

**Aus dem Campus Kerckhoff der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Fachbereich Medizin**

Abteilung für Anästhesiologie

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

**Experimentelle Strategien und Einflussfaktoren auf den  
myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Anästhesiologie  
im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dr. Dr. med. Carolin Torregroza**

2024

*In liebevollem Gedenken an all jene, die mich auf meiner Reise begleitet  
haben und diesen Moment nicht mehr erleben können.*

*Eure Erinnerung lebt in meinem Herzen weiter.*

*Diese Habilitationsschrift ist eurem Andenken gewidmet, als Zeichen meiner  
tiefen Dankbarkeit und unendlichen Liebe.*

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift fasst die Ergebnisse der unten aufgeführten Originalpublikationen zusammen.

## Originalarbeiten

1. Feige K, Rubbert J, Raupach A, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, **Torregroza C**. Cardioprotective Properties of Mannitol-Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *Int J Mol Sci* 2021 Feb 27; 22(5):2395
2. **Torregroza C**, Glashoerster CO, Feige K, Stroethoff M, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(22):12471
3. **Torregroza C**, Feige K, Schneider L, Bunte S, Stroethoff M, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Raupach A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J Clin Med* 2020 May 13; 9(5):1445
4. **Torregroza C**, Yueksel B, Ruske R, Stroethoff M, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Feige K. Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia. *Int J Mol Sci*. 2021 April 26; 22(9):4517
5. **Torregroza C**, Gnaegy L, Raupach A, Stroethoff M, Feige K, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R. Influence of Hyperglycemia and Diabetes on Cardioprotection by Humoral Factors released after Remote Ischaemic Preconditioning (RIPC). *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 18; 22(16):8880

## Abkürzungsverzeichnis

5HD	<i>5-Hydroxydecanoate</i>
$\alpha_2$	Alpha-2
A1R	Adenosin-1-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
AP	Angina Pectoris
ATP	Adenosintriphosphat
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
CABG	Koronararterien-Bypass-Operation
$\text{CaCl}_2$	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CsA	Cyclosporin A
Dex	Dexmedetomidin
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Typ 1 Diabetes Mellitus
DM2	Typ 2 Diabetes Mellitus
dP/dt max.	Maximale Anstiegsgeschwindigkeit des LVDP
DPCPX	<i>8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine</i>
EACTS	<i>European Association for Cardiothoracic Surgery</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERICCA	<i>Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
g/kg	Gramm pro Kilogramm
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 Beta
h	Stunde
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid

HF	Herzfrequenz
HG	Hyperglykämie
HLM	Herz-Lungen-Maschine
I/R-Schaden	Ischämie- und Reperfusionsschaden
IE	Internationale Einheiten
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPost	Ischämische Postkonditionierung
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
Ki	Inhibitorkonstante
Kon	Kontrolle
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
Lev	Levosimendan
LVDP	Linksventrikulärer entwickelter Druck
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESP	Linksventrikulärer endsystolischer Druck
Man	Mannitol
mBK <sub>Ca</sub> -Kanäle	Mitochondriale Calcium-abhängige Kaliumkanäle
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mK <sup>+</sup> -Kanäle	Mitochondriale Kaliumkanäle
mK <sub>ATP</sub> -Kanäle	Mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle
ml	Milliliter

mM	Millimol
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol/L	Millimol pro Liter
mPTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
μM	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NG	Normoglykämie
ng/L	Nanogramm pro Liter
nM	Nanomol
NO/PKG	<i>Ntric Oxide / Protein Kinase G</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid
PC	Präkonditionierung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PDE	Phosphodiesterase
Pi3K	Phosphoinositid3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKCε	PKC Isoform Epsilon
PKG	Proteinkinase G
PoC	Postkonditionierung
ProCCard	A Multimodal Cardioprotection Strategy During Cardiac Surgery
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
RIPHeart	<i>Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery</i>
RIPostC	<i>Remote Ischemic Postconditioning</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	<i>Surviving Activating Factor Enhancement</i>
SPICEIII	<i>Sedation Practice in Intensive Care Evaluation 3</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAVI	Transkatheter-Aortenklappen-Implantation
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TIVA	Totale intravenöse Anästhesie
TNF-R2	TNF-Rezeptor 2
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben Düsseldorf

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.	Myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschaden	11
2.	Kardioprotektion durch Konditionierung	13
2.1.	Ischämische Fernkonditionierung	14
2.2.	Pharmakologische Konditionierung	15
3.	Signalwege der Kardioprotektion	15
4.	Einfluss der Komorbiditäten Hyperglykämie und Diabetes Mellitus	18
5.	Fragestellung	19
<b>II</b>	<b>Methodik</b>	<b>20</b>
1.	<i>In vivo</i> Modell – Ischämische Fernkonditionierung	20
2.	<i>In vitro</i> Modell – Ischämie und Reperfusionsschaden	21
3.	Experimentelles <i>in vitro</i> Protokoll	23
4.	Infarktgrößenbestimmung	25
<b>III</b>	<b>Pharmakologische Konditionierung – Untersuchung bei Normoglykämie</b>	<b>26</b>
1.	Mannitol	26
1.1.	Mediatoren der Mannitol-induzierten Kardioprotektion	27
1.2.	Intrazelluläre Signalkaskaden der Mannitol-induzierten Kardioprotektion	29
1.3.	Schlussfolgerung Mannitol	33
<b>IV</b>	<b>Pharmakologische Konditionierung – Untersuchung bei Hyperglykämie</b>	<b>34</b>
1.	Dexmedetomidin	34
1.1.	Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Kardioprotektion	35
1.2.	Schlussfolgerung Dexmedetomidin	39
2.	Levosimendan	40
2.1.	Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Kardioprotektion	41
2.2.	Schlussfolgerung Levosimendan	46

<b>V</b>	<b>Ischämische Fernkonditionierung – Untersuchung bei Hyperglykämie und Diabetes mellitus .....</b>	<b>48</b>
1.	Ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) .....	48
1.1.	Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC .....	49
1.2.	Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC .....	51
1.3.	Der Einfluss des erkrankten Myokards auf RIPC .....	52
1.4.	Schlussfolgerung RIPC .....	54
<b>VI</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
1.	Konditionierung unter Normoglykämie .....	56
2.	Der Einfluss von Hyperglykämie .....	60
3.	Der Einfluss von Diabetes mellitus .....	65
4.	Translation in die Klinik .....	68
5.	Limitationen .....	75
<b>VII</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>77</b>
<b>VIII</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>IX</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>X</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>100</b>
<b>XI</b>	<b>Originalarbeiten .....</b>	<b>101</b>

## I Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die ischämische Herzerkrankung, zählen weiterhin zu den häufigsten Todesursachen weltweit und führen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Personen.<sup>1</sup> Aufgrund des demographischen Wandels sowie einer Zunahme der Komorbiditäten Diabetes mellitus, Hypertension und Adipositas, ist in der Zukunft von einem weiteren Anstieg der kardiovaskulären Erkrankungen auszugehen.<sup>2,3</sup> In den letzten Jahren gab es einen maßgeblichen Fortschritt in den Therapiestrategien des akuten Myokardinfarktes; die Mortalität der betroffenen Personen bleibt jedoch weiterhin hoch.<sup>4-7</sup> Die steigende Inzidenz in Kombination mit dem zugleich schlechten Outcome der kardiovaskulären Erkrankungen, begründet die fundamentale Bedeutung der Forschung im Bereich der Kardioprotektion.

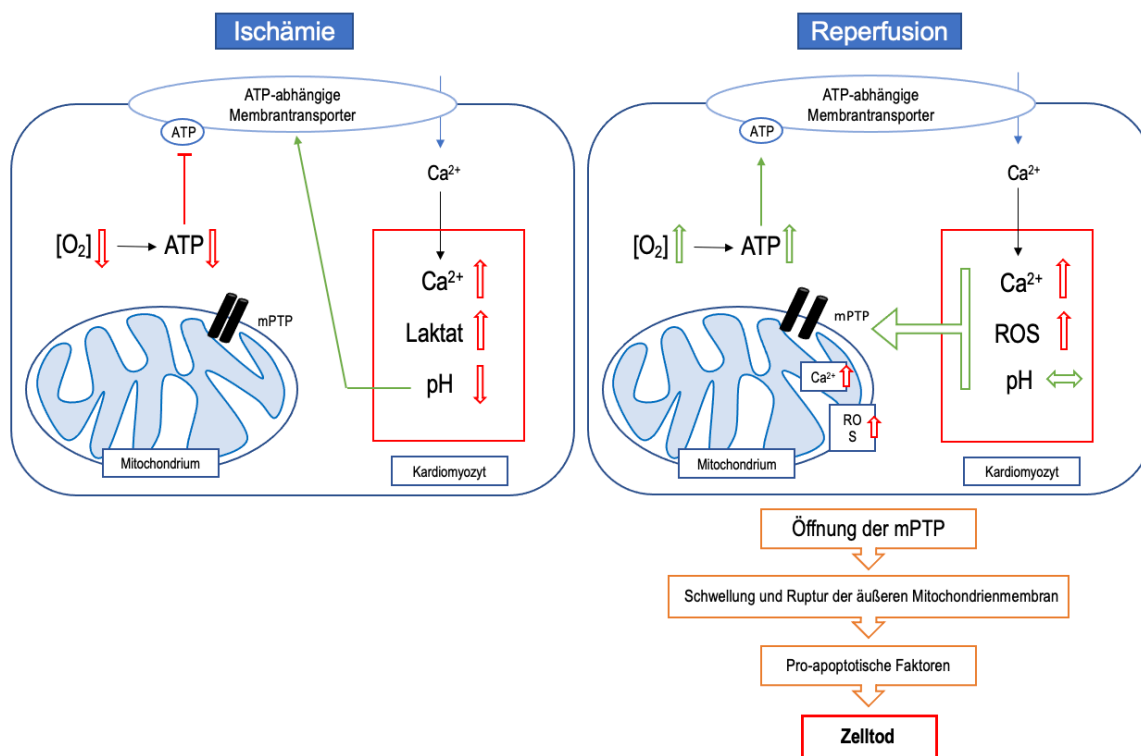
Unter Kardioprotektion versteht man Strategien, die den myokardialen Schaden minimieren und somit die Myokardfunktion und das Outcome nach einem Myokardinfarkt verbessern.<sup>8-10</sup> Während in experimentellen Studien bereits vielversprechende Ansätze zur Kardioprotektion gezeigt werden konnten, bleibt die Translation dieser Strategien in die klinische Forschung weiterhin unzureichend.<sup>11,12</sup> Als mögliche Begründung dieser Diskrepanz zwischen experimenteller und klinischer Forschung sollten die vielfältigen Komorbiditäten der Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden, betrachtet werden.<sup>12-14</sup> Kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen durch einen multifaktoriellen Prozess, der bei den meisten tierexperimentellen Studien bisher nur wenig beleuchtet wird. Insbesondere die metabolischen Störungen, wie Diabetes mellitus und Hyperglykämie, die mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes assoziiert sind, können mögliche Einflussfaktoren auf kardioprotektive Strategien darstellen.<sup>15,16</sup> Im Bereich der Grundlagenforschung sollte der Schwerpunkt daher auf experimentellen Studien liegen, die Therapieoptionen zur Protektion des Myokards vor einer Ischämie auch unter den oben genannten Einflussfaktoren untersuchen.

## 1. Myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der Myokardinfarkt ist definiert als myokardialer Zelltod durch anhaltende Ischämie, zumeist verursacht durch eine Minderdurchblutung oder ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Myokard.<sup>17</sup> Die unmittelbare Wiederherstellung oder Verbesserung des koronaren Blutflusses ist unerlässlich, um das Myokard vor einem weiteren Zelltod zu schützen.<sup>10</sup> Als Behandlungsstrategien stehen hierfür pharmakologische Substanzen, wie Vasodilantien und Gerinnungshemmer, oder invasive Maßnahmen, wie die perkutane Koronarintervention (PCI) oder die Koronararterien-Bypass-Operation (CABG), zur Verfügung.<sup>18,19</sup> In den vergangenen Jahren wurden die Therapieoptionen des akuten Myokardinfarkts kontinuierlich verbessert; die Mortalität der erkrankten Personen bleibt jedoch weiterhin signifikant höher als in der Gesamtbevölkerung.<sup>7</sup> Diese Diskrepanz ist unter anderem durch das Phänomen des Ischämie- und Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) zu erklären.<sup>9</sup>

Ein wesentlicher Aspekt von Mortalität und Morbidität nach Erleiden eines Myokardinfarkts ist das Ausmaß des myokardialen Zelltods. Während die Wiederherstellung der koronaren Durchblutung für das Myokard lebensnotwendig ist, führt die Reperfusion paradoxerweise selbst zu einem weiteren Zellschaden.<sup>20</sup> Grundlage des I/R-Schaden sind Ischämie-induzierte anaerobe Bedingungen, die mit einem Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) einhergehen.<sup>8,9</sup> Aufgrund dessen kommt es zu einer Hemmung des intrazellulären ATP-abhängigen Substrattransportes, Laktatakkumulation und folglich zu einem drastischen Abfall des pH-Wertes auf unter 7,0. Um dieser Azidose entgegenzuwirken, werden komplexe intrazelluläre Prozesse aktiviert, die über Elektrolytverschiebungen zu einem Überschuss an zellulärem und mitochondrialem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) führen. Erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte bedingen eine Hyperkontraktion der betroffenen Zellen. Durch die Wiederherstellung der Blutzufuhr (Reperfusion) kann der Gehalt an ATP gesteigert und damit auch der pH-Wert angehoben werden. Infolgedessen potenziert sich jedoch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss weiter und es kommt zudem zu einer massiven Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Durch den hohen ROS Gehalt wird der Zell- und Gewebeschaden weiter potenziert. So führen die Sauerstoffradikale zur Lipidoxidation, Erhöhung der Endothelpermeabilität und zu Ödem Bildung.<sup>21</sup>

Die Kombination aus pH- und Elektrolytverschiebungen sowie oxidativem Stress führt schließlich zur erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), die als Schlüsselfigur des I/R-Schadens betrachtet wird.<sup>22</sup> Als nicht-selektive Pore zwischen der inneren und äußeren mitochondrialen Membran lässt sie bei Öffnung Moleküle bis zu 1,5kD passieren. Bei anhaltender Öffnung der Pore kommt es entlang des osmotischen Gradienten zu einem Einstrom von Wasser und damit zu einer Anschwellung und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran. Hierdurch werden pro-apoptotische Faktoren freigesetzt, die den Zelluntergang einleiten.<sup>23</sup> Da die Kardiomyozyten über sogenannte *tight junctions* untereinander verbunden sind, kann sich der Prozess des Zellschadens und der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Hyperkontraktion weiter ausdehnen und hat damit eine weitreichende Auswirkung auf das Ausmaß des Ischämie-bedingten myokardialen Schadens sowie auf die Mortalität und Morbidität nach einem Myokardinfarkt.

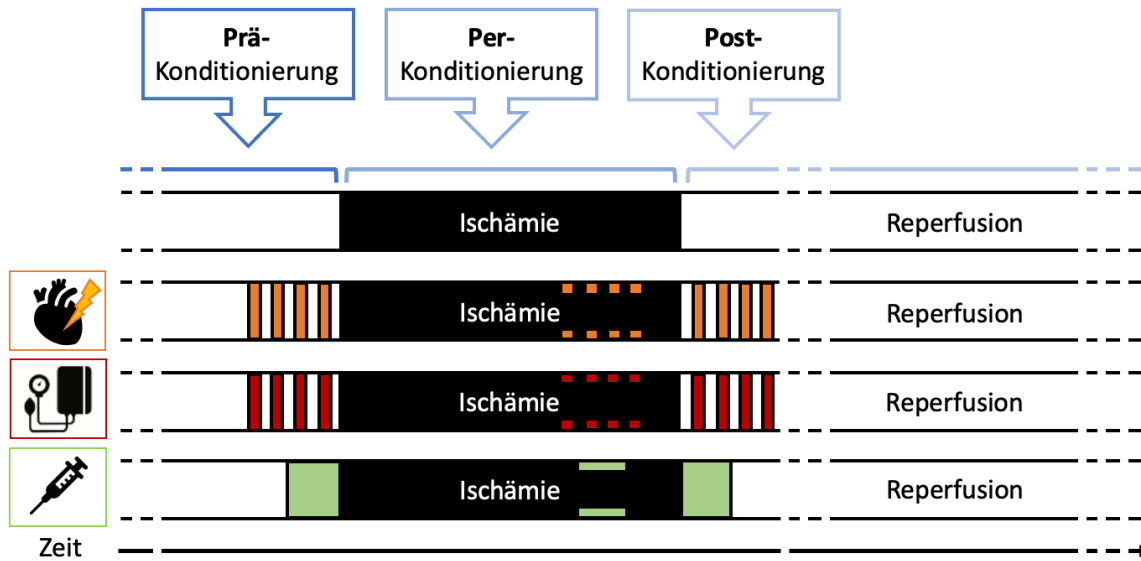


**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Ischämie- und Reperfusionsschadens. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>20</sup> mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, ATP = Adenosintri-phosphat,  $\text{O}_2$  = Sauerstoff,  $\text{Ca}^{2+}$  = Calcium.

## 2. Kardioprotektion durch Konditionierung

Eine Strategie, um das Myokard vor den schwerwiegenden Folgen des I/R-Schaden zu schützen, ist die sogenannte Konditionierung. Im Jahr 1986 wurde das Konzept der ischämischen Präkonditionierung (IPC) von Murry und Kollegen erstmals beschrieben.<sup>24</sup> Die Methodik beinhaltet kurze alternierende Phasen von subletaler Ischämie und Reperfusion vor einer langanhaltenden (Index-) Ischämie. Durch dieses Vorgehen konnte die Infarktgröße um 75% im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden. In folgenden Studien wurden diese Ergebnisse nicht nur reproduziert, sondern auch zugrundeliegende Mechanismen identifiziert.<sup>25</sup> Durch die kurzen Phasen subletaler Ischämie werden am Herzen endogene Faktoren, wie Adenosin und Bradykinin, freigesetzt, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (näher beschrieben unter 1.3). Über diese Signalwege werden schlussendlich die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP sowie die Produktion von ROS reduziert und damit der I/R-induzierte Zellschaden minimiert.<sup>26</sup>

In Bezug auf die Translation kardioprotektiver Maßnahmen in die Klinik ist zu beachten, dass ein akuter Myokardinfarkt in aller Regel ein unvorhersehbares Ereignis darstellt. Um einen Organschutz durch Präkonditionierung zu erreichen, muss jedoch bekannt sein, wann eine Ischämie auftritt.<sup>14</sup> Der Einsatz einer Präkonditionierung vor der Ischämie ist damit nur in wenigen klinischen Situationen, wie vor einer elektiven CABG oder PCI, möglich. Aufgrund dessen wurden Interventionen untersucht, die auch während (Per-) oder nach (Postkonditionierung) dem ischämischen Ereignis zu einer Kardioprotektion führen. Sowohl die ischämische Postkonditionierung (IPost) als auch eine ischämische Fernpostkonditionierung (*Remote Ischemic Postconditioning*, RIPostC) bewirken eine signifikante Infarktgrößenreduktion im experimentellen Tiermodell.<sup>20</sup>



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Konditionierungsstimuli. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>20</sup> Präkonditionierung = Behandlungen vor der Ischämie, Perkonditionierung = Behandlungen während der Ischämie, Postkonditionierung = Behandlungen während der Reperfusion.

## 2.1. Ischämische Fernkonditionierung

Während die oben beschriebene ischämische Präkonditionierung im Tiermodell weiterhin den stärksten endogenen Mechanismus gegen einen I/R-Schaden darstellt, ist sie aufgrund der Invasivität der Maßnahme kaum in das klinische Setting übertragbar.<sup>11,27</sup> Lediglich im Rahmen der PCI oder CABG könnte die IPC umgesetzt werden. Aufgrund der Gefahr schwerwiegender Folgen mit dauerhafter Verletzung der Koronargefäße bleibt die Methode auch hier jedoch impraktikabel. Eine alternative, nicht-invasive Maßnahme ist die ischämische Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic Preconditioning, RIPC*).<sup>28</sup> Intermittierende Phasen subletaler Ischämie und Reperfusion an zielorganfernen Geweben führen ebenfalls zu einer Kardioprotektion, vergleichbar mit den Ergebnissen der IPC. Hierbei ist der RIPC Stimulus nicht auf ein Gewebe oder Organ limitiert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass mittels Okklusion der Mesenterialarterie ebenfalls eine myokardiale Infarktgrößenreduktion erzielt werden kann.<sup>25</sup> Die zugrundeliegenden Mechanismen von RIPC sind noch nicht abschließend erforscht. Es scheinen jedoch durch den Stimulus verschiedene humorale Faktoren (Zytokine, Chemokine u.a.) freigesetzt zu werden, die über die unter Punkt 1.3. beschriebenen Signalkaskaden eine Kardioprotektion induzieren.<sup>26,29,30</sup>

## 2.2. Pharmakologische Konditionierung

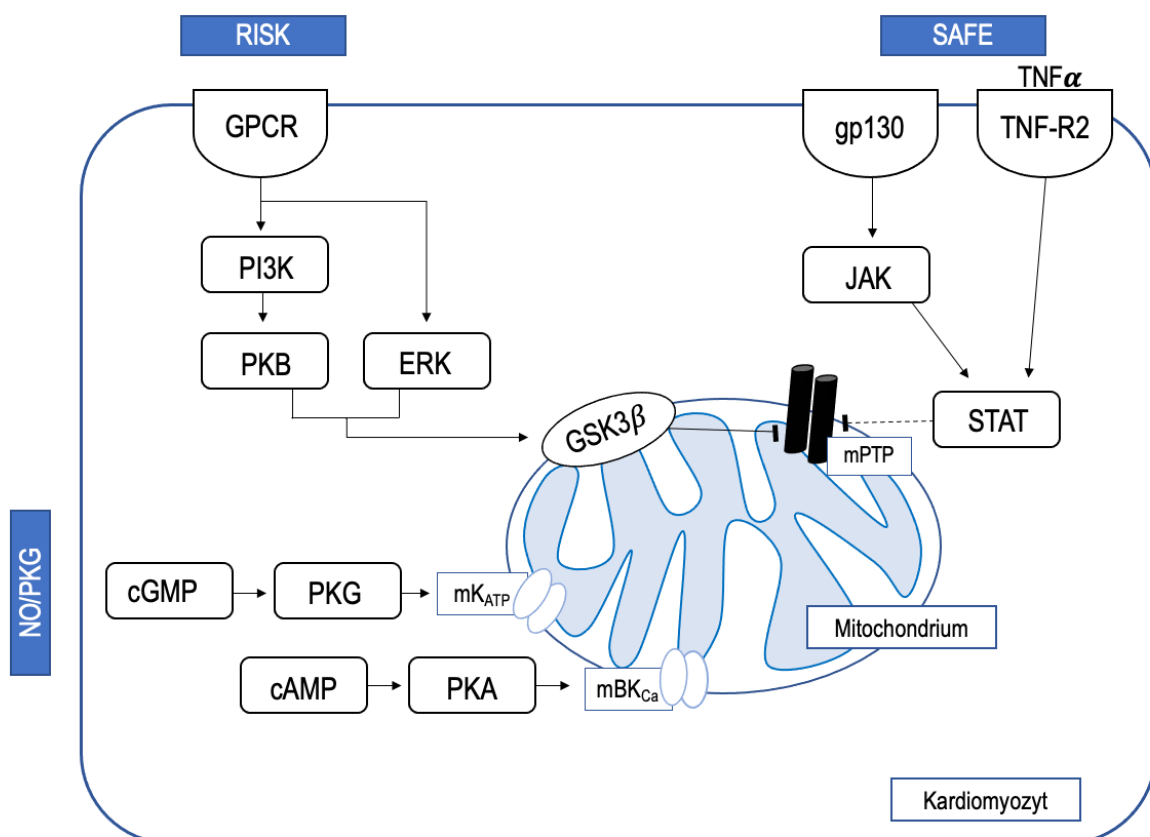
Unter pharmakologischer Konditionierung versteht man den Einsatz von Substanzen, die die oben beschriebene ischämische Konditionierung über Aktivierung myokardialer Signalwege (siehe 1.3) imitieren und so ebenfalls zu einer Kardioprotektion führen.<sup>31</sup> Die pharmakologische Konditionierung ist eine nicht-invasive Strategie und im Vergleich zur ischämischen Konditionierung wesentlich praktikabler für die Translation in das klinische Setting. Für eine Vielzahl an Substanzen, wie volatile Anästhetika,<sup>32</sup> Edelgase,<sup>33</sup> Opiode,<sup>34</sup> Phosphodiesterase-Inhibitoren<sup>35,36</sup> und Adrenorezeptor-Agonisten,<sup>37</sup> wurden kardioprotektive Eigenschaften beschrieben. Ähnlich wie die ischämischen Stimuli, kann auch die pharmakologische Konditionierung vor (Prä-), während (Per-) oder nach der Ischämie (Postkonditionierung) angewendet werden.

## 3. Signalwege der Kardioprotektion

Zu den bekannten Signalwegen der Kardioprotektion zählen *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK), *Surviving Activating Factor Enhancement* (SAFE) und *Nitric Oxide / Protein Kinase G* (NO/PKG).<sup>26</sup> Im Rahmen des RISK Signalweges<sup>38</sup> werden über Bindung an GPCR intrazellulär die Phosphoinositid3-Kinase (PI3K) und nachgelagert die Proteinkinase B (Akt) aktiviert. Parallel zur PI3K wird über Mediatoren an den GPCR auch die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) stimuliert. Sowohl Akt als auch ERK phosphorylieren die Proteinkinase C (PKC), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Glykogensynthase-Kinase 3 Beta (GSK3 $\beta$ ). Phosphorylierung und damit Inhibierung der GSK3 $\beta$  wiederum hemmt die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP und reduziert damit den Zelluntergang.

Der SAFE Signalweg<sup>39,40</sup> wird über Bindung des Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) an den TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) aktiviert, wodurch wiederum Januskinase und *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) phosphoryliert werden. Die Unterform des STAT ist hierbei speziesunterschiedlich; so ist im humanen Myokard beispielsweise STAT5 beteiligt. Das aktivierte STAT transloziert ins Mitochondrium und reguliert hier nicht nur die mPTP, sondern auch die ROS Konzentration.

Neben den beiden bekannten Signalkaskaden konnte zuletzt noch der NO/PKG Weg als kardioprotektiver Mechanismus identifiziert werden.<sup>25,26</sup> Eine Stimulation von eNOS (unabhängig von PI3K und Akt) und damit Erhöhung der NO-Konzentration führt zu einer gesteigerten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Nachgeschaltet werden die mPTP, Ca<sup>2+</sup> Produktion und mitochondriale Kalium (mK<sup>+</sup>)-Kanäle reguliert. Auch wenn die drei Signalwege in der Literatur als eigenständige Kaskaden bezeichnet werden, sind relevante Interaktionen zwischen den einzelnen intrazellulären Mediatoren beschrieben.<sup>20</sup>



**Abbildung 3** Signalwege der Kardioprotektion. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>20</sup> RISK = Reperfusion Injury Salvage Kinase, GPCR = G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, PI3K = Phosphoinositid3-Kinase, PKB = Proteinkinase B (Akt), ERK = Extracellular Signal-Related Kinase, GSK3β = Glykogensynthase-Kinase 3 Beta, SAFE = Surviving Activating Factor Enhancement, TNFα = Tumornekrosefaktor Alpha, TNF-R2 = TNF-Rezeptor 2, gp130 = Glykoprotein 130, JAK = Januskinase, STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription, mPTP = Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, NO/PKG = Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, cAMP = , PKA = Proteinkinase A, mK<sub>ATP</sub> = mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal, mBK<sub>Ca</sub> = mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Kaliumkanal.

Auf Basis umfangreicher Forschung konnte das Mitochondrium als mutmaßlicher Endeffektor der kardioprotektiven Signalkaskaden identifiziert werden.<sup>23</sup> Neben der bereits beschriebenen Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP<sup>22,41</sup> spielen auch mK<sup>+</sup>-Kanäle eine entscheidende Rolle. Hier sind insbesondere der mitochondriale ATP-abhängige (mK<sub>ATP</sub>) und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kaliumkanal (mBK<sub>Ca</sub>) hervorzuheben.<sup>42-45</sup> Beide Kanäle regulieren den Energiestatus der Zelle, sowie Volumen und Funktion der Mitochondrien.<sup>44,46</sup> Durch experimentelle Studien mit Einsatz spezifischer Kanalblocker und -aktivatoren konnten sowohl der mK<sub>ATP</sub> als auch der mBK<sub>Ca</sub> Kanal als intrazelluläre Mediatoren der Kardioprotektion herausgearbeitet werden. Als Endeffektoren der oben beschriebenen Signalwege kommt es zur Öffnung der mK<sup>+</sup>-Kanäle mit Einstrom von K<sup>+</sup> in das Mitochondrium. Dies wiederum führt zu Membrandepolarisation, wodurch die mitochondriale ROS-Konzentration reguliert, die ATP-Synthese gesteigert und die Ca<sup>2+</sup>-Überladung der Mitochondrien verhindert wird.<sup>47</sup> Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen intrazellulären Mediatoren der kardioprotektiven Signalwege gibt es auch zwischen den mK<sup>+</sup>-Kanälen Interaktionen. Interessanterweise scheinen je nach Konditionierungsstrategie und -zeitpunkt die verschiedenen mK<sup>+</sup>-Kanäle in unterschiedlichem Maße aktiviert zu werden. So konnte zum Beispiel für die Substanz Dexmedetomidin gezeigt werden, dass bei der Postkonditionierung in der frühen Reperfusion sowohl der mK<sub>ATP</sub> als auch der mBK<sub>Ca</sub>-Kanal aktiviert werden. Im Gegensatz dazu wird die Dexmedetomidin-induzierte Postkonditionierung in der späten Reperfusion über den mK<sub>ATP</sub>, aber nicht über den mBK<sub>Ca</sub>-Kanal vermittelt.<sup>48</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die frühe und späte ischämische Postkonditionierung in Bezug auf die mK<sup>+</sup>-Kanäle demonstriert.<sup>49</sup> Der mBK<sub>Ca</sub>-Kanal wiederum nimmt eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Kardioprotektion im alternden Herzen ein. Während eine Vielzahl von Signalkaskaden im Alter blockiert zu sein scheinen, konnte für den mBK<sub>Ca</sub>-Kanal gezeigt werden, dass eine Aktivierung nicht nur im jungen gesunden, sondern auch im alternden Herzen noch zu einer Infarktgrößenreduktion führt.<sup>50</sup> Aufgrund dieser Eigenschaft ist der mBK<sub>Ca</sub>-Kanal, insbesondere in Bezug auf eine Übertragung kardioprotektiver Strategien in den klinischen Alltag, hochrelevant und sollte in experimentellen Studien weiter untersucht werden.

#### 4. Einfluss der Komorbiditäten Hyperglykämie und Diabetes Mellitus

Eine Vielzahl von Komorbiditäten werden als mögliche Einflussfaktoren auf myokardiale Konditionierungsstrategien in der Klinik diskutiert.<sup>51</sup> Hierbei scheinen insbesondere Diabetes mellitus und damit einhergehend hyperglykämie Stoffwechsellagen von Bedeutung zu sein, da diese prädisponierend für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen sind.<sup>52</sup> Die akute Hyperglykämie hat auch unabhängig von einem vorbestehenden Diabetes mellitus Einfluss auf das Outcome von Patienten im perioperativen Setting.<sup>53,54</sup> So konnte gezeigt werden, dass eine Hyperglykämie zum Zeitpunkt der Krankenhauseinweisung mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität korreliert.<sup>55,56</sup> Zudem werden insbesondere bei herzchirurgischen Patienten hyperglykämie Stoffwechsellagen beobachtet, da es durch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems als endogene Stressreaktion zu einer Steigerung der Glukoseproduktion in Leber und Niere kommt. Im Vergleich zu anderen kardiovaskulären Komorbiditäten, wie zum Beispiel Hypertonie oder Hyperlipidämie, ist die Hyperglykämie im perioperativen Setting jedoch ein medikamentös gut und zeitnah behandelbarer Risikofaktor. Unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz auf das Outcome und die hohe Prävalenz bei herzchirurgischen Patienten stellt die Hyperglykämie, mit oder ohne vorbestehendem Diabetes mellitus, einen entscheidenden Einflussfaktor im Kontext der Kardioprotektion dar.<sup>57</sup> In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der Diabetes mellitus und die Hyperglykämie zu einer Blockierung verschiedener ischämischer und pharmakologischer Konditionierungsstrategien führt.<sup>58-60</sup> Die zugrundeliegenden Mechanismen der Hyperglykämie-induzierten Hemmung kardioprotektiver Signalkaskaden ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

## 5. Fragestellung

Da die Translation der Kardioprotektion in das klinische Setting weiterhin unzureichend bleibt, bedarf es der Weiterentwicklung von Konditionierungsstrategien sowie Untersuchung von relevanten Einflussfaktoren in diesem Kontext. Um die Kenntnisse zugrundeliegender Signaltransduktionswege pharmakologischer Konditionierung sowie den Einfluss akuter und chronischer hyperglykämischer Stoffwechsellagen weiter zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Habilitationsschrift folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet:

- 1) Wird die Mannitol-induzierte Prä- und Postkonditionierung über mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle vermittelt?
- 2) Welche intrazelluläre Signalkaskaden sind den  $mK_{ATP}$ -Kanälen bei der Konditionierung mit Mannitol vorgeschaltet? Welche Bedeutung haben in diesem Kontext der Adenosin Rezeptor und die Proteinkinase B und G?
- 3) Welchen Einfluss hat eine akute Hyperglykämie auf die Prä- und Postkonditionierung mittels Dexmedetomidin?
- 4) Führt eine akute Hyperglykämie zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Levosimendan-induzierten Postkonditionierung? Kann diese Blockade der Protektion durch eine Kombinationstherapie mit Cyclosporin A wiederhergestellt werden?
- 5) Wie beeinflusst der Diabetes mellitus und / oder eine akute Hyperglykämie das Myokard und / oder die Freisetzung humoraler Faktoren nach ischämischer Fernpräkonditionierung?

## II Methodik

Die dieser Schrift zugrundeliegenden Versuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG i.V.m. § 33 TierSchVersV durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigt (Aktenzeichen *in vitro*: O27/12 und *in vivo*: 84-02.04.2015.A514). Die Durchführung aller Versuche erfolgte entsprechend dem Leitfaden für Pflege und Verwendung von Labortieren („*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“, NIH-Publikationsnummer 85-23, revidiert 1996).

Im Rahmen der Studien dieser Schrift wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten im Alter von zwei bis drei Monaten eingesetzt. Die Unterbringung erfolgte bis zum Beginn der Experimente in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben Düsseldorf (ZETT).

### 1. *In vivo* Modell – Ischämische Fernkonditionierung

Im Rahmen der unter V 1.1 bis 1.3 beschriebenen Studie wurde die ischämische Fernkonditionierung mittels bilateraler Hintergliedmaßen-Ischämie an jungen männlichen Wistar Ratten *in vivo* durchgeführt.<sup>61</sup>

Zu Beginn der Versuche erfolgte die Einleitung der Narkose durch intraperitoneale Applikation von 80 mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Deutschland). Die Ratten wurden für den chirurgischen Eingriff auf eine Heizplatte in Rückenlage gelegt und die Körpertemperatur mittels Rektalsonde während des gesamten Versuchsablaufs überwacht. Unter Narkose wurden die Versuchstiere durch einen ventralen Hautschnitt tracheotomiert und anschließend über einen 16-Gauge-Katheter mechanisch beatmet (Atemfrequenz 85 /min, Tidalvolumen 2,5 ml, 30% Sauerstoff und 70% Stickstoff). Die Durchführung regelmäßiger Blutgasanalysen diente der Überwachung einer adäquaten Oxygenierung und Ventilation während des gesamten *in vivo* Experimentes. Nach erfolgreicher Intubation wurden sowohl die rechte A. carotis zum hämodynamischen Monitoring als auch die linke V. jugularis als venöser Zugang kanüliert. Im Anschluss konnte die Vollnarkose mit kontinuierlicher Applikation von Pentobarbital (40 mg/kg KG/h) weitergeführt werden.

Zur Durchführung des RIPC-Manövers wurden den Ratten modifizierte Blutdruckmanschetten an beide Hintergliedmaße angelegt. Durch Aufpumpen beider Manschetten auf 200 mmHg wurde die fünfminütige bilaterale Hintergliedmaßen-Ischämie induziert. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Reperfusion. Es wurden insgesamt vier Zyklen dieses RIPC-Manövers durchgeführt. Eine adäquate Ischämie wurde über die sichtbare Zyanose der Gliedmaßen verifiziert. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche chirurgische Prozedur (Intubation und Kanülierung), jedoch ohne Aufpumpen der Blutdruckmanschetten. Fünf Minuten nach der letzten Reperfusion wurden allen Versuchstieren 10 ml arterielles Blut entnommen, dieses zentrifugiert und das Plasma für die weitere Behandlung bei -80°C gelagert.

## 2. *In vitro* Modell – Ischämie und Reperfusionsschaden

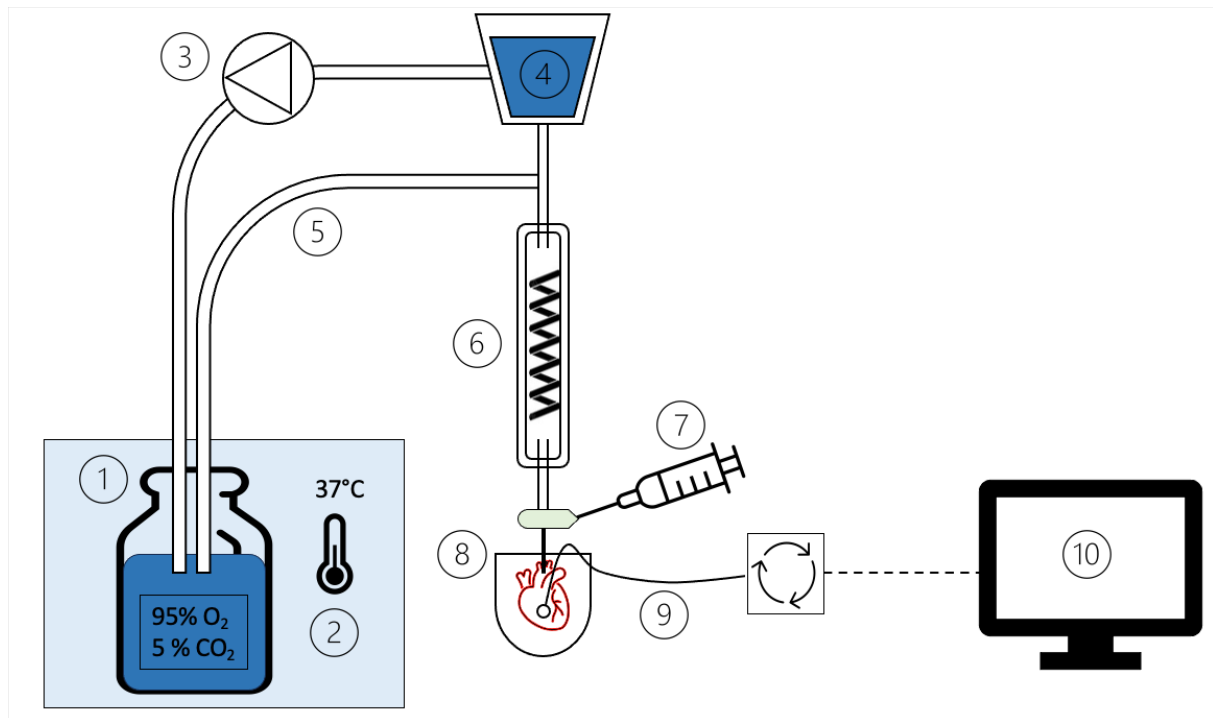
Für die *in vitro* Untersuchungen des Ischämie und Reperfusionsschaden wurde das isolierte Rattenherz Modell an der Langendorff-Anlage gewählt.<sup>62-64</sup>

Zu Beginn der Experimente wurden die männlichen Wistar Ratten (zwei bis drei Monate alt) durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (80 mg/kg KG, Narcoren®, Merial, Deutschland) betäubt und anschließend dekapitiert. Um eine Thrombosebildung zu verhindern, wurde dem Pentobarbital zusätzlich 1000 IE unfraktioniertes Heparin zugesetzt. Mittels medianer Thorakotomie wurden die Herzen entnommen und über eine Kanüle an die Langendorff-Apparatur konnektiert. Die isolierten Herzen wurden unter konstantem Druck (80 mmHg) und Temperatur (37°C) retrograd mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) (Zusammensetzung: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,52 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM Glukose und 1 mM Laktat), angereichert mit Carbogen, perfundiert. Durch die Zusammensetzung des KHP in Kombination mit der Mischung von 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> konnte ein stabiler physiologischer pH-Wert und eine adäquate Oxygenierung der Herzen gewährleistet werden. Zur Messung der hämodynamischen Parameter wurde ein mit Kochsalzlösung gefüllter Ballon über Eröffnung des linken Vorhofohrs in den linken Ventrikel eingeführt und der enddiastolische Druck auf 4-6 mmHg eingestellt.

Alle Parameter wurden über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich gemessen, mit einem Analog-Digital-Wandler (PowerLab/8SP) digitalisiert und mit LabChart 8.0 für Windows (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet. Folgende Variablen wurden bei allen Experimenten bestimmt:

<b>Parameter</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Einheit</b>
Linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDP	mmHg
Linksventrikulärer endsystolischer Druck	LVESP	mmHg
Linksventrikulärer entwickelter Druck; berechnet: LVDP = LVESP-LVEDP	LVDP	mmHg
Herzfrequenz	HF	Bpm
Zeitpunkt der maximalen Ischämie Kontraktur		min
Druckmaximum der Ischämie Kontraktur		mmHg
Maximale Anstiegsgeschwindigkeit des LVDP	dP/dt max.	

Neben den hämodynamischen Parametern erfolgte zudem die Messung des Koronarflusses mittels Sammlung des Effluates (Durchfluss des Puffers durch das Herz) über jeweils eine Minute. Der Koronarfluss wurde zum einen zur Berechnung der Perfusor-Lauftrate für die Medikamentendosierung zum anderen zur Bestimmung von Glukosewerten im Rahmen der Hyperglykämie Untersuchungen genutzt.<sup>65</sup>



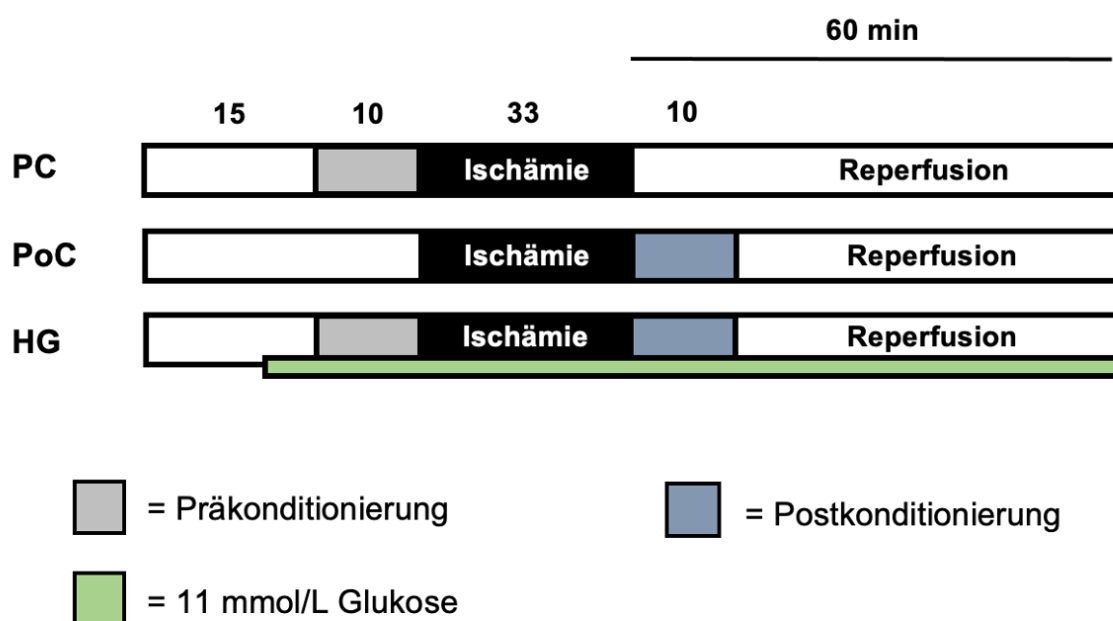
**Abbildung 4** Langendorff-Apparatur (nicht maßstabsgetreu): Der Krebs-Henseleit-Puffer (1) wird mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) angereichert. Um den KHP auf 37°C zu heizen, befindet sich der Puffer in einem Wasserbad (2) mit kontinuierlicher Temperaturmessung. Über eine Roller-Schlauchpumpe (3) wird der KHP aus dem Behälter angesaugt und über eine zwischengeschaltete Wasserfalle (4) in die Anlage befördert. Der überschüssige Puffer wird über ein Ablaufbecken zurück in den KHP-Behälter geführt (5). Eine Heizspirale (6) ist vor das Herz vorgeschaltet, um die konstante Puffer-Temperatur von 37°C im Herzen zu gewährleisten. Die Applikation der Medikamente erfolgt über einen Perfusor und einen Drei-Wege-Hahn (7). Das isolierte Herz (8) ist über eine Kanüle in der Aorta ascendens mit der Anlage verbunden. Mithilfe eines flüssigkeitsgefüllten Ballons im linken Ventrikel (9) werden die hämodynamischen Parameter erhoben und auf einen Computer (10) digitalisiert.

### 3. Experimentelles *in vitro* Protokoll

In diesem Kapitel soll das Versuchsprotokoll der *in vitro* Versuche in seinen Grundzügen dargestellt werden. Im Detail finden sich die einzelnen Versuchsprotokolle unter den Darstellungen der jeweiligen Studien (siehe III bis V).

Für die Durchführung aller Studien wurden die Versuchstiere zu Beginn in die verschiedenen experimentellen Gruppen randomisiert. Alle Herzen durchliefen standardisiert eine mindestens 15-minütige Phase der Adaptation, eine 33-minütige globale Ischämie und eine 60-minütige Reperfusion. Die globale Ischämie wurde initiiert, indem die Perfusion mit KHP gestoppt und das Herz mit Stickstoff gesättigtem KHP umgeben wurde. Für die Reperfusion wurde dieses Ischämie-Bad entfernt und die druckkontrollierte Perfusion mit KHP wiederhergestellt.

Die zu untersuchenden Medikamente wurden mittels Perfusor und Drei-Wege-Hahn auf die isolierten Herzen appliziert. Um die entsprechende Medikamenten-Endkonzentration am Herzen zu erzielen, wurde eine Flussrate der Perfusoren von 1% des Koronarflusses (gemessen aus dem Effluat) eingestellt. Für die Durchführung einer Präkonditionierung wurden die Medikamente über einen Zeitraum von 5 bis 10 Minuten vor Beginn der globalen Ischämie appliziert. Eine Postkonditionierung wurde erzielt, indem die Medikamente über 10 Minuten unmittelbar nach Beginn der Reperfusion verabreicht wurden. Die Kontrollgruppen erhielten KHP als Vehikel, um ein vergleichbares appliziertes Volumen der verschiedenen Versuchsgruppen zu gewährleisten. In den Studien zur Untersuchung von hyperglykämischen Bedingungen erfolgte zusätzlich die Applikation einer 11 mmol/L Glukose-Lösung über einen separaten Perfusor. Um eine akute Hyperglykämie mit Glukosewerte > 400 mg/dl zum Behandlungszeitpunkt zu erzielen, wurde die Glukose-Lösung 5 Minuten vor Beginn der Präkonditionierung bzw. vor der Ischämie gestartet.



**Abbildung 5** Experimentelles Protokoll Schema. PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung, HG = Hyperglykämie.

#### 4. Infarktgrößenbestimmung

Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Herzen von der Langendorff-Anlage entfernt, bei -20°C über Nacht eingefroren und anschließend in 8 transversale Scheiben pro Herz (2mm pro Scheibe) geschnitten. Für die Infarktgrößenbestimmung als primärer Endpunkt erfolgte die Färbung der Herzscheiben mit 0,75% Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Lösung bei 37°C.<sup>66</sup> Die Färbung basiert auf einer Redoxreaktion, die durch Dehydrogenasen in vitalen Zellen katalysiert wird. Hier kommt es zu einer Reduktion des farblosen Tetrazolium zu rotem Formazan, wodurch sich vitales Gewebe rot zeigt, während nekrotisches Gewebe ungefärbt bleibt. Im Anschluss wurden die Herzscheiben für 24h in Formaldehyd-Lösung fixiert und mittels eines hochauflösenden Fotoscanner digital erfasst.

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte durch einen verblindeten Untersucher mit Hilfe der Planimetrie Software SigmaScan Pro (SPPS Science Software, Chicago, USA). Die Infarktgröße der einzelnen Herzscheiben wurde jeweils als prozentualer Anteil der Infarktfläche in Bezug auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels beschrieben.

### III Pharmakologische Konditionierung – Untersuchung bei Normoglykämie

Die pharmakologische Konditionierung gilt als vielversprechender Ansatz für eine erfolgreiche Translation kardioprotektiver Strategien in das klinische Setting. Neben der geringeren Invasivität im Vergleich zur ischämischen Konditionierung bietet der Einsatz von klinisch etablierten Pharmaka den großen Vorteil, dass mögliche Nebenwirkungen bereits untersucht wurden und ein für Patienten sicherer Einsatz der Substanz möglich ist. In den Studien dieser kumulativen Arbeit wurden daher Substanzen eingesetzt, die bereits routinemäßig in der perioperativen Kardioanästhesie, also bei Patienten, die maßgeblich von einer myokardialen Protektion profitieren würden, angewendet werden. Im Folgenden werden diese Pharmaka im Kontext der Kardioprotektion näher beleuchtet.

#### 1. Mannitol

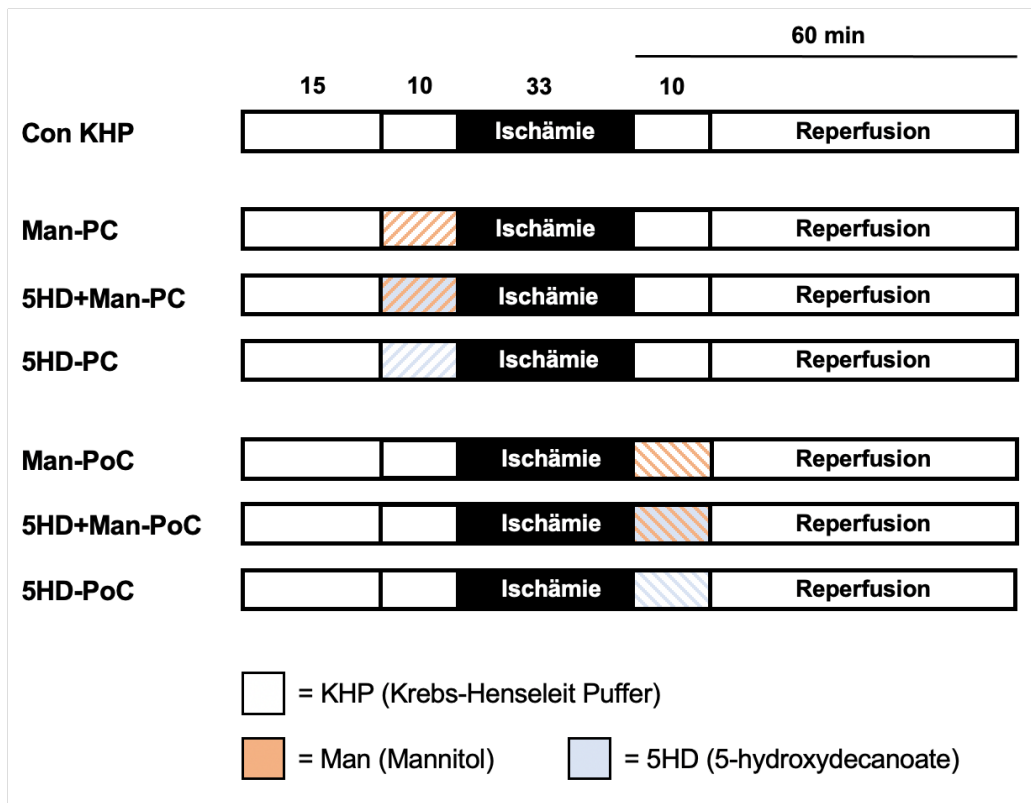
Das osmotische Diuretikum Mannitol ist der natürlich vorkommende Zuckeralkohol der Mannose und wird in der Klinik aufgrund seiner hyperosmolaren Eigenschaften eingesetzt.<sup>67,68</sup> Die Substanz wird in der Niere glomerulär filtriert und tubulär kaum resorbiert, wodurch sich der osmotische Druck im Tubulussystem erhöht und eine osmotische Diurese erzielt wird. Durch eine intravenöse Applikation kommt es zudem zu einer Erhöhung der Plasmaosmolalität und damit zu einer Umverteilung von Flüssigkeit aus dem Extrazellularraum nach intravasal.<sup>69</sup> Diese Eigenschaften werden sich bei der Therapie von Hirnödemen zu Nutze gemacht, insbesondere da Mannitol bei intakter Blut-Hirn-Schranke diese nicht passiert.<sup>70,71</sup> Neben der Senkung des intrakraniellen Druckes findet Mannitol auch bei der Prophylaxe der akuten prärenalen Niereninsuffizienz und im Bereich der Kardiochirurgie Anwendung.<sup>72</sup> Hier konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation von Mannitol zu einer Verbesserung der koronaren Perfusion und des Herzzeitvolumens, einer gesteigerten myokardialen Kontraktion und einer Steigerung des mittleren arteriellen Druckes führt.<sup>67</sup> Auch konnte in einigen experimentellen Studien ein protektiver Einfluss von Mannitol auf den myokardialen I/R-Schaden demonstriert werden.<sup>73</sup> Diese kardioprotektiven Effekte wurden vornehmlich mit den hyperosmolaren Eigenschaften des Medikamentes begründet.<sup>74,75</sup>

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Mannitol-induzierten Kardioprotektion, insbesondere auch der Bezug zu bekannten myokardialen Signalkaskaden, waren bisher jedoch unbekannt. Vor dem Hintergrund, dass Mannitol bereits routinemäßig im perioperativen Setting, auch bei kardial vorerkrankten Patienten, eingesetzt wird und hier positive Effekte auf die Nieren- und Herzfunktion zeigt, ist die Forschung im Bereich der Mannitol-induzierten Kardioprotektion von großer Bedeutung.

### 1.1. Mediatoren der Mannitol-induzierten Kardioprotektion

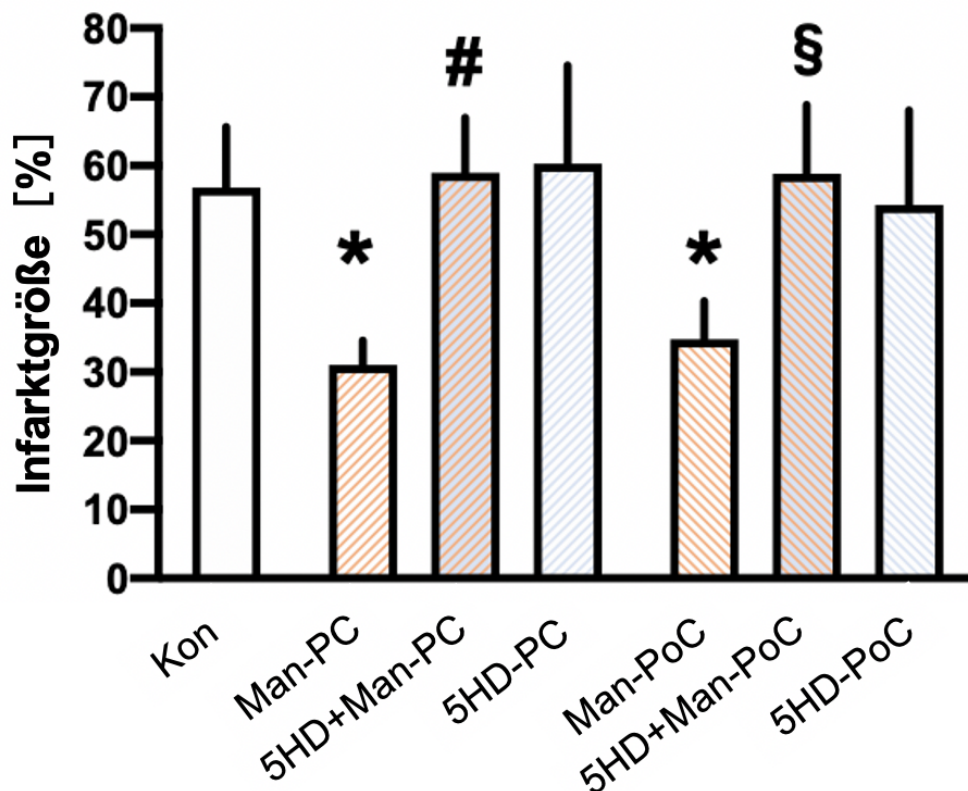
In Anbetracht der vorteilhaften Eigenschaften von Mannitol auf die Organprotektion wurde in der ersten Studie untersucht, ob das Medikament einen myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden im Sinne einer klassischen Prä- und / oder Postkonditionierung reduzieren kann.<sup>76</sup> Die Untersuchungen wurden am Modell des isoliert-perfundierten Rattenherz an der Langendorff-Anlage durchgeführt (im Detail siehe II, Abbildung 4). Mannitol wurde hierzu für 10 Minuten vor einer globalen Ischämie als Präkonditionierung oder zu Beginn der Reperfusion für 10 Minuten als Postkonditionierung appliziert. Auf der Grundlage experimenteller Vorstudien zu dieser Substanz wurde für die Studie eine Mannitol Konzentration von 11 mmol/L gewählt.<sup>65</sup> Umgerechnet entspricht die Konzentration einer klinischen Dosierung von 1g/kg KG Mannitol und ist damit in Einklang mit der verwendeten Medikamentendosis im klinischen Setting.

