

**Der Einfluss von intravenös verabreichtem Levosimendan auf
die post-ischämische Funktionserholung ex vivo-perfundierter
Rattenherzen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von: Welk, Edgar
aus Löningen

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Böning

Gutachter: PD. Dr. med. Rolf Schreckenber

Tag der Disputation: 19.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	LEVOSIMENDAN.....	1
1.1.1	<i>Pharmakokinetik</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Pharmakodynamik</i>	<i>3</i>
1.1.3	<i>Anwendung</i>	<i>4</i>
1.2	DIE KARDIOPLEGISCHE LÖSUNG NACH BRETSCHNEIDER.....	6
1.3	AKTUELLER FORSCHUNGSSTAND	7
1.3.1	<i>Prospektive Studien</i>	<i>7</i>
1.3.2	<i>Retrospektive Studien.....</i>	<i>9</i>
1.3.3	<i>Metastudien</i>	<i>10</i>
1.3.4	<i>Zusammenfassung des aktuellen Forschungsstands.....</i>	<i>11</i>
1.4	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	11
2	MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1	MATERIALIEN.....	12
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	<i>12</i>
2.1.2	<i>Pharmaka</i>	<i>14</i>
2.1.3	<i>Medien und Puffer.....</i>	<i>15</i>
2.1.4	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>18</i>
2.1.5	<i>Geräte.....</i>	<i>20</i>
2.1.6	<i>EDV und Statistik</i>	<i>25</i>
2.2	METHODEN	26
2.2.1	<i>Versuchstiere und Versuchstiergruppen.....</i>	<i>26</i>
2.2.2	<i>Implantation der Alzet®-Pumpe</i>	<i>29</i>
2.2.3	<i>Das Langendorff-Modell.....</i>	<i>30</i>
2.2.4	<i>Isolierung der Kardiomyozyten.....</i>	<i>33</i>
2.2.5	<i>Lastfreie Zellverkürzung</i>	<i>36</i>
2.2.6	<i>Gelelektrophorese, Western-Blot und Proteindetektion</i>	<i>37</i>
2.2.7	<i>Elektronenmikroskopie.....</i>	<i>40</i>
2.2.8	<i>Statistische Analysen.....</i>	<i>42</i>
3	ERGEBNISSE	43
3.1	ÜBERSICHT ÜBER DIE ERHOBENEN ERGEBNISSE	43
3.2	METABOLITEN.....	43

3.3	KARDIALE FUNKTIONSPARAMETER.....	44
3.3.1	<i>Baseline Daten</i>	45
3.3.2	<i>Versuchsspezifische Ergebnisse aus dem Langendorff-Modell</i>	45
3.4	DIE LASTFREIE ZELLVERKÜRZUNG	49
3.4.1	<i>Zellmorphologie</i>	49
3.4.2	<i>Längenänderung der Kardiomyozyten</i>	51
3.4.3	<i>Länge der Zellen</i>	52
3.5	PROTEINDETEKTION.....	53
3.6	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	54
4	DISKUSSION	57
4.1	ENTWICKLUNG DER FRAGESTELLUNG	57
4.2	KARDIALE FUNKTION UND LASTFREIE ZELLVERKÜRZUNG.....	58
4.3	ZELLSTOFFWECHSEL UNTER DER ANWENDUNG VON LEVOSIMENDAN.....	60
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG DIESER ARBEIT	63
4.5	LIMITATIONEN.....	65
4.6	AUSBLICK	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
	DEUTSCH	68
	ENGLISCH	70
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
7	ABBILDUNGS- UND FORMELVERZEICHNIS	74
8	TABELLENVERZEICHNIS	75
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	76
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	85
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	86
12	DANKSAGUNG	87

1 Einleitung

1.1 Levosimendan

Levosimendan (Levo) ($C_{14}H_{12}N_6O$) ist ein Calcium-Sensitizer, der von der Firma Orion Pharma AG entwickelt und unter dem Handelsnamen Simdax[®] in den Verkehr gebracht wurde. Seit 2013 besteht die Applikationsmöglichkeit in Deutschland (60). Bei der akuten Dekompensation einer schweren Herzinsuffizienz kommt das Medikament als Kurzzeit-Behandlung zur Anwendung, vor allem dann, wenn eine konventionelle Therapie mit Inotropika nicht ausreichend ist (30,60).

1.1.1 Pharmakokinetik

Levo wird im klinischen Alltag intravenös (i.v.) verabreicht. Es hat sich gezeigt, dass die orale Bioverfügbarkeit mit 85 % als hoch einzuschätzen ist (70,71).

Gelangt das Pharmakon in den Körperkreislauf, bindet es zu 95-98 % an Plasmaproteinen (vor allem Albumin) und besitzt eine mittlere Halbwertszeit von ca. einer Stunde. Die Plasmakonzentration erreicht nach einer Infusionsdauer von vier Stunden ein „*Steady State*“, wobei die Höchstkonzentration 24 Stunden nach Infusionsende detektiert wurde (3).

Die Metabolisierung findet hauptsächlich durch Konjugation mit Glutathion in der Leber statt. Der Abbau erfolgt zu zyklischen und N-acetylierten Cysteinylglycin und weiteren Cysteinkonjugaten. In etwa 5 % entsteht dabei ebenfalls der Metabolit OR-1855, welcher im Darm durch die N-Acetyltransferase (NAT2) weiter zu dem aktiven Metaboliten OR-1896 verarbeitet wird (2)[siehe Abbildung 1]. Die Plasma-Clearance von Levo liegt bei 220-330 ml/min, wobei die zyklischen Metaboliten hauptsächlich über den Urin und die N-acetylierten Metaboliten hauptsächlich über die Faeces ausgeschieden werden (71).

Es konnte gezeigt werden, dass OR-1896 ähnliche pharmakologische Wirkungen hat wie Levo (2,4). Die Halbwertszeit des aktiven Metaboliten beträgt 80 Stunden. Dies

Einleitung

ist aller Wahrscheinlichkeit nach für die lange kardiale Wirkung noch nach Infusionsende verantwortlich (39).

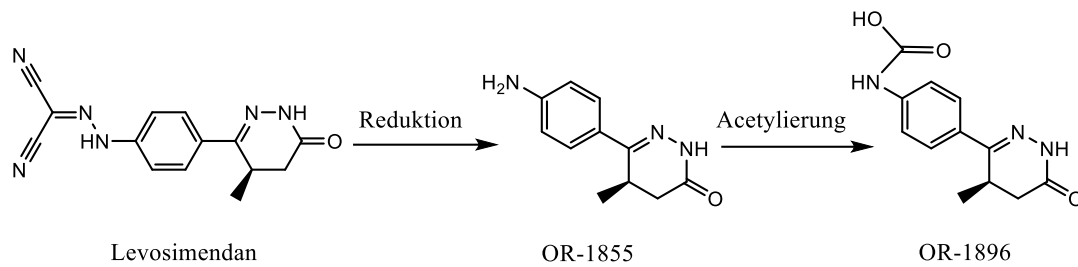


Abbildung 1: Der Abbau von Levosimendan zu den relevanten Metaboliten OR-1855 und OR-1896. Levo wird zum geringen Teil durch Darmbakterien in OR-1855 reduziert und anschließend durch die N-Acetyltransferase (NAT2) zu OR-1896 acetyliert. Letzteres besitzt eine höhere Halbwertszeit als Levo und weist ähnliche kardiale Wirkungen auf.

Studien haben erwiesen, dass Levo an verschiedenen Stellen pharmakodynamisch aktiv wird [siehe Kapitel 1.1.2]. So beeinflusst das Medikament die Herzkontraktilität, indem es an dem NH₂-terminalen Ende vom myokardialen Troponin C (cTnC) bindet, welches sich nah an der Calcium-Austauschstelle befindet. Dadurch wird die Stabilität des Calcium-Troponin-Komplexes verstärkt (Calcium-Sensitizer-Funktion) und die Inotropie des Herzens erhöht (27,64,77).

Weiter führt Levo zur Öffnung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle in den Gefäßen und somit zur Vasodilatation. Dadurch sinkt der total periphere und koronararterielle Gefäßwiderstand. Dieser Effekt konnte auch bei dem aktiven Metabolit OR-1896 festgestellt werden (23).

Mit der Senkung des Gefäßwiderstandes reduziert Levo die Vor- und Nachlast des Herzens und ermöglicht eine bessere Koronardurchblutung. Auch werden die ATP-abhängigen Kaliumkanäle am kardialen Mitochondrium geöffnet. Dadurch kommt es zu einer Energieoptimierung, die den Verlust von ATP während einer Ischämie oder Reperfusion verringern und damit zu einer protektiven Wirkung führen soll (26,40).

Bei Anwendung des Medikamentes kommt es zur Verringerung der Calciumkonzentration durch Erhöhung der Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (17).

Bei hohen Dosierungen von Levo *in vitro* wurde ebenfalls eine Hemmung der Phosphodiesterase-III festgestellt (17,28).

Eine Wirkung auf das Diaphragma wird derzeit diskutiert. Hierbei gibt es Hinweise auf die Erhöhung der Calcium-Sensitivität (86) des Diaphragmas.

Eine Zusammenfassung der Wirkung von Levo ist in Abbildung 2 dargestellt.

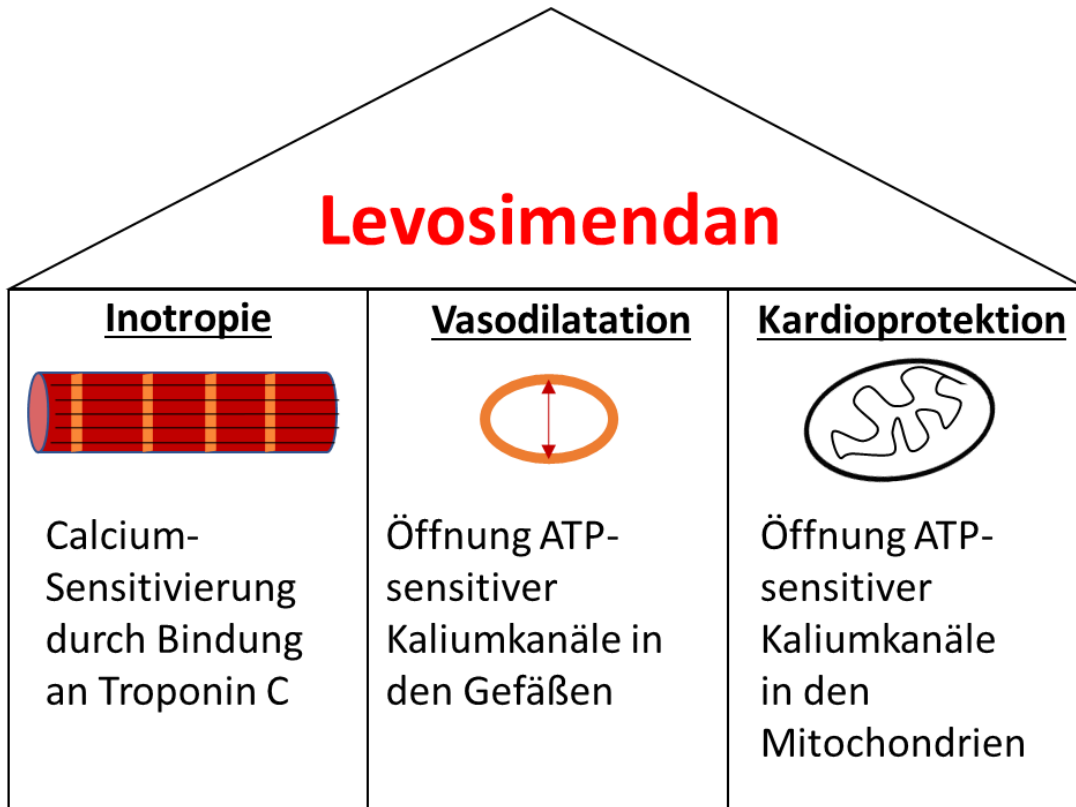


Abbildung 2: Die 3 Wirkungssäulen von Levosimendan. Levo wirkt über verschiedene Mechanismen. Zum einen steigert es die Inotropie des Herzens über die Bindung an das kardiale Troponin C (Calcium-Sensitizer-Funktion), zum anderen führt es zur Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen. Die Gefäße dilatieren und somit sinkt der Gefäßwiderstand. Ebenfalls öffnen sich die Kaliumkanäle in den Mitochondrien, was zur Energieoptimierung und erhöhter Kardioprotektion führt. Weiterhin wurden eine Hemmung der Phosphodiesterase-III bei hohen Dosen und eine Diaphragma-Wirkung beobachtet.

1.1.2 Pharmakodynamik

Die pharmakodynamischen Effekte von Levo spiegeln sich in der kardialen Funktion wider. Laut aktuellem Kenntnisstand erhöht das Medikament das Herzzeitvolumen auf verschiedenen Ebenen ohne dabei den myokardialen Sauerstoffbedarf zu steigern (29).

Je nach Dosis wird das Schlagvolumen um bis zu 25 % und die Herzfrequenz um ca. 6 Schläge pro Minute (bpm) angehoben, was einen höheren kardialen Index (CI) zur

Einleitung

Folge hat (75). Auch nimmt der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP) zu (84). Dieser Effekt ist auf die positiv inotrope Wirkung von Levo zurückzuführen.

Eine Abnahme des pulmonalkapillären Verschlussdruckes (PCWP) wurde bei Applikation beobachtet. Dieser ist ein Surrogatmarker für den enddiastolischen Druck des linken Vorhofs. Ebenfalls ist eine Reduzierung des systemisch vaskulären Widerstandes (SVR) zu verzeichnen, die durch Vasodilatation der Gefäße zustande kommt, wodurch sich eine Nachlastsenkung ergibt und eine insgesamt bessere Pumpleistung entsteht (57,75).

Auch wurden verschiedene Parameter der Hämodynamik von Levo mit Dobutamin verglichen, welches ebenfalls bei akuter Herzinsuffizienz indiziert ist. Unter der Anwendung von Levo kommt es zu einem geringeren PCWP und SVR sowie weniger Laktatausschüttung. Der CI und die gemischt-venöse Sauerstoffsättigung hingegen waren unter der Anwendung von Levo höher als unter Dobutamin (37).

1.1.3 Anwendung

Die zuvor beschriebenen Wirkungen des Calcium-Sensitizers finden Anwendung in der Intensivmedizin und der perioperativen Versorgung bei herzchirurgischen Eingriffen. Indiziert ist die Gabe des Medikamentes bei der akuten Dekompensation einer schweren Herzinsuffizienz und dem kardiogenen Schock (30,60). Beim katecholaminrefraktären kardiogenen Schock kann Levo ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Da der Wirkeintritt im Gegensatz zu anderen Katecholaminen verzögert ist, wird eine Initialdosis von 12 – 24 µg/kg Körpergewicht über 10 min i.v. in der klinischen Praxis angewandt. Begleitend kann eine Dauerinfusion über 24 h mit einer Dosierung von 0,05 – 0,2 µg/kg Körpergewicht/min verabreicht werden (36,65). Insgesamt gibt es bisher jedoch keine allgemein gültigen Dosierungsempfehlungen, so dass der Bolus als auch die Dauer der Infusion in verschiedenen Studien untersucht wurden (58,90).

So zeigte die RUSSLAN-Studie positive Effekte auf die Sterblichkeit und die Herzinsuffizienz bei einer Infusion mit Levosimendan über insgesamt 6 Stunden (53).

Von Vorteil könnte die lange Wirkdauer sein, die nach Absetzen der Infusion immer noch besteht. Diese ist durch die lange Halbwertszeit des Metaboliten OR-1896 zu erklären (39) (vgl. Kapitel 1.1.1).

Einleitung

Zu den häufigsten und relevantesten unerwünschten Wirkungen gehören: Hypokaliämie, ventrikuläre Tachykardien, Vorhofflimmern, Hypotonie, ventrikuläre Extrasystolen, gastrointestinale Störungen und Niereninsuffizienz (51).

Die aktuelle nationale Versorgungsleitlinie der chronischen Herzinsuffizienz empfiehlt die Verwendung von Levosimendan lediglich bei weiterer klinischer Verschlechterung (insbesondere systemische Hypoperfusion) (12).

Anwendung in der Herzchirurgie

Herzchirurgische Operationen sind mit möglichen Komplikationen verbunden, die durch den Eingriff und die Risikofaktoren der Patienten in Verbindung stehen.

Die Bestimmung des perioperativen Risikoprofils eines Patienten ist bei einem geplanten herzchirurgischen Eingriff somit wesentlich. Diese setzt sich aus verschiedenen Faktoren wie Geschlecht, Alter, körperliche Konstitution, Herzereignis begünstigende Parameter (Hypercholesterinämie, Hypertonie, Nikotinabusus), verschiedene Komorbiditäten (Diabetes mellitus, COPD, Niereninsuffizienz) und vor allem der präoperativen linksventrikulären Ejektionsfraktion zusammen (33,35).

Aufgrund der in Kapitel 1.1.1 und Kapitel 1.1.2 erläuterten Wirkungen von Levo könnte sich die prophylaktische Gabe vor herzchirurgischen Eingriffen, besonders bei bereits bestehender Herzinsuffizienz, positiv auf das *Outcome* der Patienten auswirken. Die kardioprotektive Wirkung nach Ischämie/Reperfusion könnte hier genutzt werden und findet daher oft Anwendung bei Herzoperationen (14,83).

Auch in der anschließenden intensivmedizinischen Versorgung kann Levo zum Einsatz kommen. Laut aktuellen S3-Leitlinien zur intensivmedizinischen Versorgung herzchirurgischer Patienten ist eine hämodynamische Differentialtherapie durch Volumensubstitution, positiv inotrope und vasoaktive Medikamente zu erreichen. Levo könnte hier zum Einsatz kommen, jedoch ist es im Gegensatz zu anderen positiv inotropen und vasoaktiven Substanzen (Adrenalin, Dobutamin, Milrinon) wesentlich teurer [siehe Tabelle 1]. Die Anwendung von Levo ist in jedem Fall bei Katecholaminresistenz indiziert (50).

Einleitung

Substanz	Kosten
Adrenalin	0,90 €
Dobutamin	7,50 €
Milrinon	120,00 €
Levosimendan	1720,00 €

***Tabelle 1:** Kosten für den Einsatz positiv inotroper und vasoaktiver Substanzen über 24 h für einen Patienten mit 85 kg Körpergewicht in durchschnittlicher Dosierung (50). Levosimendan fällt im Verhältnis zu anderen inotropen und vasoaktiven Substanzen für die intensivmedizinische Versorgung mit wesentlich höheren Kosten auf.*

1.2 Die kardioplegische Lösung nach Bretschneider

Die kristalline kardioplegische Lösung nach Bretschneider, auch als Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HKT) oder Custodiol® bekannt, ist als myokardiale Schutzlösung entwickelt worden und bereits seit etwa 50 Jahren im Einsatz (11). Die Lösung ist insgesamt natrium- und calciumarm und über Histidin gepuffert. Die genaue Zusammensetzung findet sich in Tabelle 2.

Um einen Herzstillstand zu erwirken, müssen die Phasen der Depolarisation des Ventrikelmyokards unterbrochen werden.

In der ersten Phase öffnen sich schnelle, spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle so dass es zu einem starken Natriumeinstrom kommt. Der niedrige Natriumgehalt der Bretschneiderlösung inhibiert diesen schnellen Einstrom.

Während der zweiten Phase (Plateauphase) öffnen sich spannungsabhängige L-Typ-Calcium-Kanäle und die Depolarisation schreitet voran. Erst durch den Einstrom von Kalium in Phase 3 kommt es zur Repolarisation der Zellmembran. Diese Phase wird durch den hohen Kaliumgehalt der Lösung beschleunigt. Insgesamt versetzt die Perfusion einer Bretschneiderlösung, aufgrund der oben genannten Sachverhalte, die Myozyten in ein Stadium der Unerregbarkeit. Eine Pufferwirkung wird zudem durch das Histidin sichergestellt (22,67).

Die einmalige Gabe des Custodiol® ist ausreichend und führt zu einem Kardioplegieschutz von bis zu 3 h (66).

Einleitung

Table 2: Bestandteile der kardioplegischen Lösung nach Bretschneider. Der pH-Wert der Lösung liegt bei einer Temperatur von 25°C bei 7,2 mit einer Gesamtosmolalität von 310 mosmol/l. (Custodiol® Zusammensetzung von Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, D-64625 Bensheim. modifiziert nach (89))

Bestandteil	Konzentration in mmol/l
Natriumchlorid	15,0
Kaliumchlorid	9,0
Magnesiumchlorid	4,0
Histidinhydrochlorid	18,0
L-Histidin	180,0
Tryptophan	2,0
Mannitol	30,0
Calciumchlorid	0,0
Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat	1,0

1.3 Aktueller Forschungsstand

Nachfolgend wird die gegenwärtige Forschungslage von Levosimendan in der Herzchirurgie beleuchtet. Dabei werden sowohl Daten von prospektiven und retrospektiven Studien als auch von Metaanalysen dargestellt.

