

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

**Der Einfluss von Hyperglykämie und die
zugrundeliegenden Mechanismen bei der
Levosimendan-induzierten Postkonditionierung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Birce Yüksel

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Martin Ströthoff

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

*Für meine Eltern Cemal und Nuray,
für meine Schwester Asya,
für Matthi*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Torregroza C, **Yueksel B**, Ruske R, Stroethoff M, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Feige K

Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia

International Journal of Molecular Sciences: April 26, 2021

doi: 10.3390/ijms22094517

Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen zählen weltweit zu den führenden Todesursachen und sind in Deutschland für ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich. Ein akuter Myokardinfarkt entsteht über eine Minderperfusion sowie Sauerstoffmangel des Myokards. Hierbei ist die therapeutische Methode der Wahl die perkutane koronare Intervention (PCI). Das Therapieziel ist die schnellstmögliche und vollständige Reperfusion der bereits ischämischen Areale. Paradoxe Weise führt jene Reperfusion zu einer zusätzlichen irreversiblen myokardialen Gewebeschädigung. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden verschiedene kardioprotektive Strategien entwickelt, die den Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) minimieren sollen. Konditionierungsstrategien wie die ischämische Postkonditionierung (PoC) und die pharmakologische Konditionierung sind im Tiermodell eine effektive Methode gegen den I/R-Schaden. Allerdings ist die Translation in den klinischen Alltag erschwert. Möglicherweise tragen Komorbiditäten wie Diabetes mellitus und akute Hyperglykämie (HG) dazu bei diese Herausforderung zu erklären. Der Kalzium-Sensitizer Levosimendan, führte in PoC-Studien unter Normoglykämie über eine Inhibierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) zur Kardioprotektion.

In dieser experimentellen Arbeit wurde der Einfluss der akuten HG auf die ischämische PoC mit Levosimendan im Zusammenhang mit der mPTP untersucht. Insbesondere wurde untersucht, ob die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung unter akuter HG mittels Blockade der mPTP wiederhergestellt werden.

Die Experimente wurden an isolierten männlichen Wistar-Rattenherzen durchgeführt. Die Herzen wurden mit dem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) retrograd über die Aorta an der Langendorff-Anlage perfundiert. Alle Herzen durchliefen eine 33-minütige globale Ischämie- und eine 60-minütige Reperusionsphase. Die akute HG wurde mit einer Gesamtkonzentration von 22 mmol/l Glukose am Herzen induziert. Mittels der Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC-Färbung) erfolgte postexperimentell die Bestimmung der Infarktgrößen. Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen randomisiert (n = 5). Alle Substanzen wurden als PoC in den ersten 10 Minuten der Reperusionsphase verabreicht. Die Kontrollgruppe (Con) erhielt KHP als Vehikellösung. Levosimendan wurde in einer Konzentration von 0,3 μ M allein oder in Kombination mit dem mPTP-Blocker Cyclosporin A (CsA) appliziert. Um einen Effekt von CsA auf die Infarktgrößen auszuschließen, wurde der Blocker zudem in einer Gruppe allein eingesetzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die kardioprotektiven Effekte von Levosimendan in einer Konzentration von 0,3 μ M unter akuter HG vollständig aufgehoben werden. Der mPTP-Blocker allein hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße (CsA: 50 ± 10 ; ns vs. Con). Durch die Kombination von Lev und CsA (Lev $\pm$ CsA) kann jedoch auch unter akuter Hyperglykämie eine signifikante Infarktarealreduktion erzielt werden (Lev0.3+CsA: 35 ± 4 ; $P < 0,05$ vs. Lev0.3).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kombination von Levosimendan und Cyclosporin A den Verlust der Kardioprotektion unter HG wiederherstellt. Cyclosporin A kann allein über die Hemmung der mPTP unter HG keine Infarktgrößenreduktion auslösen.

Summary

Cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide and are responsible for a third of all deaths in Germany. An acute myocardial infarction is caused by reduced perfusion and a lack of oxygen in the myocardium. The therapeutic method of choice here is percutaneous coronary intervention (PCI). The therapeutic goal is the fastest possible and most complete reperfusion of the already ischaemic areas. Paradoxically, this reperfusion leads to additional irreversible myocardial tissue damage. Based on these findings, various cardioprotective strategies have been developed to prevent and minimise ischaemia-reperfusion (I/R) damage. Conditioning strategies such as ischaemic postconditioning (PoC) and pharmacological conditioning are an effective method against I/R damage in experiments. However, translation into clinical practice is difficult. Comorbidities such as diabetes mellitus and acute hyperglycaemia (HG) may help to explain this challenge. In PoC studies under normoglycaemia, the calcium sensitiser levosimendan led to cardioprotection via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP).

In this experimental work, the influence of acute HG on ischaemic PoC with levosimendan was investigated in context with the mPTP. In particular, it was tested whether the levosimendan-induced postconditioning under acute HG can be restored by blocking the mPTP.

The experiments were performed on isolated male Wistar rat hearts. The hearts were perfused retrogradely with the modified Krebs-Henseleit buffer (KHP) via the aorta at the Langendorff system. All hearts underwent a 33-minute global ischaemia period and a 60-minute reperfusion period. Acute HG was induced with a total cardiac glucose concentration of 22 mmol/l. The infarct sizes were determined post-experimentally using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The test animals were randomised into four groups ($n = 5$). All substances were administered as PoC in the first 10 minutes of the reperfusion phase. The control group (Con) received KHP as a vehicle solution. Levosimendan was administered at a concentration of 0.3 μ M alone or in combination with the mPTP blocker cyclosporine A (CsA). To exclude an effect of CsA on infarct sizes, the blocker was also used alone in one group. Our results show that the cardioprotective effects of levosimendan at a concentration of 0.3 μ M are completely abolished under acute HG. The mPTP blocker alone has no effect on infarct size (CsA: 50 ± 10 ; ns vs. Con). However, the combination of Lev and CsA 0.2 (Lev±CsA) can achieve a significant infarct area reduction even under acute hyperglycaemia (Lev0.3+CsA: 35 ± 4 ; $P < 0.05$ vs. Lev0.3).

The present study shows that the combination of levosimendan and cyclosporin A restores the loss of cardioprotection under HG. Cyclosporin A alone cannot reduce infarct size by inhibiting mPTP under HG.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>area at risk</i>
Abb	Abbildung
ACS	akutes Koronarsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CCS	chronisches Koronarsyndrom
CF	Koronarfluss
Con	Kontrolle
CsA	Cyclosporin A
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO ₂	Sauerstoffangebot (<i>oxygen delivery</i>)
ERK 1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GC	Guanylylzyklase
GLUT-4-Transporter	Glukosetransporter Typ 4
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase-3β
H ⁺	Wasserstoff-Ionen
HG	Hyperglykämie
H ₂ O	Wasser
HR	<i>heart rate</i>
HZV	Herzzeitvolumen
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
i.p.	intraperitoneal
IPC	ischämische Präkonditionierung

I/R-Schaden	Ischämie-Reperfusionsschaden
JAK	Januskinase
K ⁺	Kalium
KHK	koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LAD	<i>left anterior descending</i>
Lev	Levosimendan
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i>
LVEDP	<i>left ventricular enddiastolic pressure</i>
LVESP	<i>left ventricular endsystolic pressure</i>
Mio	Million
mK _{ATP}	mitochondriale Adenosintriphosphat sensitive Kaliumkanal
mPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
Mrd	Milliarde
N	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
O ₂	Sauerstoff
PCI	perkutane koronare Intervention
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PoC	ischämische Postkonditionierung

PTA	perkutane transluminale Angioplastie
RIPC	ischämische Fernpräkonditionierung
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT 3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt
Stress-HG	Stress-Hyperglykämie
S _v O ₂	gemischtvenöse Sauerstoffsättigung
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Einheiten

°C	Celsius
cm ²	Quadratzentimeter
g	Gramm
g • mol ⁻¹	Gramm pro Mol
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
kDA	Kilodalton
µg	Mikrogramm
µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm
µl	Mikroliter
µg/l	Mikrogramm pro Liter
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
mM	Millimolar

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ischämische Herzerkrankung	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Diabetes mellitus, akute Hyperglykämie und Komorbidität	3
1.1.4 Ischämie–Reperfusionsschaden	5
1.1.5 Kardioprotektion	9
1.1.6 Pharmakologische Konditionierung	11
1.1.7 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Gase	15
2.1.3 Laborgeräte	16
2.1.4 Langendorff-Anlage	17
2.1.5 Pharmaka	19
2.1.6 Computer und Software	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Versuchstiere	20
2.2.2 Präparation der Versuchsherzen	20
2.2.3 Das isolierte Herz an der Langendorff-Anlage	21
2.2.4 Substanzen	23
2.2.5 Versuchsprotokoll und Versuchsbeschreibung	25
2.2.6 Postexperimentelle TTC-Färbung	27
2.2.7 Bestimmung der Infarktarealgröße	28
2.2.8 Hämodynamische Auswertung	28
2.2.9 Statistische Auswertung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Infarktgröße	30
3.2 Hämodynamische Daten	31
3.3 Glukosekonzentrationen	32
3.4 Gewichte und Ischämiekontraktur	33
4 Diskussion	34
4.1 Diskussion der Infarktgrößenreduktion	34
4.2. Diskussion der Hämodynamik	37

4.3 Einfluss der Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung.....	38
4.4 Wiederherstellung der Levosimendan-induzierten Kardioprotektion durch die Kombination mit Cyclosporin A unter Hyperglykämie	41
4.5 Diskussion der Methode.....	43
4.5.1 Das isolierte Herz nach Oscar Langendorff.....	43
4.5.2 Versuchstiere	45
4.5.3 Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer	47
4.5.4 Akute Hyperglykämie	49
4.6 Limitierung und Schlussfolgerung	49
5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Vereinfachte Darstellung des a) Ischämieschadens sowie b) Reperfusionsschadens im Kardiomyozyten.....	8
Abb. 2 Skizze der Langendorff-Anlage	23
Abb. 3 Versuchsprotokoll	26
Abb. 4 Herzscheiben nach TTC-Färbung	28
Abb. 5 Infarktgrößen unter akuter HG	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Hämodynamische Daten.....	32
Tabelle 2 Glukosekonzentrationen.....	33
Tabelle 3 Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere.....	34
Tabelle 4 Zeitpunkt (min) und Höhe (mmHg) der maximalen Ischämiekontraktur	34

1 Einleitung

1.1 Ischämische Herzerkrankung

1.1.1 Definition

Die Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien wird als ischämische Herzerkrankung oder koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet [1]. Aufgrund der Koronarstenosen mit resultierender Flusslimitierung sowie Minderperfusion und meist progressiver Krankheitsentwicklung kann sich eine Koronarinsuffizienz entwickeln [1, 2]. Hierbei entsteht eine Diskrepanz zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot der Kardiomyozyten, welches wiederum zu einer Myokardischämie führt. Abhängig von der Manifestationsform wird die ischämische Herzerkrankung in das chronische Koronarsyndrom (CCS, stabile Angina Pectoris) und in das akute Koronarsyndrom (ACS) eingeteilt. Hierbei erfolgt die Definition des ACS über 3 Entitäten: die instabile Angina Pectoris ohne Troponinanstieg, NSTEMI (Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt mit Troponinanstieg) und STEMI (ST-Streckenhebungsinfarkt mit Troponinanstieg anhaltender ST-Hebung über 20 Min.) [1]. Das ACS ist ein potenziell lebensbedrohliches Krankheitsbild. Das CCS kann trotz des vorherigen stabilen Verlaufs und entsprechender medikamentöser Therapie durch ein akutes atherothrombotisches Ereignis wie eine Plaqueruptur oder eine Erosion in ein ACS übergehen [2]. Herzrhythmusstörungen (ventrikuläre Extrasystolen bis Kammerflimmern) und der plötzliche Herztod werden ebenfalls zu den Manifestationsformen der Myokardischämie gezählt [1].

Das Leitsymptom der ischämischen Herzerkrankung ist die Angina Pectoris, die sich in 55 % der Fälle erstmanifestiert. Bedingt durch die Minderperfusion des Myokards und den Sauerstoffmangel können anhaltende oder intermittierende, retrosternale Schmerzen oder ein Druckgefühl mit Ausstrahlung in den linken Arm, Hals, Unterkiefer, Oberbauch oder Rücken entstehen. Im Weiteren können belastungsabhängige Dyspnoe und vegetative Begleitsymptomatik mit Unruhe und Angstgefühl vorliegen [1]. Die Abwesenheit der Angina Pectoris und/oder das Vorliegen von unspezifischer Symptomatik kann insbesondere bei Frauen, Patienten älter 75 Jahre, Patienten nach Herzoperationen oder Herztransplantierten sowie Patienten mit Diabetes mellitus und Niereninsuffizienz vorliegen [1].

Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Tabakkonsum, KHK, Myokardinfarkte bei direkten Familienangehörigen sowie das erhöhte Lebensalter (Männer ≥ 55 Jahre, Frauen ≥ 65 Jahre) sind kardiovaskuläre Risikofaktoren. Sie begünstigen die Artheroskleroseentwicklung bzw. führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Progression der Erkrankung [1].

1.1.2 Epidemiologie

Die *World Health Organization* (WHO) deklarierte Herz-Kreislauferkrankungen im Jahr 2021 erneut zu den führenden Todesursachen weltweit [3]. Im Jahr 2023 verstarben in Deutschland insgesamt 348.312 Menschen an Herz-Kreislauferkrankungen. Die ischämischen Herzerkrankungen zählen bei hoher Morbidität sowie Mortalität, national als auch international, zu den häufigsten Herz-Kreislauferkrankungen [3, 4]. Im Jahr 2023 verstarben daran in Deutschland 119.795 Menschen, davon betroffen waren 51.168 (43%) Frauen und 68.627 (57%) Männer [4]. Die Lebenszeitprävalenz der KHK liegt bei den 40- bis 79-Jährigen bei 9,3 % und nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Hierbei weist der Myokardinfarkt für diese Altersgruppe eine Lebenszeitprävalenz von 4,7 % auf. Auch hier zeigt sich ein Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Alter. Bei den 40- bis 49-Jährigen beträgt diese 1,5 % und steigt bei den 70- bis 79-Jährigen auf 10,2 % an [5].

Das männliche Geschlecht sowie ein niedriger sozioökonomischer Status bedingen ein erhöhtes Risiko an der KHK zu erkranken [5]. Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Prävalenz und sozioökonomischen Status: Je niedriger der Sozialstatus, desto höher die Prävalenz [6]. Hierbei spielen Adipositas, sportliche Inaktivität und Tabakkonsum eine wesentliche Rolle [7]. Die höchste Lebenszeitprävalenz von KHK mit 34,3 % haben somit die 70- bis 79-Jährigen Männer mit niedrigem sozioökonomischem Status [5].

Ab dem 60. Lebensjahr kommt es bei Frauen als auch bei Männern zu einem auffälligen Anstieg der altersstandardisierten Mortalitätsrate der KHK. Diese betrug für Männer 176,3 je 100.000 Einwohner und überstieg die Mortalitätsrate der Frauen, die 2019 bei 87,6 je 100.000 Einwohner lag [8]. Im Vergleich zur KHK starben weniger Menschen an einem akuten oder einem rezidivierenden

Myokardinfarkt. Hier betrug die Zahl der Verstorbenen 44.529, davon waren 18.085 Frauen und 26.444 Männer [4]. Die Mortalitätsrate des akuten Myokardinfarkts (inklusive STEMI und NSTEMI) weist seit dem Jahr 2000 einen rückläufigen Trend auf: die Mortalitätsrate der Männer lag 2019 bei 65,6 je 100.000 Einwohner (Abnahme um 26,8% seit 2011) und überstieg auch hier die Mortalitätsrate der Frauen, welche 31,4 je 100.000 Einwohner betrug (Abnahme um 30,9% seit 2011) [8].

Trotz der hohen Prävalenz ischämischer Herzerkrankungen ist eine anhaltende Reduzierung der Mortalitätsraten zu beobachten. Es wird angenommen, dass die Gründe in den optimierten Bedingungen hinsichtlich der Prävention, Diagnostik, Therapie und Rehabilitation, sowie am Rückgang des Tabakkonsums liegen [8].

Die Kosten für Herz-Kreislauferkrankungen lagen im Jahr 2015 bei 46,4 Mrd. Euro [9]. Für das Jahr 2020 konnte mit 56,7 Mrd. Euro ein Anstieg dokumentiert werden. Über die Hälfte der Krankheitskosten wurden von Menschen ab dem 65. Lebensjahr verursacht. Für Menschen ab 85 Jahren und älter wurden die höchsten Pro-Kopf-Kosten mit 25.350 Euro verzeichnet [10]. Vor dem Hintergrund der erheblichen gesundheitssystemischen Kosten kommt der Forschung zur Kardioprotektion eine zentrale Bedeutung zu.

1.1.3 Diabetes mellitus, akute Hyperglykämie und Komorbidität

Diabetes mellitus (DM) ist eine chronische Stoffwechselstörung, die mit einer Hyperglykämie einhergeht. Ursächlich können eine Insulinsekretionsstörung, eine Störung der Insulinwirkung oder seltener ein genetischer Defekt sein [11]. In Deutschland sind mehr als 7 Mio. Menschen an einem Diabetes mellitus erkrankt, davon sind > 90 % von Typ-2 Diabetes und ca. 5% von Typ-1 Diabetes betroffen.

