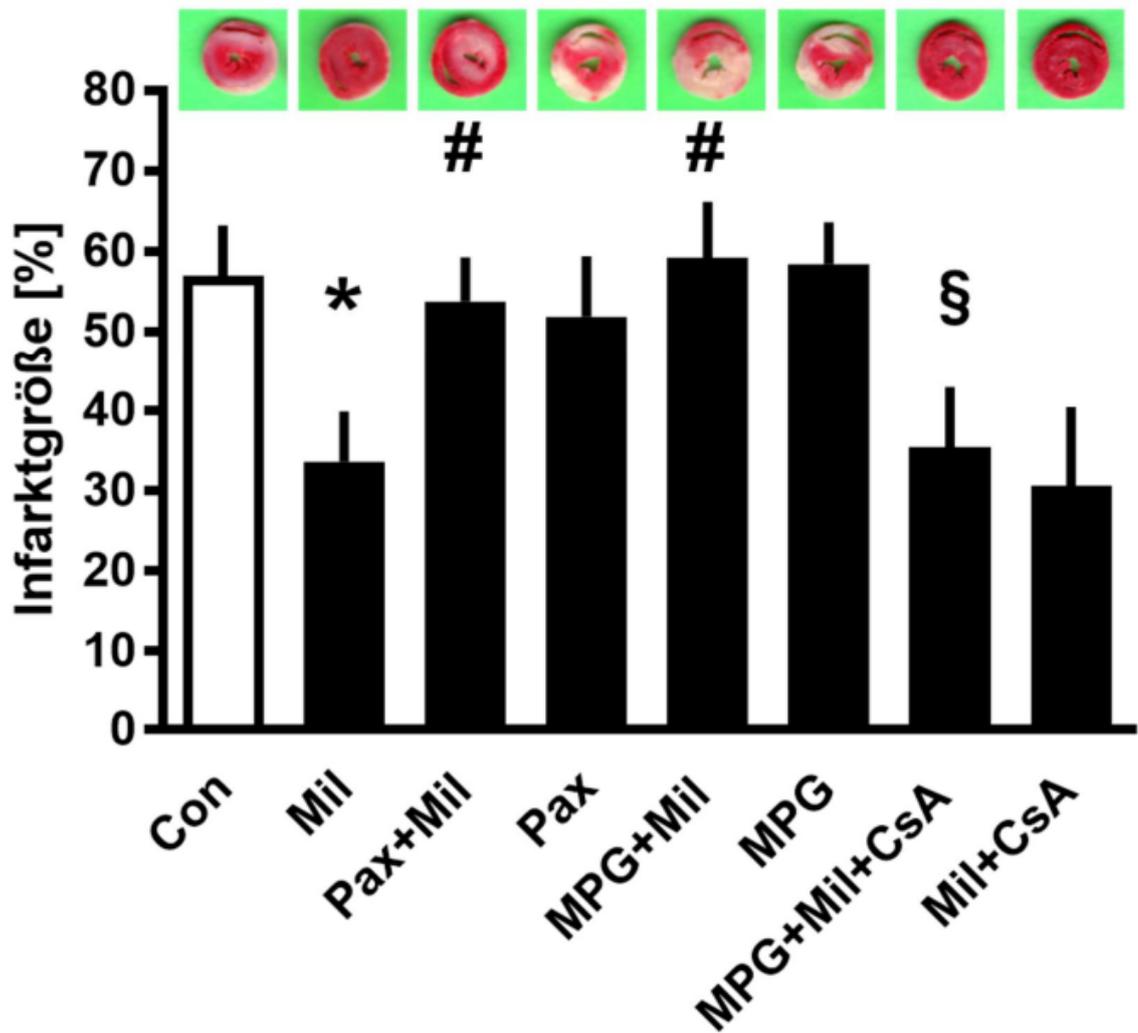


Abb. 4 **Infarktgrößen** Darstellung der Infarktgrößen der jeweiligen Versuchsgruppen. Mittelwerte \pm Standardabweichung, modifiziert nach [42]

* $P < 0,05$ vs. Con, # $P < 0,05$ vs. Mil, § $P < 0,05$ vs. MPG+Mil

Abkürzungen: Con = Kontrolle; Mil = Milrinon; Pax = Paxillin; MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin; CsA = Cyclosporin A

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersuchte die Wirksamkeit von Milrinon in der Präkonditionierung und legte dabei besonderes Augenmerk auf den kardioprotektiven Effekt sowie die Rolle des mK_{Ca} -Kanals und der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore als zentrale Zielstrukturen in der Signaltransduktion. Kardioprotektion bezeichnet in diesem Zusammenhang den Schutz des Herzens vor ischämischen Schäden, um die Morphologie und Funktion des Herzens nach einer Ischämie-Episode zu verbessern.

Das experimentelle Modell der Langendorff-Anlage mit isoliert retrograder Herzperfusion wurde gewählt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, unabhängig von systemischen Faktoren. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine ischämische Präkonditionierung in diesem Modell kardioprotektiv wirkt[44]. In der vorliegenden Studie wurde Milrinon, ein klinisch etablierter Phosphodiesterase-3-Inhibitor, verwendet, der über eine Erhöhung von cAMP zu einer verstärkten Calciumfreisetzung führt und somit eine positive Inotropie und periphere Vasodilatation vermittelt[45].

Im Rahmen eines randomisierten Studienprotokolls erfolgte die Gabe von Milrinon, gefolgt von einer Ischämie- und Reperfusionsphase. Zusätzlich wurden spezifische Substanzen eingesetzt, um die Rolle des $mKCa$ -Kanals und der mPTP zu untersuchen: Paxilline zur Blockade des $mKCa$ -Kanals, der Radikalfänger MPG zur Antagonisierung von ROS und CsA zur Stabilisierung der mPTP. Die minimal wirksame Dosis von Milrinon wurde aus einer vorherigen Dosisfindungsstudie bestimmt[42].

Die Ergebnisse zeigten, dass Milrinon vermutlich über eine Öffnung des $mKCa$ -Kanals zur Bildung von ROS beiträgt, welche die mPTP im geschlossenen Zustand stabilisiert und so die Apoptose verhindert. Insgesamt wurde ein kardioprotektiver Effekt von Milrinon über den $mKCa$ -Kanal und die mPTP nachgewiesen.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Studienaufbau

Das Prinzip der isolierten, extrakorporalen Perfusion von Säugetierherzen ist eine bereits gut etablierte und vielfach eingesetzte Methode. Durch sie wird eine isolierte Betrachtung der Physiologie und Morphologie des Herzens ermöglicht, ohne den Einfluss von potenziell störenden Faktoren berücksichtigen zu müssen. Durch Oscar Langendorff wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts ein Versuchsaufbau beschrieben, der diese extrakorporale Perfusion in einem festgeschriebenen, reproduzierbaren Rahmen gewährleistet[46]. Hierbei wird das Herz retrograd, zumeist mit Krebs-Henseleit-Puffer, perfundiert und seine Anpassungsreaktionen auf verschiedene Stimuli (Ischämie, Pharmaka etc.) beobachtet[47]. Durch den Einsatz dieses Puffers, sowie dessen Erwärmung und Anreicherung mit Sauerstoff werden näherungsweise physiologische Gegebenheiten geschaffen, wodurch das Herz auch extrakorporal über einen definierten Zeitraum annähernd physiologisch weiterarbeiten kann[48].