In einem zweiten Schritt sollten die  $mK_{ATP}$ -Kanäle als mögliche Mediatoren der Mannitol-induzierten Kardioprotektion untersucht werden. Die Hypothese, dass  $mK_{ATP}$ -Kanäle Teil dieser Signalkaskade sind, beruht auf der bekannten Beteiligung dieser mitochondrialen Kanäle an einer Vielzahl pharmakologischer Konditionierungsstrategien.<sup>77</sup> Zur Überprüfung der Hypothese wurde Mannitol (als Prä- und Postkonditionierung) mit dem selektiven  $mK_{ATP}$ -Kanal-Blocker 5-*hydroxydecanoate* (5HD) kombiniert. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass dieser selektive Inhibitor zu einer vollständigen Blockade  $mK_{ATP}$ -Kanal vermittelter kardioprotektiver Strategien führt.<sup>78</sup> Zum Ausschluss eines Einfluss von 5HD selbst auf den myokardialen I/R-Schaden wurde die Substanz zudem in separaten Gruppen auch einzeln appliziert.



**Abbildung 6** Mediatoren der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Experimentelles Protokoll. Modifiziert nach Feige et al.<sup>76</sup> Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, Man = Mannitol, 5HD = 5-hydroxydecanoate, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Mannitol sowohl als Prä- (Man-PC  $31 \pm 4\%$  vs. Kon  $57 \pm 9\%$ ,  $p < 0,05$ ) als auch als Postkonditionierung (Man-PoC  $35 \pm 6\%$  vs. Kon  $57 \pm 9\%$ ,  $p < 0,05$ ) zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße nach globaler Ischämie führt und damit das Herz gegen einen myokardialen I/R-Schaden schützt. Darüber hinaus scheinen diese kardioprotektiven Eigenschaften über die Aktivierung mitochondrialer  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt zu werden. Die Kombination von Mannitol und dem Kanalblocker 5HD führte zu einer vollständigen Aufhebung der Infarktgrößenreduktion bei der Prä- (5HD-PC+Man-PC  $59 \pm 8\%$ ,  $p < 0,05$  vs. Man-PC) und Postkonditionierung (5HD-PoC+Man-PoC  $59 \pm 10\%$ ,  $p < 0,05$  vs. Man-PoC).

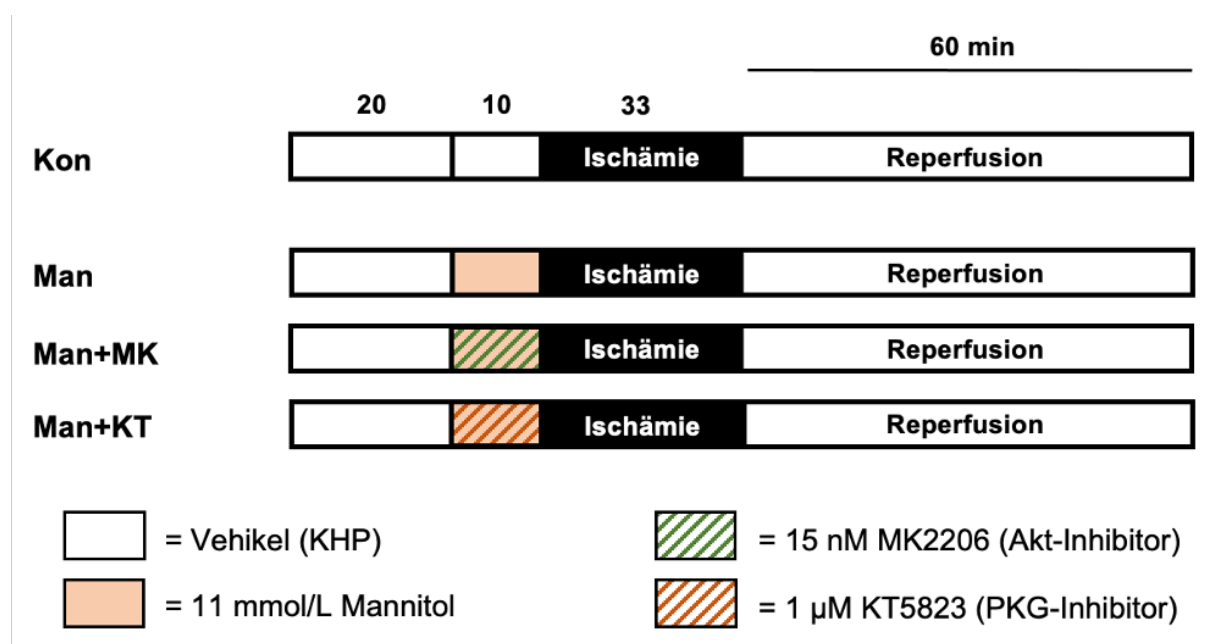


**Abbildung 7** Mediatoren der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Infarktgrößen. Modifiziert nach Feige et al.<sup>76</sup> Kon = Kontrolle, Man = Mannitol, 5HD = 5-hydroxydecanoate, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung. \*P<0,05 vs. Kontrolle, #P<0,05 vs. Man-PC, §P<0,05 vs. Man-PoC.

### 1.2. Intrazelluläre Signalkaskaden der Mannitol-induzierten Kardioprotektion

In der zuvor beschriebenen Studie konnte herausgearbeitet werden, dass die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol über die  $mK_{ATP}$ -Kanäle vermittelt werden.<sup>76</sup> Die vorgeschalteten extra- und intrazellulären Signalkaskaden bleiben jedoch ungeklärt. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass das Medikament Mannitol im extrazellulären Raum verbleibt und damit nicht selbst intrazellulär wirksam werden kann. Damit stellt sich die Frage über welche Mechanismen die Substanz ihre intrazellulären Effekte vermittelt. Wie in Abschnitt I.3 beschrieben gelten der RISK und NO/PKG Signalweg als wichtige Kaskaden bei der Vermittlung verschiedener pharmakologischer Konditionierungsstimuli. Mediatoren dieser Signalwege sind verschiedene Proteinkinasen, wie die Proteinkinase B (Akt) und G (PKG), die wiederum  $mK^+$ -Kanäle aktivieren.<sup>26</sup> Basierend auf diesem Wissen stellt sich die Frage, ob diese Proteinkinasen auch die Mannitol-induzierte Kardioprotektion vermitteln.

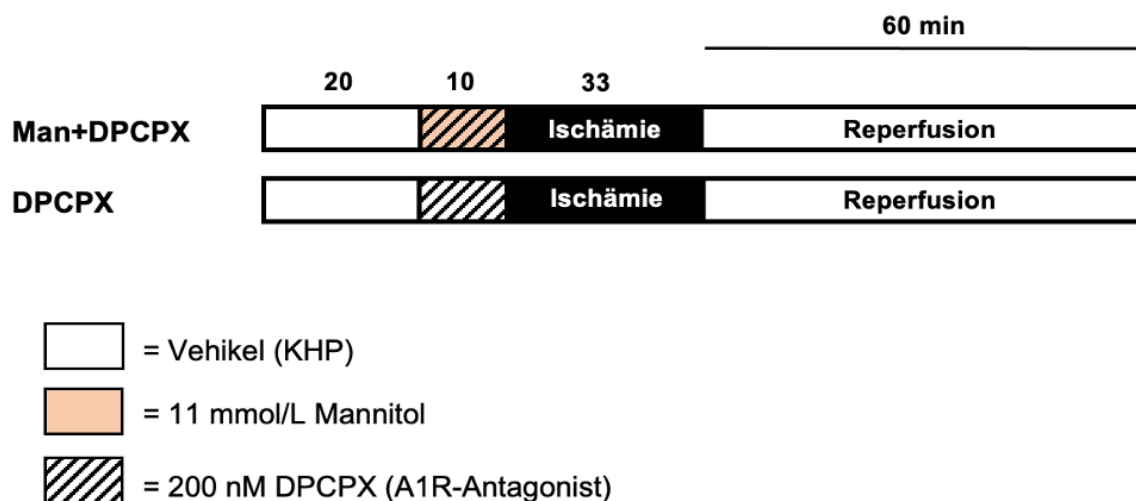
Für die Untersuchung der Hypothesen in dieser Studie wurde ebenfalls das isoliert-perfundierte Rattenherz an der Langendorff-Anlage genutzt.<sup>79</sup> Der Versuchsaufbau und die Dosierung von Mannitol als Präkonditionierung entsprechen dem in der unter III.1.1 beschriebenen Vorstudie.<sup>76</sup> Für die Untersuchung der beteiligten Proteinkinasen wurde Mannitol in Kombination mit einem selektiven Akt-Blocker (MK2206) oder PKG-Blocker (KT5823) appliziert. In verschiedenen Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die hier gewählte Konzentration der Inhibitoren zu einer suffizienten Blockade der respektiven Proteinkinasen führt.<sup>80,81</sup> Zudem wurde in Vorstudien ausgeschlossen, dass die Inhibitoren in dieser Konzentration einen Einfluss auf andere Proteinkinasen haben.



**Abbildung 8** Intrazelluläre Signalkaskaden der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Experimentelles Protokoll Teil 1. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>79</sup> Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, Man = Mannitol, MK = MK2206 (Akt-Inhibitor), KT = KT5823 (PKG-Inhibitor).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind integrale Membranproteine, die unter anderem in Kardiomyozyten exprimiert werden.<sup>82</sup> Verschiedene Substanzen, wie Adenosin, führen zu einer Aktivierung dieser Rezeptoren, worüber extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre Signale umgewandelt und somit kardioprotektive Kaskaden stimuliert werden.<sup>83,84</sup>

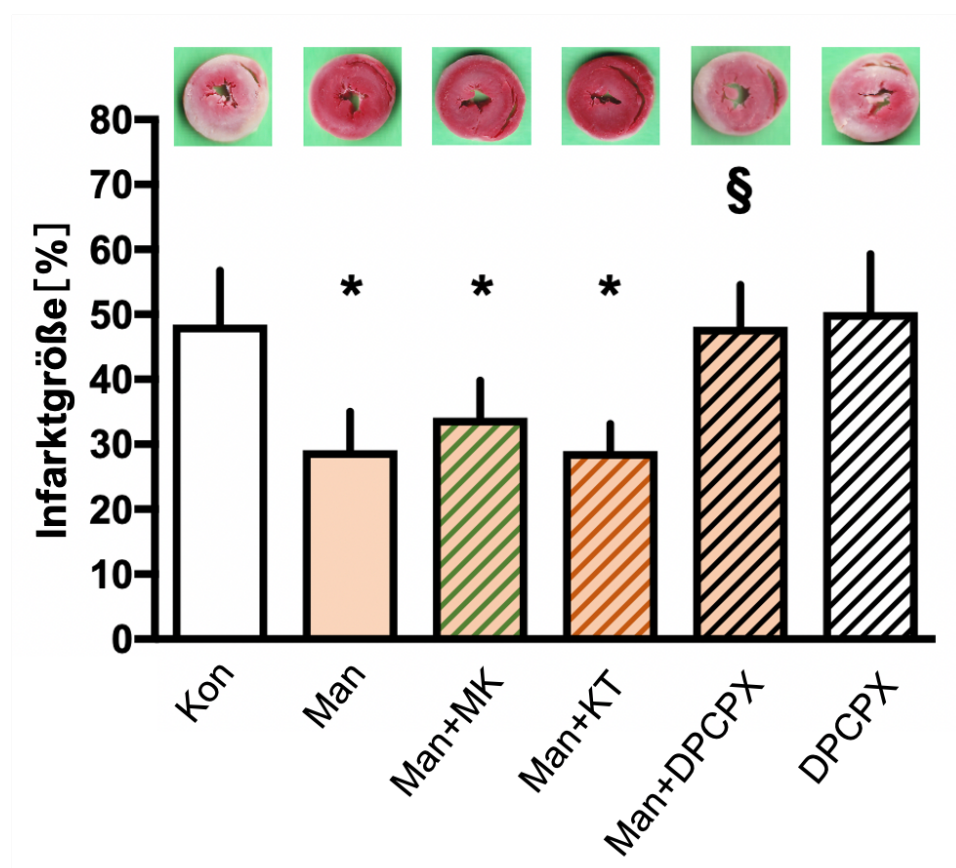
Der Adenosin-1-Rezeptor (A1R) vermittelt nicht nur relevante kardiovaskuläre Funktionen wie die Herzfrequenz und Kontraktionskraft, sondern auch verschiedene Konditionierungsstimuli über die Aktivierung des RISK und NO/PKG Signalweges.<sup>85,86</sup> Sowohl die Proteinkinase B als auch  $mK_{ATP}$ -Kanäle werden nach Stimulation des A1R aktiviert. Darüber hinaus konnte in Nierenzellen gezeigt werden, dass eine Applikation von Mannitol zu einer gesteigerten Expression und Aktivierung des A1R mit darauffolgender Nephroprotektion führt.<sup>87</sup> Da der A1R auch in Kardiomyozyten exprimiert wird, wurde in dieser Studie untersucht, ob die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol intrazellulär über Aktivierung dieses Adenosin-Rezeptors vermittelt werden. Hierfür wurde in einer weiteren Gruppe das Osmodiuretikum Mannitol mit dem A1R-Blocker *8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine* (DPCPX) kombiniert.<sup>88</sup> Um einen potenziellen Einfluss des Inhibitors auf die Infarktgrößen auszuschließen, wurde DPCPX zudem in einer Gruppe einzeln appliziert.



**Abbildung 9** Intrazelluläre Signalkaskaden der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Experimentelles Protokoll Teil 2. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>79</sup> KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, Man = Mannitol, DPCPX = 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (A1R-Antagonist).

Die in unserer Vorstudie beschriebene Mannitol-induzierte Kardioprotektion konnte in dieser Studie reproduziert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde durch die Präkonditionierung mit Mannitol eine signifikante Infarktgrößenreduktion erzielt (Man 29±6% vs. Kon 48±8%,  $p < 0,05$ ).

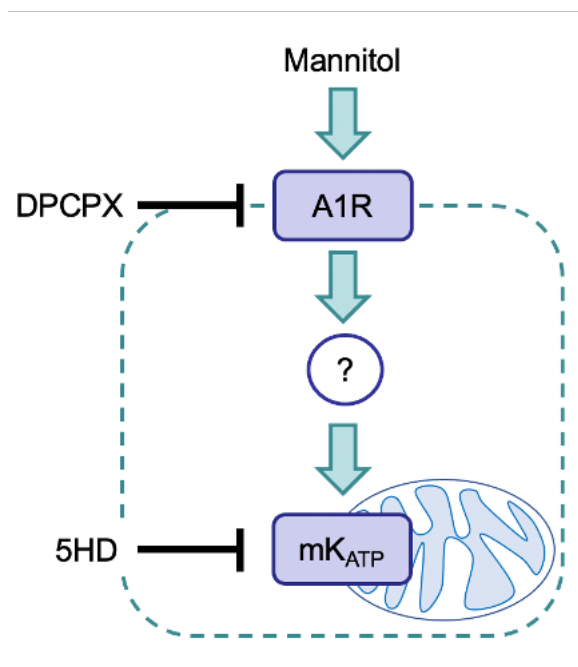
Die Kombination von Mannitol mit dem selektiven A1R-Blocker DPCPX führte zu einer vollständigen Aufhebung der Infarktgrößenreduktion (Man+DPCPX 48±6%,  $p < 0,05$  vs. Man). Daraus lässt sich schließen, dass Mannitol seine kardioprotektiven Eigenschaften über die Aktivierung des Adenosin-1-Rezeptors vermittelt. Interessanterweise und entgegen der initialen Hypothese, scheinen weder die Proteinkinase B noch G hauptverantwortlich für die Mannitol-induzierte Präkonditionierung zu sein. Die kombinierte Gabe von Mannitol mit einem Proteinkinase B (MK2206) oder G (KT5823) Blocker hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße im Vergleich zur alleinigen Gabe von Mannitol (Man+MK 34±6% vs. Man und Man+KT 29±4% vs. Man, beide nicht signifikant (ns)).



**Abbildung 10** Intrazelluläre Signalkaskaden der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>79</sup> Kon = Kontrolle, Man = Mannitol, MK = MK2206 (Akt-Inhibitor), KT = KT5823 (PKG-Inhibitor) DPCPX = 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (A1R-Antagonist). \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle, § $P < 0,05$  vs. Man.

### 1.3. Schlussfolgerung Mannitol

Mit den von uns durchgeführten zwei Studien konnte herausgearbeitet werden, dass die Mannitol-induzierte Kardioprotektion über den Adenosin-1-Rezeptor und über die nachgeschaltete Aktivierung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen vermittelt wird.<sup>76,79</sup> Zudem zeigte sich, dass die zwei bekannten Proteinkinasen B und G als Teil des RISK und NO/PKG Signalweges nicht an der myokardialen Protektion durch Mannitol beteiligt sind.<sup>79</sup> Die Untersuchungen geben damit einen ersten Hinweis auf die intrazellulären Signalkaskaden der Kardioprotektion durch Mannitol. In der Zukunft bleibt zu klären, welche Mediatoren zwischen dem A1R und den  $mK_{ATP}$ -Kanälen wirksam sind. Ein denkbare Enzym an dieser Stelle ist die PKC, insbesondere die Isoform Epsilon ( $PKC\epsilon$ ).<sup>89,90</sup> Sowohl für ischämische als auch pharmakologische Konditionierungsstimuli konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von  $PKC\epsilon$  wiederum zur Aktivierung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen führt.<sup>91,92</sup> Interessanterweise scheint es auch einen Zusammenhang zwischen der  $PKC\epsilon$  und dem A1R zu geben. Basierend auf diesen Kenntnissen könnte die  $PKC\epsilon$  das noch fehlende und essenzielle Bindeglied zwischen dem A1R und den  $mK_{ATP}$ -Kanälen in der Mannitol-vermittelten Signalkaskade sein.<sup>89</sup>



**Abbildung 11** Signalkaskade der Mannitol-induzierten Kardioprotektion. A1R = Adenosin-1-Rezeptor, DPCPX = 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine,  $mK_{ATP}$  = mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal, 5HD = 5-hydroxydecanoate.

## IV Pharmakologische Konditionierung – Untersuchung bei Hyperglykämie

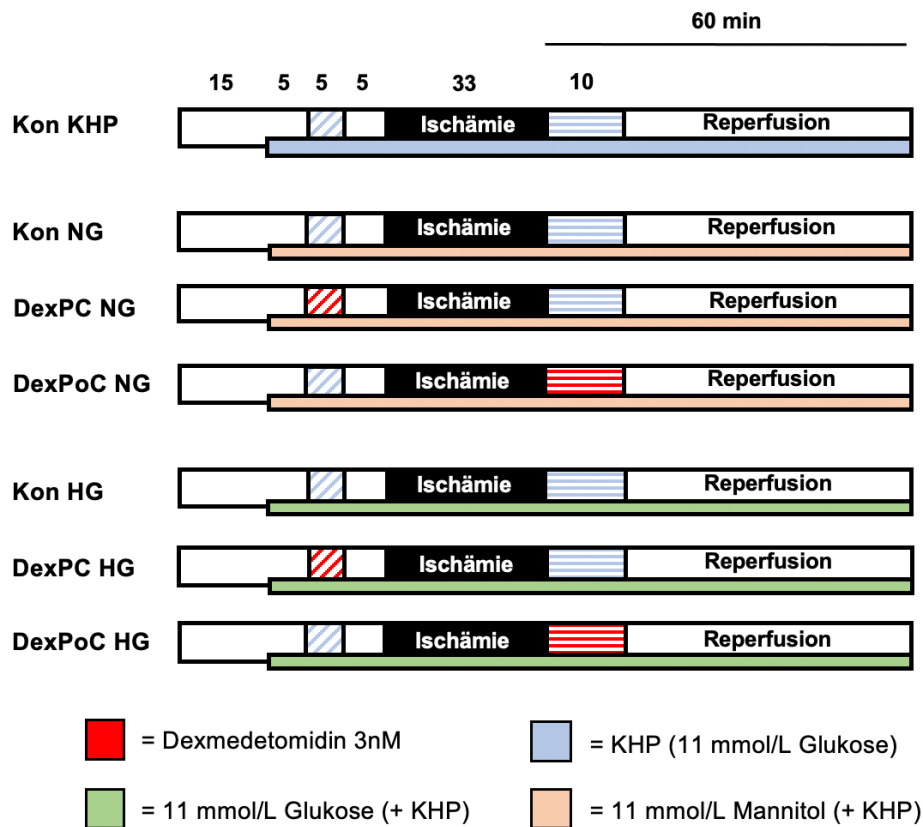
### 1. Dexmedetomidin

Dexmedetomidin bewirkt dosisabhängig über Aktivierung der zentralen alpha-2 ( $\alpha_2$ )-Rezeptoren eine Sedierung, Analgesie und Anxiolyse.<sup>93</sup> Im Vergleich zu anderen Sedativa zeigt Dexmedetomidin eine bessere Steuerbarkeit auch bei Langzeitanwendung und eine reduzierte Abhängigkeitsgefahr im Vergleich zu Opioiden. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Substanz perioperativ, insbesondere aber in der Intensivmedizin, als opiat-sparendes Sedativum eingesetzt.<sup>94</sup> In verschiedenen experimentellen Studien konnten für Dexmedetomidin zudem kardioprotektive Eigenschaften gezeigt werden.<sup>37,95,96</sup> Prä- und Postkonditionierung werden bei der Substanz über Aktivierung des RISK Signalweges sowie  $mK^+$ -Kanäle vermittelt.<sup>97-99</sup> Des Weiteren scheint Dexmedetomidin auch über microRNAs und damit die Regulierung der Genexpression auf dem transkriptionellen Level zu einer Reduktion der Apoptose zu führen<sup>97,100-102</sup>. Im Kontext der Kardioprotektion hat Dexmedetomidin einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Konditionierungsstrategien. Bisher musste die pharmakologische Postkonditionierung unmittelbar nach Beginn der Reperfusion eingeleitet werden, um eine myokardiale Protektion zu erzielen. Im Gegensatz hierzu sind die kardioprotektiven Eigenschaften von Dexmedetomidin unabhängig von dem Zeitpunkt und der Dauer der Gabe während der Reperfusion. Bunte und Kollegen konnten zeigen, dass auch eine 15-minütige Applikation der Substanz 45 Minuten nach Beginn der Reperfusion noch zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führt.<sup>37</sup> In der Studie gab es keine Unterschiede bezüglich des kardioprotektiven Effektes in Abhängigkeit von Applikationsdauer und -zeitpunkt. Die kardioprotektiven Effekte von Dexmedetomidin werden dabei je nach Zeitpunkt in der Reperfusion über unterschiedliche Endeffektoren vermittelt. In einer Vorstudie konnten wir zeigen, dass in der frühen Reperfusion eine Aktivierung des  $mK_{ATP}$  und  $mBK_{Ca}$  Kanals erfolgt, während die späte Postkonditionierung mit Dexmedetomidin nur über den  $mBK_{Ca}$  vermittelt wird.<sup>48</sup>

Bezüglich einer Übertragbarkeit in die Klinik ermöglicht diese Eigenschaft einen größeren Anwendungszeitraum, was wiederum deutlich flexiblere Therapieoptionen nach einem Myokardinfarkt bietet. Ebenfalls wurde der Einfluss verschiedener Komorbiditäten auf die Dexmedetomidin-vermittelte Kardioprotektion untersucht. Cheng et al. zeigten, dass eine Postkonditionierung mit Dexmedetomidin auch in Typ2 Diabetes mellitus (DM2) erkrankten Ratten zu einer myokardialen Protektion führt.<sup>96,103</sup> Des Weiteren scheint Dexmedetomidin seine kardioprotektiven Eigenschaften auch in Herzen mit koronarer endothelialer Dysfunktion zu vermitteln<sup>104</sup>. Damit bietet das Medikament einen interessanten Ansatz für die Translation der Kardioprotektion in klinische Studien.

#### 1.1. Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Kardioprotektion

In verschiedenen experimentellen Studien konnte Dexmedetomidin als vielversprechende Substanz für eine myokardiale Protektion nach einem I/R-Schaden herausgearbeitet werden.<sup>100</sup> Während die Dexmedetomidin-induzierte Konditionierung in Versuchstieren mit der chronisch-metabolischen Störung Diabetes mellitus bereits untersucht wurde, wurde der Einfluss einer akuten Hyperglykämie auf dieses Medikament bisher nicht beleuchtet. In dieser experimentellen Studie am isoliert perfundierten Rattenherz an der Langendorff-Anlage sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine akute Hyperglykämie die Dexmedetomidin-induzierte Prä- und / oder Postkonditionierung beeinflusst.<sup>65</sup> Die Studie wurde an 50 Rattenherzen durchgeführt, die in sieben experimentelle Gruppen randomisiert wurden. Dabei wurde in jeweils drei Gruppen die Prä- und Postkonditionierung mittels Dexmedetomidin unter Normoglykämie oder Hyperglykämie untersucht. Eine weitere Gruppe galt als Kontrollgruppe ohne Einsatz der zu untersuchenden Substanz.



**Abbildung 12** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Kardioprotektion. Experimentelles Protokoll. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>65</sup> Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, NG = Normoglykämie, HG = Hyperglykämie, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung, Dex = Dexmedetomidin.

Dexmedetomidin wurde in allen Gruppen (sowohl für die Prä-, als auch Postkonditionierung) in einer Konzentration von 3 nM appliziert. Diese Dosierung beruht auf Vorstudien zur Dosisfindung von Dexmedetomidin aus unserer Arbeitsgruppe.

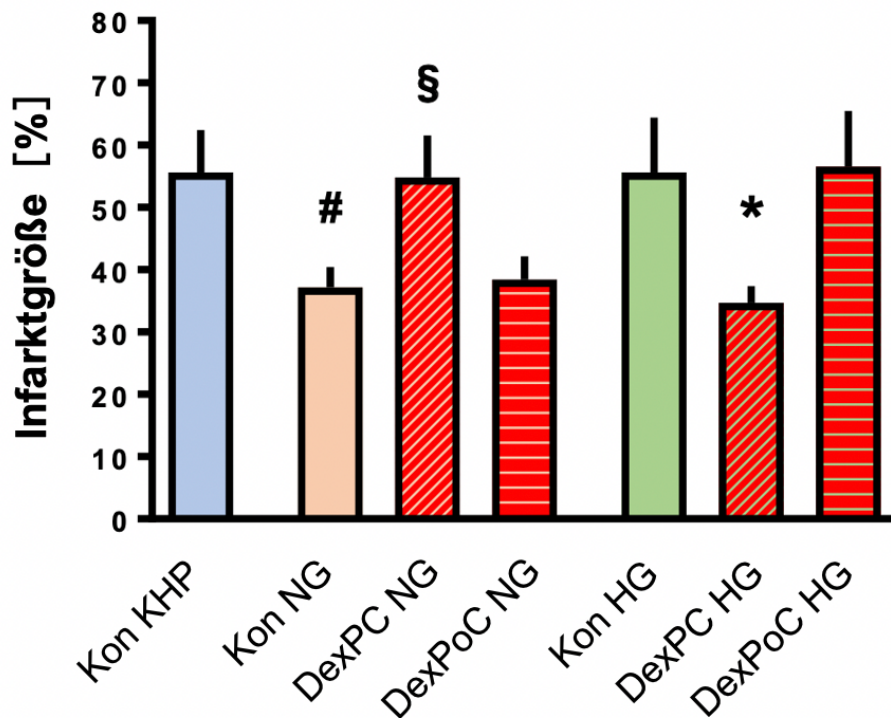
Die akute Hyperglykämie wurde mittels Applikation einer Glukose-Lösung in einer Konzentration von 11 mmol/L erreicht. Der Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), der bei der Langendorff-Methode zur Herzperfusion eingesetzt wird, beinhaltet bereits 11 mmol/L Glukose, sodass die isolierten Herzen in den hyperglykämischen Gruppen einer Gesamt-Glukosekonzentration von 22 mmol/L ausgesetzt wurden. Vor Beginn der Hyperglykämie sowie während des gesamten Experiments wurde bei allen Versuchsgruppen über das Effluat die Glukosekonzentration der Herzen gemessen. Durch die Gabe von 22 mmol/L Glucose wurde in den Hyperglykämie-Gruppen im Vergleich zu den Normoglykämie-Gruppen ein signifikanter Anstieg der Glukosewerte von über 400 mg/dl bis zum Ende der Reperfusion erreicht.

		Baseline	Reperfusion	
			Minute 15	Minute 60
KHP	Kon	198 ± 4	192 ± 7	192 ± 4
	Kon	200 ± 6	196 ± 6	196 ± 5
NG	DexPC	199 ± 5	196 ± 4	197 ± 9
	DexPoC	202 ± 4	201 ± 5	197 ± 4
HG	Kon	198 ± 6	390 ± 10*#	416 ± 45*#
	DexPC	203 ± 5	398 ± 13*\$	417 ± 20*\$
	DexPoC	199 ± 6	396 ± 10*\$	428 ± 14*\$

**Tabelle 1** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Kardioprotektion. Glukosekonzentration (mmol/L). Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>65</sup> Daten als Mittelwert ± SD. Kon = Kontrolle; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; NG = Normoglykämie; HG = Hyperglykämie; Dex = Dexmedetomidin; PC = Präkonditionierung; PoC = Postkonditionierung. \*P<0,05 vs. Baseline, #P<0,05 vs. Kon KHP und Kon NG, §P<0,05 vs. DexPC NG, \$P<0,05 vs. DexPoC NG.

Um eine vergleichbare Osmolarität in den normoglykämischen Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden die Herzen anstelle der 11 mmol/L Glukose-Lösung zusätzlich mit 11 mmol/L Mannitol behandelt. Damit wurden alle Herzen in den sechs Versuchsgruppen (Normoglykämie vs. Hyperglykämie) mit einer finalen Konzentration von 22 mmol/L Monosaccharid-Lösung (KHP plus Glukose oder KHP plus Mannitol) perfundiert.

Im Rahmen dieser Studie zeigte sich, dass eine akute Hyperglykämie keinen Einfluss auf die Dexmedetomidin-induzierte Präkonditionierung hat. Die Präkonditionierung mit Dexmedetomidin führt auch unter akuter Hyperglykämie zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Dex-PC HG 35±3% vs. Kon HG 56±9%, p < 0,0001). Im Gegensatz dazu wird der protektive Effekt der Postkonditionierung mit Dexmedetomidin durch eine Hyperglykämie vollständig aufgehoben (Dex-PoC HG 57±9%, ns vs. Kon HG).



**Abbildung 13** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Kardioprotektion. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>65</sup> Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, NG = Normoglykämie, HG = Hyperglykämie, Dex = Dexmedetomidin, PC = Präkonditionierung, PoC = Postkonditionierung. \*P<0,05 vs. Kontrolle KHP, §P<0,05 vs. Kon NG; #P<0,05 vs. Kon HG.

Interessanterweise zeigen die Infarktgrößen der Versuchsgruppen unter Normoglykämie ein genau gegensätzliches Ergebnis. Die Applikation von Mannitol, die in dieser Studie lediglich zum Ausgleich der Osmolarität eingesetzt wurde, führt zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion (Kon NG 37±3% vs. Kon KHP 56±7%, p = 0,0001). Dieses Studienergebnis bildete die Basis der unter 1.1.1 und 1.1.2 beschriebenen Folgestudien zur Mannitol-induzierten Konditionierung. Die gleichzeitige Gabe von Mannitol und Dexmedetomidin vor der Index-Ischämie zeigt keinen protektiven Effekt in Bezug auf die Infarktgröße (Dex-PC NG 55±7%, p = 0,0003 vs. Kon NG). Im Gegensatz dazu kann die Dexmedetomidin-induzierte Postkonditionierung auch unter Mannitol-Gabe eine Infarktgrößenreduktion bewirken (Dex-PoC NG 38±4%, ns vs. Kon NG).

## 1.2. Schlussfolgerung Dexmedetomidin

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie demonstrieren erneut, dass eine Behandlung mit Dexmedetomidin zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion nach einem I/R-Schaden führt. Die Dexmedetomidin-induzierte Postkonditionierung wird jedoch vollständig aufgehoben, wenn gleichzeitig eine akute Hyperglykämie vorliegt. Im Gegensatz hierzu scheint eine gesteigerte Glukosekonzentration keinen Einfluss auf die Präkonditionierung mit Dexmedetomidin zu haben.<sup>65</sup> Experimentelle Studien zur pharmakologischen Konditionierung mit volatilen Anästhetika zeigten ebenfalls eine Blockierung der kardioprotektiven Eigenschaften unter akuter Hyperglykämie.<sup>58,105,106</sup> Die durch volatile Anästhetika vermittelte Kardioprotektion beruht unter anderem auf den Mediatoren Akt und eNOS und ist damit bezüglich beteiligter Mediatoren vergleichbar mit der Dexmedetomidin-induzierten Konditionierung. Diese Mediatoren werden jedoch unter akuter Hyperglykämie vollständig aufgehoben.<sup>107-109</sup> Der Unterschied im Einfluss einer akuten Hyperglykämie auf die Prä- und Postkonditionierung mit Dexmedetomidin beruht möglicherweise auf der Dauer der Hyperglykämie zum Zeitpunkt der Konditionierung. Die gemessenen Glucosekonzentrationen unterscheiden sich zwar nicht zwischen der Prä- und Postkonditionierung, jedoch waren die isolierten Herzen zum Zeitpunkt der Präkonditionierung der Hyperglykämie lediglich fünf min ausgesetzt. Im Gegensatz hierzu herrschten zum Zeitpunkt der Postkonditionierung bereits für 48 min hyperglykämische Bedingungen im Herzen. Um den Einfluss der Dauer akuter Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Konditionierung zu untersuchen, werden weitere Folgestudien zum Zeitpunkt und Applikationsdauer von Glukose benötigt, die auch die Aktivierung der verschiedenen Mediatoren mit einbeziehen.

## 2. Levosimendan

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer Levosimendan wird als Inotropikum zur perioperativen Therapie der akuten oder chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt.<sup>110-112</sup> Über Bindung an das kardiale Troponin C erhöht die Substanz die Bindungsaffinität von  $\text{Ca}^{2+}$  und steigert damit die Kontraktilität des Myokards. In höheren Konzentrationen bewirkt Levosimendan zudem eine Hemmung der Phosphodiesterase 3, wodurch die Kontraktionskraft weiter gesteigert wird.<sup>113</sup> Im Gegensatz zu anderen Inotropika scheint Levosimendan vorteilhafte Effekte auf die Energiebilanz der Kardiomyozyten zu haben, da es zu keinem erhöhten Sauerstoffbedarf kommt.<sup>114</sup> Neben diesen klinischen Anwendungsbereichen konnte im Tiermodell ein kardioprotektiver Effekt von Levosimendan nach einem I/R-Schaden nachgewiesen werden.<sup>115,116</sup> Experimentelle Studien zeigen, dass eine Prä- und Postkonditionierung mit Levosimendan konzentrationsabhängig zu einer Infarktgrößenreduktion führt und diese Kardioprotektion überwiegend über den RISK Signalweg vermittelt wird.<sup>117</sup> Als Endeffektoren der Levosimendan-induzierten myokardialen Konditionierung konnten der  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ - und  $\text{mBK}_{\text{Ca}}$ -Kanal herausgearbeitet werden.<sup>116,118,119</sup> Matsumoto und Kollegen haben einen potenziellen Einfluss von Hyperglykämie auf die kardioprotektiven Eigenschaften von Levosimendan untersucht.<sup>120</sup> Die Ergebnisse der *in vivo* Studie zeigten, dass erhöhte Blutglukosewerte zu einer vollständigen Aufhebung der Infarktgrößenreduktion mittels Levosimendan führen. Interessanterweise konnte diese Blockade durch eine Steigerung der Levosimendan-Dosierung um das zehnfache überwunden werden. Die Autoren postulieren daher, dass eine Hyperglykämie zu einem angehobenen Schwellenwert für eine Levosimendan-induzierte Kardioprotektion führt. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Hemmung durch Hyperglykämie konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden.

## 2.1. Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Kardioprotektion

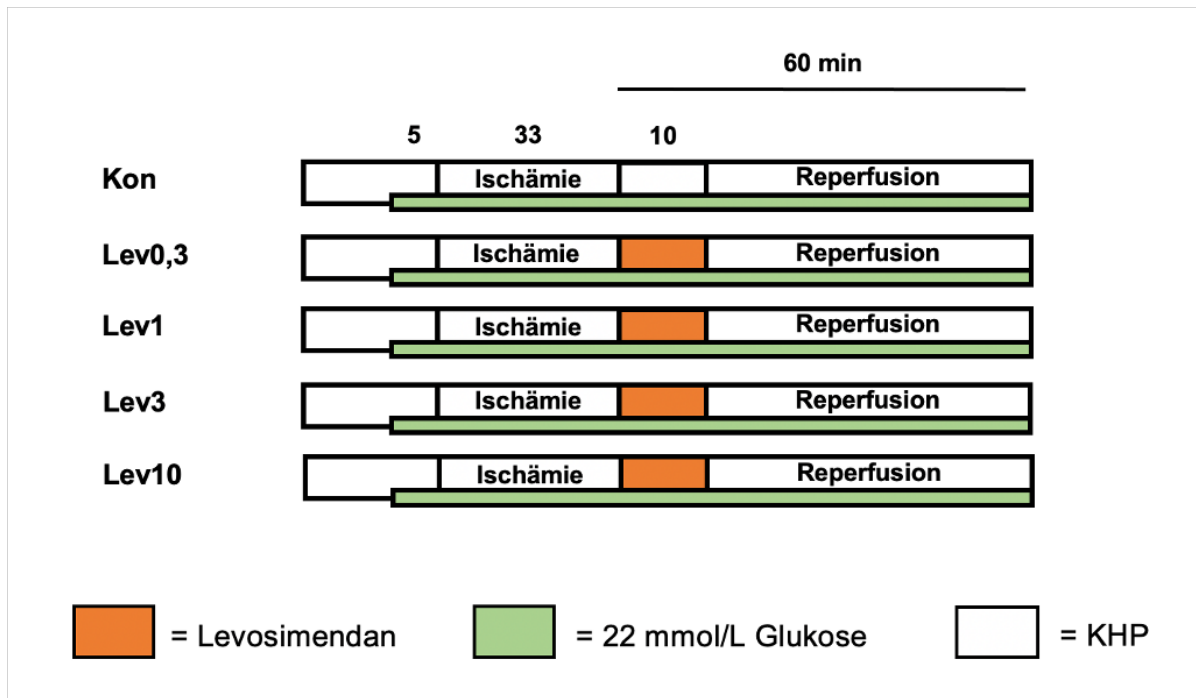
In experimentellen Vorstudien konnten die kardioprotektiven Eigenschaften des klinisch eingesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizers Levosimendan mittels Postkonditionierung bereits nachgewiesen werden.<sup>115,121</sup> Stroethoff et al. ermittelten eine Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  als niedrigste kardioprotektive Dosis im experimentellen Setting am isoliert perfundierten Rattenherz.<sup>116</sup> Diese Konzentration entspricht umgerechnet ca. 100  $\mu\text{g/L}$  Levosimendan im klinischen Setting. Eine weitere Steigerung der Levosimendan Konzentration führte hier zu keinem größeren Ausmaß der Infarktgrößenreduktion, während niedrigere Dosierungen von Levosimendan keinen kardioprotektiven Effekt hervorgerufen haben. Basierend auf diesen Daten, wurden in der Folgestudie zum Einfluss von Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung 0,3  $\mu\text{M}$  als Konzentration verwendet. Betrachtet man die zugrundeliegenden Mechanismen der Kardioprotektion mittels Levosimendan deuten die Ergebnisse von Matsumoto et al. auf eine Beteiligung der mPTP hin.<sup>120</sup> Interessanterweise konnten Huhn und Kollegen in einer Studie zur Sevofluran-induzierten Konditionierung zeigen, dass durch die Gabe des selektiven mPTP-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) die durch Hyperglykämie blockierte Kardioprotektion wieder aufgehoben wird.<sup>58</sup> Auf Grundlage dieser Voruntersuchungen stellt sich die Frage, ob eine akute Hyperglykämie die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung konzentrationsabhängig aufhebt und ob diese Blockade über die Regulation der mPTP wieder aufgehoben werden kann.

Diese Fragestellung wurde an isoliert perfundierten Herzen junger gesunder Wistar Ratten an der Langendorff-Anlage durchgeführt.<sup>122</sup> Die Etablierung der akuten Hyperglykämie erfolgte basierend auf dem experimentellen Protokoll der Vorstudie zu Dexmedetomidin (im Detail beschrieben unter IV.1.1). Alle Herzen wurden einer Gesamt-Glukosekonzentration von 22 mmol/L ausgesetzt und durchliefen das gleiche standardisierte experimentelle Protokoll.

		Baseline	Prä-Ischämie	Reperfusion	
				Minute 15	Minute 60
<b>Teil 1</b>					
	Kon	196 ± 5	370 ± 10*	394 ± 18*	425 ± 44*
	Lev0.3	197 ± 6	374 ± 37*	393 ± 11*	425 ± 28*
HG	Lev1	197 ± 2	360 ± 46*	389 ± 13*	409 ± 33*
	Lev3	197 ± 4	377 ± 10*	389 ± 32*	393 ± 41*
	Lev10	198 ± 3	372 ± 16*	377 ± 13*	400 ± 32*
<b>Teil 2</b>					
	Kon	203 ± 3	384 ± 6*	389 ± 12*	418 ± 35*
	Lev0.3	200 ± 9	378 ± 14*	392 ± 10*	441 ± 18*
HG	CsA	204 ± 10	377 ± 9*	390 ± 10*	425 ± 20*
	Lev0.3+CsA	203 ± 6	389 ± 8*	398 ± 5*	448 ± 35*

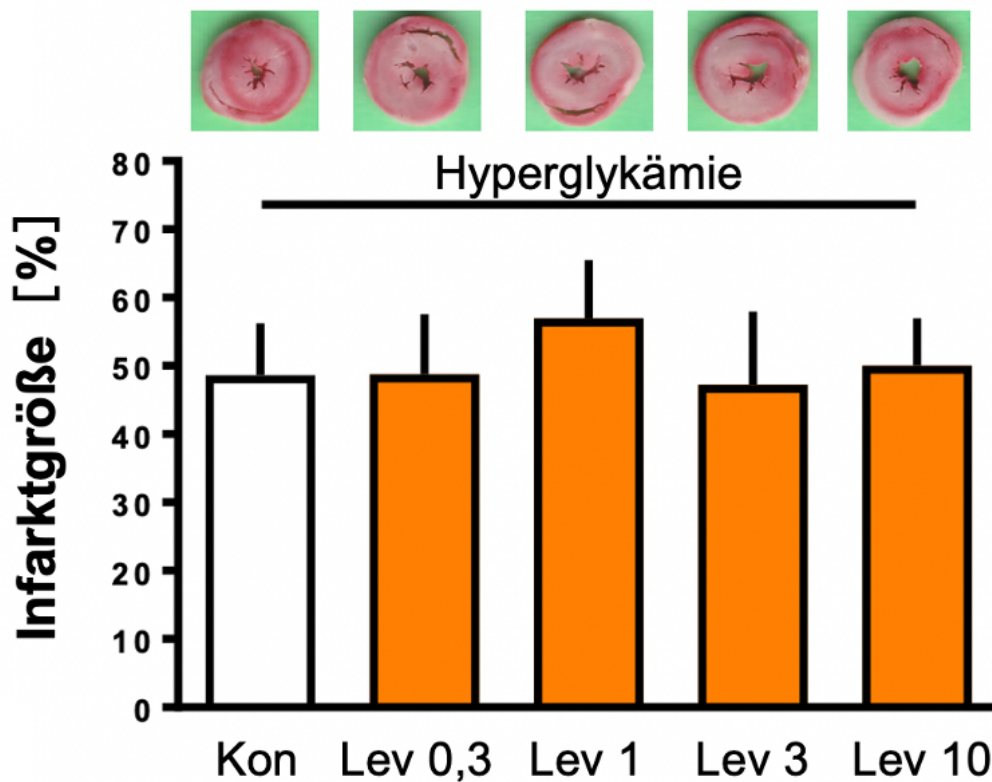
**Tabelle 2** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Kardioprotektion. Glukosekonzentration (mmol/L). Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>122</sup> Daten als Mittelwert ± SD. Kon = Kontrolle; HG = Hyperglykämie; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporin A. \*P<0,05 vs. Baseline.

Im ersten Teil der Versuchsreihe wurde ein möglicher konzentrationsabhängiger Effekt von Levosimendan unter akuter Hyperglykämie untersucht. Hierzu erfolgte die Postkonditionierung über zehn Minuten zu Beginn der Reperfusion in aufsteigender Dosierung von Levosimendan. Ausgangspunkt war hier die in der Vorstudie von Stroethoff et al. ermittelte Konzentration von 0,3 µM.<sup>116</sup>



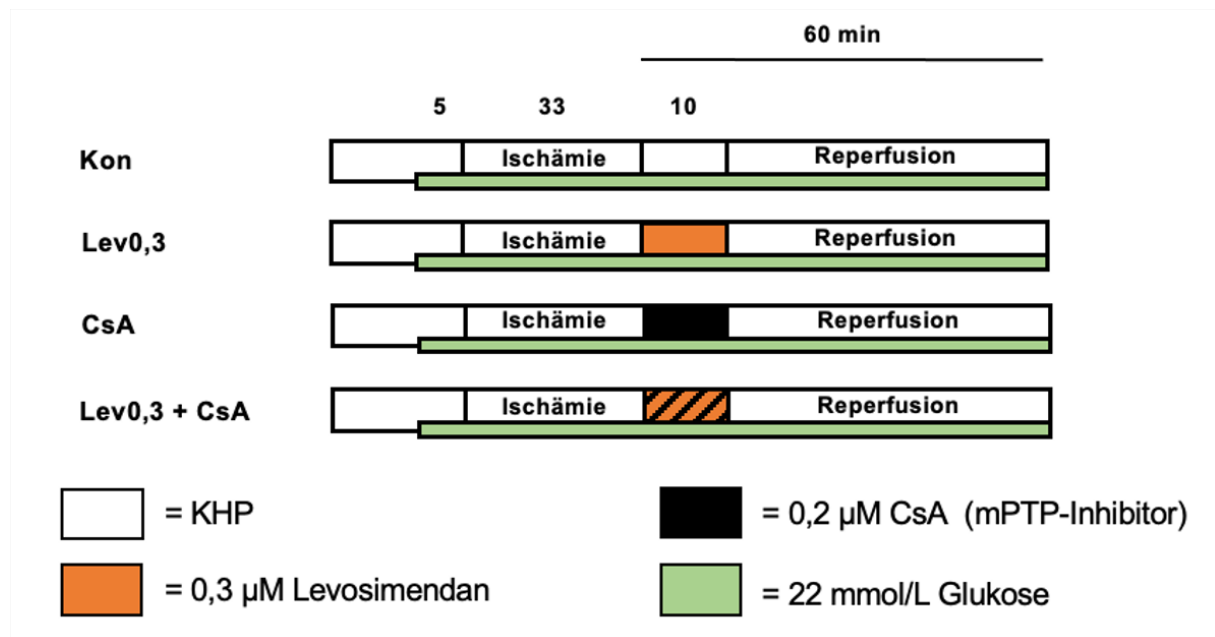
**Abbildung 14** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung. Experimentelles Protokoll Teil 1. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>122</sup> Kon = Kontrolle, Lev = Levosimendan, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer.

In diesem ersten Teil der Studie zeigte sich eine vollständige Aufhebung der kardioprotektiven Effekte von 0,3  $\mu\text{M}$  Levosimendan unter akuter Hyperglykämie (Lev0,3  $49 \pm 9\%$  vs. Kon  $52 \pm 12\%$ , ns). Auch unter Steigerung der Levosimendan-Konzentration auf bis zu 10  $\mu\text{M}$  konnte dieser blockierende Einfluss der Hyperglykämie nicht aufgehoben werden (Lev1  $57 \pm 9\%$ , Lev3  $47 \pm 11\%$  und Lev10  $50 \pm 7\%$ , alle ns vs. Kon).



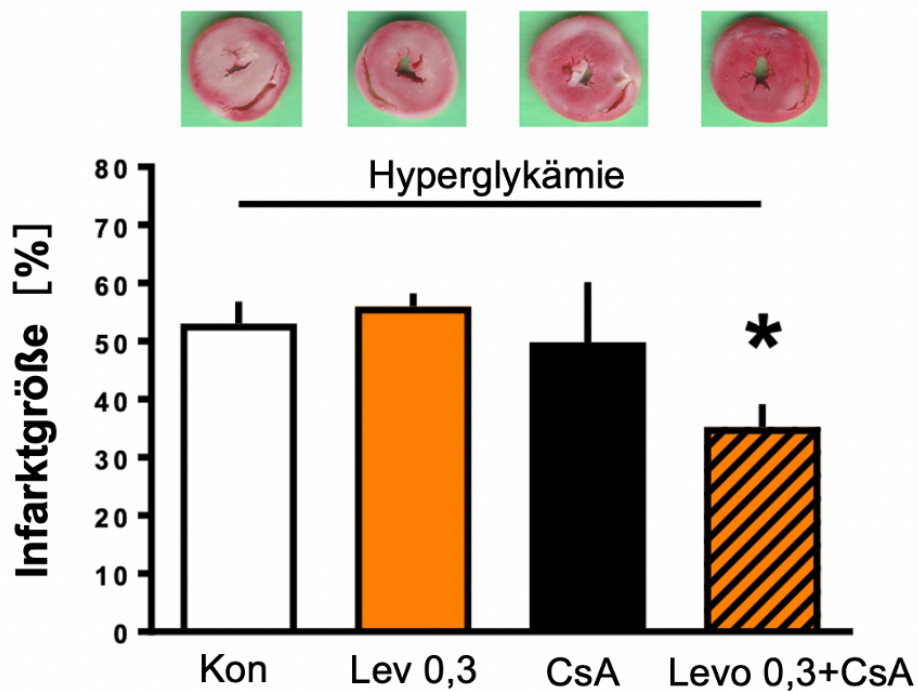
**Abbildung 15** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung. Teil 1. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>122</sup> Kon = Kontrolle, Lev = Levosimendan.

Der zweite Teil der Studie wurde konzipiert, um den zugrundeliegenden Mechanismus der mittels Hyperglykämie blockierten Kardioprotektion von Levosimendan herauszuarbeiten. Hierzu wurde Levosimendan in der Postkonditionierung mit dem mPTP-Inhibitor CsA kombiniert. Um die alleinige Wirkung von CsA auf die Infarktgrößenreduktion unter Hyperglykämie darzustellen, wurde der mPTP-Inhibitor in einer Gruppe einzeln verabreicht.



**Abbildung 16** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung. Experimentelles Protokoll Teil 2. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>122</sup> Kon = Kontrolle, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, Lev = Levosimendan, CsA = Cyclosporin A (mPTP-Inhibitor).

Die Ergebnisse des zweiten Teils der Studie zeigten erneut eine vollständige Aufhebung der Infarktgrößenreduktion mittels Levosimendan-induzierter Postkonditionierung unter Hyperglykämie (Lev0,3  $53 \pm 4\%$  vs. Kon  $56 \pm 2\%$ , ns). Die kombinierte Gabe von Levosimendan in einer Konzentration von  $0,3 \mu\text{M}$  mit dem mPTP-Inhibitor CsA führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße auch unter akuter Hyperglykämie (CsA+Lev0,3  $35 \pm 4\%$ ,  $p < 0,05$  vs. Lev0,3). Interessanterweise konnte durch alleinige Applikation von CsA keine kardioprotektiven Effekte bei hyperglykämischen Bedingungen erzielt werden (CsA  $50 \pm 10\%$  ns vs. Kon).



**Abbildung 17** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung. Teil 2. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>122</sup> Kon = Kontrolle, Lev = Levosimendan, CsA = Cyclosporin A (mPTP-Inhibitor). \*P<0,05 vs. Kontrolle.

## 2.2. Schlussfolgerung Levosimendan

Vereinbar mit anderen Untersuchungen konnte in dieser experimentellen Studie gezeigt werden, dass eine akute Hyperglykämie zu einer vollständigen Blockade der Levosimendan-induzierten Postkonditionierung führt.<sup>122</sup> Interessanterweise und im Gegensatz zu den Ergebnissen von Matsumoto et al.<sup>120</sup> konnte diese Hyperglykämie-induzierte Blockade auch unter Steigerung der Levosimendan-Konzentration auf 10  $\mu$ M nicht aufgehoben werden. Diese divergenten Ergebnisse lassen sich zum einen mit den unterschiedlichen experimentellen Protokollen (*in vitro* vs. *in vivo*) und zum anderen mit der Dauer der akuten Hyperglykämie und Reperfusion begründen. In der Studie von Matsumoto und Kollegen wurden die Tiere lediglich während der Hälfte der Reperfusion hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt und die Reperfusion dauerte 120 min;<sup>120</sup> im Vergleich dazu wurden die isolierten Rattenherzen in der aktuellen Studie während der gesamten 60-minütigen Reperfusion mit einer Glukose Lösung perfundiert.<sup>122</sup>

Unabhängig davon scheint eine Steigerung der Levosimendan-Dosierung im klinischen Alltag nicht praktikabel, um die Blockade durch Hyperglykämie aufzuheben. Die in der Vorstudie von Stroethoff et al. ermittelte niedrigste protektive Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  entspricht in etwa 100 $\mu\text{g/L}$  und ist damit vereinbar mit gemessenen klinischen Levosimendan Plasma-Konzentrationen von 10-100  $\mu\text{g/L}$ .<sup>110,114,123</sup> Berücksichtigt man mögliche unerwünschte Nebenwirkungen des Medikamentes, ist eine 10-fache Steigerung der Levosimendan-Dosierung im klinischen Alltag vermutlich nicht umsetzbar. Um die Blockade kardioprotektiver Effekte durch eine akute Hyperglykämie aufzuheben, müssen daher andere Maßnahmen in Betracht gezogen werden.

Ein möglicher Ansatz ist der Einsatz multimodaler kardioprotektiver Strategien, also die Kombination verschiedener Substanzen oder Konditionierungsmaßnahmen. Vergleichbar mit unserer Studie zu Levosimendan wird auch die Sevofluran-induzierte Kardioprotektion unter Hyperglykämie blockiert. Huhn und Kollegen demonstrierten, dass die Kombination mit CsA zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion auch unter hyperglykämischen Bedingungen führt, während die alleinige CsA Gabe keine Reduktion der Infarktgröße bewirkt.<sup>58</sup> Die Ergebnisse von Huhn et al. sind damit vereinbar mit den hier gezeigten Daten und deuten darauf hin, dass die pharmakologische Konditionierung möglicherweise die Inhibierung der mPTP durch CsA verstärken und so auch unter Hyperglykämie eine Kardioprotektion erzielt werden kann. Ob dieser multimodale Konditionierungsansatz über einen herabgesetzten Schwellenwert der gleichen Endeffektoren oder eine parallele Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wirksam wird, muss jedoch in Folgestudien untersucht werden.

## V Ischämische Fernkonditionierung – Untersuchung bei Hyperglykämie und Diabetes mellitus

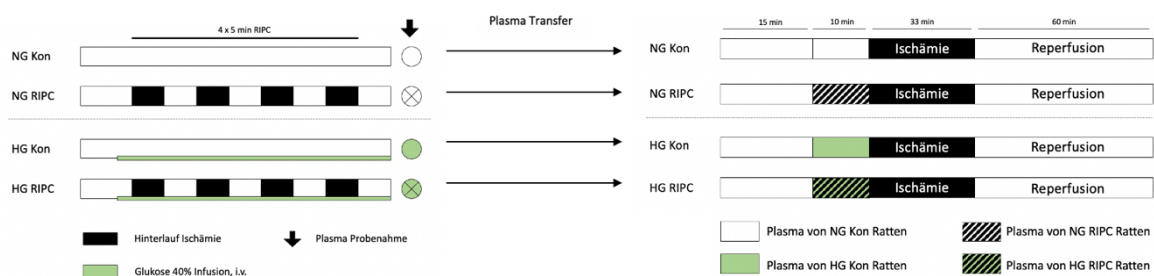
### 1. Ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC)

Die ischämische Fernkonditionierung stellt eine nicht-invasive und damit klinisch praktikable Alternative der ischämischen Kardioprotektion dar.<sup>20</sup> Transiente Phasen von zielorganferner subletaler Ischämie und Reperfusion führen in experimentellen Studien zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion nach einem I/R-Schaden.<sup>124</sup> Die Fernkonditionierung kann dabei sowohl vor (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) als auch nach (*remote ischemic postconditioning*, RIPostC) der Index-Ischämie durchgeführt werden.<sup>26,28</sup> Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass durch diese subletalen Phasen von Ischämie und Reperfusion humorale Faktoren freigesetzt werden, die über die unter I.3 beschriebenen Signalkaskaden zu einer Kardioprotektion führen.<sup>125</sup> In klinischen Studien kann RIPC nicht-invasiv mittels Oberarmischämie induziert werden, wobei bisher keine klare Empfehlung für die Anzahl oder Dauer der Zyklen besteht.<sup>124</sup> Hierzu wird eine handelsübliche Blutdruckmanschette am Oberarm auf suprasystolische Werte (i.d.R. > 200 mmHg) aufgepumpt und phasenweise zur Reperfusion wieder abgelassen. Die erfolgreiche Translation der experimentellen Ergebnisse zu RIPC in klinische Studien bleibt bisher jedoch aus. Auch wenn eine kleine Anzahl von Studien am Patienten einen positiven Effekt von RIPC angedeutet haben, konnten in den großen Multicenter-Studien zu RIPC keine kardioprotektiven Eigenschaften nachgewiesen werden.<sup>11,126</sup> Vergleichbar mit der pharmakologischen Konditionierung könnte auch für RIPC eine hyperglykämie Stoffwechsellage ursächlich für die Blockade kardioprotektiver Effekte sein.<sup>127,128</sup> Neben struktureller Veränderungen am Myokard selbst, kann die Hyperglykämie mit oder ohne Diabetes mellitus möglicherweise auch die Freisetzung oder den Transport der humoralen Faktoren blockieren. Um zwischen diesen Mechanismen zu unterscheiden wurde eine Studie mit translationalem Protokoll konzipiert, bei der ein Plasma-Transfer von jungen Wistar Ratten *in vivo* auf isolierte Rattenherzen *in vitro* erfolgte.