Patienten mit einem Diabetes mellitus erleiden häufiger einen Myokardinfarkt und haben zudem ein schlechteres Langzeitüberleben nach einem Infarkt im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus. Interessanterweise kann auch eine akute Hyperglykämie (HG) als Komorbidität, unabhängig von einer Diabetes Diagnose, die Prognose nach einem überstandenen Myokardinfarkt negativ beeinflussen [12]. Die akute HG, auch als „Stress-Hyperglykämie“ (Stress-HG) bezeichnet, beschreibt den veränderten Stoffwechselzustand, welcher durch eine akute

Erkrankung oder eine Operation ausgelöst wird [13]. Da es keine einheitliche Definition einer Stress-HG gibt, erfolgt die Differenzierung zur manifesten Diabetesdiagnose meist über den HbA1c-Wert.

Zahlreiche Studien und Metaanalysen zeigen, dass eine HG unabhängig von einer Diagnose des Diabetes zum Zeitpunkt des Myokardinfarkts nicht nur zu einer erhöhten Mortalität, sondern auch zu einer ausgedehnteren Infarktgröße führen [14-18]. Einen Zusammenhang zwischen einer akuten Stress-HG und unerwünschten kardialen Ereignissen bei Myokardinfarkt zeigen die Ergebnisse von Rajpurohit et al. Bei Patienten mit erhöhten Blutglukosekonzentrationen traten im Verlauf der Hospitalisierung signifikant häufiger schwere Herzinsuffizienz, Arrhythmien und kardiogener Schock auf [19]. Doenst et al. untersuchten den Einfluss der HG während des kardiopulmonalen Bypasses auf die perioperative Morbidität und Mortalität bei diabetischen und nichtdiabetischen Patienten. Ein hoher Blutglukosewert (> 15 mmol/l) während des kardiochirurgischen Eingriffs erwies sich als unabhängiger Risikofaktor für Morbidität und Mortalität bei beiden Patientengruppen [20].

Die Pathophysiologie der akuten HG ist komplex. Eine Kombination von verschiedenen Faktoren wie Glukosetoleranz der Patienten, Schwere und Stadium der Erkrankung beeinflussen die Entwicklung einer akuten HG. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, die hier vereinfacht dargestellt werden. Die Entwicklung einer akuten HG beruht unter anderem auf der Interaktion gegenregulatorischer Hormone wie Kortisol, Glukagon, Katecholamine und Wachstumshormon sowie Zytokinen z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) [13, 21, 22]. Diese neurohormonalen Interaktionen führen zu einer abnormen hepatischen Glukoseproduktion, Insulinresistenz und zu einer Suppression der Insulinfreisetzung [21-23]. Die hepatische sowie periphere Insulinresistenz verstärken zusätzlich die Entwicklung einer akuten HG [24]. Ein Kortisolanstieg verringert die insulinabhängige Aufnahme von Glukose. Katecholamine beschränken die Bindung von Insulin am Insulinrezeptor (z.B. auf der Zellmembran der Skelettmuskulatur oder Fettgewebe), die Insulinaktivierung durch Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität am Insulinrezeptor sowie die periphere Aufnahme von Glukose über den insulinabhängigen GLUT-4-Transporter (Glukosetransporter Typ 4) [25, 26]. Zudem wird der Glukosestoffwechsel durch vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-

1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) beeinflusst. Diese verursachen neben der Insulinresistenz auch eine Inhibition der Insulinfreisetzung [27]. Zudem wird durch die Insulinresistenz eine katabole Stoffwechsellaage mit Lipolyse ausgelöst. Zirkulierende freie Fettsäuren verstärken wiederum die Insulinresistenz, in dem die Insulinaktivierung sowie Glykogensynthese gestört wird [28, 29].

Die HG bedingt eine vaskuläre Inflammation [30, 31], endotheliale [32] und mikrovaskuläre Dysfunktion [33], einen prothrombotischen Zustand und führt letztendlich zu atherosklerotischen Ablagerungen [34-36]. Zudem führt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) unter HG und DM zu oxidativem Stress, wodurch myokardiale Gewebeschäden entstehen [37, 38], kardioprotektive Signalkaskaden und damit auch das *Outcome* nach einem Myokardinfarkt beeinflusst werden.

Zusammenfassend stehen HG und DM im engen Zusammenhang mit ungünstigen Behandlungsergebnissen sowie erhöhter Morbidität und Mortalität bei einem akuten Myokardinfarkt. Die schnellstmögliche Wiederherstellung der Reperfusion ist bei diesem Krankheitsbild unabdingbar.

1.1.4 Ischämie–Reperfusionsschaden

Der akute Myokardinfarkt entwickelt sich zunächst in den subendokardialen Ebenen im Zentrum des ischämischen Risikoareals (*Area at risk* = AAR) und schreitet bei anhaltendem Koronarverschluss als Wellenfront in die subepikardialen Ebenen sowie die Grenzzonen des ischämischen Risikoareals weiter [39, 40]. Faktoren wie die Ausprägung der mikrovaskulären Dysfunktion in den Koronargefäßen, die Größe des AAR, die Zeitdauer sowie die Unterbrechung des Koronarverschlusses als auch die Kollateralgefäße bestimmen die Infarktarealgröße [41].

Eine schnellstmögliche und effektive myokardiale Reperfusion mittels primärer perkutaner koronarer Intervention (PCI) ist bei der Akuität dieser Erkrankung die wirksamste therapeutische Methode der Wahl [42]. Das Therapieziel ist die vollständige Reperfusion bereits ischämischer Infarktareale, die Protektion von potenziell vitalem Myokardgewebe (AAR) sowie der Erhalt der systolischen

linksventrikulären Funktion.

Paradoxe Weise führt genau die Reperfusion der primär ischämischen Bereiche zu einer zusätzlichen irreversiblen Gewebeschädigung und myokardialen Zelltod [43]. Dieses Phänomen wird Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) genannt und wurde erstmals von Jennings et al. im Jahr 1960 am Hundemyokard beschrieben [44].

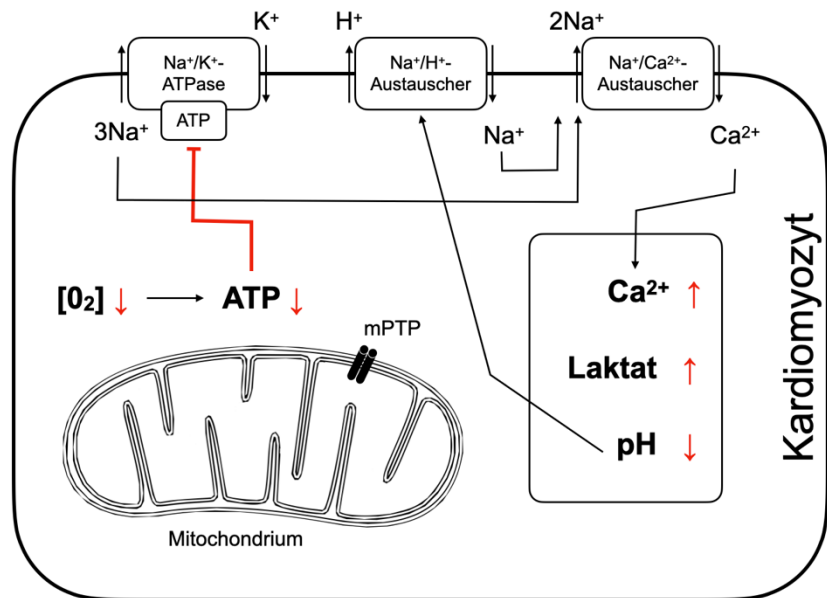
Der I/R-Schaden zeichnet sich durch mikrovaskuläre Dysfunktion insbesondere mit gesteigerter Kapillarpermeabilität, Ödembildung [45, 46], koronarer Mikroembolisation [47], gestörter Vasomotorik [48], einer Ausschüttung vasokonstriktorischer Substanzen und Stase aus [49, 50]. Kapillarschäden und Blutung vervollständigen das Bild eines I/R-Schadens [51, 52].

Verantwortlich für die irreversible Schädigung der Kardiomyozyten im Rahmen des I/R-Schadens sind komplexe biochemische und metabolische Prozesse (Abb. 1a). Der akute Myokardinfarkt verursacht in den Kardiomyozyten eine Hypoxie, so dass der Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse umgestellt. Die Folge ist eine Kumulation von Laktat und eine Abnahme des intrazellulären pH-Wertes auf $< 7,0$. Aufgrund der intrazellulären Übersäuerung wird der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher aktiviert, der Na^+ -Ionen im Austausch gegen Protonen in die Zelle transportiert. Zudem verliert die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase während der ischämischen Phase, durch das ATP-Defizit, ihre Funktion und es entsteht ein intrazellulärer Na^+ -Ionen Überschuss. Der Versuch, die überschüssigen Na^+ -Ionen mit Hilfe des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Ionen-Austauscher extrazellulär zu transportieren, resultiert intrazellulär wiederum in einer Ca^{2+} -Überladung. Diese intrazellulär und mitochondrial erhöhten Ca^{2+} -Spiegel bedingen Membranschäden, welche zum Zelltod führen [53, 54]. Die intrazelluläre Azidität verhindert die Hyperkontraktion der Kardiomyozyten und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) [43].

Nach Einsetzen der Reperfusion erlangt die mitochondriale Elektronentransportkette ihre Funktion zurück, wodurch die ATP-Produktion wieder stattfindet. Zudem wird intrazellulär verstärkt ROS (*reactive oxygen species*) gebildet (Abb. 1b). Die Xanthinoxidase in den Endothelzellen als auch die NADPH-Oxidase in den Neutrophilen sind extrazellulär zusätzlich für eine starke ROS-Bildung verantwortlich [55]. Ebenso kommt es durch die rasche Versorgung mit Sauerstoff zu einem schnellen Ausgleich des niedrigen pH-Werts auf das Ausgangsniveau. Das wiederum hat eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung zur

Folge. Oxidativer Stress, ein zu schneller Ausgleich des pH-Wertes sowie die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung sind Faktoren die zur verlängerten Öffnung der mPTP und Hyperkontraktur der Kardiomyozyten beitragen [43]. Die mPTP ist eine nicht-selektive Pore, die sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet. Sie ist ein Megakanal mit starker Leitfähigkeit und ermöglicht den Durchlass von Molekülen $< 1,5 \text{ kDA}$. Sie dient der Kommunikation zwischen der Mitochondrienmatrix und dem Zytoplasma. Bei niedrigem pH-Wert bleibt die mPTP geschlossen; nur unter pathologischen Bedingungen öffnet sie sich [43, 54]. Die verlängerte Öffnung hat negative Auswirkungen auf die Bioenergetik des Mitochondriums. Die oxidative Phosphorylierung wird gehemmt [54] und die Permeabilitätsbarriere der inneren Membran wird gestört [53]. Die Folge ist eine Matrixschwellung mit Ruptur der äußeren Membran und Freisetzung von proapoptischen Proteinen wie Cytochrom C. Der Verlust des Membranpotenzials [54, 55] und das daraufhin entstandene ATP- und NAD^+ - Defizit [56], die Freisetzung von akkumuliertem Ca^{2+} , die Matrixschwellung und die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führen schließlich zur Apoptose [55].

a)



b)

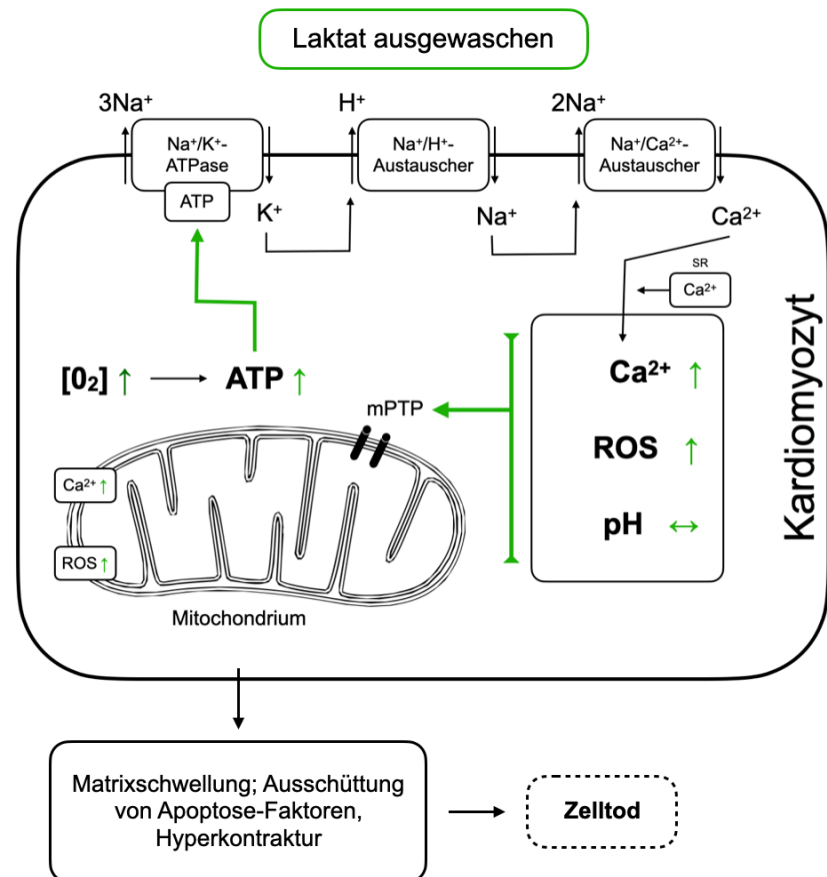


Abb. 1: a) Vereinfachte Darstellung des a) Ischämieschadens sowie b) des Reperfusionsschadens im Kardiomyozyten modifiziert nach Hausenloy et al. [43], Yellon et al. [55] und Torregróza et.al. [57]. Visualisiert werden die biochemischen sowie metabolischen Prozesse während eines I/R-Schadens. ATP = Adenosintriphosphat, Ca^{2+} = Calcium-Ionen, H^+ = Wasserstoff-Ionen, mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore, Na^+ = Natrium-Ionen, O_2 = Sauerstoff, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, SR = sarkoplasmatisches Retikulum

1.1.5 Kardioprotektion

Unter Kardioprotektion werden alle Strategien zusammengefasst, welche die negativen Auswirkungen eines I/R-Schadens vorbeugen und / oder minimieren. Verschiedene Konditionierungsmaßnahmen konnten in experimentellen Studien als kardioprotektiv herausgearbeitet werden. Zu den Strategien der Kardioprotektion zählen beispielsweise die ischämische Präkonditionierung (IPC), die ischämische Postkonditionierung (PoC), die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) und die pharmakologische Konditionierung.

Erstmals beschrieben Murry et al. im Jahr 1986 tierexperimentell das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC). Am in vivo Hundemodell führten sie in der Interventionsgruppe vier 5-minütige regionale Ischämieperioden durch, die jeweils durch 5-minütige Reperusionsperioden unterbrochen wurden. Anschließend erfolgte in der Interventions- sowie in der Kontrollgruppe eine zusätzliche Ischämie von 40 Minuten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die IPC in der Interventionsgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße um 75% [58]. Auch in tierexperimentellen Untersuchungen an anderen Spezies konnte das Phänomen der IPC belegt werden [59-61]. In der Regel ist ein akuter Myokardinfarkt beim Menschen jedoch ein unvorhersehbares Ereignis, so dass eine IPC lediglich im Rahmen von elektiven Eingriffen wie beispielsweise der aortokoronaren Bypassoperation erfolgen kann.

Aus dem Konzept der IPC entwickelten Zhao et.al 2003 das Modell der ischämischen Postkonditionierung (PoC) am Hundemodell [62]. Nach einer längeren Index-Ischämie folgten mehrere, regionale kurze Zyklen von Reperfusion und Ischämie in der eigentlich frühen Reperusionsphase. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der Interventionsgruppe eine signifikante Infarktgrößenreduktion von 44%. Die Methode der PoC erwies sich, vergleichbar mit der IPC, als eine weitere effektive kardioprotektive Maßnahme [62]. Die bessere klinische Anwendbarkeit bei Patienten mit einem unvorhersehbaren akuten Myokardinfarkt, als die Behandlung in der postischämischen Phase, bieten hier im Gegensatz zur IPC einen Vorteil. Staat et al. untersuchten erstmals in einer klinischen Studie, ob die PoC während einer PCI zur Behandlung eines akuten Myokardinfarkts den I/R-Schaden durch eine rechtzeitige Intervention vermindert [63]. Die Postkonditionierung wurde eine Minute nach *Reflow* durch einen

Koronarstent ausgelöst und mittels vier Zyklen von jeweils einminütigem Aufblasen und Ablassen des PTA-Ballons durchgeführt. Diese Methode führte in der Interventionsgruppe zu erniedrigten Kreatinkinase-Serumspiegel, Verbesserung der mikrovaskulären Durchblutung und zu einer Infarktgrößenreduktion [63]. Folgestudien zu PoC im Rahmen einer PCI zeigten jedoch keine kardioprotektiven Ergebnisse, sodass die Translation in die Klinik bisher ausblieb [64].

Auch wenn die Konditionierungsphänomene wie IPC und PoC im experimentellen Setting zu einer signifikanten Kardioprotektion führen, sind sie hochinvasiv und daher in der klinischen Umsetzung wenig praktikabel.