1.3.1 Prospektive Studien

Die im Jahr 2017 im „*New England Journal of Medicine*“ veröffentlichte, multizentrische Studie von Landoni et al. verglich insgesamt 506 Patienten in 3 Ländern bezüglich der Mortalität (30 Tage postoperativ) nach kardiochirurgischen Eingriffen. Es handelt sich hierbei um eine randomisierte, kontrollierte Doppelblindstudie, die Patienten mit perioperativer kardiovaskulärer Dysfunktion einschloss (LVEF < 25 %, Verwendung einer intraaortalen Ballonpumpe oder notwendige Gabe von inotropisch wirksamen Substanzen). Die Patienten wurden nahezu 1:1 in eine Placebo Gruppe und eine Levo Gruppe aufgeteilt. Die Levosimendan-Gruppe erhielt das Medikament über 48 h mit einer Dosierung von 0,025 – 0,2 µg/kg Körpergewicht.

Einleitung

Die Resultate ergaben keinen signifikanten Unterschied der Mortalitätsrate zwischen den Patienten, die mit Levo behandelt wurden (12,9 %) und der Placebo-Gruppe (12,8 %). Ebenfalls gleich waren die maschinelle Beatmungsdauer, die Liegedauer auf der Intensivstation, die Dauer des Krankenhausaufenthaltes und das Auftreten von Hypotonien oder Herzrhythmusstörungen (43).

Desai und Kollegen untersuchten Patienten nach Koronararterien-Bypass Operation ohne den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, welche perioperativ Levo erhielten. Inkludiert wurden 60 Patienten mit einer LVEF < 30 %, die randomisiert in eine Levo Gruppe und in eine Kontrollgruppe (n= 30) aufgeteilt wurden. Die Gabe der Substanz erfolgte dabei eine Nacht vor Operationsbeginn für insgesamt 24 Stunden mit einer Konzentration von 0,1 µg/kg Körpergewicht/min. Während dieser Zeit fand ein hämodynamisches Monitoring der Patienten statt, das unter anderem den CI, PCWP, die Laktatkonzentration und die Herzfrequenz bestimmte. Zudem wurde die Aufenthaltsdauer und die Mortalitätsrate untersucht.

Hämodynamisch ergab sich bei der Gruppe, die Levo erhielt, ein höherer CI, ein geringerer PCWP und ein geringerer Serum-Laktatwert sowie eine geringere Rate an Vorhofflimmern, akutem Nierenversagen und einem „*Low-Cardiac-Output-Syndrom*“ (LCOS).

Keinen Unterschied ergab jedoch die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und die Dauer des Krankenhausaufenthaltes. Ebenfalls gleich war die Mortalität der Patienten, die Levo erhielten und die der Kontrollgruppe (0 % zu 6 % bei $p = 0,24$) (15).

Die LEVO-CTS-Studie, welche von Mehta et al. im Jahr 2017 publiziert wurde, untersuchte 849 Patienten mit einer LVEF < 35 %. Die Studie fand insgesamt an 27 Zentren über 26 Monate, randomisiert und Placebo kontrolliert statt. 428 Patienten wurde Levo i.v. vor dem chirurgischen Eingriff appliziert, zunächst in der ersten Stunde mit 0,2 µg/kg Körpergewicht/min und anschließend über 23 Stunden mit 0,1 µg/kg Körpergewicht/min. Die Eingriffe beschränkten sich dabei auf Arterien-Bypass-, Kardio-pulmonaler-Bypass- und verschiedene Klappen-Operationen.

Auch hier zeigte sich kein Vorteil bei der Anwendung von Levo gegenüber der Kontrollgruppe.

Einleitung

Die Auswertung ergab keinen Unterschied der beiden Gruppen bei der Mortalität, der Aufenthaltsdauer oder der Myokardinfarktrate. Auch bei der Entstehung von renalen Komplikationen zeigte sich Levo nicht von Vorteil (52).

1.3.2 Retrospektive Studien

288 Patienten wurden von Grieshaber et al. über einen Zeitraum von 4 Jahren retrospektiv bezüglich der prophylaktischen Gabe von Levo untersucht. Das Patientenkollektiv wies eine LVEF von $< 35\%$ auf und unterzog sich in dem Zeitraum einer isolierten Koronararterien-Bypass-Operation, einer isolierten Klappenoperation oder einer Kombination aus beiden. Dabei wurden 84 Patienten mit Levo-Gabe und 204 ohne ausgewertet. Die intravenöse Infusion begann mit der Einleitung der Anästhesie vor dem operativen Eingriff ohne Bolus und endete 24 h danach. Insgesamt wurde so eine Gesamtmenge von 12,5 mg Levo infundiert. Die Auswertung ergab eine geringere Inzidenz für akutes Nierenversagen bei den Patienten, die Levo erhielten. Das Auftreten von postoperativem Vorhofflimmern war jedoch bei der Levo Gruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Levo Gruppe: 76 %, Kontrollgruppe: 44 % bei einem $p < 0,0001$ und einem OR: 4,0). Außerdem konnten keine Unterschiede bei der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation oder dem Gesamtaufenthalt in der Klinik festgestellt werden. Die 30-tägige Überlebensrate ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Levo Gruppe.

Zudem konnte kein positiver Effekt auf das Langzeitüberleben bei der Levo Gruppe im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (24).

Weitere Untersuchungen über den Zeitpunkt der Applikation erfolgten von Treskatsch et al. im Jahr 2015. Dabei wurden Daten von 159 Patienten ausgewertet, die sich an der Charité verschiedenen herzchirurgischen Eingriffen, unter Anwendung von Levo, unterzogen. Patienten mit einer LVEF $< 35\%$ oder mit LCOS wurden dazu gewählt. Verglichen wurden 89 Eingriffe, bei denen Levo bis maximal 1 h postoperativ gegeben wurde, mit solchen, bei denen die Applikation danach erfolgte. Insgesamt wurde so 12,5 mg Levo mit einer Geschwindigkeit von $0,1 \mu\text{g/kg Körpergewicht/min}$ infundiert.

Einleitung

Es stellte sich heraus, dass die Gruppe, die das Medikament früher bekam, eine geringere Mortalität sowohl postoperativ (30 % vs. 54 %, bei $p = 0,004$ und OR: 2,258) als auch nach einem Jahr aufwies (49 % vs. 70 %, bei $p = 0,027$ und OR: 1,827). Weiterhin scheint eine frühe Gabe von Levo die Beatmungsdauer zu reduzieren und ein geringeres Aufkommen von Nierenkomplikationen hervorzurufen. Es gab keinen signifikanten Unterschied bei der Aufenthaltsdauer in der Klinik (82).

1.3.3 Metastudien

Insgesamt 14 Studien aus den Jahren 2000 – 2017 mit 2243 Patienten wurden von Tena und ihren Kollegen analysiert und im Jahr 2018 publiziert. Dabei wurden prospektive, randomisierte, kontrollierte, klinische Studien verwendet, in denen Levo gegenüber einer Placebo-Gruppe in der Herzchirurgie getestet wurde. Die Hälfte dieser Studien beinhaltete 50 oder weniger Probanden. Alle Patienten hatten das Erwachsenenalter erreicht und erhielten perioperativ das Medikament als kontinuierliche Infusion.

Die Auswertung ergab eine reduzierte 30-Tage Mortalität (RR = 0,71, 95 % CI = 0,53 - 0,95; $p = 0,023$) und ein geringeres Auftreten von renalen Komplikationen (RR = 0,66, 95 % CI = 0,47 – 0,92; $p = 0,015$). Auch das LCOS ist unter Levo-Therapie vermindert aufgetreten (RR = 0,4, 95 % CI = 0,22 – 0,73; $p = 0,003$).

Kein Unterschied war bei der myokardialen Schädigung, der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und der mechanischen Beatmungsdauer festzustellen (80).

1.3.4 Zusammenfassung des aktuellen Forschungsstands

Insgesamt spiegelt sich die kardiologische Wirkung von Levo klinisch wider. Parameter wie der CI oder der PCWP sind im Vergleich zur Kontrolle oft besser ausgefallen und das Auftreten des LCOS ist ebenfalls reduziert unter Anwendung des Medikamentes.

Viele weitere Fragestellungen wurden jedoch unterschiedlich beantwortet. Demnach ist nicht eindeutig erwiesen, dass Levo insgesamt die Mortalität senkt, die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus verringert oder Einfluss auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen nimmt. Somit besteht Anlass, weitere Untersuchungen bei der herzchirurgischen Anwendung von Levo durchzuführen.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll anhand eines Tiermodells den Einfluss von Levo auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden an den Kardiomyozyten untersuchen. Dabei stehen insbesondere folgende, bislang unzureichend beantwortete Fragestellungen im Vordergrund:

- 1. Wie beeinflusst Levosimendan die kardiale Schädigung und die Kontraktilität der isolierten Rattenherzen nach Ischämie/Reperfusion?**
- 2. Welchen Einfluss hat die kardioplegische Lösung nach Bretschneider bei der präischämischen Gabe von Levosimendan?**
- 3. Wie sollte der Zeitpunkt der Applikation von Levosimendan gewählt werden?**

2 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden dieser Arbeit detailliert aufgezeigt.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aqua bidest.	B. Braun, Melsungen
Benzonase [®]	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DDT)	Invitrogen [®] , Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirche
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA by GE Healthcare, Pasching (AUT)
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kollagenase Type 2, CLS 2	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood (USA)
Laemmli concentrate, sample Buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Materialien und Methoden

Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MOPS SDS Running Buffer	Novex [®] , by life technologies [™] , Carlsbad (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NuPAGE [®] antioxidants	Novex [®] by life technologies [™] , Carlsbaden (USA)
NuPAGE [®] transfer Buffer	Novex [®] , by life technologies [™] , Carlsbad (USA)
Penicillin/Streptomycin	Gibco [™] Invitrogen, Darmstadt
Phosphatase inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Running Transfer Puffer	Invitrogen [™] , Darmstadt
Spectra [™] Multicolour broad range protein ladder	Fermentas Thermo Scientific, Schwerte
Tris/HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	AppliChem, Darmstadt
Tween [®] 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Pharmaka

Atipamezol (Antisedan®)	Vetoquinol GmbH, Ismaning
Buprenorphin (Buprenodale®)	Impfstoffwerk Dessau-Tornau Biologika GmbH, Dessau-Roßlau
Isofluran (Isofluran Baxter®)	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kardioplegieschutz nach Bretschneider (Custodiol®)	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim
Ketamin (Ursotamin®)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Levosimendan (Simdax®)	Orion Pharma GmbH, Hamburg
Medetomidin (Domitor®)	Orion Pharma GmbH, Hamburg

2.1.3 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden nach standardisierten Versuchsanleitungen des physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität aufbereitet.

Creatin-Carnitin-Taurin Medium (CCT)

Ansatz mit 10 Liter Aqua bidest. und pH 7,4:

Stoff	Molarität	Masse	Firma
M199		2 Pack	Biochrom, Berlin
Hepes		36 g	Roche, Rotkreuz
Creatin	5 mM	3,95 g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taurin	5 mM	6,26 g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytosin- Arabinofuranosid	10 µM	10 mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Lysispuffer (LB)

Ansatz für 200 ml mit pH 6,7:

Stoff	Molarität	Masse	Firma
Tris/HCL	5 mM	1,21 g	Roth, Karlsruhe
SDS	13 mM	4 g	Roth, Karlsruhe

Powell-Medium

Ansatz für 10 Liter Aqua bidest.:

Stoff	Molarität	Masse	Firma
NaCl	110 mM	64,3 g	Roth, Merck
KCL	2,5 mM	1,9 g	Roth, Merck
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	3,0 g	Roth, Merck
Hepes	25 mM	59,6 g	Roche, Rotkreuz
Glucose-Monohydrat D	10 mM	19,8 g	Roth, Merck
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1,2 mM	3,0 g	Roth, Merck

Vorplattiermedium

Ansatz für 10 Falcon Typ 353001 (1 ml pro Zellkulturschale)

Stoff	Volumen	Firma
CCT	10 ml	
FCS	400 µl	PAA, Pasching
Penicillin/Streptomycin	200 µl	Gibco™ Darmstadt

Ausplattier- und Waschmedium

Das Ausplattier- und Waschmedium wurde gemeinsam in einem Falcon conical Tube 50 ml angesetzt:

Stoff	Volumen	Firma
CCT	20 ml	
Penicillin/Streptomycin	400 µl	Gibco™ Darmstadt

Calciumchlorid-Puffer

Ansatz für 1 L Puffer mit pH 7,4:

Stoffmenge	Molarität	Masse	Firma
NaCl	125 mM	7,30 g	Roth, Merck
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,16 g	Roth, Merck
KCl	2,6 mM	0,19 g	Roth, Merck
Glucose- Monohydrat D	10 mM	1,98 g	Roth, Merck
MgSO ₄	1,2 mM	0,295 g	Roth, Merck
Hepes	10 mM	2,38 g	Roche, Rotkreuz
CaCl ₂	1,5 mM	0,22 g	Roth, Merck

Motifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (Langendorffperfusat)

Ansatz für 1 L Puffer mit pH 7,4

Stoff	Molarität	Masse	Firma
NaCl	140 mM	8,18 g	Roth, Merck
KCl	2,7 mM	0,2 g	Roth, Merck
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	0,4 mM	0,055 g	Roth, Merck
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	1 mM	0,2 g	Roth, Merck
Glucose	5 mM	0,99 g	Roth, Merck
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1,8 mM	0,26 g	Roth, Merck
NaHCO ₃	24 mM	2,02 g	Roth, Merck

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

Ansatz von 5 L mit pH 7,4:

Stoff	Konzentration	Firma
TBS:	224 g/L	AppliChem
-KCl	4 g/L	
-NaCl	160 g/L	
-Tris	60 g/L	

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

<i>Cell scraper</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar Pipetten 5 ml, 10 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster (AUT)
Dose mit Schnappdeckel	Brand, Wertheim
Einmalschälchen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Falcon 35 3001 Zellkulturschalen	BD Bioscience, Heidelberg
Falcon conical Tube 15 ml, 50 ml	BD Bioscience Heidelberg
Falcon Plastikpipetten 5 ml	BD Bioscience Heidelberg
Kanüle 0,8x120 mm	B. Braun, Melsungen
Leinen-Operationszwirn, unsteril	Gruschwitz, Neu- Ulm
O ₂ -Gasflasche (Carbogen®)	Praxair Deutschland GmbH, Düsseldorf
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen

Materialien und Methoden

Papiertücher

SCA Hygiene

Produkts,

Mannheim

Parafilm

Pechiney Plastic

Packaging, Chicago

Pasteurpipetten 3 ml Plastibrand®

Brand, Wertheim

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen 100-500 µl

Eppendorf,

Hamburg

Reagiergefäß, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Skalpell Nr. 21

Fa Feather, Köln

2.1.5 Geräte

Allgemein

Anlage für deionisiertes Wasser	Millipore GmbH, Eschborn
Bauchdeckenschere gebogen	Aeskulap, Tuttlingen
Bechergläser 100 ml, 250 ml, 600 ml	Ilmabor® TGI, Ilmenau
Butanbrenner Fireboy	Integra Biosciences Deutschland GmbH, Bibertal
Comfort -20°C Gefrierschrank	Liebherr, Bulle
Economic nofrost -20°C Gefrierschrank	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Schwerte
Microfuge® 18 Zentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Pipetten boy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Präparierschere groß, klein	Aeskulap, Tuttlingen

Tierstall

Altromin®	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage
Buchenholzeinstreu	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg
Gitterdeckel aus Edelstahl	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg

Materialien und Methoden

Kunststoffkafige Type IV aus Polycarbonat	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Pehazell [®]	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Polycarbonat Trinkflasche (720 ml)	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Trinkflaschenkappen aus Edelstahl	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg
Zellstoffrohre	L B S (Serving Biotechnology) Ltd, UK

Implantation Alzet-Pumpe

Alzet [®] -Minipumpe, Model 1003D	Durect Corporation, Cupertino
--	----------------------------------

Langendorff-Modell

Bruckenverstarker	Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Doppelwandiger Perfusionsbehalter	Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Druckaufnehmer Braun Combitrans	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Fiberoxygenator D150	Hugo Sachs Elektronik –
----------------------	----------------------------

Materialien und Methoden

Isolated Heart ICH-SR Appartus Type: 844/1	Harvard apparatus GmbH, March Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Latextballon Gr. 5/6	Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Perfusor 11 plus	Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Schlauchpumpe Ismatec Reglo digital ISM 834/230	Ismatec-IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Software Isoheart	Hugo Sachs Elektronik – Harvard apparatus GmbH, March
Tygon Pumpenschläuche (ID: 3,18 mm)	Ismatec-IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Wärmepumpe Ecoline Lauda E100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Königshofen

Isolierung Kardiomyozyten

Absauger Vacusafe comfort	Integra Biosciences Deutschland GmbH, Bibertal
Allegra 21 Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Apparatur nach Langendorff	Eigenkonstruktion des Physiologischen Instituts der JLU Gießen
Aqualine AL 18 Wasserbad	Lauda, Lauda- Königshofen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Büchnertrichter	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Lauda, Lauda- Königshofen
Mc Ilwain tissue chopper	Cavey Laboratory Engineering Co., Goomshell
Plastikscheibe	Cavey Laboratory Engineering Co., Goomshell
Rollerpumpe	Ismatec, Grevenbroich
Siebnetz, Maschenweite 200 µl	Neolab, Berlin
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uhrglas	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acculab Waage	Satorius Group, Göttingen

Western Blot

Chemilumineszenz ChemiDoc	Pelab, Erlangen
Dri-Block DB-2D	Techne, Wertheim- Bestenheid
Entwicklerschalen	Labcor Products, Gaithersburg
Kühlraum	Eigenkonstruktion des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
Life Technologies PS 608 electroresis	Gibco™ Invitrogen, Darmstadt
Microliter® Nr.710 Hamiltonspritze	Hamilton Germany GmbH, Planegg- Martinsried
NuPAGE® 10% Bis-Tris-Gel 10well	Novex® by life technologies™, Carlsbad (USA)
Protan nitrocellulose Transfer membran	Whatman® GE Healthcare, Freiburg
Rocking platform	Biometra, Göttingen
Western Blot Roller	Novex® by life technologies™, Carlsbad
Western Blot Schwämme	Novex® by life technologies™, Carlsbad
Western Blot Glasplatte	Biomtra, Göttingen
XCell SureLock™ electrophoresis cell	Novex® by life technologies™, Carlsbad

Materialien und Methoden

XCell2™ blot module

Novex® by life
technologies™,
Carlsbad

2.1.6 EDV und Statistik

Microsoft Office® 2007 und 2016

Microsoft
Deutschland
Unterschleißheim

Citavi 6

Swiss Academic
Software,
Wädenswil (CHE)

ChemDraw®

PerkinElmer
Informatics,
Hamburg

SPSS statistical software version 24

IBM Armonk USA

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die Methoden der Arbeit detailliert dargestellt. Abbildung 3 vermittelt eine Übersicht über die Verfahren und das Procedere.