## 1.1. Der Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC

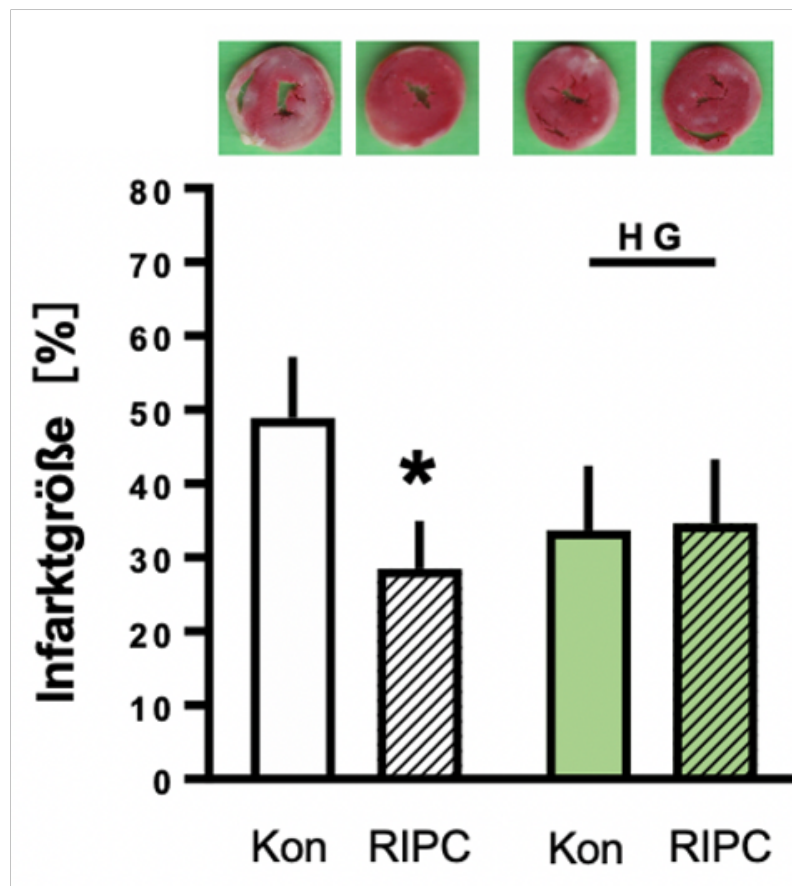
Im ersten Teil der Studie wurde der Einfluss einer akuten Hyperglykämie auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC untersucht. Unter Allgemeinanästhesie mit Pentobarbital (40 mg/kg KG/h) und mechanischer Ventilation erfolgte die Durchführung des RIPC-Stimulus an jungen gesunden Wistar Ratten *in vivo*.<sup>61</sup> Hierzu wurde bei den Versuchstieren eine modifizierte Blutdruckmanschette an beiden Hintergliedmaßen angebracht. RIPC wurde etabliert durch jeweils vier Zyklen von fünfminütiger Ischämie und Reperfusion mittels Aufpumpen und Ablassen der Blutdruckmanschette. Kontrolltiere durchliefen das gleiche experimentelle Protokoll, jedoch ohne RIPC-Stimulus.<sup>129</sup> Durch kontinuierliche intravenöse Applikation von 40%iger Glukose-Lösung wurde bei einer Versuchsgruppe die akute Hyperglykämie induziert. Blutglukose Spiegel während des experimentellen Protokolls wurden genutzt um die Hyperglykämie, definiert als Blutglukose > 300 mg/dL, zu verifizieren. Nach dem letzten RIPC Zyklus wurden Blutproben entnommen, diese zentrifugiert und das isolierte Plasma bei -80°C gelagert.

Im Anschluss an die *in vivo* Versuche erfolgte die Translation des isolierten Plasmas auf isoliert perfundierte Herzen junger gesunder, nicht-diabetischer Ratten an der Langendorff-Anlage. Das experimentelle Protokoll der *in vitro* Versuche ist im Detail unter II.3 beschrieben. Als Präkonditionierung wurde das isolierte Plasma der normoglykämien (NG) und hyperglykämien (HG) Kontroll- (Kon) und RIPC-Versuchstiere für zehn Minuten vor der globalen Ischämie appliziert.



**Abbildung 18** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC. Experimentelles Protokoll. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = remote ischemic preconditioning, NG = Normoglykämie, HG = Hyperglykämie.

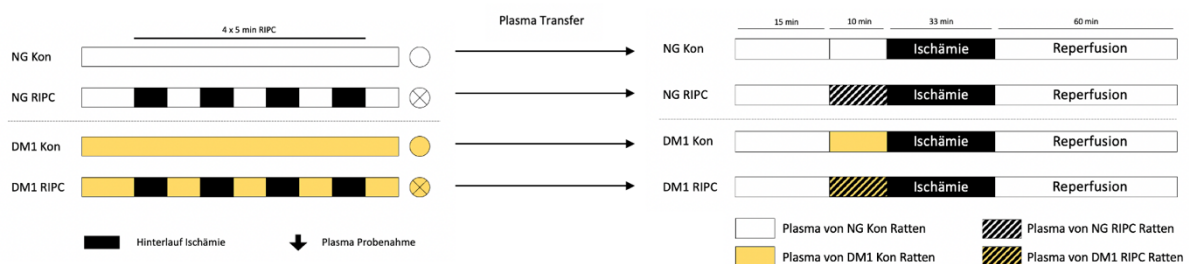
Die Ergebnisse von Teil 1 der Studie zeigten, dass eine Infarktgrößenreduktion nach I/R-Schaden mittels Plasma Transfer an der Langendorff-Anlage induziert werden kann. Im Vergleich zu der Gruppe, die mit normoglykämien Kontrollplasma behandelt wurde, konnte durch Applikation von normoglykämien RIPC Plasma eine signifikante Reduktion der Infarktgröße erzielt werden (NG RIPC 29±6% vs. NG Kon 49±8%,  $p < 0,0001$ ). Interessanterweise zeigten die Herzen, die mit Kontroll-Plasma von hyperglykämien Tieren perfundiert wurden, vergleichbare kardioprotektive Ergebnissen. Dabei war es vollkommen unabhängig, ob es sich um hyperglykämies Kontroll- oder RIPC Plasma handelte (HG RIPC 34±9% vs. HG Kon 35±9%, ns).



**Abbildung 19** Einfluss akuter Hyperglykämie auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = *remote ischemic preconditioning*, HG = Hyperglykämie \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle.

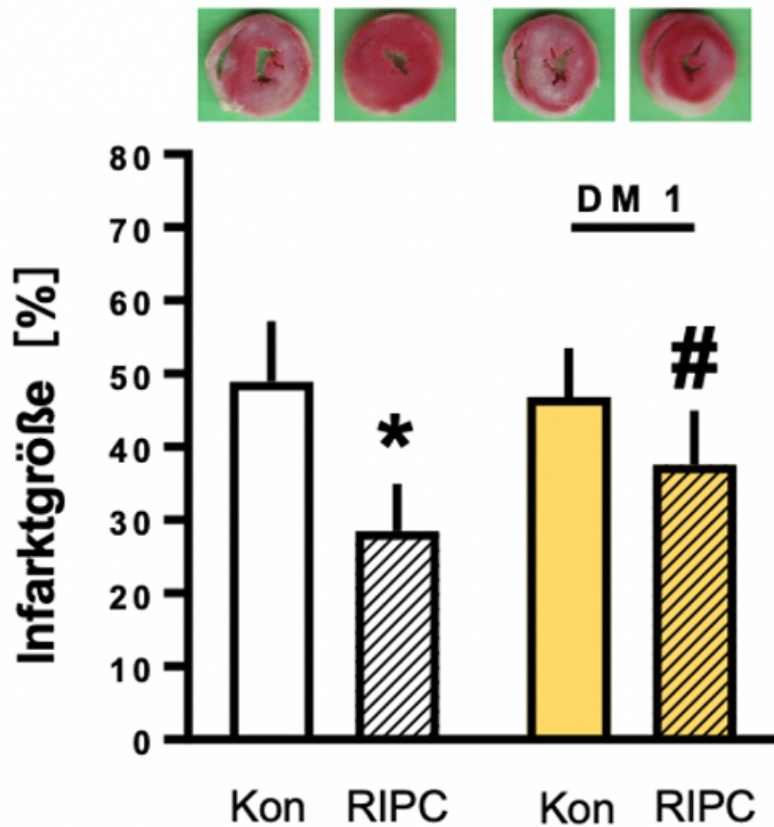
## 1.2. Der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC

Im zweiten Teil der translationalen Studie wurde der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC betrachtet. Das experimentelle RIPC *in vivo* Protokoll entsprach dem Teil 1 der Studie.<sup>61</sup> Im Gegensatz zur Untersuchung unter akuter Hyperglykämie wurde bei den Versuchstieren jedoch im Vorfeld ein Diabetes mellitus Typ 1 (DM1) induziert. Hierfür wurden die Wistar Ratten 21 Tage vor dem RIPC-Protokoll mit 65 mg/kg Körpergewicht Streptozotocin behandelt.<sup>61</sup> Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Protokoll der DM1 Induktion in Ratten, das zu einer Zerstörung von Betazellen im Pankreas und damit absolutem Insulinmangel führt.<sup>130,131</sup> Die erfolgreiche DM1 Induktion wurde definiert als Blutglukose Werte > 300 mg/dL zum Zeitpunkt des RIPC-Protokolls. Wie auch in Teil 1 wurde das isolierte Plasma der DM1 Kontroll- (Kon) und RIPC Tiere im Anschluss als zehninütiger Präkonditionierungsstimulus auf isolierte Rattenherzen *in vitro* übertragen.



**Abbildung 20** Einfluss von DM1 auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC. Experimentelles Protokoll. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = *remote ischemic preconditioning*, NG = Normoglykämie, DM1 = Diabetes mellitus Typ 1.

In Teil 2 der Studie konnte demonstriert werden, dass auch der Transfer von RIPC Plasma von Ratten mit DM1 zu einer Infarktgrößenreduktion im gesunden Myokard führt. Hier zeigte sich ein signifikant kleineres Infarktareal nach I/R-Schaden im Vergleich zu den Herzen, die mit Kontroll-Plasma von DM1 erkrankten Tieren behandelt wurden (DM1 RIPC 38±7% vs. DM1 Kon 47±7%,  $p < 0,05$ ).



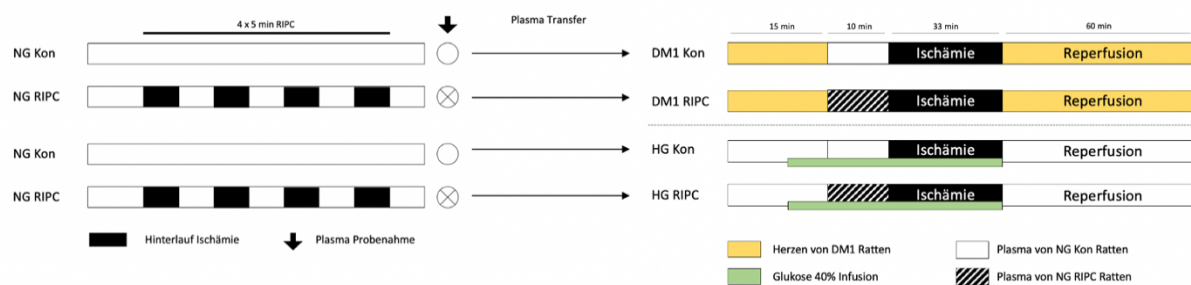
**Abbildung 21** Einfluss von DM1 auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = *remote ischemic preconditioning*, DM1 = Diabetes mellitus Typ 1. \*P<0,05 vs. Kon, #P<0,05 vs. Kon DM1.

### 1.3. Der Einfluss des erkrankten Myokards auf RIPC

In Teil 1 und 2 der Studie wurde der Fokus auf die Untersuchung der Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC unter physiologischen und pathologischen Bedingungen gesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Applikation von normoglykämien RIPC Plasma im gesunden Myokard eine Kardioprotektion erzielt werden kann. Um eine Differenzierung zwischen der Freisetzung humoraler Faktoren und dem Einfluss von durch DM1 oder Hyperglykämie erkrankten Myokard zu ermöglichen, erfolgte im dritten Teil der Studie Plasmatransfer von gesunden Wistar Ratten auf isolierte, erkrankte Rattenherzen.<sup>61</sup>

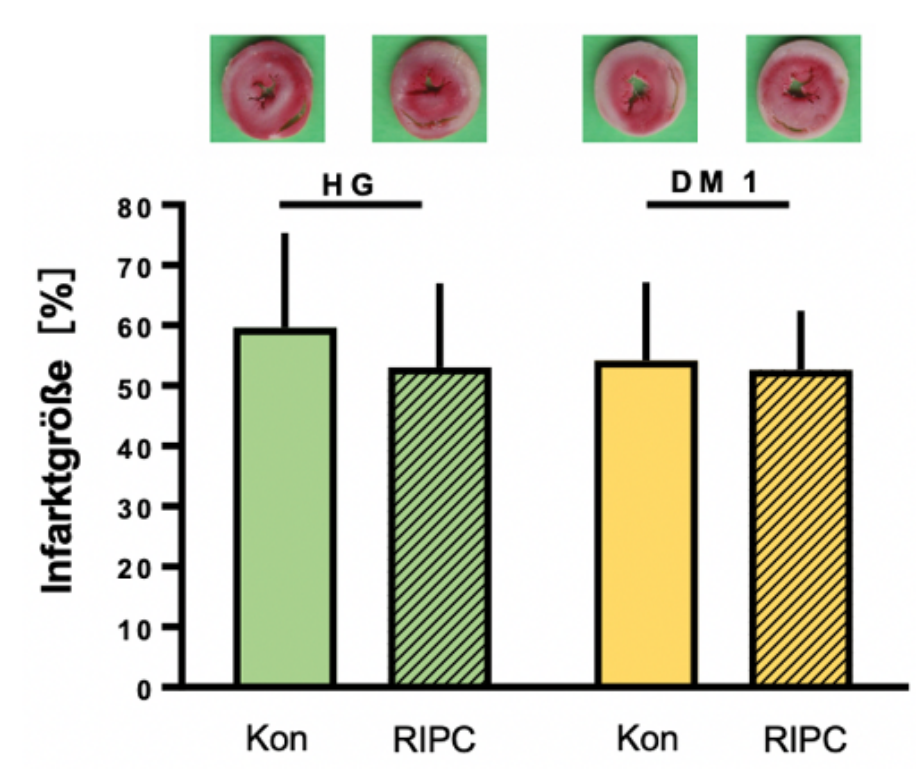
Hierzu wurde das gleiche experimentelle RIPC *in vivo* Protokoll eingesetzt wie in Teil 1 und 2 der Studie. Im Anschluss erfolgte ebenfalls der Transfer des isolierten Plasmas als Präkonditionierung über zehn Minuten vor der globalen Ischämie an der Langendorff-Anlage.<sup>61</sup> Im Unterschied zu Teil 1 und 2 wurden hier jedoch isolierte Herzen an DM1 erkrankter Ratten oder isolierte Herzen unter akuter Hyperglykämie eingesetzt.

Dies diente der Untersuchung des Einflusses von RIPC auf das erkrankte Myokard. Die Etablierung des DM1 erfolgte mittels Streptocotozin Protokoll (im Detail beschrieben unter V.1.2). Eine akute Hyperglykämie wurde mittels Glukose Applikation (Gesamtkonzentration von 22 mmol/L) an der Langendorff-Anlage, basierend auf dem Protokoll der Vorstudien zu Dexmedetomidin und Levosimendan, induziert (im Detail beschrieben unter IV.1.1).<sup>65</sup> Im Gegensatz zu den Vorstudien erfolgte die Applikation von Glukose-Lösung jedoch nur bis zum Ende der Ischämie.



**Abbildung 22** Einfluss des erkrankten Myokards auf RIPC. Experimentelles Protokoll. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = *remote ischemic preconditioning*, NG = Normoglykämie, HG = Hyperglykämie, DM1 = Diabetes mellitus Typ 1.

Die Übertragung von normoglykämischen Kontroll- und RIPC-Plasma führte weder in Herzen von DM1 erkrankten Ratten (DM1 RIPC  $53 \pm 10\%$  vs. DM1 Kon  $54 \pm 13\%$ , ns) noch in Herzen unter akuter Hyperglykämie (HG RIPC  $53 \pm 14\%$  vs. HG Kon  $60 \pm 16\%$ , ns) zu einer Infarktgrößenreduktion. Die kardioprotektiven Effekte des normoglykämischen RIPC-Plasmas scheinen also im erkrankten Myokard aufgehoben zu werden.



**Abbildung 23** Einfluss des erkrankten Myokards auf RIPC. Infarktgrößen. Modifiziert nach Torregroza et al.<sup>61</sup> Kon = Kontrolle, RIPC = *remote ischemic preconditioning*, HG = Hyperglykämie, DM1 = Diabetes mellitus Typ 1.

#### 1.4. Schlussfolgerung RIPC

Die Ergebnisse dieser translationalen Studie deuten darauf hin, dass durch einen RIPC Stimulus *in vivo* humorale Faktoren in das Plasma freigesetzt werden, die wiederum kardioprotektive Signalkaskaden im Herzen aktivieren. Ein DM1 in der Ratte führt zu keiner Blockade der Freisetzung humoraler Faktoren, da dieses Plasma ebenfalls eine Protektion gegenüber einem I/R-Schaden im isolierten Herzen erzielt hat. Im Gegensatz dazu scheinen im diabetisch erkrankten Myokard kardioprotektive Signalkaskaden durch bisher noch unklare Mechanismen inhibiert zu sein. Durch Übertragung von normoglykämien RIPC-Plasma, das basierend auf Teil 1 der Studie humorale Faktoren enthalten sollte, konnte keine Infarktgrößenreduktion in Herzen von DM1 Ratten induziert werden. Gleiche Ergebnisse zeigen sich auch bei einem Plasma Transfer auf Herzen unter akuter Hyperglykämie.<sup>61</sup> Die Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen steht bisher noch aus. Es konnte jedoch in Vorstudien gezeigt werden, dass verschiedene kardioprotektive Signalkaskaden (wie der RISK Signalweg und die Regulation der mPTP) durch Diabetes mellitus und Hyperglykämie blockiert werden.<sup>127,132-134</sup>

Interessanterweise deuten die Studienergebnisse darauf hin, dass hyperglykämies Plasma kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Eine mögliche Erklärung für diese protektiven Plasma-Effekte sind erhöhte Insulinspiegel im isolierten Plasma. Denkbar ist, dass die Induktion der akuten Hyperglykämie *in vivo*, insbesondere durch Bolus-Gabe von Glukose, eine gesteigerte Ausschüttung von Insulin in der Ratte hervorgerufen hat. Sowohl in experimentellen als auch klinischen Studien wurde bereits eine kardioprotektive Wirkung von Insulin nachgewiesen.<sup>135,136</sup> Um diese Fragestellung abschließend zu klären, sind jedoch weitere Studien notwendig.

## VI Diskussion

Die perioperative Kardioprotektion stellt nicht nur einen wichtigen Forschungsschwerpunkt dar, sondern nimmt auch zunehmend eine zentrale Rolle im klinischen Arbeitsalltag ein. Der myokardiale I/R-Schaden wurde erstmals im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes beschrieben; er zeigt sich jedoch auch im kardiochirurgischen Setting bei Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM).<sup>14</sup> Durch den demographischen Wandel einhergehend mit einem Anstieg von Patienten mit kardiovaskulären Begleiterkrankung und somit erhöhtem perioperativen kardialen Risiko, sind Strategien zur Minimierung des I/R-Schadens eine zunehmend wichtige Herausforderung in der Klinik. Pharmakologische und nicht-pharmakologische Ansätze zeigten in experimentellen Studien vielversprechende Ergebnisse zur Kardioprotektion.<sup>20</sup>

### 1. Konditionierung unter Normoglykämie

Die pharmakologische Konditionierung, als nicht-invasive Alternative zu der IPC, wurde in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Studien erforscht. Neben dem Verständnis zugrundeliegender Mechanismen rückte zunehmend die Translation in das klinische Setting in den Mittelpunkt. Daher wurden vor allem Substanzen untersucht, welche bereits regelhaft in der Klinik eingesetzt und als ungefährlich für Patienten mit kardialem Risiko beurteilt wurden.<sup>14</sup> So konnte für Inhalationsanästhetika wie z.B. Sevofluran, aber auch das Edelgas Helium,  $\alpha_2$ -Rezeptoragonisten wie Dexmedetomidin, Phosphodiesterase-Inhibitoren und Opioide ein Schutz gegen den I/R-Schaden demonstriert werden.<sup>31</sup> Im Rahmen der unter IV.1 beschriebenen Studie zum Einfluss einer akuten Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Konditionierung wurde die Substanz Mannitol zum Ausgleich der Osmolarität in der Normoglykämie-Gruppe eingesetzt.<sup>65</sup> Interessanterweise zeigte sich in der Mannitol-Kontrollgruppe eine reduzierte Infarktgröße im Vergleich zur KHP-Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse begründeten die anschließend durchgeführten Untersuchungen (III.1.1 und III.1.2) zu möglichen kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol.

Im Hinblick auf die routinemäßige klinische Anwendung u.a. bei kardialen Risikopatienten scheint das Osmodiuretikum Mannitol eine vielversprechende Alternative zu sein. Eine der wichtigsten klinischen Indikationen für Mannitol ist die Behandlung des erhöhten intrakraniellen Drucks.<sup>70,71</sup> Voraussetzung ist dabei eine intakte Blut-Hirn-Schranke, da die Substanz über seine osmotische und vasokonstriktive Wirkung zu einer Reduktion von Gesamtwasser- und Blutvolumen führt.<sup>67</sup> Studien deuten zudem auf eine verbesserte zerebrale Perfusion durch Reduktion der Blutviskosität unter Mannitol Behandlung hin.<sup>69</sup> Neben diesen günstigen Auswirkungen auf die Hirnfunktion findet das Osmodiuretikum in den letzten Jahren zunehmend Einzug in die Kardiochirurgie. So enthält das Füllvolumen zum *priming* der HLM oftmals Mannitol als Volumenexpander. In einigen Studien zum Einsatz von Mannitol in der HLM wurde eine Reduktion des postoperativen akuten Nierenversagens berichtet.<sup>137</sup> Darüber hinaus scheint die Substanz auch den koronaren Blutfluss, das Herzzeitvolumen und die myokardiale linksventrikuläre Kontraktilität zu erhöhen.<sup>68,138</sup> Interessanterweise konnten Hamiko et al.<sup>139</sup> in einer Studie zum Einsatz von Mannitol bei Patienten, die sich einer Aortenklappen-Ersatz-Operation unterzogen, auch eine Reduktion des postoperativen Delirs sowie eine verkürzte Dauer der invasiven Beatmung, Zeit auf der Intensivstation und dem Krankenhausaufenthalt nachweisen. Auch kardioprotektive Eigenschaften von Mannitol wurden bereits in einer Vielzahl experimenteller Studien untersucht. Untersuchungen über zugrundeliegende Mechanismen zeigten jedoch uneinheitliche Ergebnisse, insbesondere in Bezug auf die hyperosmolaren Eigenschaften.<sup>76</sup> Magovern et al. begründeten den verbesserten Koronarfluss und das reduzierte myokardiale Ödem mit der Hyperosmolarität der Substanz.<sup>75</sup> Dagegen zeigten experimentelle Studien zur intrakoronaren Injektion von Mannitol keine Kardioprotektion nach I/R-Schaden.<sup>140</sup> Auch bezüglich der Eigenschaft eines Radikalfängers herrscht in Studien zu Mannitol und I/R-Schaden Uneinigkeit.<sup>74,141</sup> Eine *ex vivo* Studie in isolierten Kardiomyozyten zeigte keinen Einfluss von Mannitol auf die Freisetzung von ROS unter Hypoxie. Es konnte aber eine Aktivierung der PI3K durch die Hyperosmolarität nachgewiesen werden.<sup>142</sup> Bezüglich der Konzentration sowie Zeitpunkt und Dauer der Mannitol Applikation unterscheiden sich die bis dato durchgeführten Studien ebenfalls grundlegend.<sup>73</sup> Diese widersprüchlichen Daten begründeten die Studien unter III.1 zur Mannitol-induzierten Konditionierung.<sup>76,79</sup>

Entgegen den bisher durchgeführten Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen von Mannitol, wurden in den Studien dieser Schrift gezielt bekannte kardioprotektive Signalkaskaden untersucht. Darüber hinaus wurde bezüglich Zeitpunkt und Dauer ein klassischer Prä- und Postkonditionierungsstimulus appliziert. Die in diesen Studien verwendete Mannitol-Konzentration von 11 mmol/L wurde aus der unter IV.2 beschriebenen Studie zu Dexmedetomidin unter Hyperglykämie übernommen.<sup>65</sup> Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Einklang mit Daten von Zálešák et al. die ebenfalls eine Konzentration von 11 mmol/L Mannitol eingesetzt haben.<sup>143</sup> In Bezug auf die Translation in die Klinik entspricht die in unserer *in vitro* Studie verwendete Mannitol-Konzentration von 11 mmol/L etwa 1g/kg Körpergewicht. Zum Vergleich: Als therapeutische Dosierung zur Behandlung eines Hirnödems werden beim Patienten 1g/kg Körpergewicht empfohlen.<sup>144</sup> Durch die unter III.1 beschriebenen Studien konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Mannitol-induzierte Prä- und Postkonditionierung über intrazelluläre Mediatoren vermittelt werden, die bereits bei anderen pharmakologischen Strategien bekannt sind. Als mögliche End-Effektoren scheinen die  $mK_{ATP}$ -Kanäle die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol zu vermitteln.<sup>76</sup> Durch gleichzeitige Gabe des selektiven  $mK_{ATP}$ -Kanal Blockers 5HD konnte die Mannitol-induzierte Infarktgrößenreduktion vollständig aufgehoben werden. 5HD wurde bereits in einer Vielzahl experimenteller Studien als potenter Kanalblocker eingesetzt, wobei die hier eingesetzte Konzentration von 100  $\mu$ M zu einer vollständigen Blockade des  $mK_{ATP}$ -Kanals führt.<sup>78</sup> In der Folgestudie zu Mannitol konnte herausgearbeitet werden, dass die intrazelluläre Signalkaskade der Mannitol-induzierten Konditionierung wiederum über den A1R vermittelt wird.<sup>79</sup> G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie der A1R sind integrale Membranproteine, die von Kardiomyozyten exprimiert werden.<sup>82</sup> Durch Bindung von Adenosin wird der Rezeptor aktiviert und führt zu einer Vermittlung extrazellulärer Stimuli auf intrazelluläre Signalkaskaden.<sup>84,86</sup> Sowohl bei der IPC als auch der RIPC spielt der A1R eine entscheidende Rolle, indem er eine Aktivierung des RISK und eNOS/PKG Signalweg auslöst.<sup>83</sup> Pingle et al. zeigten, dass auch die Mannitol-induzierte Nephroprotektion über den A1R in Nierenzellen vermittelt wird.<sup>87</sup> Durch eine Kombination mit dem Radioliganden DPCPX<sup>88</sup> als selektiver A1R-Antagonist wurde die Mannitol-induzierte Kardioprotektion in unserer Studie vollständig aufgehoben.

Experimentelle Studien berichten Ki-Werte ( $K_i$  = Inhibitor-Konstante) von 0,45 nM für DPCPX als Inhibitor von A1R in Kardiomyozyten, wobei eine 700-fach höhere Affinität zu A1R im Vergleich zu anderen Adenosin-Rezeptoren vorliegt.<sup>145</sup> Die in unserer Studie verwendete, aus Vorstudien<sup>146</sup> abgeleitete, Konzentration von 200 nM führt somit zu einer suffizienten Blockade der myokardialen A1R ohne Beeinflussung anderer Rezeptoren. Bis zu diesem Zeitpunkt bleiben jedoch die zwischen dem A1R und  $mK_{ATP}$ -Kanal geschalteten Kinasen ungeklärt. Durch Einsatz selektiver PKG- und Akt-Blocker wurde in unserer Studie die Mannitol-induzierte Infarktgrößenreduktion nicht beeinflusst. Somit lässt sich ableiten, dass diese Kinasen vermutlich nicht an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt sind. Als mögliches Bindeglied zwischen dem A1R und den  $mK_{ATP}$ -Kanälen sollte die  $PKC\varepsilon$  untersucht werden.<sup>90</sup> Daten experimenteller Studien zeigen sowohl bei der IPC- als auch der Isofluran-induzierten Kardioprotektion eine Beteiligung der  $PKC\varepsilon$  als vorgeschaltetes Enzym vor  $mK_{ATP}$ -Kanäle und die  $mPTP$ .<sup>89,92,147</sup> Basierend auf diesen Daten ist es denkbar, dass die  $PKC\varepsilon$  das noch unbekannte Bindeglied zwischen dem A1R und Aktivierung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen in der Mannitol-induzierten Konditionierung ist. Weitere Studien hierzu stehen zum aktuellen Zeitpunkt noch aus. Im Hinblick auf die hyperosmolaren Eigenschaften von Mannitol wurde in unseren Studien das Ausmaß des Gesamtödems innerhalb der verschiedenen Studiengruppen untersucht. Hierfür wurde das Nass- und Trockengewicht der Herzen am Ende der Versuchsreihe verglichen. Aus diesen Werte lässt sich der prozentuale Wassergehalt ( $\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht} / \text{Nassgewicht} \times 100$ ) berechnen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mannitol- und Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass die kardioprotektiven Eigenschaften von Mannitol nicht nur über die hyperosmolare Wirkung erklärt werden kann.

Die Studien dieser Habilitationsschrift konnten die zugrundeliegenden Mechanismen der Mannitol-induzierten Kardioprotektion zwar näher entschlüsseln, es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die Mediatoren der intrazellulären Signalkaskade im Detail zu verstehen. Im Hinblick auf die weiter oben beschriebenen vorteilhaften klinischen Eigenschaften von Mannitol stellt diese Substanz einen vielversprechenden Ansatz für die Translation pharmakologischer Konditionierung in das klinische Setting dar.

## 2. Der Einfluss von Hyperglykämie

Eine hyperglykämische Stoffwechsellage ist ein Hauptrisikofaktor für Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden, und spielt eine zentrale Rolle bei der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.<sup>54,55</sup> In klinischen Studien konnte herausgearbeitet werden, dass erhöhte Blutglukose-Spiegel signifikant mit dem Langzeitüberleben nach einem Myokardinfarkt korrelieren.<sup>148</sup> Diese Korrelation war dabei vollkommen unabhängig von der Diagnose Diabetes mellitus.<sup>56</sup> Insbesondere bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden, aber auch perioperativ bei kardiochirurgischen Patienten, werden häufig erhöhte Blutglukose-Spiegel nachgewiesen.<sup>149</sup> Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems als Stressreaktion des Körpers oder ein bisher undiagnostizierter Diabetes mellitus bzw. eine prädiabetische Stoffwechsellage werden als Ursache vermutet.<sup>56</sup> Bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden, führt die akute Hyperglykämie nicht nur zu einem erhöhten Risiko letaler Arrhythmien, sondern ist auch mit einer reduzierten linksventrikulären Funktion und endothelialer Dysfunktion assoziiert.<sup>150-152</sup> Darüber hinaus konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien eine Blockade ischämischer und pharmakologischer Konditionierungsstrategien unter hyperglykämischer Stoffwechsellage demonstriert werden.<sup>11,13</sup> Verschiedene Mechanismen wurden als mögliche Ursache für die negativen Effekte einer Hyperglykämie im Zusammenhang mit der Kardioprotektion untersucht, wobei vermutlich ein multifaktorieller Prozess vorliegt. So wurden unter hyperglykämischen Bedingungen deutlich erhöhte Mengen ROS nachgewiesen.<sup>153</sup> Die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies wie Hyperoxid ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) erfolgt vorwiegend in Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette.<sup>154</sup> Studien deuten darauf hin, dass Hyperoxid essenziell für kardioprotektive Strategien ist, während Wasserstoffperoxid an der positiven Feedbackschleife der  $mK_{ATP}$ -Kanäle beteiligt ist.<sup>44,155</sup> Im gesunden Herzen führt die Öffnung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle und der daraus resultierende Kaliumeinstrom zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und konsekutiv zu einer ROS-Produktion. Wasserstoffperoxid wiederum führt zur Öffnung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle.<sup>90</sup> Interessanterweise scheint im Rahmen der Kardioprotektion die Menge der freigesetzten ROS entscheidend. Moderate ROS-Spiegel führen wie oben beschrieben u.a. über eine Regulierung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle als Teil kardioprotektiver Signalkaskaden zu einer myokardialen Protektion. Im Gegenteil dazu induzieren exzessive Mengen an ROS die Öffnung der  $mPTP$  und führen damit zu Zellschaden und -untergang.<sup>26,41</sup>

Durch eine akute Hyperglykämie mit oxidativem Stress und hohen Mengen an ROS werden so vermutlich die kardioprotektiven Effekte verschiedener Konditionierungsstrategien blockiert. Die mPTP sollte daher als ein zentraler Ansatzpunkt zur Untersuchung von Konditionierungsstrategien unter Hyperglykämie betrachtet werden.

In der Studie IV.2.1 wurde der Einfluss einer akuten Hyperglykämie und eine mögliche Wiederherstellung der Kardioprotektion mit Levosimendan untersucht.<sup>122</sup> Für die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung konnte am Langendorff-Modell eine Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  als niedrigste kardioprotektive Dosierung herausgearbeitet werden.<sup>116</sup> In weiteren Studien wurde der unter I.3 beschriebene RISK Signalweg und die Regulierung der mPTP als Endeffektor der kardioprotektiven Eigenschaften von Levosimendan ermittelt. Die akute Hyperglykämie blockiert verschiedene Bestandteile dieser Signalkaskade, wie die Akt Phosphorylierung, die eNOS, PKG, PKC und PI3K, die Schlüsselrollen in verschiedenen pharmakologischen und ischämischen Konditionierungsstrategien spielen.<sup>108,109,133,156</sup> Nachgeschaltet wird, wie unter I.3 beschrieben, die mPTP als Endeffektor der Kardioprotektion reguliert, die wiederum durch exzessive Mengen von ROS Freisetzung unter Hyperglykämie geöffnet wird.<sup>41</sup> Ein möglicher Ansatzpunkt, um eine Hyperglykämie-induzierte Blockade myokardialer Protektion zu überwinden, ist die Steigerung des Konditionierungsstimulus. In einer *in vivo* Studie zum I/R-Schaden zeigten Kehl et al., dass durch eine Erhöhung der Isofluran-Konzentration eine Kardioprotektion auch unter Hyperglykämie erzielt werden kann.<sup>105</sup> Im Einklang mit diesen Ergebnissen untersuchte Matsumoto et al. den Einfluss der akuten Hyperglykämie auf die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung *in vivo*.<sup>120</sup> Durch Steigerung der Dosierung auf das zehnfache konnte die Hyperglykämie-vermittelte Blockade aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu konnten wir in der aktuellen *in vitro* Studie auch durch Steigerung der Levosimendan Konzentration von 0,3 auf 10  $\mu\text{M}$  keine Infarktgrößenreduktion unter Hyperglykämie erzielen. Im Hinblick auf solche Dosierungssteigerung müssen immer auch unerwünschte Nebenwirkungen in Betracht gezogen werden. So ist davon auszugehen, dass eine Steigerung der Levosimendan-Konzentration um das zehnfache auch zu einer erhöhten Rate von Nebenwirkungen im klinischen Setting führt. Dieser Ansatzpunkt zur Überwindung des Einflusses von akuter Hyperglykämie scheint also wenig praktikabel.

Eine weitere Möglichkeit zur erfolgreichen Kardioprotektion unter Hyperglykämie ist die Kombination verschiedener Substanzen oder Konditionierungsstrategien. Huhn et al. zeigten, dass die Sevofluran-induzierte Kardioprotektion unter Hyperglykämie vollständig aufgehoben wurde.<sup>58</sup> Durch Gabe des mPTP-Inhibitors CsA konnte die Infarktgrößenreduktion von Sevofluran unter Hyperglykämie wiederhergestellt werden. Einhergehend mit den Ergebnissen unserer Studie zu Levosimendan und CsA war diese Wiederherstellung jedoch nur bei Kombination von Sevofluran und CsA möglich, während die alleinige Gabe von CsA unter Hyperglykämie keine Reduktion der Infarktgröße erzielte. Diese und unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gewisse Schwelle durch Steigerung oder Kombination von Konditionierungsstrategien überwunden werden muss, um auch unter hyperglykämischen Stoffwechsellagen eine Kardioprotektion zu erzielen. Auch verdeutlichen die Daten unserer Studie, dass die mPTP in Bezug auf blockierte kardioprotektive Signalkaskaden unter Hyperglykämie eine zentrale Rolle einnimmt.

Neben einer gesteigerten ROS-Produktion konnten Studien unter hyperglykämischer Stoffwechsellage auch erhöhte ATP-Spiegel nachweisen, die wiederum zu einer Hemmung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle führen können.<sup>107,157</sup> Wie unter Abschnitt 1.3 beschrieben spielen die  $mK_{ATP}$ -Kanäle eine Schlüsselrolle als Endeffektoren verschiedener kardioprotektiver Signalwege. Unter ischämischen Bedingungen und damit einhergehend vermindertem mitochondrialen Membranpotential, führt die Öffnung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle zu einem Einstrom von  $K^+$  ins Mitochondrium und verhindert eine Matrixkontraktion.<sup>43,44</sup> Zudem wird über die Kanalöffnung das Volumen des Raums zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran aufrechterhalten. Die Regulierung des Intermembranraums ist entscheidend, um während der Ischämie eine geringe Permeabilität der Mitochondrienmembran für Nukleotide zu ermöglichen. Hierdurch wird der Verlust an ATP reduziert und das Angebot an Adenosindiphosphat (ADP) zum Zeitpunkt der Reperfusion erhöht.<sup>77,158</sup> Die  $mK_{ATP}$ -Kanäle werden jedoch nicht nur über Proteinkinasen als Teil kardioprotektiver Signalkaskaden, sondern auch als Feedback-Mechanismus über ATP reguliert. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte ATP-Werte zu einer Reduktion des Membranpotentials und verringerten KaliumEinstrom führen.<sup>157</sup> In experimentellen Studien zeigte sich zudem bei direkter Gabe von ATP eine Blockade der  $mK_{ATP}$ -Kanäle.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen hohen ATP-Spiegeln unter akuter Hyperglykämie und der Öffnungswahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen konnte in Pankreaszellen demonstriert werden.<sup>159</sup> Unter Erhöhung der ATP-Werte bleibt der K<sup>+</sup>-Kanal in diesen Zellen geschlossen, wodurch eine Membrandepolarisation und die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Insulin Freisetzung ermöglicht wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine hyperglykämie Stoffwechsellage verbunden mit erhöhten ATP-Spiegeln auch im Myokard zu einer Hemmung der mK<sub>ATP</sub>-Kanäle und damit Blockade kardioprotektiver Effekte führen könnte.

In der unter IV.1.1 beschriebenen Studie zum Einfluss einer akuten Hyperglykämie auf die Dexmedetomidin-induzierte Konditionierung konnten wir zeigen, dass die Postkonditionierung unter hyperglykämischen Bedingungen vollständig blockiert war.<sup>65</sup> In der Studie wurden jedoch keine zugrundeliegenden Mechanismen untersucht. Die zuvor beschriebenen Vorgänge der exzessiven ROS Produktion und Hemmung der mK<sub>ATP</sub>-Kanäle sind als mögliche Ursachen für die blockierte Kardioprotektion denkbar.

Auch wenn die Dexmedetomidin-induzierte Postkonditionierung ebenfalls zu einer Aktivierung der mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle führt,<sup>95</sup> scheinen im Rahmen einer hyperglykämischen Stoffwechsellage vor allem die mK<sub>ATP</sub>-Kanäle entscheidend. In diesem Zusammenhang konnte eine Studie zur pharmakologischen Konditionierung unter Hyperglykämie zeigen, dass eine Postkonditionierung mit Levosimendan durch Hyperglykämie blockiert wird, nicht aber die Konditionierung durch Milrinon.<sup>120</sup> Vergleichbar mit Dexmedetomidin<sup>48</sup> wird auch die kardioprotektive Wirkung von Levosimendan über Aktivierung beider Kaliumkanäle, mK<sub>ATP</sub> und mBK<sub>Ca</sub>, vermittelt. Im Gegensatz hierzu scheint bei der Konditionierung mittels Milrinon nur der mBK<sub>Ca</sub>-Kanal beteiligt zu sein.<sup>160</sup> Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine akute Hyperglykämie vornehmlich die Öffnung von mK<sub>ATP</sub>-Kanälen blockiert und weniger Einfluss auf die mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle hat. Basierend auf dem Wissen, dass mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle auch im alten Herzen eine Kardioprotektion vermitteln und darüber hinaus im chronischen I/R-Modell die kardiale Funktion verbessern, scheinen diese ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Untersuchungen.<sup>50,161</sup>

Die Postkonditionierung mit Dexmedetomidin wird in der frühen Reperfusion nicht nur durch die Öffnung von  $mK_{ATP}$ -Kanäle, sondern auch über Regulierung der ROS-Produktion vermittelt.<sup>20</sup> Wie oben beschrieben ist im Rahmen von Konditionierungsmaßnahmen die Menge an ROS-Bildung entscheidend. In unserer Studie konnten wir zwar eine blockierte Dexmedetomidin-vermittelte Postkonditionierung zeigen, die Präkonditionierung war jedoch unter Hyperglykämie nicht aufgehoben.<sup>65</sup> Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte die Dauer der hyperglykämischen Bedingungen zum Zeitpunkt der Konditionierung und damit verbunden das Ausmaß an exzessiver ROS-Produktion sein. Kehl et al. haben in einer *in vivo* Studie zu Isofluran demonstriert, dass unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellage hohe Mengen an ROS zu einer Blockade der Kardioprotektion führen. Durch Gabe des Radikalfängers N-Acetylcystein konnte die Isofluran-induzierte Infarktgrößenreduktion wieder hergestellt werden.<sup>156</sup> Zum Zeitpunkt der Präkonditionierung mit Dexmedetomidin waren die isolierten Herzen in der aktuellen Studie lediglich fünf Minuten einer Hyperglykämie ausgesetzt, während es bei der Postkonditionierung bereits 48 Minuten waren. Im Vergleich dazu wurden die Versuchstiere in der Studie von Kehl et al. für mindestens 30 Minuten vor dem I/R-Schaden mit Glukose-Lösung behandelt.<sup>156</sup> Basierend auf den Untersuchungen von Tanaka et al. lässt sich vermuten, dass zum Zeitpunkt der Dexmedetomidin-induzierten Präkonditionierung in der aktuellen Studie aufgrund der kurzen Hyperglykämie noch keine exzessive ROS-Produktion stattgefunden hat und daher keine Blockade der Kardioprotektion vorlag. Zu diesem Zeitpunkt handelt es sich hierbei jedoch lediglich um eine Annahme und muss durch Folgeuntersuchungen z.B. mit direkter ROS Messung verifiziert werden. Der Einfluss der Dauer einer Hyperglykämie wurde in einer Folgestudie unserer Arbeitsgruppe zu RIPC weiter untersucht.<sup>162</sup> Bei dieser translationalen Studie wurde in gesunden Probanden ein RIPC-Stimulus mittels Oberarmischämie induziert und das isolierte Plasma entsprechend dem Protokoll der Studie V.1 auf isolierte Rattenherzen an der Langendorff-Anlage appliziert. Die Herzen wurden mit Glukose-Lösung als kurze Hyperglykämie bis zum Beginn der Ischämie oder als lange Hyperglykämie bis zum Ende der Reperfusion behandelt. Der kardioprotektive Effekt von RIPC Plasma wurde unter Hyperglykämie blockiert, wobei sich hier ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Dauer der Hyperglykämie zeigte.

Während keine Infarktgrößenreduktion durch RIPC-Plasma unter langer Hyperglykämie erzielt werden konnte, führte die Applikation von RIPC-Plasma (im Vergleich zur Kontrollgruppe) unter kurzer Hyperglykämie zu einer myokardialen Protektion. Interessanterweise war diese Infarktgrößenreduktion jedoch weniger ausgeprägt als die durch RIPC-Plasma unter Normoglykämie.<sup>162</sup> Vereinbar mit diesen Daten zeigte Kehl et al., dass eine schwere Hyperglykämie (> 600 mg/dl) die Isofluran-induzierte Konditionierung vollständig blockiert, eine moderate Hyperglykämie (> 300 mg/dl) aber nur zu einer geringen Hemmung der Infarktgrößenreduktion führt.<sup>105</sup> Diese Studienergebnisse unterstreichen damit nicht nur die Annahme, dass die Dauer und Ausprägung einer Hyperglykämie entscheidend sind, sondern verdeutlichen die Tragweite auch kurzer hyperglykämischer Phasen im klinischen Alltag.

### 3. Der Einfluss von Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) ist eine der Haupt-Komorbiditäten, die mit einer Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert sind.<sup>2,163</sup> Neben einer erhöhten Gesamt-Mortalität bei Patienten mit Diabetes (ca. 1,5-fach höher als in der Vergleichsgruppe) erkranken diese Personen auch häufiger an einer koronaren Herzerkrankung (KHK), einem Myokardinfarkt und einer Herzinsuffizienz.<sup>52,164</sup> Aktuelle Studien beschreiben bei Personen mit DM2 ein 10-Jahres-Risiko für die Entstehung einer KHK von 21%. Dabei steigt das absolute Risiko altersabhängig auf bis zu 30% an. Auswertungen des Robert Koch-Instituts zeigen zudem eine steigende Prävalenz des diagnostizierten DM (zuletzt 8,9% 2019/20) und prognostizieren einen weiteren Anstieg in den kommenden Jahren.<sup>165</sup> Die Behandlung von Patienten mit DM nimmt daher einen zunehmenden Stellenwert in der Klinik ein und muss auch in Bezug auf die Schwierigkeiten der Translation von Konditionierungsstrategien betrachtet werden.

Experimentelle und klinische Studien deuten darauf hin, dass ein DM zu einer Aufhebung kardioprotektiver Effekte pharmakologischer und ischämischer Strategien führt.<sup>166</sup> Ein DM bewirkt zum Beispiel eine Blockade der IPC in Patienten mit Myokardinfarkt. Ishihara et al.<sup>167</sup> zeigten in einer Untersuchung zu Angina Pectoris (AP), dass Patienten mit vorbestehenden Angina Beschwerden eine reduzierte Mortalität nach Myokardinfarkt hatten im Vergleich zu Patienten ohne Symptomatik.

Man vermutet, dass die subletale Ischämie- und Reperfusion, die sich als AP Beschwerden darstellt, vergleichbar mit einer IPC ist und so den I/R-Schaden nach Myokardinfarkt reduziert. Dieser protektive Effekt wurde jedoch bei Patienten mit DM-Diagnose vollständig aufgehoben. Hier zeigte sich kein Mortalitätsvorteil bei vorbestehenden AP Symptomen. Vergleichbar mit den Daten zur ischämischen Konditionierung scheinen auch pharmakologische Konditionierungsstrategien im diabetischen Herzen blockiert zu sein. Sowohl für die Isofluran-<sup>168</sup> als auch die Morphin-induzierte Präkonditionierung<sup>169</sup> wie auch die Sevofluran-Postkonditionierung<sup>170</sup> konnte in diabetischen Tieren (Behandlung mit Streptozotocin) keine Infarktgrößenreduktion induziert werden.

Experimentelle Studien konnten mögliche zugrundeliegende Mechanismen dieser blockierten Kardioprotektion bei DM bereits nachweisen. So war in Versuchstieren mit DM die Aktivität der GSK3 $\beta$ , die die Öffnung der mPTP reguliert, erhöht.<sup>132,171</sup> Bei der chronischen Stoffwechselstörung DM scheint auch ein Zusammenhang zwischen mK<sub>ATP</sub>-Kanälen und der Anpassung von Kardiomyozyten an ischämische Bedingungen zu bestehen. Ren et al.<sup>172</sup> zeigten in einem Tiermodell, dass ein DM über veränderte *messenger ribonucleic acid* (mRNA) Expression zu einer Funktionsstörung der mK<sub>ATP</sub>-Kanäle führt und die Kardiomyozyten dadurch ihre Anpassungsfähigkeit gegen Ischämie und Hypoxie verlieren. Auf Grundlage dieser Forschungsergebnisse ist anzunehmen, dass eine akute oder chronische hyperglykämische Stoffwechsellaage insbesondere auf die Konditionierungsstrategien mit mK<sup>+</sup>-Kanälen als Endeffektor einen Einfluss haben. Darüber hinaus kommt es bei einer DM Erkrankung zu einer exzessiven ROS-Produktion, Abnahme der NO Verfügbarkeit und einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion durch Regulation der mPTP.<sup>127</sup> Somit hat eine DM-Erkrankung einen negativen Einfluss auf verschiedene Schlüsselfiguren kardioprotektiver Signalkaskaden am Herzen.

Im Gegensatz zur pharmakologischen oder ischämischen Konditionierung, die direkt am Herzen angreifen, werden durch RIPC humorale Faktoren freigesetzt, die dann am Herzen wirksam werden.<sup>28,125</sup> Eine mögliche Aufhebung kardioprotektiver Effekte von RIPC durch DM kann daher nicht nur durch negative Einflüsse direkt am Myokard, sondern auch durch eine Blockade von Freisetzung oder Transport humoraler Faktoren hervorgerufen werden. Eine Diskrepanz zwischen Blockade der Freisetzung humoraler Faktoren und einen negativen Einfluss direkt am Myokard konnten Bunte et al. in Bezug auf Propofol als Einflussfaktor herausarbeiten.<sup>173</sup>

In der *in vivo* Studie zu RIPC wurde die Freisetzung humoraler Faktoren durch Gabe von Propofol inhibiert, während die myokardialen Signalkaskaden am Herzen direkt nicht blockiert wurden. Um eine klare Abgrenzung der Mechanismen von RIPC in Bezug auf eine DM-Erkrankung zu untersuchen, wurde die Studie unter V.1 konzipiert.<sup>61</sup> Durch den translationalen Aspekt mit Übertragung von Plasma gesunder Tiere auf kranke Herzen und *vice versa* konnte gezeigt werden, dass unter DM zwar eine Freisetzung humoraler Faktoren erfolgt, die kardioprotektiven Effekte im diabetischen Myokard jedoch blockiert sind. Durch Übertragung von RIPC-Plasma gesunder Tiere auf isolierte Herzen von Ratten mit DM konnte keine Infarktgrößenreduktion induziert werden. Im Gegensatz zeigte sich nach Transfer von RIPC-Plasma, entnommen von Ratten mit DM, auf gesunde Herzen eine deutliche Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe. Entscheidend für die Freisetzung und den Transport der humoralen Faktoren scheint ein intaktes afferentes Nervensystem zu sein. In der *in vivo* Studie von Pickard et al. war die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC und damit die kardioprotektiven Eigenschaften nach bilateraler Vagotomie vollständig aufgehoben.<sup>174</sup> Aus diesen Ergebnissen folgern die Autoren, dass die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC abhängig von einer Stimulation des N. Vagus ist. Die Bedeutung der intakten sensorischen Innervation, insbesondere des Organs wo der RIPC-Stimulus appliziert wird, konnte auch in diabetischen Patienten nachgewiesen werden. Jensen et al.<sup>175</sup> zeigten in ihrer translationalen Studie bei Übertragung von humanen RIPC-Plasma auf isolierte Herzen, dass bei diagnostizierter diabetischer peripherer Neuropathie keine Infarktgrößenreduktion induziert werden kann. Im Gegensatz dazu führt die Applikation des Plasmas von Patienten mit DM, aber ohne Neuropathie, zu einer Kardioprotektion nach I/R-Schaden. Die Ergebnisse unterstreichen damit den Einfluss des Nervensystems auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC und sind vereinbar mit den Daten der aktuellen translationalen Studie. Auch die antidiabetische Medikation scheint eine Rolle bei der Blockade kardioprotektiver Mechanismen zu spielen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Einnahme von Sulfonylharnstoffen, die als Kaliumkanalblocker wirken, kardioprotektive Effekte blockiert.<sup>176</sup>

Insgesamt zeigt die aktuelle Studienlage deutlich, dass ein Diabetes mellitus als Begleiterkrankung die kardioprotektive Wirkung verschiedener Konditionierungsstrategien vollständig aufhebt. Aufgrund der steigenden Inzidenz des DM und der zugleich hohen Korrelation mit dem Auftreten einer KHK, stellen Strategien zur verbesserten Ischämie-Toleranz in diabetischen Patienten eine große Herausforderung dar. Ein detailliertes Verständnis zugrundeliegender Mechanismen der blockierten kardioprotektiven Signalkaskaden ist Voraussetzung, um eine passende myokardiale Konditionierungsstrategie bei Diabetikern zu erarbeiten.

#### 4. Translation in die Klinik

Auf Grundlage der vielversprechenden experimentellen Daten zur ischämischen und pharmakologischen Konditionierung stellte sich die Frage, ob diese Strategien auch in die klinische Praxis umgesetzt werden können.

Erste klinische Studien zur Untersuchung kardioprotektiver Effekte volatiler Anästhetika zeigten positive Ergebnisse in Bezug auf Surrogatparameter für Organdysfunktion wie die Freisetzung von Troponin.<sup>51</sup> So konnten De Hert et al. in einer monozentrischen Studie mit 50 CABG Patienten für die Sevofluran-induzierte Prä- und Postkonditionierung eine signifikante Reduktion der postoperativen Troponin I Werte im Vergleich zu Patienten mit totaler intravenöser Anästhesie (TIVA) zeigen.<sup>177</sup> Auch die Dauer des Intensivaufenthaltes als sekundärer Endpunkt war in dieser Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe verkürzt. Auf Basis dieser und weiterer Studien mit vorteilhaften Ergebnissen volatiler Anästhetika in herzchirurgischen Patienten wurden durch die *European Association for Cardiothoracic Surgery* (EACTS) Empfehlungen zum Einsatz von Inhalationsanästhetika ausgesprochen. Die Ergebnisse der frühen monozentrischen Studien wurden jedoch aufgrund ihrer geringen Patientenzahl und Biomarkern als primären Endpunkt in Folgestudien zunehmend in Frage gestellt. In der randomisiert-kontrollierten Studie von Landoni et al. wurden 200 Patienten eingeschlossen, die sich einer Hochrisiko-Herzoperation (Kombinationseingriff von CABG und Klappenoperation) unterzogen.<sup>178</sup> Weder für die 1-Jahres-Mortalität noch für die Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation konnte eine Überlegenheit durch Sevofluran-Gabe im Vergleich zu TIVA gezeigt werden.

Diese Ergebnisse wurden durch eine pragmatische, randomisiert-kontrollierte multizentrische Studie bestätigt.<sup>179</sup> Bei 5400 CABG-Patienten gab es keinen Überlebensvorteil (1-Jahres-Mortalität) oder eine Reduktion unerwünschter Ereignisse durch Einsatz volatiler Anästhetika (Sevofluran, Desfluran, Isofluran) im Vergleich zu TIVA. Auch die Übertragung der Helium-induzierten Konditionierung in klinische Studien bleibt unzufriedenstellend. Während Helium bei gesunden Probanden protektive Eigenschaften gegenüber dem I/R-Schaden vermittelt,<sup>180</sup> führt die Prä- oder Postkonditionierung mit Helium während einer CABG Operation nicht zu einer Reduktion der postoperativen Troponin Werte.<sup>181</sup> Diese Diskrepanz zwischen klinischen und experimentellen Daten zeigt sich auch in Studien zugrundeliegender Mechanismen pharmakologischer Konditionierung mit Inhalationsanästhetika. Bei Patienten, die sich einer CABG Operation unterzogen, wurde kein Effekt einer Prä- oder Postkonditionierung mit Helium auf die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteinkinasen (u.a. ERK1/2 und PKC) im humanen Myokard beobachtet.<sup>181</sup> Demgegenüber deuten Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien auf eine Beteiligung dieser Proteinkinasen in der Helium-induzierten Konditionierung hin.<sup>33,182</sup>

Ähnlich wie die Datenlage zu Kardioprotektion und Inhalationsanästhetika zeigen auch die klinischen Studien zu anderen pharmakologischen Konditionierungsstrategien keine eindeutigen Ergebnisse. Ein vielversprechender Ansatz war der hochselektive  $\alpha_2$ -Agonist Dexmedetomidin, der auf der Intensivstation bereits als Sedativum und zur Prävention des postoperativen Delirs eingesetzt wird.<sup>93</sup> Neben diesen klinischen Eigenschaften konnten in experimentellen Studien auch kardioprotektive Effekte gegenüber einem I/R-Schaden nachgewiesen werden.<sup>20</sup> Erste monozentrische Studien zeigten nicht nur Hinweise auf einen verbesserten Herzindex nach CABG Operation, sondern auch reduzierte Troponin Werte nach CABG oder Herzklappenchirurgie bei Einsatz von Dexmedetomidin<sup>183,184</sup>. Auch in Bezug auf die Nierenfunktion scheint Dexmedetomidin protektive Effekte zu vermitteln. In einer Metaanalyse von Peng et al. führt die perioperative Gabe der Substanz bei kardiochirurgischen Patienten zu einer signifikanten Reduktion eines postoperativen akuten Nierenversagens.<sup>185</sup> Die bisher durchgeführten Studien sind aufgrund geringer Patientenzahl jedoch nur eingeschränkt beurteilbar und große randomisierte multizentrische Studien stehen noch aus.

Aufgrund der seit 2022 bestehenden altersabhängig eingeschränkten Anwendungsempfehlungen von Dexmedetomidin hat das Medikament in Bezug auf die myokardiale Konditionierung im klinischen Setting an Attraktivität verloren. Basierend auf den Ergebnissen der SPICEIII Studie wurde aufgrund eines erhöhten Mortalitätsrisikos ein Warnhinweis für die Anwendung von Dexmedetomidin bei Intensivpatienten  $\geq 65$  Jahren ausgesprochen.<sup>186</sup> Da jedoch insbesondere dieses Patientenkontinuum von einer perioperativen Kardioprotektion profitieren würde, müssen zukünftig weitere klinische Substanzen zur Konditionierung untersucht werden.