Eine weniger invasive, alternative kardioprotektive Strategie ist die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC; *Remote ischemic Preconditioning*), erstmalig 1993 von Przyklenk et al. beschrieben [65]. Die kardioprotektive Reaktion wird durch kurze repetitive Zyklen von Ischämie und Reperfusion zielorganfern, beispielsweise durch Verschluss einer Mesenterial-/ Nierenarterie [66] oder durch das Aufblasen und Entleeren einer Blutdruckmanschette an einer Extremität [67] stimuliert. Vergleichbar mit der IPC lassen sich die kardioprotektiven Effekte des RIPC-Phänomens auch als „*Remote Postconditioning*“ durchführen. Kerendi et al. demonstrierten in einem in vivo Rattenmodell, dass durch eine herzferne renale Postkonditionierung, welche vor der kardialen Reperfusion durchgeführt wird, den I/R-Schaden signifikant verringert [68].

Die genauen Prozesse der Kardioprotektion sind bis heute nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass die Kardioprotektion der ischämischen Konditionierung durch drei parallel ablaufende Signalwege induziert wird: 1) *Reperfusion Injury Salvage Kinase*-Signalweg (RISK), 2) Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie 3) *Survivor Activating Factor Enhancement*-Signalweg (SAFE). Bereits bekannt ist, dass die IPC und die PoC rezeptorvermittelte Prozesse sind, die durch Agonisten der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie Adenosin, Bradykinin und Opioidpeptide induziert werden und im Mitochondrium als Endeffektor die Überlebenswahrscheinlichkeit des Kardiomyozyten steigern [69].

Der RISK- Signalweg wird über einen ischämischen Konditionierungsreiz aktiviert, wodurch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) stimuliert wird [70]. PI3K interagiert

und phosphoryliert die nachfolgende Proteinkinase B, auch als Akt bezeichnet, sowie die mitogen-aktivierte Proteinkinase p44/p42 extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK 1/2) [71]. Akt führt zur Schlüsselfunktion des RISK-Signalwegs: die Phosphorylierung und die Hemmung der Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β), welche die mPTP- Öffnung inhibiert. Zusätzlich führt die Phosphorylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) über die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Aktivierung der Guanylylzyklase (GC). Diese wiederum führt über die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) zur Aktivierung der PKC. Die PKC verursacht eine mitochondriale ROS Ausschüttung, welche den mitochondrialen Adenosintriphosphat sensitiven Kaliumkanal (mK_{ATP}) öffnet und eine Inhibition der mPTP veranlasst [72].

Der SAFE- Signalweg wird über TNF- α aktiviert. Dieser bindet am TNF- α -Rezeptor-Subtyp 2 und phosphoryliert die Januskinase (JAK), welcher wiederum den *Signal Transducer and Activator of Transcription* 3 (STAT 3) phosphoryliert [73, 74]. Zu den wichtigen mitochondrialen Aktivitäten des dimerisierten Transkriptionsfaktors STAT 3 gehören die Aufrechterhaltung der Elektronentransportkette [75] und die Inhibition der mPTP -Öffnung [76]. Konditionierungsmaßnahmen können beide Signalwege aktivieren. Jedoch ist auch die Aktivierung jeweils eines einzelnen Signalwegs möglich [77].

Der kardioprotektive Effekt der ischämischen Konditionierungen resultiert über die genannten Signalwege und letztendlich über die Inhibition der mPTP. Diese intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion scheinen von grundlegender Bedeutung für den Myokardschutz nach stattgehabten I/R-Schaden zu sein.

1.1.6 Pharmakologische Konditionierung

Eine praktikablere und nicht-invasive Methode das Myokard vor einem I/R-Schaden und deren Folgen zu schützen ist das Konzept der pharmakologischen Konditionierung; eine Imitierung der ischämischen Konditionierung. Bestimmte pharmakologische Substanzen können gezielt prä-, per- oder postischämisch appliziert werden, so dass die Kardiomyozyten über eine Stimulierung intrazellulärer Signalwege einen I/R-Schutz entwickeln. Die genauen zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen der pharmakologischen

Konditionierung sind bisher nicht abschließend geklärt. Auch wenn die Suche nach dem idealen Pharmakon im Mittelpunkt der Forschung um die Kardioprotektion steht, existiert bereits eine große Anzahl an pharmakologischen Substanzen, die einen nachgewiesenen Myokardschutz erzielen. Zu diesen zählen beispielsweise volatile Anästhetika wie Sevofluran [78, 79], Dexmedetomidin (α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten) [80], Cyclosporin A (Immunsuppressivum) [78, 81, 82] und Levosimendan (Kalzium-Sensitizer/Inodilatator) [83, 84].

Sevofluran zählt zu den klassischen Inhalationsanästhetika und wird häufig im klinischen Alltag verwendet. Der kardioprotektive Effekt mittels Sevofluran-induzierter PoC konnte in der Vergangenheit tierexperimentell [85], sowie auch in klinischen Studien in der Herzchirurgie demonstriert werden [86].

Levosimendan, welches im klinischen *Setting* in der Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzt wird, vermittelt mittels pharmakologischer PoC über die Aktivierung des RISK- Signalwegs und ATP-sensitiver Kalium- (KATP)-Kanäle eine signifikante Kardioprotektion [84, 87].

Piot et al. wiesen in ihrer klinischen Studie nach, dass das zum Zeitpunkt der Reperfusion intravenös applizierte Cyclosporin A mit einer kleineren Infarktgröße assoziiert war [88]. Auch experimentell [81] sowie tierexperimentell [89] konnte der kardioprotektive Effekt nachgewiesen werden.

Akute HG als Komorbidität kann jedoch die durch pharmakologische PoC vermittelte Kardioprotektion aufheben [78, 90, 91] in dem bestimmte Konditionierungsstrategien blockiert werden [92-94]. Matsumoto et. al zeigten, dass Levosimendan-induzierte PoC unter akuter HG nur durch eine zehnfache Steigerung der Dosis kardioprotektiv wirkt [95]. Daneben beschrieben Huhn et al. in einer Sevofluran-induzierten PoC Studie unter akuter HG eine Wiederherstellung der Kardioprotektion unter Anwendung von Cyclosporin A [78]. Es besteht die Annahme, dass eine akute HG die intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion und somit die Inhibition der mPTP hinsichtlich einer Kardioprotektion blockiert [96]

1.1.7 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Ein überstandener Myokardinfarkt in Kombination mit einer akuten Hyperglykämie als Komorbidität ist mit einem schlechten *Outcome* verbunden. Um so wichtiger erscheinen weniger invasive kardioprotektive Strategien zur Minimierung eines I/R-Schadens wie die pharmakologische Konditionierung. Praktikabel erscheinen hierfür pharmakologische Substanzen wie beispielsweise Levosimendan, die im klinischen Alltag Anwendung finden.

In früheren Studien wurde festgestellt, dass mittels pharmakologischer Postkonditionierung mit Levosimendan 0,3 µg unter Normoglykämie eine Infarktgrößenreduktion im Sinne einer Kardioprotektion im Tiermodell resultiert [83]. Die Verwendung höherer Levosimendan Konzentrationen zeigten unter Normoglykämie einen kardioprotektiven Effekt, allerdings konnte die Infarktgröße nicht weiter verringert werden [83]. Unter akuter HG zeigte die Levosimendan-induzierte PoC eine Kardioprotektion erst durch eine zehnfache Steigerung der Dosierung [95]. An der HG induzierten Blockade der Kardioprotektion wird eine Beteiligung der mPTP vermutet, so dass sich aus diesen Grundlagen folgende Fragestellung ergab:

- Kann die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung unter akuter Hyperglykämie mittels Blockade der mPTP wiederhergestellt werden?

Die Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte mittels Levosimendan-induzierter PoC in Kombination mit dem mPTP Blocker Cyclosporin A an isolierten Wistar-Rattenherzen am Langendorff-Modell. Der primäre Endpunkt dieser Arbeit ist die Infarktgröße.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Calciumchlorid (CaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [10043-52-4]
D (+)-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [50-99-7]
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [60-00-4]
Formaldehyd 37%	E. Merck KG, Darmstadt, Deutschland CAS Nr.: [50-00-0]
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [7447-40-7]
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	E. Merck KG, Darmstadt, Deutschland CAS Nr.: [7778-77-0]
Laktat (L(+)-Milchsäure-Natriumsalz)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland CAS Nr.: [867-56-1]
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	E. Merck KG, Darmstadt, Deutschland CAS Nr.: [10034-99-8]
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemikals BDH, Leuven, Belgien CAS Nr.: [7647-14-5]

Natriumhydrogenphosphat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [144-55-8]
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [7647-01-0]
Triphenyltetrazoliumchloride (TTC)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland CAS Nr.: [298-96-4]
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland CAS Nr.: [77-86-1]

2.1.2 Gase

Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2)	Linde AG, München, Deutschland
Stickstoff (N_2)	Linde AG, München, Deutschland

2.1.3 Laborgeräte

Blutgasanalysator	ABL800 Flex Radiometer GmbH Krefeld, Deutschland
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1160 Greisinger electronic GmbH Regenstauf, Deutschland
Feinwaage	BP 1200 Sartorius Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	MR 2002 Heidolph Instruments Schwabach, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646 Knick Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	LA 230 S Sartorius Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Lauda-GFL mbH Burgwedel, Deutschland
Well-Platte	24-Well-Multiwell Platte Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Vortexmischer	Scientific Industries SI Vortex-Genie 2 Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4 Langendorff-Anlage

Brückenverstärker	Bridge Amp, FE221 AD Instruments Oxford, England
Druckaufnehmer	P23XL Gould Electronics Bilthoven, Niederlande
Einhängethermostat	Julabo MW-4 Sigma- Aldrich (<i>Chemie GmbH</i>) Taufkirchen, Deutschland
Glasfritte	ROBU Glasfilter-Geräte GmbH Hattert, Deutschland
Guillotine	Kleintier-Decapitator Schneidemaschine, Modell 7950 Seriennr.: 045012/12070, Ugo Basile Gemonio, Italien
Injektionskanüle	Sterican Gr. 14, 0,60mm x 30mm, 23 G x 1 ¼ “ Braun Melsungen, Deutschland
Offener Wasserbaderhitzer	Julabo EC-5 Sigma-Aldrich (Chemie GmbH) Taufkirchen, Deutschland
Perfusatflasche	ISO SIMAX 2000ml BDL Turnov, Tschechische Republik
Perfusatschlauch	Tygon E-3603 ID: 6,0mm/ OD: 9,0mm/ Wall: 1,5mm Saint-Gobain Performance Plastics Charny, Frankreich

Perfusor	Perfusor® fm B.Braun Melsungen AG Hessen, Deutschland
Perfusor	Perfusor® Space B. Braun Melsungen AG Hessen, Deutschland
Schlauch für Schlauchpumpe	Ismatec® Tygon LMT-55 ID: 3,17mm/ Wall: 0,90mm IDEX Health & Science GmbH Wertheim, Germany
Schlauchpumpe	Minipuls® 3 Peristaltic Pump ML 172, AD Instruments Oxford, England
USB-Datenerfassung	PowerLab 8/30 AD Instruments Oxford, England

2.1.5 Pharmaka

Cyclosporin A (CsA)	Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA CAS Nr.: [59865-13-3]
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma – Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland CAS Nr.: [67-68-5]
Heparin-Natrium Injektionslösung	25.000 I.E. / 5ml B. Braun Melsungen AG Hessen, Deutschland CAS Nr.: [9041-08-1]
Levosimendan	Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA CAS Nr.: [141505-33-1]
Pentobarbital Injektionslösung	Narcoren® Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Ingelheim am Rhein, Deutschland CAS Nr.: [76-74-4]

2.1.6 Computer und Software

Aufzeichnungssoftware	LabChart ® 7 Pro, Version 7.3.7 AD Instruments Oxford, England
Flachbettscanner	CanoScan® LIDE 700F Krefeld, Deutschland
Planimetriesoftware	SigmaScan Pro Image Analysis Systat Software Inc. San Jose, CA, USA
Statistiksoftware	GraphPad PRISM Software, San Diego, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Bei der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf liegt eine Genehmigung mit der Projektnummer O 27/12 vor. Für diese experimentelle Studie wurden 20 gesunde, männliche WISTAR-Ratten verwendet. Die WISTAR-Ratten wurden von dem Unternehmen Janvier (Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich) und aus der ZETT des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt zwei bis drei Monate alt und wogen durchschnittlich 299,6 g. Für die Tierhaltung wurden Makrolon Rattenkäfige Typ 4 mit einer Fläche von 1800 cm² der Firma Tecniplast (Hohenpreißenberg, Deutschland) und der Firma Zoonlab (Castrop-Rauxel, Deutschland) verwendet. Als Bodestreue diente Weichholzstreue JELUXYL HW 300/500 der Firma Jelu-Werk (Rosenberg, Deutschland). Die Tiere erhielten nach Belieben Alleinfuttermittel für Ratten der Firma Ssniff Spezialitäten GmbH (Soest, Deutschland) und keimfreies Stadtwasser, welches ozonisiert und mit HCl angesäuert wurde (pH 2,8 – 3,0). Die Tierhaltung erfolgte in speziellen pathogenfreien Räumen (Raumtemperatur 22°C ± 2°C, Luftfeuchte 55% ± 5% mit einer 22-fachen Luftwechselrate pro Stunde). Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit 12h Belichtung (6 Uhr bis 18 Uhr) und 12h Dunkelheit (18 Uhr bis 6 Uhr) aufrechterhalten. Für diese experimentelle Studie wurden ausschließlich gesunde WISTAR-Ratten verwendet.

2.2.2 Präparation der Versuchsherzen

Zu Beginn der experimentellen Untersuchung erfolgte die Anästhesie der Versuchstiere mit 80 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion. Zeitgleich wurden 1000 I.E. Heparin-Natrium Injektionslösung zur Antikoagulation i.p. injiziert. Hierdurch wurde ein Auftreten von intrakardialen Blutkoagel während der chirurgischen Präparation verhindert.

Nach dem Nachlassen der Schutzreflexe wurden die Tiere mittels Guillotine

dekapitiert und unverzüglich erfolgte die Entnahme der Rattenherzen. Über eine mediane Thorakotomie wurde der Thorax eröffnet und die Aorta mit Hilfe einer Pinzette fixiert, so dass das Herz an der Herzbasis exzidiert werden konnte. Unmittelbar nach Entnahme wurde das isolierte Herz zum Schutz vor Luftembolien in 0,9%ige NaCl Lösung gelegt. Im Anschluss erfolgte das Anbringen der isolierten Herzen an die Langendorff-Apparatur. Nach der Identifikation der Aorta wurde das isolierte Herz mit Hilfe eines Polyester-Fadens (4/0 USP, nicht resorbierbar, geflochten, RESORBA Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland) an der Kanüle der Langendorff-Apparatur befestigt. Anschließend erfolgte die Perfusion mit dem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) [97].

2.2.3 Das isolierte Herz an der Langendorff-Anlage

Die Langendorff-Anlage ermöglichte eine retrograde Perfusion des isolierten Herzens mit einem konstanten Druck von 80 mmHg. Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde in einer Perfusatflasche, in einem Wärmebad, auf 37°C erwärmt und fortlaufend über eine Glasfritte mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Die Begasung mit Carbogen hob den pH-Wert auf durchschnittliche und physiologische Werte von 7,4. Die Auskühlung des Herzens wurde mit Hilfe eines beheizten Wärmeschildes verhindert, um das Auftreten von Herzrhythmusstörungen zu vermeiden. Die detaillierte Darstellung des Aufbaus der Langendorff-Anlage ist in Abbildung 2 zu sehen. Das begaste Perfusat wurde mittels der Schlauchpumpe angesaugt und erreichte über den Luftfänger das isolierte Herz. Unmittelbar nach der Befestigung des Herzens an der Langendorff-Apparatur folgte die Exzision des linken Vorhofohres. Anschließend wurde ein Ballon (Eigenherstellung) über den linken Vorhof in den linken Ventrikel platziert. Über die Füllung des Ballons, mit doppelt destilliertem H₂O, wurde ein linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) von 4 bis 6 mmHg eingestellt. Die Verbindung des linksventrikulären Ballons mit der PowerLab-Station ermöglichte über einen Druckaufnehmer die Darstellung der mechanischen Herzarbeit. Die Aufzeichnung erfolgte mit dem Programm LabChart® 7 Pro, Version 7.3.7. Das Perfusat wurde aus dem Koronarvenensinus des isolierten Herzens als Koronarfluss (CF) ausgeworfen. Der Koronarfluss wurde manuell in

einem Becherglas gesammelt, abgewogen und anschließend verworfen. Die verwendeten Substanzen wurden über Perfusoren herznah appliziert.