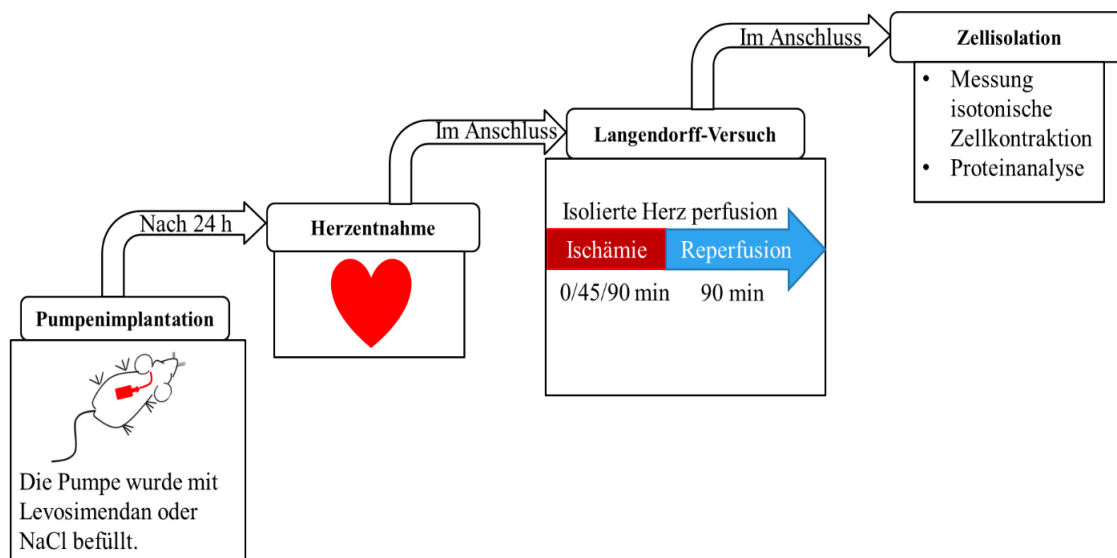


Abbildung 3: Übersicht über die Methoden der Arbeit. Zunächst wurde eine Minipumpe auf dem Rücken der Wistar-Versuchsratten implantiert. Nach 24 h wurden die Tiere euthanasiert und das Herz entfernt. Im Anschluss sind die isolierten Herzen mittels Langendorff-Versuch retrograd perfundiert worden. Es erfolgte eine Ischämiezeit von 0, 45 oder 90 min (je nach Versuchsgruppe) und einer anschließenden Reperfusion von 90 min. Schließlich wurden die Kardiomyozyten isoliert, verschiedene Zell- bzw. Funktionsparameter erhoben und eine Proteinanalyse durchgeführt.

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstiergruppen

Versuchstierkollektiv

Der Umgang, die Haltung und Tötung entsprachen den gesetzlichen Vorschriften. Die Genehmigung des Versuchstiervorhabens erfolgte durch das Regierungspräsidium Gießen unter der Vorgangsnummer G 48/2017 und der Ergänzungsantragsnummer G 92/2018

Materialien und Methoden

Das Tierkollektiv bestand aus insgesamt 50 männlichen Wistar-Ratten (Zuchtlinie: Han.: W.), welche ca. 3 Monate alt waren und einem Gewicht von 300 - 400 g aufwiesen (Lieferant: Janvier, Saint Berthevincedex und Charles River Laboratories, Massachusetts).

Nach Lieferung der Versuchstiere durch die Fa. Javier, Frankreich, hatten diese eine Eingewöhnungszeit von 14 Tagen und wurden bis zum Versuchsvorhaben am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten.

Dabei hielten sich die Tiere immer mit maximal 4 weiteren Ratten in einem Käfig auf, bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ \text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10 \%$, einer 22-fachen Luftwechselungsrate und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14 h/10 h (5:00 -19:00 Uhr).

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit dem Standardfutter Altromin[®] und Leitungswasser, welches über die Trinkflaschen uneingeschränkt zur Verfügung stand.

Versuchstiergruppen

Es standen 40 Versuchstiere zur Verfügung, die auf 6 Gruppen mit je 6 Individuen verteilt wurden [siehe Tabelle 3]. Auf Basis eigener empirischer Untersuchung wurde eine Erfolgsquote von 90 % angenommen, so dass von 36 verwertbaren und 4 Misserfolgsversuchen ausgegangen wurde. Im Verlauf des Versuchsvorhabens stellte sich jedoch eine höhere Komplikationsrate heraus [vgl. Kapitel 4.5], welche eine Ergänzung um weitere 10 Versuchstiere notwendig machte.

Levo wird im klinischen Alltag nur i.v. verabreicht (65). Daher war es notwendig, eine Alzet[®]-Minipumpe zu implantieren, die dann nach der gewählten Dauer die Substanz in das Gefäßsystem einbrachte. So bekam die Versuchsgruppe 1 Levo über 24 h mit anschließender Ischämiedauer von 45 min und ohne einen Kardioplegie-Schutz. Gruppe 2 hingegen musste sich einer 90-minütigen Ischämie unterziehen, jedoch mit einer kristalloiden Kardioplegie nach Bretschneider.

Als Kontrolle fungierte die „Levo 24 h Perfusion“, da sie weder eine Perfusionspause noch einen Schutz gegen diese erhalten hat.

Die Gruppe 4 spiegelte die klinische Realität wider, in der bis zu 2 h vor der Herzoperation Levo gegeben wird und nach der Kardioplegie weiterläuft (31).

Weitere Kontrollen stellten die Gruppe 5 „NaCl 2 h Perfusion“ und die Gruppe 6 „NaCl 2 h Ischemia“ dar, bei denen sich in den Pumpen der beiden Gruppen jeweils

Materialien und Methoden

Natriumchlorid (NaCl) befand und kein Kardioplegie-Schutz gegeben wurde. Die Gruppe 6 erfuhr zusätzlich noch eine Ischämiedauer von 45 min.

Die Ischämie und die Reperfusion der Versuchstierherzen simulieren die OP-Situation, die durch das Langendorff-Modell realisiert wurde [siehe Kapitel 2.2.3].

Tabelle 3: Überblick der Versuchsgruppen. Alle Gruppen erfuhren eine Reperfusionszeit von 90 min.

Gruppe	Name	Ischämie	Reperfusion	Kardioplegie-Schutz	Stoff	Exposition	Anzahl der Individuen
1	Levo 24 h Ischemia	45 min	90 min	-	Levo	24 h	6
2	Levo 24 h Cardioplegia	90 min	90 min	+	Levo	24 h	6
3	Levo 24 h Perfusion	0 min	90 min	-	Levo	24 h	6
4	Levo 2 h Cardioplegia	90 min	90 min	+	Levo	2 h	6
5	NaCl 2 h Perfusion	0 min	90 min	-	NaCl	2 h	6
6	NaCl 2 h Ischemia	45 min	90 min	-	NaCl	2h	6

2.2.2 Implantation der Alzet[®]-Pumpe

Operativer Eingriff

Je nach Versuchsgruppe wurde das Medikament über 2 h oder 24 h vor der Organentnahme verabreicht, um den vollen Wirkspiegel zu erreichen. Dies bewerkstelligte eine osmotische Alzet[®]-Minipumpe des Modelles 1003D.

Die Implantation der Pumpe fand im OP-Raum der Tierhaltung im Gebäude des Physiologischen Institutes der JLU statt. Die Sedierung der Tiere wurde mit Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht) und Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht) erreicht. Das Injektionsvolumen betrug ca. 300 µl und wurde mit einer 26 ½ G-Kanüle intraperitoneal verabreicht. Nach Erreichen völliger Schmerzfreiheit folgte dann die Lagerung der Tiere in die Bauchlage. Im Anschluss fand dann die Lokalanästhesie mit Carprofen (Rimadyl[®], Dosierung: 4 mg/kg Körpergewicht) statt. Hierbei wurde das Lokalanästhetikum über eine Kanüle der Größe 23 G subcutan in die linke Scapularegion injiziert. Danach erfolgte ein Hautschnitt laterocaudal der linken Scapula. Ausgehend von dem Schnitt wurde weiter eine subcutane Tasche präpariert, in die die Alzet[®]-Pumpe mit dem Infusionsmedium, bestehend aus Levo und einer 5-prozentigen Glucose-Lösung, eingesetzt wurde. Von dort aus war es weiter möglich, einen Tunnel in die Cervicalregion frei zu präparieren.

Nach Umlagerung auf dorsal, Desinfektion und Lokalanästhesie erfolgte ein Schnitt über der linken Vena jugularis. Nun konnte ein Verbindungskatheter von der Pumpe durch den vorbereiteten Tunnel bis zur Vene gezogen werden. Schließlich wurde der Katheter in die Vena jugularis eingebracht und dort fixiert.

Am Ende des Eingriffs wurde das craniale Ende der Vena jugularis ligiert und die Hautschnitte mit Hautklammern versorgt.

Auf diese Weise konnte 1 µg/kg Körpergewicht/min unverdünntes Levo durch die Minipumpe infundiert werden.

Postoperative Versorgung

Nach der Operation erfolgte die Antagonisierung der Narkose mit Atipamezol (Antisedan[®], Dosierung: 0,5 mg/kg Körpergewicht) und die engmaschige Überwachung der Tiere in Einzelkäfigen. Die analgetische Versorgung wurde durch die Gabe von Buprenorphin bei 0,1 mg/kg Körpergewicht sichergestellt, wobei die Applikation subcutan mindestens zweimal, je nach klinischem Befund, durchgeführt wurde.

2.2.3 Das Langendorff-Modell

Prinzip zur Perfusion am isolierten Rattenherz nach Langendorff

Das Funktionsprinzip, isolierte Herzen zu perfundieren, stammt erstmalig von dem Physiologen Oscar Langendorff Ende des 19. Jahrhunderts und wurde stets weiterentwickelt (44).

Dabei wird das zuvor frei präparierte Herz an der Aorta ascendens mit der Anlage konnektiert. Dadurch ist es möglich, das Myokard retrograd zu versorgen, indem das Perfusat auf die geschlossene Aortenklappe trifft, weiter in die Koronararterien ausweicht und dann über den Sinus Coronarius drainiert wird. Parallel dazu kann über das linke Atrium ein Latexballon in die linke Kammer eingeführt werden, um physiologische Parameter bei der Kontraktion und Relaxation zu erfassen. Die durch diese Methode erhobenen Messdaten sind, im Gegensatz zur Messung am Herzen im Individuum, unabhängig von hormonellen oder neurogenen Störfaktoren.

Euthanasie und Freipräparation der Herzen

Vor Beginn der Euthanasie wurden die Versuchsratten samt ihren Käfigen in das Labor der Herzchirurgie im 5. Stock des Physiologischen Institutes der JLU gebracht. Hier fanden im Anschluss ebenfalls die Versuche nach Langendorff statt.

Das Tier wurde in einen Exsikkator überführt, der mit 5 Vol. % Isofluran geflutet wurde. Während der Zeit wurde der Verlauf der Sedierung beobachtet. Ausfall der Muskel- und Cornealreflexe sowie eine insgesamt flache Atmung wiesen auf eine ausreichende Tiefe der Narkose hin. Die Euthanasie erfolgte durch zervikale Dislokation.

In den nachfolgenden Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, diese möglichst schnell zu vollziehen, um eine Thrombenbildung zu vermeiden.

Es erfolgte die Umlagerung auf Rückenlage und das Eröffnen der Bauchhöhle mit Einschnitt des Diaphragmas und des Sternums. Weiter wurde das Herz samt zu- und abführenden Gefäßen, Lungenflügeln und Thymus aus dem Thorax abgetrennt.

Das Explantat konnte dann in eine Schale mit 4°C gekühlter isotonomischer Kochsalzlösung gegeben werden, um den Metabolismus der noch autonom schlagenden Kardiomyozyten zu verlangsamen. In der Schale kam es zur Auswaschung von Blutresten und zur Präparation des Herzens von umliegenden Organen und Geweben. Dabei wurde darauf geachtet, einen ausreichend großen Aortenstumpf am Herzen zu hinterlassen.

Versuchsdurchführung

Der Aortenstumpf des Herzens wurde mit einer atraumatischen Pinzette gefasst und über eine Edelstahlkanüle (Ø1,8 mm) gestülpt. Anschließend wurde die Aorta an der Kanüle mit einer Krokodilklemme befestigt und mittels Leinenbindfaden endgültig fixiert. Bei dem Vorgehen war zu beachten, dass das Ende der Kanüle sich oberhalb des Koronarabgangs befindet, um eine Perfusion der Koronargefäße zu gewährleisten.

Danach kam es zur Anbringung des Herzens in die Perfusionsanlage. Da durch die Abtrennung des Lungenkreislaufes das linke Atrium zugänglich war, konnte der Druckabnehmer über die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben werden. Nachfolgend wurde die Rollerpumpe aktiviert und gewährleistete somit den Fluss des Perfusates durch die Anlage und schließlich auch durch das Koronarstrombett. In den ersten ca. 30 min wird ein sogenanntes „*Steady State*“ aufgebaut, indem die Anlage eine konstante Temperatur von 37 °C und einen Perfusionsdruck von 70 mmHg erreicht.

Bei den Versuchsgruppen 1, 2, 4 und 6 folgten nach dem „*Steady State*“ die vorgesehenen Ischämiezeiten [siehe Tabelle 3], indem ein Durchflusstopp mittels Querabklemmung der Aorta oberhalb der Perfusionskanüle und Deaktivierung der Rollerpumpe erreicht wurde. Gruppe 2 und 4 bekamen zusätzlich in dieser Phase die Kardioplegielösung nach Bretschneider alle 20 min über die Perfusorpumpe.

Nach der Ischämiezeit wurde die Abklemmung der Aorta wieder entfernt und die Rollerpumpe aktiviert, es folgte eine 90 min andauernde Reperfusion. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Phasen im Langendorff-Versuch.

Materialien und Methoden

Während der Reperfusion konnten folgende Parameter erhoben werden: Koronarblutfluss, linksventrikulärer Druck (LVDP) und die Kontraktilität ($dp/dt \max.$). Dabei wurde der LVDP durch Messung des linksventrikulären systolischen Druckes (LVSP) und des linksventrikulären diastolischen Druckes (LVDP) ermittelt. Die erste positive und negative Ableitung des LVSP wurden von einem Verstärkungswandler (PLUGSYS® TAM-A, *Havard apparatus*) aufgezeichnet und mit der Software „Isoheart“ berechnet.

Während der Aortendruck durch einen Druckregler auf konstanten 70 mmHg gehalten wurde, konnte der koronare Fluss ermittelt werden (ml / min).

Nach Ende der Versuchsdurchführungen wurde das Herz mit der Kanüle von der Perfusionsanlage getrennt und in den 1. Stock des Gebäudes der Physiologie zur Isolation der Kardiomyozyten gebracht.

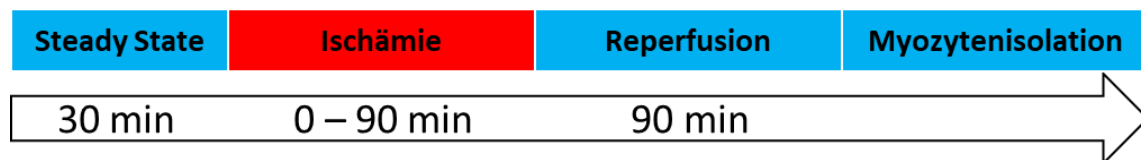


Abbildung 4: Zeitliche Dauer der Phasen im Langendorff-Modell. Steady State, Ischämie, Reperfusion, sowie die Myozytenisolation

2.2.4 Isolierung der Kardiomyozyten

Aufbau

Die Gewinnung der Kardiomyozyten erfolgte nach dem Prinzip der Perfusion an Säugetierherzen nach Langendorff, das vom physiologischen Institut der JLU modifiziert wurde (44,59).

Dabei wird wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben das zuvor isolierte und retrograd perfundierte Herz nochmals nach dem Langendorff-Prinzip perfundiert und nun mit zusätzlicher Kollagenase enzymatisch zersetzt.

Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Isolation mussten zunächst Vorplattier-, Ausplattier- und Waschmedium hergestellt werden. Diese wurden 2 - 24 Stunden vor der Kardiomyozytenisolation angesetzt und bestanden jeweils aus CCT-Medium und 2 Vol. % Penicillin-Streptomycin. Das Vorplattiermedium enthält zudem 4 Vol. % fetales Kälberserum (FCS). Das Vorplattiermedium wurde dann in die Falcon Zellkulturschalen überführt und bei 37°C inkubiert. Die anderen Medien verweilten bis zu Beginn des Versuches im Kühlschrank und wurden kurz vor der Isolation in einem 37°C warmem Wasserbad erwärmt.

Diese Arbeitsschritte fanden unter der Sterilbank mit abgeflamtem Arbeitsmaterial statt, um Keimkontaminationen zu reduzieren.

Isolation

Nachdem das Rattenherz die Phasen im Langendorff-Modell durchlaufen hatte, wurden umgehend die Kardiomyozyten isoliert [siehe Abbildung 5].

Dazu erfolgte die Anbringung des Herzens an die Anlage mittels eines Schlauchadapters. Nachfolgend ist das Herz mit Powell-Lösung perfundiert worden, indem der Kreislauf der Anlage geöffnet wurde. Sobald das Spülvolumen ca. 25 ml betrug, ist der Kreislauf geschlossen worden und es folgte eine Hinzugabe von 35 mg Kollagenase Type II. Diese wurde vorher in 5 ml oxygeniertem und erwärmtem Powell-Medium und 12,5 µl CaCl₂

gelöst und dem Kreislauf hinzugefügt. Nachfolgend ist das Herz für 35 min mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/ Sekunde bei 37°C perfundiert worden.

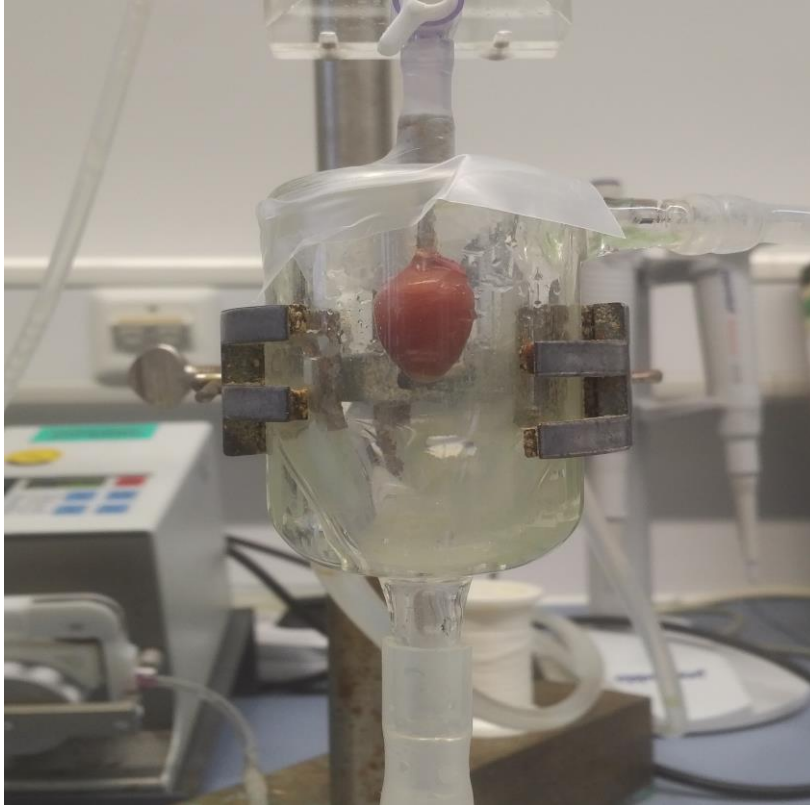


Abbildung 5: Perfundiertes Rattenherz an dem Langendorff-Modell. Hier erfolgte die enzymatische Verdauung des Herzens mittels Powell-Lösung und Kollagenase für 35 min und mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/Sekunde.

Nach Ablauf der Zeit ist das Perfusionsventil geschlossen worden und es erfolgte eine Begutachtung des Verdauungsprozesses.

Anschließend wurde das Herz von der Perfusionsanlage abgetrennt, dabei wurde der Schnitt unterhalb der Auriculae atrii mit der Schere gesetzt. Nun kam es zur Zerkleinerung des Herzgewebes. Dazu ist die Schere in die Aorta eingeführt und der linke Ventrikel eingeschnitten worden. Nachfolgend wurden weitere Schnitte vom linken und rechten Ventrikel zentral gesetzt. Die weitere Zerkleinerung erfolgte am „*Tissue Chopper*“ mit einer Rasierklinge (Geschwindigkeit 0,15 cm/Sekunde, Schnittbreite 0,7 mm), die in 2 Richtungen jeweils um 90° versetzt stattfand [siehe Abbildung 6]. In einem zweiten Schritt wurde der Zellbrei nochmals manuell mit 2 Einmalskalpellen entgegengesetzt fragmentiert. Jetzt konnte die Nachverdauung beginnen. Das zerkleinerte

Materialien und Methoden

Herz ist in ein auf 37°C erwärmtes und mit Perfusat gefülltes Falcon Type 40 überführt worden. Dort persistierte der Zellbrei 5 min, wobei jede Minute auf- und abpipettiert wurde. Schließlich fand die Filtration durch einen Büchner-Trichter und ein Nylonnetz statt. Alle festen Bestandteile $\geq 200 \mu\text{m}$ wurden vom Nylonnetz aufgefangen. Das Filtrat ist im Folgenden insgesamt dreimal zentrifugiert worden. Im ersten Zentrifugationsschritt wurde dabei mit 400 U/min für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Die beiden weiteren Schritte dienten dem Anreichern von Calcium, wobei erst mit 6 ml begastem und gewärmtem Powell sowie 250 μM CaCl_2 (2 min bei 400 U/min) zentrifugiert wurde. Dann erfolgte die Hinzugabe von zunächst 6 ml Powell-Lösung bei 500 μM CaCl_2 . Weitere 12 ml Mediummenge bei 1 mM CaCl_2 kamen hinzu mit anschließender Zentrifugation bei 300 U/min über 1 min. Der Überstand wurde entsorgt und ein Pellet blieb zurück.