Neben den pharmakologischen Konditionierungsstrategien ist auch eine Translation der ischämischen Fernkonditionierung in das klinische Setting möglich. Insbesondere die RIPC als praktikable und nicht-invasive Methode wurde in verschiedenen klinischen Studien bei herzchirurgischen Patienten untersucht.<sup>124</sup> Vergleichbar mit den Daten zu Inhalationsanästhetika weckten auch die ersten klinische RIPC-Studien die Hoffnung auf eine erfolgreiche Translation experimenteller Ergebnisse in die klinische Praxis. Sowohl in der monozentrischen Studie von Hausenloy et al.<sup>187</sup> also auch in der Untersuchung von Thielmann et al.<sup>188</sup> wurden reduzierte Troponin Werte durch Einsatz von RIPC in herzchirurgischen Patienten beobachtet. Bei diesen Studien handelte es sich jedoch nur um kleine *Proof-of-Concept* Studien, die in erster Linie die Auswirkung von RIPC auf die Freisetzung von Biomarkern untersuchten, während klinische Ereignisse kaum betrachtet wurden. Es folgten große multizentrische Studien (RIPHeart und ERRICA), die neben Biomarker auch kombinierte Endpunkte (u.a. kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Langzeitüberleben) untersuchten.<sup>189,190</sup> Hier zeigte sich jedoch kein Vorteil von RIPC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Follow-up RIPHeart Studie konnte auch ein Jahr nach Operation keinen Überlebensvorteil in Bezug auf den zusammengesetzten Endpunkt zeigen.<sup>191</sup> Wie bei der RIPC bleiben auch die Untersuchungen zu RIPostC im Rahmen der PCI unzufriedenstellend. In der Studie von Hausenloy et al. wurden über 5000 Patienten, die sich bei einem akuten Myokardinfarkt einer PCI unterzogen, eingeschlossen.<sup>192</sup> RIPostC hatte im Vergleich zur alleinigen PCI keinen protektiven Effekt auf die Endpunkte kardiovaskulärer Tod, Hospitalisierung wegen Herzinsuffizienz oder myokardiale Biomarker. In den folgenden Jahren wurden kardioprotektive Eigenschaften von RIPC auch in nicht-kardiochirurgischen Patienten untersucht.

In der randomisiert kontrollierten Studie von Ekeloef et al. wurden über 600 Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko, die sich einer Hüftfraktur-Operation unterzogen, eingeschlossen.<sup>193</sup> In der RIPC Gruppe zeigte sich sowohl ein niedrigerer postoperativer Troponin Wert als auch eine geringere Inzidenz von Myokardinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hervorzuheben ist, dass in dieser Studie ca. 70% der Patienten weiblich waren. Bei den großen multizentrischen RIPC-Studien im herzchirurgischen Setting wurden überwiegend männliche Patienten eingeschlossen (im Vergleich bei RIPHeart und ERICCA >70% männlich). Diesbezüglich konnte in verschiedenen experimentelle Studien bereits geschlechtsspezifische Unterschiede auf Konditionierungsstimuli herausgearbeitet werden; wobei insbesondere die altersabhängige Östrogen-Produktion im weiblichen Geschlecht als Einflussfaktor diskutiert wird.<sup>194,195</sup> In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus dem Jahr 2021 von Halapas et al. konnte dagegen kein kardioprotektiver Effekt von RIPC bei Patienten während einer Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) Prozedur beobachtet werden.<sup>196</sup> Diese diskrepanten Ergebnisse spiegeln sich auch in Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen von RIPC wider. So waren die im Tierversuch ermittelten Signalkaskaden von RIPC, mit Beteiligung von ERK1/2, PKB, GSK3 $\beta$  und PKC, in humanen atrialen Herzmuskelzellen bei Patienten nach RIPC Stimulus nicht aktiviert.<sup>197</sup>

Während die kardioprotektiven Eigenschaften von RIPC in klinischen Studien uneinheitlich bleiben, deutet sich in einigen Untersuchungen ein nephroprotektiver Effekt von RIPC an. Kim et al. konnten in ihrer prospektiven monozentrischen Studie zwar keinen Unterschied in Troponin Werten zeigen, jedoch war das Auftreten von postoperativen akuten Nierenversagen in der RIPC signifikant reduziert.<sup>198</sup> Eine im Jahr 2022 publizierte Meta-Analyse, die 79 randomisiert-kontrollierte Studien und über 10.000 Patienten eingeschlossen hat, bestätigt diese Daten.<sup>199</sup> Während es keinen Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf den postoperativen Myokardinfarkt gab, wurde in der RIPC-Gruppe eine signifikant reduzierte Inzidenz eines akuten Nierenversagens beobachtet. Die Subgruppen-Analyse deutete zudem an, dass der nephroprotektive Effekt von RIPC bei Einsatz volatiler Anästhetika besonders ausgeprägt war.

Eine Kombination verschiedener Störfaktoren wird im Zusammenhang mit der Diskrepanz zwischen experimentellen und klinischen Konditionierungsstudien diskutiert, wobei man zwischen Patientencharakteristika und perioperativen Faktoren wie dem Anästhesieregime unterscheiden muss.<sup>11,12</sup> Neben dem in dieser Schrift untersuchtem Einfluss der Komorbiditäten Hyperglykämie und Diabetes Mellitus, scheint auch das Alter der Patienten eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>200</sup> Klinische und experimentelle Studien deuten sowohl für pharmakologische als auch ischämische Konditionierungsstrategien auf einen Verlust protektiver Effekte im alternden Myokard hin.<sup>201,202</sup> Als Ursache hierfür wird die Blockade verschiedener kardioprotektiver Signalkaskaden im alten Herzen diskutiert, wobei vor allem das Mitochondrium als Endeffektor sowie die Freisetzung von ROS eine Rolle spielen.<sup>203</sup> Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die Freisetzung von humoralen Faktoren nach RIPC altersabhängig ist. In diesem Zusammenhang konnten Heinen et al. in einer translationalen Studie zeigen, dass durch Übertragung von RIPC Plasma junger gesunder männlicher Probanden (< 30 Jahre) eine Reduktion der Infarktgröße im isolierten Rattenherz hervorgerufen werden kann. Im Gegensatz dazu konnte durch Transfer von RIPC Plasma von gesunden Patienten über 60 Jahren keine Kardioprotektion ausgelöst werden.<sup>194</sup> Nicht nur vor dem Hintergrund des demographischen Wandels, sondern auch da ein hohes Alter mit einer erhöhten Sterblichkeit nach einem Herzinfarkt assoziiert ist, sollte in Bezug auf eine erfolgreiche Translation von Kardioprotektion vor allem der Störfaktor Alter weiter untersucht werden.<sup>204</sup>

In Bezug auf mögliche perioperative Einflussfaktoren wurde in den letzten Jahren vor allem das gewählte Anästhesieregimen, insbesondere der Einsatz von Propofol, diskutiert.<sup>14</sup> In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Kombination von Propofol pharmakologische und ischämische Konditionierungsstrategien blockiert werden.<sup>173,205</sup> Eine Beeinträchtigung mitochondrialer Kaliumkanäle sowie ein Einfluss auf die ROS Freisetzung wird in diesem Zusammenhang vermutet. Die Autoren der zwei bekannten multizentrischen RIPC Studien (ERICCA und RIPHeart) diskutieren ebenfalls einen möglichen Einfluss von Propofol auf die inhibierten protektiven Eigenschaften von RIPC bei herzchirurgischen Patienten. Alle Patienten in der RIPHeart-<sup>190</sup> und > 90% der Patienten in der ERICCA-Studie<sup>189</sup> wurden mit Propofol behandelt.

In diesem Zusammenhang konnten Bunte et al. in einer experimentellen *in vivo* Studie zeigen, dass die Applikation von Propofol zu einer Blockade der Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC Stimulus führt. Im Gegensatz dazu hatte Propofol keinen Einfluss auf die RIPC-induzierte Kardioprotektion am Herzen selbst, sobald die protektiven Faktoren ins Blut freigesetzt wurden.<sup>173</sup> Die Ergebnisse konnten wir in einer translationalen Studie von herzchirurgischen männlichen Patienten bestätigen. Hier wurde ein RIPC Stimulus nach Induktion mit Propofol vor einer CABG Operation durchgeführt und das Plasma anschließend auf isolierte junge Rattenherzen *in vitro* übertragen. Die bisher nicht publizierten Daten zeigen, dass durch Transfer von diesem RIPC Plasma keine Infarktgrößenreduktion *in vitro* ausgelöst werden konnte.

Ein vielversprechender Ansatz zur erfolgreichen Translation scheint der Einsatz von Multi-Target Strategien, also einer Kombination verschiedener Konditionierungsstrategien oder Substanzen.<sup>206</sup> Experimentelle Studien, wie z.B. die unter IV.2 beschriebene Untersuchung, konnten bereits zeigen, dass durch eine Kombination verschiedener Substanzen die Hyperglykämie-induzierte Blockade der Kardioprotektion überwunden werden kann.<sup>122</sup> Additive Effekte von pharmakologischen Stimuli konnten auch für die PDE-Inhibitoren Milrinon und Sildenafil beobachtet werden.<sup>36</sup> Während die alleinige Gabe einer Substanz in subtherapeutischen Dosierungen keine Kardioprotektion erzielte, konnte durch Kombination beider Medikamente in subtherapeutischer Dosierung eine signifikante Infarktgrößenreduktion ausgelöst werden.

Der Ansatz einer Multi-Target Therapie wurde von Chiari et al. in einer prospektiven kontrolliert-randomisierten multizentrischen Studie bei Patienten, die sich einer Aortenklappen-Operation unterzogen, untersucht (ProCCard).<sup>207</sup> In der Behandlungsgruppe wurden insgesamt fünf Konditionierungsstrategien kombiniert: Anästhesie mit Sevofluran, RIPC, strenge Blutglukosekontrolle (< 140 mg/dL), moderate Azidose (pH 7,3) beim *Unclamping* der Aorta und anschließend schrittweise Reperfusion. Die Ergebnisse dieser 2023 publizierten Studie zeigten keinen Vorteil der multimodalen Kardioprotektion in Bezug auf Freisetzung von Troponin sowie unerwünschte Ereignisse innerhalb von 30 Tagen postoperativ. Auch wenn die Ergebnisse der ProCCard Studie ernüchternd scheinen, sind in Bezug auf das Studiendesign und die Patientenpopulation einige Limitierungen zu betrachten.

Die Kombination der gewählten fünf Strategien basiert auf einer Annahme, dass diese Maßnahmen zusammen betrachtet additiv oder synergistisch wirksam sind, stützt sich jedoch nicht auf experimentelle Daten. Es wurden zudem nur knapp über 200 Patienten eingeschlossen, wovon ca. 30% einen Kombinationseingriff von CABG und Aortenklappen-Operation erhielten. Das Ausmaß und die Art des herzchirurgischen Eingriffes spielt jedoch eine zentrale Rolle in Bezug auf die Freisetzung postoperativer Biomarker. Die kurze Aortenklammzeit bei isolierten Aortenklappen-Operationen, welche sich auch in der ProCCard Studie zeigte, führt zumeist zu deutlich niedrigeren postoperativen Troponin-Werten als bei CABG Operationen.<sup>208</sup> In diesem Zusammenhang konnten Devereaux et al. in einer 2022 publizierten prospektiven Kohorten Studie neue Troponin-Schwellenwerte in Bezug auf die Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen zeigen.<sup>209</sup> Postoperative Troponin I Werte, die mit einer erhöhten Mortalität innerhalb von 30 Tagen verbunden waren, lagen hier deutlich über den Werten, die aktuell als Hinweis einer klinischen Myokardschädigung empfohlen werden. Entsprechend dieser Ergebnisse sind bei isolierten CABG- oder Aortenklappen-Eingriffen erst Troponin I Werte von über 5000 ng/L mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Die in der ProCCard Studie gemessenen Troponin I Werte blieben im Durchschnitt deutlich unterhalb dieses Schwellenwertes.<sup>207</sup> Es ist daher denkbar, dass der myokardiale I/R-Schaden im Rahmen der ProCCard Studie zu gering war, um einen protektiven Effekt durch Konditionierungsstrategien zu zeigen. Zuletzt wurden die Patienten in der ProCCard Studie alle mit Propofol (als TIVA in der Kontrollgruppe oder zur Einleitung in der Interventionsgruppe) behandelt. Die zuvor bereits beschriebenen experimentellen Daten von Bunte et al. konnten jedoch zeigen, dass auch die einmalige Gabe von Propofol vor RIPC-Stimulus die Freisetzung humoraler Faktoren blockiert. Die neutralen Ergebnisse der ProCCard Studie könnten also durch die geringe intraoperative Ischämie, die gewählte Patientenpopulation, Wahl der Konditionierungsstrategien und das Anästhesieregime begründet werden.<sup>210</sup>

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Translation kardioprotektiver Strategien in das klinische Setting bis dato unzufriedenstellend bleibt. Durch die Identifikation verschiedener Störfaktoren, unter anderem die in dieser Arbeit beschriebenen Komorbiditäten, könnten zukünftig mögliche Ansatzpunkte in experimentellen und klinischen Studien untersucht werden, die eine erfolgreiche Translation doch noch möglich machen.

## 5. Limitationen

Wie bei den meisten experimentellen Studien gibt es auch in dieser Schrift Limitationen, die betrachtet werden müssen.

Das in den Studien verwendete *in vitro* Modell des isoliert, perfundierten Rattenherz an der Langendorff-Apparatur bietet zwar relevante Vorteile zur Betrachtung experimenteller Fragestellungen, besitzt jedoch die Limitation einer eingeschränkten Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen. Die Langendorff-Anlage stellt ein etabliertes Verfahren für Untersuchungen zum myokardialen I/R-Schaden dar und ermöglicht durch konstant einstellbare Parameter (wie zum Beispiel die Temperatur und den Perfusionsdruck) eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit.<sup>62,211</sup> Darüber hinaus kann der Effekt verschiedener Substanzen auf das isolierte Myokard betrachtet werden, ohne den Einfluss systemischer, humoraler oder neuronaler Faktoren. Diese Eigenschaft ermöglicht nicht nur die Untersuchung einzelner Substanzen auf den I/R-Schaden, sondern auch die gezielte Betrachtung bestimmter Störfaktoren (wie Hyperglykämie oder ein DM). So können insbesondere die zugrundeliegenden Mechanismen einzelner Substanzen oder Faktoren ermittelt werden. Eben genau diese systemischen Faktoren könnten jedoch im Menschen dazu führen, dass kardioprotektive Stimuli aufgehoben oder beeinflusst werden. Untersuchungen an der Langendorff-Apparatur können daher immer nur einen ersten Schritt in der experimentellen Forschung darstellen und Ergebnisse sollten durch *in vivo* Studien validiert werden. Das Langendorff-Modell bietet die Möglichkeit sowohl eine globale als auch eine regionale Ischämie zu untersuchen. In den Studien dieser Schrift wurde sich für die globale Form des I/R-Schaden entschieden, da dieser eine höhere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen den Studien ermöglicht. Zudem ist die Übertragbarkeit auf den I/R-Schaden, der im Rahmen der HLM auftritt, besser. Im Gegensatz dazu spiegelt der regionale I/R-Schaden die Ischämie während eines akuten Myokardinfarktes wider. Die Umsetzung der regionalen Ischämie an der Langendorff-Anlage, durch Umstechung verschiedener Koronargefäße, ist jedoch technisch deutlich aufwendiger und birgt eine höhere Variation des Ischämie-Areals aufgrund von Anatomie, Anzahl oder Ausmaß betroffener Gefäße.

Neben den Limitationen der Langendorff-Apparatur als I/R-Modell, wurden in den Studien dieser Schrift zudem ausschließlich junge, männliche Ratten als Versuchstiere eingesetzt. Lediglich für die unter V.1 beschriebene Studie erfolgte der Einsatz von diabetischen Ratten. In allen anderen Studien dieser Schrift handelt es sich um gesunde Versuchstiere ohne weitere Vorerkrankungen. Das Patientenkollektiv, welches im klinischen Setting maßgeblich von kardioprotektiven Strategien profitieren würde, unterscheidet sich maßgeblich von den jungen, gesunden Versuchstieren dieser Studien. Die Patienten mit hohem perioperativen oder periinterventionellen kardialen Risiko leiden zumeist an einer Vielzahl von Komorbiditäten mit entsprechender Einnahme von Komedikation. Darüber hinaus handelt es sich primär um Patienten beider Geschlechter im fortgeschrittenen Alter. Wie unter VI.4 bereits näher beleuchtet sind vor allem Komorbiditäten und das Alter relevante Störfaktoren in Bezug auf die Translation von Konditionierungsstrategien in die klinische Praxis. Die Studien dieser Schrift dienten jedoch zunächst dazu, verschiedene Substanzen und zugrundeliegende Mechanismen der Konditionierung sowie gezielt ausgewählte Komorbiditäten (Hyperglykämie und DM) ohne weitere Störfaktoren (wie zum Beispiel das Geschlecht) zu beleuchten.

In Bezug auf die Studien zum Einfluss der Komorbiditäten Hyperglykämie und DM wurden mögliche zugrundeliegende Mechanismen oder Signalwege nicht näher untersucht. Die Studien dieser Schrift dienten zunächst der Untersuchung, ob die Komorbiditäten Hyperglykämie und Diabetes mellitus einen Einfluss auf die untersuchten Konditionierungsstrategien haben. Folgestudien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sind erforderlich, um die blockierten Mechanismen weiter aufzudecken, bevor eine erfolgreiche Übertragung in die klinische Praxis denkbar ist.

## VII Ausblick

Das Ziel aller Untersuchungen zu Konditionierungsstrategien bleibt die erfolgreiche Translation der Kardioprotektion in die klinische Praxis. Auch wenn dieses Ziel bis dato noch nicht erreicht werden konnte, wurden durch die zahlreichen experimentellen und klinischen Studien nicht nur relevante Störfaktoren (u.a. Alter, Komorbiditäten, Begleitmedikation, Dauer der Erkrankung, verwendete Anästhetika), sondern auch zugrundeliegende Mechanismen identifiziert. Um eine erfolgreiche Translation zu erzielen, sollten zukünftig diese patientenzentrierten und perioperativen Aspekte näher betrachtet werden.

Ein patientenzentrierter Ansatzpunkt ist die gezielte Auswahl der Studienpopulation im Rahmen klinischer Studien. So könnte zunächst die Betrachtung einzelner Patientengruppen, zum Beispiel entsprechend Alter oder Vorhandensein bestimmter Komorbiditäten, eine erfolgreiche Kardioprotektion in klinischen Studien ermöglichen. Patienten mit einem Diabetes mellitus könnten von einer perioperativen oder periinterventionellen Kardioprotektion profitieren; demgegenüber zeigt jedoch die Datenlage insbesondere bei diesen Patienten die größten Schwierigkeiten bei der Vermittlung kardioprotektiver Effekte.<sup>212</sup> Als erster Schritt wäre daher zunächst eine erfolgreiche Etablierung von Konditionierungsmaßnahmen in nicht-diabetischen Patienten sinnvoll. In weiteren Schritten könnten dann Strategien entwickelt werden, die besser auf Patienten mit DM oder andere Komorbiditäten zugeschnitten sind. Hierzu ist die Identifizierung der blockierten Mechanismen durch die einzelnen Störfaktoren durch experimentelle Studien von großer Relevanz. Durch die Identifikation des Ortes der Blockade (zum Beispiel bestimmter Mediatoren, Enzyme oder Kanäle der kardioprotektiven Signalkaskaden), könnten Konditionierungsstrategien erarbeitet werden, die gezielt bei diesen Komorbiditäten wirksam werden.

In diesem Zusammenhang deuten experimentelle Studien darauf hin, dass verschiedene Signalkaskaden bei unterschiedlichen Patientencharakteristika beeinflusst sind. So scheint im Alter insbesondere der  $mBKA_{Ca}$ -Kanal entscheidend, da dieser auch im alternden Myokard noch kardioprotektive Effekte vermittelt.<sup>50</sup> Im Gegensatz dazu scheint der  $mK_{ATP}$ -Kanal bei der DM-induzierten Blockade der Kardioprotektion eine Schlüsselrolle zu spielen.<sup>107</sup>

Auf Basis dieser Daten wäre daher denkbar, dass Konditionierungsstrategien bevorzugt werden, die ihre protektiven Eigenschaften vornehmlich über  $mBKA_{Ca}$ -Kanal vermitteln. Eine gezielt-ausgewählte Konditionierungsstrategie für bestimmte Patientengruppen, je nach Vorerkrankungsspektrum und Ko-Medikation, wäre somit ein denkbarer Ansatz für die erfolgreiche Translation in die Klinik.

Neben patientenzentrierten und perioperativen Faktoren, die die Translation in das klinische Setting beeinflussen können, scheint auch die Wahl der primären und sekundären Endpunkte von zentraler Rolle.<sup>213</sup> In einer Vielzahl klinischer Studien zu pharmakologischer und ischämischer Konditionierung werden Biomarker, insbesondere das hochsensitive Troponin, als primärer Endpunkt betrachtet. Auch wenn das Troponin als spezifischer Biomarker für die Myokardschädigung etabliert ist, wird der Schwellenwert für die prognostische Bedeutung nach herzchirurgischen Eingriffen aktuell kritisch beleuchtet. Insbesondere da dieser Biomarker auch durch das chirurgische Trauma mitbeeinflusst wird, ist die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen operativen und interventionellen Eingriffen eingeschränkt. Die Relevanz der Auswahl des primären Endpunktes zeigt sich auch in der im Jahr 2023 publizierten Studie von Gaspar et al.<sup>214</sup> Bei über 500 Patienten mit STEMI konnte ein RIPC Stimulus am Bein die Mortalität und Krankenhausaufenthaltsdauer reduzieren, wobei sich kein Unterschied bei den Troponin-Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Daher sollte neben diesen Biomarkern zukünftig primär patientenrelevante kombinierte Endpunkte (Mortalität, Krankenhausaufenthaltsdauer und die gesundheitsrelevante Lebensqualität) erhoben werden.

Auch die Art des I/R-Schadens muss in Hinblick auf die schwierige Translation betrachtet werden. So ist eine Ischämie im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes nicht vergleichbar mit dem I/R-Schaden, der durch die globale Ischämie an der HLM entsteht. Das Ausmaß der Ischämie bei einem Myokardinfarkt ist abhängig von der Lokalisation, der Anzahl der betroffenen Koronargefäßen, dem anatomischen Versorgungstyp, dem Zeitpunkt und der Dauer der Minderperfusion sowie dem Erfolg der Koronarintervention.<sup>14</sup> Darüber hinaus kann in einer akuten Situation wie dem Myokardinfarkt in der Regel lediglich eine Postkonditionierung, aber keine Präkonditionierung durchgeführt werden. Daher sind die Ergebnisse von Konditionierungsstrategien bei Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erleiden schwer vergleichbar, was wiederum zu uneinheitlichen Daten führen kann.

Der I/R-Schaden, der im Rahmen einer HLM auftritt, ist ein globales Ereignis, das vergleichbar ist mit der globalen Ischämie im Rahmen der in dieser Schrift durchgeführten *in vitro* Studien. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Dauer des I/R-Schadens in den experimentellen Studien klar definiert ist; in der klinischen Praxis ist diese Dauer jedoch von einer Vielzahl von Faktoren abhängig (u.a. anatomische Bedingungen, Anzahl der Bypässe, Erfahrung des Operateurs). Trotzdem ist der I/R-Schaden an der HLM ein vermutlich besser kontrollierbarer Vorgang als während eines akuten Myokardinfarktes. Unterschiedliche Konditionierungsstrategien sollten vorzugsweise in beiden Szenarien untersucht, dürfen jedoch nicht miteinander verglichen werden.<sup>215</sup>

Zuletzt bleibt der Ansatz einer Multi-Target Strategie, trotz der neutralen Ergebnisse der ProCCard Studie, weiterhin der vielversprechendste Ansatz für die erfolgreiche Translation.<sup>213</sup> Die von Chiari et al. durchgeführte Untersuchung und die gewonnenen Daten sollten nicht dazu führen, dass der Ansatz von Kombinationsstrategien wieder verworfen wird. Vielmehr können die Methoden und Ergebnisse dieser Studie als Grundlage für die Weiterentwicklung von Multi-Target Strategien genutzt werden. Hierbei sollten Ergebnisse experimenteller Studien zu additiven oder synergistischen Effekten von Konditionierungsstrategien einbezogen und wie oben beschrieben zunächst gezielt begrenzte Patientenpopulation untersucht werden.

## VIII Zusammenfassung

**Hintergrund:** Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen nicht nur zu den häufigsten Todesursachen weltweit, es wird auch ein weiterer Anstieg kardialer Risikofaktoren (wie Alter und Komorbiditäten) prognostiziert. Die Behandlung eines akuten Myokardinfarktes oder der ischämischen Herzerkrankung wurde in den letzten Jahren zunehmend optimiert, die Morbidität und Mortalität dieser Patienten bleibt jedoch nach wie vor hoch. Dabei ist insbesondere das Ausmaß des infarzierten Myokards eine entscheidende Determinante für die Prognose der betroffenen Patienten.

Ziel der pharmakologischen und ischämischen Konditionierung ist es, die Folgen eines Ischämie- und Reperfusionsschadens, wie er im Rahmen eines Myokardinfarktes aber auch perioperativ an der Herz-Lungen-Maschine auftritt, zu minimieren. Trotz umfangreicher experimenteller Forschung mit vielversprechenden Ergebnissen, bleibt die Translation dieser Maßnahmen in den klinischen Alltag bis heute unzufriedenstellend. In der Literatur wird eine Kombination verschiedener Störfaktoren wie das Alter, Geschlecht, Vorkommen von Komorbiditäten und Ko-Medikation diskutiert. Die Studien dieser Schrift dienten der Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen pharmakologischer Konditionierung sowie der Betrachtung einer hyperglykämien bzw. diabetischen Stoffwechsellage als möglicher Einflussfaktor auf die Kardioprotektion.

**Methodik:** Alle Experimente in dieser Schrift wurden an jungen männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Um den Einfluss eines Diabetes mellitus oder einer Hyperglykämie auf die ischämische Fernkonditionierung zu untersuchen, erfolgte ein RIPK Stimulus an den Wistar Ratten *in vivo* mit anschließender Plasma-Gewinnung für die weiteren *in vitro* Versuche. Der Typ 1 Diabetes Mellitus in Studie V wurde in den gesunden männlichen Wistar Ratten durch einmalige intraperitoneale Injektion von Streptozotocin induziert. Für die *in vitro* Untersuchungen zum Ischämie- und Reperfusionsschaden wurde das isoliert perfundierte Herzmodell an der Langendorff-Anlage gewählt. Alle Herzen durchliefen standardisiert eine 33-minütige globale Ischämie, gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusion.

Kontrollherzen erhielten den Krebs-Henseleit-Puffer als Vehikel, während die Interventionsgruppen mit der jeweiligen Substanz bzw. Plasma als Prä- oder Postkonditionierung perfundiert wurden. Um den Einfluss einer akuten Hyperglykämie zu untersuchen, wurden die Herzen einer Gesamtkonzentration von 22 mmol/L Glukose (11 mmol/L über den KHP und 11 mmol/L Glukose-Lösung) ausgesetzt. Der primärer Endpunkt aller Studien in dieser Schrift war die Infarktgrößenbestimmung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung.

**Ergebnisse:** Durch die Ergebnisse der Studien III.1.1 und III.1.2 konnte gezeigt werden, dass die Mannitol-induzierte Kardioprotektion über den Adenosin-1-Rezeptor und nachgeschaltet die  $mK_{ATP}$ -Kanäle vermittelt wird. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse daraufhin, dass weder die Proteinkinase B noch Proteinkinase G als bekannte kardioprotektive Mediatoren an der Mannitol-induzierten Signalkaskade beteiligt sind.

Die Studien unter IV demonstrieren blockierende Effekte einer akuten Hyperglykämie auf die pharmakologische Konditionierung mit Dexmedetomidin und Levosimendan. Die Dexmedetomidin-induzierte Postkonditionierung wird unter Hyperglykämie vollständig aufgehoben, während hyperglykämie Bedingungen keinen Einfluss auf die Präkonditionierung mit Dexmedetomidin haben (Studie IV.1.1). Auch die Levosimendan-induzierte Postkonditionierung wird durch Hyperglykämie aufgehoben und diese Blockade kann durch eine Dosissteigerung nicht überwunden werden. Die Ergebnisse der Studie IV.2.1 zeigen jedoch, dass die Kombination von Levosimendan und dem mPTP-Inhibitor CsA auch unter Hyperglykämie zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führt, während die alleinige Gabe von CsA keinen Einfluss auf die Infarktgröße hat.

Zuletzt wird durch die Ergebnisse der translationalen Studie V.1 demonstriert, dass ein RIPC Stimulus *in vivo* zu einer Freisetzung humoraler Faktoren führt, die durch Transfer auf das isolierte Herz eine Kardioprotektion erzielen. Während diese humorale Faktoren auch in Ratten mit Typ 1 Diabetes mellitus freigesetzt werden, scheinen kardioprotektive Signalkaskaden im diabetisch erkrankten Myokard und unter hyperglykämien Bedingungen blockiert zu sein.

**Fazit:** In dieser Schrift werden pharmakologische und ischämische Konditionierungsstrategien sowie der Einfluss von Hyperglykämie und Diabetes mellitus im Kontext der perioperativen Kardioprotektion beleuchtet. Es werden zudem Gründe erörtert, warum die Translation vielversprechender experimenteller Ergebnisse in die klinische Praxis bisher nicht gelungen ist. Die Studien dieser Schrift erweitern das Verständnis zugrundeliegender Mechanismen der Mannitol-induzierten Konditionierung als vielversprechende kardioprotektive Substanz für den klinischen Einsatz. Darüber hinaus wird der blockierende Einfluss einer akuten Hyperglykämie und des diabetisch erkrankten Myokards hervorgehoben. Sowohl die Dexmedetomidin- als auch Levosimendan-induzierte Konditionierung und auch die über RIPC und humorale Faktoren vermittelte Kardioprotektion wird unter Hyperglykämie aufgehoben. Ein Ansatzpunkt, um diese Blockade zu überwinden, ist die Durchführung von Multi-Target Strategien, wie in dieser Schrift durch Kombination von Levosimendan und einem mPTP-Inhibitor. Weitere potenzielle Störfaktoren (wie Alter, Geschlecht und Komorbiditäten) und zukünftige Perspektiven zur erfolgreichen Translation kardioprotektiver Strategien in die klinische Praxis werden skizziert. Zusammenfassend bleibt die klinische Etablierung von Konditionierungsstrategien weiterhin eine große Herausforderung. Das bisher gewonnene Wissen zugrundeliegender Mechanismen, insbesondere unter pathologischen Zuständen (wie Komorbiditäten) sollte zukünftig genutzt werden, um Konditionierungsstrategien im Sinne einer personalisierten Medizin für gezielt ausgewählte Patientengruppen zu entwickeln.

## IX Literaturverzeichnis

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023;147(8):e93-e621. doi:doi:10.1161/CIR.0000000000001123
2. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2022;80(25):2361-2371. doi:doi:10.1016/j.jacc.2022.11.005
3. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020/12/22/ 2020;76(25):2982-3021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
4. Roe MT, Messenger JC, Weintraub WS, et al. Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. Jul 20 2010;56(4):254-63. doi:10.1016/j.jacc.2010.05.008
5. Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. Nov 11 2008;118(20):2057-62. doi:10.1161/circulationaha.108.784215
6. Jenča D, Melenovský V, Stehlik J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail*. Feb 2021;8(1):222-237. doi:10.1002/ehf2.13144
7. Kayani WT, Ballantyne CM. Improving Outcomes After Myocardial Infarction in the US Population. *Journal of the American Heart Association*. 2018;7(4):e008407. doi:doi:10.1161/JAHA.117.008407
8. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. Jan 2013;123(1):92-100. doi:10.1172/jci62874
9. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667
10. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J*. Mar 14 2017;38(11):774-784. doi:10.1093/eurheartj/ehw224
11. Heusch G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ Res*. Apr 28 2017;120(9):1477-1486. doi:10.1161/circresaha.117.310820
12. Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol*. Dec 2020;17(12):773-789. doi:10.1038/s41569-020-0403-y
13. Kleinbongard P, Bøtker HE, Ovize M, Hausenloy DJ, Heusch G. Co-morbidities and co-medications as confounders of cardioprotection-Does it matter in the clinical setting? *Br J Pharmacol*. Aug 20 2019;doi:10.1111/bph.14839

14. Roth S, Torregroza C, Feige K, et al. Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* Mar 3 2021;22(5)doi:10.3390/ijms22052519
15. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol.* Jun 13 2012;11:67. doi:10.1186/1475-2840-11-67
16. Momeni M, De Hert S. New advances in perioperative cardioprotection. *F1000Research.* 2019;8:F1000 Faculty Rev-538. doi:10.12688/f1000research.17184.1
17. Collet JP, Thiele H, Barbato E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* Apr 7 2021;42(14):1289-1367. doi:10.1093/eurheartj/ehaa575
18. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL, et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* Dec 6 2011;124(23):e652-735. doi:10.1161/CIR.0b013e31823c074e
19. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, et al. 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur Heart J.* Sep 14 2014;35(35):2383-431. doi:10.1093/eurheartj/ehu282
20. Torregroza C, Raupach A, Feige K, Weber NC, Hollmann MW, Huhn R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth Analg.* Dec 2020;131(6):1765-1780. doi:10.1213/ane.0000000000005243
21. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol.* Jun 26 2011;3(6):186-200. doi:10.4330/wjc.v3.i6.186
22. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* Apr 2003;35(4):339-41. doi:10.1016/s0022-2828(03)00043-9
23. Boengler K, Lochnit G, Schulz R. Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov 1 2018;315(5):H1215-H1231. doi:10.1152/ajpheart.00124.2018
24. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* Nov 1986;74(5):1124-36. doi:10.1161/01.cir.74.5.1124
25. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Botker HE, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* Nov 2016;111(6):70. doi:10.1007/s00395-016-0588-8

26. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* Feb 13 2015;116(4):674-99. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348
27. Przyklenk K. Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations. *Anesth Analg.* Oct 2013;117(4):891-901. doi:10.1213/ANE.0b013e318294fc63
28. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol.* Jan 20 2015;65(2):177-95. doi:10.1016/j.jacc.2014.10.031
29. Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Protocols and Mechanisms for Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Method for Reducing Ischemia Reperfusion Injury. *Transplantation.* 2007;84(4):445-458. doi:10.1097/01.tp.0000228235.55419.e8
30. Przyklenk K, Whittaker P. Remote Ischemic Preconditioning: Current Knowledge, Unresolved Questions, and Future Priorities. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 2011;16(3-4):255-259. doi:10.1177/1074248411409040
31. Caricati-Neto A, Errante PR, Menezes-Rodrigues FS. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* Aug 16 2019;20(16)doi:10.3390/ijms20164002
32. Lotz C, Kehl F. Volatile anesthetic-induced cardiac protection: molecular mechanisms, clinical aspects, and interactions with nonvolatile agents. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2015;29(3):749-60. doi:10.1053/j.jvca.2014.11.012
33. Weber NC, Preckel B. Gaseous mediators: an updated review on the effects of helium beyond blowing up balloons. *Intensive Care Med Exp.* Dec 19 2019;7(1):73. doi:10.1186/s40635-019-0288-4
34. Tanaka K, Kersten JR, Riess ML. Opioid-induced cardioprotection. *Curr Pharm Des.* 2014;20(36):5696-705. doi:10.2174/1381612820666140204120311
35. Kukreja RC, Salloum F, Das A, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol.* Apr-May 2005;42(5-6):219-32. doi:10.1016/j.vph.2005.02.010
36. Torregroza C, Maas K, Feige K, et al. Combination of the Phosphodiesterase Inhibitors Sildenafil and Milrinone Induces Cardioprotection With Various Conditioning Strategies. *J Cardiovasc Pharmacol.* Dec 2020;76(6):684-691. doi:10.1097/fjc.0000000000000919
37. Bunte S, Behmenburg F, Majewski N, et al. Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesth Analg.* Oct 15 2019;doi:10.1213/ANE.0000000000004417
38. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* Feb 2005;15(2):69-75. doi:10.1016/j.tcm.2005.03.001
39. Hadebe N, Cour M, Lecour S. The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res Cardiol.* Jan 15 2018;113(2):9. doi:10.1007/s00395-018-0670-5

40. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* Jul 2009;47(1):32-40. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.019
41. Lisa FD, Canton M, Menabò R, Kaludercic N, Bernardi P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Failure Reviews.* 2007/12/01 2007;12(3):249-260. doi:10.1007/s10741-007-9028-z
42. Debska G, Kicinska A, Skalska J, et al. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* Dec 2 2002;1556(2-3):97-105. doi:10.1016/s0005-2728(02)00340-7
43. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jul 2002;283(1):H284-95. doi:10.1152/ajpheart.00034.2002
44. Garlid KD, Dos Santos P, Xie Z-J, Costa ADT, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 2003/09/30/ 2003;1606(1):1-21. doi:[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00109-9)
45. Smith CO, Nehrke K, Brookes PS. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. *Biochem J.* Jun 9 2017;474(12):2067-2094. doi:10.1042/BCJ20160623
46. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 2001;280(2):H649-57. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.2.H649
47. Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol.* Jul 2005;39(1):7-16. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.003
48. Raupach A, Karakurt E, Torregroza C, et al. Dexmedetomidine Provides Cardioprotection During Early or Late Reperfusion Mediated by Different Mitochondrial K<sup>+</sup>-Channels. *Anesth Analg.* Jan 2021;132(1):253-260. doi:10.1213/ane.0000000000005148
49. Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, et al. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Res Cardiol.* Jan 2015;110(1):452. doi:10.1007/s00395-014-0452-7
50. Heinen A, Strothoff M, Schmidt A, et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol.* Aug 2014;56:99-105. doi:10.1016/j.exger.2014.03.029
51. Roth S, Torregroza C, Huhn R, Hollmann MW, Preckel B. Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications. *Anesth Analg.* Dec 2020;131(6):1751-1764. doi:10.1213/ane.0000000000005234
52. Jelesoff NE, Feinglos M, Granger CB, Califf RM. Outcomes of diabetic patients following acute myocardial infarction: a review of the major thrombolytic trials. *Coron Artery Dis.* Oct 1996;7(10):732-43. doi:10.1097/00019501-199610000-00006

53. Angeli F, Reboldi G, Poltronieri C, et al. Hyperglycemia in acute coronary syndromes: from mechanisms to prognostic implications. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. Dec 2015;9(6):412-24. doi:10.1177/1753944715594528
54. Bellodi G, Manicardi V, Malavasi V, et al. Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. Oct 15 1989;64(14):885-8. doi:10.1016/0002-9149(89)90836-9
55. Goyal A, Mehta SR, Diaz R, et al. Differential clinical outcomes associated with hypoglycemia and hyperglycemia in acute myocardial infarction. *Circulation*. Dec 15 2009;120(24):2429-37. doi:10.1161/circulationaha.108.837765
56. Wei CH, Litwin SE. Hyperglycemia and Adverse Outcomes in Acute Coronary Syndromes: Is Serum Glucose the Provocateur or Innocent Bystander? *Diabetes*. 2014;63(7):2209-2212. doi:10.2337/db14-0571 %J Diabetes
57. Ceriello A. Acute hyperglycaemia: a 'new' risk factor during myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2004;26(4):328-331. doi:10.1093/eurheartj/ehi049 %J European Heart Journal
58. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Anaesth*. Apr 2008;100(4):465-71. doi:10.1093/bja/aen022
59. Kersten JR, Schmelting TJ, Orth KG, Pagel PS, Wartier DC. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am J Physiol*. Aug 1998;275(2):H721-5. doi:10.1152/ajpheart.1998.275.2.H721
60. Kristiansen SB, Paelestik KB, Johnsen J, et al. Impact of hyperglycemia on myocardial ischemia-reperfusion susceptibility and ischemic preconditioning in hearts from rats with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. May 31 2019;18(1):66. doi:10.1186/s12933-019-0872-7
61. Torregroza C, Gnaegy L, Raupach A, et al. Influence of Hyperglycemia and Diabetes on Cardioprotection by Humoral Factors Released after Remote Ischemic Preconditioning (RIPC). *Int J Mol Sci*. Aug 18 2021;22(16)doi:10.3390/ijms22168880
62. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. Jun 2011;50(6):940-50. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018
63. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. Mar-Apr 2007;55(2):113-26. doi:10.1016/j.vascn.2006.05.006
64. Watanabe M, Okada T. Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Methods Mol Biol*. 2018;1816:107-116. doi:10.1007/978-1-4939-8597-5\_8
65. Torregroza C, Feige K, Schneider L, et al. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J Clin Med*. 2020;9(5):1445. doi:10.3390/jcm9051445

66. Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther.* Aug 2009;23(4):327-31. doi:10.1007/s10557-009-6176-5
67. Davis M, Lucatorto M. Mannitol revisited. *J Neurosci Nurs.* Jun 1994;26(3):170-4. doi:10.1097/01376517-199406000-00012
68. Poullis M. Mannitol and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* Feb 1999;47(1):58-62. doi:10.1055/s-2007-1013112
69. Shawkat H, Westwood M-M, Mortimer A. Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain.* 2012;12(2):82-85. doi:10.1093/bjaceaccp/mkr063
70. Farrokh S, Cho SM, Suarez JI. Fluids and hyperosmolar agents in neurocritical care: an update. *Curr Opin Crit Care.* Apr 2019;25(2):105-109. doi:10.1097/mcc.0000000000000585
71. Schilte C, Bouzat P, Millet A, et al. Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med.* Oct 2015;43(10):2212-8. doi:10.1097/ccm.0000000000001137
72. O'Kane D, Baldwin GS, Bolton DM, Ischia JJ, Patel O. Preconditioning against renal ischaemia reperfusion injury: the failure to translate to the clinic. *J Nephrol.* Aug 2019;32(4):539-547. doi:10.1007/s40620-019-00582-6
73. Falck G, Schjott J, Jynge P. Hyperosmotic pretreatment reduces infarct size in the rat heart. *Physiol Res.* 1999;48(5):331-40.
74. Gardner TJ, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers DE. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery.* Sep 1983;94(3):423-7.
75. Magovern GJ, Jr., Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation.* Sep 1984;70(3 Pt 2):I91-5.
76. Feige K, Rubbert J, Raupach A, et al. Cardioprotective Properties of Mannitol-Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *Int J Mol Sci.* Feb 27 2021;22(5)doi:10.3390/ijms22052395
77. Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Sep 2003;285(3):H921-30. doi:10.1152/ajpheart.00421.2003
78. Paggio A, Checchetto V, Campo A, et al. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature.* Aug 2019;572(7771):609-613. doi:10.1038/s41586-019-1498-3
79. Torregroza C, Glashoerster CO, Feige K, et al. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *Int J Mol Sci.* Nov 19 2021;22(22)doi:10.3390/ijms222212471
80. Zhao YY, Tian Y, Zhang J, et al. Effects of an oral allosteric AKT inhibitor (MK-2206) on human nasopharyngeal cancer in vitro and in vivo. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:1827-37. doi:10.2147/dddt.S67961

81. Torregroza C, Jalajel O, Raupach A, et al. Activation of PKG and Akt Is Required for Cardioprotection by Ramelteon-Induced Preconditioning and Is Located Upstream of mKCa-Channels. *Int J Mol Sci.* Apr 8 2020;21(7)doi:10.3390/ijms21072585
82. Tadevosyan A, Vaniotis G, Allen BG, Hébert TE, Nattel S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J Physiol.* Mar 15 2012;590(6):1313-30. doi:10.1113/jphysiol.2011.222794
83. Lasley RD. Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection-Current Limitations and Future Directions. *Front Pharmacol.* 2018;9:310. doi:10.3389/fphar.2018.00310
84. Headrick JP, Lasley RD. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):189-214. doi:10.1007/978-3-540-89615-9\_7
85. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov.* Apr 2013;12(4):265-86. doi:10.1038/nrd3955
86. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res.* Oct 2001;52(1):25-39. doi:10.1016/s0008-6363(01)00358-3
87. Pingle SC, Mishra S, Marcuzzi A, et al. Osmotic diuretics induce adenosine A1 receptor expression and protect renal proximal tubular epithelial cells against cisplatin-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* Oct 8 2004;279(41):43157-67. doi:10.1074/jbc.M405666200
88. Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U, Olsson RA. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Aug 1987;336(2):204-10. doi:10.1007/bf00165806
89. Inagaki K, Churchill E, Mochly-Rosen D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res.* May 1 2006;70(2):222-30. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.015
90. Rotko D, Kunz WS, Szewczyk A, Kulawiak B. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *Int J Biochem Cell Biol.* Aug 2020;125:105792. doi:10.1016/j.biocel.2020.105792
91. Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res.* Oct 15 1999;85(8):731-41. doi:10.1161/01.res.85.8.731
92. Hassouna A, Matata BM, Galiñanes M. PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *Am J Physiol Cell Physiol.* Nov 2004;287(5):C1418-25. doi:10.1152/ajpcell.00144.2004
93. Keating GM. Dexmedetomidine: A Review of Its Use for Sedation in the Intensive Care Setting. *Drugs.* Jul 2015;75(10):1119-30. doi:10.1007/s40265-015-0419-5

94. Castillo RL, Ibacache M, Cortinez I, et al. Dexmedetomidine Improves Cardiovascular and Ventilatory Outcomes in Critically Ill Patients: Basic and Clinical Approaches. *Front Pharmacol.* 2019;10:1641. doi:10.3389/fphar.2019.01641
95. Behmenburg F, Pickert E, Mathes A, et al. The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* Apr 2017;69(4):228-235. doi:10.1097/FJC.0000000000000466
96. Cheng X, Hu J, Wang Y, et al. Effects of Dexmedetomidine Postconditioning on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats: Role of the PI3K/Akt-Dependent Signaling Pathway. *J Diabetes Res.* 2018;2018:3071959. doi:10.1155/2018/3071959
97. Ibacache M, Sanchez G, Pedrozo Z, et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2012/04/01/ 2012;1822(4):537-545. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.013>
98. Riquelme JA, Westermeier F, Hall AR, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism. *Pharmacological Research.* 2016/01/01/ 2016;103:318-327. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.11.004>
99. Yuan F, Fu H, Sun K, Wu S, Dong T. Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Metabolic Brain Disease.* 2017/04/01 2017;32(2):539-546. doi:10.1007/s11011-016-9945-4
100. Jiang C, Xia M, Wang M, Chen S. Dexmedetomidine preconditioning protects isolated rat hearts against ischemia/reperfusion injuries and its mechanism. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences.* 2013/05// 2013;42(3):326-330.
101. Wang L, Tang S, Wang Z, Chen H, Rajcha SS, Qian J. The administration of dexmedetomidine changes microRNA expression profiling of rat hearts. *Biomed Pharmacother.* Dec 2019;120:109463. doi:10.1016/j.biopha.2019.109463
102. Zhang J, Jiang H, Liu DH, Wang GN. Effects of dexmedetomidine on myocardial ischemia-reperfusion injury through PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* Aug 2019;23(15):6736-6743. doi:10.26355/eurrev\_201908\_18565
103. Deng L, Chen H, Wei N, Zhang Z, Wang G. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on regional ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic rat hearts. *Microvascular Research.* 2019/05/01/ 2019;123:1-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.08.006>
104. He L, Hao S, Wang Y, et al. Dexmedetomidine preconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts with endothelial dysfunction. *Biomed Pharmacother.* Jun 2019;114:108837. doi:10.1016/j.biopha.2019.108837
105. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology.* Jan 2002;96(1):183-8. doi:10.1097/00000542-200201000-00032

106. Weber NC, Goletz C, Huhn R, et al. Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium: the regulation of different mitogen-activated protein kinases. *Eur J Pharmacol*. Sep 11 2008;592(1-3):48-54. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.010
107. Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, et al. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2001;280(4):H1744-50. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1744
108. Raphael J, Gozal Y, Navot N, Zuo Z. Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*. Apr 2010;55(4):348-57. doi:10.1097/FJC.0b013e3181d26583
109. Varma S, Lal BK, Zheng R, et al. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2005;289(4):H1744-51. doi:10.1152/ajpheart.01088.2004
110. Harjola V-P, Giannakoulas G, von Lewinski D, et al. Use of levosimendan in acute heart failure. *European Heart Journal Supplements*. 2018;20(suppl\_1):I2-I10. doi:10.1093/eurheartj/suy039
111. Levin R, Degrange M, Del Mazo C, Tanus E, Porcile R. 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*. Sep 2012;17(3):125-30.
112. Mehta RH, Leimberger JD, van Diepen S, et al. Levosimendan in Patients with Left Ventricular Dysfunction Undergoing Cardiac Surgery. *N Engl J Med*. May 25 2017;376(21):2032-2042. doi:10.1056/NEJMoa1616218
113. Papp Z, Édes I, Fruhwald S, et al. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol*. Aug 23 2012;159(2):82-7. doi:10.1016/j.ijcard.2011.07.022
114. Antila S, Sundberg S, Lehtonen LA. Clinical pharmacology of levosimendan. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(7):535-52. doi:10.2165/00003088-200746070-00001
115. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, Warltier DC. Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels. *Anesth Analg*. Jan 2000;90(1):5-11. doi:10.1097/00000539-200001000-00003
116. Stroethoff M, Bunte S, Raupach A, et al. Impact of Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*. Oct 2019;33(5):581-588. doi:10.1007/s10557-019-06908-7
117. Du Toit EF, Genis A, Opie LH, Pollesello P, Lochner A. A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br J Pharmacol*. May 2008;154(1):41-50. doi:10.1038/bjp.2008.52

118. Bunte S, Behmenburg F, Bongartz A, et al. Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca(2+)-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *Cardiovasc Drugs Ther.* Oct 2018;32(5):427-434. doi:10.1007/s10557-018-6819-5
119. Hönisch A, Theuring N, Ebner B, Wagner C, Strasser RH, Weinbrenner C. Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition. *Basic Res Cardiol.* Mar 2010;105(2):155-67. doi:10.1007/s00395-009-0064-9
120. Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, et al. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan-but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc Diabetol.* Jan 12 2012;11:4. doi:10.1186/1475-2840-11-4
121. Du Toit EF, Muller CA, McCarthy J, Opie LH. Levosimendan: effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug 1999;290(2):505-14.
122. Torregroza C, Yueksel B, Ruske R, et al. Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia. *Int J Mol Sci.* Apr 26 2021;22(9)doi:10.3390/ijms22094517
123. Jonsson EN, Antila S, McFadyen L, Lehtonen L, Karlsson MO. Population pharmacokinetics of levosimendan in patients with congestive heart failure. *Br J Clin Pharmacol.* Jun 2003;55(6):544-51. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01778.x
124. Hausenloy D, Lim S. Remote Ischemic Conditioning: From Bench to Bedside. Review. *Frontiers in Physiology.* 2012-February-20 2012;3(27)doi:10.3389/fphys.2012.00027
125. Billah M, Ridiandries A, Allahwala U, et al. Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection. *Oncotarget.* Jan 4 2019;10(2):216-244. doi:10.18632/oncotarget.26537
126. Garratt KN, Whittaker P, Przyklenk K. Remote Ischemic Conditioning and the Long Road to Clinical Translation: Lessons Learned From ERICCA and RIPHeart. *Circ Res.* Apr 1 2016;118(7):1052-4. doi:10.1161/circresaha.115.308102
127. Penna C, Andreadou I, Aragno M, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br J Pharmacol.* Dec 2020;177(23):5312-5335. doi:10.1111/bph.14993
128. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the Diabetic Heart. *The Importance of Akt Phosphorylation.* 2005;54(8):2360-2364. doi:10.2337/diabetes.54.8.2360
129. Behmenburg F, Heinen A, Bruch LV, Hollmann MW, Huhn R. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* Aug 2017;31(4):1223-1226. doi:10.1053/j.jvca.2016.07.005
130. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res.* 2016;2016:9051426. doi:10.1155/2016/9051426

131. Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:181-8. doi:10.2147/dmso.S82272
132. Yadav HN, Singh M, Sharma PL. Involvement of GSK-3 $\beta$  in attenuation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem.* Oct 2010;343(1-2):75-81. doi:10.1007/s11010-010-0500-z
133. Baranyai T, Nagy CT, Koncsos G, et al. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc Diabetol.* Nov 18 2015;14:151. doi:10.1186/s12933-015-0313-1
134. Hassouna A, Loubani M, Matata BM, Fowler A, Standen NB, Galiñanes M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res.* Feb 1 2006;69(2):450-8. doi:10.1016/j.cardiores.2005.11.004
135. Fan Y, Zhang A-M, Xiao Y-B, Weng Y-G, Hetzer R. Glucose–insulin–potassium therapy in adult patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* 2011;40(1):192-199. doi:10.1016/j.ejcts.2010.10.007
136. Ng KW, Allen ML, Desai A, Macrae D, Pathan N. Cardioprotective Effects of Insulin. *Circulation.* 2012;125(5):721-728. doi:doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.063784
137. Ljunggren M, Sköld A, Dardashti A, Hyllén S. The use of mannitol in cardiopulmonary bypass prime solution-Prospective randomized double-blind clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand.* Nov 2019;63(10):1298-1305. doi:10.1111/aas.13445
138. Carlson RE, Aisen AM, Buda AJ. Effect of reduction in myocardial edema on myocardial blood flow and ventricular function after coronary reperfusion. *Am J Physiol.* Mar 1992;262(3 Pt 2):H641-8. doi:10.1152/ajpheart.1992.262.3.H641
139. Hamiko M, Charitos EI, Velten M, et al. Mannitol Is Associated with Less Postoperative Delirium after Aortic Valve Surgery in Patients Treated with Bretschneider Cardioplegia. *Thorac Cardiovasc Surg.* Oct 2022;70(7):549-557. doi:10.1055/s-0040-1715891
140. Klein HH, Nebendahl K, Schubothe M, Kreuzer H. Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol.* May-Jun 1985;80(3):251-9. doi:10.1007/bf01907901
141. Ouriel K, Ginsburg ME, Patti CS, Pearce FJ, Hicks GL. Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation.* Sep 1985;72(3 Pt 2):li254-8.
142. Pastukh V, Ricci C, Solodushko V, Mozaffari M, Schaffer SW. Contribution of the PI 3-kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning. *Mol Cell Biochem.* Jan 2005;269(1-2):59-67. doi:10.1007/s11010-005-2536-z
143. Zálešák M, Blažíček P, Pancza D, Gablovský I, Štrbák V, Ravingerová T. Hyperosmotic environment blunts effectivity of ischemic preconditioning against ischemia-reperfusion injury and

improves ischemic tolerance in non-preconditioned isolated rat hearts. *Physiological research*. 2016/12// 2016;65(6):1045-1051. doi:10.33549/physiolres.933362

144. Witherspoon B, Ashby NE. The Use of Mannitol and Hypertonic Saline Therapies in Patients with Elevated Intracranial Pressure: A Review of the Evidence. *Nurs Clin North Am*. Jun 2017;52(2):249-260. doi:10.1016/j.cnur.2017.01.002

145. Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RM, Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res*. Apr 1993;27(4):565-70. doi:10.1093/cvr/27.4.565

146. Yao L, Kato R, Foe'x P. Isoflurane-induced protection against myocardial stunning is independent of adenosine 1 (A1) receptor in isolated rat heart. *British Journal of Anaesthesia*. 2001/08/01/ 2001;87(2):258-265. doi:<https://doi.org/10.1093/bja/87.2.258>

147. Pravdic D, Sedlic F, Mio Y, Vladic N, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology*. Aug 2009;111(2):267-74. doi:10.1097/ALN.0b013e3181a91957

148. Deckers JW, van Domburg RT, Akkerhuis M, Nauta ST. Relation of admission glucose levels, short- and long-term (20-year) mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. Nov 1 2013;112(9):1306-10. doi:10.1016/j.amjcard.2013.06.007

149. Lazar HL. Hyperglycemia during cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jan 2006;131(1):11-3. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.05.027

150. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, et al. Impact of acute hyperglycemia on left ventricular function after reperfusion therapy in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *Am Heart J*. Oct 2003;146(4):674-8. doi:10.1016/s0002-8703(03)00167-4

151. Marfella R, Siniscalchi M, Esposito K, et al. Effects of stress hyperglycemia on acute myocardial infarction: role of inflammatory immune process in functional cardiac outcome. *Diabetes Care*. Nov 2003;26(11):3129-35. doi:10.2337/diacare.26.11.3129

152. Wahab NN, Cowden EA, Pearce NJ, Gardner MJ, Merry H, Cox JL. Is blood glucose an independent predictor of mortality in acute myocardial infarction in the thrombolytic era? *J Am Coll Cardiol*. Nov 20 2002;40(10):1748-54. doi:10.1016/s0735-1097(02)02483-x

153. Callaghan MJ, Ceradini DJ, Gurtner GC. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. Nov-Dec 2005;7(11-12):1476-82. doi:10.1089/ars.2005.7.1476

154. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. 2019/07/01 2019;44(1):3-15. doi:10.3892/ijmm.2019.4188

155. Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS. Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Letters*. 2010;584(10):2043-2048. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.013>

156. Kehl F, Krolikowski JG, Weihrauch D, Pagel PS, Wartier DC, Kersten JR. N-acetylcysteine restores isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction during hyperglycemia. *Anesthesiology*. Jun 2003;98(6):1384-90. doi:10.1097/00000542-200306000-00013
157. Craig TJ, Ashcroft FM, Proks P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *The Journal of general physiology*. 2008;132(1):131-144. doi:10.1085/jgp.200709874
158. Grover GJ, Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol*. Apr 2000;32(4):677-95. doi:10.1006/jmcc.2000.1111
159. Seino S. Physiology and pathophysiology of K(ATP) channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. *J Diabetes Complications*. Mar-Apr 2003;17(2 Suppl):2-5. doi:10.1016/s1056-8727(02)00274-x
160. Raupach A, Reinle J, Stroethoff M, et al. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J Clin Med*. Apr 12 2019;8(4)doi:10.3390/jcm8040507
161. Behmenburg F, Hölscher N, Flögel U, Hollmann MW, Heinen A, Huhn R. Opening of calcium-activated potassium channels improves long-term left-ventricular function after coronary artery occlusion in mice. *Int J Cardiol*. Aug 15 2017;241:351-357. doi:10.1016/j.ijcard.2017.04.084
162. Feige K, Roth S, M'Pembele R, et al. Influence of Short and Long Hyperglycemia on Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning-A Translational Approach. *Int J Mol Sci*. Nov 22 2022;23(23)doi:10.3390/ijms232314557
163. Buddeke J, Bots ML, van Dis I, et al. Comorbidity in patients with cardiovascular disease in primary care: a cohort study with routine healthcare data. *Br J Gen Pract*. Jun 2019;69(683):e398-e406. doi:10.3399/bjgp19X702725
164. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. Oct 10 2015;6(13):1246-58. doi:10.4239/wjd.v6.i13.1246
165. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes 2023 – Kapitel Epidemiologie, Screening und erhöhtes Diabetesrisiko, Diagnostik. Accessed 17.02.2023, 2023.
166. Saeid F, Aniseh J, Reza B, Manouchehr VS. Signaling mediators modulated by cardioprotective interventions in healthy and diabetic myocardium with ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Prev Cardiol*. Sep 2018;25(14):1463-1481. doi:10.1177/2047487318756420
167. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, et al. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38(4):1007-1011. doi:10.1016/S0735-1097(01)01477-2 %J Journal of the American College of Cardiology
168. Tanaka K, Kehl F, Gu W, et al. Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2002;282(6):H2018-23. doi:10.1152/ajpheart.01130.2001

169. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes*. Jan 2007;56(1):127-36. doi:10.2337/db06-0907
170. Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, Nechemia-Arbely Y, Ziv E, Axelrod JH. Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology*. Jun 2011;114(6):1364-72. doi:10.1097/ALN.0b013e31820efafd
171. Teli DM, Gajjar AK. Glycogen synthase kinase-3: A potential target for diabetes. *Bioorg Med Chem*. Sep 7 2023;92:117406. doi:10.1016/j.bmc.2023.117406
172. Ren Y, Xu X, Wang X. Altered mRNA Expression of ATP-Sensitive and Inward Rectifier Potassium Channel Subunits in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Heart and Aorta. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2003;93(4):478-483. doi:10.1254/jphs.93.478
173. Bunte S, Behmenburg F, Eckelskemper F, et al. Cardioprotection by Humoral Factors Released After Remote Ischemic Preconditioning Depends on Anesthetic Regimen. *Crit Care Med*. Jan 2 2019;doi:10.1097/CCM.0000000000003629
174. Pickard JM, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Co-dependence of the neural and humoral pathways in the mechanism of remote ischemic conditioning. *Basic Res Cardiol*. Jul 2016;111(4):50. doi:10.1007/s00395-016-0568-z
175. Jensen RV, Støttrup NB, Kristiansen SB, Bøtker HE. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol*. Sep 2012;107(5):285. doi:10.1007/s00395-012-0285-1
176. Kottenberg E, Thielmann M, Kleinbongard P, et al. Myocardial protection by remote ischaemic pre-conditioning is abolished in sulphonylurea-treated diabetics undergoing coronary revascularisation. *Acta Anaesthesiol Scand*. Apr 2014;58(4):453-62. doi:10.1111/aas.12278
177. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology*. Aug 2004;101(2):299-310. doi:10.1097/00000542-200408000-00009
178. Landoni G, Guarracino F, Cariello C, et al. Volatile compared with total intravenous anaesthesia in patients undergoing high-risk cardiac surgery: a randomized multicentre study. *Br J Anaesth*. Dec 2014;113(6):955-63. doi:10.1093/bja/aeu290
179. Landoni G, Lomivorotov VV, Nigro Neto C, et al. Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery. *N Engl J Med*. Mar 28 2019;380(13):1214-1225. doi:10.1056/NEJMoa1816476
180. Smit KF, Oei GT, Brevoord D, et al. Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo. *Anesthesiology*. Jan 2013;118(1):95-104. doi:10.1097/ALN.0b013e3182751300

181. Smit KF, Brevoord D, De Hert S, et al. Effect of helium pre- or postconditioning on signal transduction kinases in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Transl Med.* Oct 14 2016;14(1):294. doi:10.1186/s12967-016-1045-z
182. Weber NC, Smit KF, Hollmann MW, Preckel B. Targets Involved in Cardioprotection by the Non-Anesthetic Noble Gas Helium. *Curr Drug Targets.* 2015;16(8):786-92. doi:10.2174/1389450116666150120104459
183. Elgebaly AS, Fathy SM, Sallam AA, Elbarbary Y. Cardioprotective effects of propofol-dexmedetomidine in open-heart surgery: A prospective double-blind study. *Ann Card Anaesth.* Apr-Jun 2020;23(2):134-141. doi:10.4103/aca.ACA\_168\_18
184. Zhou HM, Ling XY, Ni YJ, Wu C, Zhu ZP. Pre-cardiopulmonary bypass administration of dexmedetomidine decreases cardiac troponin I level following cardiac surgery with sevoflurane postconditioning. *J Int Med Res.* Aug 2019;47(8):3623-3635. doi:10.1177/0300060519856750
185. Peng K, Li D, Applegate RL, 2nd, Lubarsky DA, Ji FH, Liu H. Effect of Dexmedetomidine on Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis With Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* Mar 2020;34(3):603-613. doi:10.1053/j.jvca.2019.09.011
186. Shehabi Y, Serpa Neto A, Howe BD, et al. Early sedation with dexmedetomidine in ventilated critically ill patients and heterogeneity of treatment effect in the SPICE III randomised controlled trial. *Intensive Care Med.* Apr 2021;47(4):455-466. doi:10.1007/s00134-021-06356-8
187. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet.* Aug 18 2007;370(9587):575-9. doi:10.1016/s0140-6736(07)61296-3
188. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* Aug 17 2013;382(9892):597-604. doi:10.1016/s0140-6736(13)61450-6
189. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, et al. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine.* 2015;373(15):1408-1417. doi:10.1056/NEJMoa1413534
190. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, et al. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med.* Oct 8 2015;373(15):1397-407. doi:10.1056/NEJMoa1413579
191. Meybohm P, Kohlhaas M, Stoppe C, et al. RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial Dysfunction, Postoperative Neurocognitive Dysfunction, and 1 Year Follow-Up. *J Am Heart Assoc.* Mar 26 2018;7(7)doi:10.1161/jaha.117.008077
192. Hausenloy DJ, Kharbanda RK, Møller UK, et al. Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind

randomised controlled trial. *Lancet*. Oct 19 2019;394(10207):1415-1424. doi:10.1016/s0140-6736(19)32039-2

193. Ekeloef S, Homilius M, Stilling M, et al. The effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in emergency hip fracture surgery (PIXIE trial): phase II randomised clinical trial. *Bmj*. Dec 4 2019;367:l6395. doi:10.1136/bmj.l6395

194. Heinen A, Behmenburg F, Aytulun A, et al. The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent. *Journal of Translational Medicine*. 2018/04/27 2018;16(1):112. doi:10.1186/s12967-018-1480-0

195. Querio G, Geddo F, Antoniotti S, Gallo MP, Penna C. Sex and Response to Cardioprotective Conditioning Maneuvers. *Front Physiol*. 2021;12:667961. doi:10.3389/fphys.2021.667961

196. Halapas A, Kapelouzou A, Chrissoheris M, Pattakos G, Cokkinos DV, Spargias K. The effect of Remote Ischemic Preconditioning (RIPC) on myocardial injury and inflammation in patients with severe aortic valve stenosis undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVI). *Hellenic J Cardiol*. Nov-Dec 2021;62(6):423-428. doi:10.1016/j.hjc.2021.02.003

197. Ney J, Hoffmann K, Meybohm P, et al. Remote Ischemic Preconditioning Does Not Affect the Release of Humoral Factors in Propofol-Anesthetized Cardiac Surgery Patients: A Secondary Analysis of the RIPHeart Study. *Int J Mol Sci*. Apr 5 2018;19(4)doi:10.3390/ijms19041094

198. Kim TK, Min JJ, Cho YJ, et al. Effects of delayed remote ischemic preconditioning on peri-operative myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery - A randomized controlled trial. *Int J Cardiol*. Jan 15 2017;227:511-515. doi:10.1016/j.ijcard.2016.10.111

199. Long YQ, Feng XM, Shan XS, et al. Remote Ischemic Preconditioning Reduces Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Anesth Analg*. Mar 1 2022;134(3):592-605. doi:10.1213/ane.0000000000005804

200. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*. Dec 2007;59(4):418-58. doi:10.1124/pr.107.06002

201. Abete P, Cacciatore F, Testa G, et al. Ischemic preconditioning in the aging heart: from bench to bedside. *Ageing Res Rev*. Apr 2010;9(2):153-62. doi:10.1016/j.arr.2009.07.001

202. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res*. Jul 15 2009;83(2):247-61. doi:10.1093/cvr/cvp033

203. Ruiz-Meana M, Boengler K, Garcia-Dorado D, et al. Ageing, sex, and cardioprotection. *Br J Pharmacol*. Dec 2020;177(23):5270-5286. doi:10.1111/bph.14951

204. Jahangir A, Sagar S, Terzic A. Aging and cardioprotection. *J Appl Physiol (1985)*. Dec 2007;103(6):2120-8. doi:10.1152/jappphysiol.00647.2007

205. Bunte S, Lill T, Falk M, et al. Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning. *J Clin Med*. Mar 21 2019;8(3)doi:10.3390/jcm8030396

206. Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. Jan 8 2019;73(1):89-99. doi:10.1016/j.jacc.2018.09.086
207. Chiari P, Desebbe O, Durand M, et al. A Multimodal Cardioprotection Strategy During Cardiac Surgery: The ProCCard Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. Aug 2023;37(8):1368-1376. doi:10.1053/j.jvca.2023.04.011
208. Pölzl L, Engler C, Sterzinger P, et al. Association of High-Sensitivity Cardiac Troponin T With 30-Day and 5-Year Mortality After Cardiac Surgery. *J Am Coll Cardiol*. Sep 26 2023;82(13):1301-1312. doi:10.1016/j.jacc.2023.07.011
209. Devereaux PJ, Lamy A, Chan MTV, et al. High-Sensitivity Troponin I after Cardiac Surgery and 30-Day Mortality. *N Engl J Med*. Mar 3 2022;386(9):827-836. doi:10.1056/NEJMoa2000803
210. Pagel PS, Crystal GJ. The Multimodal Cardioprotective Strategy in a Cardiac Surgery Trial: Predictable Neutral Results From a Questionable Design. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. Nov 2023;37(11):2399-2401. doi:10.1053/j.jvca.2023.07.030
211. Rossello X, Hall AR, Bell RM, Yellon DM. Characterization of the Langendorff Perfused Isolated Mouse Heart Model of Global Ischemia–Reperfusion Injury: Impact of Ischemia and Reperfusion Length on Infarct Size and LDH Release. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016;21(3):286-295. doi:10.1177/1074248415604462
212. Ferdinandy P, Andreadou I, Baxter GF, et al. Interaction of Cardiovascular Nonmodifiable Risk Factors, Comorbidities and Comedications With Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Pharmacological Treatments and Ischemic Conditioning. *Pharmacol Rev*. Jan 2023;75(1):159-216. doi:10.1124/pharmrev.121.000348
213. Heusch G, Gersh BJ. Is Cardioprotection Salvageable? *Circulation*. Feb 11 2020;141(6):415-417. doi:10.1161/circulationaha.119.044176
214. Gaspar A, Lourenço AP, Pereira M, et al. Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI). *Basic Res Cardiol*. Mar 7 2018;113(3):14. doi:10.1007/s00395-018-0672-3
215. Lecour S, Andreadou I, Bøtker HE, et al. Improving Preclinical Assessment of Cardioprotective Therapies (IMPACT) criteria: guidelines of the EU-CARDIOPROTECTION COST Action. *Basic Res Cardiol*. Sep 13 2021;116(1):52. doi:10.1007/s00395-021-00893-5

## **X Danksagungen**

Ein besonderer Dank gebührt meinem wissenschaftlichen und klinischen Mentor Herrn Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen, dessen unermüdliche Führung und grenzenlose Unterstützung wesentlich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit möglich wurde. Seine einzigartige Begeisterung für den Forschungsschwerpunkt der perioperativen Kardioprotektion haben meinen akademischen Werdegang maßgeblich geprägt und waren mir stets eine Inspiration.

Meiner geliebten Mutter und Schwester danke ich für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre ständige Ermutigung während dieser anspruchsvollen Zeit. Eure bedingungslose Unterstützung und Liebe waren meine größte Motivation.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Freunden und Kollegen, die mich auf meinem akademischen Weg begleitet und in den wissenschaftlichen Projekten unterstützt haben. Euer Feedback und die Zusammenarbeit haben meine Forschung bereichert. Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Kristina, Katharina und Franziska für ihre ermutigenden Worte, die anhaltende Unterstützung und ihre Freundschaft.

Zuletzt danke und gedenke ich meinem Vater Dr. med. Michael Torregroza mit dem ich diesen Moment so gerne geteilt hätte.

Papa – Deine Erinnerung wird für immer in meinem Herzen weiterleben.

## **XI Originalarbeiten**



Article

# Cardioprotective Properties of Mannitol—Involvement of Mitochondrial Potassium Channels

Katharina Feige <sup>1</sup>, Janine Rubbert <sup>1</sup> , Annika Raupach <sup>1</sup> , Martin Stroethoff <sup>1</sup>, André Heinen <sup>2</sup>, Markus W. Hollmann <sup>3</sup>, Ragnar Huhn <sup>1,\*</sup> and Carolin Torregroza <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anesthesiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Katharina.Kristina.Feige@med.uni-duesseldorf.de (K.F.); Janine.Rubbert@hhu.de (J.R.); Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de (A.R.); Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de (M.S.); Carolin.Torregroza@med.uni-duesseldorf.de (C.T.)

<sup>2</sup> Institute of Cardiovascular Physiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@uni-duesseldorf.de

<sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; m.w.hollmann@amsterdamumc.nl

\* Correspondence: Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de

**Abstract:** Cardiac preconditioning (PC) and postconditioning (PoC) are powerful measures against the consequences of myocardial ischemia and reperfusion (I/R) injury. Mannitol—a hyperosmolar solution—is clinically used for treatment of intracranial and intraocular pressure or promotion of diuresis in renal failure. Next to these clinical indications, different organ-protective properties—e.g., perioperative neuroprotection—are described. However, whether Mannitol also confers cardioprotection via a pre- and/or postconditioning stimulus, possibly reducing consequences of I/R injury, remains to be seen. Therefore, in the present study we investigated whether (1) Mannitol-induced pre- and/or postconditioning induces myocardial infarct size reduction and (2) activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium ( $mK_{ATP}$ ) channels is involved in cardioprotection by Mannitol. Experiments were performed on isolated hearts of male Wistar rats via a pressure controlled Langendorff system, randomized into 7 groups. Each heart underwent 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion. Control hearts (Con) received Krebs–Henseleit buffer as vehicle only. Pre- and postconditioning was achieved by administration of 11 mmol/L Mannitol for 10 min before ischemia (Man-PC) or immediately at the onset of reperfusion (Man-PoC), respectively. In further groups, the  $mK_{ATP}$  channel blocker 5HD, was applied with and without Mannitol, to determine the potential underlying cardioprotective mechanisms. Primary endpoint was infarct size, determined by triphenyltetrazolium chloride staining. Mannitol significantly reduced infarct size both as a pre- (Man-PC) and postconditioning (Man-PoC) stimulus compared to control hearts (Man-PC:  $31 \pm 4\%$ ; Man-PoC:  $35 \pm 6\%$ , each  $p < 0.05$  vs. Con:  $57 \pm 9\%$ ). The  $mK_{ATP}$  channel inhibitor completely abrogated the cardioprotective effect of Mannitol-induced pre- (5HD-PC-Man-PC:  $59 \pm 8\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Man-PC) and postconditioning (5HD-PoC-Man-PoC:  $59 \pm 10\%$  vs.  $p < 0.05$  Man-PoC). Infarct size was not influenced by 5HD itself (5HD-PC:  $60 \pm 14\%$ ; 5HD-PoC:  $54 \pm 14\%$ , each ns vs. Con). This study demonstrates that Mannitol (1) induces myocardial pre- and postconditioning and (2) confers cardioprotection via activation of  $mK_{ATP}$  channels.

**Keywords:** mannitol; osmolarity; myocardial infarction; preconditioning; postconditioning



**Citation:** Feige, K.; Rubbert, J.; Raupach, A.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Torregroza, C. Cardioprotective Properties of Mannitol—Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2395. <https://doi.org/10.3390/ijms22052395>

Academic Editor: Anindita Das

Received: 13 January 2021

Accepted: 24 February 2021

Published: 27 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Ischemic conditioning still remains a strong measure to confer cardioprotection by inducing infarct size reduction and thereby protecting the heart against the detrimental consequences of ischemia and reperfusion (I/R) injury [1]. However, due to its immense

invasiveness in the majority of cases, it is unattainable in daily clinical routine. For this reason, pharmacological preconditioning (PC) and postconditioning (PoC) induced by treatment with various different substances, e.g., Dexmedetomidine, volatile anesthetics or opioids, gained importance over the years and have revealed persuading results comparable to ischemic conditioning [2,3].

Mannitol, 6-carbon natural alditol, is a hyperosmolar solution and osmotherapeutic agent only scarcely metabolized and mainly excreted rapidly via the kidneys [4]. To this day, it is widely used in many fields of medicine due to its beneficial effects on the kidney [5], brain [6–8] and heart [4,9]. One main clinical indication is treatment of elevated intracranial pressure (ICP), as the osmotherapeutic agent is thought to decrease brain volume by reducing overall water content and thus blood volume by its osmotic and vasoconstrictive effect [9]. Further, Mannitol may also improve cerebral perfusion by decreasing viscosity or altering red blood cell rheology [9]. Next to its favorable effects on cerebral and renal function, Mannitol has been extensively used in cardiac surgery achieving an increased coronary blood flow, cardiac output, mean systemic arterial pressure, left-ventricular end-diastolic pressure and myocardial left-ventricular contractility [4]. Previous experimental studies have shown cardioprotective properties of Mannitol, mostly ascribed to its hyperosmolar or radical scavenging characteristics [10–13]. However, to this point profound data on mechanisms of Mannitol-induced cardioprotection is lacking.

The mitochondrion is not only an integral player but possibly the end effector of cardioprotection [14]. Regulation of mitochondrial function, alongside mitophagy, is crucial for cell survival after myocardial I/R injury [15,16]. Mitochondrial potassium ( $mK^+$ ) channels have been proven to play a central role in various kinds of ischemic and pharmacological conditioning strategies [17,18]. The mitochondrial ATP-sensitive potassium ( $mK_{ATP}$ ) channels are crucially involved in the regulation of cellular energy levels as well as organelle volume and function [19–22]. Treatment with diazoxide, a specific  $mK_{ATP}$  opener, has led to a significant infarct size reduction in experimental studies, while the respective channel blocker 5-hydroxydecanoate (5HD) averts this effect. We and others have previously demonstrated that several different pharmacological conditioning strategies are mediated via  $mK_{ATP}$ , as combining 5HD with these stimuli completely abrogates cardioprotection [3].

Considering that Mannitol is already approved safe for clinical use and also employed in different perioperative settings, it appears as a promising candidate for a pharmacological conditioning strategy in patients. Given its potential clinical impact, more profound data on pre- and postconditioning as well as the underlying mechanisms of cardioprotection by Mannitol is of crucial importance. Therefore, we set out to determine whether (1) Mannitol induces cardioprotection by pre- and/or postconditioning and (2) this effect is mediated via activation of  $mK_{ATP}$  channels.

## 2. Results

### 2.1. Animal Characteristics

There were no differences detected between and within all groups of this study regarding body weight, wet and dry heart weight and level or time of maximal ischemic contracture (Tables 1 and 2).

**Table 1.** Body weights and wet and dry heart weights.

	<i>n</i>	Body Weight (g)	Dry Heart Weight (g)	Wet Heart Weight (g)
Con	7	292 ± 11	0.11 ± 0.01	1.15 ± 0.05
Man-PC	6	295 ± 22	0.12 ± 0.02	1.16 ± 0.19
5HD-PC+Man-PC	7	297 ± 14	0.11 ± 0.01	1.25 ± 0.10
5HD-PC	6	297 ± 12	0.10 ± 0.02	1.18 ± 0.09
Man-PoC	6	290 ± 14	0.10 ± 0.01	1.17 ± 0.17
5HD-PoC+Man-PoC	7	302 ± 20	0.09 ± 0.01	1.16 ± 0.11
5HD-PoC	6	288 ± 10	0.11 ± 0.01	1.12 ± 0.07

Data are mean ± SD. Con = Control; Man = Mannitol; 5HD = 5-hydroxydecanoate; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning.

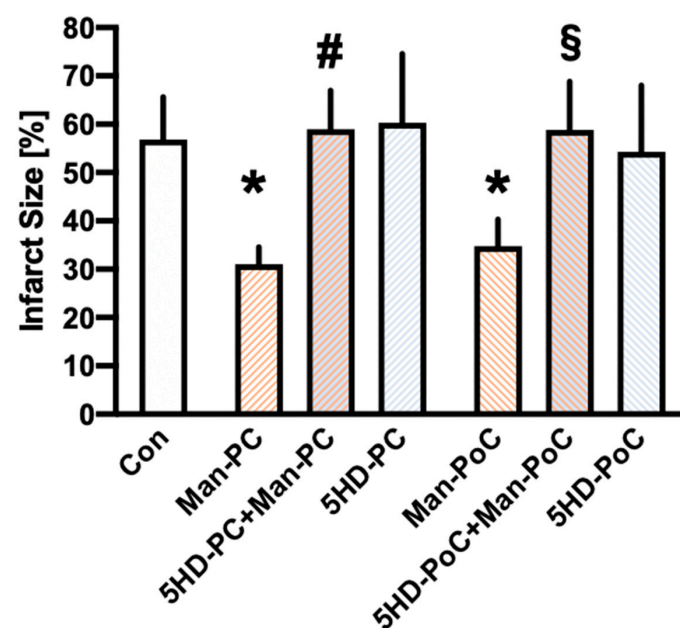
**Table 2.** Time and level of maximum ischemic contracture.

	<i>n</i>	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Con	7	14 ± 2	66 ± 8
Man-PC	6	14 ± 1	61 ± 7
5HD-PC+Man-PC	7	15 ± 2	58 ± 14
5HD-PC	6	15 ± 1	60 ± 9
Man-PoC	6	15 ± 1	64 ± 11
5HD-PoC+Man-PoC	7	15 ± 2	80 ± 9
5HD-PoC	6	15 ± 1	65 ± 6

Data are mean ± SD. Con = Control; Man = Mannitol; 5HD = 5-hydroxydecanoate; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning.

## 2.2. Infarct Size

All infarct sizes are displayed in Figure 1. Control hearts showed an infarct size of  $57 \pm 9\%$  of the left ventricle. Both pre- and postconditioning with Mannitol significantly reduced infarct size to  $31 \pm 4\%$  (Man-PC,  $p < 0.05$  vs. Con) and  $35 \pm 6\%$  (Man-PoC,  $p < 0.05$  vs. Con), respectively. The  $mK_{ATP}$  channel blocker 5HD completely abolished cardioprotection by Mannitol-induced pre- (5HD-PC+Man-PC:  $59 \pm 8\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Man-PC) and postconditioning (5HD-PoC+Man-PoC:  $59 \pm 10\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Man-PoC). The channel blocker itself had no effect on infarct size (5HD-PC:  $60 \pm 14\%$ , ns vs. Con and 5HD-PoC:  $54 \pm 14\%$ , ns vs. Con).



**Figure 1.** Infarct size measurement. Histogram shows all infarct sizes of the study. Data are presented as means ± SD; \*  $p < 0.05$  vs. Con; #  $p < 0.05$  vs. Man-PC; §  $p < 0.05$  vs. Man-PoC.

### 2.3. Cardiac Function

Hemodynamic variables are shown in Table 3. There were no differences detected between the different groups for each time of measurement. Heart rate slightly decreased from baseline to the end of reperfusion, but no significant differences were measured within or between groups. Both left ventricular-developed pressure and coronary flow significantly decreased during reperfusion compared to baseline values within each study group.

**Table 3.** Hemodynamic variables.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
<i>Heart Rate (bpm)</i>				
Con	318 ± 40	318 ± 51	338 ± 75	277 ± 62
Man-PC	293 ± 20	284 ± 22	273 ± 56	233 ± 60
5HD-PC+Man-PC	300 ± 40	292 ± 35	291 ± 58	263 ± 69
5HD-PC	314 ± 46	329 ± 52	275 ± 46	227 ± 57
Man-PoC	312 ± 38	306 ± 21	253 ± 51	266 ± 17
5HD-PoC+Man-PoC	301 ± 49	289 ± 45	288 ± 63	270 ± 67
5HD-PoC	297 ± 30	288 ± 18	286 ± 29	242 ± 37
<i>Left Ventricular-Developed Pressure (mmHg)</i>				
Con	118 ± 24	122 ± 22	12 ± 6 *	24 ± 9 *
Man-PC	114 ± 9	111 ± 23	21 ± 14 *	33 ± 12 *
5HD-PC+Man-PC	112 ± 12	117 ± 9	21 ± 13 *	29 ± 14 *
5HD-PC	114 ± 10	121 ± 16	14 ± 9 *	22 ± 9 *
Man-PoC	106 ± 11	119 ± 16	27 ± 14 *	32 ± 10 *
5HD-PoC+Man-PoC	135 ± 15	145 ± 15 #	18 ± 13 *	25 ± 19 *
5HD-PoC	123 ± 21	133 ± 16	22 ± 13 *	36 ± 14 *
<i>Left Ventricular End Diastolic Pressure (mmHg)</i>				
Con	3 ± 2	4 ± 3	85 ± 23 *	72 ± 21 *
Man-PC	3 ± 1	3 ± 2	83 ± 16 *	72 ± 14 *
5HD-PC+Man-PC	4 ± 2	4 ± 2	81 ± 14 *	70 ± 12 *
5HD-PC	3 ± 1	4 ± 3	77 ± 20 *	67 ± 20 *
Man-PoC	3 ± 2	3 ± 2	75 ± 14 *	65 ± 13 *
5HD-PoC+Man-PoC	5 ± 2	5 ± 2	109 ± 18 *	97 ± 17 *
5HD-PoC	5 ± 2	5 ± 2	103 ± 10 *	88 ± 7 *
<i>Coronary Flow (mL/min)</i>				
Con	14 ± 2	14 ± 2	8 ± 1 *	8 ± 2 *
Man-PC	14 ± 2	14 ± 4	8 ± 1 *	7 ± 1 *
5HD-PC+Man-PC	14 ± 3	15 ± 3	9 ± 3 *	9 ± 3 *
5HD-PC	13 ± 2	15 ± 1	6 ± 2 *	6 ± 2 *
Man-PoC	14 ± 3	14 ± 3	8 ± 2 *	7 ± 1 *
5HD-PoC+Man-PoC	14 ± 2	14 ± 2	7 ± 2 *	7 ± 2 *
5HD-PoC	14 ± 3	13 ± 3	7 ± 2 *	6 ± 2 *

Data are mean ± SD. Con = Control; Man = Mannitol; 5HD = 5-hydroxydecanoate; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning. \*  $p < 0.05$  vs. Baseline; #  $p < 0.05$  vs. Con.

### 3. Discussion

In this study, we demonstrated infarct size-reducing effects by Mannitol-induced pre- and postconditioning and reported novel possible underlying mechanisms of cardioprotection by Mannitol.

Cardioprotective properties of Mannitol have been described over several years in various animal species and experimental setups and were mostly ascribed to its hyperosmolar characteristics or possible radical scavenging features [12,23,24]. Magovern et al. showed that reperfusion with Mannitol resulted in improved developed pressure, greater coronary flow and less myocardial edema due to its osmotherapeutic effects [12]. However, studies on cardioprotection and hyperosmolarity show inconsistent results. Intracoronary administration of Mannitol in different in vivo experiments for instance did not improve heart resistance against I/R injury [25,26]. Hence, Mannitol-induced cardioprotection might not only be explained by its osmotic characteristics.

Next to several known signaling cascades, oxidative stress by reactive oxygen species (ROS) has been discussed as playing a key role in I/R injury [3,18,27]. Even though low

levels of ROS are needed for cardioprotection, excessive ROS formation ultimately leads to cell death after I/R injury. As Mannitol is known to be an effective free radical scavenger, it appears likely that the osmotherapeutic agent might confer its organ-protective properties via regulation of ROS levels during ischemia and reperfusion. While Ouriel et al. [24] suggested that Mannitol offers myocardial protection not only via hyperosmolarity but also possibly due to free radical scavenging activity, an ex vivo study by Pastukh et al. [28] did not support this concept of cardioprotection by Mannitol. In isolated cardiomyocytes, pretreatment with Mannitol showed no effect on the generation of free radicals during hypoxia [28]. Yet, hyperosmolarity by Mannitol induced activation of phosphoinositide 3-kinase (PI 3K)/protein kinase B (Akt) pathway contributing to cardioprotection. Gardner et al. [11] underline these findings by investigating the effect of Mannitol on the oxygen paradox in an in vitro I/R injury study. Results indicate that Mannitol reduces reoxygenation-induced cardiac biomarker release by osmotic activity, rather than by its oxygen-free radical scavenger abilities. Hence, to this date clear consensus on the underlying mechanisms of Mannitol-induced myocardial protection has been lacking. Moreover, studies on Mannitol and cardioprotection used different conditioning strategies, time or duration of application as well as varying substance concentrations. For instance, preconditioning with Mannitol was demonstrated by Falck et al. [10] through perfusion with the hyperosmotic (600 mOsm/kg) solution before ischemia and reperfusion. However, only a 2 min treatment with Mannitol induced infarct size reduction, while 1 min or even 5 min of application showed no effect. Thus, next to a lack of profound knowledge on underlying mechanisms of cardioprotection by Mannitol, studies investigating different conditioning stimuli with clinically used concentrations have also been sparse to this point.

Various intracellular signaling pathways are known to play a crucial role in cardioprotection, and it is accepted that several mediators finally converge upon and regulate the mitochondria ultimately providing protection against myocardial I/R injury [14,15,27]. Next to different intracellular mediators, mitochondrial potassium channels have been identified as integral players in cardiac conditioning by several different ischemic and pharmacological stimuli [17,19,29,30]. These channels are closely linked to the modulation of mitochondrial function, especially considering the energetic status, electrolyte influx and, hence, membrane potential [31]. Activation of these  $mK^+$  channels is generally considered to inhibit the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Prolonged opening of the mPTP leads to mitochondrial swelling, release of pro-apoptotic factors and ultimately cell death after I/R injury. Thus, inhibition of mPTP opening is a key step in myocardial protection [32,33].

Our findings demonstrate for the first time, that  $mK_{ATP}$  are involved in the cardioprotective effect by Mannitol, as the  $mK_{ATP}$  channel inhibitor 5HD completely abolished infarct size reduction by Mannitol. A potent and selective blocker of the  $mK_{ATP}$  channel [34], 5HD has been widely used in several different experimental studies successfully blocking the respective channel [35–38]. In more detail, 5HD mimics ATP by binding to the mitochondrial potassium channel. With regard to its effectiveness, it was recently reported that 5HD in a concentration of 100  $\mu$ M—the same concentration used in our experiments—leads to a complete blockage of the  $mK_{ATP}$  channel [21]. While results from our study support that pre- and postconditioning with Mannitol leads to cardioprotection via  $mK_{ATP}$  channel activation, at this point it still remains to be discussed how exactly Mannitol confers the opening of these respective channels. There are different signaling pathways, e.g., reperfusion injury salvage kinase (RISK), survivor activating factor enhancement (SAFE) and nitric oxide/protein kinase G (NO/PKG), recognized to target the mitochondrion as an end-effector of cardioprotection after I/R injury. Referring to  $mK_{ATP}$  channels, both protein kinase C (PKC) as part of the RISK pathway and NO/PKG have been shown to take a central role in intracellular signaling. These signaling cascades and downstream targets are for instance activated by the binding of specific agonists to G-protein coupled receptors located at the plasma membrane [30,39,40]. It could be assumed that Mannitol might influence these pathways, ultimately targeting the  $mK_{ATP}$  channels; however, further research

is needed to fully unravel the involved mechanisms. Despite knowledge on these respective pathways involved in  $mK_{ATP}$  channel activation and cardioprotection, an osmotic effect of Mannitol or the channel itself cannot be fully excluded. There is experimental evidence that ischemia (especially during early phases) leads to matrix contracture caused by a lack of oxygen, depolarization of mitochondrial membrane and, hence, decrease of  $K^+$  influx [39]. In contrast, activation of the  $mK_{ATP}$  channel leads to moderate matrix swelling via osmotic effects preserving intermembrane space and in turn—via a complex interaction of different intermediates—providing adequate ATP support upon reperfusion, counteracting the negative consequences of ischemia. Referring to the possible osmotic action of Mannitol, we further looked at overall edema or swelling within the different study groups. In the experimental setup, all hearts fulfilled the same basic prerequisite, permitting a comparison of the wet and dry heart weight at the end of the experiment (see Table 1). In line with findings from Carlson et al. and Klein et al. regarding Mannitol and hyperosmolarity [25,26], there were no significant differences in wet heart weight in control hearts (perfused with Krebs–Henseleit buffer) compared to hearts perfused with Mannitol as a pre- or postconditioning stimulus. At the end of reperfusion, all hearts were weighed and dried before reweighing. From this, a determination of the content of water as a percentage can be differentiated ( $\text{weight wet} - \text{weight dry} / \text{weight wet} \times 100$ ). Focusing on control hearts and those treated with Mannitol solely, the water percentage results do not show a significant difference between groups. This indicates that Mannitol-induced cardioprotection might not only be explained by its hyperosmolar characteristics resulting in a reduction of edema. However, both edema and cardiac dysfunction have a number of promoters, making a direct causal relationship difficult to prove.

Although we see a strong effect on infarct size reduction by both Mannitol-induced pre- and postconditioning, no hemodynamic improvement during the reperfusion phase was detected between groups. The exact reason for this remains unknown, however the occurrence of myocardial stunning after global ischemia is often discussed in this context, meaning a temporary depression of function in the surviving myocardial tissue, especially after global ischemia. As the global function of the left ventricle is measured, we cannot discriminate between effects that belong to differences in infarct size or differences in the degree of stunning [41].

The respective Mannitol concentration of 11 mmol/L employed in this study was taken from the literature as well as one of our previous studies. In a preliminary experimental protocol, we investigated the influence of hyperglycemia on cardioprotection by Dexmedetomidine [42]. To ensure comparable osmolarity in all experiments, normoglycemic groups were treated with Mannitol—achieving the same osmolar conditions to hyperglycemia without affecting glucose levels. Interestingly, our results showed that 11 mmol/L Mannitol—administered throughout the whole experimental period—induced a strong cardioprotective effect, significantly reducing the infarct size. Along with our own findings, the respective concentration has been used in different experimental studies investigating organ-protective effects of the osmotherapeutic agent. Zálešák et al. demonstrated similar results to our previous own study, where administration of 11 mmol/L Mannitol over a prolonged experimental period induced a significant infarct size reduction [13]. They also detected a suppressed release of heart fatty acid binding protein (h-FABP) as a biomarker of myocardial cell injury. Regarding translation into the clinical setting, the employed Mannitol concentration in our *in vitro* study converts to around 1 g/kg bodyweight, which is exactly in line with the routinely used clinical dosage.

The present study presents Mannitol as a pre- and postconditioning stimulus in a clinically used concentration effectively reducing infarct size after I/R injury. Furthermore, we report  $mK_{ATP}$  channel activation as an alternative and novel underlying mechanism of Mannitol-induced cardioprotection, independent of the known hyperosmolar or radical scavenger characteristics.

#### 4. Materials and Methods

The present investigation is in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised 1996) and was conducted after obtaining approval by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12). The animals were provided from the breeding facility at the Central Animal Research Facility of Heinrich Heine University Duesseldorf.

##### 4.1. Surgical Preparation

All experiments were performed on male Wistar rats (2–3 months old), as described previously [42]. In short, animals were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight, Narcoren, Merial, Germany) and decapitated. A thoracotomy was performed to excise the hearts, which were then mounted onto a Langendorff system perfused with Krebs–Henseleit buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose and 1mM lactate) under constant pressure (80 mmHg) and temperature (37 °C). The Krebs–Henseleit buffer was supplemented with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. For implementing continuous pressure measurements, a saline-filled balloon was inserted into the left ventricle and the end-diastolic pressure was adjusted to 4–6 mmHg. The continuous measurement of the hemodynamic data (including heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and coronary flow) was attained by using an analogue-to-digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz. Data were recorded using Labchart 8.0 for Windows (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Left ventricular-developed pressure (LVDP) was calculated as LVESP—LVEDP. Additionally, maximal contracture during ischemia and the respective timepoint was analyzed for each experiment as an indicator for myocardial injury. At the end of reperfusion, hearts were removed from the Langendorff system, cut into 8 transverse slices (2 mm each) and stained with 0.75% triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution. The size of the infarcted area was determined by planimetry using SigmaScan Pro5 software by a blinded, experienced investigator [43]. Infarct size was determined as percentage of infarct area per total area of the left ventricle.

##### 4.2. Experimental Protocol

Hearts were randomized into 7 experimental groups ( $n = 6–7$  per group) as shown in Figure 2. All hearts underwent a 15 min adaption period, a 10 min preconditioning period and 33 min of ischemia, followed by 60 min of reperfusion including a 10 min postconditioning period. Global ischemia was achieved by complete cessation of retrograde perfusion. At the end of ischemia, perfusion was restored to initiate the reperfusion period.

Mannitol was applied in a concentration of 11 mmol/L as a preconditioning stimulus (PC) before or a postconditioning stimulus (PoC) after ischemia. This concentration of Mannitol was determined to induce significant infarct size reduction when applied permanently—throughout the entire experiment—in a previously performed study [42].

In further groups, Mannitol and 5HD were applied simultaneously as either a preconditioning stimulus (PC) or postconditioning stimulus (PoC). Additionally, 5HD was also given individually to rule out a possible effect of the channel blocker itself on infarct size. The concentration of 5HD was taken from the literature [21]. All substances were applied at an infusion rate of 1% of coronary flow.

Control (Con KHB): Hearts received Krebs–Henseleit buffer (KHB) as vehicle during both treatment phases (pre- and postconditioning).

Man PC: Hearts were perfused with 11 mmol/L Mannitol for 10 min before ischemia.

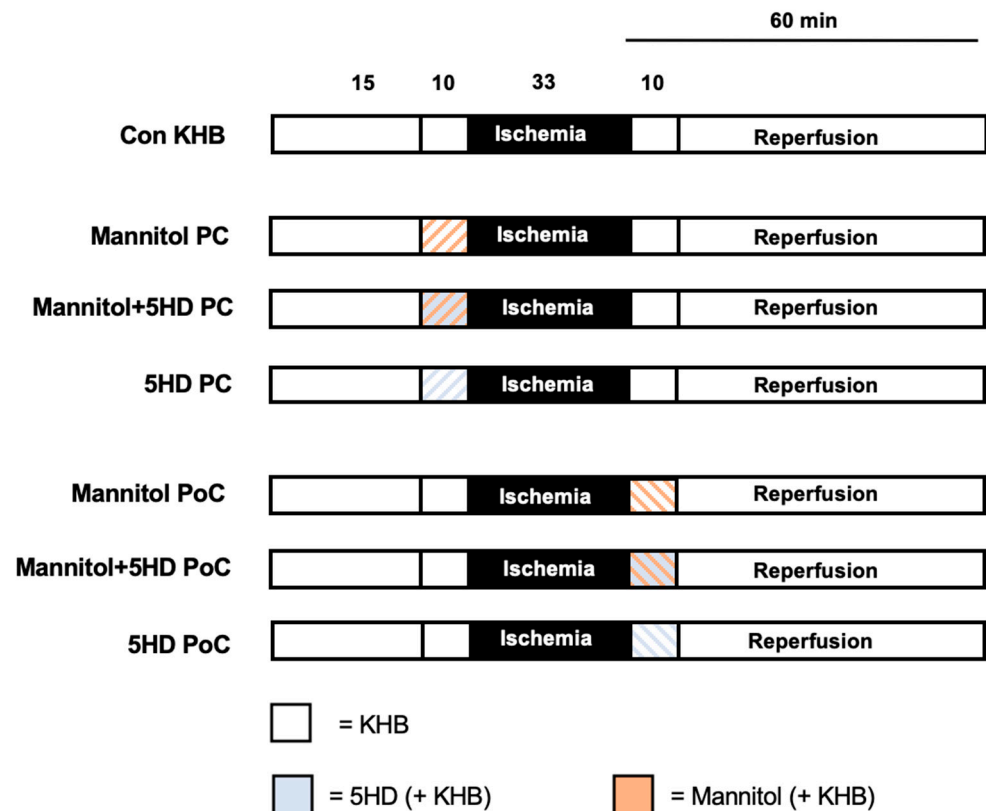
Man+5HD-PC: Hearts were treated with 11 mmol/L Mannitol and 100 µM 5HD for 10 min before ischemia.

5HD-PC: Hearts were treated solely with 100 µM 5HD for 10 min before ischemia.

Man PoC: Hearts were perfused with 11 mmol/L Mannitol for 10 min at the onset of reperfusion.

Man+5HD-PoC: Hearts were treated with 11 mmol/L Mannitol and 100  $\mu$ M 5HD for 10 min at the onset of reperfusion.

5HD-PoC: Hearts were treated solely with 100  $\mu$ M 5HD for 10 min at the onset of reperfusion.



**Figure 2.** Experimental protocol. Con = Control; KHB = Krebs–Henseleit buffer; 5HD = 5-hydroxy-decanoate; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning.

#### 4.3. Statistical Analysis

##### 4.3.1. Sample Size Analysis

We performed a sample size calculation (GraphPad StatMate™, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) revealing a group size of  $n = 7$  for detecting a 25% mean difference and a standard deviation of 15% in infarct size (power 80%,  $\alpha < 0.05$  (two-tailed)).

##### 4.3.2. Statistical Approach

A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's post hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA, USA) were employed for comparison of hemodynamic data between groups as well as between different timepoints within groups. All data is presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Infarct sizes were analyzed by a one-way ANOVA and a Tukey's post hoc test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant for changes within and between groups.

## 5. Conclusions

The results in our study demonstrate that administration of Mannitol in a clinically used concentration as pre- and postconditioning confers cardioprotection after I/R injury. Furthermore, this effect is mediated via activation of  $mK_{ATP}$  channels. These findings might be of high clinical relevance, as Mannitol is already routinely used in patients. Considering this fact, we employed a clinically used concentration in our experimental study; our

results indicate that Mannitol might be a promising agent for establishing cardioprotection in the clinical setting.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.T., K.F. and R.H.; methodology, K.F., A.R. and C.T.; formal analysis, C.T., M.S. and R.H.; investigation, K.F., J.R. and C.T.; writing—original draft preparation, K.F., C.T. and R.H.; writing—review and editing, A.H. and M.W.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The author's acknowledge that this work is in partial fulfillment of the requirements for the MD thesis of Janine Rubbert.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Hausenloy, D.J.; Barrabes, J.A.; Bøtker, H.E.; Davidson, S.M.; Di Lisa, F.; Downey, J.; Engstrom, T.; Ferdinandy, P.; Carbrera-Fuentes, H.A.; Heusch, G.; et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: A 30 year voyage of discovery. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caricati-Neto, A.; Errante, P.R.; Menezes-Rodrigues, F.S. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4002. [[CrossRef](#)]
- Torregroza, C.; Raupach, A.; Feige, K.; Weber, N.C.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1765–1780. [[CrossRef](#)]
- Poullis, M. Mannitol and Cardiac Surgery. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1999**, *47*, 58–62. [[CrossRef](#)]
- O’Kane, D.; Baldwin, G.S.; Bolton, D.M.; Ischia, J.J.; Patel, O. Preconditioning against renal ischaemia reperfusion injury: The failure to translate to the clinic. *J. Nephrol.* **2019**, *32*, 539–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schilte, C.; Bouzat, P.; Millet, A.; Boucheix, P.; Pernet-Gallay, K.; Lemasson, B.; Barbier, E.L.; Payen, J.-F. Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury\*. *Crit. Care Med.* **2015**, *43*, 2212–2218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Farrokh, S.; Cho, S.-M.; Suarez, J.I. Fluids and hyperosmolar agents in neurocritical care. *Curr. Opin. Crit. Care* **2019**, *25*, 105–109. [[CrossRef](#)]
- Witherspoon, B.; Ashby, N.E. The Use of Mannitol and Hypertonic Saline Therapies in Patients with Elevated Intracranial Pressure. *Nurs. Clin. N. Am.* **2017**, *52*, 249–260. [[CrossRef](#)]
- Davis, M.; Lucatorto, M. Mannitol Revisited. *J. Neurosci. Nurs.* **1994**, *26*, 170–174. [[CrossRef](#)]
- Falck, G.; Schjott, J.; Jynge, P. Hyperosmotic pretreatment reduces infarct size in the rat heart. *Physiol. Res.* **1999**, *48*, 331–340.
- Gardner, T.J.; Stewart, J.R.; Casale, A.S.; Downey, J.M.; Chambers, D.E. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery* **1983**, *94*, 423–427.
- Magovern, G.J.; Bolling, S.F.; Casale, A.S.; Bulkley, B.H.; Gardner, T.J. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: Hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation* **1984**, *70*, 91–95.
- Zálešák, M.; Blažíček, P.; Pancza, D.; Gablovský, I.; Štrbák, V.; Ravingerová, T. Hyperosmotic Environment Blunts Effectivity of Ischemic Preconditioning Against Ischemia-Reperfusion Injury and Improves Ischemic Tolerance in Non-Preconditioned Isolated Rat Hearts. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, 1045–1051. [[CrossRef](#)]
- Boengler, K.; Lochnit, G.; Schulz, R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1215–H1231. [[CrossRef](#)]
- Di Lisa, F.; Canton, M.; Menabò, R.; Kaludercic, N.; Bernardi, P. Mitochondria and cardioprotection. *Hear. Fail. Rev.* **2007**, *12*, 249–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morciano, G.; Patergnani, S.; Bonora, M.; Pedriali, G.; Tarocco, A.; Bouhamida, E.; Marchi, S.; Ancora, G.; Anania, G.; Wieckowski, M.R.; et al. Mitophagy in Cardiovascular Diseases. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smith, C.O.; Nehrke, K.; Brookes, P.S. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 2067–2094. [[CrossRef](#)]
- Heusch, G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 674–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ardehali, H.; O’Rourke, B. Mitochondrial K channels in cell survival and death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *39*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gross, G.J.; Peart, J.N. KATP channels and myocardial preconditioning: An update. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2003**, *285*, H921–H930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Paggio, A.; Checchetto, V.; Campo, A.; Menabò, R.; Di Marco, G.; Di Lisa, F.; Szabo, I.; Rizzuto, R.; De Stefani, D. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *572*, 609–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Queliconi, B.B.; Wojtovich, A.P.; Nadtochiy, S.M.; Kowaltowski, A.J.; Brookes, P.S. Redox regulation of the mitochondrial KATP channel in cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenergy* **2011**, *1813*, 1309–1315. [[CrossRef](#)]
23. Garcia-Dorado, D.; Oliveras, J. Myocardial oedema: A preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc. Res.* **1993**, *27*, 1555–1563. [[CrossRef](#)]
24. Ouriel, K.; Ginsburg, M.E.; Patti, C.S.; Pearce, F.J.; Hicks, G.L. Preservation of myocardial function with mannitol perfusate. *Circulation* **1985**, *72*, 254–258.
25. Carlson, R.E.; Aisen, A.M.; Buda, A.J. Effect of reduction in myocardial edema on myocardial blood flow and ventricular function after coronary reperfusion. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1992**, *262*, H641–H648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Klein, H.H.; Nebendahl, K.; Schubothe, M.; Kreuzer, H. Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res. Cardiol.* **1985**, *80*, 251–259. [[CrossRef](#)]
27. Perrelli, M.-G. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J. Cardiol.* **2011**, *3*, 186–200. [[CrossRef](#)]
28. Pastukh, V.; Ricci, C.; Solodushko, V.; Mozaffari, M.; Schaffer, S.W. Contribution of the PI 3-kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *269*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cao, Y.; Zhang, S.-Z.; Zhao, S.-Q.; Bruce, I.C. The mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel contributes to cardioprotection by limb remote ischemic preconditioning in rat. *Life Sci.* **2011**, *88*, 1026–1030. [[CrossRef](#)]
30. Vishwakarma, V.K.; Upadhyay, P.K.; Chaurasiya, H.S.; Srivasatav, R.K.; Ansari, T.M.; Srivastava, V. Mechanistic Pathways of ATP Sensitive Potassium Channels Referring to Cardio-Protective Effects and Cellular Functions. *Drug Res.* **2019**, *69*, 365–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zorova, L.D.; Popkov, V.A.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N.; Pevzner, I.B.; Jankauskas, S.S.; Babenko, V.A.; Zorov, S.D.; Balakireva, A.V.; Juhaszova, M.; et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **2018**, *552*, 50–59. [[CrossRef](#)]
32. Di Lisa, F.; Carpi, A.; Giorgio, V.; Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenergy* **2011**, *1813*, 1316–1322. [[CrossRef](#)]
33. Hausenloy, D.J. The mitochondrial permeability transition pore: Its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2003**, *35*, 339–341. [[CrossRef](#)]
34. Sato, T.; Saito, T.; Saegusa, N.; Nakaya, H. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Cardiac Myocytes. *Circulation* **2005**, *111*, 198–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Stroethoff, M.; Christoph, I.; Behmenburg, F.; Raupach, A.; Bunte, S.; Senpolat, S.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Mathes, A.; Huhn, R. Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2018**, *72*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cao, S.; Liu, Y.; Wang, H.; Mao, X.; Chen, J.; Liu, J.; Xia, Z.; Zhang, L.; Liu, X.; Yu, T. Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ* **2016**, *4*, e1706. [[CrossRef](#)]
37. Li, W.; Wu, N.; Shu, W.; Jia, D.; Jia, P. Pharmacological preconditioning and postconditioning with nicorandil attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial necrosis and apoptosis in hypercholesterolemic rats. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *10*, 2197–2205. [[CrossRef](#)]
38. Lucchinetti, E.; Jamnicki, M.; Fischer, G.; Zaugg, M. Preconditioning by Isoflurane Retains Its Protection Against Ischemia-Reperfusion Injury in Postinfarct Remodeled Rat Hearts. *Anesthesia Analg.* **2008**, *106*, 17–23. [[CrossRef](#)]
39. Dos Santos, P.; Kowaltowski, A.J.; Laclau, M.N.; Seetharaman, S.; Paucek, P.; Boudina, S.; Thambo, J.-B.; Tariosse, L.; Garlid, K.D. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H284–H295. [[CrossRef](#)]
40. Rotko, D.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A.; Kulawiak, B. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *125*, 105792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Flameng, W. Mechanisms Underlying Myocardial Stunning. *J. Card. Surg.* **1993**, *8*, 275–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Torregroza, C.; Feige, K.; Schneider, L.; Bunte, S.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

# Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases

Carolin Torregroza <sup>1</sup>, Chiara O. Glashoerster <sup>1</sup>, Katharina Feige <sup>1,\*</sup>, Martin Stroethoff <sup>1</sup>, Annika Raupach <sup>1</sup> , André Heinen <sup>2</sup>, Markus W. Hollmann <sup>3</sup> and Ragnar Huhn <sup>1,4</sup>

- <sup>1</sup> Department of Anesthesiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moonenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Carolin.Torregroza@med.uni-duesseldorf.de (C.T.); Chiara.Glashoerster@hhu.de (C.O.G.); Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de (M.S.); Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de (A.R.); Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de (R.H.)
- <sup>2</sup> Institute of Cardiovascular Physiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@uni-duesseldorf.de
- <sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; M.W.Hollmann@amsterdamumc.nl
- <sup>4</sup> Department of Anesthesiology, Kerckhoff-Clinic GmbH, Benekestr. 2-8, 61231 Bad Nauheim, Germany
- \* Correspondence: KatharinaKristina.Feige@med.uni-duesseldorf.de



**Citation:** Torregroza, C.; Glashoerster, C.O.; Feige, K.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12471. <https://doi.org/10.3390/ijms222212471>

Academic Editors: Taňa Ravingerová and Adriana Duris Adameova

Received: 29 October 2021  
Accepted: 16 November 2021  
Published: 19 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The osmotic diuretic agent Mannitol exerts cardioprotection against ischemia and reperfusion (I/R) injury when applied as a pre- and/or postconditioning stimulus. Previously, we demonstrated that these properties are mediated via the activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium ( $mK_{ATP}$ ) channels. However, considering Mannitol remains in the extracellular compartment, the question arises as to which receptor and intracellular signaling cascades are involved in myocardial protection by the osmotic diuretic substance. Protein kinase B (Akt) and G (PKG), as part of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) and/or endothelial nitric oxide (eNOS)/PKG pathway, are two well-investigated intracellular targets conferring myocardial protection upstream of mitochondrial potassium channels. Adenosine receptor subtypes have been shown to trigger different cardioprotective pathways, for example, the reperfusion injury. Further, Mannitol induces an increased activation of the adenosine 1 receptor (A1R) in renal cells conferring its nephroprotective properties. Therefore, we investigated whether (1) Akt and PKG are possible signaling targets involved in Mannitol-induced conditioning upstream of the  $mK_{ATP}$  channel and/or whether (2) cardioprotection by Mannitol is mediated via activation of the A1R. All experiments were performed on male Wistar rats in vitro employing the Langendorff isolated heart perfusion technique with infarct size determination as the primary endpoint. To unravel possible protein kinase activation, Mannitol was applied in combination with the Akt (MK2206) or PKG (KT5823) inhibitor. In further groups, an A1R blocker (DPCPX) was given with or without Mannitol. Preconditioning with Mannitol (Man) significantly reduced the infarct size compared to the control group. Co-administration of the A1R blocker DPXPC fully abolished myocardial protection of Mannitol. Interestingly and in contrast to the initial hypothesis, neither administration of the Akt nor the PKG blocker had any impact on the cardioprotective properties of Mannitol-induced preconditioning. These results are quite unexpected and show that the protein kinases Akt and PKG—as possible targets of known protective signaling cascades—are not involved in Mannitol-induced preconditioning. However, the cardioprotective effects of Mannitol are mediated via the A1R.

**Keywords:** mannitol; myocardial infarction; preconditioning; adenosine receptor; protein kinase B; protein kinase G

## 1. Introduction

Ischemia and reperfusion (I/R) injury is defined as the occurrence of myocardial damage due to the restoration of blood and oxygen supply after an ischemic event [1]. A sequence of complex intracellular events, including electrolyte and pH shift as well as the release of proapoptotic factors, is responsible for the incidence of I/R injury and accounts for up to 50% of the final infarcted area [2]. Hence, I/R injury plays a crucial role in patient survival and outcome after myocardial ischemia.

Various pharmacological conditioning strategies have been investigated in recent years, with beneficial results on infarct size and myocardial function after an ischemic event [3,4]. However, these encouraging experimental findings have yet failed to be successfully transferred into clinical trials [5]. One promising cardioprotective substance is the hyperosmolar agent Mannitol, which is routinely used for osmotherapy in the clinical setting [6]. In addition to the treatment of acute intracranial pressure [7], it is also employed in cardiac surgery, showing favorable effects on hemodynamics, coronary blood flow and cardiac function [6]. In addition to known neuro- [8–10] and nephroprotection [11], recent research has also demonstrated the cardioprotective properties of Mannitol when applied as a pre- and/or postconditioning stimulus [12]. Besides its hyperosmolar and radical scavenging characteristics [13–16], we previously showed that mitochondrial ATP-sensitive potassium ( $mK_{ATP}$ ) channels are involved in myocardial protection triggered by Mannitol [12]. However, as Mannitol remains in the extracellular compartment, the question arises as to how the agent confers its intracellular effects. At this point, the Mannitol-induced cardiac signaling pathway upstream of  $mK_{ATP}$  channels is unknown.

Two well-investigated intracellular cardioprotective signaling cascades are the reperfusion injury salvage kinase (RISK) [17,18] and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/protein kinase G (PKG) [4] pathways. Both confer myocardial protection by different pharmacological stimuli, ultimately triggering mitochondrial potassium ( $mK^+$ ) channels [19,20] and the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) [21]. PKG has been demonstrated to modulate both mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium ( $mBK_{Ca}$ ) and  $mK_{ATP}$  channel openings, while protein kinase B (Akt) is a main target in the RISK pathway triggering  $mBK_{Ca}$  channels [22].

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are integral membrane proteins expressed by cardiomyocytes [23]. Binding different substances, such as adenosine, activates these respective receptors and converts extracellular stimuli into intracellular signals as part of the above-mentioned cardioprotective pathways [24]. One member of the GPCR superfamily is the adenosine receptor (AR), which mediates several crucial cardiovascular functions, such as heart rate and contraction [25]. Further, different adenosine receptor subtypes have been shown to be involved in various ischemic and pharmacological conditioning strategies [24,26]. The adenosine 1 receptor (A1R) plays an integral role in ischemic and remote ischemic preconditioning, triggering both the RISK and eNOS/PKG pathways [26]. Interestingly, Pingle et al. demonstrated that the administration of Mannitol increases the expression and activation of this specific receptor subtype in renal cells mediating nephroprotection by osmotic diuretics [27]. As the A1R is also found in cardiomyocytes, the question arises as to whether Mannitol might exert its cardioprotective effect via activation of this G-protein-coupled adenosine receptor.

Based on this knowledge, the aim of our study was to analyze whether (1) Akt and PKG are potential intracellular targets involved in cardioprotection by Mannitol and/or whether (2) Mannitol-induced preconditioning leads to the activation of the A1R and the downstream triggering of intracellular cascades.

## 2. Results

### 2.1. Animal Characteristics

There were no differences detected between or within any of the groups in this study regarding wet and dry heart weight and level or time of maximal ischemic contracture

(Table 1). The body weight of the animals included in the Man + DPCPX group was significantly lower compared to Man.

Table 1. Weights and ischemic contracture.

	<i>n</i>	Body Weight (g)	Heart Weight Dry (g)	Heart Weight Wet (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Con	7	304 ± 29	0.17 ± 0.02	1.13 ± 0.08	15 ± 1	66 ± 14
Man	7	313 ± 28	0.17 ± 0.02	1.10 ± 0.08	16 ± 2	56 ± 10
Man + MK	7	308 ± 12	0.16 ± 0.01	1.07 ± 0.04	15 ± 1	57 ± 8
Man + KT	7	312 ± 10	0.17 ± 0.01	1.08 ± 0.05	16 ± 2	60 ± 9
Man + DPCPX	7	278 ± 10	0.15 ± 0.01	1.05 ± 0.04	14 ± 2	65 ± 19
DPCPX	7	290 ± 17 *	0.16 ± 0.01	1.09 ± 0.04	15 ± 2	71 ± 10

Data are means ± SD. Con = control; Man = Mannitol; MK = MK2206 (Akt inhibitor); KT = KT5823 (PKG inhibitor); DPCPX = adenosine receptor 1 antagonist. \*  $p < 0.05$  vs. Man.