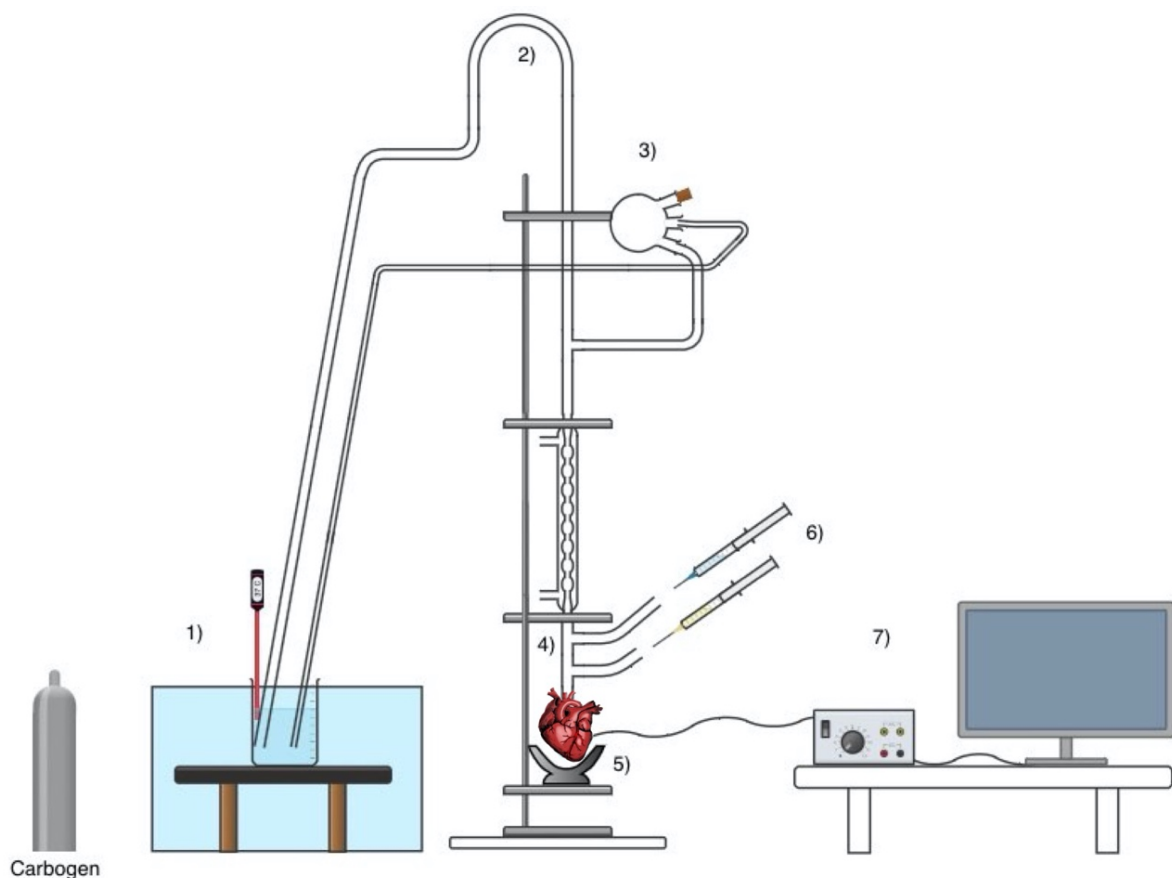


Abb. 2 Schematische Skizze der Langendorff-Anlage. Aufbau der Langendorff-Anlage (nicht maßstabsgetreu): Das KHP-Perfusat wurde fortlaufend mit Carbogen begast und mittels Einhängethermostat im 1) Wasserbad auf 37°C erwärmt. Eine Schlauchpumpe förderte das Perfusat anschließend durch den 3) Luftfänger in die gesamte Apparatur. Das isolierte Herz, das über die Aorta kanüliert und fixiert war, wurde dabei kontinuierlich mit einem konstanten Druck von 80 mmHg retrograd perfundiert. Dieser Perfusionsdruck wurde über einen am höchsten Punkt angebrachten 2) Schlauch eingestellt. Die Perfusion des Herzens wurde über einen 4) Dreiwegehahn reguliert. Ein zusätzlich 5) beheiztes Wärmeschild erwärmte das Herz permanent. Über 6) Perfusoren und weitere Dreiwege-Hähne wurden die benötigten Substanzen appliziert. Der linksventrikuläre Ballon übermittelte die hämodynamischen Daten über den Druckaufnehmer an die 7) PowerLab-Station. Diese wurden mit dem Programm LabChart® aufgezeichnet und auf dem Computermonitor visualisiert. Created with Chemix (<https://chemix.org>).

2.2.4 Substanzen

Levosimendan

Das Pharmakon Levosimendan gehört zur Wirkstoffklasse der Kalzium-*Sensitizer* und Inodilatoren. Die Summenformel lautet $C_{14}H_{12}N_6O$ und die molare Masse beträgt $280,28\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Für die Versuche wurde Levosimendan der Firma Cayman Chemical Company genutzt. Levosimendan wirkt molekular über seine besondere Interaktion mit myofilamentärem Troponin C und somit über die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität des Myokards positiv inotrop. Im Vergleich zu anderen Inotropika steigert Levosimendan die myokardiale Kontraktilität ohne negativen Einfluss auf den Sauerstoffbedarf des Herzes [98-100]. Die klinische Anwendung ist bei der intravenösen Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz indiziert.

Vor Beginn der Versuche wurde eine 20 mM Levosimendan Stocklösung angefertigt. Hierfür wurden 10 mg Levosimendan in 1784,9 μl 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Bei 7,5 μl 20 mM Levosimendan enthielt die Perfusorspritze 0,15% DMSO. Nach Verdünnung mit 4937,5 μl KHP betrug die Levosimendan-Konzentration in der jeweiligen Spritze 30 μM . Die Endkonzentration von Levosimendan am Herzen lag bei 0,3 μM [97].

Cyclosporin A

Das Pharmakon Cyclosporin A (CsA) gehört zu der Gruppe der Immunsuppressiva. Aus seiner Summenformel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ ergibt sich eine molare Masse von $1202,61\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Für die Versuche wurde Cyclosporin A der Firma Cayman Chemical Company genutzt.

Vor Beginn der Versuche wurde eine 20 mM CsA Stocklösung angefertigt. Hierfür wurden 5 mg CsA in 208 μl 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Nach Verdünnung mit 4937,5 μl KHP betrug die CsA-Konzentration in der jeweiligen Spritze 20 μM . An der Langendorff-Apparatur wurde dem isolierten Herzen mittels eines Perfusors stets 1% des ermittelten Koronarflusses appliziert, so dass die Endkonzentration von CsA am Herzen bei 0,2 μM lag [97].

D (+) -Glukose

Die D (+) -Glukose, auch Dextrose genannt, besitzt die Summenformel $C_6H_{12}O_6$ und weist eine molare Masse von $180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf. Für die Versuche wurde D (+) - Glukose der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG genutzt.

3,964 g D (+) -Glukose wurden in 15 ml KHP rührend auf der Heizplatte aufgelöst und auf insgesamt 20 ml KHP aufgefüllt. Die Gesamtkonzentration der Glukoselösung am Herzen lag bei 22 mmol/l. Diese setzte sich zum einen aus 11 mmol/l aus dem KHP und zum anderen mit 11 mmol/l aus der angerührten Glukoselösung zusammen. Das isolierte Herz erhielt über einen Perfusor stets 1% Glukoselösung des jeweilig ermittelten Koronarflusses [97].

2.2.5 Versuchsprotokoll und Versuchsbeschreibung

In dieser Studie untersuchten wir in einer Versuchsreihe insgesamt 20 isolierte WISTAR-Rattenherzen, die in vier Versuchsgruppen randomisiert wurden (Abb. 3). Die Kontrollgruppe (n = 5) erhielt lediglich die Vehikellösung. Diese bestand aus 4937,5 µl KHP und 62,5 µl 100%igem DMSO. Levosimendan 0,3 µM wurde den isolierten Herzen in der zweiten Gruppe appliziert (n = 5). Die dritte Gruppe (n = 5) erhielt die alleinige Gabe von CsA 0,2 µM. Der vierten Gruppe (n= 5) wurde die Kombination von Lev 0,3 µM und CsA 0,2 µM verabreicht [97].

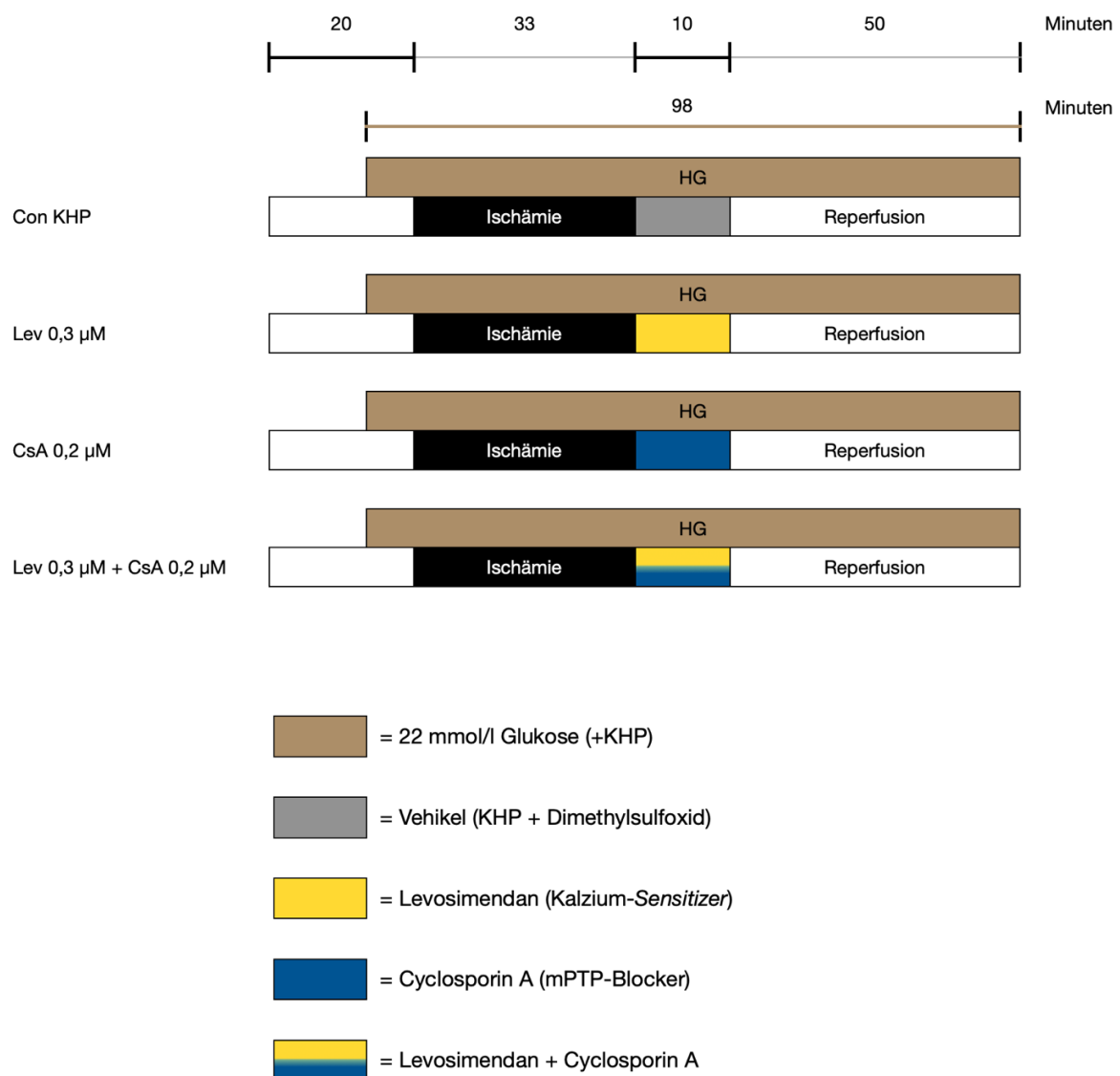


Abb. 3 Versuchsprotokoll zur Levosimendan-induzierten Postkonditionierung unter HG (modifiziert nach Torregroza et al. 2021). Die Abb. 2 zeigt den Versuchsaufbau der Kontrollgruppe sowie der Interventionsgruppen. Con = Kontrolle; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporin A [97].

Alle Herzen durchliefen eine 15-minütige Adaptationsphase, eine 33-minütige globale Ischämiephase (ab der 20. Minute) gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusionsphase (ab der 53. Minute). Ab der 15. Minute erfolgte die Applikation der Glukoselösung mit einer Gesamtkonzentration von 22 mmol/l zur Induktion einer akuten Hyperglykämie (HG) in allen Versuchsgruppen. In der 18. Minute wurde über den CF die Glukosekonzentration bestimmt. Das Protokoll der akuten HG wurde entsprechend einer Vorstudie aus unserer Arbeitsgruppe übernommen [91] und erzielte einen präischämischen Glukosewert ≥ 300 mg/dl. Die Induktion der globalen Ischämie erfolgte in der 20. Minute für 33 Minuten. Hierbei wurde die Zuleitung des KHP sowie der Substanzen über den Dreiwege-Hahn verschlossen (Abb. 2) und damit die Perfusion des Herzes gestoppt. Anschließend wurde das Wärmeschild mit 40 ml Ischämiepuffer befüllt. Der Ischämiepuffer bestand aus dem KHP und wurde zusätzlich mit Stickstoff (N) begast. Mit Hilfe des Ischämiepuffers wurden die Kardiomyozyten vor dem in der Raumluft enthaltenem O₂ isoliert, da sie über Diffusion die Fähigkeit besitzen O₂ aus der Raumluft zu entnehmen. Um während der globalen Ischämiephase einen anhaltenden hyperglykämischen Zustand der Herzen sicherzustellen, wurde dem Ischämiepuffer ebenfalls eine Glukosekonzentration von 22 mmol/l zugesetzt. Die 60-minütige Reperfusion (ab der 53. Minute) erfolgte mit dem KHP und der Glukoselösung, einschließlich einer 10-minütigen Postkonditionierungsphase (Abb.2). Um einen Postkonditionierungsreiz zu erzielen, wurden alle Substanzen mit einer Infusionsrate von 1% des jeweiligen CF appliziert [97].

2.2.6 Postexperimentelle TTC-Färbung

Zur Darstellung der Infarktgrößen wurden die Herzen zunächst in transversaler Schnittführung in acht jeweils 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,75 %iger Triphenyltetrazoliumchlorid. 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) besitzt die Summenformel $C_{19}H_{15}ClN_4$ und hat eine molare Masse von $334,81 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Herzscheiben wurden in einer Well-Platte mit der TTC-Färbelösung bedeckt und in einem Wärmebad bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Herzen für 24 h in 4%iger Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Im letzten Schritt erfolgte das Scannen der Herzscheiben (Abb. 4). Nach sieben Tagen wurde das Trockengewicht der Herzen zur Ermittlung der myokardialen Ödembildung bestimmt. Die TTC-Färbung wird auch als Vitalfärbung bezeichnet und beruht auf einer Redox-Reaktion. Die Reaktion wird durch Dehydrogenasen in den Zellen induziert. Ein Tetrazolium-Radikal reduziert Tetrazolium-Kation zu rotem Formazan, wodurch vitale Zellen im Risikobereich (AAR) demnach rot gefärbt werden. Avitale Zellen erscheinen im Vergleich zu den vitalen Zellen weiß [101].



Abb. 4: Herzscheiben nach TTC- Färbung: Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft die postexperimentelle Färbung der Herzen mit 0,75 %iger Triphenyltetrazoliumchlorid. Vitale Zellen werden durch die Redox-Reaktion, durch das Enzym Dehydrogenase, rötlich gefärbt. Infarzierten Zellen fehlt die enzymatische Reduktion, folglich sind diese Areale farblos und stellen sich weißlich dar [101].

2.2.7 Bestimmung der Infarktarealgröße

Ein verblindeter Studienteilnehmer (der nicht an den Versuchen teilnahm) wertete die Infarktareale unter Einsatz des SigmaScan Pro 5® Programmes (SPSS Science Software, Chicago, IL, USA) planimetrisch aus. Die Infarktarealgrößen der Herzen wurden als prozentualer Anteil an der linksventrikulären Gesamtfläche bestimmt [97].

2.2.8 Hämodynamische Auswertung

In allen Versuchen wurde folgende Parameter der Hämodynamik kontinuierlich gemessen und graphisch dargestellt: die Herzfrequenz (HR), der linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP).

CF (ml/min)

Der CF besteht aus dem KHP, welches das isolierte Herz perfundiert und ausgeworfen wird. Der CF steht in Beziehung zu der kontraktile Funktion des Herzens. Die Messung des CF erfolgte manuell für eine Minute, ebenfalls zu den oben genannten Zeiten.

Herzfrequenz (HR) (min^{-1})

Die Aufzeichnung der HR erfolgte in Schlägen pro Minute.

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Der LVEDP beschreibt den gemessenen Druck in mmHg am Ende der Diastole vor der systolischen Kontraktion. Der LVEDP ist eine Kenngröße der diastolischen Herzfunktion. In der Adaptationsphase wurde über den Ballon im linken Ventrikel ein Druck von 4-6 mmHg eingestellt. Um die Herzfunktion nicht zu beeinflussen, wurde der LVEDP während der laufenden Versuche nicht verändert.

Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP)

Der LVESP ist der gemessene Druck in mmHg am Ende der Systole und eine Kenngröße der systolischen Herzfunktion.

Linksventrikuläre Entwicklungsdruck (LVDP)

Über die Differenz der LVESP und LVEDP wurde der linksventrikuläre Entwicklungsdruck in mmHg berechnet: $LVESP - LVEDP = LVDP$ (*left ventricular developed pressure*). Dieser beschreibt die maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit.