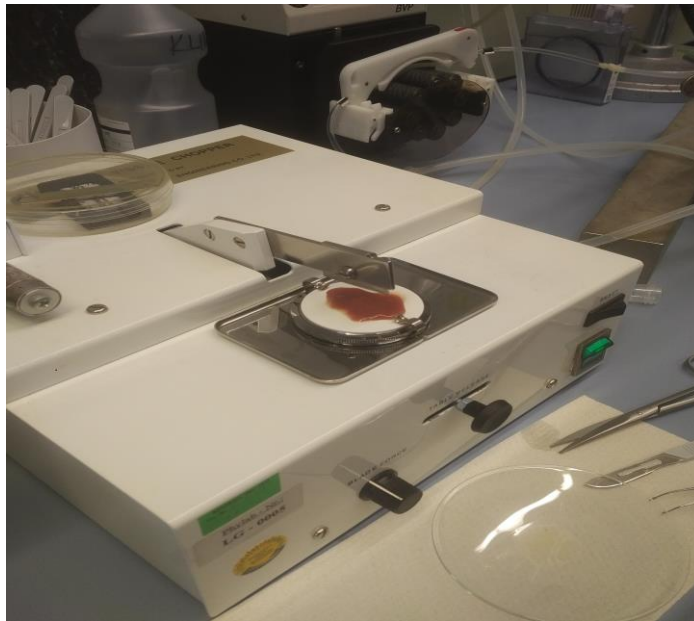


Abbildung 6: Der „Tissue Chopper“. Nachdem die kollagene Verdauung abgeschlossen wurde, erfolgte die Zerkleinerung mit dem „Tissue Chopper“. Dabei wurde das Herz mit einer Geschwindigkeit von 0,15 cm/Sekunde in etwa 1-3mm³ Bestandteile aufgespalten. Durch Zentrifugieren konnte im nächsten Schritt die Zellmasse aufgetrennt werden.

Ausplattieren und Waschen

Das Pellet wurde in das Ausplattiermedium überführt. Nachfolgend wurde die Vorplattierlösung aus den Falcon Zellkulturschalen steril abgesaugt und die Zellsuspension auf die Schalen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, während sich die Zellen an den mit FCS benetzten Boden anheften konnten. Nach einer Stunde wurde das Medium aus den Zellschalen zusammen mit den nicht anhaftenden Zellen abgesaugt und der Calciumchlorid-Puffer zugegeben. Die Ausbeute der Zellen ergaben 10 Schalen pro Rattenherz.

Diese Arbeitsschritte fanden unter der Sterilbank mit abgeflammtem Arbeitsmaterial statt, um Keimkontaminationen zu reduzieren.

2.2.5 Lastfreie Zellverkürzung

Nachdem die Kardiomyozyten isoliert wurden, erfolgte die Messung der lastfreien Zellverkürzung (45). Dazu ist je eine Schale mit den Herzmuskelzellen in die Vertiefung unter dem Mikroskop gelegt worden. Die restlichen Schalen, die nicht gemessen wurden, persistierten im Inkubator bei 37°C.

Der zu messenden Falcon Zellkulturschale ist eine Silberchlorid-Elektrode (AgCl) aufgesetzt worden, die eine Rechteckspannung von 20 mV erzeugte. Sie wies einen monophasischen Verlauf mit einer Frequenz von 2 Hz auf.

Durch das Mikroskop wurde eine zentral gelegene Zelle ausgewählt, die sowohl vital als auch rhythmisch erschien. Wurde solch eine Zelle in den Fokus genommen, ist auf den Oszillografen umgeschaltet und kalibriert worden. Die Zellmessung konnte gestartet werden. Dabei wurde die Herzzelle viermal im Abstand von je 5 Sekunden gemessen. Statistisch ist der Mittelwert dieser vier Messungen zur Auswertung verwendet worden. Auf diese Weise wurden maximal 9 Zellen pro Schale gemessen.

2.2.6 Gelelektrophorese, Western-Blot und Proteindetektion

Prinzip des Western-Blots

Im Folgenden wird das Semi-Dry Western-Blot-Verfahren, das erstmalig von Kyhsen-Andersen 1984 entwickelt wurde, beschrieben (42).

Durch diese Methode lassen sich Proteine anhand ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes sortieren und detektieren. Dazu ist es notwendig, die Kardiomyozyten zunächst zu lysieren und die Proteine anschließend mittels Gelelektrophorese aufzutrennen. Diese werden schließlich auf Nitrozellulose transferiert und mittels einer Antikörper-Färbung detektiert.

Aufbereitung der Kardiomyozyten für den Western-Blot

Die Aufbereitung der Kardiomyozyten war notwendig, um die Zellen zu lysieren und somit die darin enthaltenen Proteine freizulegen. Es erfolgte die frische Anmischung des Lysemediums für alle 10 Schalen. Diese bestand aus 500 mM Dithiothreitol (100 µl), Proteinaseinhibitor (10 µl), Phosphataseinhibitor (5 µl) und Lysispuffer (900 µl).

100 µl Lysemedium wurden nachfolgend in jede Schale pipettiert und gleichmäßig verteilt, indem diese 15 min auf dem Plattformschüttler verblieben (100.000 U/vial).

Anschließend erfolgte die Zugabe des Enzyms Benzonase[®] (5 µl auf 1:30 verdünnt) und eine weitere Inkubation für 10 min auf dem Schüttler. Dies diente dazu, die DNA- und RNA-Verbindungen zu spalten. Das in dem Lysispuffer enthaltene SDS bildet eine negativ geladene Hülle mit konstanter Ladung pro Masseneinheit um die einzelnen Proteine. Zusätzlich verändert es durch die Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine. Dadurch erhalten die Proteine in der nachfolgenden Gelelektrophorese eine von der Molekülmasse abhängige Wanderungsgeschwindigkeit, wodurch diese voneinander getrennt werden können.

Schließlich ist der Inhalt der Falcon-Schalen in Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt worden. Um sicherzugehen, dass sich keine Zellreste und Proteine auf den Schalen befinden, wurden diese zuvor mit einem sterilen Zellschaber bearbeitet. Die befüllten Reaktionsgefäße verweilten bis zum Western Blot bei -20°C.

Gelelektrophorese

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen mittels Anlegen einer elektrischen Spannung anhand ihres Molekulargewichtes. Zuvor wird die Ladungsdifferenz mit SDS aufgehoben und die Proteine über die Porengröße des Gels getrennt.

Die SDS-PAGE und die Übertragung auf die Nitrozellulosemembran wurden nach der Anleitung des Systems NuPAGE® (Novex® by life technologies) durchgeführt. Dazu fand zunächst das Ansetzen des Laufpuffers mit 50 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer und 950 ml Aqua bidest. statt. Das NuPAGE® 10% Bis-Tris Fertiggel ist mit dem Laufpuffer gespült worden. Die lysierten Proben, die bei -20°C gelagert wurden, sind für 5 min bei 95°C in den Heizblock erhitzt und anschließend auf dem Vortexer auf halbmaximaler Stufe gemischt worden. Nachfolgend wurden die Proteine mit 40 µl 2-fach konzentriertem Laemmli Puffer eingefärbt und es ist das Spectra® - Multicolor Broad Range Protein Ladder als molekulare Gewichtsmarker hinzugefügt worden. Schließlich konnte die Probenlösung in die 15 Wells des vorgefertigten Gels mit einer Hamilton Spitze eingefügt werden. Die Auftrennung der Proben fand bei 200 V statt. Nach ca. 60 min war die Selektion abgeschlossen und es konnte das Blotting erfolgen.

Übertragung auf die Nitrozellulosemembran (Blotting)

Um im nachfolgenden Schritt die Proteine zu detektieren, müssen diese zunächst auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Das geschah durch das Semi-Dry-Blotting. Als Erstes erfolgte das Anmischen des Transfer-Puffers mit 500 µl NuPAGE®-Antioxidants und 25 ml Transfer Pufferlösung sowie 100 ml Methanol. Weiter wurde das Blot Sandwich nach dem Schema in Abbildung 7 zusammengesetzt und luftblasenfrei mit einem Handroller angelegt.

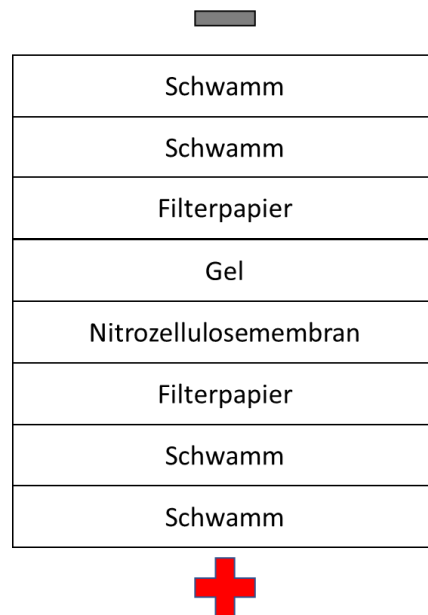


Abbildung 7: Aufbau des Sandwiches für das Blotting-Verfahren. Der Strom fließt dabei von der Kathode (-) zur Anode (+) und überträgt die Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.

Das zusammengesetzte Gel-Sandwich wird nachfolgend in der Mitte der Blotkammer fixiert. Die innere Kammer ist mit Transferpuffern und die äußere mit Aqua bidest gefüllt worden. Bei einer Spannung von 30 V und einer Laufzeit von ca. 60 min kam es zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran. War der Vorgang abgeschlossen, wurde die Nitrozellulose mit BSA und TBS auf dem Wipptisch inkubiert und abschließend mit Aqua bidest gespült.

Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper

Die semiquantitative Analyse der Proteine erfolgte mittels primärer Antikörper, die immunologisch an das zu detektierende Protein binden. Die sekundären Antikörper binden wiederum an den primären Antikörper, die bei Zugabe der Supersignal-Lösung eine Chemilumineszenz katalysiert.

Dazu wurden zunächst 5 % BSA, 5 ml TBS, sowie 0,1 % Tween[®] zum Antikörper hinzugegeben und wirkten über Nacht bei 4°C auf die Nitrozellulosemembran ein.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Auswaschung der Membran mit TBS und Tween[®] und die lichtgeschützte Inkubation des sekundären Antikörpers über 60 min.

Schließlich wurde die Membran final gespült, zunächst mit TBS und Tween[®] und anschließend nur mit TBS.

Die Darstellung und Auswertung erfolgte mittels ECL-Lösung Supersignal[®] und dem Chemilumineszenzsystem „ChemiDoc“.

Bei den primären Antikörpern handelte es sich um den polyklonalen Anti- SERCA2 (goat) Antikörper (Größe SERCA2-Protein 92 kDa) , den monoklonalen Anti-GAPDH (mouse) Antikörper (Größe GAPDH-Protein 37 kDa) sowie den monoklonalen Anti-Natrium-Calcium-Austauscher (mouse oder goat) Antikörper (Größe NCX-Protein 108 kDa).

Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um polyklonale Maus- und Ziegenantikörper, die zusätzlich mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert sind.

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Ein Herz aus jeder Gruppen wurde nach dem Langendorff-Versuch zunächst fixiert. Dazu ist das Herz vaskulär mit 1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % Paraformaldehyd in einem 0,5 M HEPES-Puffer perfundiert worden.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in einem Fixativ bei 4° C gelagert. Die weiteren Untersuchungen fanden in Hannover am Zentrum Anatomie und Zellbiologie, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christian Mühlfeld statt.

Dem linken Ventrikel wurde durch eine systematisch einheitliche Zufallsprobe (55) Material entnommen. Die weitere Verarbeitung und Fixierung der Proben erfolgte mit Osmiumtetroxid mit anschließender Blockfärbung durch halbgesättigtes Uranylacetat und einer endgültigen Einbettung in Epoxyharz. Weiter wurden ultradünnschicht-Schnitte aus den fixierten Präparaten unter Verwendung eines Ultramikrotoms gewonnen und schließlich mit Bleicitrat und Uranylacetat angefärbt.

Nach einem etablierten Verfahren (56) kamen Elektromikroskopie und Morphometrie zum Einsatz, wodurch der Grad des Ischämie- und Reperfusionsschadens der Kardiomyozyten abgeschätzt werden konnten. Dazu wurde zunächst die Volumendichte (V_v) der Myofibrillen, des Sarkoplasmas und der Mitochondrien unter dem Elektronenmikroskop nach der Weibel Punktezahlmethode bestimmt. Aus diesen Daten ließ sich dann der zelluläre Ödemindex (CEI) mit folgender Formel berechnen:

$$CEI = V_v \left(\frac{\text{Mitochondrien}}{\text{Myozyten}} \right) + \frac{V_v \left(\frac{\text{Sarkoplasma}}{\text{Myozyten}} \right)}{V_v \left(\frac{\text{Myofibrillen}}{\text{Myozyten}} \right)}$$

***Formel 1:** Berechnung des zellulären Ödemindex (CEI) unter Verwendung von Volumendichte (V_v) der Mitochondrien, Myozyten, Myofibrillen und des Sarkoplasmas. Der CEI gibt Aufschluss über das Maß der postischämischen Zellschädigung (16).*

Der CEI-Wert und damit die Schwellung der Kardiomyozyten gibt Aufschluss über den postischämischen Schaden. Je höher der Wert, desto größer ist der Schaden (16).

2.2.8 Statistische Analysen

Bei den Ergebnissen der Langendorff-Versuche wurden die verschiedenen hämodynamischen Parameter als Absolut- oder Prozentualwerte in Bezug zur Baseline ausgedrückt und unter Verwendung der SPSS-Statistiksoftware Version 24 analysiert. Der Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest wurde zur Prüfung auf Normalverteilung verwendet. Der einfaktorielle ANOVA-Test kam für den Vergleich der verschiedenen Gruppen in Bezug auf hämodynamische Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten zustande. Konnte dieser einen Unterschied der Mittelwerte in den einzelnen Gruppen aufzeigen, gaben die Tukey-Post-Hoc-Tests Aufschluss über die Signifikanz. Die statistische Signifikanz wurde auf einem Niveau von $p < 0,05$ angenommen.

Der Levens-Test gab an, ob eine gleiche Varianz zwischen zwei Gruppen besteht.

Schließlich wurde der zweiseitige T-Test für die weitere Signifikanzbestimmung bei der Myozytenisolation verwendet.

Kam keine Signifikanz zustande, wurden die Variablen deskriptiv beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht über die erhobenen Ergebnisse

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Anzahl der Tiere für die jeweiligen Untersuchungen. Bei der Versuchsplanung war es vorgesehen, die Individuen auf insgesamt 6 Gruppen zu verteilen [vgl. Kapitel 2.2.1]. Dies ließ sich bei der Durchführung jedoch nicht verwirklichen. Bei der Gruppe 4 (Levo 2 h Cardioplegia mit 90 min Ischämie und Kardioplegie) sowie der Gruppe 6 (NaCl 2 h Ischemia mit 45 min Ischämie Zeit und keiner Kardioplegie) kam es bei allen Versuchstierherzen zu keinem messbaren Druckaufbau im Langendorff-Apparat aufgrund von Kammerflimmern oder Asystolien während des *Steady States* oder vor der Reperfusionphase. Diese Gruppen konnten für die Druckmessung am Langendorff sowie für die isolierte Zellkontraktionsmessung nicht verwendet werden. Die Proteindetektion erfolgte jedoch bei allen Gruppen. Störfaktoren und mögliche Auslöser dafür werden in Kapitel 4.2 und 4.5 diskutiert.

Tabelle 4: Übersicht über die Verfahren und die dafür verwendete Anzahl an Versuchstieren.

Verfahren	Anzahl der Tiere
Analyse der Metaboliten	8
Messung kardialer Funktionsparameter	16
Isolierte Zellkontraktionsmessung	12
Proteindetektion	12
Elektronenmikroskopie	4

3.2 Metaboliten

Um die Funktion der Minipumpe und den Erfolg der Implantation mit Hilfe des Levo-Plasmaspiegels zu evaluieren, ist vor der Euthanasie stichprobenartig Blutplasma aus der Vena caudalis mediana der Versuchstiere entnommen worden. Insgesamt ergaben sich

Ergebnisse

Blutproben aus 4 Individuen, die 24 h mit Levo behandelt wurden und weiteren 4 Individuen, die über 2 h mit dem Medikament infundiert wurden. Die Detektion erfolgte im Analyselabor Dr. M. Hows des LGC Group Fordham (United Kingdom).

Analysiert wurde sowohl der Levo Spiegel als auch die hämodynamisch relevanten Metaboliten OR-1855 und OR-1896. In jeder Lösung konnte mindestens 1 Analyt nachgewiesen werden, wobei OR-1855 nicht nachweisbar (n.n.) war [siehe Tabelle 5].

Tabelle 5: Übersicht über die Plasmaanalyse von Levosimendan und der relevanten Metaboliten in 8 Versuchstieren. 4 Proben stammten dabei von Ratten, die 24 h perfundiert wurden und 4 Proben aus Ratten, die 2 h das Medikament erhielten. In jeder Analyse konnte Levo oder OR-1896 gefunden werden (Angaben in ng/ml), wobei OR-1855 nicht nachweisbar (n.n.) war.

	Levosimendan	OR-1855	OR-1896
24 h			
Individuum 1	n.n.	n.n.	4,41
Individuum 2	0,43	n.n.	6,02
Individuum 3	0,58	n.n.	6,84
Individuum 4	16,60	n.n.	11,00
2 h			
Individuum 1	25,90	n.n.	n.n.
Individuum 2	12,70	n.n.	n.n.
Individuum 3	8,88	n.n.	n.n.
Individuum 4	11,90	n.n.	n.n.

3.3 Kardiale Funktionsparameter

Die kardialen Funktionsparameter der präparierten Herzen ließen sich im Langendorff-Apparat evaluieren. Dabei wurden folgende relevante Messparameter ermittelt: Koronarer Blutfluss, linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP) sowie die Druckanstiegs-geschwindigkeit ($LVdP/dt_{max}$ und $LVdP/dt_{min}$). Aufgrund von Kammerflimmern und Asystolien, kam es bei zwei der vier Gruppen zu keinem

Ergebnisse

verwertbaren Ergebnis im Langendorff-Apparat. Daher sind die Ergebnisse der kardialen Funktionsparameter auf vier-, statt der ursprünglich geplanten sechs Gruppen beschränkt.

3.3.1 Baseline Daten

Der koronare Blutfluss wurde mit Bezug zur Baseline (BL) angegeben, welche nach der *Study State* Phase erhoben wurde [siehe Kapitel 2.2.3]. Dies hat den Zweck, anfängliche Unterschiede zu korrigieren und die Ergebnisse ins Verhältnis zu setzen.

Die Durchflussmessungen der Gruppen ergaben mit einem p-Wert von 0,94 keinen signifikanten Unterschied [Tabelle 6]. Aufgrund dessen war kein weiterer Gruppenvergleich möglich.

Tabelle 6: Koronarfluss-Messung bei den 4 Versuchsgruppen (ml/min). Angegebene Werte als Mittelwert, berechnet nach ANOVA. Die Durchflussmessungen am Koronarbett unterschieden sich zwar, waren jedoch mit einem p-Wert von 0,94 statistisch nicht signifikant verschieden.

	Levo 24 h Ischemia	Levo 24 h Cardioplegia	Levo 24 h Perfusion	NaCl 2 h Perfusion	p-Wert
Koronarfluss (ml /min)	11,6 +/- 2,3	12,2 +/- 2,5	11,4 +/- 1,1	11,5 +/- 2,4	0,94

3.3.2 Versuchsspezifische Ergebnisse aus dem Langendorff-Modell

Vor der ischämischen Phase wiesen die Herzen, welche zuvor mit Levo behandelt wurden, einen besseren LVDP auf als jene, die mit NaCl behandelt worden waren (Levo 24 h Ischemia vs. NaCl 2 h: 151 ± 6 mmHg vs. 91 ± 31 mmHg, $p = 0,038$). Ebenfalls signifikant war der Unterschied der Relaxationsgeschwindigkeit im linken Ventrikel ($dLVP dt_{min}$) aller mit Levo behandelten Gruppen gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe ($p = 0,014$). Die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($dLVP dt_{max}$) wies jedoch keinen statistischen Unterschied auf [siehe Tabelle 7].