## 2.2. Infarct Size

Figure 1 presents the results from infarct size determination. Hearts in the control group had an infarct size of  $48 \pm 8\%$ . Preconditioning with Mannitol led to a significant reduction in final infarct size when compared to the control (Man:  $29 \pm 6\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Con). Neither the Akt (MK2206) nor PKG (KT5823) blocker had any effect on infarct size reduction by Mannitol-induced preconditioning (Man + MK:  $34 \pm 6\%$  vs. Man and Man + KT:  $29 \pm 4\%$  vs. Man, both ns). Co-administration of the A1R inhibitor DPCPX fully abrogated the cardioprotective effects of Mannitol (Man + DPCPX:  $48 \pm 6\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Man), while the inhibitor itself had no influence on infarct size (DPCPX:  $50 \pm 9\%$ , ns vs. Con).

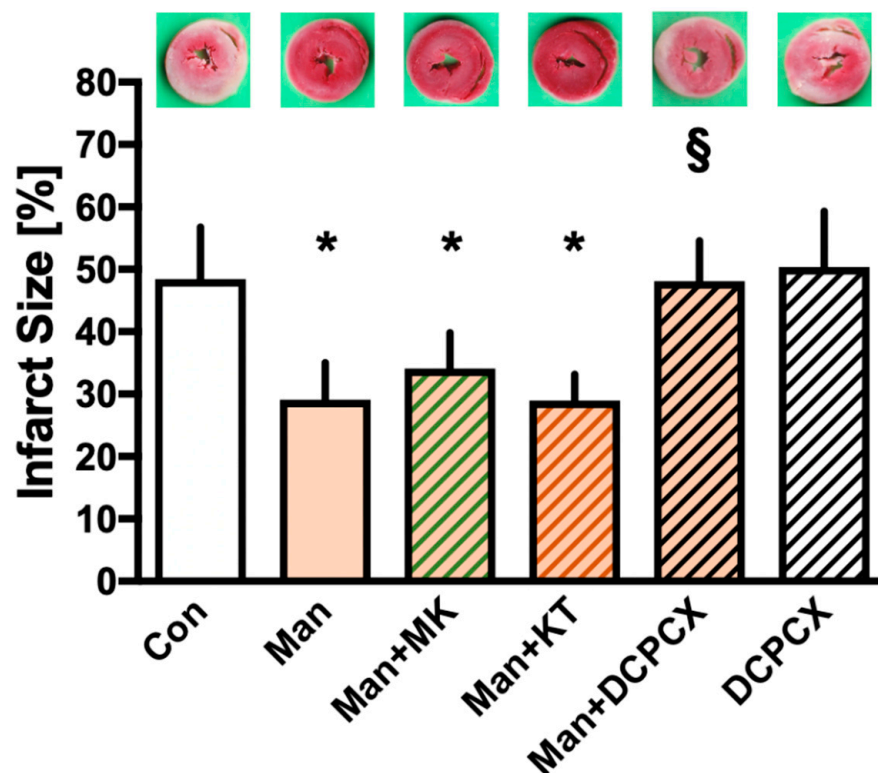


Figure 1. Infarct size measurement. Data are presented as means ± SD, Con = control; Man = Mannitol; MK = MK2206 (Akt inhibitor); KT = KT5823 (PKG inhibitor); DPCPX = adenosine receptor 1 antagonist. \*  $p < 0.05$  vs. Con, §  $p < 0.05$  vs. Man.

### 2.3. Cardiac Function

Comparing hemodynamic data at any measured time point, no differences were detected between the study groups. Regarding coronary flow and left ventricular developed pressure, a significant decrease occurred during reperfusion compared to the baseline within each study group. Hemodynamic variables are shown in Table 2.

**Table 2.** Hemodynamic variables.

	Baseline	PC	Reperfusion	
			30	60
Heart Rate (bpm)				
Con	306 ± 26	281 ± 37	273 ± 43	255 ± 41
Man	296 ± 27	297 ± 22	278 ± 62	263 ± 21
Man + MK	306 ± 24	300 ± 34	308 ± 58	293 ± 69
Man + KT	318 ± 28	313 ± 28	273 ± 43	287 ± 33
Man + DPCPX	305 ± 37	311 ± 36	285 ± 68	248 ± 52
DPCPX	290 ± 34	298 ± 30	290 ± 18	246 ± 61
Left Ventricular Developed Pressure (mmHg)				
Con	139 ± 16	146 ± 14	22 ± 15 *	28 ± 10 *
Man	137 ± 16	135 ± 18	25 ± 6 *	34 ± 4 *
Man + MK	143 ± 16	141 ± 18	29 ± 14 *	34 ± 19 *
Man + KT	134 ± 6	137 ± 6	20 ± 10 *	31 ± 11 *
Man + DPCPX	141 ± 23	136 ± 23	18 ± 16 *	31 ± 11 *
DPCPX	136 ± 18	136 ± 17	23 ± 16 *	33 ± 17 *
Coronary flow (mL/min)				
Con	15 ± 2	15 ± 1	8 ± 1 *	7 ± 1 *
Man	18 ± 3	18 ± 4	10 ± 4 *	9 ± 3 *
Man + MK	16 ± 2	16 ± 2	10 ± 3 *	9 ± 2 *
Man + KT	14 ± 2	15 ± 1	8 ± 2 *	7 ± 2 *
Man + DPCPX	15 ± 1	15 ± 1	8 ± 1 *	8 ± 1 *
DPCPX	15 ± 3	15 ± 3	8 ± 3 *	7 ± 3 *

Data are means ± SD. PC = preconditioning; Con = control; Man = Mannitol; MK = MK2206 (Akt inhibitor); KT = KT5823 (PKG inhibitor); DPCPX = adenosine receptor 1 antagonist. \*  $p < 0.05$  versus baseline.

### 3. Discussion

The results from this current study demonstrate that Mannitol-induced preconditioning is mediated via the activation of adenosine 1 receptors (A1R); however, PKG and Akt, as two known targets of intracellular signaling cascades, are not involved in myocardial protection by Mannitol.

In addition to discussing the hyperosmolar and radical scavenging features of Mannitol [15,28,29], we recently further unraveled the underlying mechanisms of cardioprotective properties, demonstrating the activation of  $mK_{ATP}$  channels by Mannitol-induced pre- and/or postconditioning [12]. The findings from our previous study showed that the co-administration of the  $mK_{ATP}$  channel blocker 5-hydroxydecanoate completely abolished the infarct size-reducing effects of Mannitol [12]. While these results present a connection between Mannitol and known myocardial targets of cardioprotective cascades—specifically mitochondrial potassium ( $mK^+$ ) channels—the intracellular pathway triggered by Mannitol upstream of  $mK_{ATP}$  channels remains unknown.

As shown by extensive research,  $mK^+$  channels are regulated by different intracellular protein kinases as part of cardioprotective signaling cascades, such as the RISK and eNOS/PKG pathways [30–32]. Protein kinase B (Akt) and PKG are both well-investigated in this context and have been shown to trigger the downstream activation of  $mK^+$  channels [22]. Considering this background of knowledge, we focused on these two protein kinases as possible intracellular targets linking Mannitol to  $mK_{ATP}$  channels. The applied concentrations of both protein kinase inhibitors were taken from the literature and have been shown to significantly block the respective kinases [33–36]. The potent and highly specific PKG inhibitor KT5823 was administered in a concentration of 1  $\mu$ M, in which the blocker, with an  $IC_{50}$  of 60 nM and a  $K_i$  value of 234 nM, does not affect other protein kinases [36]. MK2206 (15 nM) was applied as a selective inhibitor for all three Akt isoforms [35]. Referring to the literature, no effect on other protein kinases can be found. Each blocker itself, in the respective concentration, has no influence on infarct size reduction, as shown in our previous study employing the Langendorff perfusion technique and the exact same experimental setup [36]. Mannitol was administered in a concentration of 11 mmol/L (converting to 1 g/kg body weight as used in clinical practice), which has previously been shown to confer cardioprotection as a pre- and postconditioning stimulus [12].

Interestingly and in contrast to the initial hypothesis, findings from our current study demonstrate that neither Akt nor PKG are directly involved in Mannitol-induced preconditioning. Co-administration of the respective kinase blocker had no influence on infarct size reduction by Mannitol. These results were quite unexpected, considering both Akt and PKG have been described extensively as targets in the main cardioprotective signaling cascades, such as RISK and eNOS/PKG. Moreover, for different pharmacological agents—for example, Ramelteon [36] or Sildenafil [37]—it was shown that these respective kinases trigger intracellular  $mK^+$  channel activation [4]. Hence, more research is necessary to elucidate the intracellular targets upstream of  $mK_{ATP}$  channel activation by Mannitol. One potential enzyme in this context might be protein kinase C (PKC), more specifically isoform epsilon (PKC $\epsilon$ ) [22,38,39]. The role of PKC in ischemic (IPC) and pharmacological preconditioning has been investigated extensively [22,40]. Hassouna et al. [41] indicate that PKC $\epsilon$  is located upstream of  $mK_{ATP}$  channels in the IPC-induced signaling cascade. In line with these findings, Pravdic et al. [42] demonstrated the PKC $\epsilon$ -dependent inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) by preconditioning with Isoflurane. Thus, future studies could investigate PKC as an intracellular target of Mannitol-induced preconditioning upstream of  $mK_{ATP}$  channel activation.

In addition to the so far underexplored myocardial signaling cascade, the question remains as to how exactly Mannitol triggers intracellular targets considering the substance remains in the extracellular compartment. Several different GPCRs have been shown to be activated by pharmacological substances triggering cardioprotective pathways, such as RISK and eNOS/PKG [23]. Up to this point, no receptor has been linked to Mannitol-induced myocardial protection. However, Pingle et al. [27] investigated the nephroprotective properties of osmotic diuretics in renal cells demonstrating involvement of the A1R. The results from their study indicate that Mannitol induces an increase in A1R expression in renal proximal tubular cells via nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B). Further, the osmotic diuretic also activates the A1R, leading to nephroprotection [27]. Adenosine receptor-mediated cardioprotection has been well-investigated in recent years, focusing on different receptor subtypes, species and experimental protocols [24,26]. The activation of the A1R in cardiomyocytes is crucial in conferring cardioprotection by ischemic and remote ischemic preconditioning [43]. Through binding ligands to the A1R, extracellular stimuli are converted into intracellular signals. Various intracellular targets have been linked to adenosine receptor activation, such as the phosphorylation of Akt [44], stimulation of cAMP and protein kinase A pathway [25], increasing levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [26] and the activation of  $mK^+$  channels [25]. While early studies focused on the A1R, several subsequent investigations have also reported adenosine 2 and 3 receptor agonists as cardioprotective agents. Based on the above-mentioned information, we tested the

hypothesis of whether Mannitol exerts its cardioprotective effects via the activation of the A1R in cardiomyocytes. We employed the radioligand 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), a selective antagonist with high affinity for the A1R [45]. The applied DPCPX concentration of 200 nM was taken from a previous study on Isoflurane-induced cardioprotection in isolated rat hearts at the Langendorff apparatus [46]. A radioligand study by Lasley et al. [47] reported DPCPX  $K_i$ -values of 0.45 nM for the A1R in cardiomyocytes with a 700-fold A1-selectivity compared to other adenosine receptor subtypes. Thus, the DPCPX concentration (200 nM) in our study is sufficient for the inhibition of the A1R, while not affecting the A2 and A3 receptor.

Interestingly, in addition to the above-discussed involvement of PKC in  $mK_{ATP}$  channel activation, the protein kinase has also been linked to adenosine receptor activation. Experimental studies on these GPCRs demonstrate that PKC is located downstream of adenosine receptor activation [48], specifically the A1R [49]. Hence, PKC might be a potential connection between A1R activation by Mannitol and the downstream triggering of  $mK_{ATP}$  channels, independent of Akt and PKG. However, further research is needed investigating a possible interaction of the A1R, PKC $\epsilon$  and  $mK_{ATP}$  channel openings in Mannitol-induced preconditioning.

### Limitations

While our results indicate that neither Akt nor PKG are involved in the downstream activation of Mannitol-induced preconditioning, we did not measure protein kinase activity in our experiments. However, all inhibitors employed in this study were used in concentrations specific for the respective protein kinase and have been shown to sufficiently block Akt or PKG in previous studies [36]. Further, we investigated the cardioprotective properties of Mannitol in isolated hearts *in vitro*, focusing on the heart itself without other influencing factors. In future studies, these beneficial effects should be further investigated *in vivo*. Up to this point, there is only limited knowledge on the underlying mechanisms of Mannitol-induced preconditioning. While our current results give more insight on receptor activation and possible downstream targets, future studies are needed to elucidate whether other membranous candidates and intracellular enzymes are involved in myocardial signaling by Mannitol.

## 4. Materials and Methods

All experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the U.S. National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996), after approval by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12).

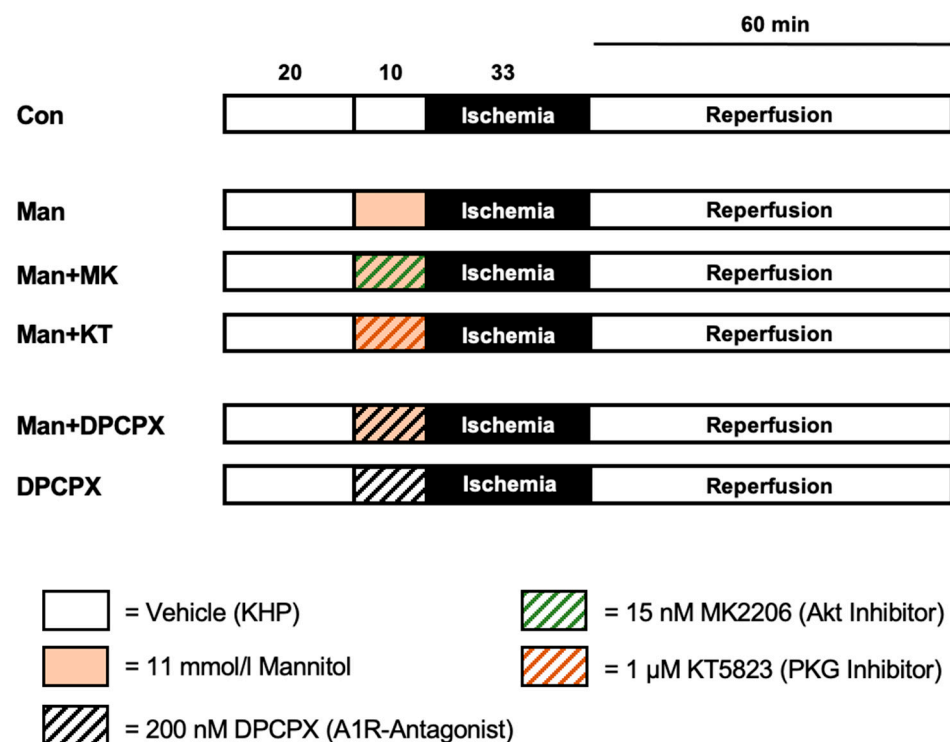
### 4.1. Surgical Preparation

The present study was performed *in vitro* on the isolated hearts of 2–3-month-old male Wistar rats employing the Langendorff heart perfusion technique [50]. Prior to decapitation, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight, Narcoren, Merial, Germany). After the thoracotomy, hearts were excised and placed onto the Langendorff apparatus. Perfusion was established via a pressure- and temperature-controlled (80 mmHg, 37 °C) inflow of Krebs–Henseleit buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose and 1 mM lactate) to the isolated hearts. Hemodynamic measurements were achieved by inserting a saline-filled balloon via the left atrium into the left ventricle with a set end-diastolic pressure of 4–6 mmHg. The analogue-to-digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) along with the program Labchart 8.0 for Windows (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) allowed for the continuous measurement of hemodynamic data, including heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular developed pressure (LVDP) (calculated as LVESP—LVEDP) and coronary flow. Upon the completion

of each experiment, hearts were frozen overnight and then cut into 8 transverse 2 mm slices per heart, starting at the apex. For the determination of the final global infarct size, all heart slices were stained with 0.75% triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution. Finally, a blinded investigator measured the total non-viable infarcted area as a percentage of the left ventricle using planimetry (SigmaScan Pro5 software, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) [33].

#### 4.2. Experimental Protocol

Animals were randomly assigned to 6 experimental groups ( $n = 7$  per group). The experimental protocol is displayed in Figure 2. After a 20 min adaption period, all hearts received vehicle, Mannitol and/or one of the respective blockers at an infusion rate of 1% coronary flow for 10 min as a preconditioning stimulus. Subsequently, perfusion was stopped, initiating 33 min of global ischemia, followed by 60 min of reperfusion.



**Figure 2.** Experimental protocol. Con = control; Man = Mannitol; MK = MK2206 (Akt inhibitor); KT = KT5823 (PKG inhibitor); DPCPX = adenosine receptor 1 antagonist.

For the treatment with Mannitol (Man), we used a concentration of 11 mmol/L which has previously been shown to induce significant infarct size reduction when applied as a pre- or postconditioning stimulus [12]. In further groups, Mannitol was administered in combination with either the Akt (MK2206, 15 nM) or the PKG (KT5823, 1  $\mu$ M) blocker. The concentrations of the respective inhibitors employed in this study were taken from the literature [36]. Finally, Mannitol was combined with 200 nM of the A1R blocker DPCPX (Man + DPCPX). To rule out a possible effect of the receptor blocker on the infarct size, it was also given individually (DPCPX).

**Control (Con):** Hearts were perfused with Krebs–Henseleit buffer (KHB) as vehicle for 10 min before ischemia.

**Man:** Mannitol was applied in a concentration of 11 mmol/L for 10 min before ischemia.

**Man + MK:** 11 mmol/L Mannitol and 15 nM MK2206 were applied simultaneously for 10 min before ischemia.

**Man + KT:** 11 mmol/L Mannitol and 1  $\mu$ M KT5823 were applied simultaneously for 10 min before ischemia.

Man + DPCPX: 11 mmol/L Mannitol and 200 nM DPCPX were applied simultaneously for 10 min before ischemia.

DPCPX: Hearts were perfused with 200 nM DPCPX for 10 min before ischemia.

#### 4.3. Statistical Analysis

##### 4.3.1. Sample Size Analysis

Sample size calculation (GraphPad StatMate™, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) revealed a group size of  $n = 7$  for detecting a 25% mean difference and a standard deviation of 15% in infarct size (power 80%,  $\alpha < 0.05$  (two-tailed)).

##### 4.3.2. Statistical Approach

All data included in this study are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The primary endpoint was infarct size determination, analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test. A two-way ANOVA and a Tukey post hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA, USA) were performed for comparison of the hemodynamic data between groups and within each group at different time points.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

The current investigation demonstrates that Mannitol-induced preconditioning is mediated via the activation of the A1R in cardiomyocytes with the downstream triggering of the  $mK_{ATP}$  channel opening. Further, results from our study show that neither Akt nor PKG—as two possible targets of known cardioprotective pathways—are involved in the signaling cascade of myocardial protection by Mannitol. Thus, these findings give a more detailed description of the underlying mechanisms—which were to this point unknown—involved in the cardioprotective properties of Mannitol.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.T., K.F. and R.H.; methodology, C.T., K.F. and A.R.; formal analysis, C.T., M.S. and R.H.; investigation, C.O.G., M.S. and C.T.; writing—original draft preparation, C.T. and R.H.; writing—review and editing, A.R., A.H. and M.W.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the U.S. National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996), after approval by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** In partial fulfillment of the requirements for an MD thesis by Chiara Olivia Glashoerster.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hausenloy, D.J.; Barrabes, J.A.; Botker, H.E.; Davidson, S.M.; Di Lisa, F.; Downey, J.; Engstrom, T.; Ferdinandy, P.; Carbrera-Fuentes, H.A.; Heusch, G.; et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: A 30 year voyage of discovery. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 70. [[CrossRef](#)]
2. Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. Myocardial Reperfusion Injury. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1121–1135. [[CrossRef](#)]
3. Caricati-Neto, A.; Errante, P.R.; Menezes-Rodrigues, F.S. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4002. [[CrossRef](#)]
4. Torregroza, C.; Raupach, A.; Feige, K.; Weber, N.C.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1765–1780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Roth, S.; Torregroza, C.; Huhn, R.; Hollmann, M.W.; Preckel, B. Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1751–1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Poullis, M. Mannitol and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc. Surg.* **1999**, *47*, 58–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Davis, M.; Lucatorto, M. Mannitol revisited. *J. Neurosci. Nurs.* **1994**, *26*, 170–174. [[CrossRef](#)]
8. Schilte, C.; Bouzat, P.; Millet, A.; Boucheix, P.; Pernet-Gallay, K.; Lemasson, B.; Barbier, E.L.; Payen, J.F. Mannitol Improves Brain Tissue Oxygenation in a Model of Diffuse Traumatic Brain Injury. *Crit. Care Med.* **2015**, *43*, 2212–2218. [[CrossRef](#)]
9. Farrokh, S.; Cho, S.M.; Suarez, J.I. Fluids and hyperosmolar agents in neurocritical care: An update. *Curr. Opin. Crit. Care* **2019**, *25*, 105–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Witherspoon, B.; Ashby, N.E. The Use of Mannitol and Hypertonic Saline Therapies in Patients with Elevated Intracranial Pressure: A Review of the Evidence. *Nurs. Clin. N. Am.* **2017**, *52*, 249–260. [[CrossRef](#)]
11. O’Kane, D.; Baldwin, G.S.; Bolton, D.M.; Ischia, J.J.; Patel, O. Preconditioning against renal ischaemia reperfusion injury: The failure to translate to the clinic. *J. Nephrol.* **2019**, *32*, 539–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Feige, K.; Rubbert, J.; Raupach, A.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Torregroza, C. Cardioprotective Properties of Mannitol-Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Falck, G.; Schjott, J.; Jynge, P. Hyperosmotic pretreatment reduces infarct size in the rat heart. *Physiol. Res.* **1999**, *48*, 331–340.
14. Gardner, T.J.; Stewart, J.R.; Casale, A.S.; Downey, J.M.; Chambers, D.E. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery* **1983**, *94*, 423–427. [[PubMed](#)]
15. Magovern, G.J., Jr.; Bolling, S.F.; Casale, A.S.; Bulkley, B.H.; Gardner, T.J. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: Hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? *Circulation* **1984**, *70*, 191–195.
16. Zálešák, M.; Blažíček, P.; Pancza, D.; Gablovský, I.; Štrbák, V.; Ravingerová, T. Hyperosmotic environment blunts effectivity of ischemic preconditioning against ischemia-reperfusion injury and improves ischemic tolerance in non-preconditioned isolated rat hearts. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, 1045–1051. [[CrossRef](#)]
17. Hausenloy, D.J.; Tsang, A.; Yellon, D.M. The reperfusion injury salvage kinase pathway: A common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc. Med.* **2005**, *15*, 69–75. [[CrossRef](#)]
18. Rossello, X.; Yellon, D.M. The RISK pathway and beyond. *Basic Res. Cardiol.* **2017**, *113*, 2. [[CrossRef](#)]
19. Smith, C.O.; Nehrke, K.; Brookes, P.S. The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 2067–2094. [[CrossRef](#)]
20. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: Signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 674–699. [[CrossRef](#)]
21. Boengler, K.; Lochnit, G.; Schulz, R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1215–H1231. [[CrossRef](#)]
22. Rotko, D.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A.; Kulawiak, B. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *125*, 105792. [[CrossRef](#)]
23. Tadevosyan, A.; Vaniotis, G.; Allen, B.G.; Hébert, T.E.; Nattel, S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: Evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 1313–1330. [[CrossRef](#)]
24. Lasley, R.D. Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection—Current Limitations and Future Directions. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 310. [[CrossRef](#)]
25. Chen, J.F.; Eltzschig, H.K.; Fredholm, B.B. Adenosine receptors as drug targets—What are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 265–286. [[CrossRef](#)]
26. Headrick, J.P.; Lasley, R.D. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, *193*, 189–214. [[CrossRef](#)]
27. Pingle, S.C.; Mishra, S.; Marcuzzi, A.; Bhat, S.G.; Sekino, Y.; Rybak, L.P.; Ramkumar, V. Osmotic diuretics induce adenosine A1 receptor expression and protect renal proximal tubular epithelial cells against cisplatin-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43157–43167. [[CrossRef](#)]
28. Garcia-Dorado, D.; Oliveras, J. Myocardial oedema: A preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc. Res.* **1993**, *27*, 1555–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ouriel, K.; Ginsburg, M.E.; Patti, C.S.; Pearce, F.J.; Hicks, G.L. Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate. *Circulation* **1985**, *72*, Ii254–Ii258. [[PubMed](#)]
30. Dos Santos, P.; Kowaltowski, A.J.; Laclau, M.N.; Seetharaman, S.; Paucek, P.; Boudina, S.; Thambo, J.B.; Tariosse, L.; Garlid, K.D. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H284–H295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Gross, G.J.; Peart, J.N. KATP channels and myocardial preconditioning: An update. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *285*, H921–H930. [[CrossRef](#)]
32. Perrelli, M.G.; Pagliaro, P.; Penna, C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J. Cardiol.* **2011**, *3*, 186–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)]
34. Yan, L. Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Cancer Res.* **2009**, *69*, DDT01.

35. Zhao, Y.Y.; Tian, Y.; Zhang, J.; Xu, F.; Yang, Y.P.; Huang, Y.; Zhao, H.Y.; Zhang, J.W.; Xue, C.; Lam, M.H.; et al. Effects of an oral allosteric AKT inhibitor (MK-2206) on human nasopharyngeal cancer in vitro and in vivo. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 1827–1837. [[CrossRef](#)]
36. Torregroza, C.; Jalajel, O.; Raupach, A.; Feige, K.; Bunte, S.; Heinen, A.; Mathes, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Stroethoff, M. Activation of PKG and Akt Is Required for Cardioprotection by Ramelteon-Induced Preconditioning and Is Located Upstream of mKCa-Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2585. [[CrossRef](#)]
37. Das, A.; Xi, L.; Kukreja, R.C. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29572–29585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wang, Y.; Hirai, K.; Ashraf, M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 731–741. [[CrossRef](#)]
39. Inagaki, K.; Churchill, E.; Mochly-Rosen, D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *70*, 222–230. [[CrossRef](#)]
40. Chen, Z.; Spahn, D.R.; Zhang, X.; Liu, Y.; Chu, H.; Liu, Z. Morphine Postconditioning Protects Against Reperfusion Injury: The Role of Protein Kinase C-Epsilon, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Mitochondrial Permeability Transition Pores. *Cell Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 1930–1940. [[CrossRef](#)]
41. Hassouna, A.; Matata, B.M.; Galiñanes, M. PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *287*, C1418–C1425. [[CrossRef](#)]
42. Pravdic, D.; Sedlic, F.; Mio, Y.; Vladoic, N.; Bienengraeber, M.; Bosnjak, Z.J. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology* **2009**, *111*, 267–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lasley, R.D.; Rhee, J.W.; Van Wylen, D.G.; Mentzer, R.M., Jr. Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **1990**, *22*, 39–47. [[CrossRef](#)]
44. Solenkova, N.V.; Solodushko, V.; Cohen, M.V.; Downey, J.M. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H441–H449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lohse, M.J.; Klotz, K.N.; Lindenborn-Fotinos, J.; Reddington, M.; Schwabe, U.; Olsson, R.A. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)—A selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1987**, *336*, 204–210. [[CrossRef](#)]
46. Yao, L.; Kato, R.; Foeix, P. Isoflurane-induced protection against myocardial stunning is independent of adenosine 1 (A1) receptor in isolated rat heart. *Br. J. Anaesth.* **2001**, *87*, 258–265. [[CrossRef](#)]
47. Lasley, R.D.; Anderson, G.M.; Mentzer, R.M., Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc. Res.* **1993**, *27*, 565–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yang, Z.; Sun, W.; Hu, K. Molecular mechanism underlying adenosine receptor-mediated mitochondrial targeting of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 950–958. [[CrossRef](#)]
49. Mubagwa, K.; Flameng, W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: An updated overview. *Cardiovasc. Res.* **2001**, *52*, 25–39. [[CrossRef](#)]
50. Torregroza, C.; Feige, K.; Schneider, L.; Bunte, S.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1445. [[CrossRef](#)]



Article

# Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart

Carolin Torregroza<sup>1,2</sup>, Katharina Feige<sup>1,\*</sup>, Laura Schneider<sup>1</sup>, Sebastian Bunte<sup>3</sup>, Martin Stroethoff<sup>1</sup>, André Heinen<sup>4</sup>, Markus W. Hollmann<sup>2</sup>, Ragnar Huhn<sup>1</sup> and Annika Raupach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Carolin.Torregroza@med.uni-duesseldorf.de (C.T.); Laura.Schneider@hhu.de (L.S.); Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de (M.S.); Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de (R.H.); Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de (A.R.)

<sup>2</sup> Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; M.W.Hollmann@amsterdamumc.nl

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Elbe Clinics Stade-Buxtehude, Bremervoerder Str. 111, 21682 Stade, Germany; buntesebastian@gmail.com

<sup>4</sup> Institute of Cardiovascular Physiology, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@hhu.de

\* Correspondence: KatharinaKristina.Feige@med.uni-duesseldorf.de

Received: 14 April 2020; Accepted: 11 May 2020; Published: 13 May 2020



**Abstract:** Pharmacological preconditioning (PC) and postconditioning (PoC), for example, by treatment with the  $\alpha$ 2-adrenoreceptor agonist Dexmedetomidine (Dex), protects hearts from ischemia-reperfusion (I/R) injury in experimental studies, however, translation into the clinical setting has been challenging. Acute hyperglycemia adversely affects the outcome of patients with myocardial infarction. Additionally, it also blocks cardioprotection by multiple pharmacological agents. Therefore, we investigated the possible influence of acute hyperglycemia on Dexmedetomidine-induced pre- and postconditioning. Experiments were performed on the hearts of male Wistar rats, which were randomized into 7 groups, placed in an isolated Langendorff system and perfused with Krebs-Henseleit buffer. All hearts underwent 33 min of global ischemia, followed by 60 min of reperfusion. Control (Con) hearts received Krebs-Henseleit buffer (Con KHB), glucose (Con HG) or mannitol (Con NG) as vehicle only. Hearts exposed to hyperglycemia (HG) received KHB, containing 11 mmol/L glucose (an elevated, but commonly used glucose concentration for Langendorff perfused hearts) resulting in a total concentration of 22 mmol/L glucose throughout the whole experiment. To ensure comparable osmolarity with HG conditions, normoglycemic (NG) hearts received mannitol in addition to KHB. Hearts were treated with 3 nM Dexmedetomidine (Dex) before (DexPC) or after ischemia (DexPoC), under hyperglycemic or normoglycemic conditions. Infarct size was determined by triphenyltetrazoliumchloride staining. Acute hyperglycemia had no impact on infarct size compared to the control group with KHB (Con HG:  $56 \pm 9\%$  ns vs. Con KHB:  $56 \pm 7\%$ ). DexPC reduced infarct size despite elevated glucose levels (DexPC HG:  $35 \pm 3\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Con HG). However, treatment with Dex during reperfusion showed no infarct size reduction under hyperglycemic conditions (DexPoC HG:  $57 \pm 9\%$ , ns vs. Con HG). In contrast, hearts treated with mannitol demonstrated a significant decrease in infarct size compared to the control group (Con NG:  $37 \pm 3\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Con KHB). The combination of Dex and mannitol presents exactly opposite results to hearts treated with hyperglycemia. While DexPC completely abrogates infarct reduction through mannitol treatment (DexPC NG:  $55 \pm 7\%$ ,  $p < 0.05$  vs. Con NG), DexPoC had no impact on mannitol-induced infarct size reduction (DexPoC NG:  $38 \pm 4\%$ , ns vs. Con NG). Acute hyperglycemia inhibits DexPoC, while it has no impact on DexPC. Treatment with mannitol induces cardioprotection.

Application of Dex during reperfusion does not influence mannitol-induced infarct size reduction, however, administering Dex before ischemia interferes with mannitol-induced cardioprotection.

**Keywords:** dexmedetomidine; cardioprotection; hyperglycemia; mannitol; ischemia/reperfusion

---

## 1. Introduction

Pharmacological preconditioning (PC) and postconditioning (PoC) by treatment with several different substances, e.g., volatile anesthetics, opioids or phosphodiesterase-inhibitors, have been proven to protect hearts from ischemia-reperfusion (I/R) injury and lead to significant infarct size reduction in experimental studies, comparable to results from ischemic preconditioning [1]. However, recent clinical trials that attempted to translate conditioning strategies into a clinical setting have been disappointing [2–5]. Besides the possible influence of different anesthetics on cardioprotection, e.g., propofol, the comorbidities of patients suffering myocardial infarction and I/R injury have been found to be a challenging factor in the translation of conditioning strategies into the clinical setting [6,7]. Acute hyperglycemia plays an important role in adverse outcomes in patients with and without diabetes after myocardial infarction [8,9]. Elevated glucose levels at the time of admission have been shown to correlate with increased mortality and morbidity in these patients [10]. Several previous studies have described the influence of acute hyperglycemia on ischemic [11,12] and pharmacological [13,14] preconditioning, with both stimuli blocking cardioprotection.

The highly selective  $\alpha$ 2-adrenoreceptor agonist Dexmedetomidine (Dex), which has sedative, analgesic and opioid-sparing effects, is routinely used in the perioperative setting, especially for short- as well as long-term sedation in intensive care patients [15]. Previously, we [16,17], and others [18], have demonstrated the cardioprotective effects of Dexmedetomidine-induced pre- and postconditioning in an in vitro as well as an in vivo I/R injury model in the rat heart. Dexmedetomidine protects the heart through its direct effects on myocardial signaling cascades [19], e.g., activation of the reperfusion injury salvage kinase (RISK), and in particular, the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) [18] signaling pathway. Furthermore, it has been shown that Dexmedetomidine-induced cardioprotection is mediated by mitochondrial large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive potassium ( $\text{mBK}_{\text{Ca}}$ ) [16] and ATP-sensitive potassium ( $\text{mK}_{\text{ATP}}$ )-channels [20]. As shown in several experimental studies, Dexmedetomidine has the ability to significantly reduce infarct size after I/R injury, and in fact it is already routinely used in patients, thus, it is a highly promising pharmacological target for translating conditioning strategies into the clinical setting.

The interference of signaling cascades involved in cardioprotection during disease states, such as diabetes mellitus, has previously been identified. Diabetes mellitus, for instance, prevents ischemic preconditioning in patients suffering from an acute myocardial infarction [21]. Ishihara et al. found that the presence of prodromal angina, as an equivalent of ischemic preconditioning, seemed to ameliorate outcome in patients without diabetes mellitus, while patients suffering from this comorbidity did not show a reduction in mortality [21]. While some studies have suggested a cardioprotective effect of Dexmedetomidine-induced postconditioning in rats with Type II diabetes mellitus (DM II) [18,22] and I/R injury, the influence of acute hyperglycemia on Dexmedetomidine-induced cardioprotection has not been investigated so far. Hyperglycemia is one of the most relevant influencing factors in patients with I/R injury, as it is often part of chronic metabolic comorbidities such as diabetes mellitus in these patients. Furthermore, hyperglycemia also occurs frequently when the human body is exposed to any kind of stressful condition [23], like myocardial infarction, due to the activation of the sympathetic nervous system.

Therefore, with this study we set out to determine whether acute hyperglycemia has a potential impact on Dexmedetomidine-induced pre- and/or postconditioning in an in vitro I/R rat heart model.

## 2. Material and Methods

The present study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institute of Health (NIH publication No. 85–23, revised 1996) and was approved by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (Project number O27/12). The animals were obtained from the breeding facility at the Central Animal Research Facility of the Heinrich-Heine-University Duesseldorf.

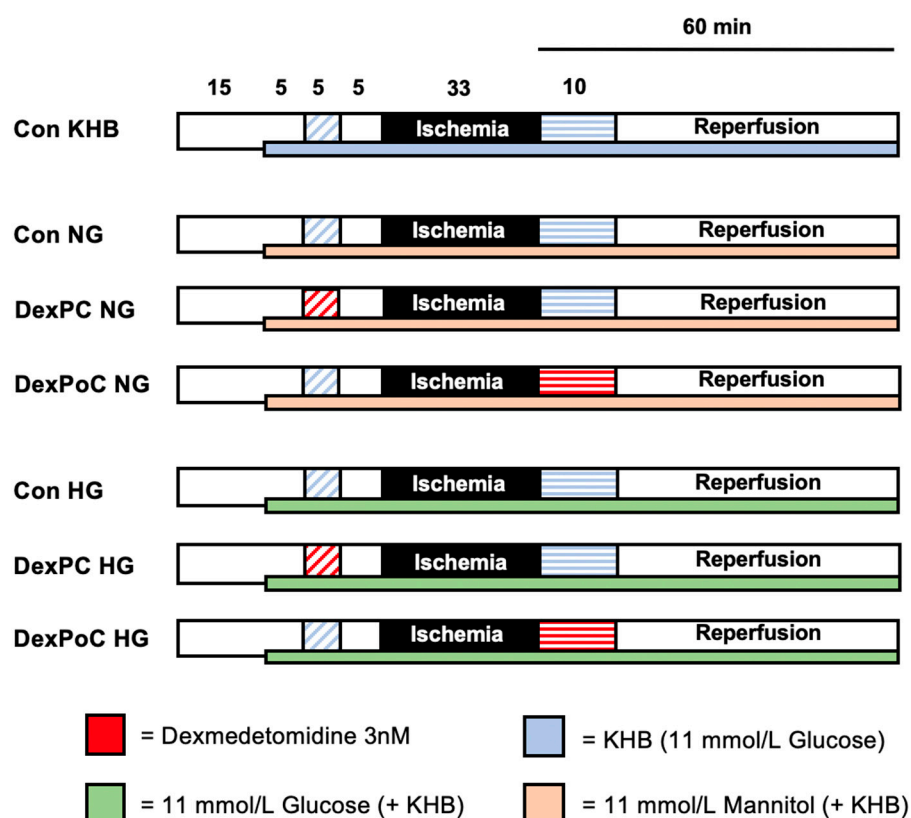
### 2.1. Surgical Preparation and Langendorff Model

All experiments were performed on male Wistar rats (2–3 months old), which were randomized into seven groups. Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight, Narcoren, Merial, Germany) and decapitated. Hearts were excised through a thoracotomy, placed onto a Langendorff system under constant pressure (80 mmHg) and temperature (37 °C) and perfused with Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, and 1 mM lactate) enriched with a mix of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The procedure was performed as described previously [24]. A saline-filled balloon was inserted into the left ventricle and the end-diastolic pressure set to 4–6 mmHg for continuous pressure measurements. Hemodynamic data was measured continuously, digitized using an analogue to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) at a sampling rate of 500 Hz and recorded on a personal computer using Labchart 8.0 for Windows (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Hemodynamic data included heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and left ventricular developed pressure (LVDP) (calculated as LVESP-LVEDP), maximal rate of rise of left ventricular pressure (dP/dt max.) as well as coronary flow. Furthermore, maximal contracture during ischemia and the respective time-point as well as the time to ischemic contracture was analyzed for each experiment as an indicator for myocardial injury. Glucose levels (mmol/L) were measured after collecting effluent from each heart at baseline (minute 10), after the start of glucose or mannitol treatment but before PC (minute 19) and during reperfusion (minute 122).

At the end of reperfusion, hearts were cut into 8 transverse slices per heart (2 mm each slice) and stained with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution. The size of the infarcted area was determined by planimetry using SigmaScan Pro5 software by a blinded, experienced investigator [25]. Infarct size was expressed as percentage of infarct area per total area of the left ventricle.

### 2.2. Experimental Setting

A total of 50 rat hearts were randomized into 7 experimental groups (n = 6–8 per group). All hearts underwent 15 min of adaption period, 15 min of the first treatment phase and 33 min of ischemia, followed by 60 min of reperfusion, including the second treatment phase. The first subgroup consisted of hearts under hyperglycemic (HG) conditions. The second subgroup included the same treatment phases but represents a normoglycemic (NG) state under comparable osmolar conditions to hyperglycemia groups. To ensure comparable osmolarity in all subgroups, the hearts in the second subgroup received mannitol treatment. The Krebs-Henseleit buffer used for this protocol already consists of 11 mmol/L glucose. For normoglycemic conditions, 11 mmol/L glucose was administered, as this is the most commonly used concentration in the Langendorff model of the isolated perfused heart [26]. Furthermore, postprandial blood glucose levels in Wistar rats can increase up to 10.4 mmol/L [27]. To achieve hyperglycemia, hearts in the hyperglycemic subgroup were perfused with a total of 22 mmol/L glucose (11 mmol/L from the KHB plus additional glucose solution with a final concentration of 11 mmol/L glucose in the heart). Thus, in return, normoglycemic hearts received 11 mmol/L mannitol treatment (final concentration in the heart) in addition to KHB. To establish hyperglycemic or normoglycemic conditions before Dexmedetomidine treatment, perfusion with additional glucose or mannitol was started 5 min prior to the preconditioning treatment phase (Figure 1).



**Figure 1.** Experimental protocol. Con = Control; KHB = Krebs-Henseleit buffer, NG = Normoglycemia, HG = Hyperglycemia; Dex = Dexmedetomidine; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning.

Control (Con KHB): Hearts received Krebs-Henseleit buffer (KHB) as vehicle during both treatment phases (pre- and postconditioning) at an infusion rate of 1% coronary flow (CF).

Dexmedetomidine (Dex): For treatment we used 3 nM Dexmedetomidine during pre- and postconditioning. This is the previously determined lowest concentration inducing the strongest cardioprotective effect [16,17].

Preconditioning (PC): Hearts were treated with 3 nM Dexmedetomidine over 5 min, followed by a 5-min wash-out period before 33 min of ischemia. In previous studies, we demonstrated that treatment with 3 nM Dexmedetomidine for 5 min followed by a 5-min wash-out phase before ischemia induces a strong cardioprotective effect and significant reduction in infarct size [16]. A longer period of preconditioning or higher concentrations of Dexmedetomidine were not able to reduce the infarct size to a greater extent [16].

Postconditioning (PoC): Hearts were treated with 3 nM Dexmedetomidine over 10 min, immediately after ischemia during reperfusion. As for postconditioning with Dexmedetomidine, previous investigations have shown that infarct size reduction by treatment with 3 nM Dexmedetomidine is completely independent of time point or duration during reperfusion [17]. Based on these findings and others [28] we chose a 10-min postconditioning treatment immediately at the onset of reperfusion.

### 2.2.1. Subgroup—Normoglycemia (NG)

After 15 min of adaption period, all hearts were perfused with a mannitol solution in addition to KHB (containing 11 mol/L glucose) at an infusion rate of 1% CF to achieve a total final concentration of 11 mmol/L mannitol resulting in 22 mmol/L monosaccharides (glucose and mannitol) in the heart.

Control (Con NG): Hearts were perfused with KHB as vehicle during pre- and postconditioning and received mannitol throughout the whole experiment.

DexPC NG: Preconditioning treatment with 3 nM Dexmedetomidine for 5 min under normoglycemia.  
 DexPoC NG: Postconditioning treatment with 3 nM Dexmedetomidine for 10 min under normoglycemia.

### 2.2.2. Subgroup—Hyperglycemia (HG)

After 15 min of adaption period, all hearts were perfused with a glucose solution in addition to KHB (containing 11 mol/L glucose) at an infusion rate of 1% CF, resulting in a total of 22 mmol/L glucose final concentration in the heart.

Control (Con HG): Hearts received KHB as vehicle during both treatment phases as well as a total of 22 mmol/L glucose during the whole experiment.

DexPC HG: Preconditioning treatment with 3 nM Dexmedetomidine for 5 min under hyperglycemia.

DexPoC HG: Postconditioning treatment with 3 nM Dexmedetomidine for 10 min under hyperglycemia.

### 2.3. Statistical Analysis

Sample size calculation (GraphPad StatMate™, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) suggested a group size of  $n = 7$  for detecting a 25% mean difference and a standard deviation of 15% in infarct size (power 80%,  $\alpha < 0.05$  (two-tailed)). Infarct sizes were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's post hoc test. We performed a two-way ANOVA and a Tukey post hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA, USA) for comparison of hemodynamic data and glucose levels between groups as well as between different time points within groups. Data is presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD).  $p < 0.05$  was considered statistically significant for changes within and between groups.

## 3. Results

### 3.1. Animal Characteristics

As shown in Table 1, there were no significant differences in body weight, wet weight and the time and level of maximal ischemic contracture between and within all groups.

**Table 1.** Weights and ischemic contracture.

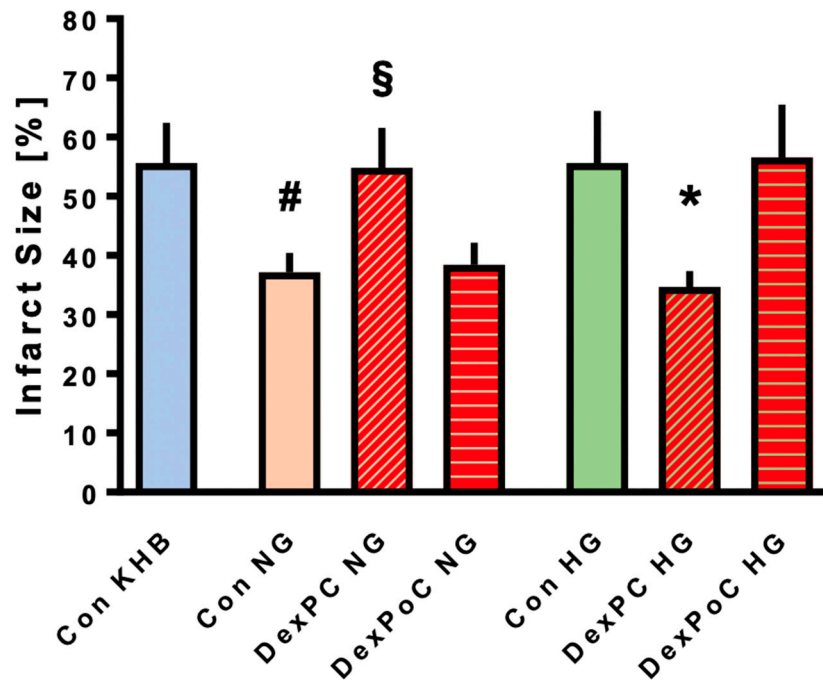
Subgroup	Treatment	n	Body Weight (g)	Heart Wet Weight (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
KHB	Con	7	295 $\pm$ 14	1.17 $\pm$ 0.07	17 $\pm$ 3	107 $\pm$ 16
	Con	6	299 $\pm$ 17	1.23 $\pm$ 0.04	17 $\pm$ 1	76 $\pm$ 21
NG	DexPC	7	299 $\pm$ 15	1.25 $\pm$ 0.09	16 $\pm$ 2	70 $\pm$ 14
	DexPoC	8	308 $\pm$ 26	1.21 $\pm$ 0.05	16 $\pm$ 3	71 $\pm$ 17
HG	Con	8	301 $\pm$ 10	1.26 $\pm$ 0.04	15 $\pm$ 1	107 $\pm$ 26
	DexPC	6	309 $\pm$ 21	1.28 $\pm$ 0.03	17 $\pm$ 2	98 $\pm$ 16
	DexPoC	8	306 $\pm$ 19	1.25 $\pm$ 0.06	14 $\pm$ 2	102 $\pm$ 14

Data are mean  $\pm$  SD; Con = Control; KHB = Krebs-Henseleit buffer; NG = Normoglycemia; HG = Hyperglycemia; Dex = Dexmedetomidine; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning.

### 3.2. Infarct Size Measurements

Results from the infarct size measurements are shown in Figure 2. The infarct size in control (Con) hearts, which were only treated with Krebs-Henseleit Buffer (KHB) as vehicle, was 56  $\pm$  7%. Acute hyperglycemia had no impact on infarct size compared to the control group with KHB (Con HG: 56  $\pm$  9% ns vs. Con KHB). Dexmedetomidine-induced preconditioning (DexPC HG) significantly reduced infarct size to 35  $\pm$  3%, despite elevated glucose levels ( $p < 0.0001$  vs. Con HG). However, treatment with Dexmedetomidine during reperfusion (DexPoC) showed no infarct size reduction under hyperglycemic conditions (DexPoC HG: 57  $\pm$  9%, ns vs. Con HG). In contrast to HG conditions, control hearts treated with mannitol only (Con NG) demonstrated a significant decrease in infarct size

to  $37 \pm 3\%$  compared to the KHB control group ( $p = 0.0001$  vs. Con KHB). As for the combination of Dexmedetomidine and mannitol, results show the exact opposite to hearts treated with hyperglycemia. While Dexmedetomidine-induced preconditioning (DexPC) completely abrogates reduction of infarct size by mannitol treatment (DexPC NG:  $55 \pm 7\%$ ,  $p = 0.0003$  vs. Con NG), DexPoC had no impact on mannitol-induced infarct size reduction (DexPoC NG:  $38 \pm 4\%$ , ns vs. Con NG).



**Figure 2.** Infarct size measurements. Figure shows the infarct size of controls (Con) and Dexmedetomidine (Dex) treated groups under hyperglycemia (HG) or normoglycemia (NG). PC = Preconditioning, PoC = Postconditioning. Data are presented as means  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs. Con HG and DexPoC HG, respectively, #  $p < 0.05$  vs. Con KHB, §  $p < 0.05$  vs. Con NG and DexPoC NG, respectively.

### 3.3. Cardiac Function

Hemodynamic data for all groups are shown in Table 2. There were no differences measured for heart rate and coronary flow between groups. Hearts in the control KHB group had a significantly lower left ventricular developed pressure (LVDP) before ischemia compared to control hearts in the two subgroups (Con NG and Con HG). However, there was no difference in LVDP between hearts in hyperglycemia and normoglycemia subgroups. As expected, LVDP and  $dp/dt$  max. significantly decreased while LVEDP increased during reperfusion compared to baseline in all groups. Furthermore, coronary flow decreased significantly during reperfusion compared to baseline with the exception of the Con KHB and Con NG groups.

Table 2. Hemodynamic variables.

Subgroup	Treatment	Baseline	PC	Reperfusion	
				30	60
Heart Rate (bpm)					
KHB	Con	319 ± 43	305 ± 48	260 ± 53	243 ± 50
NG	Con	286 ± 21	268 ± 16	317 ± 40	207 ± 66
	DexPC	308 ± 23	288 ± 20	287 ± 54	232 ± 54
	DexPoC	314 ± 40	293 ± 42	298 ± 47	250 ± 71
HG	Con	289 ± 41	286 ± 32	235 ± 71	209 ± 60
	DexPC	302 ± 26	286 ± 26	265 ± 99	202 ± 40
	DexPoC	305 ± 44	293 ± 36	254 ± 60	217 ± 33
LVDP (mmHg)					
KHB	Con	105 ± 14	110 ± 11	27 ± 16 *	33 ± 14 *
NG	Con	141 ± 31 #	148 ± 28 #	32 ± 15 *	43 ± 19 *
	DexPC	129 ± 36	129 ± 32	24 ± 19 *	30 ± 17 *
	DexPoC	136 ± 30	133 ± 34	34 ± 19 *	40 ± 18 *
HG	Con	141 ± 23 #	145 ± 33 #	20 ± 9 *	32 ± 12 *
	DexPC	118 ± 27	126 ± 29	20 ± 6 *	32 ± 6 *
	DexPoC	140 ± 38	145 ± 30	28 ± 18 *	36 ± 16 *
LVEDP (mmHg)					
KHB	Con	4 ± 2	4 ± 3	129 ± 19 *	107 ± 13 *
NG	Con	4 ± 1	3 ± 2	109 ± 28 *	94 ± 22 *
	DexPC	4 ± 1	4 ± 2	106 ± 14 *	93 ± 14 *
	DexPoC	5 ± 2	5 ± 2	99 ± 18 *	89 ± 18 *
HG	Con	4 ± 2	4 ± 2	127 ± 29 *	109 ± 19 *
	DexPC	6 ± 2	7 ± 3	129 ± 17 *	111 ± 16 *
	DexPoC	4 ± 1	4 ± 3	123 ± 20 *	112 ± 19 *
dP/dt max. (mmHg/s)					
KHB	Con	4357 ± 1047	4976 ± 1097	1256 ± 313 *	1699 ± 625 *
NG	Con	4793 ± 1337	5356 ± 1291	2559 ± 1429 *	2230 ± 1681 *
	DexPC	4470 ± 1119	4805 ± 1143	1588 ± 611 *	1603 ± 362 *
	DexPoC	4974 ± 953	5055 ± 1063	2351 ± 966 *	2093 ± 923 *
HG	Con	5312 ± 1299	5476 ± 859	1453 ± 310 *	1726 ± 481 *
	DexPC	4337 ± 1089	5004 ± 1347	2242 ± 1991 *	1461 ± 259 *
	DexPoC	4834 ± 1470	5190 ± 1489	1696 ± 791 *	1821 ± 1007 *
Coronary flow (mL/min)					
KHB	DexPoC	11 ± 2	10 ± 2	8 ± 1	9 ± 3
NG	Con	12 ± 2	11 ± 2	9 ± 2	9 ± 2
	DexPC	14 ± 4	14 ± 5	10 ± 2 *	9 ± 2 *
	DexPoC	15 ± 5	14 ± 6	10 ± 1 *	9 ± 3 *
HG	Con	13 ± 2	13 ± 3	8 ± 2 *	7 ± 2 *
	DexPC	12 ± 3	12 ± 3	7 ± 2 *	7 ± 2 *
	DexPoC	14 ± 4	14 ± 4	6 ± 1 *	6 ± 1 *

Data are mean ± SD; Con = Control; KHB = Krebs-Henseleit buffer; NG = Normoglycemia; HG = Hyperglycemia; Dex = Dexmedetomidine; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning; LVDP = Left Ventricular Developed Pressure; LVEDP = Left Ventricular End-diastolic Pressure; dP/dt max. = Maximal Rate of Rise of Left Ventricular Pressure \* *p* < 0.05 versus Baseline; # *p* < 0.05 versus Con KHB.

### 3.4. Glucose Values

Glucose values (mmol/L) for all groups are reported in Table 3. No differences were measured between all groups under baseline conditions and within KHB and NG groups throughout the whole experiment. Hearts under hyperglycemic condition(s) had significantly higher glucose levels

after starting glucose treatment (pretreatment (PT), minute 19, before initiation of Dexmedetomidine preconditioning) and at the end of reperfusion (minute 122) compared to hearts in the normoglycemia subgroups and Con KHB group. Furthermore, glucose levels were also significantly elevated before ischemia (PT) and during reperfusion compared to baseline (before administration of glucose, minute 10) within each hyperglycemia group. There were no statistically significant differences in glucose values between PT and reperfusion within any subgroup.

**Table 3.** Glucose values (mmol/L).

Subgroup	Treatment	Baseline	PT	Reperfusion
KHB	Con	11.0 ± 0.2	10.7 ± 0.4	10.7 ± 0.2
	Con	11.1 ± 0.4	10.9 ± 0.3	10.9 ± 0.3
NG	DexPC	11.1 ± 0.3	10.9 ± 0.2	11.0 ± 0.5
	DexPoC	11.2 ± 0.2	11.1 ± 0.3	11.0 ± 0.2
HG	Con	11.0 ± 0.3	21.6 ± 0.5 <sup>*,#</sup>	23.1 ± 2.5 <sup>*,#</sup>
	DexPC	11.2 ± 0.3	22.1 ± 0.7 <sup>*,§</sup>	23.2 ± 1.1 <sup>*,§</sup>
	DexPoC	11.0 ± 0.3	22.0 ± 0.5 <sup>*,§</sup>	23.7 ± 0.8 <sup>*,§</sup>

Data are mean ± SD; Con = Control; KHB = Krebs-Henseleit buffer; NG = Normoglycemia; HG = Hyperglycemia; Dex = Dexmedetomidine; PT = Pretreatment; PC = Preconditioning; PoC = Postconditioning. \*  $p < 0.05$  versus Baseline, #  $p < 0.05$  versus Con KHB and Con NG, §  $p < 0.05$  versus DexPC NG, §  $p < 0.05$  versus DexPoC NG.

#### 4. Discussion

The results from the present study show that acute hyperglycemia completely inhibits cardioprotection by Dexmedetomidine-induced postconditioning whereas it has no impact on preconditioning with Dexmedetomidine. Furthermore, based on our findings we were able to demonstrate that treatment with mannitol has a profound cardioprotective effect by reducing infarct size after I/R injury in the isolated rat heart. Interestingly, administration of Dexmedetomidine before ischemia interferes with mannitol-induced cardioprotection, while application of Dexmedetomidine during reperfusion has no influence on infarct size reduction by mannitol.

Although we see a strong effect on infarct size, we did not detect hemodynamic improvement during the reperfusion phase among the groups. The exact reason for this is unclear, but it might be due to the occurrence of myocardial stunning, i.e., a temporary depression of cardiac function in the surviving myocardial tissue, which can last for several days after I/R injury [29]. Furthermore, while contractile dysfunction possibly reflects ischemic injury it is not synonymous with cell death [30]. For our study, we chose to assess quantitative cardiomyocyte viability through infarct size measurement by TTC staining, which is still considered the gold standard for detecting infarct reducing effects in the Langendorff model of isolated reperfused hearts.

##### 4.1. Dexmedetomidine and Hyperglycemia

Acute hyperglycemia is a major factor in patients suffering myocardial infarction and plays a crucial role in cardiovascular morbidity and mortality after I/R injury [31]. Previous studies have shown a significant correlation between blood glucose level and long-term outcome in patients with acute myocardial infarction, independent of diabetes mellitus as a comorbidity [8,10]. While there have been few studies regarding Dexmedetomidine-induced cardioprotection and diabetes mellitus, the influence of hyperglycemia on this highly selective alpha-2-adrenoreceptor agonist has not been investigated so far.