Obwohl durch den Einsatz des Puffers versucht wird, eine nahezu physiologische Situation für das Herz zu schaffen, ist dessen Zusammensetzung dennoch nicht mit tierischem Blut gleichzusetzen, woraus sich potenzielle Beeinflussungen der Homöostase des Herzens ergeben könnten. Skrzypiec-Spring *et al.* diskutierten in ihrem *Review* dazu unterschiedliche Zusammensetzungen von Perfusionspuffern [47]. Da der Puffer als einzige Energiequelle Glucose enthält, ist diese Konzentration mit 11g/mol höher als im Blut. Ebenso könnte die fehlende Proteinbindung im Puffer zu unphysiologisch hohen Elektrolytzusammensetzungen führen [47]. Durch eine reine kristalloide Lösung ist die Zusammensetzung des Puffers jedoch gut reproduzierbar. Ferner sind auch in dieser Hinsicht humorale Faktoren zu vernachlässigen, die beispielsweise in einer auf Blut basierenden Perfusionslösung enthalten wären. Allerdings haben kristalloide Lösungen zum einen den Nachteil, dass sie die Viskosität des Blutes nicht nachahmen können, zum anderen ist der onkotische Druck des KHP nicht identisch mit dem von Vollblut. Durch den Viskositätsunterschied ist der Koronardurchfluss bei Perfusion mit KHP höher als bei Blutfluss [47], wodurch das Endothel einem höheren Scherstress ausgesetzt ist. Die daraus resultierenden möglichen Endothelverletzungen könnten wiederum Faktoren freisetzen, die auf die Kardioprotektion Einfluss nehmen könnten. Durch einen niedrigeren onkotischen Druck kann es aufgrund von Auswärtsfiltration zu Gewebeödemen kommen [47]. Diese Ödeme könnten die Herzaktion negativ beeinflussen. Anhand des Herznassgewichts konnte allerdings gezeigt werden, dass sich diese in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant voneinander unterscheiden. Sollte der Gebrauch von KHP zur Ödembildung geführt haben, müsste diese demnach in allen Gruppen gleich stark ausgebildet gewesen sein, sodass der Einfluss auf die Ergebnisse vernachlässigbar ist.

Durch die Verwendung von kristalloidem Puffer an Stelle von Blut wird zudem einer artifiziellen Verunreinigung der Anlage vorausgegriffen[48].

Da das Herz im regelrechten Körperkreislauf zahlreichen Faktoren, wie humoraler und nervaler Steuerung, Einflüsse anderer Organsysteme oder auch der Immunabwehr unterlegen ist, wäre die isolierte Betrachtung eines Stimulus auf myokardiale Zellen im *in vivo* Modell nicht möglich. Diese interferierenden Faktoren sind im Langendorff-Modell gänzlich ausgeschaltet, wodurch der tatsächliche Einfluss auf die Myokardzellen sichtbar wird. Zudem unterliegen die applizierten Pharmaka -mangels eines physiologischen Organismus- keiner Pharmakokinetik, die Dosis des Pharmakons ist in jedem Versuchsaufbau gleich hoch und unterliegt keinen interindividuellen Unterschieden. Der zielgenaue Wirkmechanismus einer Substanz kann somit direkt an der Myokardzelle nachvollzogen werden, ohne potenzielle Beeinflussung durch etwaige Metabolite.

Die extrakorporale Perfusion eröffnet zudem die Möglichkeit des intrakardialen *Monitorings* der Herzphysiologie durch intraventrikuläre Drucksonden. Somit gelingt eine genaue Aufzeichnung der Veränderungen der Herzphysiologie als Antwort auf verschiedene gesetzte Stimuli. Die Platzierung dieser Drucksonden birgt allerdings die Gefahr der artifiziellen Verletzung des Myokards. Daher wurde die Platzierung jeweils mit höchster Vorsicht durchgeführt und der Druckballon nie mit mehr als 4-8mmHg des enddiastolischen Drucks befüllt. Ebenso müssen die chirurgische Präparation sowie die Ligatur des Herzens an der Anlage mit äußerster Sorgfalt durchgeführt werden, um Verletzungen am Herzen, wie beispielsweise das Durchstoßen der Aortenklappe mit der Kanüle der Anlage zu vermeiden. Um eine mögliche Verletzung des Herzens bei der Entnahme zu erfassen, erfolgte nach Beginn der Reperfusion an der Anlage zunächst eine genaue Beobachtungsphase, in der das Herz hämodynamisch intensiv überwacht wurde. Über- oder unterschritt das jeweilige Herz eine zuvor definierte hämodynamische Marke, sodass ein artifizieller myokardialer Schaden bei der Entnahme angenommen werden konnte, erfolgte ein Abbruch des Versuchs mit dem jeweiligen Herzen. Hierdurch wurde versucht potenziell vorgeschädigte Herzen noch vor Induktion einer möglichen kardioprotektiven Behandlung zu identifizieren und systematisch aus dem Versuch auszuschließen.

Hinsichtlich der Durchführung von Studien am isoliert perfundierten Herzen empfahlen Lindsey *et al.* einige Richtlinien [49]. Hier evaluierten sie unter anderem, dass eine globale Ischämie ausgelöst werden sollte, zudem empfehlen sie die Messung der Infarktgröße als primären Endpunkt der Studien. Dies soll zum einen die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten erhöhen, zum anderen erscheint die Bestimmung der Infarktgrößen als primärer Endpunkt im einer experimentellen Ansatz am besten durchführbar und am wenigsten durch Fehler belastet. Durch die Auslösung globalen, anstatt einer regionalen Ischämie

kann der mögliche kardioprotektive Effekt auf das gesamte Myokard überprüft werden, die Infarktgröße kann demnach genauer in Relation zum gesamtem linken Ventrikel bestimmt werden[49]. Dies wurde in der vorliegenden Studie durch den Versuchsaufbau umgesetzt.