Ergebnisse

Tabelle 7: Baseline Parameter der Gruppen, erhoben aus dem Druckaufnehmer im Langendorff-Versuch. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler. Zunächst wurde der ANOVA-Test zur Detektion einer Signifikanz der Mittelwerte angewandt. Der Tukey post-hoc-Test wurde dann zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander verwendet. Signifikante Unterschiede erwiesen sich bei den Messungen des LVDP und des dLVP dt_{min}. (*) = LVDP-Signifikanz zwischen der Levo 24 h Ischemia und der NaCl 2 h Perfusion (p = 0,038). (**) = Signifikanz zwischen der Levo 24 h Ischemia und der NaCl 2 h Perfusion (p = 0,014).

	Levo 24 h Ischemia (n=3)	Levo 24 h Cardioplegia (n=6)	Levo 24 h Perfusion (n=3)	NaCl 2 h Perfusion (n=4)	p-Wert ANOVA- Test
LVDP (mmHg)	151 +/- 6	125 +/- 20	117 +/- 20	91 +/- 31	0.025*
dLVP dt _{max}	3640 +/- 261	3361 +/- 274	3197 +/- 1003	2699 +/- 1081	0.37
dLVP dt _{min}	-2882 +/- 210	-2415 +/- 423	-2109 +/- 299	-1648 +/- 757	0.035**

Weiterhin ist eine ähnliche Herzfrequenz (Hf) vor Eintritt des Herzstillstandes in den Levo Gruppen und der Kontrolle zu beobachten (194 ± 52 bpm vs. 215 ± 75 bpm bei $p = 0,33$).

Abbildung 8 zeigt das Verhalten des Druckes im linken Ventrikel zu verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Gruppen. Dabei ist der Baseline-Wert (BL) der durchschnittliche Eingangsdruck des linken Ventrikels vor Ischämie und wird als 100 % angegeben. Nach einer Ischämie und einer anschließenden 90-minütigen Reperfusion ist eine sichtliche Abnahme der kardialen Leistung in den Levo Gruppen mit Ischämie im Vergleich zur *Baseline* zu verzeichnen (Levo 24 h Ischemia LVDP 20 ± 5 % der BL und Levo 24 h Cardioplegia LVDP 12 ± 10 % der BL). Es kommt zu einem geringeren Druckaufbau, die ursprünglichen *Baseline*-Werte werden nicht mehr erreicht.

Nach Ende der Reperfusion fällt die Gruppe 2 mit der zusätzlichen kardioplegischen Lösung (Levo 24 h Cardioplegia) sichtlich am geringsten aus.

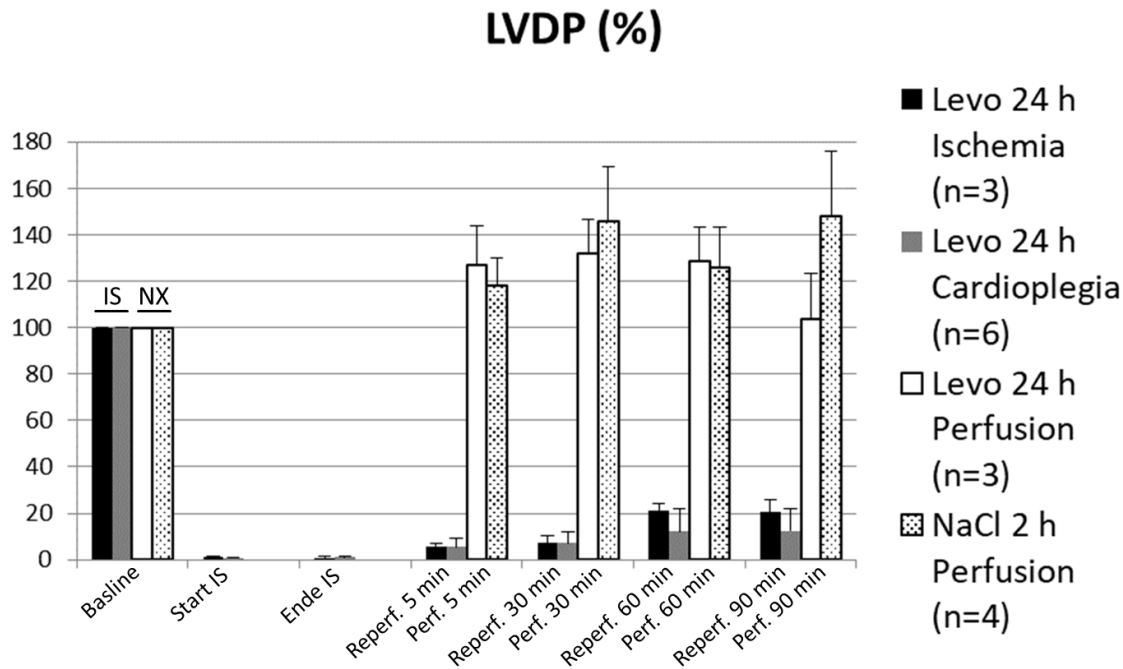


Abbildung 8: Linksventrikuläre Druckverhältnisse im Langendorff-Model. Angegeben jeweils als Mittelwert mit dem Standardfehler. Die *Baseline* (BL) spiegelt dabei den durchschnittlichen Druckwert vor Ischämiebeginn wider und wird mit 100 % angegeben. Die Levo 24 h Ischemia- und Levo 24 h Cardioplegia-Gruppe (IS – Ischämie-Protokoll) zeigen in der Reperfusionphase eine geringere Funktionserholung, wo hingegen die Gruppen Levo 24 h Perfusion und NaCl 2 h Perfusion (NX – Normoxie-Protokoll) über den BL-Druck hinausgingen. Sichtlich am geringsten fiel hier die Levosimendan-Gruppe mit zusätzlicher Kardioplegie aus (nach 90 min.= LVDP 12 ± 10 % der BL). Die Kontrollgruppe mit Natriumchlorid wies den höchsten LVDP mit 148 ± 28 % der BL auf.

In Tabelle 8 findet sich ein Überblick der Gruppenvergleiche. Die Levo 24 h Ischemia erfuhr eine Ischämie mit anschließender Reperfusionphase. Diese Gruppe wies im Vergleich zur normoxen NaCl 2 h Perfusion eine sehr geringere Druckentwicklung auf (148 ± 28 vs. 20 ± 5 , $p = 0,002$). Auch die Gruppe Levo 24 h Cardioplegia mit zusätzlicher kardioplegischer Lösung zeigte im Vergleich zur normoxen Kontrollgruppe (NaCl 2 h Perfusion) eine signifikant reduzierte Druckentwicklungen (148 ± 28 vs. 12 ± 9 , $p < 0,05$). Beim Vergleich der beiden ischämischen Gruppen (Levo 24 Ischemia und Levo 24 Cardioplegia) sind Unterschiede zu verzeichnen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichen (20 ± 5 vs. 12 ± 9 , $p = 0,986$). Die Gruppen NaCl 2 h Perfusion und Levo 24 h Perfusion unterschieden sich zwar im direkten Vergleich, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant (148 ± 28 vs. 104 ± 20 , $p = 0,367$).

Ergebnisse

Tabelle 8: Vergleich der einzelnen Gruppen im Langendorff-Modell. Der LVDP ist hier als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Zur p-Wert-Berechnung wurde der Post-hoc-Test verwendet, Voraussetzung war ein zuvor signifikanter ANOVA Test. Bei den Gruppen die einer Ischämiephase ausgesetzt waren, kam es zum signifikant geringeren Druckaufbau nach Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe (148 vs. 20, $p = 0,002$; 148 vs. 12, $p < 0,05$; 104 vs. 12, $p = 0,013$). Unterschiede in anderen Gruppenvergleichen konnten ebenfalls gezeigt werden, diese waren statistisch jedoch nicht signifikant.

Gruppenvergleich	LVDP nach 90 min Reperfusion	p-Wert
NaCl 2 h Perfusion vs. Levo 24 h Perfusion	148 ± 28 vs. 104 ± 20	0,376
NaCl 2 h Perfusion vs. Levo 24 h Ischemia	148 ± 28 vs. 20 ± 5	0,002
NaCl 2 h Perfusion vs. Levo 24 h Cardiople.	148 ± 28 vs. 12 ± 9	0,0003
Levo 24 h Perfusion vs. Levo 24 h Ischemia	104 ± 20 vs. 20 ± 5	0,0512
Levo 24 h Perfusion vs. Levo 24 h Cardiople.	104 ± 20 vs. 12 ± 9	0,013
Levo 24 h Ischemia vs. Levo 24 h Cardiople.	20 ± 5 vs. 12 ± 9	0,986

3.4 Die lastfreie Zellverkürzung

Bei der lastfreien Zellverkürzung der Kardiomyozyten konnten folgende Messparameter erfasst werden: Allgemeine Zellmorphologie, die durchschnittliche Längenänderung (dl/l) sowie die Länge der Myozyten in der Diastole.

Eine Zelle ($n=1$) wurde dabei insgesamt viermal im Abstand von 5 Sekunden gemessen. Für die aufgezeigten Ergebnisse, wurde das arithmetische Mittel dieser Messungen verwendet.

3.4.1 Zellmorphologie

Nachdem die Kardiomyozyten isoliert wurden, ist die Zellmorphologie visuell unter einem Lichtmikroskop begutachtet worden, um einen Eindruck des Isolationserfolges zu erhalten. Zellen, die für die Messung in Betracht gezogen wurden, hatten eine zylindrische Form, symmetrische Ränder und eine insgesamt regelmäßige und gute Zellverkürzung [siehe Abbildung 9]. Dabei waren mehr messbare Zellen pro Gesichtsfeld in der Kontrolle als in den Levo perfundierten Zellen (ca. 30 – 120 vs. 5 – 40 messbare Zellen)

[siehe Abbildung 10].

Eine spezifische Erfassung weiterer morphologischer Merkmale (bspw. der diastolischen Länge) erfolgte in der lastfreien Zellverkürzung.

Ergebnisse

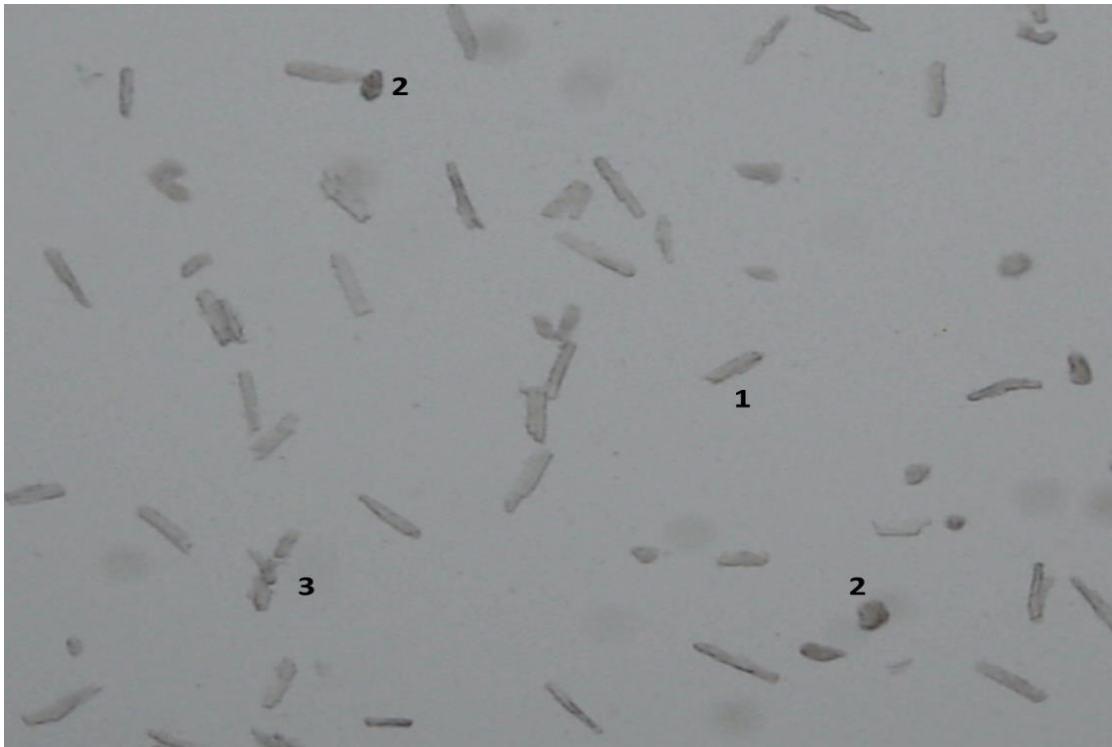
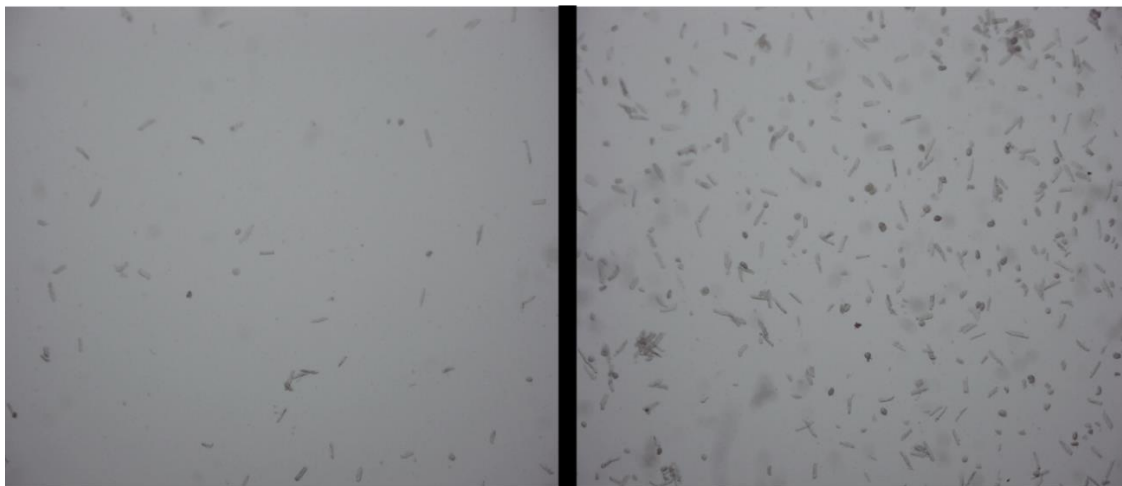


Abbildung 9: Visuelle Begutachtung der Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop. Gut isolierte und anhaftende Zellen haben eine zylindrische, symmetrische Form (1), die sich rhythmisch kontrahieren und insgesamt vital erscheinen. (2) zeigt das typische Bild eines hyperkontrahierten Kardiomyozyten. Der Stützapparat ist nicht mehr ausgebildet und die Zellform erscheint kugelförmig. Außerdem waren teils ungelöste Zellverbände in einigen Proben zu erkennen (3), die sich nicht adäquat in der zuvor vorgegeben Perfusionszeit der Kardiomyozytenisolierung getrennt haben.



Levosimendan

Kontrolle

Abbildung 10: Exemplarische lichtmikroskopische Bilder nach der Myozytenisolierung. Nach der Myozytenisolierung wurde der Erfolg über das Lichtmikroskop begutachtet. Zellen, die zuvor mit Levo perfundiert wurden, wiesen in der Regel eine geringere Ausbeute als die Kontrolle auf.

3.4.2 Längenänderung der Kardiomyozyten

Die Zellen, die zuvor aus post-ischämischen Herzen Levo behandelte Tiere isoliert wurden, zeigten eine geringere Längenänderungsdifferenz (Levo 24 h Ischemia: $5,46 \pm 2,04$ %; Levo 24 h Cardioplegia: $4,66 \pm 1,96$ %) im Vergleich zu den anderen Gruppen (Levo 24 h Perfusion: $9,45 \pm 2,32$ %; NaCl 2 h Perfusion: $8,03 \pm 2,04$ %). Dabei wies die Versuchsreihe Levo 24 h Cardioplegia die geringste Zellverkürzung mit einer Längenänderungsdifferenz von 4,66 % auf.

Die größte Längenänderungsdifferenz ergab sich bei der Levo 24 h Perfusion. Der Vergleich dieser Gruppe mit der NaCl 2 h Perfusion, ergab einen signifikanten Unterschied ($9,45 \pm 2,32$ % vs. $8,03 \pm 2,04$ %, $p < 0,005$). Ebenso der Vergleich der NaCl 2 h Perfusion mit der Levo 24 h Ischemia ($p < 0,005$) und der Levo 24 h Cardioplegia ($p < 0,005$). Die Levo 24 h Cardioplegia Gruppe wies eine geringere Längenänderungsdifferenz, als die Levo 24 h Ischemia auf, welche keine kardioplegische Lösung erhielt ($4,66 \pm 1,96$ % vs. $5,46 \pm 2,04$ %, $p < 0,005$) [siehe Abbildung 11].

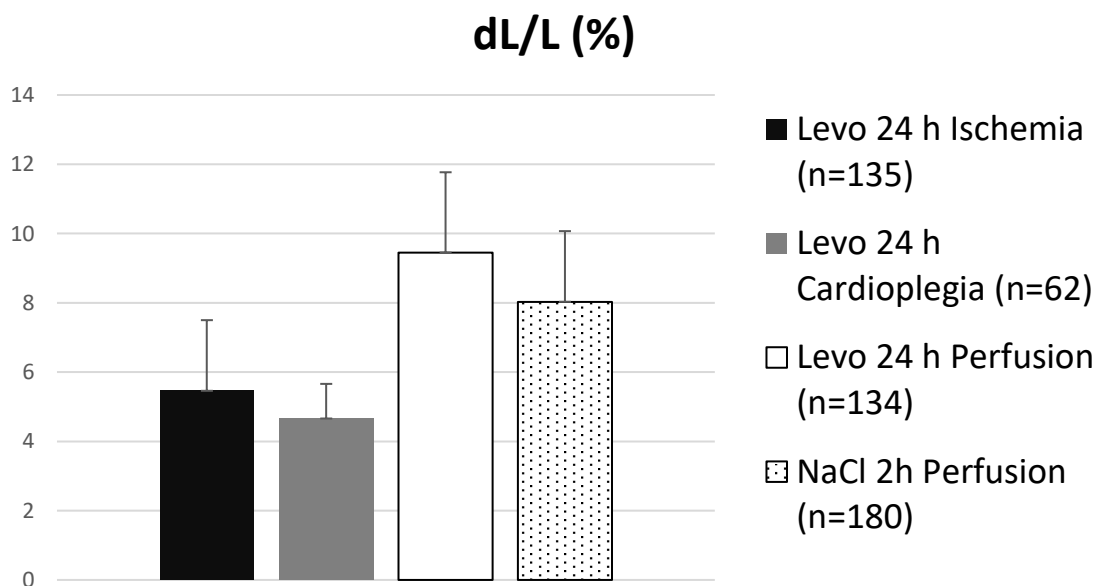


Abbildung 11: Durchschnittliche Längenänderung der Kardiomyozyten (in %). Angegeben als Mittelwert mit Standardfehler. Die höchste Längenänderungsdifferenz ergab sich bei der Levo 24 h Perfusion mit 9,45 %, welche signifikant höher war als die Kontroll-Gruppe NaCl 2 h Perfusion ($p < 0,005$). Die geringste Kontraktilität wies die Gruppe mit Ischämie und zusätzlicher Kardioplegie auf, bei durchschnittlichen 4,66 % Längenänderung. Gegenüber der Levo 24 h Ischemia-Gruppe, war die Levo 24 h Cardioplegia ebenfalls signifikant geringer ($4,66 \pm 1,96$ vs. $5,46 \pm 2,04$, $p < 0,005$).

3.4.3 Länge der Zellen

Bei der Kontraktionsmessung war es möglich, die Zelllänge in der diastolischen Phase zu erfassen. Das Resultat ist in Abbildung 12 dargestellt.

Dabei ist zu erkennen, dass sowohl die Zellen der ischämischen als auch der normoxen Levo-Gruppen insgesamt kürzer waren als die der NaCl 2 h Perfusion mit $111 \pm 16 \mu\text{m}$ ($p < 0,005$). Die kürzesten Zellen wurden bei der Levo 24 h Ischemia-Gruppe mit einer durchschnittlichen Länge von $93 \pm 18 \mu\text{m}$ beobachtet.