Die gemessenen hämodynamischen Variablen wie die HF, der CF sowie der LVDP werden in Abschnitt 3.2 in Tabelle 1 dargestellt. Nur die zu bestimmten vier Zeitpunkten gemessenen Daten (Minute 15 nach Ende der Adaptationsphase sowie in der Minute 30, 45 und 60 nach Reperfusionsbeginn) wurden in die statistische Auswertung aufgenommen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Mit Hilfe von *GraphPad StatMate*TM (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) wurde eine Stichprobengröße von 5 Versuchstieren pro Gruppe für die Erkennung einer Infarktgrößendifferenz von 25 % mit einer Sicherheit von 80% und einem α -Fehler $<0,05$ (zweiseitig getestet) bestimmt. Die Analyse der Infarktgrößen-Signifikanz erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*one-way analysis of variance* (ANOVA)) und anschließendem *Tukey post hoc* Test. Für die hämodynamischen Daten zwischen den Gruppen sowie für die Zeiteffekte innerhalb jeder Gruppe wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way analysis of variance* (ANOVA)) und anschließendem *Tukey post hoc* Test durchgeführt. Die Ergebnisse der Infarktgrößen sowie der hämodynamischen Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen angegeben. Die Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant anerkannt [97].

3 Ergebnisse

3.1 Infarktgröße

Die Bestimmung der Infarktrealgröße erfolgte als prozentualer Anteil des Risikogebiets an der linksventrikulären Gesamtfläche. Die Größe des Infarktrealbereichs war der primäre Endpunkt dieser Arbeit. Wie in Kapitel 2.2.5 Versuchsprotokoll beschrieben, wurden die Daten an 20 Versuchstieren erfasst. Unter akuter Hyperglykämie zeigten die Herzen in der Kontroll- sowie in der Levosimendan-Gruppe Infarktgrößen von 53 ± 4 % bzw. 56 ± 2 %. Die Kombination von Levosimendan mit Cyclosporin A unter akuter Hyperglykämie reduzierte die Infarktgröße im Vergleich zur alleinigen Applikation von Levosimendan signifikant (Lev 0,3 + CsA 35 ± 4 %; $p < 0,05$ vs. Lev 0,3). Cyclosporin A allein hatte unter akuter Hyperglykämie keinen Einfluss auf die Infarktgröße (CsA 50 ± 10 %; ns vs. Con) (Abb. 5).

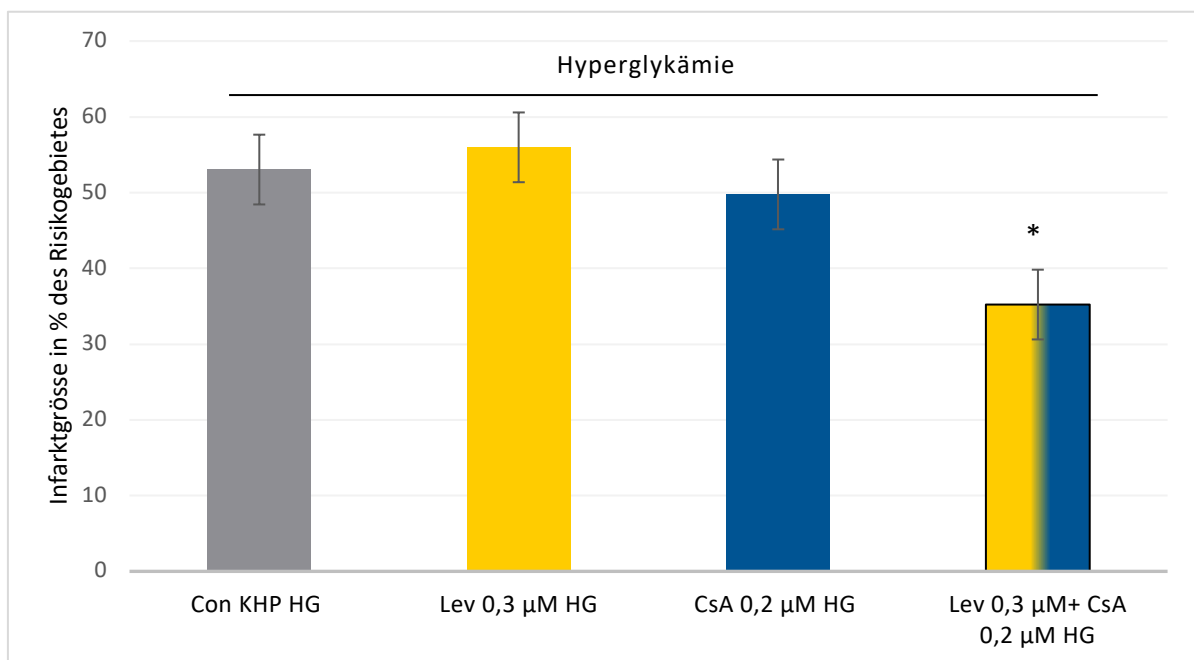


Abb. 5 Infarktgrößen unter akuter Hyperglykämie (modifiziert nach Torregroza et al. 2021): Das Histogramm präsentiert die Infarktgröße in % des Risikogebiets der Kontroll- sowie Interventionsgruppen. Die Kombination von Lev 0,3 µM + CsA 0,2 µM zeigt eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu Lev 0,3 µM (* $p < 0,05$ vs. Lev 0,3). Die Ergebnisse sind in Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung angegeben. Con = Kontrolle CsA = Cyclosporin A; HG = Hyperglykämie; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; Lev = Levosimendan [97].

3.2 Hämodynamische Daten

Die Ergebnisse der Hämodynamik sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Zu keinem Messzeitpunkt wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen und innerhalb der verschiedenen Gruppen festgestellt. Während der Reperfusion verringerten sich der LVDP und der CF signifikant im Vergleich zum *baseline* Wert innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe [97].

	baseline	Reperfusion		
	15. min	30. min	45. min	60. min
Herzfrequenz (min ⁻¹)				
Con	311 ± 54	205 ± 42*	220 ± 69	192 ± 16*
Lev 0,3	297 ± 30	245 ± 87	259 ± 45	216 ± 52
CsA	292 ± 23	215 ± 63	214 ± 67	229 ± 47
Lev 0,3 + CsA	306 ± 29	297 ± 43	267 ± 20	265 ± 23
Linksventrikulärer Entwicklungsdruck (mmHg)				
Con	117 ± 19	20 ± 16*	28 ± 16*	28 ± 11*
Lev 0,3	106 ± 14	15 ± 13*	20 ± 19*	25 ± 16*
CsA	123 ± 26	35 ± 8*	37 ± 13*	35 ± 10*
Lev 0,3 + CsA	112 ± 21	23 ± 18*	24 ± 13*	24 ± 12*
Koronarfluss (ml/min)				
Con	15 ± 3	7 ± 3*	6 ± 1*	6 ± 2*
Lev 0,3	13 ± 2	6 ± 1*	6 ± 1*	5 ± 1*
CsA	15 ± 2	5 ± 1*	6 ± 1*	6 ± 1*
Lev 0,3 + CsA	14 ± 2	7 ± 2*	7 ± 2*	6 ± 1*

Tabelle 1: Hämodynamische Daten. Die Daten sind in Mittelwerten ± Standardabweichung angegeben. Alle Daten wurden unter akuter Hyperglykämie erfasst. Abkürzungen: Con = Kontrolle; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporin A.* $p < 0,05$ vs. *baseline* [97].

3.3 Glukosekonzentrationen

Die ermittelten Glukosekonzentrationen werden in der Tabelle 2 dargestellt. Die Bestimmung der Glukosekonzentrationen im CF erfolgte in jedem Versuch präischämisch in der 15. (*baseline*) und 18. Minute (Präischämie) sowie postischämisch in der 15. und 60. Minute. In allen Gruppen war zum Zeitpunkt der Präischämie und in der Reperfusion ein signifikanter Anstieg der Glukosewerte im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten. Zwischen den Gruppen gab es keine Unterschiede bezüglich der Glukosekonzentrationen [97].

	baseline	Präischämie	Reperfusion	
	15. min	18. min	15. min	60. min
Glukosekonzentration (mg/dl)				
Con	203 ± 3	384 ± 6*	389 ± 12*	418 ± 35*
Lev 0,3	199 ± 9	373 ± 16*	391 ± 9*	441 ± 18*
CsA	204 ± 10	377 ± 9*	390 ± 10*	425 ± 20*
Lev 0,3 + CsA	203 ± 6	389 ± 8*	398 ± 5*	448 ± 35*

Tabelle 2: Glukosekonzentrationen (mg/dl) unter induzierter PoC. Die Daten sind in Mittelwerten ± Standardabweichung angegeben. Abkürzungen: Con = Kontrolle; CsA = Cyclosporin; Lev = Levosimendan. * $p < 0,05$ vs. *baseline* [97].

3.4 Gewichte und Ischämiekontraktur

Die Tabelle 3 zeigt die Körper-, Herznass- und Herztrockengewichte. Ebenso wird der Zeitpunkt sowie die Höhe der maximalen Ischämiekontraktur während der globalen Ischämiephase dargestellt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Körper-, der Herznass- und der Herztrockengewichte. Im Weiteren gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Zeitpunktes sowie der Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur (Tabelle 4) [97].

	Körpergewicht (g)	Herznassgewicht (g)	Herztrockengewicht (g)
Con	316 ± 11	1,27 ± 0,04	0,14 ± 0,00
Lev 0,3	288 ± 21	1,24 ± 0,07	0,12 ± 0,01
CsA	294 ± 24	1,15 ± 0,08	0,12 ± 0,01
Lev 0,3 + CsA	307 ± 11	1,19 ± 0,04	0,12 ± 0,01

Tabelle 3: Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Körper-, der Herznass- und der Herztrockengewichte. Die Daten sind in Mittelwerten ± Standardabweichungen angegeben. Abkürzungen: Con = Kontrolle; CsA = Cyclosporin; Lev = Levosimendan [97].

	Zeitpunkt der maximalen Ischämiekontraktur (min)	Höhe der maximalen Ischämiekontraktur (mmHg)
Con	16 ± 2	75 ± 15
Lev 0,3	15 ± 2	79 ± 10
CsA	15 ± 2	77 ± 7
Lev 0,3 + CsA	15 ± 2	68 ± 8

Tabelle 4: Zeitpunkt (min) und Höhe (mmHg) der maximalen Ischämiekontraktur. Die Daten sind in Mittelwerten ± Standardabweichung angegeben. Abkürzungen: Con = Kontrolle; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporin A [97].

4 Diskussion

Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere die KHK, zählen weltweit zu den führenden Todesursachen [3, 4]. Durch die alternde Bevölkerung sowie die steigende Zahl komplexer operativer Eingriffe nimmt der Anteil an Patienten mit erhöhtem kardialen Risiko weiter zu, wodurch Strategien zur Kardioprotektion zunehmend an Bedeutung gewinnen. Ein zusätzlicher wichtiger Faktor ist die akute Hyperglykämie, die sowohl beim Myokardinfarkt als auch im perioperativen Umfeld mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [14-20]. Mehrere Studien zeigen eine signifikante Korrelation zwischen dem Blutglukosewert und dem Langzeitergebnis nach einem akuten Myokardinfarkt [15, 102]. Die Problematik besteht darin, dass akute kardiale Ereignisse in der Regel nicht vorhersehbar sind. Obwohl kardioprotektive Interventionen mittels Postkonditionierung gute Ergebnisse liefern, ist die Durchführung von kurzen Ischämie- und Reperusionszyklen am Patienten nicht realisierbar. Allerdings kann der ischämische Stimulus pharmakologisch nachgeahmt werden. Auch bei dieser pharmakologischen Konditionierung kann eine ausgeprägte Kardioprotektion ausgelöst werden [78, 80, 81, 83]. Levosimendan ist ein klinisch eingesetztes Medikament und vor allem indiziert bei der Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. In der Grundlagenforschung, vor allem in tierexperimentellen Modellen, zeigt Levosimendan kardioprotektive Effekte [83, 84]. Aufgrund seiner klinischen Anwendung erscheint es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob Levosimendan auch unter einer akuten Hyperglykämie eine Kardioprotektion auslösen kann.

4.1 Diskussion der Infarktgrößenreduktion

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Kombination von Levosimendan und Cyclosporin A unter akuter Hyperglykämie eine signifikante Infarktgrößenreduktion um etwa 21%. Die Arbeit von Kersten et al. aus dem Jahr 2000 zeigte erstmals in einem *in vivo* Hundemodell den infarktgrößenreduzierenden Effekt von Levosimendan [84], wobei die Infarktgröße von $24 \pm 2 \%$ (Kontrolle) auf $11 \pm 2 \%$ (Levosimendan) abnahm. Während Kersten et al. ein *in vivo* Versuchsmodell mit

einer passageren Okklusion der linken Koronararterie (LAD) durchführten, beruhen die Ergebnisse von Leprán et al. auf einem *ex vivo* Versuchsmodell an isolierten Kaninchenherzen an der Langendorff-Anlage [103] und sind demnach methodisch eher mit unseren Ergebnissen zu vergleichen. Allerdings untersuchten sie den Einfluss von Levosimendan auf die Infarktgröße als pharmakologischen Präkonditionierungsstimulus unter Normoglykämie, indem sie 0,1 µmol/l Levosimendan über zwei Zyklen von jeweils fünf Minuten, verabreichten. Die Infarktgröße der Kaninchenherzen verringerte sich hierbei von $52 \pm 2 \%$ (Kontrolle) auf $45 \pm 2 \%$ (Levosimendan). Wie auch in der vorliegenden Arbeit, induzierten Leprán et al. eine globale Ischämie, allerdings betrug diese 30 Minuten gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusion. Unabhängig von systemischen und humoralen Einflüssen zeigten Leprán et al. erstmals, dass Levosimendan als pharmakologischer Präkonditionierungsreiz signifikant im *ex vivo*-Modell die Infarktgröße reduziert [103]. Hönisch et al. führten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2010 am *in vivo*-Rattenmodell eine Postkonditionierung mit Levosimendan unter Normoglykämie durch und erzielten ebenfalls eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle $48 \pm 2\%$; Levosimendan $29 \pm 3 \%$) [104]. Die Ischämie wurde für 30 Minuten über eine Okklusion der linken Koronararterie (LAD) herbeigeführt, so dass im Anschluss eine 30-minütige Reperfusion stattfand. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit verabreichten Hönisch et al. Levosimendan vor Beginn der Reperfusion als Bolus für fünf Minuten. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Applikation jedoch für zehn Minuten. Interessanterweise zeigten du Toit et al. in einem *ex vivo*-Meerschweinchenmodell, dass die kontinuierliche Applikation für zehn Minuten, ohne das Levosimendan (0,1 µM) auszuwaschen, im Gegensatz zur intermittierenden Gabe mit einer Auswaschphase, eine Zunahme der Infarktgrößenreduktion bewirkte [87]. Bunte et al. untersuchten im Jahr 2018 im *ex vivo* Rattenmodell unter Normoglykämie, ähnlich wie du Toit et al., den Effekt von 0,1 µM Levosimendan mittels kontinuierlicher Applikation für zehn Minuten an der Langendorff-Anlage als pharmakologische Präkonditionierung und konnten den infarktreduzierenden Effekt bestätigen ($58 \pm 7 \%$ Kontrolle; 0,1 µM Levosimendan $47 \pm 9 \%$) [105]. Zwecks einer Dosisfindungsstudie führten sie weitere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen durch und verzeichneten für 0,3 µM Levosimendan den maximalen infarktgrößenreduzierenden Effekt als niedrigste

kardioprotektive Dosis. Die Infarktgröße für 0,3 μ M Levosimendan betrug 30 ± 7 % [105]. In einer weiteren Dosisfindungsstudie mit Levosimendan (*ex vivo* Rattenmodell) unter Normoglykämie, welche ebenfalls wie auch die vorliegende Arbeit als pharmakologischer Postkonditionierungsreiz durchgeführt wurde, identifizierten Stroethoff et al. im Jahr 2019, dass die niedrigste kardioprotektive Dosis 0,3 μ M betrug. Die Infarktgröße war gegenüber der Kontrollgruppe um 30% verringert [83]. Im Gegensatz zu Stroethoff et al. führten Matsumoto et al. bereits im Jahr 2012 sowohl unter Normoglykämie als auch unter pathologischen Bedingungen einer akuten Hyperglykämie an Wistar-Ratten (*in vivo*) eine Dosisfindungsstudie mit Levosimendan als Postkonditionierungsstimulus durch [95]. Basierend auf der Annahme, dass eine akute Hyperglykämie eine pharmakologisch induzierte Kardioprotektion blockiert [96, 106], erhöhten sie die Levosimendankonzentration in der Hyperglykämiegruppe. In Übereinstimmung ihrer Annahme, verzeichneten sie für die Herzen in der Gruppe mit Hyperglykämie erst bei 100 μ g/kg Levosimendan (zehnfach erhöhte Dosis) eine signifikante Infarktgrößenreduktion um etwa 26%. Unter Normoglykämie übte bereits 10 μ g/kg Levosimendan eine signifikante Infarktgrößenreduktion von etwa 25% aus. Wie in dieser vorliegenden Arbeit wurde Levosimendan bei Matsumoto et al. in den ersten zehn Minuten der 120-minütigen Reperfusionsphase appliziert [95].

Analog zu unseren Ergebnissen, beobachteten Huhn et al. schon im Jahr 2008, dass die kombinierte Applikation von Sevofluran und Cyclosporin A unter Hyperglykämie als Postkonditionierungsstimulus infarktgrößenreduzierend wirkt (51,4 % Kontrolle; 35,2 % Sevofluran + Cyclosporin A) [78]. Ähnlich wie Levosimendan in unserer Studie, hatte die alleinige Applikation von Sevofluran keinen Effekt auf die Infarktgröße. Im Gegensatz zu Matsumoto et al. konnten Huhn et al. weder über eine Erhöhung der Konzentration von Sevofluran noch Cyclosporin A einen kardioprotektiven Effekt beobachten. Wir zeigten in dieser Arbeit, dass die Kombination von Levosimendan und Cyclosporin A unter hyperglykämischen Bedingungen die Infarktgröße signifikant reduziert. Basierend auf diesen Ergebnissen, stellt sich im Weiteren die Frage, inwieweit dieser Effekt mit hämodynamischen Veränderungen assoziiert ist.