Außerdem sehen die Autoren in-vitro-basierte Studien als optimal an, um grundlegende Mechanismen der Kardioprotektion auf Zellebene zu verstehen, da Einflüsse anderer Organsysteme nicht mit einbezogen werden müssten. Mit der Reproduzierbarkeit von kardioprotektiven Studien zur Verbesserung der Übersetzung in klinischen Studien befassten sich zudem auch Bøtker *et al.* Sie beschreiben detailliert, wie der Versuchsaufbau zur Standardisierung festgelegt werden sollte. Hier beziehen sie sich im Rahmen der Langendorff-Aparatur insbesondere auf die Versuchstiere, Aufbau der Anlage, Organentnahme, primäre Endpunkte (Infarktgrößenbestimmung) und zeitlichen Aufbau der jeweiligen Studien[50]. In unserer vorliegenden Studie wurde in den wesentlichen Punkten hierauf Rücksicht genommen, um ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Da immer wieder Einflüsse des Geschlechts der Tiere und dementsprechende hormonelle *Confounder* in Studien postuliert wurden [51], führten wir unsere Studie lediglich an männlichen Ratten durch um mögliche hormonelle Interaktionen auszuschließen. Insgesamt beschränkten sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede, die in der überwiegenden Literatur beschrieben wurden insbesondere auf eine Veränderung des hämodynamischen *Outcomes* [51], während die Infarktgrößen sich nicht signifikant voneinander unterschieden [52]. Da in unserer Studie jedoch weibliche Versuchstiere ausgeschlossen wurden, lassen sich mögliche hormonelle Einflüsse auch auf die hämodynamischen Parameter nicht nachweisen. Insgesamt ist es aufgrund des isolierten Herzens allerdings fraglich, inwieweit überhaupt eine hormonelle Beeinflussung am isoliert perfundierten Herzen stattgefunden hätte. Dennoch erschien das Ausschließen dieses Störfaktors als sinnvoll, um sich isoliert auf die pharmakologisch induzierte kardioprotektive Signaltransduktion zu konzentrieren.

Insgesamt konnten durch den Einsatz des Langendorff-Modells und der isolierten retrograden Herzperfusion in dieser Studie die kardioprotektiven Effekte verschiedener pharmakologischer Interventionen in einem kontrollierten, reproduzierbaren Umfeld untersucht werden. Die Auswahl des Krebs-Henseleit-Puffers und die Minimierung potenzieller Störfaktoren, wie humorale und nervale Einflüsse, ermöglichten eine direkte Beobachtung der myokardialen Reaktionen auf Ischämie und Reperfusion.

Die Anwendung des Langendorff-Modells ermöglichte zudem die genaue Messung hämodynamischer Parameter und die Bestimmung der Infarktgrößen, was als primärer Endpunkt zur Bewertung des kardioprotektiven Effekts diente. Durch die strikte Kontrolle

der experimentellen Bedingungen konnten die Einflüsse der getesteten Pharmaka isoliert betrachtet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Versuche präsentiert, wobei insbesondere die Effekte der Pharmaka auf die Infarktgröße analysiert werden. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, inwiefern die postulierten Signalwege, insbesondere der mK_{Ca} -Kanal und die mPTP, in die kardioprotektive Wirkung der Pharmaka involviert sind.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Kardioprotektive Effekte von Milrinon

In der vorliegenden Studie wurde der Fokus darauf gelegt, zu überprüfen, ob Milrinon in der Präkonditionierung einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt auf das isolierte Herz im Langendorff-Modell zeigt, wie es bereits für die Postkonditionierung nachgewiesen wurde. Durch eine signifikante Reduktion der Infarktgröße in der Milrinon-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte der kardioprotektive Effekt von Milrinon in der Präkonditionierung nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Milrinon das Myokard effektiv vor den schädlichen Auswirkungen der Ischämie schützt, indem es die Ausdehnung des Infarktareals deutlich verringert und somit den ischämiebedingten Zellschaden reduziert. Die Dosis, in der Milrinon in diesem Versuchsaufbau kardioprotektiv wirksam wurde, lag bei $1\mu\text{M}$ Milrinon, dies entspricht 211ng/ml Milrinon[42].

Klinisch wird Milrinon bereits zur Kurzzeittherapie der schweren Herzinsuffizienz eingesetzt. Hierbei liegt die Standarddosierung in einem Bereich von $100\text{-}300\text{ng/ml}$ ($0,5\text{-}1,4\mu\text{M}$). Demnach liegt die im vorliegenden Versuch benötigte Dosierung im unteren Bereich der bereits klinisch etablierten Dosierung von Milrinon. Auch eine *in vivo* Studie an Ratten konnte den kardioprotektiven Effekt von Milrinon, gemessen an einer Reduktion der Infarktgröße, bereits nachweisen[43] Huang *et al.* infundierten dazu in einem *in-vivo*-Modell an Ratten 5min vor Beginn der Reperfusion für 10min $5\mu\text{g/kg/min}$ Milrinon. Hierunter konnte eine Reduktion der Infarktgröße des linken Ventrikels im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich nachgewiesen werden. Die Dosierung, die von Huang *et al.* verwendet wurde, stellt gerade einmal $1/10$ der klinisch empfohlenen Initialdosis dar, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass kardioprotektive Dosen von Milrinon auch in den klinisch etablierten Dosierungsbereich fallen[45]. Während frühere Studien, wie die von Huang *et al.*, den kardioprotektiven Effekt von Milrinon in der Postkonditionierung demonstrierten, zeigen unsere Daten nun erstmals, dass dieser Effekt auch in der Präkonditionierung nachgewiesen werden kann [42].

Insgesamt lagen die in der Studie verwendeten Plasmaspiegel, wie zuvor erwähnt, am unteren Ende der klinisch etablierten Dosierungen. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine geringere Konzentration des Pharmakons möglicherweise mit einem reduzierten Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) verbunden sein könnte. Eine direkte Übertragung der kardioprotektiven Ansätze in klinische Studien ist bislang jedoch nicht gelungen, was vor allem auf die zahlreichen *Confounder* sowie die Vielzahl an Begleitmedikationen zurückzuführen ist, die mit potenziell kardioprotektiven Wirkstoffen interagieren könnten[50].

Die beobachtete kardioprotektive Wirkung von Milrinon in der Präkonditionierung wirft die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen auf, die für diesen Effekt verantwortlich sind. Im folgenden Kapitel werden daher die Mechanismen der Milrinon-induzierten Kardioprotektion genauer betrachtet, um ein tieferes Verständnis der Signalwege zu gewinnen, die zu diesem Schutz des Myokards führen.

4.2.2 Mechanismen der Milrinon-induzierten Kardioprotektion

Die molekularen Mechanismen, durch die Milrinon seinen kardioprotektiven Effekt entfaltet, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ein umfassendes Verständnis dieser Signalkaskade würde jedoch die gezielte Beeinflussung kardioprotektiver Mechanismen ermöglichen, die im Kontext einer kritischen kardialen Ischämie therapeutisch genutzt werden könnten. Aus diesem Grund stellt die detaillierte Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Signalwege einen zentralen wissenschaftlichen Ansatzpunkt dar und bildet die Grundlage der Fragestellung dieser Arbeit.