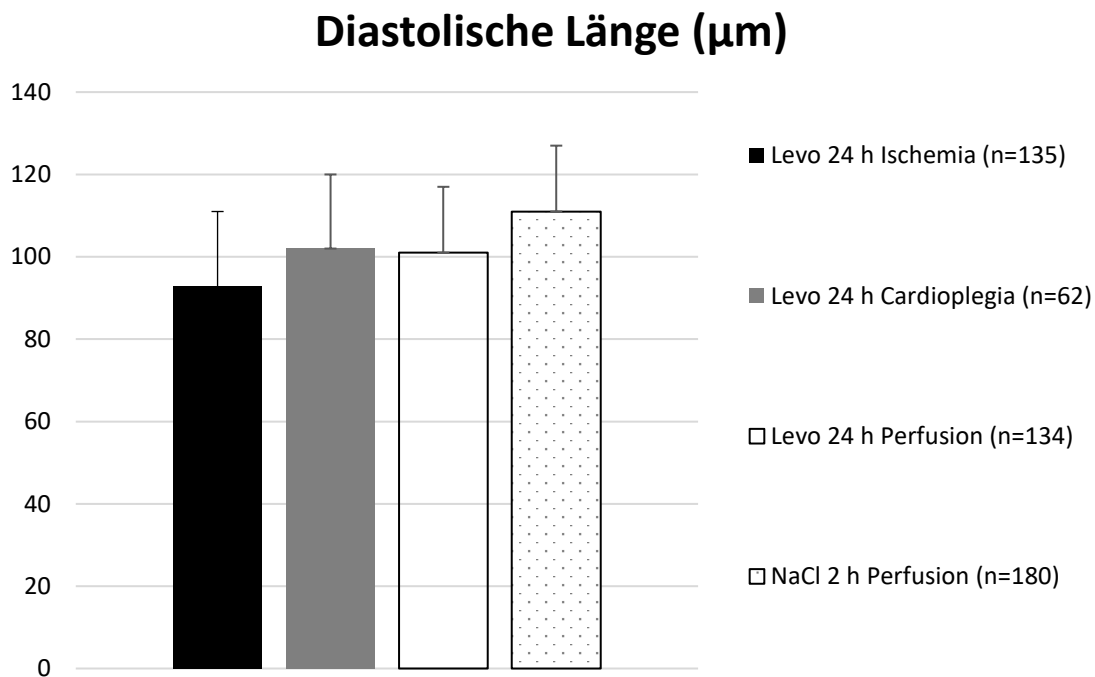


Abbildung 12: Diastolische Länge der Kardiomyozyten (in μm). Angegeben als Mittelwert mit Standardfehler. Alle Zelle der Individuen, die zuvor Levo erhielten, wiesen eine geringere Länge im Vergleich zur NaCl 2 h Perfusion-Kontrolle auf ($p < 0,005$).

3.5 Proteindetektion

Im Folgenden werden die Expressionen von Proteinen untersucht, die am Calcium-Stoffwechsel beteiligt sind. Die Detektion erfolgte mittels Western Blotting [vgl. Kapitel 2.2.6] aller 6 Gruppen.

Insgesamt 3 Proteine wurden bei dem Verfahren detektiert: *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase Isotype 2a* (SERCA2a), Natrium/Kalium-Austauscher (NCX) sowieso die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Abbildung 13 zeigt den Nachweis der jeweiligen Proteinbanden, aufgeteilt nach dem Inhalt der implantierten Pumpe. Es ist zu erkennen, dass die GAPDH und die NCX in allen Versuchsgruppen ähnlich stark exprimiert worden war. Die Levo Zellen wiesen jedoch eine wesentlich schwächere Ausprägung des SERCA2a Proteins auf.

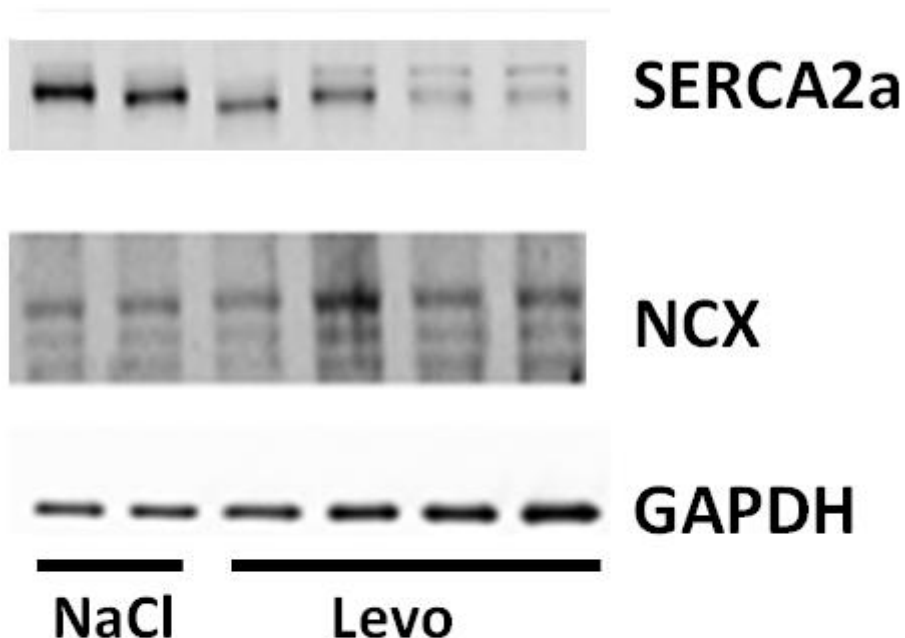


Abbildung 13: Nachweis der Proteinbanden von SERCA2a und NCX mittels Western Blot. Die mit Levosimendan behandelten Gruppen wiesen schwächere SERCA2a Banden auf als die NaCl-Kontrolle.

Ergebnisse

Um die Unterschiede der Proteinbanden in den jeweiligen Gruppen genauer zu evaluieren, wurden diese gegenübergestellt [Abbildung 14]. Für die Auswertung wurden die Gruppen auf eine Levosimendan und NaCl zusammengefasst. Die SERCA2a- und NCX Banden wurden densitometrisch ausgewertet und auf die absoluten Signalintensitäten von GAPDH normiert. Der Quotient aus SERCA2a und GAPDH ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,02$) mit $1,08 \pm 0,18$ der Levo Gruppen und $0,35 \pm 0,21$ in NaCl Gruppe.

Bei der Gegenüberstellung der NCX der Levo Gruppen und der NaCl Gruppe war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen (Levo: $7,37 \pm 2,85$ vs. NaCl: $5,93 \pm 0,38$, mit $p = 0,55$).

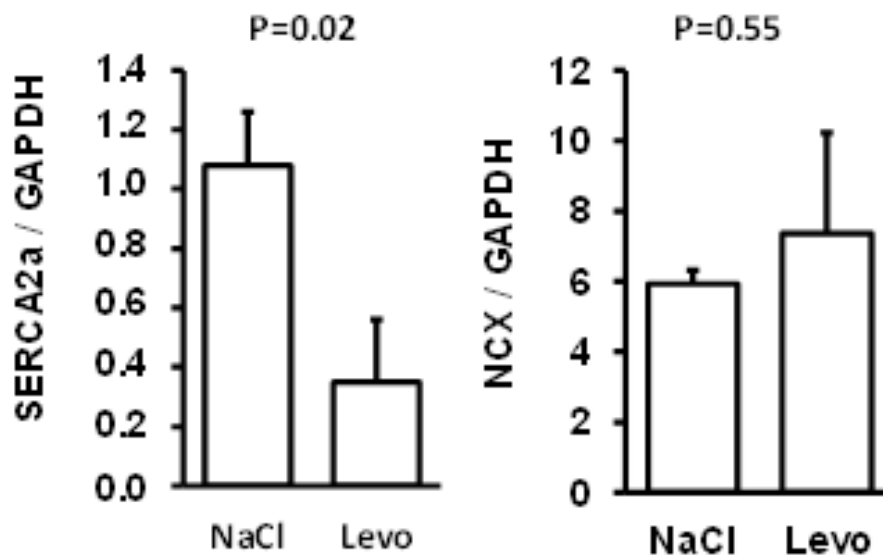


Abbildung 14: Ausprägung der SERCA2a und der NCX gegenüber der NaCl und der Levo infundierten Zellen. Die Levosimendan- und NaCl Gruppen wurden hier zusammengefasst und die Banden densitometrisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede ergaben sich bei der SERCA2a Nachweis ($1,08 \pm 0,18$ vs. $0,35 \pm 0,21$, $p = 0,02$).

3.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte randomisiert in den einzelnen Gruppen. Dabei wurde je 1 Individuum jeder Gruppe untersucht. Die Zellen wurden morphologisch begutachtet [Abbildung 15], außerdem konnte der CEI bestimmt werden [vgl. Kapitel 2.2.7]. Diese Daten geben Hinweise auf das Ausmaß des zellulären Schadens.

Ergebnisse

Den stärksten zellulären Ödemindex wiesen die Gruppen Levo 24 h Ischemia und Levo 2 h Cardioplegia mit einem CEI von 0,99 und 0,95 auf. Bei der Versuchsreihe mit Levo ohne eine ischämische Phase im Langendorff-Model ergab sich ein Wert von 0,62. Der geringste CEI war bei der NaCl Kontrolle mit 0,41 zu verzeichnen [Tabelle 9].

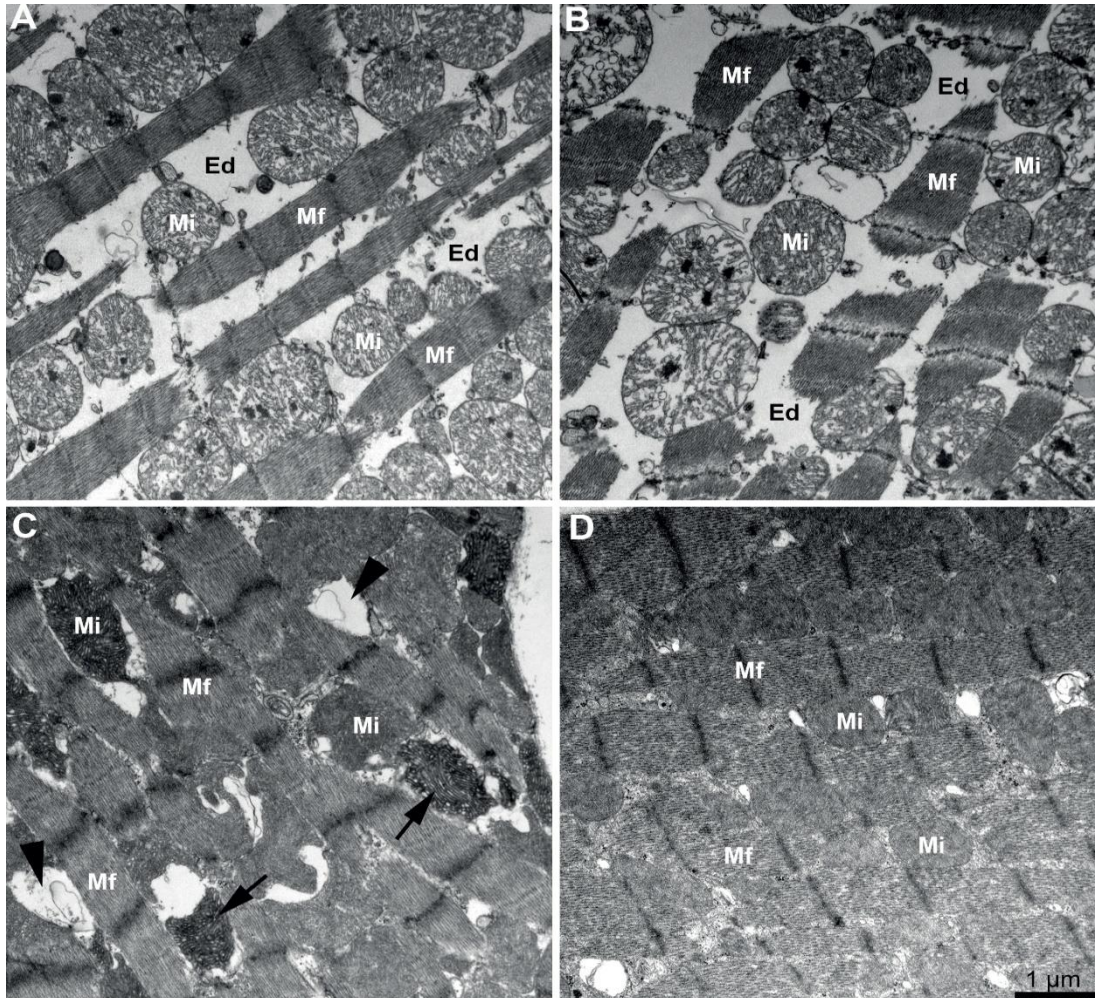


Abbildung 15: Elektronenmikroskopisches Bild aus dem linken Ventrikel (1:20.000). (A) Levo 24 h Ischemia, (B) Levo 24 h Cardioplegia, (C) Levo 24 h Perfusion, (D) NaCl 2h Perfusion, (Ed) intrazelluläres Ödem, (Mi) Mitochondrien, (Mf) Myofibrillen, (Pfeilspitze) beginnendes Ödem, (Pfeil) geschädigtes Mitochondrium.

Ergebnisse

Tabelle 9: *Ermittelter zellulärer Ödemindex (CEI) der Gruppen.* Aus jeder Gruppe wurde je 1 Individuum zur Bestimmung des CEI herangezogen (n=1). Den höchsten CEI wies die Gruppe „Levo 24 h Ischemia“ mit 0,99 und den geringsten die NaCl 2 h Gruppe mit 0,41 auf.

Gruppe	Zellulärer Ödemindex (CEI)
Levo 24 h Ischemia	0,99
Levo 24 h Cardioplegia	0,88
Levo 24 h Perfusion	0,62
NaCl 2 h Perfusion	0,41

4 Diskussion

4.1 Entwicklung der Fragestellung

Insgesamt ist der Nutzen von Levosimendan in der Herzchirurgie nicht ausreichend belegt. Die klinische Studie von Grieshaber et al. (24) zeigte keinen Unterschied bei der 30 Tage- und der Langzeitmortalität bei der Anwendung von Levo postoperativ. Vielmehr kam es bei retrospektiver Betrachtung zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Vorhofflimmern und einer stärkeren Ausschüttung von Herzenzymen. Dies gab den Anlass, den Stoffwechsel und die Funktion der Kardiomyozyten nach Levo-Applikation näher zu beleuchten.

Die Ergebnisse von Grieshaber et al. stehen teilweise im Widerspruch zu anderen klinischen Studien, die einen positiven Effekt von Levo postoperativ verzeichnen konnten [vgl. Kapitel 1.3] (47,49,85).

In tierexperimentellen Studien wird Levo oftmals nicht an die klinische Realität angepasst. So existieren Untersuchungen, die nicht 24 h vor der Operation das Medikament applizieren, sondern direkt während der Ischämie oder kurz davor (18,41). Andere Studien sind so designt, dass Levo auf anderem Wege appliziert wird z.B. intraperitoneal oder inhalativ (10,38). Dies gab zum Anlass, Untersuchungen zu starten, die nah an der Klinik orientiert sind und folgenden zentralen Sachverhalt beleuchten: Die Auswirkung von Levo auf die Herzfunktion nach 24 h Verabreichung und anschließendem Ischämie-/Reperfusionsschaden, der mit Kardioplegie gemindert wird. Dabei sollte der Fokus der Studie auf der Betrachtung sowohl des gesamten Herzens als auch der isolierten Zellen liegen. Ischämie- und Reperfusionsschaden beeinflussen die Infarktgröße und damit die Anzahl der überlebenden Myozyten, sowie auch deren Funktion und Metabolismus (1,68,87).

Daher wurde zum einen die kardiale Funktion der noch intakten Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion analysiert und zum anderen die Auswirkung von Levo auf die Zellen untersucht.

4.2 Kardiale Funktion und lastfreie Zellverkürzung

In den Untersuchungen wurde gezeigt, dass es zu signifikant höheren Druckentwicklungen unter der Anwendung von Levo vor Ischämie/Reperfusion kommt. So zeigte das Langendorff-Modell, dass die Levo 24 h Ischemia Gruppe vor der Ischämie, in der *Baseline*, einen signifikant höheren LVDP und $dLVP_{min}$ aufbaut als die Kontrolle mit NaCl. Bei der nachfolgenden Kardiomyozytenisolation und der isotonischen Zellkontraktion erwies die Levo 24 h Perfusion-Gruppe einen um das ca. 1,8-fach erhöhten dI/I - Wert ohne Ischämie/Reperfusionsphase.

Somit konnte eine positive Wirkung auf die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten durch den Calcium-Sensitizer Levo nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Literatur mit zahlreichen Studien (20,27,64,77,81). Dass dieser Effekt auf dem Medikament beruht, wurde durch die Plasmaanalysen von Levo und seinem Metaboliten OR-1896 gezeigt. Daher unterstreichen die Ergebnisse zunächst den Erfolg des verwendeten Behandlungsschemas der Studie.

Die erhöhte Druckentwicklung war jedoch ausschließlich vor der Ischämie bzw. bei der Gruppe ohne Ischämie zu beobachten, obwohl eine ausreichende Menge des Medikamentes oder des Metaboliten OR-1896 im Blutplasma der Versuchstiere nachweisbar war. Die *in vivo* Applikation von Levo 24 h vor der Ischämie *ex vivo* perfundierten Herzen führte zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Funktion während der 90-minütigen Reperfusion. Das Vorhandensein einer kardioplegischen Lösung könnte darüber hinaus die Funktionserholung des post-ischämischen Myokards nochmal reduzieren. So erholte sich die Gruppe mit der Kardioplegie sowohl bei der kardialen Leistung als auch bei isolierten Zellmessung am geringsten. Es zeigte sich bei dem Langendorff-Modell eine Verringerung der LVDP der Levo 24 h Cardioplegia Reihe um etwa 88 % gegenüber der *Baseline* und in der isotonischen Zellkontraktionsmessung um etwa 42 % gegenüber der NaCl-Gruppe. Die genaue Wechselwirkung von Levosimendan mit der Bretschneiderlösung nach kardiochirurgischen Eingriffen ist in der Literatur nicht ausreichend verstanden. Grossini et al. verglichen den Ischämie-/Reperfusionsschaden von Schweinenieren unter Levosimendan, der Bretschneiderlösung und in Kombination. Es wurde in all den genannten Gruppen eine antioxidative, antiapoptotische und überlebensfördernde Wirkungen nachgewiesen, wobei die Kombination die Schutzwirkung weiter zu verstärken scheint (25). Der Aufbau

dieser Studie war jedoch nicht mit der klinischen Realität oder dem hier durchgeführten Projekt zu vergleichen. So wurde in dieser Arbeit Levo kurz vor der Ischämie und an lebenden Individuen gegeben, ohne die Kardiomyozyten zu isolieren. Die Untersuchungen beschränken sich hierbei ausschließlich auf die Niere.

Es ist bekannt, dass die Bretschneider-Lösung nach kardiochirurgischen Eingriffen Störungen in mehreren Stoffwechselwegen hervorruft, wie z.B. im Histidin-, Glutamin- oder Purinstoffwechsel (46). Eine bisher nicht erfasste Interaktion zwischen Levo und der Bretschneiderlösung oder deren Metaboliten wäre denkbar.

Die Ergebnisse der kardialen Funktionsparameter stehen im Kontrast zu vielen anderen Studien, die keinen negativen Effekt von Levo auf die Erholung nach Ischämie/Reperfusion in Tierversuchen zeigten (5,18,48). In einem ähnlichen Experiment haben Sommer et al. jedoch herausgestellt, dass es unter Levo zu einer Einschränkung der Atmungskette der Mitochondrien in Rattenherzen kommt. Dadurch kommt es zu einer reduzierten ATP-Synthese während der Ischämie/Reperfusion und einer vermehrten Zellschädigung (76). Es wurde hier ebenfalls eine mitochondriale Schädigung mit Erhöhung des zellulären Ödemindex festgestellt. Die dargestellten Ergebnisse unserer Experimente könnten damit erklärt werden.