4.2. Diskussion der Hämodynamik

Zwischen und innerhalb der verschiedenen Gruppen wurden zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich der HF festgestellt. Der CF veränderte sich erwartungsgemäß während der Reperfusion signifikant im Vergleich zum *baseline* Wert innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe. Nach Induktion der globalen Ischämie mit Entstehung eines Infarktareals nahm die Pumpleistung des Herzens als Ausdruck eines I/R-Schadens ab. Infolgedessen wurde weniger Perfusatlösung durch die Koronarien gepumpt, welches sich im reduzierten CF widerspiegelte. Wie der CF verringerte sich während der Reperfusion der LVDP signifikant im Vergleich zum *baseline* Wert innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe. Der LVDP steht als Maß für die linksventrikuläre myokardiale Funktion. Zwischen den Gruppen zeigte sich interessanterweise kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der LVDP. Da die Kombination von Levosimendan und CsA eine Infarktgrößenreduktion ausübte, wäre ein Anstieg des LVDP in dieser Gruppe erdenkbar gewesen. Vorstudien mit Levosimendan unter Normoglykämie sowie auch unter akuter HG bestätigen unsere Ergebnisse, in dem auch in diesen ein Anstieg des LVDP nicht aufzuzeichnen waren [83, 97, 105].

Ein möglicher Grund für die ausbleibende Verbesserung der Hämodynamik kann am myokardialen *Stunning* nach Ischämie und Reperfusion liegen. Hierbei kommt es zu einer transienten postischämischen kontraktilen Dysfunktion des Myokards. Braunwald et al. beschreiben regionale sowie globale Ischämien als Auslöser des *Stunnings*, welche auch nach wiederhergestellter Perfusion und fehlender irreversibler Zellschädigung im Sinne einer Nekrose auftreten kann [107]. Die genaue Pathogenese des *Stunnings* ist nicht eindeutig geklärt. Die Ursache liegt vermutlich in einer komplexen Serie zellulärer Störungen. Zum einen stehen oxidativer Stress durch die Bildung von ROS und zum anderen eine Beeinträchtigung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase als mögliche Schlüsselereignisse zur Diskussion. Letzteres scheint über eine Abnahme der Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente Veränderungen im kardialen Troponinkomplex zu verursachen [108]. Beide Theorien schließen sich sehr wahrscheinlich nicht aus, sondern sind Aspekte eines gemeinsamen Pathomechanismus [109]. Potenziell ist eine Genesung des Myokards möglich.

Allerdings kann diese auch bei kurzzeitigen Ischämieperioden bis Tage dauern [110]. Unter Umständen ist die kurze Zeit der Reperfusion in unserer Arbeit nicht ausreichend, um eine Verbesserung der Hämodynamik zu beobachten. Diese Annahme wird durch die Arbeit von Jamali et al. unterstützt, in der nach fünf 5-minütiger Okklusion der LAD (*left anterior descending*) die abschließende Reperfusionszeit drei Stunden betrug, wodurch eine funktionelle Erholung der Hämodynamik erzielt wurde. Wie auch in unserer Arbeit verwendeten Jamali et al. den Ca^{2+} -Sensitizer Levosimendan, welches allerdings intrakoronar verabreicht wurde. Auch die Arbeit von Leprán et al. zeigte unter einer verlängerten Reperfusionszeit von 120 Minuten eine Verbesserung der Hämodynamik nach einer Präkonditionierung mit Levosimendan [103] .

Ferrera et al. führten in diesem Kontext Untersuchungen zu der optimalen Reperfusionsdauer in Bezug auf hämodynamische Veränderungen durch. Entgegen den zuvor beschriebenen Arbeiten von Jamali und Leprán zeigte eine 120-minütige Reperfusion im Vergleich zu einer 60-minütigen Reperfusion keine signifikante Verbesserung der Hämodynamik. Ein infarktreduzierender Effekt blieb aus [111]. Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass eine 60-minütige Reperfusion, wie auch in unserer Arbeit, zur Bewertung der Infarktgröße angemessen ist.

4.3 Einfluss der Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung

Eine akute HG wird nicht nur als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie einen akuten Myokardinfarkt betrachtet, sondern beeinflusst auch wesentlich die Morbidität und Mortalität nach einem I/R-Schaden [16, 112]. In einer klinischen Langzeitstudie wurde gezeigt, dass Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt und gleichzeitig erhöhten Glukosewerten bei der Krankenhausaufnahme eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen [16]. Ein bereits bekannter und relevanter Faktor ist, dass eine HG in experimentellen Versuchen verschiedene kardioprotektive Strategien hemmt [91, 113] und dadurch könnten geringere kardioprotektive Funktionen des Myokards diese erhöhte Sterblichkeit möglicherweise erklären. Vermutlich erschwert auch genau dieser Faktor die

erfolgreiche Translation kardioprotektiver Ansätze in das klinische *Setting*. Auf der Basis dieser Erkenntnisse untersuchten wir in dieser Arbeit den Einfluss der akuten HG auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung am isolierten Herzen am Langendorff-Modell.

Levosimendan gehört zur Gruppe der Kalzium-Sensitizer und wird bei der Therapie der akut und chronisch eingeschränkten Myokardfunktion eingesetzt. Die positiv inotrope Wirkung, welches *in vitro* [114], *in vivo* [115] und ebenso in klinischen Studien [100, 116] belegt wurde, basiert auf der Zunahme der Kalziumsensitivität des Myokards, wodurch eine Steigerung der myokardialen Kontraktilität resultiert. Levosimendan kann über die Bindung mit dem N-terminalen Ende des myokardialen Troponin C letztendlich bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion das Schlagvolumen und den Herzindex steigern [100]. Dadurch resultiert eine Erhöhung des Herzzeitvolumens (HZV), des Sauerstoffangebots (DO_2) und der gemischtvenösen Sauerstoffsättigung (SvO_2) [117-119]. Levosimendan führt über eine Aktivierung der ATP-abhängigen K^+ -Kanälen (K_{ATP} -Kanal) in der glatten Gefäßwandmuskulatur zu einer Vasodilatation. Infolgedessen verringert sich die Vor- sowie die Nachlast mit einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Myokards. Zusätzlich werden Levosimendan, über eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von mitochondrialen Adenosintriphosphat sensitiven Kaliumkanälen (mK_{ATP}) in den Kardiomyozyten, kardioprotektive Eigenschaften vor I/R Schäden zugeordnet [120-123].

In einer früheren Dosisfindungsstudie mit Levosimendan wurde durch eine Postkonditionierung unter Normoglykämie eine konzentrationsabhängige kardioprotektive Wirkung festgestellt [83]. Die niedrigste kardioprotektive Dosis von 0,3 μg Levosimendan führte zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße, wohingegen eine Konzentrationserhöhung auf 1 μg keine Wirkung erzielte. Interessanterweise zeigten Matsumoto et al., dass die HG die Kardioprotektion unter niedrigen Konzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sowie 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Levosimendan blockierte [95]. In der Annahme, dass der Schwellenwert für einen kardioprotektiven Effekt unter HG erhöht ist, untersuchten sie den Postkonditionierungseffekt mit 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Levosimendan. Sie vermuteten, dass die HG zu einer abgeschwächten Öffnung der mitochondrialen Adenosintriphosphat

sensitiven Kaliumkanäle (mK_{ATP}) führt. Auf dieser Grundlage wurden wiederum in einer weiteren *in vitro* Studie von Torregroza et al. verschiedene Levosimendan-Konzentrationen (0,3 μ g, 1 μ g, 3 μ g, 10 μ g) unter akuter HG als Postkonditionierungsstimuli verabreicht. Die Konzentration von 0,3 μ g Levosimendan, die unter Normoglykämie kardioprotektiv wirkte, zeigte unter Hyperglykämie keinen Effekt. Trotz einer Erhöhung der Levosimendan Konzentration, blockierte die Hyperglykämie die Kardioprotektion [97].

Mit Blick auf eine klinische Anwendung wäre eine Applikation einer zehnfach höheren Levosimendankonzentration an Patienten zur Wiederherstellung der blockierten Kardioprotektion nicht empfehlenswert. Die niedrigste kardioprotektive Dosis von 0,3 μ g entspricht umgerechnet etwa einer Plasmakonzentration von 100 μ g/l. Unter Berücksichtigung des therapeutischen Dosisbereichs von 10 μ g/l – 100 μ g/l liegt Levosimendan mit 0,3 μ g bereits im Hochdosisbereich [124-126]. Schließlich ist die Applikation einer zehnfach höheren Levosimendankonzentration zur Wiederherstellung der blockierten Kardioprotektion unter HG im klinischen Alltag nicht umsetzbar.

Die möglichen Gründe der unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dieser Studie und Matsumotos Arbeit werden im Folgenden erläutert. Um eine von systemischen sowie humoralen Einflüssen unabhängige Beobachtung des Herzens zu gewährleisten, entschieden wir uns für einen *in vitro* Versuch mit der Induktion einer globalen Ischämie. Im Gegensatz zu unseren Versuchen am isolierten Wistar-Rattenherz führten Matsumoto et al. eine *in vivo* Studie durch. Über eine 30-minütige Koronararterien-Okklusion (LAD) veranlassten sie eine regionale Ischämie mit anschließender Applikation von Levosimendan. Im Anschluss folgte eine zwei-stündige Reperfusionsphase unter hyperglykämischen Bedingungen [95]. Allerdings applizierten sie die Glukoselösung nur in der ersten Hälfte der Reperfusion. Wir hingegen führten eine HG in der kompletten 60-minütigen Reperfusionsphase durch. Diese heterogenen Versuchsbedingungen können die unterschiedlichen Ergebnisse beider Arbeiten begründen.

4.4 Wiederherstellung der Levosimendan-induzierten Kardioprotektion durch die Kombination mit Cyclosporin A unter Hyperglykämie

Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen, inwiefern eine akute HG kardioprotektive Strategien einschränkt, sind nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die kardioprotektiven Effekte des Levosimendans insbesondere auf der Öffnung des mitochondrialen Adenosintriphosphat sensitiven Kaliumkanals (mK_{ATP}) beruhen [83, 84, 105]. Es ist bekannt, dass eine Öffnung der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle zur Inhibition der mPTP führt, wodurch ein Myokardschutz resultiert [127].

Abgesehen von den mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen in den Kardiomyozyten, existieren diese Kanäle auch in den β -Zellen des Pankreas. Als Reaktion auf die Glukose kommt es zum Schließen von K_{ATP} -Kanälen mit anschließendem Kalziumeinstrom und Insulinausschüttung [128, 129]. Allerdings ist genau diese entscheidende Regulierung hinsichtlich eines kardioprotektiven Effekts der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle in den Kardiomyozyten unbekannt.

Mehrere Studien zeigen, dass eine akute Hyperglykämie die Aktivierung mitochondrialer kardialer K_{ATP} -Kanäle [130, 131] beeinflusst. Gleichermaßen werden wichtige intrazelluläre Mechanismen der Signaltransduktion beeinträchtigt. Insbesondere sind Zielstrukturen des RISK-Signalwegs betroffen, die nach einem ischämischen Postkonditionierungsreiz mit Levosimendan ablaufen. Hierzu gehören unter anderem die Phosphorylierung von Akt, die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) über die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) sowie die Proteinkinase G (PKG) [90, 92, 132, 133]. Zum RISK-Signalweg ist ebenfalls zugehörig die Proteinkinase C. Diese Kinase veranlasst über eine mitochondriale ROS Ausschüttung die Öffnung der mK_{ATP} -Kanäle mit Inhibition der mPTP, wodurch ein Myokardschutz resultiert [72]. Allerdings kann eine akute HG eine mitochondriale ROS-Überproduktion veranlassen und diese erhöhten Mengen von ROS führen zur Öffnung der mPTP und somit zum Zelltod [134, 135]. Eine weitere Beeinträchtigung der Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen durch eine HG können durch intrazellulär erhöhtes ATP verursacht werden [136-138].

Die Arbeit von Matsumoto et al. zeigte, dass unter niedrigen Konzentrationen von

Levosimendan der Postkonditionierungseffekt unter hyperglykämischen Bedingungen blockiert war. Die Kardioprotektion durch Levosimendan konnte lediglich in einer zehnfach höheren Konzentration ausgelöst werden. Matsumoto et al. formulierten daher die Hypothese, dass Hyperglykämie den Schwellenwert der Levosimendan-induzierten Postkonditionierung erhöht, welches auf der abgeschwächten Öffnung und somit der kardioprotektiven Wirkung des mitochondrialen K_{ATP} -Kanal Öffners beruht [95]. Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie von Kersten et al. mit dem mitochondrialen K_{ATP} -Kanal Öffner Diazoxid verstärkt. Sie deutet darauf hin, dass die kardioprotektiven Wirkungen des Diazoxids unter HG abgeschwächt sind und eine höhere Dosis eine Verringerung der Myokardinfarktgröße bewirken kann [136].

Interessanterweise konnten Matsumoto et al. für Milrinon, ein Phosphodiesterase-3-Hemmer, unter HG einen kardioprotektiven Effekt in der gleichen Konzentration wie unter Normoglykämie aufzeigen. Die Frage, ob die mPTP der kardioprotektive Endeffektor für die Postkonditionierung mit Levosimendan und Milrinon sein könnte, überprüften sie mit der Applikation des mPTP-Öffners Atracylosid. Hierbei hob Atracylosid die Kardioprotektion vollständig auf. Aus diesen Ergebnissen leiteten sie ab, dass im Gegensatz zu Levosimendan, Milrinon aller Voraussicht nach einen Postkonditionierungseffekt ohne die Beteiligung der mK_{ATP} -Kanäle sowohl unter HG als auch unter Normoglykämie ausübt [95].

Insgesamt scheinen bei einem Postkonditionierungsstimulus mit Levosimendan unter HG die mitochondriale Energiehomöostase, die mK_{ATP} -Kanäle, die ROS-Konzentration sowie die mPTP eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Kardioprotektion zu spielen.

Die Kombination von verschiedenen Substanzen oder Interventionen, die auf unterschiedliche Ziele ausgerichtet sind, werden als *Multitarget*-Strategien bezeichnet. In einigen Studien wurde demonstriert, dass diese Strategien die blockierte Kardioprotektion unter HG wiederherstellen können. So zeigten Kehl et al. tierexperimentell, dass die Isofluran-induzierte Präkonditionierung in Kombination mit dem Radikalfänger N-Acetylcystein unter Hyperglykämie die blockierte Kardioprotektion wiederherstellt [132]. Diese Arbeit bekräftigt die Theorie, dass ROS unter HG für eine signifikante Kardioprotektion eine wichtige Rolle spielt.

Ähnlich wie in dieser vorliegenden Arbeit zeigten Huhn et al., dass eine akute HG die Kardioprotektion mit Sevofluran aufhebt. Entsprechend unseren aktuellen Ergebnissen resultierte durch die Kombination von Sevofluran mit Cyclosporin A ein kardioprotektiver Effekt, wohingegen die alleinige Applikation von Cyclosporin A unter Hyperglykämie keinen Effekt ausübte [78]. Es ist bekannt, dass Cyclosporin A eine hemmende Wirkung gegenüber der Öffnung der mPTP aufweist [139, 140]. Eine Hyperglykämie scheint diese protektiven Fähigkeiten des Cyclosporin A aufzuheben. Huhn et al. konnten den durch die HG bedingten Verlust der Kardioprotektion über eine Erhöhung der Cyclosporin A Konzentration nicht beeinflussen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann darin bestehen, dass im Rahmen von *Multitarget*-Strategien durch die Kombination von verschiedenen Stimuli eine niedrigere Schwelle für die Kardioprotektion resultiert. Es bedarf in der Zukunft weitere Untersuchungen, die Gründe für den Verlust der Kardioprotektion unter hyperglykämischen Bedingungen untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten wir erstmals am Langendorff-Modell, dass HG die pharmakologische Postkonditionierung mit Levosimendan hemmt, aber der Verlust der Kardioprotektion durch die zeitgleiche Applikation von Cyclosporin A wiederhergestellt werden kann.

4.5 Diskussion der Methode

4.5.1 Das isolierte Herz nach Oscar Langendorff

In dieser Arbeit wurden alle Versuche an der Langendorff-Anlage durchgeführt. Unser Versuchsmodell eignet sich aufgrund seiner konzeptionellen Ausrichtung nur bedingt für die präzise Analyse hämodynamischer Parameter an der Langendorff-Anlage. Für die Untersuchung der Infarktgröße ist die Langendorff-Anlage hingegen ein etabliertes Referenzverfahren [141, 142].

Oscar Langendorff stellte 1895 erstmalig das komplett isolierte und durchblutete Säugetierherz vor [143]. Das Langendorff-Herz wird entgegen der Physiologie retrograd über eine in die Aorta eingeführte Kanüle mit einer oxygenierten Perfusionslösung perfundiert. Dabei wird die Aortenklappe durch den retrograden Fluss geschlossen. Der hydrostatische Perfusionsdruck leitet während der

Diastole die Perfusionslösung über die Ostien in die Koronararterien und versorgt das Myokard mit Nährstoffen und Sauerstoff. Letztendlich gelangt das Perfusat über den Sinus coronarius in das rechte Atrium und fließt als freies Effluat aus der Lungenarterie ab. Als Koronarfluss kann es gesammelt und abgewogen werden [141].