Da von anderen Konditionierungen, beispielsweise der Postkonditionierung mit Milrinon (Behmenburg *et al.* [1]) bereits bekannt ist, dass der kardioprotektive Effekt in den Mitochondrien vermutlich über die mK_{Ca} -Kanäle sowie der mPTP vermittelt wird, postulierten wir dies auch als mögliche kardioprotektive Signalkaskade in der Präkonditionierung mit Milrinon. Um diese Hypothese experimentell zu untersuchen, setzten wir Antagonisten bzw. Agonisten für die jeweiligen Kanäle ein, die zuvor bereits in der Literatur beschrieben wurden.

An Knock-Out Mäusen für mBK_{Ca} -Kanäle konnten Soltysinska *et al.* bereits zeigen, dass dieser Kanal essenziell für eine Kardioprotektion ist, da durch eine ischämische Präkonditionierung keine Infarktgrößenreduktion mehr induziert werden konnte [53]. In dieser Studie verwendeten sie Mäuse, denen das $KCNMA1$ -Gen fehlte, welches für die poren-bildende Untereinheit der mBK_{Ca} -Kanäle kodiert. Eine weitere Studie, die die Beteiligung der mBK_{Ca} -Kanäle an der Kardioprotektion zeigen konnte, nutzte den kardial hoch sensitiven mBK_{Ca} -Kanal-Aktivator NS11021[20]. Hierbei beobachteten Bentzen *et al.* am isolierten perfundierten Herzen den Effekt von NS11021 in der Präkonditionierung und wiesen eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach, weshalb sie von einer Beteiligung der mBK_{Ca} -Kanäle an der kardioprotektiven Signaltransduktion ausgingen[20]. Mit Hilfe eines weiteren Aktivators der mBK_{Ca} -Kanäle konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die kardioprotektiven Effekte, die über die mBK_{Ca} -Kanäle vermittelt werden, scheinbar unabhängig vom Alter zu sein scheinen [35]. Hier konnten Heinen *et al.* mit dem mBK_{Ca} -Kanal-Aktivator NS1619 eine Infarktgrößenreduktion sowohl bei jungen als auch bei alten Ratten nachweisen, weshalb ein altersunabhängiger Effekt postuliert wird. Aufgrund dieser Tatsache ist der mBK_{Ca} -

Kanal ein interessanter Ansatzpunkt zur Induktion der Kardioprotektion, da diese in der klinischen Realität auch aufgrund des Alters großen Einschränkungen unterliegt. Im klinischen Umfeld ist die KHK eine Erkrankung des höheren Lebensalters, somit ist es interessant Zielstrukturen der kardioprotektiven Signalkaskade zu identifizieren, die vom Alter unbeeinflusst sind, um diese im klinischen Setting zukünftig nutzen zu können.

Um die Beteiligung des mBK_{Ca} -Kanals an der kardioprotektiven Signaltransduktion in dieser Studie zu belegen, verwendeten wir den mBK_{Ca} -Kanal-Inhibitor Paxillin. Dieses Indol-Diterpen aus der Familie der tremorgenen Mykotoxine des *Penicillium paxilli* ist in der Literatur als allosterischer Modulator der mBK_{Ca} -Kanäle bekannt [54]. Paxillin bindet sich dabei an die α -Untereinheit von mBK_{Ca} -Kanäle und stabilisiert den Kanal im geschlossenen Zustand [55]. Zusätzlich hat Paxillin eine höhere Affinität zu bereits geschlossenen Poren, sodass es seinen Effekt weiterhin verstärkt [56]. In der Literatur wird eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 0,35-0,70 $\mu\text{mol/l}$ beschrieben [57]. Daher kann angenommen werden, dass die verwendete Dosierung von $1\mu\text{M}$ Paxillin in dieser Studie ausreichend gewesen sein sollte, um die mBK_{Ca} -Kanäle durch Paxillin vollständig zu blockieren.

Kombinierte man Paxillin mit Milrinon, zeigten sich im Vergleich zur alleinigen Verwendung von Milrinon signifikant größere Infarktareale. Somit scheinen die mBK_{Ca} -Kanäle in der vorliegenden Studie an der Kardioprotektion beteiligt gewesen zu sein [42].

Eine weitere, zuvor postulierte Beteiligung an der kardioprotektiven Wirkung von Milrinon spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Durch die Öffnung von mBK_{Ca} -Kanälen kommt es vermutlich zu einer (vermehrten) Bildung von ROS. Dass die Bildung von ROS eng an die mBK_{Ca} -Kanäle geknüpft sind zeigen mehrere Studien, die im Folgenden vorgestellt werden. Insgesamt ist die Beteiligung von ROS an der Kardioprotektion sehr ambivalent. Zu niedrige Konzentrationen an ROS lösen keinen zytotoxischen Effekt aus während zu hohe Konzentrationen an ROS ihrerseits schädliche Effekte auf die Zelle induzieren [58]. So wird beispielsweise bei fehlenden mBK_{Ca} -Kanälen in den oben erwähnten $KCNMA1^{-/-}$ -Mäusen nach erfolgter Reperfusion eine große Menge an ROS in den Mitochondrien freigesetzt, wodurch es zu großen Infarktarealen kam [53]. Die enge Beziehung der ROS-Freisetzung mit mBK_{Ca} -Kanälen konnte auch durch eine Studie an Meerschweinchen von Heinen *et al.* gezeigt werden. Hier wurde durch den mBK_{Ca} -Kanal-Öffner NS1619 eine erhöhte Konzentration von ROS in den Kardiomyozyten nachgewiesen, während die zusätzliche Gabe von Paxillin diesen Effekt auf die ROS-Produktion wiederum aufhob [59].

In der vorliegenden Studie wurde die Beteiligung von ROS am kardioprotektiven Effekt von Milrinon mit dem Radikalfänger MPG untersucht. Hier zeigte sich, dass die Infarktgrößenreduktion von Milrinon bei zusätzlicher Gabe von MPG aufgehoben

wurde[42]. Somit scheinen ROS eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Milrinon zu spielen. Insgesamt ist die Beteiligung von ROS schwierig nachzuweisen, da bisher keine valide, selektive Messung von ROS in Organsystemen etabliert ist [60]. Zudem ist aktuell noch nicht bekannt, welche Konzentrationen von ROS einen protektiven bzw. schädlichen Effekt induzieren.