Ebenfalls im Widerspruch zur Literatur stehen die Ergebnisse des Koronarflusses und der Herzfrequenz (29,37,57,75). So beobachteten wir in der vorliegenden Arbeit keinen Anstieg der HF und auch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Koronardurchblutung der Levo Gruppen und der Kontrollgruppe. Die unterschiedlichen Erkenntnisse könnten dabei auf die Infusionszeit von Levo zurückzuführen sein. In unserer Studie wurde, im Gegensatz zu den anderen Studien, das Medikament 24 h vor der Ischämie i.v. gegeben, um die klinische Realität zu simulieren. So wäre es denkbar, dass in dem vorliegenden Projekt geringere Levo Spiegel und höhere OR-1896-Spiegel erreicht wurden. Untersuchungen aus anderen Forschungsgruppen evaluierten nicht den erreichten Levo oder OR-1896-Plasmaspiegel, um den Applikationserfolg zu bestätigen. Das kurzwirksame Levo, welches hauptsächlich calciumsensibilisierend wirkt, war demnach vermutlich in höherer Konzentration vorhanden als sein Metabolit, der durch die Hemmung der Phosphodiesterase seine Wirkung entfaltet. Für den inotropen bzw. lusitropen Effekt von Levo und seiner Metaboliten spielt wahrscheinlich die Calciumsensibilisierung eine untergeordnete Rolle (17,61). Wenn Levo 24 h vor der

Operation verabreicht wird, geht die direkte Wirkung der Calcium-Sensibilisierung verloren. Der Levo Spiegel sinkt, während gleichzeitig die Phosphodiesterasehemmung durch OR-1896 überwiegt. Unsere Plasmaanalysen bestätigen dies: Während der Metabolit nach 2 h nicht nachweisbar war, überwog dieser bei den Individuen nach 24 h. Die positiven Wirkungen von Levo wurden meistens nur in Tierversuchen beobachtet, in denen das Medikament während oder nach der Ischämie verabreicht wurde. Dies könnte der Grund sein, wieso die hier vorliegenden Ergebnisse vergleichsweise schlecht ausfallen. Mit der Gruppe 4, welcher Levo über 2 h verabreicht wurde, sollte der Vergleich der Applikationsdauer erfolgen. Hier zeigte sich jedoch kein verwertbarer Druckaufbau im Langendorff-Versuch. Dieser Sachverhalt unterstreicht weiter die Wichtigkeit einer ausreichenden Wirkdauer.

4.3 Zellstoffwechsel unter der Anwendung von Levosimendan

Bevor die Zellkontraktionsmessung und die biochemischen Untersuchungen an isolierten Zellen stattfanden, wurde der Erfolg der Myozytenisolation unter dem Lichtmikroskop beurteilt (Kapitel 3.4.1). Dabei ergaben sich sichtbare Unterschiede zwischen den mit Levo infundierten Zellen und denen aus der Kontrolle. Da in der NaCl-Gruppe die Zellzahl morphologisch höher war als bei den anderen Gruppen, könnte die geringere Ausbeute der Levo Gruppen nach der Myozytenisolation auf einen hohen Schädigungsgrad hinweisen (59). Je mehr Zellen pro Gesichtsfeld vorhanden waren, desto besser war das Herz intakt: Ist die Zellmembran nicht mehr funktionsfähig, haften diese nicht auf dem FCS-benetzten Boden der Falcon Schälchen, so dass die geschädigten Zellen dann beim Auswaschen und Absaugen entfernt werden.

Das Ausmaß der Schädigung, welche über den CEI detektiert wurde, wiesen eine ähnliche Tendenz auf (Kapitel 3.6). Herzzellen die zuvor Levo erhielten, zeigen einen höheren Ödemindex als solche ohne Levo oder mit Ischämie. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigten sich bei der Gruppe Levo 24 h Cardioplegia und der Gruppe Levo 24 Perfusion Anzeichen von Zelluntergang mit geschädigten Mitochondrien und beginnenden Ödemen. Diese Beobachtungen ergänzen die Ergebnisse der kardialen

Diskussion

Funktionen in dem Langendorff-Modell und die Ergebnisse der isolierten Zellkontraktionsmessung.

Auffälligkeiten wurden ebenfalls in dem Calciumstoffwechsel der mit Levo behandelten Herzzellen detektiert (Kapitel 3.5). Die biochemische Analyse ergab eine geringere SERCA2a Expression bei gleichbleibender Konzentration von NCX bei den mit Levo behandelten Rattenherzen.

Diese Proteine sind maßgeblich an der Calciumhomöostase beteiligt. So wird die Beendigung der Herzkontraktion durch das Entfernen des Calciums intrazellulär erreicht. Die SERCA pumpt dazu 2 Ca^{2+} -Ionen pro ATP gegen einen hohen Gradienten (zwischen 1 mM im SR und 100 nM im Zytosol) (8,19) vom Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum. Unterstützend wirkt der Natrium-Calcium Austauscher und befördert Calcium nach extra- und Natrium nach intrazellulär (6,34).

Die Calciumfüllmenge ist entscheidend für die Herzfunktion. So erhöht eine hohe SR-Beladung die Menge an freigesetztem Calcium, die direkt während der Kontraktion zur Verfügung steht (7). Dadurch kann das Herz-Zeit-Volumen steigen, jedoch besteht dabei ebenfalls das Risiko für Extrasystolen, Bigeminie, Kammerflimmern und damit die Gefahr von Herzversagen (21,88).

Die geringere SR-Füllung hat gegenteiligen Effekt. Dabei kommt es zu einer geringeren Freisetzung von Ca^{2+} in der Systole und damit zur Einschränkung der Kontraktilität (9). Wenn bei Mäusen das SERCA-Gen ausgeschaltet wird, führt dies ebenfalls zu geringerer SR-Füllung und schließlich zur verminderten Relaxation und Kontraktion des Myokards (32,63,78). Erste therapeutische Maßnahmen zur Veränderung der SERCA-Konzentration beim Vorliegen einer Herzinsuffizienz werden bereits diskutiert (69,91,92).

In dieser Arbeit wurde eine geringere SERCA2a-Konzentration in allen Levo-Gruppen beobachtet. Eine Reduzierung der SERCA2a beeinträchtigt die Calciumfüllung des sarkoplasmatische Retikulum und damit einhergehend die Kontraktilität des Myokards (63). Dies wird durch die Ergebnisse der kardialen Funktionen bestätigt. Auch die Zellen, die mit Levosimendan behandelt wurden wiesen eine geringere Zelllänge in der Diastole auf als die NaCl-Gruppe. Wenn die SERCA-Expression reduziert ist, kommt es durch die geringere Calcium-Füllung im SR zur unvollständigen Relaxation (62). Dadurch kann die geringere Länge der mit Levo behandelten Zellen in der Diastole erklärt werden.

Diskussion

In Kontrast dazu steht die Arbeit von Hillestad et al. aus dem Jahr 2013. Die dortigen Untersuchungen zeigen, dass Levo bei SERCA- Knockout-Mäusen die Herzfunktion verbessert (32). Die in dieser Studie verwendeten Versuchstiere wurden jedoch keiner vorherigen Ischämie/Reperfusion unterzogen.

Die Expression und Aktivität der SERCA ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So führen z.B. eine Ischämie mit anschließender Reperfusion oder das Vorliegen einer Herzinsuffizienz zu einer Herabregulation (74,79). Es wäre demnach denkbar, dass hier Faktoren wie die präoperative Gabe von Levo oder die Ischämie selbst zur Veränderung der SERCA geführt haben.

4.4 Schlussfolgerung dieser Arbeit

Die im Fokus stehenden Fragestellungen dieser Arbeit können wie folgt beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst Levosimendan die kardiale Schädigung und die Kontraktilität des isolierten Rattenherzens nach Ischämie/Reperfusion?

Bei der Anwendung von Levosimendan kommt es zu vermehrter Ödembildung und damit zu einer Zellschädigung insbesondere nach einer Ischämie/Reperfusion.

Während unter physiologischen, nicht ischämischen Bedingungen die Kontraktilität des Herzens zunimmt, zeigt sich bei Ischämie und Reperfusion eine starke Abnahme der Kontraktionsfähigkeit.

2. Welchen Einfluss hat die kardioplegische Lösung nach Bretschneider bei der präischämischen Gabe von Levosimendan?

Die Erholung der Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion ist unter dem Einfluss von Levosimendan in Kombination mit der kardioplegischen Lösung nach Bretschneider am geringsten ausgefallen. Die Lösung nach Bretschneider könnte den Myokardschaden somit weiter verstärkt haben.

3. Wie sollte der Zeitpunkt der Applikation von Levosimendan gewählt werden?

Nach einer Applikationsdauer von 2 Stunden mit Levosimendan waren keine messbaren kardialen Funktionen im Langendorff-Apparat bei Reperfusion zu verzeichnen. Der relevante Metabolit OR-1896 war zudem nicht nachweisbar.

Wählt man jedoch eine Infusionsdauer von 24 Stunden vor der Ischämie, zeigen die Kardiomyozyten einen Druckaufbau in der Reperfusionsphase. Außerdem ist hier der Metabolit nachweisbar. Somit sollte eine frühzeitige Applikation mit Levosimendan vor Ischämie/Reperfusion erfolgen.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass Levo unter normoxen Bedingungen einen positiven Effekt auf die Kontraktionsfähigkeit des

Diskussion

Myokards ausübt und als kurzfristige herzunterstützende Maßnahme sinnvoll sein kann. Die Funktionserholung post-ischämischer Herzen war jedoch nach vorheriger Applikation von Levo beträchtlich reduziert.

Die Untersuchungen dieser Arbeit weisen weiter darauf hin, dass Levosimendan nicht zu der gewünschten Verbesserung der Herzleistung nach Herzoperationen beiträgt und somit die präoperative Applikation nicht klar indiziert ist. Insbesondere nach Applikation der kardioplegischen Bretschneider-Lösung, die im klinischen Setting weit verbreitet ist (54), konnte post-ischämisch nur eine deutlich eingeschränkte Funktion registriert werden.

4.5 Limitationen

Obwohl ursprünglich 8 Herzen für jede Versuchsgruppe geplant waren, ergaben sich aus verschiedenen Gründen eine geringere verwertbare Anzahl.

Bei vielen präparierten Herzen erwies es sich als schwierig, eine aussagekräftige Funktion während der Langendorff-Perfusion zu erzielen. So wurde die Gruppe 4 (Levo 2 h Cardioplegia) und die Gruppe 6 (NaCl 2 h Ischemia) aus der Wertung der kardialen Funktionsprüfung ausgeschlossen, da diese nach der ischämischen Phase keinen Druck mehr aufbauen konnten und somit die Werte unterhalb der Messbarkeitsgrenze waren.

Ebenfalls ist Kammerflimmern bei 2 Herzen in jeder Gruppe während der ersten 30 min in der Stabilisationsphase („*Steady State*“) beobachtet worden. Die Kontrollgruppe war davon ebenfalls betroffen. Auch hier konnten keine aussagekräftigen Messungen erfolgen. Der pathologische Befund (Institut für Veterinär-Pathologie, Gießen) dieser Herzen ergab Myokardnarben, die möglicherweise die Herzrhythmusstörungen verursacht haben. Weiter wurden histologisch und morphologisch Peyersche Platten im Dünndarmepithel gefunden, wobei eine parasitäre Infektion ausgeschlossen wurde.

Auch der Eingriff (Implantation der Alzet-Pumpe) stellt möglicherweise einen Störfaktor aufgrund der verwendeten Anästhesie und der inflammatorischen Reaktionen dar. So musste ein weiteres Tier, das sich die Pumpe durch Manipulation am Eingriffsort freigelegt hatte, aufgrund der präspezifizierten Abbruchkriterien vorzeitig euthanasiert werden. Hier ergab die veterinär-pathologische Untersuchung eine entzündliche Veränderung im Operationsbereich der Pumpe mit Nachweis von *E. coli* und Streptokokken.

Zur weiteren Reduzierung von Komplikationen, wechselten wir ebenfalls die Narkose von Ketamin und Medetomidin auf Isofluran sowie die Analgesie von Buprenorphin auf Fentanyl, da Anästhetika Einfluss nehmen können auf mögliche pharmakologische Kardioprotektion (13). Die Rate der Herzen mit Kammerflimmern während der Messung im Langendorff-Modell reduzierte sich allerdings nicht.

Der Zeitpunkt der Euthanasie könnte ebenfalls entscheidend für die Untersuchungsergebnisse sein. Demnach wäre es denkbar, dass die Labortiere eine längere Erholung nach der Implantation der Minipumpe brauchen als die angesetzten 2- oder 24 Stunden.

Diskussion

Weiterhin wäre es möglich, dass die angewendete kardioplegische Lösung nach Bretschneider eine Wechselwirkung mit Levo eingeht oder das Medikament dadurch ausgewaschen wird. Es konnte der Erfolg der Applikation an den Versuchstieren mittels Plasmaanalysen bestätigt werden, jedoch wurde das Perfusat nicht nach der Reperfusion evaluiert.

Die Übertragbarkeit auf die klinische Praxis kann hier ebenfalls nicht sichergestellt werden, da Tierversuche nicht direkt mit Humanoiden verglichen werden können.

4.6 Ausblick

Derzeit gibt es keine Studie, in der die Wirkung von Levosimendan in einem vergleichbaren Versuchsaufbau untersucht wurde. Einige andere Studien stehen in Diskrepanz zu diesen Ergebnissen, was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen unterstreicht.

Wie in Kapitel 4.1 erläutert, ist dies die erste Studie, die Levo 24 h vor Ischämie appliziert, das gesamte Herz als auch die isolierten Kardiomyozyten betrachtet und dabei die Metaboliten im Blutplasma analysiert hat. Daher wäre es sinnvoll, weitere Studien mit gleichen oder ähnlichen Verfahren durchzuführen, um diese miteinander vergleichen zu können und insgesamt eine höhere Anzahl an Versuchstieren zu erhalten.

Weiterhin könnten die in Kapitel 4.5 „Limitationen“ genannten Punkte angegangen werden. Es wäre denkbar, diese Studie erneut durchzuführen und die Applikationsart zu ändern, z.B. auf oral oder intraperitoneal. So könnten Störfaktoren der Operation vermieden und das Vorkommen von Kammerflimmern besser bewertet werden.

Die Hypothese, dass die Kardioplegie nach Bretschneider Levo oder seine Metaboliten möglicherweise auswäscht, könnte noch weiter untermauert werden.

Obwohl Levo schon früh auf dem europäischen Markt zur Verfügung stand, müssen die genauen Indikationen und Kontraindikationen noch bestimmt werden. Alles in Allem ist die Anwendung von Levo in der Herzchirurgie nach wie vor uneindeutig. Es werden insgesamt mehr Arbeiten benötigt, um den Stellenwert einer präoperativen Levo-Applikation bei herzchirurgischen Patienten zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Deutsch

Hintergrund: Während die Indikation von Levosimendan (Levo) bei der akuten dekompensierten schweren Herzinsuffizienz gegeben ist, ist die aktuelle Studienlage bei der Anwendung in der Herzchirurgie umstritten. Viele groß angelegte Studien detektieren keinen Vorteil bei der präoperativen Gabe von Levo, besonders in den harten Endpunkten wie z.B. das Langzeitüberleben (43,52). Grieshaber et al. zeigte vielmehr, dass es zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern kommt (24).

Es gibt jedoch Arbeitsgruppen, die durchaus zu einem Vorteil in der Verwendung von Levo vor Operationen gelangen (15,72,80).

Um die Anwendung von Levosimendan (Levo) in der Herzchirurgie näher zu beleuchten, stellt diese Arbeit Untersuchungen an Versuchstieren dar, die nahe an der Anwendung im klinischen Alltag orientiert sind.

Materialien und Methoden: In 36 männlichen Wistar-Ratten wurde eine subkutane Minipumpe implantiert, welche Levo oder NaCl für 2- bzw. 24 Stunden intravenös applizierte. Um die Herzfunktion zu beurteilen, wurden die Herzen anschließend in Langendorff-Technik mit und ohne kardioplegischer Lösung nach Bretschneider perfundiert. Anschließend erfolgte eine Ischämie von 45 oder 90 Minuten. Die Reperfusionzeit betrug immer 90 min. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine 90-min Reperfusion. Während der Perfusion wurden dabei verschiedene Herzparameter gemessen.

Anschließend erfolgte eine Myozytenisolation mit Zellkontraktionsmessung und Proteinanalyse oder die Kryokonservierung zur Bestimmung des Ödemindex.

Ergebnisse: Um den Erfolg der Applikation darzustellen, wurde Levosimendan und sein relevanter Metabolit OR 1896 im Blutplasma analysiert.

Die prä-ischämischen Druckmessungen im Langendorff-Apparat ergaben einen signifikant höheren Wert bei den Levo Gruppen im Vergleich zur NaCl-Kontrolle (Levo 24 h Ischemia vs. NaCl 2 h: 151 ± 6 mmHg vs. 91 ± 31 mmHg, $p = 0,038$) sowie eine ähnliche Herzfrequenz (194 ± 52 bpm vs. 215 ± 75 bpm bei $p = 0,33$).

Zusammenfassung

Nach einer 45- bzw. 90-minütigen Ischämie wiesen die Herzen aus Levosimendan-behandelten Tieren in der Reperfusion nur eine geringe Funktionserholung auf. Am schlechtesten erholte sich die Gruppe mit Levo und zusätzlicher kardioplegischer Lösung (Levo 24 h Cardioplegia vs. NaCl 2 h Perfusion: 12 ± 9 % der BL vs. 148 ± 28 % der BL, $p < 0,05$). Die Gruppe mit 2-stündiger Infusionsdauer von Levosimendan konnte keine messbaren Druckparameter nach der Ischämie aufbauen.

Auch in der Zellkontraktionsmessung wiesen isolierte Kardiomyozyten aus den Herzen Levosimendan-behandelter Ratten nach Ischämie/Reperfusion eine signifikant reduzierte Zellverkürzung auf ($5,46 \pm 2,04$ % vs. $8,03 \pm 2,04$ %, $p < 0,005$). Im Myokard ließ sich nach Applikation von Levosimendan zudem ein hoher Ödemindex feststellen. Darüber hinaus waren die isolierten Herzmuskelzellen sämtlicher Levosimendan-Behandlungsgruppen kürzer als die Zellen der NaCl Gruppe und wiesen eine signifikant reduzierte Expression der SERCA2a auf ($p = 0,02$).

Schlussfolgerung: Levosimendan erhöht die Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten ohne Ischämie/Reperfusion. Wird Levosimendan 24 h vor einer Ischämie/Reperfusion gegeben, erholen sich die Kardiomyozyten nach der Reperfusion schlechter als die der NaCl Kontrolle, besonders bei Anwesenheit von kardioplegischer Lösung. Außerdem resultiert eine geringere Konzentration der SERCA2a unter Anwendung des Medikaments.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass Levosimendan, gegeben 24 Stunden vor herzchirurgischen Eingriffen, die postoperative Herzfunktion nicht verbessern kann.

Englisch

Background: While the indication of Levosimendan (Levo) for acute decompensated heart failure is evident, the application in cardiac surgery remains scientifically unclear.

Several large multi-central studies revealed no benefit for the preoperative infusion of Levo, especially at the regarding endpoints like long-term survival (43,52).

Rather, Grieshaber et al. demonstrated an increasing rate of atrial fibrillation (24).

Besides, there are also working groups who detected benefits by using Levosimendan preoperative (15,72,80).

The aim was to investigate Levo on experimental animals which are close to the clinical situation in order to provide for further explanation of using Levo in the cardiac surgery.

Materials and Methods: A mini-pump was implanted subcutaneously in 36 rats. The pump was filled with Levosimendan or NaCl (Control) with an application time of 24- or 2 hours. In order to assess cardiac function, the hearts were perfused using the Langendorff-technique with and without Bretschneider cardioplegia. This was followed by an ischemia of 45 or 90 minutes. The reperfusion time was always 90 min. Different heart parameters were measured while the reperfusion was running. After that, myocytes were isolated or cryopreserved. Furthermore, the cell contraction was measured and a protein analysis conducted.

Results: Levosimendan and its metabolite OR 1896 were detected in the blood plasma to evaluate the success of application.

The left ventricular preischemic pressure in Langendorff was substantially higher in the Levo group than in the control group (Levo 24 h Ischemia vs. NaCl 2 h: 151 ± 6 mmHg vs. 91 ± 31 mmHg, $p = 0,038$) and had a similar heart frequency (194 ± 52 bpm vs. 215 ± 75 bpm bei $p = 0,33$).

After ischemia of 45 or 90 minutes and reperfusion the hearts from Levosimendan-treated-rats showed a lower functional recovery in the reperfusion phase. The worst recovery after ischemia was found at the group with cardioplegia (Levo 24 h Cardioplegia vs. NaCl 2 h Perfusion: 12 ± 9 % from BL vs. 148 ± 28 % from BL, $p < 0,05$). The group with 2-hour infusion of levosimendan before ischemia could not build up any measurable pressure parameters in the reperfusion phase.

Same results in the cell contraction measurement. The isolated cardiomyocytes from the hearts of levosimendan-treated rats showed a significantly reduced cell shortening after

Zusammenfassung

ischemia/reperfusion ($5.46 \pm 2.04\%$ vs. $8.03 \pm 2.04\%$, $p < 0.005$). A high edema index was also measured in the myocardium after application of levosimendan. In addition, the isolated cardiomyocytes of all levosimendan treatment groups were shorter than the cells of the NaCl group and showed a significantly reduced expression of SERCA2a. ($p=0.02$)

Conclusion: Levosimendan improves the contraction of cardiomyocytes before ischemia/reperfusion. The application of Levosimendan given 24 h before ischemia/reperfusion leads to decreased recovery of the cardiomyocytes after reperfusion, compared to control hearts, especially when cardioplegic arrest is included.