Nach über 100 Jahren Entwicklung ist das Prinzip des Langendorff-Modells eine kostengünstige und übersichtliche Methode mit unkomplizierter Präparation der Herzen und hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Das isoliert perfundierte Herz bietet eine systematische Beurteilung messbarer Einflussgrößen wie Chronotropie, Inotropie, elektrische Aktivität, Koronarfluss und Infarktgröße [144]. Unabhängig von systemischen Effekten wie der neurohumoralen Steuerung, des Nervensystems sowie des peripheren Gefäßsystems wird eine genaue Beobachtung von Ischämie-Reperfusionsschäden mit pharmakologischen Interventionen zur Klärung einer Forschungsfrage ermöglicht [144]. Ein weiterer Vorteil des Langendorff-Modells besteht in der breiten Praktikabilität von verschiedenen Säugetierarten, wozu das isolierte Rattenherz als das am besten Untersuchte gilt [58, 145-148].

Das Modell des isolierten Herzens hat sich für herzphysiologische Untersuchungen, insbesondere von I/R-Schäden etabliert. Wie auch in dieser Arbeit dient die Infarktgröße häufig als Endpunkt. Eine Ischämie kann als globale Ischämie oder als regionale Ischämie induziert werden [149]. In dieser Arbeit haben wir aufgrund der besseren Standardisierung und Vergleichbarkeit eine globale Ischämie durch eine vollständige Unterbrechung der Perfusion zum Herzen über die Langendorff-Anlage erzeugt. Das hohe Verletzungsrisiko eines Gefäßes bei der Durchführung einer regionalen Ischämie mittels einer Ligatur macht diese Methode unvorteilhafter [141]. Bei einigen Spezies kann das Ausmaß der Kollateralisierung so stark ausgeprägt sein, dass die Ligatur einer Arterie nicht genügt, um eine signifikante Ischämie herbeizuführen. Zudem müsste zwecks der Vergleichbarkeit der Ergebnisse die Anbringung der Ligatur stets an der möglichst exakten Gefäßlokalisation erfolgen [141].

Im Langendorff-Modell gibt es zwei verschiedene Arten der Perfusionsmöglichkeit. Neben der Perfusion mit konstantem Fluss, welche über eine Rollpumpe erzeugt wird, existiert die Möglichkeit der Perfusion mit konstantem Druck. Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit einem konstanten Druck von 80 mmHg durchgeführt [97].

Üblicherweise wird in Experimenten mit I/R-Schäden die druckkonstante Perfusion bevorzugt, weil hierbei das isolierte Herz seinen koronaren Gefäßtonus selbstständig regulieren kann [144, 150].

Neben den vielen positiven Aspekten existieren auch bei der Langendorff-Methode limitierende Faktoren, die auf die Infarktgröße als primären Endpunkt bedeutsamen Einfluss haben können. Verletzungen, die beim groben *Handling* beispielsweise während der Präparation aus dem Situs oder Kanülierung des Herzens an der Langendorff-Anlage entstehen, können zu dauerhaften Schäden führen. Zudem kann vorzeitig eine Präkonditionierung stattfinden [149]. Daher ist ein geübter Umgang unter standardisierten Bedingungen für reproduzierbare Ergebnisse unabdingbar [141, 142].

Eine mikrobielle Kontamination der Langendorff-Anlage ist eine der häufigsten Fehler, die die Versuchsergebnisse negativ beeinflussen kann [141]. Zur Ausschaltung dieser Fehlerquelle wurde die Anlage nach jedem Versuchstag mit 80 °Celsius heißem, destilliertem Wasser gespült. Zudem erfolgte alle zwei Wochen eine Reinigung mit 1-prozentiger Salzsäure und anschließender gründlicher Spülung mit destilliertem Wasser. Die Krebs-Henseleit-Pufferlösung wurde täglich neu fertiggestellt. Aktuell ist das Langendorff-Modell immer noch eines der etabliertesten Verfahren zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschaden [141, 149].

4.5.2 Versuchstiere

Für Experimente an der Langendorff-Anlage sind viele Säugetierherzen geeignet, wobei das Rattenherz für *in vitro* Versuche das am häufigsten untersuchte Herzmodell ist. Die Gründe hierfür liegen in der unkomplizierten Handhabung und in den geringen Kosten [149].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich junge, männliche und gesunde WISTAR-Ratten verwendet. Hierbei ist kontrovers zu betrachten, dass die Prävalenz und die Mortalität einer ischämischen Herzerkrankung sowie eines akuten Myokardinfarktes mit zunehmenden Lebensalter deutlich zunehmen [5]. Allerdings stellt ein hohes Alter ein Problem im experimentellen Tiermodell als auch in

klinischen Studien hinsichtlich des Erfolgs einer Konditionierungsstrategie dar [151-153]. Vermutlich liegt die Ursache in einer Beeinträchtigung der kardioprotektiven Signaltransduktion [154, 155]. Liu et. al. beschreiben eine signifikante Infarktgrößenreduktion mittels Cyclosporin A nur bei jungen Ratten. Sie gehen davon aus, dass die mPTP-Regulierung im älteren Rattenmyokard gestört ist und dadurch verantwortlich für den Verlust der Kardioprotektion ist [156].

Wie bereits in Kapittel 1.1.2 beschrieben existieren geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der altersstandardisierten Mortalitätsrate der KHK: im Vergleich ist sie für Männer höher [8]. Zudem erkranken Frauen durchschnittlich 10-15 Jahre später an Herz-Kreislauferkrankungen. Dieser kardiovaskuläre Schutzeffekt ist sehr wahrscheinlich hormonellen Ursprungs [157, 158]. In tierexperimentellen Versuchen zeigen weibliche Ratten eine ausgeprägtere Toleranz bezüglich I/R-Schäden mit einer Beeinflussung der Infarktgrößenausbildung [159]. Aus diesem Grund verwendeten wir in dieser Arbeit ausschließlich männliche Tiere.

Die Errichtung optimaler Versuchsbedingungen ohne Störfaktoren ermöglicht eine isolierte Beobachtung der gewählten Substanzen im Hinblick auf die Infarktgrößenreduktion im Sinne der Grundlagenforschung um die Kardioprotektion.

Dennoch ist es von wesentlicher Bedeutung in zukünftigen Forschungsprojekten geschlechtsbezogene und auch altersspezifische kardioprotektive Strategien zu untersuchen und dementsprechende Therapieansätze abzuleiten.

Auch wenn durch die Verwendung von ausschließlich gesunden Versuchstieren ein Störfaktor wie die Komorbidität gezielt ausgeschaltet werden kann, wird kein realistischer Bezug auf den vorerkrankten Patienten genommen. Die vorliegende Arbeit knüpft an die vorangegangene Problematik an. Mittels Induktion einer akuten Hyperglykämie untersuchten wir dessen Einfluss hinsichtlich der Effektivität der Kardioprotektion einer Levosimendan-induzierten Postkonditionierung.

4.5.3 Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer

Das isolierte Herz an der Langendorff- Anlage wurde mit dem modifiziertem KHP perfundiert. Dieser ist ein häufig verwendeter kristalloider Bikarbonatpuffer, welcher von Hans Adolf Krebs und Kurt Henseleit im Rahmen der Harnstoffwechsel-Forschung entwickelt wurde und insbesondere Anwendung an isolierten Organen und Geweben findet [160]. Der KHP besteht aus 118,5 mM NaCl, 25,0 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 11 mM Glukose und 2,5 mM CaCl₂. Das physiologische bioverfügbare ionisierte Calcium im Blut des Rattenherzen liegt bei ungefähr 1,3 mM [161]. In der ursprünglichen Formulierung des Puffers lag die Kalziumchloridkonzentration deutlich über dem physiologischen Wert. Krebs und Henseleit bedachten hierbei nicht, dass das Kalzium im Blut normalerweise an Proteine gebunden ist. Der modifizierte KHP beinhaltet die Korrektur der Kalziumchloridkonzentration [141].

Die Glukosekonzentration mit 5-6 mmol/l lag zunächst in der Adaptationsphase dieser Arbeit in einem unphysiologischen hohen Zustand. Normalerweise weisen gesunde Ratten eine Glukosekonzentration von 5-6 mmol/l auf. Da aber alternative Energiesubstrate wie freie Fettsäuren und Pyruvat fehlen und das Myokard die Fähigkeit besitzt verschiedene Stoffwechselsubstrate als Energiequelle zu nutzen, wird die Verwendung von Glukose erfolgreich kompensiert [141, 161]. Bei der Zugabe von freien Fettsäuren und Pyruvat mit zeitgleicher Begasung besteht allerdings hohes Risiko des Aufschäumens des Puffers, wodurch Embolien entstehen können [141].

Die Besonderheiten des KHP liegen in der Zusammensetzung und in den idealen Eigenschaften physiologische Vorgänge in isolierten Säugetierorganen aufrecht halten zu können. Obwohl die Lösung das Blutplasma imitieren soll, ist die Zusammensetzung der Ionen- und Substratkonzentration nicht physiologisch. Der KHP ist proteinfrei. Der niedrige onkotische Druck des Puffers im Vergleich zum Blutplasma hat zur Folge, dass in der Reperfusionsphase eine Ödembildung im Myokard entstehen kann, welches wiederum den Koronarwiderstand erhöht [161, 162]. In dieser Arbeit wurde postexperimentell das Herznassgewicht im Sinne einer Eruierung eines myokardialen Ödems ermittelt.

Die Sauerstofftransportkapazität des KHP ist niedriger als die des Blutes [149]. Infolgedessen resultiert eine erhöhte Koronarflussrate, welche zusätzlich zu einem

myokardialem Ödem führen kann [161, 162]. Mittels fortlaufender Begasung des Puffers mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) wurde der Sauerstoffpartialdruck angehoben und der pH-Wert mit 7,4 bei 37°Celsius auf physiologischem Niveau gehalten. Abweichungen des pH-Wertes können Gefäßtonusveränderungen bewirken und somit Auswirkungen auf die Kontraktilität des Herzens haben. Hierbei verursacht die Azidose (pH-Wert < 7,4) über eine Vasodilatation eine Verringerung der Kontraktilität. Im Gegensatz resultiert über eine Vasokonstriktion, induziert durch eine Alkalose (pH-Wert > 7,4), eine verstärkte Kontraktilität [163, 164]. Beide Abweichungen vom physiologischen pH-Wert können die Versuchsergebnisse erheblich beeinflussen. In dieser Arbeit wurden der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck prä- als auch periexperimentell anhand von Blutgasanalysen kontrolliert.

Neben der Perfusion des isolierten Herzes mit dem modifizierten KHP zu perfundieren, besteht die Möglichkeit der Perfusion mit Blut oder Erythrozyten [165]. Auch wenn blutperfundierte Herzen ein geringeres Myokardödem aufweisen und die Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten besser ist [166], ist die Aufbereitung sowie Verabreichung insgesamt komplex, aufwendig und teuer. Nachteilig ist zudem, dass ein weiteres Versuchstier, ein sogenanntes Spendertier, benötigt wird. Bei der Verwendung von spezie fremden Blut kann es durch eine ungewollte immunologische Reaktion zu einer Störung des Versuchsablaufs kommen [148, 166]. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Begasung der Erythrozyten mit Sauerstoff, welche zu einer Schaumbildung mit Embolierisiko sowie Hämolyse führt [148, 167]. Insgesamt ist die Perfusion mit dem modifizierten KHP einfacher, kostengünstiger und praktikabler [149].

Zwischen der Temperatur und der Myokardkontraktilität des isolierten Herzens besteht eine hohe Korrelation [148, 168]. Kleine Säugetierherzen wie beispielsweise Ratten besitzen in Relation zu ihrer großen Oberfläche ein geringes Volumen, so dass insbesondere in *in-vitro* Versuchen ein Wärmeverlust mit Hypothermie droht [141]. Bei *in-vivo* Versuchen mit einem intakten und geschlossenen Thorax besteht das Risiko einer Hypothermie eher nicht. Temperaturschwankungen in Sinne einer temporären Hyperthermie (42°C) [169] sowie einer Hypothermie (26°C) [170] können über einen Konditionierungsreiz kardioprotektiv wirken und somit gravierenden Einfluss auf die Ergebnisse haben [141]. Umso bedeutsamer ist die konstante Aufrechterhaltung der Temperatur. In

unserer Arbeit wurde während der gesamten Versuchszeit die Temperatur des isolierten Herzens über die Pufferlösung mit Hilfe eines Wassermantelsystems bei 37° C gehalten. Die Kontrolle der Zieltemperatur erfolgte kontinuierlich über ein Einhängethermostat im Wasserbad.

4.5.4 Akute Hyperglykämie

Die akute HG wurde mit einer Gesamtglukosekonzentration von 22 mmol/l erreicht. Da der modifizierten KHP bereits 11 mmol/l Glukose enthielt, wurde in der Adaptationsphase zusätzlich 11 mmol/l Glukoselösung appliziert (s. 2.2.5 Versuchsprotokoll und Versuchsbeschreibung). Das Versuchsprotokoll bezüglich der HG in isolierten Rattenherzen stammt aus einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe [91]. Zwecks der Vergleichbarkeit unserer Arbeit mit anderen Studien bezüglich der Kardioprotektion unter HG übernahmen wir diese Glukosekonzentration.

Bei allen Gruppen konnte ein signifikanter Anstieg der Glukosewerte im Sinne einer HG (≥ 300 mg/dl) zum Zeitpunkt der Präischämie und in der Reperfusion im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen. Es gab keinen signifikanten Unterschied bei den Glukosewerten zwischen den Gruppen.

4.6 Limitierung und Schlussfolgerung

Die Translation tierexperimenteller Studien in den klinischen Alltag stellt im Allgemeinen eine Limitierung dar. Komorbiditäten mit entsprechender Medikation und ein hohes Alter gelten als mögliche Störfaktoren kardioprotektiver Strategien. Um auch unsere kardioprotektive Strategie in die Therapieansätze betroffener Patienten übertragen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße durch die Kombination von Levosimendan und CsA unter akuter HG. Allerdings bleibt unklar, ob die positiven Effekte der kombinierten Substanzen auf denselben mitochondrialen Endeffektor zurückzuführen sind oder ob diese durch die

gleichzeitige Aktivierung verschiedener Signalwege erzielt werden. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zu ermitteln, ob die Kombination von Levosimendan und CsA die mPTP vollständig blockiert oder ob auch andere Signalwege beteiligt sind. Zuvor zeigten aus unserer Forschungsgruppe Ströthoff et al. [83] sowie andere wie du Toit et al. [87], dass die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung in gesunden isolierten Herzen eine signifikante Infarktgrößenreduktion bewirkt. Ebenso wurden die zugrundeliegenden Mechanismen der Levosimendan-induzierten Postkonditionierung unter dem gleichen Versuchsaufbau durch unsere Forschungsgruppe untersucht. Zu dem belegten Ströthoff et al., dass die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung im Vergleich zu einer normoglykämischen Kontrollgruppe eine Infarktgrößenreduktion um etwa 50 % bewirkt. Da wir aus tierethischen Gründen von einer weiteren normoglykämischen Kontrollgruppe abgesehen haben, können hierfür die Ergebnisse der normoglykämischen Kontrollgruppen aus den vorherigen Studien bezüglich der Levosimendan-induzierten Postkonditionierung beachtet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Cyclosporin A allein über die Hemmung der mPTP unter HG keine Infarktgröße verringern kann. Die Kombination von Levosimendan und Cyclosporin A stellt den Verlust der Kardioprotektion unter HG wieder her.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Herold, G. and D.G. Herold, *Koronare Herzerkrankung (KHK). In Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2021. S. 237-259.
2. Knuuti, J., et al., *2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes*. Eur Heart J, 2020. **41**(3): p. 407-477.
3. *World Health Organization (Internet)*. [zitiert 13.05.2025]. . 2021; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
4. *Statistisches Bundesamt (Destatis) Deutschland. Statistischer Bericht, Todesursachen in Deutschland 2023, EVAS-Nummer 23211. Erschienen am 19.08.2024 (Internet)*. [zitiert 13.05.2025]. Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html#_fo77k5ylh.
5. Gosswald, A., et al., *[Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 650-5.
6. Lampert, T., et al., *[Measurement of socioeconomic status in the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013: p. 631-636.
7. Lampert, T., *Smoking, physical inactivity, and obesity: associations with social status*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(1-2): p. 1-7.
8. 32. *Deutscher Herzbericht 2020. Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland. 2. Koronare Herzkrankheit*. S.47-74. Mai 2021.
9. *Statistisches Bundesamt (Destatis) Deutschland. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten. Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017. (Internet)*. [zitiert 20.08.2022]. Available from: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html.
10. *Statistisches Bundesamt (Destatis) Deutschland. Krankheitskosten pro Kopf gleichen sich zwischen Männern und Frauen weiter an. Pressemitteilung Nr. 316 vom 27. Juli 2022. (Internet)*. [zitiert 20.08.2022]. Available from: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/07/PD22_316_236.html.