Cheng et al. 2018 [18] showed that in an in vivo rat model, Dexmedetomidine-induced postconditioning maintains its cardioprotective properties despite hyperglycemia due to type II diabetes. However, in this study rats received diabetes-inducing treatment for 4 weeks prior to the experiments. Thus, this study focused on the influence of diabetes and not acute hyperglycemia on Dexmedetomidine treatment in the context of cardiac function after I/R injury.

Hyperglycemia has been shown to interfere with different kinds of cardioprotective stimuli, e.g., ischemic preconditioning (IPC) [11,31,32] and remote ischemic preconditioning (RIPerC) [33]. In the study by Baranyai et al. [34], infarct size reduction induced by RIPerC was completely blocked under hyperglycemic conditions, presumably by interfering with activation of the mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) pathway and Akt phosphorylation as well as elevation of nitric oxide (NO) and autophagy. However, acute hyperglycemia per se seems to have no influence on infarct size.

The mechanism of hyperglycemia that eradicates cardioprotective strategies is not fully understood. IPC, for example, reduces accumulation of polymorphonuclear granulocytes (PMNs) and this effect is reversed under hyperglycemic conditions [35]. Furthermore, IPC is linked to an increase in myocardial glucose uptake and hyperglycemia seems to interfere with these changes during reperfusion [11].

Pharmacologically-induced cardioprotection has been a promising, less invasive strategy and a major research focus in recent years. However, similar to IPC or RIPerC, several studies have shown that acute hyperglycemia and diabetes mellitus have a significant impact on these conditioning strategies [13,36,37]. Isoflurane-induced preconditioning is fully blocked by hyperglycemia [13] due to inactivation of  $mK_{ATP}$  channels [38,39]. Isoflurane-induced postconditioning leads to a significant reduction in infarct size and creatine kinase myocardial band (CK-MB) levels in experimental studies [40]. Furthermore, administration of the volatile anesthetic increases expression of phosphorylated Akt and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) after I/R injury. All these cardioprotective effects are completely abolished under elevated glucose levels [40]. Both Akt, as part of the RISK pathway, and eNOS are involved in signaling cascades of different preconditioning stimuli [41]. Activation of the RISK pathway eventually results in the inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening during reperfusion, thereby preventing cell damage and cell death. In a previous study on the influence of hyperglycemia on Sevoflurane-induced cardioprotection, inhibition of MPTP with Cyclosporin A (CsA) reversed the loss of cardioprotection that occurred during hyperglycemic treatment [37]. These results suggest that regulation of MPTP might be a crucial step in the interaction of hyperglycemia and cardioprotective mechanisms.

Phosphorylation of Akt and increasing levels of eNOS play a pivotal role in Dexmedetomidine-induced cardioprotection [18,19,42]. eNOS is known to activate soluble guanylate cyclase (sGC), which in turn increases cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and finally results in activation of protein kinase G (PKG) [41]. The mitochondrial  $K_{ATP}$  channel is the target of both NO and PKG. The influence of acute hyperglycemia on these channels is highly relevant considering the results of our study, as Dexmedetomidine-induced pre- and postconditioning is mediated via activation of  $mK_{ATP}$  channels [20,43]. Therefore, acute hyperglycemia might have an impact on Dexmedetomidine-induced cardioprotection by influencing the RISK pathway [44–47] and/or NO/PKG pathway. Besides the possible influence of hyperglycemia on the aforementioned signaling cascades, it also seems to affect levels of reactive oxygen species (ROS), and thereby, pharmacologically-induced cardioprotection. Kehl et al. showed that an excessive amount of ROS is generated under hyperglycemic conditions [13,48], which in turn blocks Isoflurane-induced preconditioning [49]. While release of small amounts of ROS, e.g., due to opening of  $mK_{ATP}$  channels, is indeed involved in cardioprotection [50–52], it has been shown that excessive amounts of ROS leads to opening of the MPTP, which ultimately results in cell damage and death.

The striking difference in the influence of hyperglycemia on Dexmedetomidine pre- and postconditioning might be partly explained by the administration time of glucose in our study. Although we started the application of glucose before preconditioning with Dexmedetomidine and glucose levels were already significantly increased at this time, the impact of hyperglycemia on RISK and eNOS/PKG pathways as well as ROS formation was potentially not as pronounced at this point and therefore Dexmedetomidine-induced preconditioning was still effective. At the time of reperfusion, hearts were exposed to hyperglycemic conditions for 48 min, in contrast to only 5 min before Dexmedetomidine-preconditioning. This prolonged period of hyperglycemia probably completely prevented cardioprotection by Dexmedetomidine-induced postconditioning. In order to

clarify this issue, further studies regarding the length as well as the time point of administration of glucose in combination with Dexmedetomidine are necessary.

#### 4.2. Dexmedetomidine and Mannitol

Interestingly, results from our study demonstrate that treatment with mannitol induces a strong cardioprotective effect through infarct size reduction. However, to this point, little research has been published on hyperosmolarity and conditioning strategies [32].

Chen et al. [53] demonstrated a connection between hyperosmolarity and type I diabetes mellitus (DMI) with regard to cardioprotection in isolated rat hearts. Hearts from DM1 rats had significantly better post-ischemic cardiac function after I/R injury, combined with higher levels of the—with osmolarity associated—heat shock protein 90 (hsp90). Improvement in post-ischemic cardiac function was halted by additional treatment with an hsp90 inhibitor. Hearts treated with mannitol also showed larger amounts of hsp90, similar to those of DMI hearts. These results suggest that hyperosmolarity induced by mannitol treatment might improve cardiac function after I/R injury via hsp90. In contrast, Chiong et al. [54] showed that sorbitol-induced hyperosmolarity resulted in increased calcium concentration in cardiomyocytes and along with that, pronounced apoptosis. Presumably, an increase in influx into the cell through voltage-dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels as well as an elevated release of calcium from the sarcoplasmic reticulum is involved in this. However, we were able to show that mannitol, despite the influence of hyperosmolarity on calcium homeostasis, was able to induce a strong cardioprotective effect. As suggested by Zálešák et al. [55], conditioning strategies by mannitol treatment might be dependent on the balance between calcium homeostasis and activation of cardioprotective signaling cascades, such as the RISK-pathway. However, further studies are necessary to fully understand the mechanisms of cardioprotection induced by mannitol.

Results from our study indicate that administering Dexmedetomidine before ischemia interferes with mannitol-induced cardioprotection. These findings are in line with results from Zálešák et al. [55] on hyperosmotic environment and IPC. Similar to our results, they showed a cardioprotective effect of mannitol treatment that was completely abrogated in combination with IPC. Along with an increase in infarct size when combining mannitol and IPC, levels of heart-type fatty acid binding protein (h-FABP) as a biomarker for cell injury were also higher in this group compared to hearts with IPC treatment only. Dexmedetomidine-induced preconditioning is fairly similar to IPC in a lot of aspects, e.g., involvement of signaling cascades. Both ischemic and Dexmedetomidine-induced preconditioning is mediated, among others, via the RISK pathway, which is also activated by hyperosmotic conditions [55,56]. One possible explanation for these results might be a counteracting effect of mannitol and Dexmedetomidine regarding the cardioprotective signaling pathways, which could lead to a predominantly negative impact of hyperosmolarity on cardiac function, due to intracellular calcium overload and oscillation during reperfusion and along with that, increased apoptosis. However, at this point we can only speculate, and further experiments are needed.

Interestingly, application of Dexmedetomidine during reperfusion did not influence mannitol-induced infarct size reduction in our study. In accordance with our results are the findings of Baranvai et al. [34] regarding RPerC and mannitol treatment in an in vivo rat model. RPerC under hyperosmotic conditions showed significantly lower infarct sizes than in hearts treated with mannitol only. However, in contrast to our study, they were not able to show an infarct size reducing effect of mannitol itself. Nevertheless, these findings at least suggest that application of a preconditioning stimulus and mannitol treatment do not counteract each other, as seems to be the case under preconditioning and hyperosmolarity.

#### 4.3. Limitations

As for most studies, there are some limitations that need to be addressed. The used concentration of 11 mmol/L glucose to mimic normoglycemia does not represent the physiological condition for rats, which is typically about 5–7 mmol/L glucose measured in the blood [35]. Notably, postprandial

blood glucose in Wistar rats can indeed increase up to 10.4 mmol/L [27]. However, this concentration of 11 mmol/L glucose is most commonly used for Langendorff perfused hearts [26], thus increasing the comparability of this study with other studies investigating cardioprotective effects. Additionally, we have previously demonstrated an infarct size reducing effect of Dexmedetomidine pre- and postconditioning under perfusion with KHB containing 11 mmol/L glucose [16,17,57]. Along with the glucose concentration under normoglycemia, the treatment with 22 mmol/L glucose in the hyperglycemic groups was also chosen in conformity with the literature [11,34,58–60] and our own previous studies [35–37]. This is the typically used glucose concentration in studies investigating the influence of acute hyperglycemia on conditioning strategies.

We did not investigate possible underlying mechanisms or pathways mediating cardioprotection of Dexmedetomidine in this study. We acknowledge that this is an interesting and relevant question that could possibly be addressed in further follow-up studies. However, our focus in the present study was to unravel a possible effect of hyperglycemia or mannitol on Dexmedetomidine-induced conditioning strategies. This *in vitro* model was the first approach to this topic and should be verified in an *in vivo* study, before translation into the clinical setting might be conceivable.

In conclusion, the administration of Dexmedetomidine for cardioprotection in ischemia reperfusion injury is a promising clinical approach. Therefore, unravelling the potential influencing factors on this conditioning strategy, especially comorbidities like diabetes mellitus along with acute hyperglycemia, is highly relevant in the context of Dexmedetomidine-induced cardioprotection. Results from our study demonstrate that while peracute hyperglycemia before ischemia might not interfere with Dexmedetomidine-induced preconditioning, hyperglycemic conditions at the time of reperfusion seem to be critical in postconditioning with Dexmedetomidine. As treatment before myocardial ischemia is not predictable in most cases, postconditioning strategies are of high interest in the clinical scenario; therefore, this aspect should be included in future translational studies with Dexmedetomidine-induced postconditioning.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.T., K.F., R.H. and A.R.; methodology, C.T., K.F. and A.R.; formal analysis, S.B., M.S. and R.H.; investigation, C.T., K.F. and L.S.; writing—original draft preparation, C.T., R.H. and A.R.; writing—review and editing, A.H. and M.W.H. (in partial fulfillment of the requirements for a medical doctoral (MD) thesis (L.S.)). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Caricati-Neto, A.; Errante, P.R.; Menezes-Rodrigues, F.S. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Garratt, K.N.; Whittaker, P.; Przyklenk, K. Remote Ischemic Conditioning and the Long Road to Clinical Translation. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1052–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Meybohm, P.; Bein, B.; Brosteanu, O.; Cremer, J.T.; Gruenewald, M.; Stoppe, C.; Coburn, M.; Schaelte, G.; Böning, A.; Niemann, B.; et al. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1397–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Meybohm, P.; Kohlhaas, M.; Stoppe, C.; Gruenewald, M.; Bein, B.; Albrecht, M.; Cremer, J.; Coburn, M.; Schaelte, G.; Boening, A.; et al. RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial Dysfunction, Postoperative Neurocognitive Dysfunction, and 1 Year Follow-Up. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e008077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hausenloy, D.J.; Candilio, L.; Evans, R.; Ariti, C.; Jenkins, D.P.; Kolvekar, S.; Knight, R.; Kunst, G.; Laing, C.; Nicholas, J.; et al. Effect of Remote Ischaemic preconditioning on Clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery bypass graft surgery (ERICCA study): A multicentre double-blind randomised controlled clinical trial. *Effic. Mech. Eval.* **2016**, *3*, 1–58. [[CrossRef](#)]

6. Ferdinandy, P.; Schulz, R.; Baxter, G. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol. Rev.* **2007**, *59*, 418–458. [[CrossRef](#)]
7. Heusch, G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1477–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bellodi, G.; Manicardi, V.; Malavasi, V.; Veneri, L.; Bernini, G.; Bpssini, P.; Distefano, S.; Magnanini, G.; Muratori, L.; Rossi, G.; et al. Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **1989**, *64*, 885–888. [[CrossRef](#)]
9. Jelesoff, N.E.; Feinglos, M.; Granger, C.B.; Califf, R.M. Outcomes of diabetic patients following acute myocardial infarction: A review of the major thrombolytic trials. *Coron. Artery Dis.* **1996**, *7*, 732–743. [[CrossRef](#)]
10. Ceriello, A. Acute hyperglycaemia: A ‘new’ risk factor during myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2004**, *26*, 328–331. [[CrossRef](#)]
11. Kristiansen, S.B.; Pælestik, K.B.; Johnsen, J.; Nr, J.; Pryds, K.; Hjortbak, M.V.; Jensen, R.V.; Bøtker, H.E. Impact of hyperglycemia on myocardial ischemia-reperfusion susceptibility and ischemic preconditioning in hearts from rats with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zálešák, M.; Blažiček, P.; Pancza, D.; Ledvényiová, V.; Bartekova, M.; Nemčková, M.; Čarnická, S.; Ziegelhöffer, A.; Ravingerová, T. Severity of lethal ischemia/reperfusion injury in rat hearts subjected to ischemic preconditioning is increased under conditions of simulated hyperglycemia. *Physiol. Res.* **2014**, *63*, 577–585. [[PubMed](#)]
13. Kehl, F.; Krolikowski, J.G.; Mraovic, B.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. Hyperglycemia Prevents Isoflurane-induced Preconditioning against Myocardial Infarction. *Anesthesiology* **2002**, *96*, 183–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Clarke, S.J.; McCormick, L.; Dutka, D.P. Optimising cardioprotection during myocardial ischaemia: Targeting potential intracellular pathways with glucagon-like peptide-1. *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Keating, G.M. Dexmedetomidine: A Review of Its Use for Sedation in the Intensive Care Setting. *Drugs* **2015**, *75*, 1119–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Behmenburg, F.; Pickert, E.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Berger, M.M. The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2017**, *69*, 228–235. [[CrossRef](#)]
17. Bunte, S.; Behmenburg, F.; Majewski, N.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury. *Anesthesia Analg.* **2020**, *130*, 90–98. [[CrossRef](#)]
18. Cheng, X.; Gu, X.Y.; Gao, Q.; Zong, Q.F.; Li, X.H.; Zhang, Y. Effects of dexmedetomidine postconditioning on myocardial ischemia and the role of the PI3K/Akt-dependent signaling pathway in reperfusion injury. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 797–803. [[CrossRef](#)]
19. Ibacache, M.; Sánchez, G.; Pedrozo, Z.; Galvez, F.; Humeres, C.; Echevarría, G.; Duaso, J.; Hassi, M.; Garcia, L.; Díaz-Araya, G.; et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 537–545. [[CrossRef](#)]
20. Yuan, F.; Fu, H.; Sun, K.; Wu, S.; Dong, T. Effect of dexmedetomidine on cerebral ischemia-reperfusion rats by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Metab. Brain Dis.* **2016**, *32*, 539–546. [[CrossRef](#)]
21. Ishihara, M.; Inoue, I.; Kawagoe, T.; Shimatani, Y.; Kurisu, S.; Nishioka, K.; Kouno, Y.; Umemura, T.; Nakamura, S.; Sato, H. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 1007–1011. [[CrossRef](#)]
22. Deng, L.; Chen, H.; Wei, N.; Zhang, Z.; Wang, G. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on regional ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic rat hearts. *Microvasc. Res.* **2019**, *123*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wei, C.H.; Litwin, S.E. Hyperglycemia and adverse outcomes in acute coronary syndromes: Is serum glucose the provocateur or innocent bystander? *Diabetes* **2014**, *63*, 2209–2212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Raupach, A.; Reinle, J.; Stroethoff, M.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Bunte, S. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 507. [[CrossRef](#)]

25. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKC) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bell, R.M.; Mocanu, M.M.; Yellon, D.M. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *50*, 940–950. [[CrossRef](#)]
27. Wang, Z.; Yang, Y.X.; Xiang, X.; Zhu, Y.; Men, J.; He, M. Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *J. Hyg. Res.* **2010**, *39*, 133–142.
28. Fang, W.; Lü, G. Effect of dexmedetomidine postconditioning on mitochondria injury during myocardial ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Chin. J. Anesthesiol.* **2011**, *31*, 1394–1396.
29. Braunwald, E.; Kloner, R.A. The stunned myocardium: Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* **1982**, *66*, 1146–1149. [[CrossRef](#)]
30. Lindsey, M.L.; Bolli, R.; Canty, J.M.; Du, X.-J.; Frangogiannis, N.G.; Frantz, S.; Gourdie, R.G.; Holmes, J.W.; Jones, S.; Kloner, R.A.; et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H812–H838. [[CrossRef](#)]
31. Kersten, J.R.; Schmeling, T.J.; Orth, K.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am. J. Physiol. Content* **1998**, *275*, H721–H725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kersten, J.R.; Toller, W.G.; Gross, E.R.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: Role of glucose, insulin, and osmolality. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2000**, *278*, H1218–H1224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kiss, A.; Tratsiakovich, Y.; Gonon, A.; Fedotovskaya, O.; Lanner, J.T.; Andersson, D.; Yang, J.; Pernow, J. The Role of Arginase and Rho Kinase in Cardioprotection from Remote Ischemic Preconditioning in Non-Diabetic and Diabetic Rat In Vivo. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Baranyai, T.; Nagy, C.T.; Koncsos, G.; Onódi, Z.; Károlyi-Szabó, M.; Makkos, A.; Varga, Z.; Ferdinandy, P.; Giricz, Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Goergens, J.I.; Heinen, N.M.; Zoller, J.; Preckel, B.; Bauer, I.; Huhn, R.; Ebel, D.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia During Different Phases of Ischemic Preconditioning on Cardioprotection—A Focus on Apoptosis and Aggregation of Granulocytes. *Shock* **2020**, *53*, 637–645. [[CrossRef](#)]
36. Weber, N.C.; Goletz, C.; Huhn, R.; Grueber, Y.; Preckel, B.; Schlack, W.; Ebel, D. Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *592*, 48–54. [[CrossRef](#)]
37. Huhn, R.; Heinen, A.; Weber, N.C.; Hollmann, M.W.; Schlack, W.S.; Preckel, B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: Cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *100*, 465–471. [[CrossRef](#)]
38. Kersten, J.R.; Montgomery, M.W.; Ghassemi, T.; Gross, E.R.; Toller, W.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2001**, *280*, 1744–1750. [[CrossRef](#)]
39. Toller, W.G.; Gross, E.R.; Kersten, J.R.; Pagel, P.S.; Gross, G.J.; Warltier, D.C. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: Mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **2000**, *92*, 1731–1739. [[CrossRef](#)]
40. Raphael, J.; Gozal, Y.; Navot, N.; Zuo, Z. Hyperglycemia Inhibits Anesthetic-induced Postconditioning in the Rabbit Heart via Modulation of Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and Endothelial Nitric Oxide Synthase Signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2010**, *55*, 348–357. [[CrossRef](#)]
41. Heusch, G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 674–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Riquelme, J.A.; Westermeier, F.; Hall, A.R.; Vicencio, J.M.; Pedrozo, Z.; Ibacache, M.; Fuenzalida, B.; Sobrevia, L.; Davidson, S.M.; Yellon, D.M.; et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 318–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jiang, C.; Xia, M.; Wang, M.; Chen, S. Dexmedetomidine preconditioning protects isolated rat hearts against ischemia/reperfusion injuries and its mechanism. *J. Zhejiang Univ. Med Sci.* **2013**, *42*, 326–330.
44. Rossello, X.; Yellon, D.M. The RISK pathway and beyond. *Basic Res. Cardiol.* **2017**, *113*, 2. [[CrossRef](#)]
45. Schulman, D.; Latchman, D.S.; Yellon, D.M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H1481–H1488. [[CrossRef](#)]

46. Varma, S.; Lal, B.K.; Zheng, R.; Breslin, J.W.; Saito, S.; Pappas, P.J.; Hobson, R.W.; Durán, W.N. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2005**, *289*, H1744–H1751. [[CrossRef](#)]
47. Nakadate, Y.; Sato, H.; Oguchi, T.; Sato, T.; Kawakami, A.; Ishiyama, T.; Matsukawa, T.; Schricker, T. Glycemia and the cardioprotective effects of insulin pre-conditioning in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 43. [[CrossRef](#)]
48. Kehl, F.; Krolikowski, J.G.; Weihrauch, D.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. N-Acetylcysteine Restores Isoflurane-induced Preconditioning against Myocardial Infarction during Hyperglycemia. *Anesthesiology* **2003**, *98*, 1384–1390. [[CrossRef](#)]
49. Tanaka, K.; Kehl, F.; Gu, W.; Krolikowski, J.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H2018–H2023. [[CrossRef](#)]
50. Queliconi, B.B.; Wojtovich, A.P.; Nadtochiy, S.M.; Kowaltowski, A.J.; Brookes, P.S. Redox regulation of the mitochondrial KATP channel in cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2010**, *1813*, 1309–1315. [[CrossRef](#)]
51. Gross, G.J.; Peart, J.N. KATP channels and myocardial preconditioning: An update. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2003**, *285*, H921–H930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ardehali, H.; O'Rourke, B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *39*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chen, H.; Wei, T.; Wang, X.-H.; Chen, H.-Z.; Gu, J.-Z.; Fu, J.; Ni, Y.-F.; Gao, P.-J.; Zhu, D.-L.; Higashino, H. Paradoxically enhanced heart tolerance to ischaemia in type 1 diabetes and role of increased osmolarity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 910–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chiong, M.; Parra, V.; Eisner, V.; Ibarra, C.; Maldonado, C.; Criollo, A.; Bravo-Sagua, R.; Quiroga, C.; Contreras, A.; Vicencio, J.M.; et al. Parallel activation of Ca<sup>2+</sup>-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. *Apoptosis* **2010**, *15*, 887–903. [[CrossRef](#)]
55. Zálezák, M.; Blažíček, P.; Pancza, D.; Gablovský, I.; Štrbák, V.; Ravingerová, T. Hyperosmotic Environment Blunts Effectivity of Ischemic Preconditioning Against Ischemia-Reperfusion Injury and Improves Ischemic Tolerance in Non-Preconditioned Isolated Rat Hearts. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, 1045–1051. [[CrossRef](#)]
56. Pastukh, V.; Ricci, C.; Solodushko, V.; Mozaffari, M.; Schaffer, S.W. Contribution of the PI 3-kinase/Akt survival pathway toward osmotic preconditioning. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *269*, 59–67. [[CrossRef](#)]
57. Bunte, S.; Lill, T.; Falk, M.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Impact of Anesthetics on Cardioprotection Induced by Pharmacological Preconditioning. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 396. [[CrossRef](#)]
58. Ceriello, A.; Quagliaro, L.; D'Amico, M.; Di Filippo, C.; Marfella, R.; Nappo, F.; Berrino, L.; Rossi, F.; Giugliano, D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* **2002**, *51*, 1076–1082. [[CrossRef](#)]
59. Ling, P.-R.; Mueller, C.; Smith, R.J.; Bistrrian, B.R. Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metabolism* **2003**, *52*, 868–874. [[CrossRef](#)]
60. Filippo, C.D.; Marfella, R.; Cuzzocrea, S.; Piegari, E.; Petronella, P.; Giugliano, D.; Rossi, F.; D'Amico, M. Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Increases Infarct Size Associated With Low Levels of Myocardial HO-1 During Ischemia/Reperfusion. *Diabetes* **2005**, *54*, 803–810. [[CrossRef](#)]





Article

# Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia

Carolin Torregroza <sup>1</sup>, Birce Yueksel <sup>1</sup>, Raphael Ruske <sup>1</sup>, Martin Stroethoff <sup>1</sup>, Annika Raupach <sup>1</sup> , André Heinen <sup>2</sup>, Markus W. Hollmann <sup>3</sup>, Ragnar Huhn <sup>1,\*</sup> and Katharina Feige <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Anesthesiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Carolin.Torregroza@med.uni-duesseldorf.de (C.T.); Birce.Yueksel@hhu.de (B.Y.); Raphael.Ruske@hhu.de (R.R.); Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de (M.S.); Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de (A.R.); KatharinaKristina.Feige@med.uni-duesseldorf.de (K.F.)
- <sup>2</sup> Institute of Cardiovascular Physiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@med.uni-duesseldorf.de
- <sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; M.W.Hollmann@amsterdamumc.nl
- \* Correspondence: Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de



**Citation:** Torregroza, C.; Yueksel, B.; Ruske, R.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Feige, K. Combination of Cyclosporine A and Levosimendan Induces Cardioprotection under Acute Hyperglycemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4517. <https://doi.org/10.3390/ijms22094517>

Academic Editor: Anastasios Lymperopoulos

Received: 10 March 2021  
Accepted: 23 April 2021  
Published: 26 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Prognosis of patients with myocardial infarction is detrimentally affected by comorbidities like diabetes mellitus. In the experimental setting, not only diabetes mellitus but also acute hyperglycemia is shown to hamper cardioprotective properties by multiple pharmacological agents. For Levosimendan-induced postconditioning, a strong infarct size reducing effect is demonstrated in healthy myocardium. However, acute hyperglycemia is suggested to block this protective effect. In the present study, we investigated whether (1) Levosimendan-induced postconditioning exerts a concentration-dependent effect under hyperglycemic conditions and (2) whether a combination with the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) blocker cyclosporine A (CsA) restores the cardioprotective properties of Levosimendan under hyperglycemia. For this experimental investigation, hearts of male Wistar rats were randomized and mounted onto a Langendorff system, perfused with Krebs-Henseleit buffer with a constant pressure of 80 mmHg. All isolated hearts were subjected to 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion under hyperglycemic conditions. (1) Hearts were perfused with various concentrations of Levosimendan (Lev) (0.3–10  $\mu$ M) for 10 min at the onset of reperfusion, in order to investigate a concentration–response relationship. In the second set of experiments (2), 0.3  $\mu$ M Levosimendan was administered in combination with the mPTP blocker CsA, to elucidate the underlying mechanism of blocked cardioprotection under hyperglycemia. Infarct size was determined by tetrazolium chloride (TTC) staining. (1) Control (Con) hearts showed an infarct size of  $52 \pm 12\%$ . None of the administered Levosimendan concentrations reduced the infarct size (Lev0.3:  $49 \pm 9\%$ ; Lev1:  $57 \pm 9\%$ ; Lev3:  $47 \pm 11\%$ ; Lev10:  $50 \pm 7\%$ ; all ns vs. Con). (2) Infarct size of Con and Lev0.3 hearts were  $53 \pm 4\%$  and  $56 \pm 2\%$ , respectively. CsA alone had no effect on infarct size (CsA:  $50 \pm 10\%$ ; ns vs. Con). The combination of Lev0.3 and CsA (Lev0.3  $\pm$  CsA) induced a significant infarct size reduction compared to Lev0.3 (Lev0.3+CsA:  $35 \pm 4\%$ ;  $p < 0.05$  vs. Lev0.3). We demonstrated that (1) hyperglycemia blocks the infarct size reducing effects of Levosimendan-induced postconditioning and cannot be overcome by an increased concentration. (2) Furthermore, cardioprotection under hyperglycemia can be restored by combining Levosimendan and the mPTP blocker CsA.

**Keywords:** Levosimendan; hyperglycemia; myocardial infarction; cardioprotection

## 1. Introduction

Myocardial infarction (MI) usually presents as an unforeseeable event that is still associated with high rates of mortality and morbidity [1,2]. Even after survival of MI, patients

are faced with a substantial risk of subsequent cardiovascular events, including sudden cardiac arrest or heart failure [3]. Prognosis after suffering from MI widely varies among patients and is immensely affected by comorbidities like hypertension or diabetes [4,5]. Interestingly, hyperglycemia seems to be an independent outcome-related risk factor for MI in patients with or without diabetes [6–8].

Restoration of coronary blood circulation is essential for all patients suffering from MI [9]; however, the paradoxically occurring ischemia-reperfusion (I/R) injury hampers the benefits of reperfusion. I/R injury is characterized as additional cell damage and death caused by restored blood supply to an ischemic organ or tissue, like the myocardium [10]. Hence, cardioprotective interventions protecting the heart against harmful consequences of I/R injury are fundamental. Considering the fact that MI—as an acute event—is mostly unpredictable, cardioprotective approaches performed after the occurrence of ischemia and subsequent I/R injury gain increasing relevance. Zhao et al. [11] described the mechanism of ischemic postconditioning (PoC), where short cycles of ischemia and reperfusion after a prolonged ischemic period induced a significant myocardial protection. Fortunately, a less invasive practice—administration of pharmacological agents—can mimic ischemic PoC. Different substances were demonstrated to confer myocardial protection, e.g., sedatives [12], opioids [13], or the calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sensitizer—Levosimendan [14,15].

In a clinical setting, Levosimendan is indicated for the treatment of acute and chronic heart failure, significantly lowering mortality when administered preoperatively, with the benefit of having positive inotropic characteristics without affecting the diastolic function [16]. The molecular background of Levosimendan relates to its specific interaction with cardiac troponin C in myofilaments, resulting in an increased sensitivity for  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiomyocytes [17]. Experimental studies suggest that Levosimendan-induced conditioning is mediated via activation of mitochondrial potassium ( $\text{mK}^+$ ) channels [15,18,19] and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [20], ultimately causing a decrease of infarct size and improved cardiac function after I/R injury [15,21].

However, various comorbidities abolish cardioprotection induced by ischemic and pharmacological postconditioning [22–24]. In particular, acute hyperglycemia—which is frequently observed in patients with cardiovascular diseases—blocks several known conditioning strategies [24–28]. In line with these findings, Matsumoto et al. demonstrated that hyperglycemia raised the threshold for postconditioning with Levosimendan in vivo. A ten times higher concentration of Levosimendan was needed to restore the cardioprotective effect [29]. Authors suggest an involvement of known cardioprotective targets, like  $\text{mK}^+$  channels or the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), in the hyperglycemia-induced blockade. However, definite evidence is lacking to this point. The mitochondria are thought to be the end-effector of cardioprotection [30,31] and the mPTP is considered to be the most integral player [32,33]. Opening of the mPTP ultimately leads to matrix swelling and cell death caused by the release of proapoptotic factors [34]. Referring to the influence of hyperglycemia, Huhn et al. [22] demonstrated that applying the mPTP inhibitor cyclosporine A (CsA) fully restores Sevoflurane-induced postconditioning, under elevated glucose levels.

Therefore, in this study, we set out to determine whether (1) acute hyperglycemia influences concentration-dependent postconditioning with Levosimendan and (2) if the combination with CsA reverses the hyperglycemia-caused loss of cardioprotection by Levosimendan.

## 2. Results

### 2.1. Animal Characteristics

Regarding body weight, wet and dry weight, and level or time of maximal contracture, no differences were detected between groups in both parts of this study (Table 1). For part 2 of the study, one dropout had to be reported in the Con group. The experiment was excluded from the study as it did not meet the baseline hemodynamic criteria (low baseline heart rate). Referring to the onset of maximal ischemia contracture, no differences

were detected between the experimental groups. These results illustrate that myocardial damage caused by global ischemia was comparable between all study groups, underlining that differences in infarct size resulted from the respective postconditioning stimulus and not by varying the myocardial ischemic damage.

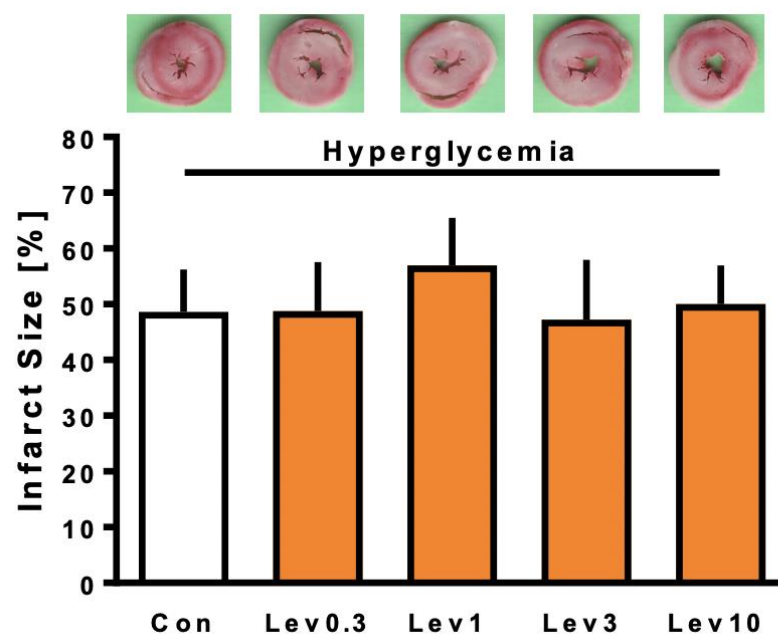
**Table 1.** Weights and ischemic contracture.

	<i>n</i>	Body Weight (g)	Heart Weight Wet (g)	Heart Weight Dry (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)	
<i>Part 1</i>							
HG	Con	7	298 ± 8	1.21 ± 0.10	0.13 ± 0.01	14 ± 1	85 ± 11
	Lev0.3	7	312 ± 7	1.22 ± 0.07	0.14 ± 0.01	15 ± 2	82 ± 9
	Lev1	7	311 ± 14	1.28 ± 0.08	0.14 ± 0.01	15 ± 1	75 ± 11
	Lev3	7	313 ± 17	1.32 ± 0.07	0.14 ± 0.02	15 ± 1	82 ± 10
	Lev10	7	308 ± 13	1.22 ± 0.05	0.14 ± 0.02	16 ± 1	65 ± 8 *
<i>Part 2</i>							
HG	Con	5	316 ± 11	1.27 ± 0.04	0.14 ± 0.00	16 ± 2	75 ± 15
	Lev0.3	5	288 ± 21	1.24 ± 0.07	0.12 ± 0.01	15 ± 2	79 ± 10
	CsA	5	294 ± 24	1.15 ± 0.08	0.12 ± 0.01	15 ± 2	77 ± 7
	Lev0.3+CsA	5	307 ± 11	1.19 ± 0.04	0.12 ± 0.01	15 ± 2	68 ± 8

Data are mean ± SD, HG = Hyperglycemia; Con = Control; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporine A (mPTP inhibitor); \*  $p < 0.05$  vs. Con.

## 2.2. Infarct Size

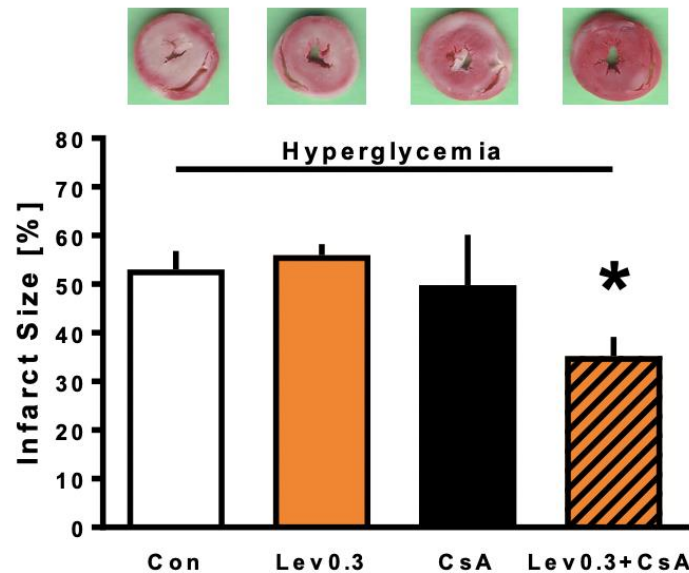
Infarct sizes of part 1 of the study are shown in Figure 1. Infarct size of control hearts was  $52 \pm 12\%$ . Levosimendan (Lev) in a concentration of  $0.3 \mu\text{M}$  did not reduce infarct size under hyperglycemia (Lev0.3:  $49 \pm 9\%$ ; ns vs. Con). Increasing Levosimendan concentration also did not induce infarct size reduction (Lev1:  $57 \pm 9\%$ ; Lev3:  $47 \pm 11\%$ ; Lev10:  $50 \pm 7\%$ ; all ns vs. Con).



**Figure 1.** Infarct size measurement part 1. Histogram shows all infarct sizes of the study. Data are presented as means ± SD.

All infarct sizes investigated in part 2 are displayed in Figure 2. Control and Lev0.3 hearts showed infarct sizes of  $53 \pm 4\%$  and  $56 \pm 2\%$  of the left ventricle, respectively.

Combining Lev0.3 with the mPTP blocker CsA (Lev0.3 ± CsA) significantly reduced the infarct size compared to Lev0.3 (Lev0.3+CsA: 35 ± 4%;  $p < 0.05$  vs. Lev0.3). The mPTP blocker itself had no effect on infarct size (CsA: 50 ± 10%; ns vs. Con).



**Figure 2.** Infarct size measurement part 2. Histogram shows all infarct sizes of the study. Data are presented as means ± SD, \*  $p < 0.05$  vs. Lev0.3.

### 2.3. Cardiac Function

In part 1 of the study, no differences were observed between the groups at the different measurement time-points. Heart rate remained stable throughout the whole experimental protocol. A significant decrease during reperfusion compared to baseline was detected for both left ventricular, which developed pressure and coronary flow values within each group. All hemodynamic variables from part 1 can be found in Table 2.

**Table 2.** Hemodynamic variables Part 1.

		Baseline	Reperfusion		
			30	45	60
		<i>Heart Rate (bpm)</i>			
HG	Con	316 ± 43	242 ± 41	219 ± 57	207 ± 69
	Lev0.3	307 ± 36	255 ± 32	228 ± 52	267 ± 43
	Lev1	288 ± 38	263 ± 109	271 ± 83	292 ± 40
	Lev3	278 ± 20	231 ± 48	208 ± 65	214 ± 45
	Lev10	282 ± 20	222 ± 64	248 ± 86	239 ± 79
		<i>Left Ventricular Developed Pressure (mmHg)</i>			
HG	Con	109 ± 9	27 ± 11 *	35 ± 12 *	33 ± 6 *
	Lev0.3	107 ± 16	22 ± 14 *	25 ± 9 *	21 ± 10 *
	Lev1	117 ± 17	13 ± 10 *	20 ± 9 *	20 ± 11 *
	Lev3	114 ± 13	12 ± 12 *	20 ± 14 *	26 ± 7 *
	Lev10	122 ± 11	12 ± 10 *	19 ± 9 *	25 ± 10 *
		<i>Coronary flow (mL/min)</i>			
HG	Con	12 ± 2	6 ± 1 *	6 ± 1 *	6 ± 1 *
	Lev0.3	12 ± 3	6 ± 1 *	6 ± 1 *	6 ± 1 *
	Lev1	13 ± 2	6 ± 1 *	6 ± 1 *	6 ± 1 *
	Lev3	13 ± 2	6 ± 2 *	7 ± 2 *	6 ± 2 *
	Lev10	14 ± 3	8 ± 3 *	8 ± 3 *	8 ± 3 *

Data are mean ± SD. HG = Hyperglycemia; Con = Control; Lev = Levosimendan; \*  $p < 0.05$  vs. Baseline.

Table 3 displays all hemodynamic variables from part 2 of the study. Again, no differences were detected between the different groups for any given time-point of measurement. Comparable to part 1 of the study, during reperfusion pressure and coronary flow that developed in the left ventricular decreased significantly, as compared to the baseline within each study group.

**Table 3.** Hemodynamic variables Part 2.

		Baseline	Reperfusion		
			30	45	60
		<i>Heart Rate (bpm)</i>			
HG	Con	311 ± 54	205 ± 42 *	220 ± 69	192 ± 16 *
	Lev0.3	297 ± 30	245 ± 87	259 ± 45	216 ± 52
	CsA	292 ± 23	215 ± 63	214 ± 67	229 ± 47
	Lev0.3 + CsA	306 ± 29	297 ± 43	267 ± 20	265 ± 23
		<i>Left Ventricular Developed Pressure (mmHg)</i>			
HG	Con	117 ± 19	20 ± 16 *	28 ± 16 *	28 ± 11 *
	Lev0.3	106 ± 14	15 ± 13 *	20 ± 19 *	25 ± 16 *
	CsA	123 ± 26	35 ± 8 *	37 ± 13 *	35 ± 10 *
	Lev0.3 + CsA	112 ± 21	23 ± 18 *	24 ± 13 *	24 ± 12 *
		<i>Coronary flow (mL/min)</i>			
HG	Con	15 ± 3	7 ± 3 *	6 ± 1 *	6 ± 2 *
	Lev0.3	13 ± 2	6 ± 1 *	6 ± 1 *	5 ± 1 *
	CsA	15 ± 2	5 ± 1 *	6 ± 1 *	6 ± 1 *
	Lev0.3 + CsA	14 ± 2	7 ± 2 *	7 ± 2 *	6 ± 1 *

Data are mean ± SD. HG = Hyperglycemia; Con = Control; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporine A (mPTP inhibitor); \*  $p < 0.05$  vs. Baseline.

#### 2.4. Glucose Levels

All glucose levels are displayed in Table 4. Compared to baseline, all groups showed a significant increase in glucose values (hyperglycemia). For part 1 and 2 of the study, there were no differences in glucose concentration between the individual groups.

**Table 4.** Glucose levels (mg/dL).

		Baseline	Pre Ischemia	Reperfusion 15	Reperfusion 60
<i>Part 1</i>					
HG	Con	196 ± 5	370 ± 10 *	394 ± 18 *	425 ± 44 *
	Lev0.3	197 ± 6	374 ± 37 *	393 ± 11 *	425 ± 28 *
	Lev1	197 ± 2	360 ± 46 *	389 ± 13 *	409 ± 33 *
	Lev3	197 ± 4	377 ± 10 *	389 ± 32 *	393 ± 41 *
	Lev10	198 ± 3	372 ± 16 *	377 ± 13 *	400 ± 32 *
<i>Part 2</i>					
HG	Con	203 ± 3	384 ± 6 *	389 ± 12 *	418 ± 35 *
	Lev0.3	199 ± 9	373 ± 16 *	391 ± 9 *	441 ± 18 *
	CsA	204 ± 10	377 ± 9 *	390 ± 10 *	425 ± 20 *
	Lev0.3 + CsA	203 ± 6	389 ± 8 *	398 ± 5 *	448 ± 35 *

Data are mean ± SD. HG = Hyperglycemia; Con = Control; Lev = Levosimendan; CsA = Cyclosporine A (mPTP inhibitor); \*  $p < 0.05$  vs. Baseline.

### 3. Discussion

In the present study, we focused on the influence of hyperglycemia on postconditioning with Levosimendan and whether increased concentrations or combined inhibition of mPTP could overcome a potential loss of cardioprotection. Our results demonstrated that (1) acute hyperglycemia fully abrogated Levosimendan-induced postconditioning even

under increased substance concentrations. However, (2) combining the mPTP blocker CsA and Levosimendan restored cardioprotection under acute hyperglycemia.

### 3.1. Influence of Hyperglycemia on Levosimendan-Induced Postconditioning

Acute hyperglycemia is not only considered an independent risk factor of cardiovascular diseases, like MI, but also significantly influences morbidity and mortality after occurrence of ischemia and reperfusion [4,6,8]. More importantly, elevated glucose levels crucially interfered with several ischemic and pharmacological conditioning strategies in experimental studies [24,35,36]. This might be one explanation for the remaining challenge of successfully translating cardioprotective approaches into the clinical setting [37,38]. Therefore, unraveling the influence of hyperglycemia on conditioning strategies is of considerable importance.

In a previous study, we demonstrated a concentration-related cardioprotective effect of postconditioning by Levosimendan [14]. We detected an on-off phenomenon, which was either ineffective or had maximal effect under normoglycemic conditions. A concentration of 0.3  $\mu\text{M}$  Levosimendan as postconditioning stimulus induced cardioprotection, whereas an increase to 1  $\mu\text{M}$  had no additional effect. Results from our own and other studies indicate that Levosimendan-induced postconditioning is mainly mediated via the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway [18,20]. In more detail, mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-sensitive potassium ( $\text{mK}_{\text{ATP}}$ ) and large conductance calcium-sensitive potassium ( $\text{mBK}_{\text{Ca}}$ ) channels are suggested to be main downstream targets of cardioprotection by Levosimendan [14,15,19,20]. All of these targets are possibly blunted by elevated glucose levels [23,39,40].

Previous studies on hyperglycemia and ischemic or pharmacological conditioning indicated that the loss of cardioprotection can be reversed by increased stimuli. In an in vitro I/R animal study, one cycle of ischemic preconditioning did not reduce infarct size, while three cycles of the same stimulus did confer cardioprotection in diabetic myocardium [41]. The same holds true for pharmacological preconditioning with increased concentrations of Isoflurane [42].

Matsumoto et al. [29] previously demonstrated that hyperglycemia blocks postconditioning with Levosimendan in vivo, presumably due to a raised threshold for cardioprotection. This explanation was based on findings that increased concentration of Levosimendan did indeed induce infarct size reduction under elevated glucose levels. However, a ten times higher concentration was needed to achieve cardioprotection. In contrary to these results, in our present study even increased concentration did not induce cardioprotection under hyperglycemia in vitro. A possible explanation might be the different experimental settings. Matsumoto et al. employed an in vivo I/R animal model, while our experiments were performed in isolated hearts in vitro. We chose this setting to exclude possible systemic influences of other organs or hormones. Furthermore, our study involved hyperglycemia throughout the whole 60 min reperfusion phase. In contrast, Matsumoto et al. applied the glucose solution only during the first half of reperfusion, with a total of 120 min reperfusion phase. These differences in experimental protocol as well as possible systemic influences in vivo vs. in vitro might explain the contrary findings in our present study.

Nevertheless, increasing concentrations of Levosimendan to overcome blocked protection by hyperglycemia might not be advisable for patients. We showed that 0.3  $\mu\text{M}$  was the lowest cardioprotective concentration of Levosimendan under normoglycemia in vitro. This converted to around 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  which was in line with the detected plasma concentrations (10–100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) under clinical dosage of Levosimendan [43–45]. However, it was already situated at the higher end of the therapeutic dose range. Considering adverse effects, applying a ten times higher concentration of Levosimendan under hyperglycemia does not seem practical in the clinical setting. Thus, increased dosage to restore blocked cardioprotection through hyperglycemia might not be feasible for Levosimendan-induced postconditioning.

### 3.2. Reversing the Loss of Levosimendan-Induced Cardioprotection under Hyperglycemia by Combined Treatment with CsA

From the literature, it is well-known that acute hyperglycemia attenuates cardioprotection; however, detailed explanation of possible underlying mechanisms is still lacking. Studies indicate that hyperglycemia leads to elevated ATP levels, which in turn hampers activation of the  $mK_{ATP}$  channels [39,46,47]. Next to ATP, excessive levels of reactive oxygen species (ROS) were detected under hyperglycemic conditions [48]. While ROS are essential in conferring cardioprotection, disproportional amounts ultimately cause opening of the mPTP and thus cell death [30,49]. Acute hyperglycemia not only has a negative impact on the  $mK_{ATP}$  channels but also blocks different parts of cardioprotective signaling cascades, for example, Akt phosphorylation, nitric oxide (NO), endothelial NO synthase (eNOS), or protein kinase G (PKG) [23,25,50,51]. Some of these respective targets are crucially involved in Levosimendan-induced cardioprotection. Especially, regulation of mitochondrial bioenergetics through  $mK^+$  channels and mPTP seems to play an integral role in conditioning strategies, under hyperglycemia [39]. Matsumoto et al. [29] demonstrated blocked postconditioning with Levosimendan under elevated glucose levels, while Milrinone was still effective. They presented involvement of different  $mK^+$  channels as a possible explanation for this discrepancy. Levosimendan is mediated via both  $mBK_{Ca}$  and  $mK_{ATP}$  channels [14,18]. Milrinone, however, is supposedly only dependent on  $mBK_{Ca}$  channels. Both substances ultimately target the mPTP and the protective properties could be fully abolished by administration of the mPTP activator atractyloside [29]. Taking together all these findings, it could be assumed that regulation of mitochondrial function, in particular  $mK_{ATP}$  channels, ROS levels and mPTP, play an integral role in lost cardioprotective properties of Levosimendan, under hyperglycemic conditions.

Multitarget strategies, meaning combination of substances or conditioning approaches, were the main research focus in the context of overcoming challenges in translating cardioprotection into clinical trials [52]. Next to the above-mentioned increased stimulus or concentration, combined conditioning strategies were shown to restore cardioprotection under hyperglycemia. Kehl et al. demonstrated that hyperglycemia blocks Isoflurane-preconditioning, but combination with the ROS scavenger N-acetylcystein restores the cardioprotective effects [50]. These findings further underline the importance of ROS in hyperglycemia. Interestingly and in line with our findings, cardioprotection with Sevoflurane is completely abrogated under acute hyperglycemia. However, inhibiting mPTP opening by administration of CsA, reversed the loss of protective effects [22]. Similar to our results, Huhn et al. [22] demonstrated that applying CsA individually did not restore cardioprotection under hyperglycemia. Even though inhibition of mPTP opening with CsA was shown to protect healthy myocardium [53,54], elevated glucose levels seemed to interfere with these properties. Further, they also demonstrated that an increased concentration of CsA did not overcome the hyperglycemia-induced loss of cardioprotection. These findings indicate that a pharmacological stimulus could possibly amplify the inhibition of mPTP with CsA and thus induce cardioprotection, even under hyperglycemia. Another possible explanation might be a lowered threshold for cardioprotection by combining stimuli triggering different pathways. Our results were consistent with findings from Huhn et al. on Sevoflurane and CsA [22]. In this study and to our knowledge for the first time, we demonstrated that while hyperglycemia blocks pharmacological conditioning with Levosimendan, this loss of cardioprotection could be restored with co-administration of CsA.

### 3.3. Limitations

While our results showed a significant infarct size reduction by combining Levosimendan and CsA under acute hyperglycemia, no hemodynamic improvement was detected during reperfusion, as compared to the other study groups. The concept of myocardial stunning after global ischemia might explain these rather contradictory findings. Myocardial stunning is defined as a temporary depression of function in the surviving myocardial

tissue, which occurs especially after global ischemia. Even a prolonged reperfusion phase (up to 120 min) only displayed slight changes in hemodynamic data—insufficient for assessment of heart function—with no further impact on infarct size reduction [55]. Consistent with current literature, measurement of infarct size still represents the most sensitive marker to assess cardioprotection in the isolated heart [56]. Based on these aspects, we chose the respective experimental protocol of our study.

Furthermore, we did not conduct experiments investigating the underlying mechanisms of restored cardioprotection by combining Levosimendan and CsA under hyperglycemia. Whether beneficial effects by simultaneous treatment were achieved by a lowered threshold of the same mitochondrial end-effector or parallel activation of different signaling pathways, remains an open question at this point. Investigating these exact underlying mechanisms were beyond the scope of our current study. Further research is needed to unravel whether mPTP is completely blocked by combining Levosimendan and CsA or if other pathways are involved.

Lastly, due to animal ethical reasons, we refrained from including normoglycemic control groups. We [14] and others [18] previously demonstrated that Levosimendan-induced postconditioning significantly reduced infarct size in healthy isolated hearts. Moreover, our own research group investigated the underlying mechanisms of postconditioning with Levosimendan by employing the exact same experimental setup. Stroethoff et al. demonstrated that Levosimendan-induced postconditioning reduced infarct size by about −50%, as compared to a normoglycemic control group [14]. Hence, these previous results could be referenced for normoglycemic groups, in the context of Levosimendan-induced postconditioning.

#### 4. Materials and Methods

All experiments included in this study were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised 1996). Investigations were approved by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12), and results were reported according to the ARRIVE guidelines.

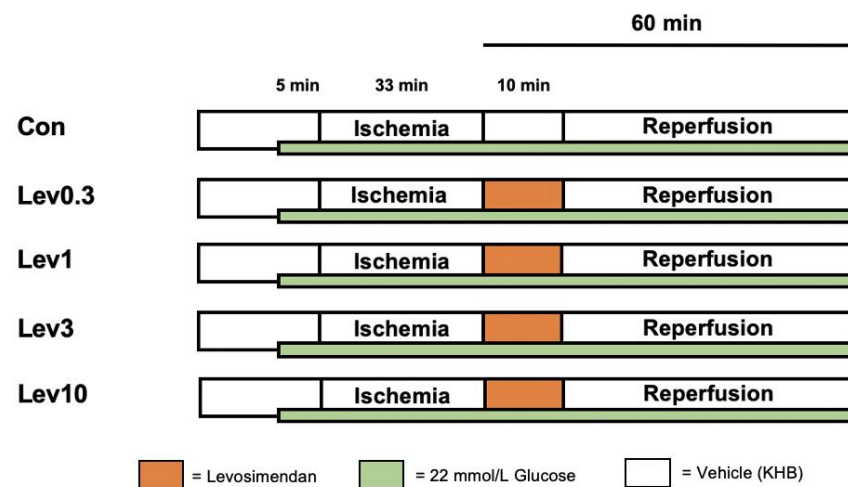
##### 4.1. Surgical Preparation

The surgical preparation was performed as described in detail previously [57]. Male wistar rats (2–3-month-old) were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (80 mg/kg body weight, Narcoren, Merial, Germany) and decapitated. Hearts were resected via a thoracotomy, mounted onto a Langendorff-System (built in-house) and perfused with Krebs-Henseleit-Buffer (KHB) (Chemicals sourced from Sigma-Aldrich, Germany; KHB solution prepared in-house) enriched with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The KHB solution contained 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.52 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, and 1 mM lactate, and was perfused under constant pressure (80 mmHg) and temperature (37 °C). For hemodynamic measurements, a fluid-filled balloon (manufactured in-house) was inserted into the left ventricle, setting left ventricular end-diastolic pressure to 4–6 mmHg. For all experiments, heart rate, left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and coronary flow (CF) were continuously measured and digitized by an analogue to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia), at a sampling rate of 500 Hz. LVESP and LVEDP values allowed for calculation of left ventricular developed pressure (LVDP) (LVDP = LVESP – LVEDP). As a possible indicator for differences in myocardial injury, we analyzed the level and time-point of maximal contracture during ischemia for each experiment. To examine infarct size, after successful completion of the protocol, each heart was removed and cut into 8 transverse slices (2 mm each slice). Afterwards, a 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution was applied to detect the infarcted area as compared to viable tissue. A blinded, expe-

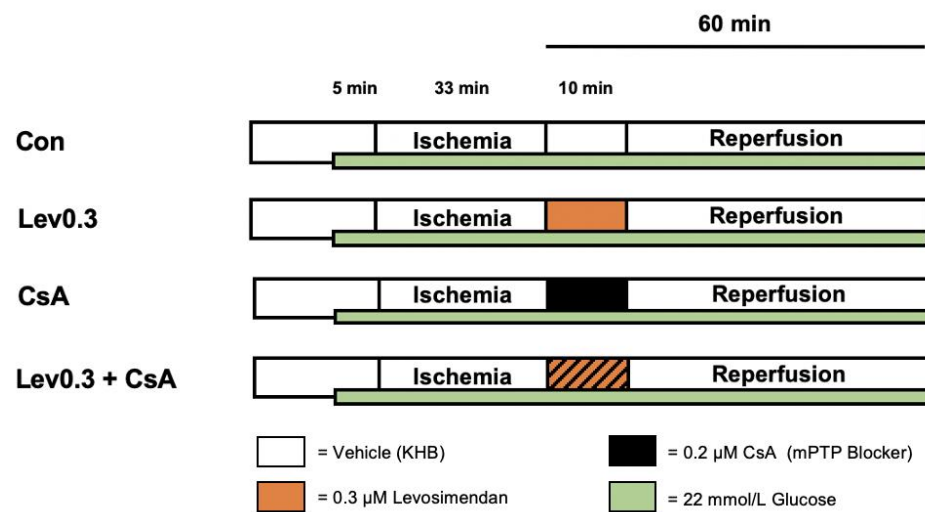
rienced investigator analyzed infarct sizes using planimetry (SigmaScan Pro5 software), determined as the percentage of infarct area per total area of the left ventricle [58].

#### 4.2. Experimental Protocol

The study consisted of two separate parts. For both parts, we employed the same basic experimental protocol (shown in Figures 3 and 4). All hearts underwent 15 min of adaption period. Hereafter, acute hyperglycemia was induced in all hearts, 5 min prior to global ischemia, by applying a 11 mmol/L glucose solution consistently throughout the entire experiment. As KHB itself already contained 11 mmol/L glucose, a total of 22 mmol/L glucose was reached in all hearts. All investigations included in this study were carried out following the same protocol for induction of acute hyperglycemia. This concentration was proven to block different pharmacological conditioning strategies by us and others [22,24,35,42]. Glucose levels were frequently reevaluated throughout each experiment, by collecting coronary effluent. The current protocol was taken from our previous study, where we successfully induced acute hyperglycemia in isolated hearts [24]. Global ischemia was followed by 60 min of, including a 10 min postconditioning (PoC) period. For all experiments, global ischemia was achieved by completely stopping the perfusion to the heart via the Langendorff System. We administered the respective substance for 10 min, starting immediately at the onset of reperfusion, to achieve a postconditioning stimulus. All substances were applied at an infusion rate of 1% of coronary flow. The applied concentration of all substances in our current study were shown to be effective in several previous studies [14,59].



**Figure 3.** Experimental protocol. Con = Control; Lev = Levosimendan, KHB = Krebs-Henseleit-Buffer; Vehicle = Krebs-Henseleit Buffer (KHB). **Green bar:** Hearts were perfused with a total of 22 mmol/L glucose concentration by combining 11 mmol/L glucose solution with KHB (containing 11 mmol/L glucose). **Control (Con):** Hearts were perfused with Krebs-Henseleit-Buffer (KHB) as vehicle for 10 min. **Levosimendan 0.3  $\mu$ M (Lev0.3):** Hearts were perfused with 0.3  $\mu$ M Lev for 10 min. **Levosimendan 1  $\mu$ M (Lev1):** Hearts were perfused with 1  $\mu$ M Lev for 10 min. **Levosimendan 3  $\mu$ M (Lev3):** Hearts were perfused with 3  $\mu$ M Lev for 10 min. **Levosimendan 10  $\mu$ M (Lev10):** Hearts were perfused with 10  $\mu$ M Lev for 10 min.