Furthermore, a down regulation of the SERCA2a by Levo was shown.

The results of the study show that Levosimendan applied 24 hours before cardiac surgery cannot offer enhanced myocardial function.

6 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromollar (µmol/Liter)
AgCl	Silberchlorid
BL	Baseline
bpm	Schläge/Minute
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCT	Creatin-Carnitin-Taurin Medium
CEI	zellulärer Ödemindex
CI	Kardialer Index
cTnC	Myokardiales Troponin C
DDT	Dithiothreitol
dL/L	Durschnittliche Längenänderung
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hf	Herzfrequenz
i.v.	Intravenös
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LCOS	Low-Cardiac-Output-Syndrom
Levo	Levosimendan
LVDP	Linksventrikuläre Druckentwicklung
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
M	Molar (mol/Liter)
M199	Medium 199
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/Liter)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NAT2	N-Acetyltransferase 2
NCX	Natrium/Kalium-Austauscher
PCWP	Siehe pulmonal-cardialer Druckwiderstand
pH	potentia hydrogenii
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA2a	Sarcoplasmatic reticulum calcium ATPase Isotype 2a
SVR	Systemisch vaskulärer Widerstand

TBS..... *Tris-gepufferte-Salzlösung*
Tris *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*

7 Abbildungs- und Formelverzeichnis

Abbildung 1: Der Abbau von Levosimendan zu den relevanten Metaboliten OR 1855 und OR-1896	2
Abbildung 2: Die 3 Wirkungssäulen von Levosimendan	3
Abbildung 3: Übersicht über die Methoden der Arbeit	26
Abbildung 4: Zeitliche Dauer der Phasen im Langendorff-Modell	32
Abbildung 5: Perfundiertes Rattenherz an dem Langendorff-Modell	34
Abbildung 6: Der Zerkleinerer „Tissue Chopper“	35
Abbildung 7: Aufbau des Sandwiches für das Blotting-Verfahren	39
Abbildung 8: Linksventrikuläre Druckverhältnisse im Langendorff-Model.	47
Abbildung 9: Visuelle Begutachtung der Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop.	50
Abbildung 10: Exemplarische lichtmikroskopische Bilder nach der Myozytenisolation	50
Abbildung 11: Durchschnittliche Längenänderung der Kardiomyozyten	51
Abbildung 12: Diastolische Länge der Kardiomyozyten	52
Abbildung 13: Nachweis der Proteinbanden von SERCA2a und NCX mittels Western Blot	53
Abbildung 14: Ausprägung der SERCA2a und der NCX gegenüber der NaCl und der Levo infundierten Zellen	54
Abbildung 15: Elektronenmikroskopisches Bild aus dem linken Ventrikel	55
Formel 1: Berechnung des zellulären Ödemindex (CEI)	41

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kosten für den Einsatz positiv inotroper und vasoaktiver Substanzen über 24 h für einen Patienten mit 85 kg Körpergewicht in durchschnittlicher Dosierung	6
Tabelle 2:	Bestandteile der kardioplegischen Lösung nach Bretschneider.	7
Tabelle 3:	Überblick der Versuchsgruppen	28
Tabelle 4:	Übersicht über die Verfahren und die dafür verwendete Anzahl der Versuchstiere.....	43
Tabelle 5:	Übersicht über die Plasmaanalyse von Levosimendan und der relevanten Metaboliten in 8 Versuchstieren	44
Tabelle 6:	Koronarfluss-Messung bei den 4 Versuchsgruppen (ml / min)	45
Tabelle 7:	Baseline Parameter der Gruppen, erhoben aus dem Druckaufnehmer im Langendorff-Versuch.....	46
Tabelle 8:	Vergleich der einzelnen Gruppen Im Langendorff-Modell	48
Tabelle 9:	Ermittelter zellulärer Ödemindex (CEI) der Gruppen	56

9 Literaturverzeichnis

1. Aasum E, Hafstad AD, Larsen TS. *Changes in substrate metabolism in isolated mouse hearts following ischemia-reperfusion*. Mol Cell Biochem. 2003;249(1-2):97–103.
2. Antila S, et al. *Site dependent bioavailability and metabolism of levosimendan in dogs*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1999;9(1):85–91.
3. Antila S, et al. *Pharmacokinetics of levosimendan and its active metabolite OR-1896 in rapid and slow acetylators*. Eur J Pharm Sci. 2004;23(3):213–22.
4. Antila S, et al. *Pharmacokinetics of levosimendan and its circulating metabolites in patients with heart failure after an extended continuous infusion of levosimendan*. Br J Clin Pharmacol. 2004;57(4):412–5.
5. Axelsson B, et al. *Milrinone and levosimendan during porcine myocardial ischemia -- no effects on calcium overload and metabolism*. Acta Anaesthesiol Scand. 2013;57(6):719–28.
6. Barry WH, Bridge JH. *Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes*. Circulation. 1993;87(6):1806–15.
7. Bassani JW, Yuan W, Bers DM. *Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes*. Am J Physiol. 1995;268(5 Pt 1):C1313–9.
8. Bers DM. *Sources and Sinks of Activator Calcium*. In: Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. p. 39–62. (vol. 237).
9. Bers DM. *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature. 2002;415(6868):198–205.
10. Boost KA, et al. *Inhaled levosimendan reduces mortality and release of proinflammatory mediators in a rat model of experimental ventilator-induced lung injury*. Crit Care Med. 2008;36(6):1873–9.
11. Bretschneider HJ. *Myocardial protection*. Thorac Cardiovasc Surg. 1980;28(5):295–302.

12. Bundesärztekammer. *Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 2. Auflage*: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2017. 147 p. ger.
13. Bunte S, et al. *Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning*. J Clin Med. 2019;8(3):
14. Chen Q-H, et al. *Effect of levosimendan on prognosis in adult patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Crit Care. 2017;21(1):253.
15. Desai PM, Sarkar MS, Umbarkar SR. *Prophylactic preoperative levosimendan for off-pump coronary artery bypass grafting in patients with left ventricular dysfunction: Single-centered randomized prospective study*. Ann Card Anaesth. 2018;21(2):123–8.
16. DiBona D.R. PW. *Quantitative correlation between cell swelling and necrosis in myocardial ischemia in dogs*, *circ Res* 1980;47(5)653-665.
17. Edes I, et al. *Effects of Levosimendan, a cardiostimulant agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca²⁺ sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart*. Circ Res. 1995;77(1):107–13.
18. Eriksson O, Pollesello P, Haikala H. *Effect of levosimendan on balance between ATP production and consumption in isolated perfused guinea-pig heart before ischemia or after reperfusion*. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2004;44(3):316–21.
19. Fabiato A. *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol. 1983;245(1):C1-14.
20. Fotbolcu H, Duman D. *A promising new inotrope: levosimendan*. Anadolu Kardiyol Derg. 2010;10(2):176–82.
21. Freeman JV, et al. *Effectiveness and safety of digoxin among contemporary adults with incident systolic heart failure*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2013;6(5):525–33.

22. Gebhard M-M, Bretschneider HJ, Schnabel PA. *Cardioplegia Principles And Problems*. In: Sperelakis N, editor. *Physiology and Pathophysiology of the Heart*. Boston, MA: Springer US; 1989. p. 655–68. (Developments in Cardiovascular Medicine; vol. 90).
23. Gödény I, et al. *Levosimendan and its metabolite OR-1896 elicit KATP channel-dependent dilation in resistance arteries in vivo*. *Pharmacol Rep*. 2013;65(5):1304–10.
24. Grieshaber P, et al. *Impact of prophylactic administration of Levosimendan on short-term and long-term outcome in high-risk patients with severely reduced left-ventricular ejection fraction undergoing cardiac surgery - a retrospective analysis*. *J Cardiothorac Surg*. 2016;11(1):162.
25. Grossini E, et al. *Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(2):376–88.
26. Grover GJ, et al. *Pharmacologic characterization of BMS-191095, a mitochondrial K(ATP) opener with no peripheral vasodilator or cardiac action potential shortening activity*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(3):1184–92.
27. Haikala H. *Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1995;27(9):1859–66.
28. Haikala H, et al. *The role of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases in the cardiac actions of the new calcium sensitizer, levosimendan*. *Cardiovasc Res*. 1997;34(3):536–46.
29. Hansen MS, et al. *Levosimendan improves cardiac function and myocardial efficiency in rats with right ventricular failure*. *Pulm Circ*. 2018;8(1):2045893217743122.
30. Harjola V-P, et al. *Use of levosimendan in acute heart failure*. *Eur Heart J Suppl*. 2018;20(Suppl D):I2-I10.
31. HCI Solutions AG. *Simdax® - compendium: Fachinformation des Arzneimittel* [Internet]. 2018 [updated 2018 Nov 8; cited 2018 Nov 8]. Available from: <https://compendium.ch/mpro/mnr/24687/html/de>

32. Hillestad V, et al. *Long-term levosimendan treatment improves systolic function and myocardial relaxation in mice with cardiomyocyte-specific disruption of the Serca2 gene.* J Appl Physiol. 2013;115(10):1572–80.
33. Hogue CW, et al. *Cardiac and neurologic complications identify risks for mortality for both men and women undergoing coronary artery bypass graft surgery.* Anesthesiology. 2001;95(5):1074–8.
34. Hryshko LV, Philipson KD. *Sodium-calcium exchange: Recent advances.* Basic Res Cardiol. 1997;92(S1):45–51.
35. Huijskes RV, Rosseel PM, Tijssen JG. *Outcome prediction in coronary artery bypass grafting and valve surgery in the Netherlands: development of the Amphiascore and its comparison with the Euroscore.* European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2003;24(5):741–9.
36. K. Werdan, et al. *Deutsch-österreichische S3-Leitlinie Infarktbedingter kardiogener Schock. Diagnose, Monitoring und Therapie.* Kardiologe. 2011;5(3):166–224.
37. Kandasamy A, et al. *Comparison of Levosimendan versus Dobutamine in Patients with Moderate to Severe Left Ventricular Dysfunction Undergoing Off-pump Coronary Artery Bypass Grafting: A Randomized Prospective Study.* Ann Card Anaesth. 2017;20(2):200–6.
38. Kiraz HA, et al. *The effect of levosimendan on myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats.* Libyan J Med. 2015;10(1):29269.
39. Kivikko M, et al. *Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure.* Int J Clin Pharmacol Ther. 2002;40(10):465–71.
40. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris N-EL. *Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria.* Biochem Pharmacol. 2004;68(5):807–12.
41. Kristof E, et al. *The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts.* Basic Res Cardiol. 1999;94(4):223–30.
42. Kyhse-Andersen J. *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.* Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 1984;10(3-4):203–9.

43. Landoni G, et al. *Levosimendan for Hemodynamic Support after Cardiac Surgery*. N Engl J Med. 2017;376(21):2021–31.
44. Langendorff O. *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Pflügers Arch. 1895;61(6):291–332.
45. Langer M, Lüttecke D, Schlüter K-D. *Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship*. Pflügers Arch. 2003;447(3):289–97.
46. Lee C-C, et al. *Bretschneider solution-induced alterations in the urine metabolome in cardiac surgery patients*. Sci Rep. 2018;8(1):17774.
47. Leppikangas H, et al. *Preoperative levosimendan infusion in combined aortic valve and coronary bypass surgery*. Br J Anaesth. 2011;106(3):298–304.
48. Leprán I, et al. *Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model*. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2006;48(4):148–52.
49. Levin R, et al. *Preoperative levosimendan decreases mortality and the development of low cardiac output in high-risk patients with severe left ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass*. Exp Clin Cardiol. 2012;17(3):125–30.
50. M. Carl, et al. *S3-Leitlinie zur intensivmedizinischen Versorgung herzchirurgischer Patienten Hämodynamisches Monitoring und Herz-Kreislauf*. 2006.
51. Mebazaa A, et al. *Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial*. JAMA. 2007;297(17):1883–91.
52. Mehta RH, et al. *Levosimendan in Patients with Left Ventricular Dysfunction Undergoing Cardiac Surgery*. N Engl J Med. 2017;376(21):2032–42.
53. Moiseyev VS, et al. *Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN)*. Eur Heart J. 2002;23(18):1422–32.
54. Mork C, et al. *Bretschneider (Custodiol®) and St. Thomas 2 Cardioplegia Solution in Mitral Valve Repair via Anterolateral Right Thoracotomy: A Propensity-Modelled Comparison*. Mediators Inflamm. 2019;20195648051.

55. Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. *A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research.* Cardiovasc Pathol. 2010;19(2):65–82.
56. Mühlfeld C, Richter J. *High-pressure freezing and freeze substitution of rat myocardium for immunogold labeling of connexin 43.* Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(10):1059–67.
57. Nieminen MS, et al. *Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure.* J Am Coll Cardiol. 2000;36(6):1903–12.
58. Nieminen MS, et al. *Levosimendan: current data, clinical use and future development.* Heart Lung Vessel. 2013;5(4):227–45.
59. Nippert F, Schreckenber R, Schlüter K-D. *Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes.* J Vis Exp. 2017;(128):
60. Orion Pharma. *Deutsche Fachinformation Simdax 2,5 mg/ml: Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung;*März 2018.
61. Ørstavik Ø, et al. *The inotropic effect of the active metabolite of levosimendan, OR-1896, is mediated through inhibition of PDE3 in rat ventricular myocardium.* PLoS ONE. 2015;10(3):e0115547.
62. Periasamy M, et al. *Role of SERCA Pump in Muscle Thermogenesis and Metabolism.* Compr Physiol. 2017;7(3):879–90.
63. Periasamy M, Huke S. *SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2001;33(6):1053–63.
64. Pollesello P, et al. *Binding of a new Ca²⁺ sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study.* J Biol Chem. 1994;269(46):28584–90.
65. Ponikowski P, et al. *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC).* Eur Heart J. 2016;37(27):2129–200.
66. Preusse CJ. *Custodiol Cardioplegia: A Single-Dose Hyperpolarizing Solution.* J Extra Corpor Technol. 2016;48(2):P15-20.

67. Preusse CJ, Gebhard MM, Bretschneider HJ. *Myocardial "equilibration processes" and myocardial energy turnover during initiation of artificial cardiac arrest with cardioplegic solution - reasons for a sufficiently long cardioplegic perfusion.* Thorac Cardiovasc Surg. 1981;29(2):71–6.
68. Redel A, et al. *Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo.* Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(1):84–93.
69. Samuel TJ, et al. *Correcting Calcium Dysregulation in Chronic Heart Failure Using SERCA2a Gene Therapy.* Int J Mol Sci. 2018;19(4):
70. Sandell EP, et al. *Pharmacokinetics of levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1995;26 Suppl 1S57-62.
71. Sandell E-P, et al. *Pharmacokinetics of Levosimendan in Healthy Volunteers and Patients with Cogestive Heart Failure.* Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1995.
72. Sanfilippo F, et al. *Levosimendan for patients with severely reduced left ventricular systolic function and/or low cardiac output syndrome undergoing cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis.* Crit Care. 2017;21(1):252.
73. Schellekens W-JM, et al. *Levosimendan affects oxidative and inflammatory pathways in the diaphragm of ventilated endotoxemic mice.* Crit Care. 2015;1969.
74. Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. *Potential of Fractional Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release by Total and Free Intra-Sarcoplasmic Reticulum Calcium Concentration.* Biophysical Journal. 2000;78(1):334–43.
75. Slawsky MT, et al. *Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators.* Circulation. 2000;102(18):2222–7.
76. Sommer S, et al. *Impact of levosimendan and ischaemia-reperfusion injury on myocardial subsarcolemmal mitochondrial respiratory chain, mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ cycling and ATP synthesis.* Eur J Cardiothorac Surg. 2016;49(2):e54-62; discussion e62.
77. Sorsa T, et al. *Binding of levosimendan, a calcium sensitizer, to cardiac troponin C.* J Biol Chem. 2001;276(12):9337–43.

78. Stokke MK, et al. *Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca²⁺ wave development in ventricular myocytes*. Cardiovasc Res. 2010;86(1):63–71.
79. Tang WH, et al. *Polyol pathway impairs the function of SERCA and RyR in ischemic-reperfused rat hearts by increasing oxidative modifications of these proteins*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2010;49(1):58–69.
80. Tena MÁ, et al. *Levosimendan versus placebo in cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis*. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018;27(5):677–85.
81. Tien M H Ng. *Levosimendan, a new calcium-sensitizing inotrope for heart failure*. Pharmacotherapy. 2004;24(10):1366–84.
82. Treskatsch S, et al. *Early levosimendan administration is associated with decreased mortality after cardiac surgery*. J Crit Care. 2015;30(4):859.e1-6.
83. Tritapepe L, et al. *Levosimendan pre-treatment improves outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery*. Br J Anaesth. 2009;102(2):198–204.
84. Udvary É, Papp JG, Végh Á. *Cardiovascular effects of the calcium sensitizer, levosimendan, in heart failure induced by rapid pacing in the presence of aortic constriction*. British Journal of Pharmacology. 1995;114(3):656–61.
85. van Diepen S, et al. *Levosimendan in patients with reduced left ventricular function undergoing isolated coronary or valve surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2019.
86. van Hees HWH, et al. *Levosimendan improves calcium sensitivity of diaphragm muscle fibres from a rat model of heart failure*. British Journal of Pharmacology. 2011;162(3):566–73.
87. Vanden Hoek TL, et al. *Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia*. Am J Physiol. 1996;270(4 Pt 2):H1334-41.
88. Vassalle M, Lin C-I. *Calcium overload and cardiac function*. J Biomed Sci. 2004;11(5):542–65.
89. Viana FF, et al. *Custodiol versus blood cardioplegia in complex cardiac operations: an Australian experience*. Eur J Cardiothorac Surg. 2013;43(3):526–31.
90. Wang C-H, et al. *Synergistic Effects of Moderate Therapeutic Hypothermia and Levosimendan on Cardiac Function and Survival After Asphyxia-Induced Cardiac Arrest in Rats*. J Am Heart Assoc. 2020;9(12):e016139.

91. Zhang Y, et al. *LncRNA ZFAS1 as a SERCA2a Inhibitor to Cause Intracellular Ca²⁺ Overload and Contractile Dysfunction in a Mouse Model of Myocardial Infarction*. *Circ Res*. 2018;122(10):1354–68.
92. Zhihao L, et al. *SERCA2a: a key protein in the Ca²⁺ cycle of the heart failure*. *Heart failure reviews*. 2020;25(3):523–35.

10 Publikationsverzeichnis

Welk E, Heep M, Grieshaber P, Niemann B, Schlüter K-D, Boening A. *Levosimendan during Cardiac Surgery Deteriorates Cardiac Function in Rats*. Thorac Cardiovasc Surg. Georg Thieme Verlag KG. 2019;67(S01):S1-S100.

Böning A, Niemann B, Heep M, Hemmerich C, **Welk E**, Schlüter KD. *Levosimendan during Cardiac Surgery Improves Cardiac Function in Ischemic Rat Hearts*. thorac Cardiovasc Surg. Georg Thieme Verlag KG. 2021;69(S01):S1-S85

Weitere, von der Dissertation unabhängige publizierte Originalartikel

M. Grade and **E. Welk**, H. Sostmann, HV Hammerstein, CH McAulay, R. Bostelmann, *An Immunosuppression Hidden Malignancy: Case Report of An Unexpected Clostridium Septicum Infection and Its Fatal Consequence*, Crimson Publishers GMR. 2021;5(5)

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Ich möchte mich zunächst herzlich bei Prof. Dr. Böning bedanken für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung dieser Arbeit über Jahre hinweg.

Außerdem spreche ich meine persönliche Dankbarkeit dem gesamten Laborteam von Prof. Dr. Böning und Prof. Dr. K. D. Schlüter aus, insbesondere Frau Martina Heep für die Einweisung und Erklärung am Langendorff-Versuch sowie Frau Nadine Woitasky für all die Geduld mit mir an den molekularbiologischen Messungen.

Vielen Dank an Kerstin und Anna-Lena für die Durchsicht auf Rechtschreibung, Grammatik und Formelles.

Für die finale Durchsicht und den damit verbundenen hohen Arbeitsaufwand, möchte ich mich bei PD. Dr. Rolf Schreckenbergr recht herzlich bedanken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich, von der Versuchsdurchführung bis zur Korrektur der Dissertation. Dadurch war es möglich, diese Arbeit noch weiter zu verbessern.

Danke an meine Familie und Freunde, die mich durch Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben und das entgegengebrachte Verständnis. Ohne diese Unterstützung wäre ich nicht an der Stelle, an der ich heute bin.