11. Herold, G. and D.G. Herold, *Diabetes mellitus (DM). In Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. 2021. S. 722-735.*
12. Kosiborod, M., et al., *Admission glucose and mortality in elderly patients hospitalized with acute myocardial infarction: implications for patients with and without recognized diabetes.* Circulation, 2005. **111**(23): p. 3078-86.
13. McCowen, K.C., A. Malhotra, and B.R. Bistrian, *Stress-induced hyperglycemia.* Crit Care Clin, 2001. **17**(1): p. 107-24.
14. Cui, C.Y., et al., *Admission hyperglycemia as an independent predictor of long-term prognosis in acute myocardial infarction patients without diabetes: A retrospective study.* J Diabetes Investig, 2021. **12**(7): p. 1244-1251.
15. Bellodi, G., et al., *Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus.* Am J Cardiol, 1989. **64**(14): p. 885-8.
16. Deckers, J.W., et al., *Relation of admission glucose levels, short- and long-term (20-year) mortality after acute myocardial infarction.* Am J Cardiol. 2013;112(9):1306-10. Accession Number: 23866731 DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.06.007. Am J Cardiol, 2013. **112**.
17. Capes, S.E., et al., *Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview.* Lancet, 2000. **355**(9206): p. 773-8.
18. Meier, J.J., et al., *Plasma glucose at hospital admission and previous metabolic control determine myocardial infarct size and survival in patients with and without type 2 diabetes: the Langendreer Myocardial Infarction and Blood Glucose in Diabetic Patients Assessment (LAMBDA).* Diabetes Care, 2005. **28**(10): p. 2551-3.
19. Rajpurohit, A., et al., *Association of Stress Hyperglycemia and Adverse Cardiac Events in Acute Myocardial Infarction - A Cohort Study.* Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2021. **21**(4): p. 260-265.
20. Doenst, T., et al., *Hyperglycemia during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for mortality in patients undergoing cardiac surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(4): p. 1144.
21. Barth, E., et al., *Glucose metabolism and catecholamines.* Crit Care Med, 2007. **35**(9 Suppl): p. S508-18.
22. Andrews, R.C. and B.R. Walker, *Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets.* Clin Sci (Lond), 1999. **96**(5): p. 513-23.
23. Mizock, B.A., *Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2001. **15**(4): p. 533-51.

24. Ellger, B., et al., *Survival benefits of intensive insulin therapy in critical illness: impact of maintaining normoglycemia versus glycemia-independent actions of insulin*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1096-105.
25. Chiasson, J.L., et al., *Inhibitory effect of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake by rat skeletal muscle*. J Clin Invest, 1981. **68**(3): p. 706-13.
26. Wolfe, R.R., *Substrate utilization/insulin resistance in sepsis/trauma*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1997. **11**(4): p. 645-57.
27. Mehta, V.K., et al., *Low-dose interleukin 1 and tumor necrosis factor individually stimulate insulin release but in combination cause suppression*. Eur J Endocrinol, 1994. **130**(2): p. 208-14.
28. Dresner, A., et al., *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 253-9.
29. Kelley, D.E., et al., *Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 91-8.
30. Aljada, A., et al., *Glucose ingestion induces an increase in intranuclear nuclear factor kappaB, a fall in cellular inhibitor kappaB, and an increase in tumor necrosis factor alpha messenger RNA by mononuclear cells in healthy human subjects*. Metabolism, 2006. **55**(9): p. 1177-85.
31. Aljada, A., et al., *Glucose intake induces an increase in activator protein 1 and early growth response 1 binding activities, in the expression of tissue factor and matrix metalloproteinase in mononuclear cells, and in plasma tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(1): p. 51-7.
32. Kawano, H., et al., *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(1): p. 146-54.
33. Scognamiglio, R., et al., *Postprandial myocardial perfusion in healthy subjects and in type 2 diabetic patients*. Circulation, 2005. **112**(2): p. 179-84.
34. Pandolfi, A., et al., *Acute hyperglycemia and acute hyperinsulinemia decrease plasma fibrinolytic activity and increase plasminogen activator inhibitor type 1 in the rat*. Acta Diabetologica, 2001. **38**(2): p. 71-76.
35. Gresele, P., et al., *Hyperglycemia-induced platelet activation in type 2 diabetes is resistant to aspirin but not to a nitric oxide-donating agent*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. 1262-8.
36. Ceriello, G., Quatraro, Della Russo, Marchi, Torella, *Hyperglycemia May Determine Fibrinopeptide A Plasma Level Increase in Humans*. Metabolism, 1989. **Vol 38, No 12**: p. 1162-63.

37. Mohanty, P., et al., *Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2970-3.
38. Guha, M., et al., *Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17728-39.
39. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation, 1977. **56**(5): p. 786-94.
40. Jennings, R.B., *Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2013. **113**(4): p. 428-38.
41. Heusch, G. and B.J. Gersh, *The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge*. Eur Heart J, 2017. **38**(11): p. 774-784.
42. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
43. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
44. 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.
45. Dauber, I.M., et al., *Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion*. Circ Res, 1990. **66**(4): p. 986-98.
46. Garcia-Dorado, D., et al., *Myocardial edema: a translational view*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(5): p. 931-9.
47. Heusch, G., et al., *Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside*. Circulation, 2009. **120**(18): p. 1822-36.
48. Bolli, R., J.F. Triana, and M.O. Jeroudi, *Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. Evidence for microvascular "stunning"*. Circ Res, 1990. **67**(2): p. 332-43.
49. Kleinbongard, P., et al., *Aspirate from human stented native coronary arteries vs. saphenous vein grafts: more endothelin but less particulate debris*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(8): p. H1222-9.
50. Leineweber, K., et al., *Intense vasoconstriction in response to aspirate from stented saphenous vein aortocoronary bypass grafts*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(5): p. 981-6.

51. Higginson, L.A., et al., *Determinants of myocardial hemorrhage after coronary reperfusion in the anesthetized dog*. Circulation, 1982. **65**(1): p. 62-9.
52. Robbers, L.F., et al., *Magnetic resonance imaging-defined areas of microvascular obstruction after acute myocardial infarction represent microvascular destruction and haemorrhage*. Eur Heart J, 2013. **34**(30): p. 2346-53.
53. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
54. Halestrap, A.P. and P. Pasdois, *The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1402-15.
55. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
56. Perrelli, M.G., P. Pagliaro, and C. Penna, *Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species*. World J Cardiol, 2011. **3**(6): p. 186-200.
57. Torregroza, C., et al., *Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches*. Anesth Analg, 2020. **131**(6): p. 1765-1780.
58. 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.
59. Yamakawa, K., et al., *Improved cardioprotection using a novel stepwise ischemic preconditioning protocol in rabbit heart*. J Surg Res, 2014. **188**(2): p. 381-6.
60. Moolman, J.A., et al., *Preconditioning with a single short episode of global ischemia in the isolated working rat heart: effect on structure, mechanical function, and energy metabolism for various durations of sustained global ischemia*. Cardiovasc Drugs Ther, 1995. **9**(1): p. 103-15.
61. Schott, R.J., et al., *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium*. Circ Res, 1990. **66**(4): p. 1133-42.
62. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
63. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.

64. Hahn, J.Y., et al., *Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial*. Circulation, 2013. **128**(17): p. 1889-96.
65. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
66. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. **94**(9): p. 2193-200.
67. Heusch, G., *Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(12): p. 773-789.
68. Kerendi, F., et al., *Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(5): p. 404-12.
69. Cohen, M.V. and J.M. Downey, *Myocardial preconditioning promises to be a novel approach to the treatment of ischemic heart disease*. Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 21-9.
70. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
71. Eves, E.M., et al., *Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 2143-52.
72. 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.
73. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
74. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 201-8.
75. Wegrzyn, J., et al., *Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration*. Science, 2009. **323**(5915): p. 793-7.
76. Boengler, K., et al., *Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(6): p. 771-85.

77. 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.
78. Huhn, R., et al., *Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore.* Br J Anaesth, 2008. **100**(4): p. 465-71.
79. Lemoine, S., et al., *The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans?* Br J Anaesth, 2016. **116**(4): p. 456-75.
80. Bunte, S., et al., *Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury.* Anesth Analg, 2020. **130**(1): p. 90-98.
81. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.* J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
82. Bernardi, P. and F. Di Lisa, *The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection.* J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 100-6.
83. Stroethoff, M., et al., *Impact of Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning.* Cardiovasc Drugs Ther, 2019. **33**(5): p. 581-588.
84. Kersten, J.R., et al., *Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels.* Anesth Analg, 2000. **90**(1): p. 5-11.
85. Obal, D., et al., *The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo.* Anesth Analg, 2005. **101**(5): p. 1252-1260.
86. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration.* Anesthesiology, 2004. **101**(2): p. 299-310.
87. du Toit, E.F., et al., *A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart.* Br J Pharmacol, 2008. **154**(1): p. 41-50.
88. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.* N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
89. Skyschally, A., R. Schulz, and G. Heusch, *Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs.* Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(1): p. 85-7.

90. Raphael, J., et al., *Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(4): p. 348-57.
91. Torregroza, C., et al., *Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
92. Baranyai, T., et al., *Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Cardiovasc Diabetol, 2015. **14**: p. 151.
93. Goergens, J.I., et al., *Influence of Hyperglycemia During Different Phases of Ischemic Preconditioning on Cardioprotection-A Focus on Apoptosis and Aggregation of Granulocytes*. Shock, 2020. **53**(5): p. 637-645.
94. Penna, C., et al., *Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols*. Br J Pharmacol, 2020. **177**(23): p. 5312-5335.
95. Matsumoto, S., et al., *Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts*. Cardiovasc Diabetol, 2012. **11**: p. 4.
96. Kehl, F., et al., *Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction*. Anesthesiology, 2002. **96**(1): p. 183-8.
97. Torregroza, C., et al., *Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
98. Follath, F., et al., *Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 196-202.
99. Papp, Z., et al., *Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan*. Int J Cardiol, 2012. **159**(2): p. 82-7.
100. Slawsky, M.T., et al., *Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure*. Study Investigators. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2222-7.
101. Reimer, K.A., *Myocardial infarct size. Measurements and predictions*. Arch Pathol Lab Med, 1980. **104**(5): p. 225-30.
102. Ceriello, A., *Acute hyperglycaemia: a 'new' risk factor during myocardial infarction*. Eur Heart J, 2005. **26**(4): p. 328-31.
103. Leprán, I., et al., *Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **48**(4): p. 148-52.

104. Hönisch, A., et al., *Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 155-67.
105. Bunte, S., et al., *Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca(2+)-Sensitive Potassium (mBK(Ca)) Channels*. Cardiovasc Drugs Ther, 2018. **32**(5): p. 427-434.
106. Tsang, A., et al., *Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2360-4.
107. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
108. Gao, W.D., et al., *Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium*. Circ Res, 1997. **80**(3): p. 393-9.
109. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
110. Bolli, R., et al., *Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs*. Am J Physiol, 1988. **254**(1 Pt 2): p. H102-14.
111. Ferrera, R., et al., *One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(4): p. 327-31.
112. Goyal, A., et al., *Differential clinical outcomes associated with hypoglycemia and hyperglycemia in acute myocardial infarction*. Circulation, 2009. **120**(24): p. 2429-37.
113. Weber, N.C., et al., *Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium: the regulation of different mitogen-activated protein kinases*. Eur J Pharmacol, 2008. **592**(1-3): p. 48-54.
114. Hasenfuss, G., et al., *Influence of the novel inotropic agent levosimendan on isometric tension and calcium cycling in failing human myocardium*. Circulation, 1998. **98**(20): p. 2141-7.
115. Pagel, P.S., et al., *Levosimendan enhances left ventricular systolic and diastolic function in conscious dogs with pacing-induced cardiomyopathy*. J Cardiovasc Pharmacol, 1997. **29**(5): p. 563-73.
116. Follath, F., et al., *Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 196-202.

117. Morelli, A., et al., *Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression*. Intensive Care Med, 2005. **31**(5): p. 638-44.
118. Morelli, A., et al., *Effects of levosimendan on right ventricular afterload in patients with acute respiratory distress syndrome: a pilot study*. Crit Care Med, 2006. **34**(9): p. 2287-93.
119. Pagel, P.S., D.A. Hettrick, and D.C. Warltier, *Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(3): p. 609-15.
120. Szewczyk, A. and E. Marbán, *Mitochondria: a new target for K channel openers?* Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(4): p. 157-61.
121. Grover, G.J. and K.D. Garlid, *ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(4): p. 677-95.
122. Oldenburg, O., et al., *Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 429-37.
123. Kopustinskiene, D.M., P. Pollesello, and N.E. Saris, *Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(5): p. 807-12.
124. Harjola, V.P., et al., *Use of levosimendan in acute heart failure*. Eur Heart J Suppl, 2018. **20**(Suppl I): p. I2-i10.
125. Antila, S., S. Sundberg, and L.A. Lehtonen, *Clinical pharmacology of levosimendan*. Clin Pharmacokinet, 2007. **46**(7): p. 535-52.
126. Jonsson, E.N., et al., *Population pharmacokinetics of levosimendan in patients with congestive heart failure*. Br J Clin Pharmacol, 2003. **55**(6): p. 544-51.
127. Costa, A.D.T., et al., *The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20801-20808.
128. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
129. Dunne, M.J. and O.H. Petersen, *Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1071**(1): p. 67-82.
130. Kersten, J.R., et al., *Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo*. Am J Physiol, 1998. **275**(2): p. H721-5.

131. Kersten, J.R., et al., *Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1218-24.
132. Kehl, F., et al., *N-acetylcysteine restores isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction during hyperglycemia*. Anesthesiology, 2003. **98**(6): p. 1384-90.
133. Nakadate, Y., et al., *Glycemia and the cardioprotective effects of insulin pre-conditioning in the isolated rat heart*. Cardiovasc Diabetol, 2017. **16**(1): p. 43.
134. 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.
135. Costa, A.D. and K.D. Garlid, *Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H874-82.
136. Kersten, J.R., et al., *Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(4): p. H1744-50.
137. Craig, T.J., F.M. Ashcroft, and P. Proks, *How ATP inhibits the open K(ATP) channel*. J Gen Physiol, 2008. **132**(1): p. 131-44.
138. Garlid, K.D., et al., *Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1606**(1-3): p. 1-21.
139. Argaud, L., et al., *Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(2): p. 367-74.
140. 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.
141. 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.
142. Hwang, H., et al., *Isolated Heart Preparation*. 2010. p. 149-159.
143. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1895. **61**(6): p. 291-332.
144. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 867-78.

145. Ytrehus, K., *The ischemic heart--experimental models*. Pharmacol Res, 2000. **42**(3): p. 193-203.
146. Tweedie, D., C. Henderson, and K. Kane, *Glibenclamide, but not class III drugs, prevents ischaemic shortening of the refractory period in guinea-pig hearts*. Eur J Pharmacol, 1993. **240**(2-3): p. 251-7.
147. Hearse, D.J. and F.J. Sutherland, *Experimental models for the study of cardiovascular function and disease*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 597-603.
148. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 613-27.
149. 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.
150. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(2): p. H156-67.
151. Boengler, K., et al., *Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(4): p. H1764-9.
152. Schulman, D., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1630-6.
153. Abete, P., et al., *Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart?* J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(4): p. 947-54.
154. Abete, P., et al., *Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(7): p. 1777-86.
155. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A*. Exp Gerontol, 2012. **47**(1): p. 116-21.
156. Liu, L., et al., *Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A*. Acta Anaesthesiol Scand, 2011. **55**(5): p. 622-30.
157. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
158. Rossouw, J.E., *Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 550-7.

159. Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112.
160. Hans Adolf Krebs and K. Henseleit, *Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper*. Klinische Wochenschrift 11. Jahrgang Nr. 18, 1932.
161. Walters, H.L., 3rd, et al., *The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(10): p. 1063-77.
162. Vogel, W.M., A.W. Cerel, and C.S. Apstein, *Post-ischemic cardiac chamber stiffness and coronary vasomotion: the role of edema and effects of dextran*. J Mol Cell Cardiol, 1986. **18**(12): p. 1207-18.
163. Kohlhardt, M., K. Haap, and H.R. Figulla, *Influence of low extracellular pH upon the Ca inward current and isometric contractile force in mammalian ventricular myocardium*. Pflugers Arch, 1976. **366**(1): p. 31-8.
164. Katz, A.M., *Effects of ischemia on the contractile processes of heart muscle*. Am J Cardiol, 1973. **32**(4): p. 456-60.
165. Gamble, W.J., et al., *Myocardial oxygen consumption of blood-perfused, isolated, supported, rat heart*. Am J Physiol, 1970. **219**(3): p. 604-12.
166. Qiu, Y. and D.J. Hearse, *Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **103**(5): p. 960-8.
167. Clements-Jewery, H., D.J. Hearse, and M.J. Curtis, *The isolated blood-perfused rat heart: an inappropriate model for the study of ischaemia- and infarction-related ventricular fibrillation*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(7): p. 1089-99.
168. Döring, H.J., H. Dehnert, and C. Döring, *The isolated perfused warm-blood heart according to Langendorff*. 1988: Biomesstechnik-Verlag March.
169. Yellon, D.M., et al., *The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(8): p. 895-907.
170. Khaliulin, I., et al., *Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 3): p. 1147-61.

Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Pannen für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Anästhesiologie verfassen zu können.

Zu dem bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Huhn-Wientgen für die freundliche Überlassung des Themas.

Einen sehr besonderen Dank möchte ich an Privatdozent Dr. Martin Ströthoff aussprechen. Danke, dass du die letzten Schritte mit mir gegangen bist.

Ein weiterer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. Dr. Carolin Torregroza: für die reichlichen Hilfestellungen und Korrekturen.

Für die unermüdliche Unterstützung im Labor bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Privatdozentin Dr. Annika Raupach sowie Frau Professorin Dr. Inge Bauer.

Letztlich danke ich vor allem meiner Familie und Matthi. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht entstanden.