Als Endpunkt der kardioprotektiven Signalkaskade in den Mitochondrien wird in der Literatur insbesondere die mPTP angesehen [13]. Der detaillierte Aufbau sowie die molekularen Abläufe an der mPTP während einer Ischämieepisode wurde bereits in Kapitel 1.2.3 ausführlich beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Stabilisierung der mPTP im geschlossenen Zustand eine Apoptose der Zelle verhindert wird. Dieser Stabilisierungsvorgang kann durch die Aktivierung der kardioprotektiven Signalkaskade beispielsweise durch Konditionierung unterstützt werden. Einen direkten Nachweis der Beteiligung der mPTP in der Präkonditionierung mit Milrinon wurde bisher noch nicht beschrieben. Matsumoto *et al.* zeigten 2012, dass der kardioprotektive Effekt von Milrinon in der Postkonditionierung durch den mPTP-Öffner Acetateosid aufgehoben werden konnte [41]. In unserer Studie nutzten wir Cyclosporin A (CsA), ein lipophiles, zyklisches Peptid aus 11 Aminosäuren, das aus *Tolypocladium inflatum Gams* isoliert wurde [61]. CsA hemmt die Öffnung der mPTP durch eine Bindung an das Regulatorprotein Prolyl-Isomerase Cyclophilin D [61]. In unserer Studie nutzten wir eine Konzentration von 200nM CsA. Für diese Dosierung konnten bereits einige Vorstudien einen kardioprotektiven Effekt am Rattenherzen nachweisen [62, 63]. Auf eine Versuchsgruppe mit der alleinigen Gabe von CsA wurde aufgrund von tierethischen Gründen verzichtet, da bereits durch eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die isolierte Gabe von CsA in der Postkonditionierung kardioprotektiv wirkt[1]. Durch den Einsatz von CsA kam es auch ohne Zugabe von Milrinon zu einer Reduktion der Infarktgrößen, während die Kombination aus Milrinon und CsA keinen additiven Effekt auf die Infarktgrößenreduktion aufweisen konnte[42]. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich demnach, dass durch eine Reduktion der ROS-Konzentration (induziert durch MPG) der Effekt von Milrinon aufgehoben wurde. Setzt man voraus, dass ROS und CsA die mPTP im geschlossenen Zustand stabilisieren, kann durch die Ergebnisse der Studie demnach eine Beteiligung der mPTP am kardioprotektiven Effekt in der Präkonditionierung durch Milrinon vermutet werden. Unsere Studie bestätigt somit nicht nur die bereits etablierte kardioprotektive Wirkung von Milrinon im experimentellen Ansatz, sondern weist zudem darauf hin, dass der mK_{Ca} -Kanal eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion spielt. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die molekularen Mechanismen der Kardioprotektion durch Milrinon besser zu verstehen und bieten eine Grundlage für zukünftige experimentelle Ansätze zur weiteren Erforschung der kardioprotektiven Signalkaskade.

4.3 Limitationen

Wie bei jeder experimentellen Studie müssen auch in der vorliegenden Arbeit bestimmte Limitationen berücksichtigt werden, die potenziell Einfluss auf die Generalisierbarkeit und Interpretation der Ergebnisse haben könnten. Diese Limitationen betreffen sowohl methodische Aspekte des Studienaufbaus als auch biologische Faktoren, die im experimentellen Modell nicht vollständig abgebildet werden können. Im folgenden wird daher insbesondere auf die Limitationen der Arbeit näher eingegangen.

Als Versuchstiere wurden nur junge, männliche und gesunde Ratten verwendet. Dadurch wird möglichen *Confoundern*, wie Alter, hormonelle Einflüsse und Vorerkrankungen sowie -medikationen keinen Interpretationsspielraum gelassen. All diese Parameter sind selbstverständlich im klinischen Alltag relevant, weshalb eine Übertragung auf den Menschen, der bereits mit starken *Confoundern* belastet ist, schwierig ist.

So wurde beispielsweise in einer nachfolgenden Studie der Arbeitsgruppe gezeigt, dass kardioprotektive Effekte durch die Gabe des alpha-2-Adrenozeptor-Agonist Dexmedetomidin unter hyperglykämischen Bedingungen aufgehoben wurden[64]. Im klinischen *Setting* ist eine hyperglykämie Stoffwechsellage im Rahmen eines metabolischen Syndroms oder Diabetes mellitus jedoch häufig. Diese Patient:innengruppe ist zusätzlich prädestiniert für eine Erkrankung an einer KHK. Dementsprechend könnten kardioprotektive Effekte in dieser Patient:innengruppe möglicherweise durch eine Hyperglykämie neutralisiert werden.

Zudem könnte eine vorhandene Komedikation weiterhin Einfluss auf den Erfolg einer (pharmakologischen) Konditionierung haben. So konnte bereits durch Bunte *et al.* gezeigt werden, dass der kardioprotektive Effekt von Milrinon durch die gleichzeitige Gabe von Dexmedetomidin aufgehoben wird[65]. Für einige in der klinischen Praxis weit verbreitete Anästhetika konnte gezeigt werden, dass sie mit kardioprotektiven Ansätzen interferieren[66]. In Hinsicht auf eine mögliche klinische Anwendung, beispielweise auf der Intensivstation, wo zusätzlich zur Verabreichung von Milrinon zur Herzinsuffizienztherapie sedierende Maßnahmen mit Anästhetika aufgrund der Schwere der Erkrankungen notwendig sind, schränkt dies die mögliche Wirksamkeit von kardioprotektiven Substanzen deutlich ein. Umso wichtiger erscheint die vollständige Erforschung der grundlegenden kardioprotektiven Signaltransduktion, um gezielt in diese therapeutisch eingreifen zu können.

Bezüglich möglicher Interaktionspotentiale mit etwaiger Komedikation ist sicherlich die Pharmakokinetik- und -dynamik von Milrinon zu betrachten. Der Metabolismus und die Ausscheidung von Milrinon im menschlichen Körper wird überwiegend durch Oxidation,

Konjugation und Glucuronidierung umgesetzt [67]. Ein überwiegender Teil des Milrinons wird allerdings unverändert renal eliminiert (83%), sodass insbesondere die häufige Interaktion mit CYP-Enzymen vernachlässigbar sein sollte [43]. Ferner wird die Halbwertszeit mit 2-3h beschrieben, sodass eine mögliche Arzneimittelinteraktion nach kurzer Zeit beendet sein sollte.

Überdies wurde in unserer Studie nur das isolierte Herz betrachtet, übrige Einflüsse anderer Organsysteme, des Immun- oder Nervensystems auf eine mögliche Kardioprotektion sowie humorale Faktoren wurden gänzlich vernachlässigt. Diese Limitationen wurden in Kauf genommen, um einen rein isolierten Blick auf die Mechanismen im Kardiomyozyten selbst, ohne etwaige *Confounder* vornehmen zu können. Allerdings ist es denkbar, dass weitere Zwischenschritte der kardioprotektiven Signalkaskade durch das Studienprotokoll nicht vollständig erfasst wurden. Hier bedarf es *Follow-Up*-Studien, die versuchen die kardioprotektive Signalkaskade in Gänze aufzudecken.

Betrachtet man den Ansatz der Präkonditionierung im klinischen Kontext, ist die realistische Durchführbarkeit eingeschränkt. Eine akute Ischämie ist in den seltensten Fällen (bspw. Coronarbypass, PCI) planbar, in der Regel werden die Patient:innen bereits mit einer akuten Ischämie in der Klinik vorstellig. Dadurch ist der Zeitpunkt der Präkonditionierung bereits abgelaufen. Insgesamt bieten allerdings auch peri- und postkonditionierende Maßnahmen im experimentellen Ansatz vielversprechende Ergebnisse[68]. Erschwerend kommt hinzu, dass in der akuten Notfallsituation häufig nicht alle Vorerkrankungen oder -medikamente der Patient:innen bekannt sind. Daher kann in dieser Situation nicht auf eine kardioprotektive Substanz zurückgegriffen werden, die eine mögliche Interaktion berücksichtigt. Auch dies zeigt die Notwendigkeit eines Pharmakons, das seinen kardioprotektiven Effekt gänzlich unbeeinflusst von Vorerkrankungen oder -medikation bewirkt. Im Rahmen von o.g. elektiven planbaren Interventionen und Operationen wäre der gezielte Einsatz einer Präkonditionierung denkbar.

Die Gabe eines potenziell kardioprotektiven Medikaments zur Sekundärprävention bei der Diagnose einer KHK erscheint aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsprofils der bisher untersuchten Substanzen hinsichtlich einer Nutzen-Risiko-Abwägung ebenfalls als nicht realistisch.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorliegende Studie trotz ihrer methodischen Stärken bestimmte Limitationen aufweist, die die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränken könnten. Insbesondere die Verwendung von isolierten Herzen, die Beschränkung auf junge, gesunde männliche Ratten und die fehlende Berücksichtigung klinisch relevanter Faktoren wie Komedikation und Vorerkrankungen sind zu

berücksichtigen. Diese Einschränkungen mindern jedoch nicht die Aussagekraft der experimentellen Ergebnisse zur grundlegenden Aufklärung der kardioprotektiven Mechanismen von Milrinon. Für eine klinische Anwendung sind jedoch weiterführende Studien notwendig, die diese Faktoren mit einbeziehen.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich ein klarer Bedarf an zukünftigen experimentellen Studien, die darauf abzielen, die Translation der hier gewonnenen Erkenntnisse in die klinische Praxis zu ermöglichen. Im folgenden Kapitel „Ausblick“ wird dargelegt, welche weiteren Schritte erforderlich sind, um die kardioprotektiven Mechanismen von Milrinon tiefergehend zu verstehen und möglicherweise potenzielle Ansätze für die klinische Anwendung zu entwickeln.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Milrinon nicht nur in der Postkonditionierung, sondern auch in der Präkonditionierung einen kardioprotektiven Effekt entfaltet. Darüber hinaus wurden Mechanismen der Signaltransduktion genauer untersucht, insbesondere die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore als vermutlicher Endpunkt der Kaskade. Zukünftige Forschung könnte sich ergänzend zur mitochondrialen Signalkaskade auch auf Veränderungen der Genexpression sowie humorale Einflüsse konzentrieren, um das Verständnis der kardioprotektiven Effekte noch weiter zu vertiefen.

Anknüpfend an der vorliegenden Studie sollte unter anderem die Rolle von ROS im Rahmen der Kardioprotektion weiter untersucht werden. Wie bereits beschrieben, zeigt die ROS-Konzentration eine ambivalente Wirkung im Zusammenhang mit einem potenziellen Schaden oder Nutzen nach einem ischämischen Ereignis[60]. Zur Gewinnung weiterführender Erkenntnisse erscheint es sinnvoll, zunächst eine valide Methode zur Bestimmung der ROS-Konzentration in vitro zu entwickeln. Eine präzise Quantifizierung der ROS-Konzentration unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie etwa ischämischer Prä- und Postkonditionierung oder pharmakologischer Konditionierung, würde eine differenzierte Analyse ermöglichen. Diese Methodik könnte eine detaillierte Bewertung spezifischer ROS-Konzentrationen in Hinblick auf deren potenziell schädigende oder protektive Effekte auf Kardiomyozyten erlauben. Darüber hinaus könnte die ROS-Konzentration als Marker für aktivierte kardioprotektive Prozesse herangezogen werden, wodurch Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Schutzmechanismen ermöglicht würden.

Angesichts der aktuellen Erkenntnisse zur Signalkaskade stellt sich die Frage, inwieweit zusätzliche Faktoren an dieser Kaskade beteiligt sein könnten. Insbesondere der aktuell favorisierte Endpunkt der Kaskade, die mPTP, sollte kritisch hinterfragt werden. Sollte sich diese tatsächlich als der Endpunkt der mitochondrialen kardioprotektiven Signalkaskade erweisen, könnte eine gezielte, spezifische Einflussnahme auf diesen Kanal den meisten Benefit in der pharmakologischen Kardioprotektion versprechen. Insbesondere hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen oder Wechselwirkungen zwischen Vormedikamenten sowie der Beeinflussbarkeit durch das Alter der Patient:innen wäre es empfehlenswert eine gezielte Einflussnahme auf einen Endpunkt der Signalkaskade zu realisieren.

Weiterhin ist das Betrachten des Mitochondriums als alleiniger Effektor der Kardioprotektion sicherlich nicht uneingeschränkt zielführend. Zwar zeigt sich in vielen experimentellen Studien, dass ein Großteil der kardioprotektiven Signaltransduktion über

die Mitochondrien realisiert wird, insbesondere mit Hinblick auf eine mögliche klinische Übertragbarkeit ist ein Blick über das Mitochondrium hinaus jedoch angezeigt. Im Zuge des weiteren Verständnisses des I/R-Schadens sollten daher noch weitere Zellorganellen, unterschiedliche Signalwege und humorale sowie nervale Faktoren berücksichtigt werden. Zudem ist ein Zusammenspiel des Herzens im gesamten Organsystems in vivo weiter zu untersuchen. Hier sollte auch ein Fokus auf weitere, durch eine Ischämie induzierte, pathophysiologische Vorgänge gelegt werden. Insbesondere auf eine Ödembildung sowie endotheliale Dysfunktion und Obstruktion im Rahmen der Ischämie wird aktuell schon in der Literatur Rücksicht genommen [69]. In der klinischen Umsetzung könnte nach Aufdeckung einer multifaktoriellen Signalkaskade auch ein Pharmakon sinnvoll sein, das mehrere Schritte der Signaltransduktion angreift [70]. Insbesondere einer möglichen Blockierung eines Zwischenschritts der Kardioprotektion durch Alter, Vorerkrankung oder Vormedikation der Patient:innen könnte so versucht werden zuvor zu kommen.

Wie im vorherigen Kapitel bereits ausführlich dargelegt, erfahren die Ergebnisse insbesondere bei der Übertragung in die Klinik große Einschränkungen. So haben zuvor vielversprechende experimentelle Ansätze in groß angelegten klinischen Studien zumeist enttäuscht. Insbesondere von dem Einsatz von CsA versprach man sich nach sehr erfolgsversprechenden experimentellen Daten auch einen klinischen Nutzen. In einer klein angelegten klinischen *Proof-of-concept*-Studie konnte tatsächlich eine Infarktgrößenreduktion durch die Applikation von CsA während der Reperfusion durch PCI gezeigt werden [30]. Zwei größer angelegte Phase II-Studien, unter anderem die CIRCUS-Studie, zeigten hingegen keinen Effekt von CsA auf die Infarktgrößen [31]. In der Literatur wird spekuliert, dass dies möglicherweise auf zu niedrige Dosierungen von CsA zurückzuführen sei. Auch eine Komedikation mit einem P2Y12-Inhibitor sowie die zu späte Applikation von CsA in der CIRCUS-Studie werden als Gründe für den ausbleibenden Erfolg von CsA diskutiert [71].

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass für eine verbesserte klinische Übertragbarkeit bestimmte Voraussetzungen in experimentellen und klinischen Studien erfüllt sein müssen. Mehrere Arbeitsgruppen befassen sich bereits mit der Schaffung eines einheitlichen Rahmens, um die Planung und Durchführung experimenteller Studien zu standardisieren [50, 72, 73]. Problematisch ist vor allem ein Vergleich der verschiedenen Studien untereinander, da zuvor kein einheitliches Versuchsprotokoll etabliert wurde. So unterscheiden sich einige Studien hinsichtlich der Dauer von Ischämie und Reperfusion, der Bestandteile des Puffers sowie der genauen Applikation der Medikamente [74], wodurch es zur Beeinflussung der jeweiligen Ergebnisse kommen könnte. Außerdem kommt es im Rahmen von experimentellen Studien zu einer Publikations-Bias, da gehäuft nur positive Daten publiziert werden [72]. Die meisten experimentellen Studien werden aktuell an Nagern

durchgeführt. Hier liegt allerdings ein weiteres Problem hinsichtlich der Übertragbarkeit in die Klinik. Die Inter-Spezies-Variabilität ist bei Nagern im Vergleich zum Menschen recht hoch. Daher wäre die Verifizierung von zuvor an Nagern gewonnen Erkenntnissen an größeren Tieren sinnvoll. Dazu eignen sich vor allem Schweine, da Schweineherzen dem menschlichen Herzen hinsichtlich Anatomie, Hämodynamik und pathophysiologische Reaktionen auf einen Ischämie am nächsten sind [75].

Diese geschilderten Einschränkungen griffen u.a. Hausenloy *et al.* in ihrem Positionspapier der *European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart* auf und formulierten darin Vorschläge zur Verbesserung von experimentellen und klinischen Studien im Forschungsfeld der Kardioprotektion [70]. Demnach sollten Erkenntnisse, die an kleinen (Nager-) Tiermodellen gewonnen wurden anschließend an größeren Tiermodellen verifiziert werden. Außerdem sollten diese Studien multizentrisch durchgeführt werden, um die Reproduzierbarkeit zu fördern. Dem Einfluss von Alter sowie Vorerkrankungen und -medikation sollte in der Grundlagenforschung ein größerer Stellenwert eingeräumt werden, um eine klinisch realistischere Situation zu schaffen. Der Publikationsbias könnte durch eine Registrierung von experimentellen Studien, angelehnt an die Registrierung bei klinischen Studien, vorgegriffen werden. Da im klinischen Kontext die Infarktgröße allein nicht unbedingt entscheidend für die Wirksamkeit einer potenziell kardioprotektiven Substanz ist, sollten die Endpunkte experimenteller Studien auch die kardiale Funktion sowie Langzeitparameter wie Morbidität und Langzeitmortalität berücksichtigen.

Nach ausführlicher experimenteller Testung eines möglichen kardioprotektiven Pharmakons sollten auch bei der Planung von klinischen Studien einige Parameter berücksichtigt werden. Hierbei sollte insbesondere die präzise Festlegung enger Ein- und Ausschlusskriterien sowie eine sorgfältige Definition der primären Endpunkte der Studie berücksichtigt werden[73].

Zusammenfassend trägt die vorliegende Arbeit weiter zum Verständnis der kardioprotektiven Signalkaskade bei und hebt insbesondere die Rolle spezifischer molekularer Mechanismen hervor, die für die kardioprotektive Wirkung relevant sind. Angesichts der hohen Komplexität dieser Mechanismen sind weiterführende Studien notwendig, um den Einfluss von Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen und Vormedikation auf die Kardioprotektion zu untersuchen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Praxis zu verbessern. Ein vertieftes Verständnis dieser Mechanismen könnte langfristig die Entwicklung spezifischer kardioprotektiver Therapien unterstützen und so die Behandlungsmöglichkeiten für Patient:innen mit ischämischen Herzerkrankungen maßgeblich verbessern.

5. Literaturverzeichnis

1. Behmenburg, F., et al., *Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca(2+)-sensitive Potassium (mBKCa) Channels*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2018. **32**(5): p. 2142-2148.
2. Herold, G.u.M., *Innere Medizin*. 2017: p. 237-251.
3. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) *Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK Kurzfassung*. 2016.
4. WHO. *The top 10 causes of death*. 2020 09.12.2020; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=Leading%20causes%20of%20death%20globally&text=The%20world%27s%20biggest%20killer%20is,8.9%20million%20deaths%20in%202019.>
5. Bundesamt, S. *Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10*. 2023 15.11.2023; Available from: https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gastd&p_aid=29169329&p_sprache=D&p_help=0&p_indnr=516&p_indsp=4065&p_ityp=H&p_fid=#AKT.
6. Gößwald, A., et al., *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland*. 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
7. Wiesner, G., J. Grimm, and E. Bittner, *Vorausberechnungen des Herzinfarktgeschehens in Deutschland*. 2002, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
8. Bundesamt, S. *Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2022*. 2023 15.11.2023 [cited 2024; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html#fussnote-2-119570>..
9. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
10. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
11. Hadebe, N., M. Cour, and S. Lecour, *The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target?* Basic Res Cardiol, 2018. **113**(2): p. 9.
12. Rosenberg, J.H., et al., *Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning*. J Cardiovasc Transl Res, 2018. **11**(4): p. 292-307.
13. Boengler, K., G. Lochnit, and R. Schulz, *Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **315**(5): p. H1215-h1231.
14. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
15. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial Reperfusion Injury*. 2007. **357**(11): p. 1121-1135.
16. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
17. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(2): p. 69-75.
18. Ong, S.B., et al., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 23-34.
19. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.

20. Bentzen, B.H., et al., *Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury.* Pflugers Arch, 2009. **457**(5): p. 979-88.
21. Ghatta, S., et al., *Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications.* Pharmacol Ther, 2006. **110**(1): p. 103-16.
22. Shintani, Y., et al., *Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(6): p. 1213-8.
23. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning.* J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 644-50.
24. Singh, L., et al., *Investigating the possible mechanisms involved in adenosine preconditioning-induced cardioprotection in rats.* Cardiovasc Ther, 2018. **36**(3): p. e12328.
25. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II).* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.
26. Okawa, H., et al., *Preischemic infusion of alpha-human atrial natriuretic peptide elicits myoprotective effects against ischemia reperfusion in isolated rat hearts.* Mol Cell Biochem, 2003. **248**(1-2): p. 171-7.
27. Kitakaze, M., et al., *Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials.* Lancet, 2007. **370**(9597): p. 1483-93.
28. Bullard, A.J., P. Govewalla, and D.M. Yellon, *Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo.* Basic Res Cardiol, 2005. **100**(5): p. 397-403.
29. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
30. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.* N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
31. Cung, T.T., et al., *Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction.* N Engl J Med, 2015. **373**(11): p. 1021-31.
32. Péter Ferdinandy, D.J.H., Gerd Heusch, Gary F. Baxter, Rainer Schulz, *Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning.* Pharmacological Reviews, 2014(66): p. 1142-1174.
33. Zhu, J., et al., *Interactions of GSK-3beta with mitochondrial permeability transition pore modulators during preconditioning: age-associated differences.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(4): p. 395-403.
34. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A.* Exp Gerontol, 2012. **47**(1): p. 116-21.
35. Heinen, A., et al., *Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway.* Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 99-105.
36. Satoh, H. and M. Endoh, *Effects of a new cardioprotective agent 1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-5-[imidazo (1,2-a) pyridin-6-yl]-3-pyridine carbonitrile hydrochloride monohydrate (E-1020) on contractile force and cyclic AMP metabolism in canine ventricular muscle.* Jpn J Pharmacol, 1990. **52**(2): p. 215-24.
37. Rong, L.Q., et al., *Intravenous and Inhaled Milrinone in Adult Cardiac Surgery Patients: A Pairwise and Network Meta-Analysis.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2019. **33**(3): p. 663-673.
38. Sanada, S., et al., *Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase.* Circulation, 2001. **104**(6): p. 705-10.
39. Kume, M., et al., *Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone.* J Surg Res, 2006. **136**(2): p. 209-18.

40. Saklani, R., A. Jaggi, and N. Singh, *Pharmacological preconditioning by milrinone: memory preserving and neuroprotective effect in ischemia-reperfusion injury in mice*. Arch Pharm Res, 2010. **33**(7): p. 1049-57.
41. Matsumoto, S., et al., *Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts*. Cardiovasc Diabetol, 2012. **11**: p. 4.
42. Raupach, A., et al., *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms*. Journal of Clinical Medicine, 2019. **8**(4): p. 507.
43. Lüllmann, H.M., K. Wehling M. Hein, L., *Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 18. 2016: Georg Thieme Verlag. 703 S. mit 560 Abbildungen.
44. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
45. Huang, M.H., et al., *Heart protection by combination therapy with esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(3): p. 223-32.
46. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1895. **61**(6): p. 291-332.
47. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **55**(2): p. 113-26.
48. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
49. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(4): p. H812-h838.
50. Bøtker, H.E., et al., *Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2018. **113**(5): p. 39.
51. Litwin, S.E., et al., *Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling*. Cardiology, 1999. **91**(3): p. 173-83.
52. Li, Y. and R.A. Kloner, *Is There a Gender Difference in Infarct Size and Arrhythmias Following Experimental Coronary Occlusion and Reperfusion?* J Thromb Thrombolysis, 1995. **2**(3): p. 221-225.
53. Soltysinska, E., et al., *KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103402.
54. Yu, M., et al., *Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels*. Acta Pharmacol Sin, 2016. **37**(1): p. 56-66.
55. Sanchez, M. and O.B. McManus, *Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel*. Neuropharmacology, 1996. **35**(7): p. 963-8.
56. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. J Gen Physiol, 2014. **144**(5): p. 415-40.
57. Saleem, F., I.C. Rowe, and M.J. Shipston, *Characterization of BK channel splice variants using membrane potential dyes*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(1): p. 143-52.
58. Antonucci, S., et al., *Selective mitochondrial superoxide generation in vivo is cardioprotective through hormesis*. Free Radic Biol Med, 2019. **134**: p. 678-687.
59. Heinen, A., et al., *Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1400-7.
60. Andreadou, I., et al., *The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H(2) S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(12): p. 6510-6522.
61. Hausenloy, D.J., E.A. Boston-Griffiths, and D.M. Yellon, *Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(5): p. 1235-45.
62. Minners, J., et al., *Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(1): p. 68-73.

63. Mozaffari, M.S. and S.W. Schaffer, *Effect of pressure overload on cardioprotection of mitochondrial KATP channels and GSK-3beta: interaction with the MPT pore*. Am J Hypertens, 2008. **21**(5): p. 570-5.
64. Torregroza, C., et al., *Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
65. Bunte, S., et al., *Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning*. J Clin Med, 2019. **8**(3).
66. Cho, Y.J., et al., *Sevoflurane, Propofol and Carvedilol Block Myocardial Protection by Limb Remote Ischemic Preconditioning*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
67. Young, R.A. and A. Ward, *Milrinone. A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic use*. Drugs, 1988. **36**(2): p. 158-92.
68. Torregroza, C., et al., *Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches*. Anesthesia & Analgesia, 2020. **131**(6): p. 1765-1780.
69. Heusch, G., *The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection*. Circ Res, 2016. **118**(10): p. 1643-58.
70. Hausenloy, D.J., et al., *Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(6): p. 564-585.
71. Heusch, G., *CIRCUS: a kiss of death for cardioprotection?* Cardiovasc Res, 2015. **108**(2): p. 215-6.
72. Heusch, G., *Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(12): p. 773-789.
73. Lecour, S., et al., *IMproving Preclinical Assessment of Cardioprotective Therapies (IMPACT) criteria: guidelines of the EU-CARDIOPROTECTION COST Action*. Basic Res Cardiol, 2021. **116**(1): p. 52.
74. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(5): p. 469-83.
75. Heusch, G., A. Skyschally, and R. Schulz, *The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 951-63.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen, für seine Betreuung und die wertvollen Anregungen.

Für die intensive Betreuung während meiner praktischen Laborarbeit sowie für das umfassende konstruktive Feedback im Verlauf des Schreibprozesses danke ich insbesondere Frau Privatdozentin Dr. Annika Raupach.

Des Weiteren danke ich Mitarbeiter:innen der Experimentellen Anästhesiologie, insbesondere Frau Professorin Dr. Inge Bauer, Frau Claudia Dohle, Frau Birgitt Berke, Herrn Dr. Sebastian Bunte sowie Herrn Lukas Götze für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während der experimentellen Phase.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mir während der gesamten Promotionszeit stets zur Seite standen und mich motiviert haben.