**Figure 4.** Experimental protocol. Con = Control; Lev = Levosimendan, KHB = Krebs-Henseleit-Buffer; Vehicle = Krebs-Henseleit Buffer (KHB); CsA = Cyclosporine A (mPTP inhibitor). **Green bar:** Hearts were perfused with a total of 22 mmol/L glucose concentration by combining 11 mmol/L glucose solution with KHB (containing 11 mmol/L glucose). **Control (Con):** Hearts were perfused with Krebs-Henseleit-Buffer as vehicle for 10 min. **Levosimendan 0.3 μM (Lev0.3):** Hearts were perfused with 0.3 μM Lev for 10 min. **Cyclosporine A (CsA):** Hearts were perfused with 0.2 μM CsA for 10 min. **Levosimendan 0.3 μM + Cyclosporine A (Lev0.3+CsA):** Hearts were perfused with 0.3 μM Lev and 0.2 μM CsA for 10 min.

#### 4.2.1. Part 1: Concentration–Response Relationship of Levosimendan under Hyperglycemia

For part 1, animals were randomly assigned into 5 experimental groups ( $n = 7$  per group), as shown in Figure 1. The first part was designed to investigate a possible concentration-dependent effect of Levosimendan under acute hyperglycemia. In previous studies, we demonstrated 0.3 μM as the lowest cardioprotective concentration of Levosimendan under normoglycemic conditions [14,19]. Therefore, we further increased Levosimendan concentrations to 1 μM, 3 μM, and 10 μM. Levosimendan was applied under hyperglycemic conditions as a postconditioning stimulus for 10 min after ischemia.

#### 4.2.2. Part 2: Underlying Mechanisms of Levosimendan-Induced Postconditioning under Hyperglycemia

The second part of this study was designed to elucidate the potentially underlying mechanism of blocked cardioprotection by Levosimendan, under acute hyperglycemia. Previously, we demonstrated a strong cardioprotective effect by postconditioning with 0.3 μM Levosimendan under normoglycemia, whereas higher concentrations did not further enhance the protective effect [14]. Based on these findings and results from part 1 of this study, we employed 0.3 μM Levosimendan as a postconditioning stimulus for investigations in part 2. Concentration of the mPTP inhibitor CsA was taken from the literature [59,60]. All substances were administered under hyperglycemic conditions as a postconditioning stimulus for 10 min. In part 2, hearts were randomized into 4 groups ( $n = 5$  per group).

### 4.3. Statistical Analysis

#### 4.3.1. Sample Size Analysis

A sample size of  $n = 7$  (part 1) and  $n = 5$  (part 2) was calculated (GraphPad StatMate™, GraphPad Software, San Diego, CA, USA), detecting a 25% mean difference in infarct size (power 80%,  $\alpha < 0.05$  (two-tailed)).

#### 4.3.2. Statistical Approach

Both parts of the study were analyzed separately, each by performing a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post-hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA, USA) for hemodynamic data between groups and time-effects within each group. For part 1 and 2, infarct sizes were analyzed by a one-way ANOVA, followed by a Tukey's post-hoc test. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Changes were considered to be statistically significant if  $p < 0.05$ .

#### 5. Conclusions

Our findings demonstrate that Levosimendan-induced postconditioning is completely abolished under hyperglycemia. Applying increased Levosimendan concentrations could not overcome blocked cardioprotective effects by hyperglycemia in this experimental setting. While inhibition of mPTP by CsA alone could not restore infarct size reduction under hyperglycemia, combining Levosimendan and CsA reversed the loss of cardioprotection under elevated glucose levels.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.T., K.F., and R.H.; methodology, C.T., K.F., A.R., and M.S.; formal analysis, C.T., M.S. and R.H.; investigation, B.Y., R.R., and A.R.; writing—original draft preparation, C.T. and K.F.; writing—review and editing, A.H., M.W.H., and R.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and investigations were approved by the local Animal Care and Use Committee of the University of Duesseldorf (project number O27/12).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** In partial fulfillment of the requirements for an MD thesis of Birce Yueksel and Raphael Ruske.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Kayani, W.T.; Ballantyne, C.M. Improving Outcomes after Myocardial Infarction in the US Population. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e008407. [CrossRef]
2. World Health Organization. The 10 Leading Causes of Death in the World, 2000 and 2012. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 9 March 2021).
3. Ko, D.T.; Khera, R.; Lau, G.; Qiu, F.; Wang, Y.; Austin, P.C.; Koh, M.; Lin, Z.; Lee, D.S.; Wijeyesundera, H.C.; et al. Readmission and Mortality After Hospitalization for Myocardial Infarction and Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 736–746. [CrossRef]
4. Deckers, J.W.; van Domburg, R.T.; Akkerhuis, M.; Nauta, S.T. Relation of admission glucose levels, short- and long-term (20-year) mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **2013**, *112*, 1306–1310. [CrossRef] [PubMed]
5. Jelesoff, N.E.; Feinglos, M.; Granger, C.B.; Califf, R.M. Outcomes of diabetic patients following acute myocardial infarction: A review of the major thrombolytic trials. *Coron. Artery Dis.* **1996**, *7*, 732–743. [CrossRef]
6. Bellodi, G.; Manicardi, V.; Malavasi, V.; Veneri, L.; Bernini, G.; Bossini, P.; Distefano, S.; Magnanini, G.; Muratori, L.; Rossi, G.; et al. Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **1989**, *64*, 885–888. [CrossRef]
7. Wei, C.H.; Litwin, S.E. Hyperglycemia and Adverse Outcomes in Acute Coronary Syndromes: Is Serum Glucose the Provocateur or Innocent Bystander? *Diabetes* **2014**, *63*, 2209–2212. [CrossRef] [PubMed]
8. Goyal, A.; Mehta, S.R.; Díaz, R.; Gerstein, H.C.; Afzal, R.; Xavier, D.; Liu, L.; Pais, P.; Yusuf, S. Differential clinical outcomes associated with hypoglycemia and hyperglycemia in acute myocardial infarction. *Circulation* **2009**, *120*, 2429–2437. [CrossRef] [PubMed]
9. Roe, M.T.; Messenger, J.C.; Weintraub, W.S.; Cannon, C.P.; Fonarow, G.C.; Dai, D.; Chen, A.Y.; Klein, L.W.; Masoudi, F.A.; McKay, C.; et al. Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *56*, 254–263. [CrossRef] [PubMed]
10. Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 92–100. [CrossRef] [PubMed]


11. Zhao, Z.Q.; Corvera, J.S.; Halkos, M.E.; Kerendi, F.; Wang, N.P.; Guyton, R.A.; Vinten-Johansen, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *285*, H579–H588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bunte, S.; Behmenburg, F.; Majewski, N.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Characteristics of Dexmedetomidine Postconditioning in the Field of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesth. Analg.* **2019**. [[CrossRef](#)]
13. Huhn, R.; Heinen, A.; Weber, N.C.; Schlack, W.; Preckel, B.; Hollmann, M.W. Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: Impact of mK(Ca) channels. *Br. J. Anaesth.* **2010**, *105*, 589–595. [[CrossRef](#)]
14. Stroethoff, M.; Bunte, S.; Raupach, A.; van de Snepscheut, M.; Torregroza, C.; Heinen, A.; Mathes, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Sixt, S.U. Impact of Ca(2+)-Sensitive Potassium Channels in Levosimendan-Induced Postconditioning. *Cardiovasc. Drugs* **2019**, *33*, 581–588. [[CrossRef](#)]
15. Kersten, J.R.; Montgomery, M.W.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels. *Anesth. Analg.* **2000**, *90*, 5–11. [[CrossRef](#)]
16. Levin, R.; Degrange, M.; Del Mazo, C.; Tanus, E.; Porcile, R. 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*, 125–130.
17. Papp, Z.; Édes, I.; Fruhwald, S.; De Hert, S.G.; Salmenperä, M.; Leppikangas, H.; Mebazaa, A.; Landoni, G.; Grossini, E.; Caimmi, P.; et al. Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications: Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int. J. Cardiol.* **2012**, *159*, 82–87. [[CrossRef](#)]
18. du Toit, E.F.; Genis, A.; Opie, L.H.; Pollesello, P.; Lochner, A. A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br. J. Pharm.* **2008**, *154*, 41–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bunte, S.; Behmenburg, F.; Bongartz, A.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Heinen, A.; Minol, J.P.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Sixt, S.U. Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca(2+)-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels. *Cardiovasc. Drugs* **2018**, *32*, 427–434. [[CrossRef](#)]
20. Hönisch, A.; Theuring, N.; Ebner, B.; Wagner, C.; Strasser, R.H.; Weinbrenner, C. Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition. *Basic Res. Cardiol.* **2010**, *105*, 155–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Du Toit, E.F.; Muller, C.A.; McCarthy, J.; Opie, L.H. Levosimendan: Effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J. Pharm. Exp.* **1999**, *290*, 505–514.
22. Huhn, R.; Heinen, A.; Weber, N.C.; Hollmann, M.W.; Schlack, W.; Preckel, B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: Cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *Br. J. Anaesth.* **2008**, *100*, 465–471. [[CrossRef](#)]
23. Raphael, J.; Gozal, Y.; Navot, N.; Zuo, Z. Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling. *J. Cardiovasc. Pharm.* **2010**, *55*, 348–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Torregroza, C.; Feige, K.; Schneider, L.; Bunte, S.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1445. [[CrossRef](#)]
25. Baranyai, T.; Nagy, C.T.; Koncsos, G.; Onodi, Z.; Karolyi-Szabo, M.; Makkos, A.; Varga, Z.V.; Ferdinandy, P.; Giricz, Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 151. [[CrossRef](#)]
26. Goergens, J.L.; Heinen, N.M.; Zoller, J.; Preckel, B.; Bauer, I.; Huhn, R.; Ebel, D.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia During Different Phases of Ischemic Preconditioning on Cardioprotection—A Focus on Apoptosis and Aggregation of Granulocytes. *Shock* **2019**. [[CrossRef](#)]
27. Kim, H.S.; Kim, S.Y.; Kwak, Y.L.; Hwang, K.C.; Shim, Y.H. Hyperglycemia attenuates myocardial preconditioning of remifentanyl. *J. Surg. Res.* **2012**, *174*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Penna, C.; Andreadou, I.; Aragno, M.; Beauloye, C.; Bertrand, L.; Lazou, A.; Falcão-Pires, I.; Bell, R.; Zuurbier, C.J.; Pagliaro, P.; et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 5312–5335. [[CrossRef](#)]
29. Matsumoto, S.; Cho, S.; Tosaka, S.; Higashijima, U.; Maekawa, T.; Hara, T.; Sumikawa, K. Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts. *Cardiovasc. Diabetol.* **2012**, *11*, 4. [[CrossRef](#)]
30. Boengler, K.; Lochner, G.; Schulz, R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1215–H1231. [[CrossRef](#)]
31. Lisa, F.D.; Canton, M.; Menabò, R.; Kaludercic, N.; Bernardi, P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* **2007**, *12*, 249–260. [[CrossRef](#)]
32. Di Lisa, F.; Carpi, A.; Giorgio, V.; Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1316–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. The mitochondrial permeability transition pore: Its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2003**, *35*, 339–341. [[CrossRef](#)]

34. Torregroza, C.; Raupach, A.; Feige, K.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1765–1780. [[CrossRef](#)]
35. Kersten, J.R.; Schmeling, T.J.; Orth, K.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, H721–H725. [[CrossRef](#)]
36. Weber, N.C.; Goletz, C.; Huhn, R.; Grueber, Y.; Preckel, B.; Schlack, W.; Ebel, D. Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium: The regulation of different mitogen-activated protein kinases. *Eur. J. Pharm.* **2008**, *592*, 48–54. [[CrossRef](#)]
37. Heusch, G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1477–1486. [[CrossRef](#)]
38. Roth, S.; Torregroza, C.; Huhn, R.; Hollmann, M.W.; Preckel, B. Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1751–1764. [[CrossRef](#)]
39. Kersten, J.R.; Montgomery, M.W.; Ghassemi, T.; Gross, E.R.; Toller, W.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *280*, H1744–H1750. [[CrossRef](#)]
40. Lei, S.; Su, W.; Xia, Z.Y.; Wang, Y.; Zhou, L.; Qiao, S.; Zhao, B.; Xia, Z.; Irwin, M.G. Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress Abrogates Remifentanyl Preconditioning-Mediated Cardioprotection in Diabetic Rats by Impairing Caveolin-3-Modulated PI3K/Akt and JAK2/STAT3 Signaling. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 9836302. [[CrossRef](#)]
41. Tsang, A.; Hausenloy, D.J.; Mocanu, M.M.; Carr, R.D.; Yellon, D.M. Preconditioning the Diabetic Heart: The Importance of Akt Phosphorylation. *Diabetes* **2005**, *54*, 2360–2364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kehl, F.; Krolikowski, J.G.; Mraovic, B.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* **2002**, *96*, 183–188. [[CrossRef](#)]
43. Antila, S.; Sundberg, S.; Lehtonen, L.A. Clinical pharmacology of levosimendan. *Clin. Pharm.* **2007**, *46*, 535–552. [[CrossRef](#)]
44. Harjola, V.-P.; Giannakoulas, G.; von Lewinski, D.; Matskeplishvili, S.; Mebazaa, A.; Papp, Z.; Schwinger, R.H.G.; Pollesello, P.; Parissis, J.T. Use of levosimendan in acute heart failure. *Eur. Heart J. Suppl.* **2018**, *20*, I2–I10. [[CrossRef](#)]
45. Jonsson, E.N.; Antila, S.; McFadyen, L.; Lehtonen, L.; Karlsson, M.O. Population pharmacokinetics of levosimendan in patients with congestive heart failure. *Br. J. Clin. Pharm.* **2003**, *55*, 544–551. [[CrossRef](#)]
46. Craig, T.J.; Ashcroft, F.M.; Proks, P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J. Gen. Physiol.* **2008**, *132*, 131–144. [[CrossRef](#)]
47. Garlid, K.D.; Dos Santos, P.; Xie, Z.-J.; Costa, A.D.T.; Paucek, P. Mitochondrial potassium transport: The role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2003**, *1606*, 1–21. [[CrossRef](#)]
48. Callaghan, M.J.; Ceradini, D.J.; Gurtner, G.C. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 1476–1482. [[CrossRef](#)]
49. Costa, A.D.; Garlid, K.D. Intramitochondrial signaling: Interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H874–H882. [[CrossRef](#)]
50. Kehl, F.; Krolikowski, J.G.; Weihrauch, D.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. N-acetylcysteine restores isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction during hyperglycemia. *Anesthesiology* **2003**, *98*, 1384–1390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nakadate, Y.; Sato, H.; Oguchi, T.; Sato, T.; Kawakami, A.; Ishiyama, T.; Matsukawa, T.; Schricker, T. Glycemia and the cardioprotective effects of insulin pre-conditioning in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 43. [[CrossRef](#)]
52. Davidson, S.M.; Ferdinandy, P.; Andreadou, I.; Bøtker, H.E.; Heusch, G.; Ibáñez, B.; Ovize, M.; Schulz, R.; Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J.; et al. Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2019**, *73*, 89–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Argaud, L.; Gateau-Roesch, O.; Muntean, D.; Chalabreysse, L.; Loufouat, J.; Robert, D.; Ovize, M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *38*, 367–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hausenloy, D.J.; Maddock, H.L.; Baxter, G.F.; Yellon, D.M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: A new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc. Res.* **2002**, *55*, 534–543. [[CrossRef](#)]
55. Watanabe, M.; Okada, T. Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1816*, 107–116. [[CrossRef](#)]
56. Ferrera, R.; Benhabbouche, S.; Bopassa, J.C.; Li, B.; Ovize, M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc. Drugs* **2009**, *23*, 327–331. [[CrossRef](#)]
57. Feige, K.; Rubbert, J.; Raupach, A.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Torregroza, C. Cardioprotective Properties of Mannitol-Involvement of Mitochondrial Potassium Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2395. [[CrossRef](#)]
58. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)]
59. Stroethoff, M.; Goetze, L.; Torregroza, C.; Bunte, S.; Raupach, A.; Heinen, A.; Mathes, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. The Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Induces Cardioprotection that Requires MT2 Receptor Activation and Release of Reactive Oxygen Species. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2020**, *34*, 303–310. [[CrossRef](#)]
60. Raupach, A.; Reinle, J.; Stroethoff, M.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Bunte, S. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 507. [[CrossRef](#)]



Article

# Influence of Hyperglycemia and Diabetes on Cardioprotection by Humoral Factors Released after Remote Ischemic Preconditioning (RIPC)

Carolin Torregroza <sup>1</sup>, Lara Gnaegy <sup>1</sup>, Annika Raupach <sup>1,\*</sup>, Martin Stroethoff <sup>1</sup>, Katharina Feige <sup>1</sup>, André Heinen <sup>2</sup>, Markus W. Hollmann <sup>3</sup> and Ragnar Huhn <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Anesthesiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany; Carolin.Torregroza@med.uni-duesseldorf.de (C.T.); l.gnaegy@gmx.net (L.G.); Martin.Stroethoff@med.uni-duesseldorf.de (M.S.); KatharinaKristina.Feige@med.uni-duesseldorf.de (K.F.); Ragnar.Huhn@med.uni-duesseldorf.de (R.H.)
- <sup>2</sup> Institute of Cardiovascular Physiology, Medical Faculty and University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany; Andre.Heinen@uni-duesseldorf.de
- <sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Amsterdam University Medical Center (AUMC), Location AMC, Meiberdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; M.W.Hollmann@amsterdamumc.nl
- \* Correspondence: Annika.Raupach@med.uni-duesseldorf.de



**Citation:** Torregroza, C.; Gnaegy, L.; Raupach, A.; Stroethoff, M.; Feige, K.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Influence of Hyperglycemia and Diabetes on Cardioprotection by Humoral Factors Released after Remote Ischemic Preconditioning (RIPC). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8880. <https://doi.org/10.3390/ijms22168880>

Academic Editor: Alessandro Di Minno

Received: 20 July 2021

Accepted: 16 August 2021

Published: 18 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Remote ischemic preconditioning (RIPC) protects hearts from ischemia–reperfusion (I/R) injury in experimental studies; however, clinical RIPC trials were unsatisfactory. This discrepancy could be caused by a loss of cardioprotection due to comorbidities in patients, including diabetes mellitus (DM) and hyperglycemia (HG). RIPC is discussed to confer protective properties by release of different humoral factors activating cardioprotective signaling cascades. Therefore, we investigated whether DM type 1 and/or HG (1) inhibit the release of humoral factors after RIPC and/or (2) block the cardioprotective effect directly at the myocardium. Experiments were performed on male Wistar rats. Animals in part 1 of the study were either healthy normoglycemic (NG), type 1 diabetic (DM1), or hyperglycemic (HG). RIPC was implemented by four cycles of 5 min bilateral hind-limb ischemia/reperfusion. Control (Con) animals were not treated. Blood plasma taken in vivo was further investigated in isolated rat hearts in vitro. Plasma from diseased animals (DM1 or HG) was administered onto healthy (NG) hearts for 10 min before 33 min of global ischemia and 60 min of reperfusion. Part 2 of the study was performed vice versa—plasma taken in vivo, with or without RIPC, from healthy rats was transferred to DM1 and HG hearts in vitro. Infarct size was determined by TTC staining. Part 1: RIPC plasma from NG (NG Con:  $49 \pm 8\%$  vs. NG RIPC  $29 \pm 6\%$ ;  $p < 0.05$ ) and DM1 animals (DM1 Con:  $47 \pm 7\%$  vs. DM1 RIPC:  $38 \pm 7\%$ ;  $p < 0.05$ ) reduced infarct size. Interestingly, transfer of HG plasma showed comparable infarct sizes independent of prior treatment (HG Con:  $34 \pm 9\%$  vs. HG RIPC  $35 \pm 9\%$ ; ns). Part 2: No infarct size reduction was detectable when transferring RIPC plasma from healthy rats to DM1 (DM1 Con:  $54 \pm 13\%$  vs. DM1 RIPC  $53 \pm 10\%$ ; ns) or HG hearts (HG Con:  $60 \pm 16\%$  vs. HG RIPC  $53 \pm 14\%$ ; ns). These results suggest that: (1) RIPC under NG and DM1 induces the release of humoral factors with cardioprotective impact, (2) HG plasma might own cardioprotective properties, and (3) RIPC does not confer cardioprotection in DM1 and HG myocardium.

**Keywords:** diabetes mellitus; humoral factor; hyperglycemia; myocardial infarction; remote ischemic preconditioning

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is one of the main comorbidities associated with cardiovascular diseases and occurrence of myocardial infarction [1]. In 2019, up to 463 million people

worldwide were suffering from a diabetic condition and its deleterious consequences [2]. Besides a higher overall mortality in these patients [3], diabetes mellitus, along with acute hyperglycemia, is considered an independent risk factor for the development of myocardial infarction and ischemic heart disease. Further, patients with diabetes mellitus are also more likely to suffer from major perioperative adverse cardiac events compared to the nondiabetic population [4]. Interestingly, hyperglycemia seems to be more than just an accompanying bystander of diabetic conditions [5]. Elevated blood glucose levels are not only present in patients with diagnosed diabetes or chronic metabolic syndrome [6]; they also frequently appear in nondiabetic individuals as a metabolic response to stress conditions, such as the perioperative setting [5]. Furthermore, hyperglycemia has been shown to directly correlate with increased morbidity and mortality in patients, independent of a pre-existing diabetic disease [7]. Due to a rising incidence of patients suffering from diabetes mellitus and hyperglycemia, an increase in the occurrence of myocardial infarction and ischemic heart disease is to be expected.

Coronary revascularization after myocardial infarction, along with resupply of oxygen to the myocardium, is crucial for patient survival. Paradoxically, during reperfusion, a cascade of complex cellular processes is triggered by restored blood supply, including electrolyte shift, as well as release of intracellular enzymes and proapoptotic factors, resulting in cardiomyocyte damage and death [8]. This phenomenon of myocardial damage due to restored coronary perfusion is called ischemia/reperfusion (I/R) injury and accounts for up to 50% of the final infarct size [9]. Hence, I/R injury is one major aspect for poor outcome in patients suffering from myocardial infarction. Unfortunately, the challenge in protecting the heart against I/R injury in the clinical setting has, as yet, failed to be resolved.

Given the poor prognosis of these patients and the overall burden to the global health system, developing new treatment strategies to improve survival after myocardial infarction is of paramount importance. A noninvasive and clinically practical technique is the concept of remote ischemic preconditioning (RIPC) [10]. Transient ischemia of remote organs or tissues—such as hind-limb ischemia via blood pressure cuffs—confers cardioprotective properties against I/R injury. Release of humoral factors into the bloodstream targeting known myocardial signaling cascades, such as reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway, is believed to induce cardioprotection by RIPC [11]. While the infarct size reducing effect of RIPC has been demonstrated in numerous experimental studies, translation into the clinical setting remains unsatisfactory [12]. Few studies have shown potential benefits of RIPC [13]; however, recent large multicenter trials were unable to detect any improvement in patient outcome after RIPC maneuver [14,15]. A clear rationale for this discrepancy has not been determined conclusively, but confounding factors, such as comedication, anesthetic regimen, age, or comorbidities of respective patients, are discussed [12]. As the patient population in clinical trials usually presents a vast heterogeneity, protective effects of RIPC for certain patient groups could be masked by loss of cardioprotection from another cohort. Hence, identifying those patients possibly benefitting from RIPC maneuver should be of particular concern. Referring to diabetes mellitus and hyperglycemia, both experimental and clinical studies have indicated a loss of cardioprotection by ischemic [16] and pharmacological [17] stimuli under these conditions.

A possible loss of protection by RIPC under confounding factors, such as diabetes mellitus or hyperglycemia, could be caused by impairment—release or transfer—of humoral factors. Another alternative is structural changes of the diseased myocardium itself under diabetic or hyperglycemic conditions, resulting in blocked effectiveness of RIPC.

Therefore, we returned from bed to bedside to determine whether diabetic or hyperglycemic conditions negatively influence cardioprotection by RIPC. Our primary aim was to investigate whether the loss of protective properties results from the diseased myocardium itself or due to an impaired release of humoral factors. In order to differentiate between the influence on humoral factors and the myocardium, we employed a translational approach, transferring plasma taken in vivo onto isolated hearts in vitro.

## 2. Results

### 2.1. Animal Characteristics and Glucose Values

For each part of the study, no differences in characteristics were shown between control (Con) and RIPC animals within each group (Table 1, Tables S1 and S2, see Supplementary Materials). Blood glucose values were measured immediately before plasma sampling in vivo after RIPC or Con treatment. Healthy, normoglycemic (NG) animals included in this study had glucose values of  $124 \pm 14$  mg/dL for Con and  $123 \pm 31$  mg/dL for RIPC, respectively. Diabetes mellitus type 1 (DM1) animals in part 1 and 2 of the study had hyperglycemic blood glucose levels (part 1: DM1 Con  $540 \pm 58$  mg/dL vs. DM1 RIPC  $447 \pm 66$  mg/dL, ns) and (part 2: DM1 Con  $495 \pm 87$  mg/dL vs. DM1 RIPC  $481 \pm 82$  mg/dL, ns), respectively. For all DM1 animals, hyperglycemia was achieved one week after streptozotocin application and remained stable throughout the following 3 weeks. Referring to hyperglycemia (HG) groups, glucose levels showed no difference between Con and RIPC groups before plasma sampling in vivo (HG Con  $543 \pm 69$  mg/dL vs. HG RIPC  $531 \pm 63$  mg/dL, ns), or between Con and RIPC groups during in vitro experiments taken from coronary effluent (HG Con  $433 \pm 13$  mg/dL vs. HG RIPC  $442 \pm 35$  mg/dL, ns). Con HG animals had significantly higher glucose values than DM1 RIPC animals (HG Con  $543 \pm 69$  mg/dL vs. DM1 RIPC  $447$  mg/dL,  $p = 0.0371$ ). However, comparing RIPC and Con animals between HG and DM1 groups, no statistical differences were detected (HG RIPC  $531 \pm 63$  vs. DM1 RIPC  $447 \pm 66$ , and HG Con  $543 \pm 69$  vs. DM1 Con  $540 \pm 58$ , both ns.).

**Table 1.** Weights and ischemic contracture.

		n	Body Weight (g)	Heart Weight Wet (g)	Heart Weight Dry (g)	Time of Max. Ischemic Contracture (min)	Level of Max. Ischemic Contracture (mmHg)
Part 1—plasma transfer diseased → healthy							
NG	Con	9	$288 \pm 16$	$1.25 \pm 0.11$	$0.10 \pm 0.02$	$15 \pm 2$	$77 \pm 11$
	RIPC	7	$285 \pm 21$	$1.22 \pm 0.09$	$0.09 \pm 0.02$	$15 \pm 1$	$73 \pm 13$
HG	Con	7	$300 \pm 20$	$1.26 \pm 0.07$	$0.10 \pm 0.01$	$16 \pm 2$	$62 \pm 13$
	RIPC	8	$299 \pm 21$	$1.26 \pm 0.10$	$0.09 \pm 0.01$	$14 \pm 1$	$74 \pm 11$
DM1	Con	7	$288 \pm 20$	$1.22 \pm 0.11$	$0.10 \pm 0.01$	$15 \pm 2$	$73 \pm 11$
	RIPC	8	$281 \pm 13$	$1.21 \pm 0.04$	$0.10 \pm 0.01$	$16 \pm 3$	$66 \pm 14$
Part 2—plasma transfer healthy → diseased							
HG	Con	8	$283 \pm 15$	$1.25 \pm 0.07$	$0.11 \pm 0.01$	$17 \pm 1$	$99 \pm 12$
	RIPC	9	$290 \pm 15$	$1.25 \pm 0.08$	$0.11 \pm 0.01$	$19 \pm 2$	$96 \pm 15$
DM1	Con	8	$257 \pm 39$	$1.15 \pm 0.13$	$0.10 \pm 0.01$	$20 \pm 3$	$77 \pm 9$
	RIPC	8	$246 \pm 28$	$1.14 \pm 0.14$	$0.10 \pm 0.01$	$20 \pm 2$	$74 \pm 11$

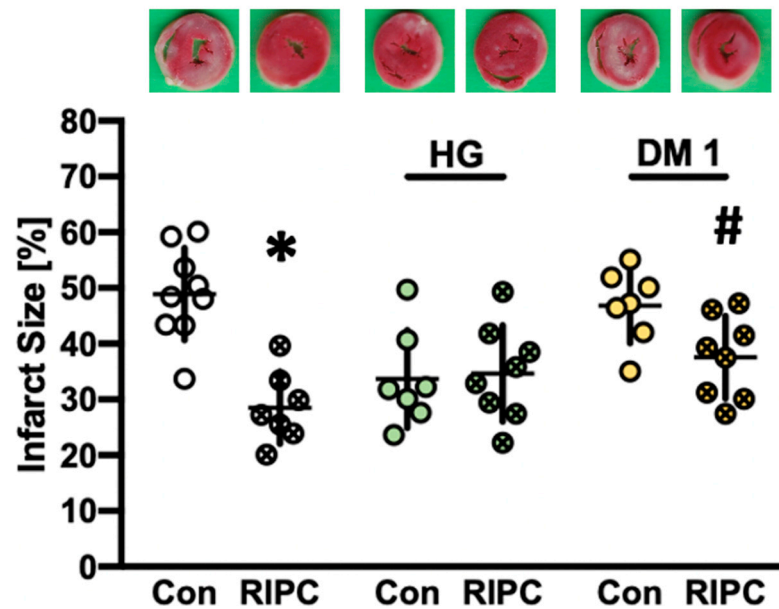
Data are mean  $\pm$  SD, Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; NG = normoglycemia; HG = hyperglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1.

For both part 1 and 2, a total of 100 animals were included in in vitro experiments. Hearts of 21 animals were excluded from statistical analysis due to not meeting required hemodynamic baseline values. As plasma from one in vivo animal was only used for one in vitro experiment, 100 animals were included in the in vivo protocol and plasma sampling. Mortality rate for these experiments was 7%, which was caused by difficulties in intubation and cannulation of the jugular vein and/or carotid artery.

### 2.2. Infarct Size Measurements

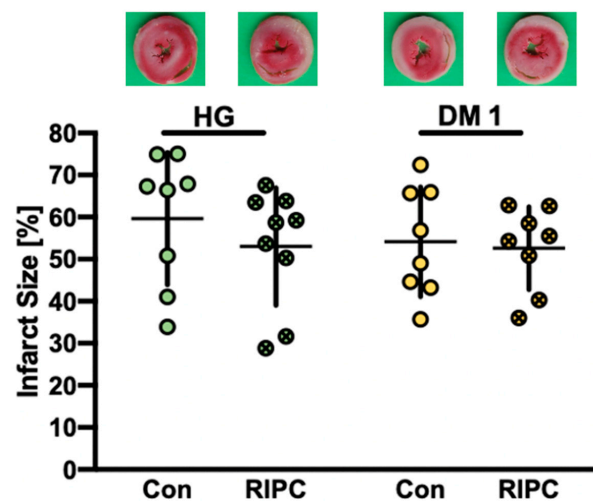
The infarct sizes from part 1 are shown in Figure 1. Preconditioning with plasma from normoglycemic RIPC animals significantly reduced infarct size in healthy hearts compared to plasma from animals without RIPC treatment (NG RIPC:  $29 \pm 6\%$  vs. NG Con:  $49 \pm 8\%$ ,

$p < 0.0001$ ). Furthermore, transfer of RIPC plasma from diabetic hearts (DM1) onto naïve hearts also induced a significant infarct size reduction (DM1 RIPC:  $38 \pm 7\%$  vs. DM1 Con:  $47 \pm 7\%$ ,  $p = 0.025$ ). Interestingly, hearts treated with plasma from hyperglycemic (HG) animals showed infarct sizes similar to known protective stimuli. However, this effect could not be enhanced further by additional RIPC treatment (HG Con:  $34 \pm 9\%$  vs. HG RIPC:  $35 \pm 9\%$ , ns.).



**Figure 1.** Infarct size measurement of part 1, including representative photos of each group. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; HG = hyperglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1. Data are presented as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.0001$  vs. Con, #  $p = 0.025$  vs. DM1 Con.

Results from part 2 infarct size measurements are displayed in Figure 2. Plasma taken from normoglycemic animals with (NG RIPC) or without RIPC (NG Con) treatment had no impact on infarct size in HG hearts (HG Con:  $60 \pm 16\%$  vs. HG RIPC:  $53 \pm 14\%$ , ns) or DM1 (DM1 Con:  $54 \pm 13\%$  vs. DM1 RIPC:  $53 \pm 10\%$ , ns).



**Figure 2.** Infarct size measurement of part 2, including representative photos of each group. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; HG = hyperglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

### 2.3. Cardiac Function

Hemodynamic data from part 1 and part 2 are demonstrated in Tables 2 and 3, respectively. There were no statistical differences measured between groups at baseline and during ischemia or reperfusion. LVDP and coronary flow significantly decreased during reperfusion compared to baseline within each group. For all in vivo experiments of the study, hemodynamic data demonstrated no significant differences between groups.

**Table 2.** Hemodynamic variables from part 1 (plasma transfer diseased → healthy).

		Baseline	PC	Reperfusion	
				33 min	60 min
Heart Rate (bpm)					
NG	Con	312 ± 37	286 ± 46	205 ± 69	227 ± 75
	RIPC	301 ± 56	269 ± 52	265 ± 55	244 ± 51
HG	Con	288 ± 25	257 ± 36	224 ± 51	272 ± 34
	RIPC	303 ± 30	278 ± 39	229 ± 74	220 ± 72
DM1	Con	315 ± 28	311 ± 36	302 ± 55	236 ± 64
	RIPC	310 ± 23	274 ± 53	256 ± 52	229 ± 59
Left Ventricular Developed Pressure (mmHg)					
NG	Con	143 ± 15	132 ± 24	22 ± 12 *	28 ± 7 *
	RIPC	152 ± 20	132 ± 27 *	45 ± 9 *	46 ± 20 *
HG	Con	141 ± 22	123 ± 35	27 ± 13 *	34 ± 13 *
	RIPC	142 ± 18	135 ± 19	25 ± 11 *	34 ± 9 *
DM1	Con	146 ± 29	131 ± 25	17 ± 5 *	27 ± 11 *
	RIPC	132 ± 32	119 ± 32	31 ± 12 *	40 ± 12 *
Coronary Flow (ml/min)					
NG	Con	16 ± 3	14 ± 5	7 ± 3 *	6 ± 2 *
	RIPC	14 ± 3	11 ± 3 *	9 ± 3 *	7 ± 3 *
HG	Con	18 ± 3	13 ± 4 *	9 ± 1 *	7 ± 1 *
	RIPC	17 ± 5	16 ± 5	8 ± 3 *	7 ± 2 *
DM1	Con	15 ± 4	13 ± 3	7 ± 2 *	6 ± 2 *
	RIPC	13 ± 3	10 ± 2 *	7 ± 1 *	7 ± 2 *

Data are mean ± SD. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; NG = normoglycemia; HG = hyperglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1; PC = preconditioning. \*  $p < 0.05$  versus baseline.

**Table 3.** Hemodynamic variables from part 2 (plasma transfer healthy → diseased).

		Baseline	PC	Reperfusion	
				33 min	60 min
Heart Rate (bpm)					
HG	Con	324 ± 24	283 ± 34	267 ± 96	255 ± 92
	RIPC	280 ± 16	267 ± 22	249 ± 71	223 ± 47
DM1	Con	258 ± 40	230 ± 28	238 ± 62	222 ± 39
	RIPC	253 ± 30	236 ± 22	224 ± 44	221 ± 52
Left Ventricular Developed Pressure (mmHg)					
HG	Con	122 ± 34	94 ± 20	31 ± 12 *	35 ± 12 *
	RIPC	127 ± 30	110 ± 21	40 ± 11 *	48 ± 11 *
DM1	Con	131 ± 20	114 ± 18	34 ± 7 *	36 ± 20 *
	RIPC	116 ± 28	106 ± 29	39 ± 9 *	40 ± 8 *
Coronary Flow (ml/min)					
HG	Con	13 ± 3	10 ± 2	5 ± 1 *	5 ± 1 *
	RIPC	11 ± 3	10 ± 1	6 ± 2 *	6 ± 2 *
DM1	Con	11 ± 2	8 ± 2	7 ± 2 *	7 ± 2 *
	RIPC	10 ± 2	8 ± 2	6 ± 1 *	6 ± 1 *

Data are mean ± SD. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; HG = hyperglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1; PC = preconditioning. \*  $p < 0.05$  versus baseline.

### 3. Discussion

The main findings of our current study demonstrate that (1) RIPC leads to the release of humoral factors under normoglycemia and DM1 that confer cardioprotection in healthy hearts, (2) hyperglycemic plasma possibly contains cardioprotective properties, and (3) infarct-size-reducing effects of RIPC are completely abolished in DM1 and HG myocardium.

Comorbidities, specifically diabetes mellitus alongside hyperglycemia, have been discussed extensively as a main factor interfering with beneficial cardioprotective effects by RIPC in clinical trials. Previous experimental studies have shown that diabetes—both type 1 and 2—and hyperglycemia lead to a loss of cardioprotection by several ischemic [18,19] and pharmacological [20] conditioning strategies. These findings were also supported in clinical studies, where beneficial effects of ischemic preconditioning were fully abolished in patients suffering from diabetes [17]. Referring to cardioprotection by ischemic conditioning strategies and comorbidities, experimental studies have detected a negative influence of diabetes and hyperglycemia on different myocardial signaling pathways [18]. Ischemic preconditioning (IPC) is blocked by diabetes mellitus through activation of glycogen synthase kinase 3-beta (GSK3 $\beta$ ), which is also a critical mediator for several pharmacological agents conferring cardioprotection [21]. Extensive evidence implicates that inhibition of GSK3 $\beta$  by different protein kinases is needed for suppression of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and, thus, protection against I/R injury [22]. Acute hyperglycemia inhibits phosphorylation of protein kinase B (Akt) as part of the cardioprotective signaling pathway, and thus abolishes infarct size reduction by IPC [23]. Furthermore, dysfunction of mitochondrial adenosine-triphosphate-dependent potassium (mK<sub>ATP</sub>) channels due to increased ATP levels under hyperglycemic conditions has been implied to block protective effects of IPC under diabetes [24].

However, ischemic conditioning stimuli are applied directly at the heart, while RIPC depends on humoral factors released after a stimulus at a remote organ or tissue. Thus, when addressing potential influencing factors on cardioprotection by RIPC, a distinction must be made between an impact on signaling cascades in the myocardium itself and release or transfer of protective stimuli to the heart. To this day, detailed information on the potential impact of comorbidities on RIPC is lacking. Baranyai et al. [25] demonstrated that acute hyperglycemia, independent of a preceding diabetes, abolished infarct size reduction by remote ischemic per-conditioning (RIPerC). Increased oxidative stress, as well as activation of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway—a main regulator of cardiac autophagy—were involved in hyperglycemia-induced loss of RIPerC. To our knowledge, our study is the first to investigate the influence of diabetes and hyperglycemia on the release of humoral factors by RIPC, as well as demonstrate a clear distinction between diseased myocardium and protective factors. Next to comorbidities, the anesthetic regimen—specifically propofol—has been discussed to block cardioprotection in clinical trials. Bunte et al. [26] showed that propofol had no influence on cardiac signaling but inhibited the release or transfer of humoral factors after RIPC. These findings, which are contrary to results on comorbidities and RIPC in our current study, underline the differential impact of the various possible confounding factors on cardioprotection. Results from our study match those from an *in vivo* animal study on humoral factors after RIPC by Pickard et al. [27]. The authors demonstrated that an intact afferent nerve system is needed for the release of protective factors by RIPC. This is further underlined in a clinical trial on diabetic neuropathy and RIPC, demonstrating that cardioprotection by released humoral factors after RIPC is only achieved with preserved neuronal pathways in patients suffering from diabetes mellitus [28].

While the results from our study demonstrate that humoral factor release is independent of diabetes mellitus and hyperglycemia but cardioprotection by RIPC is blocked in diseased myocardium, no conclusive statement on underlying mechanisms of this effect can be made. As mentioned above, several studies have demonstrated altered mechanisms under diabetes and hyperglycemia, including an increase in reactive oxygen species, decreased nitric oxide availability [29,30], and impaired mitochondrial function [31]—

especially referring to mPTP regulation. Further, various protein kinases critically involved in cardioprotective signaling (phosphatidylinositol-3-kinase, protein kinase C, mitogen-activated protein kinases and Akt) are influenced by hyperglycemia in the progression of diabetes mellitus [32]. All these elements are integral players in cardioprotection by RIPC in healthy hearts [33]. Thus, it seems obvious that infarct size reduction by RIPC is abolished in diseased myocardium due to alteration of these mechanisms under diabetes and hyperglycemia. However, further research is needed investigating this topic in more detail.

Interestingly, our findings show that plasma taken from hyperglycemic animals might contain protective factors conveying cardioprotective effects. Healthy hearts subjected to I/R injury after treatment with plasma from hyperglycemic animals showed infarct sizes comparable to known protective stimuli [34]. Notably, this effect could not be intensified by applying hyperglycemic plasma from animals treated with RIPC. This suggests that acute hyperglycemia itself possibly leads to the release of protective factors into the blood, completely independent of an additional conditioning strategy. Increased insulin plasma levels in hyperglycemic animals might be a possible explanation. Previous studies have shown that elevated glucose levels lead to an enhanced secretion of insulin in animals [35] and humans [36]. It could be assumed that induction of acute hyperglycemia with a glucose bolus, as in our experimental *in vivo* setup, resulted in an insulin response, with elevated levels at the time of plasma collection. Application of insulin as a conditioning strategy has been shown to induce cardioprotection *in vitro* and *in vivo* by triggering myocardial signaling cascades [37]. In particular, a glucose–insulin–potassium (GIK) infusion has been advocated and routinely used in cardiac patients to protect against myocardial I/R injury. In 2011, a meta-analysis including 2113 patients showed that patients undergoing cardiac surgery had a significantly lower incidence of perioperative myocardial infarction when receiving GIK compared to the control [38]. Further GIK improved postoperative cardiac index and reduced length of ICU stay in respective patients. Interestingly, in a subgroup analysis on diabetic patients, results demonstrated that GIK without glucose control had no beneficial effects on the above-mentioned endpoints. In contrast, in nondiabetic patients, cardioprotective effects of GIK were completely independent of glucose control [38]. In line with these findings, Marfella et al. [39] analyzed the effects of tight glycaemic control in relation with GIK on regenerative potential in ischemic myocardium. Results demonstrated improved regenerative potential in patients with tight glycaemic control by insulin treatment, while GIK alone had no beneficial effects. Authors concluded that the cardioprotective effects of insulin might be abrogated by hyperglycemia [39]. As patients included in the treatment groups had diagnosed diabetes and/or diabetic HbA1c levels (8% or higher) [39], findings from Marfella and colleagues further strengthen the hypothesis that optimal glucose management—possibly independent of treatment regimens—is crucial to achieve myocardial protection in diabetic patients [40]. Results from our study are in line with the above-mentioned divergent findings on nondiabetic and diabetic patients. We demonstrated that application of hyperglycemic plasma, possibly containing increased insulin levels, induced significant infarct size reduction when transferred onto healthy (nondiabetic and nonhyperglycemic) hearts. In part 2, no protective effects by transfer of RIPC plasma were detected in diseased (hyperglycemic and/or diabetic) animals, which supports the presumption that hyperglycemia abrogates cardioprotective effects. However, we did not examine whether plasma from hyperglycemic animals transferred onto diseased hearts is able to exert myocardial infarction. Further research is needed to evaluate the influence of hyperglycemic control and insulin levels in the context of plasma transfer and cardioprotection.

There are a few limitations of our study that need to be addressed. While acute hyperglycemia irrespective of a pre-existing diabetic disease—as investigated in our experimental setup—can be found in patients undergoing cardiac surgery, sudden induction of diabetes mellitus by streptozotocin does not fully represent the physiological scenario in humans. In the clinical setting, a prolonged onset and different stages are characteristic for

diabetes mellitus [18]. We mainly focused on type 1 diabetes, meaning a total loss of insulin due to destruction of pancreatic  $\beta$ -cells by streptozotocin [41]. Patients in the focus of cardioprotective strategies more commonly suffer from type 2 diabetes mellitus, characterized by insulin resistance. However, with progression of the disease, these patients also often develop insulin deficiency. Interestingly, changes in metabolism caused by high glucose levels and, hence, altered signaling mediators are similar in both types of diabetes mellitus [32]. Previous studies have shown that variations in diet and types of fat can interfere with the diabetic pathology [42]. Employing our experimental setup, we ensured that focus is placed on the hyperglycemic or diabetic condition itself, independent of influencing factors caused by a prolonged disease progression, diet, or a panoply of additional cardiovascular risk factors in diabetic animals [18]. Another limitation is the lack of insulin measurements after plasma sampling. Thus, while elevated insulin levels could be a possible explanation for cardioprotective properties of plasma from hyperglycemic animals, at this point, we can only speculate on this aspect, and further research is needed. Finally, when addressing the translation of results from experimental studies on cardioprotection into clinical trials, one main difference with our setup and most animal models needs to be considered. Patients with diabetes mellitus often suffer from a multitude of comorbidities, such as hypertension or dyslipidemia, known to be cardiovascular risk factors [43]. Therefore, previous studies [44] and reviews [45–47] have discussed a multifactorial therapy approach to achieve cardioprotection and improve outcome in patients suffering from myocardial infarction. This current study was designed to focus on one of the main comorbidities as a first step in further investigating diabetes in the context of cardioprotection without the influence and interaction of other diseases. However, future experimental studies should place focus on cardioprotective strategies in animals suffering from different comorbidities for better translation into clinical practice.

#### 4. Materials and Methods

The study was approved by the local animal care and use committees (in vivo: North Rhine-Westphalia Office of Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV), Germany, reference number: 84-02.04. 2015. A514; in vitro: Heinrich Heine University Duesseldorf, Germany, reference number: O27/12). Investigations were conducted according to the ‘Guide for the Care and Use of Laboratory Animals’ published by the U.S. National Institute of Health [48]. All experiments, in vivo plasma sampling and in vitro Langendorff model, were performed on 2–3-month-old male Wistar rats, obtained from the breeding facility at the Central Animal Research Facility of the Heinrich Heine University Duesseldorf. Animals were housed in the Central Animal Research Facility of the Heinrich Heine University Duesseldorf and kept with access to water and standard laboratory chow ad libitum at a 12 h light/dark cycle. In vivo and in vitro experiments were started after a 7-day acclimatization period for each animal.

The experimental study is comprised of two main parts. Both parts included in vivo experiments and plasma sampling prior to in vitro experiments in isolated hearts (Langendorff model). Part 1 was designed to unravel the influence of diseased conditions, such as diabetes mellitus (DM) and hyperglycemia (HG), on humoral factor release after RIPC. In part 2, we investigated the impact of diseased myocardium itself on RIPC treatment. Animals included in this study were randomly assigned to the respective study groups in part 1 and 2.

##### 4.1. In Vivo Experiments and Plasma Sampling

###### 4.1.1. Surgical Preparation and RIPC Protocol

Surgical preparation was performed as previously described in detail [49]. Animals were not fasted before anesthesia to rule out a possible influence of intermittent fasting on cardioprotection [50,51]. General anesthesia was induced in all animals by intraperitoneal (i.p.) injection of 80 mg/kg bodyweight pentobarbital (Narcoren, Merial, Germany). Rats were placed in supine position onto a heating plate for the surgical procedure. The body

temperature was monitored throughout the whole experiments using a rectal probe for rodents. Animals were intubated by ventral cervical incision, preparation of the trachea, and placement of a 16-gauge endotracheal catheter for ventilation. Mechanical ventilation (85 bpm, 2.5 mL TV, 30% oxygen/70% nitrogen) was maintained throughout the in vivo experiment and monitored by blood gas analysis (BGA). Continuous application of pentobarbital (40 mg/kg bodyweight/h) was used for general anesthesia. After successful intubation, both the right carotid artery and the left jugular vein were cannulated for hemodynamic measurements (arterial line) and application of glucose, saline and/or pentobarbital infusion (central venous line).

For implementation of RIPC maneuver, modified blood pressure cuffs were placed around both hind limbs. RIPC was induced by 4 cycles of 5 min bilateral hind-limb ischemia—via inflating blood pressure cuffs to 200 mmHg—alternating with 5 min of reperfusion. Control animals received the same surgical preparation and treatment, but without inflation of blood pressure cuffs. Sufficient induction of ischemia was verified by occurrence of visual limb cyanosis. In contrast, deflation of pressure cuffs immediately led to visual reperfusion as seen by returning of the limb to normal (preischemic) skin color. Five minutes after final reperfusion, a total of 10 mL arterial blood was collected, centrifugated for plasma separation, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further use in vitro.

#### 4.1.2. Induction of DM1 and HG

Diabetes mellitus type 1 was induced in healthy male Wistar rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg) 21 days prior to in vivo experiments [52,53]. Streptozotocin was dissolved in 50 mM sodium citrate buffer, combined with citric acid to ensure pH levels of 4.5 [54]. Control animals were treated with intraperitoneal injection of sodium citrate buffer as vehicle. Weekly controls of blood sugar levels were performed in all animals using the Accu-Check Aviva (Roche). Streptozotocin-induced DM1 is a well-established pharmacological protocol in rats, which has been shown to selectively destroy pancreatic  $\beta$ -cells, leading to glucotoxicity and insulin deficiency [52,53]. Animals develop severe DM1, with blood glucose levels between 250 and 600 mg/dL as early as 24–72 h after injection [41]. In our study, successful induction of diabetes was confirmed by the presence of glucose values above 300 mg/dL.

Hyperglycemia was induced during in vivo experiments by intravenous administration of 40% glucose solution via cannulation of the jugular vein. Perfusion with glucose solution was started 5 min before the RIPC maneuver in healthy male Wistar rats under general anesthesia. After an initial bolus of 0.5 mL G40, a continuous perfusion of 1.5–3.5 mL/h G40 was applied during the experiment. Blood glucose levels were determined before RIPC, as well as throughout the whole in vivo experiments, and perfusion rate was adjusted accordingly to ensure hyperglycemia with glucose values above 300 mg/dL.

### 4.2. In Vitro Experiments and Plasma Transfer

#### 4.2.1. Surgical Preparation

Hearts from healthy or diseased male Wistar rats were randomly assigned to one of the experimental groups in part 1 or 2 of the study. The procedure was carried out as described previously [55]. Animals were anesthetized by i.p. injection of pentobarbital (Narcoren, Merial, Germany) (80 mg/kg body weight). Subsequent to decapitation, hearts were excised via thoracotomy and placed onto a Langendorff System under constant pressure (80 mmHg) and temperature ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Pressure-controlled perfusion was achieved with Krebs–Henseleit buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.17 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 24.9 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.52 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11 mM glucose, and 1 mM lactate), enriched with a mix of 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . For continuous hemodynamic measurements, a saline-filled balloon was inserted into the left ventricle with a set end-diastolic pressure of 4–6 mmHg. All measurements were digitized at a sampling rate of 500 Hz (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) and recorded using Labchart 8.0 for Windows (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Hemodynamic data included heart rate, left ventricular

end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and left ventricular developed pressure (LVDP) (calculated as LVESP-LVEDP). For additional reference of myocardial damage, maximal contracture during ischemia, as well as the respective time point, was analyzed for each experiment. Next to hemodynamic data, coronary flow and glucose levels were measured throughout the experiments. Coronary flow was measured by collecting perfusate effluent for one minute each (expressed as milliliter per minute).

After 60 min of reperfusion, hearts were collected and cut into 8 transverse 2 mm slices per heart for subsequent staining with 0.75% triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution. A blinded, experienced investigator [56] determined the size of the infarcted area by planimetry using SigmaScan Pro5 software (Version 5.0.0). Infarct size is expressed as percentage of infarct area per total area of the left ventricle.

#### 4.2.2. Langendorff Protocol

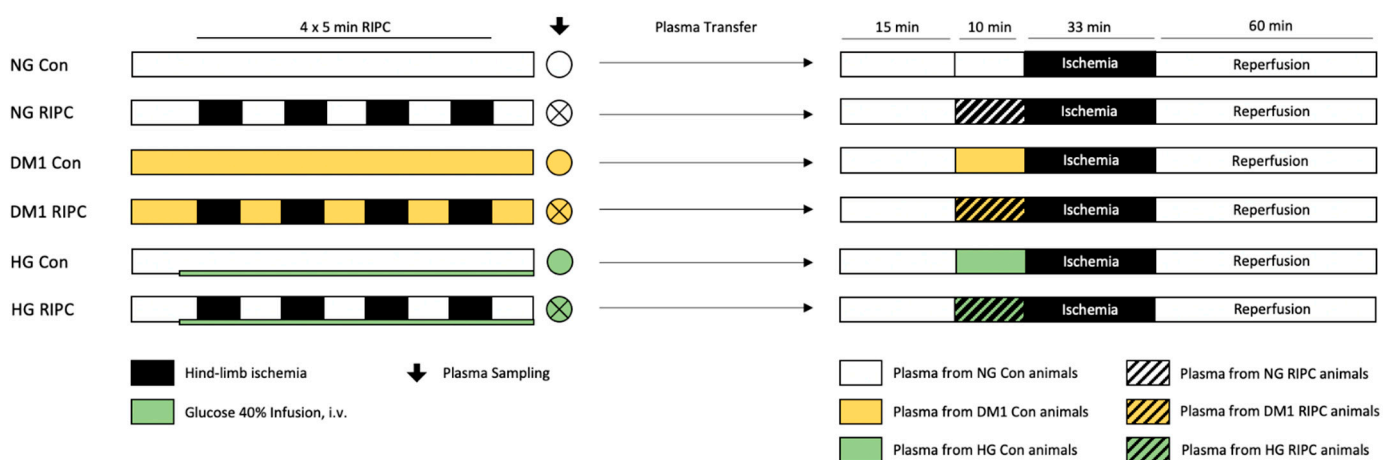
All hearts underwent 15 min of adaption period, 33 min of global ischemia, followed by 60 min of reperfusion. Preconditioning (PC) was achieved by administration of undiluted plasma via a syringe pump (Perfusor Space, B. Braun, Melsungen, Germany) at an infusion rate of 1% of the coronary flow. Plasma was not dissolved but applied in pure form over 10 min, before induction of global ischemia.

#### 4.2.3. Induction of HG

Acute hyperglycemia in hearts included in part 2 was induced by administration of an additional 11 mM glucose solution during the *in vitro* protocol. Perfusion with glucose was started five minutes prior to preconditioning and stopped with the onset of global ischemia. By combining this solution and perfusion with Krebs–Henseleit buffer (already consisting of 11 mM glucose), a total of 22 mM glucose concentration was achieved at the heart. Ensuring hyperglycemic conditions, glucose levels (mg/dL) were determined in collected effluent continuously throughout each experiment using a blood gas analyzer (ABL800Flex Plus, Radiometer, Krefeld Germany). The employed protocol was taken from a previous own study, ensuring hyperglycemia with glucose values above 300 mg/dL [34].

#### 4.2.4. Part 1: “Release of Humoral Factors”—Plasma Transfer: Diseased → Healthy

Plasma sampled from normoglycemic (NG) or diseased (DM1 or HG) animals—with or without prior RIPC treatment *in vivo*—was transferred onto naïve hearts from healthy, male Wistar rats, as shown in Figure 3.



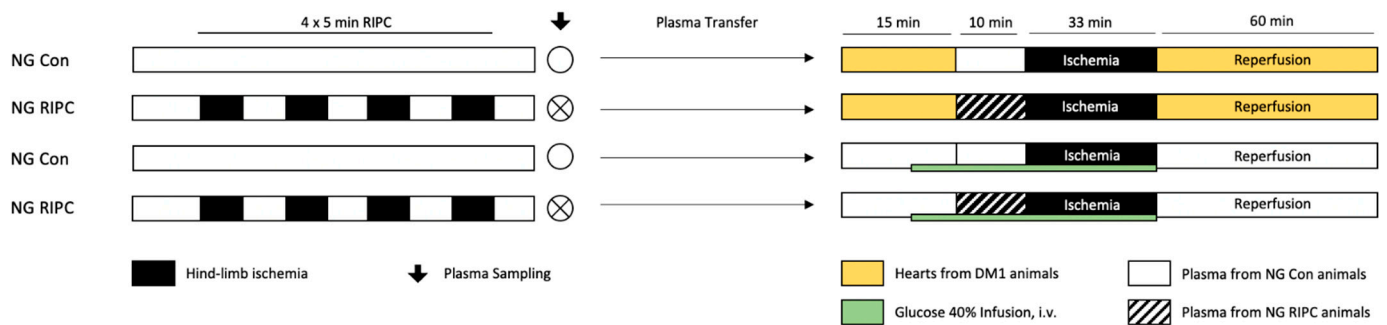
**Figure 3.** Experimental protocol part 1. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; NG = normoglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1; HG = hyperglycemia.

**Control (Con):** Hearts were perfused with plasma collected *in vivo* from NG, DM1, or HG animals without RIPC treatment.

**Remote ischemic preconditioning (RIPC):** Hearts received plasma collected in vivo from normoglycemic (NG), DM1, or HG animals that underwent RIPC treatment.

#### 4.2.5. Part 2: “Influence of Diseased Myocardium”—Plasma Transfer: Healthy → Diseased

Plasma from healthy normoglycemic animals was collected in vivo with (RIPC) or without (Con) RIPC treatment and transferred onto diseased hearts (DM1 or HG) from male Wistar rats (Figure 4).



**Figure 4.** Experimental protocol part 2. Con = control; RIPC = remote ischemic preconditioning; NG = normoglycemia; DM1 = diabetes mellitus type 1; HG = hyperglycemia.

**Control (Con):** Plasma collected from normoglycemic in vivo Con animals was administered onto hearts from DM1 or HG rats.

**Remote ischemic preconditioning (RIPC):** Plasma collected from normoglycemic in vivo RIPC animals was administered onto hearts from DM1 or HG rats.

#### 4.3. Statistical Analysis

The primary endpoint of our study was infarct size determination. Plasma taken from one animal in vivo was employed for one in vitro experiment, respectively. Therefore, the group size in the in vivo part generates from sample size calculation of infarct size determination in vitro. Detecting a 25% mean difference and a standard deviation of 16% in infarct size (power 80%,  $\alpha < 0.05$  (two-tailed)), a group size of  $n = 8$  was revealed by sample size calculation (GraphPad StatMate™, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for each part of the study. Infarct size was analyzed by Student’s *t*-test. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test (GraphPad Software V7.01, San Diego, CA, USA) were performed for comparison of hemodynamic data between groups, as well as between different time points within groups. Baseline values were taken as a reference time point. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and changes are considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

Taken together, our results suggest that the blockade of cardioprotection by comorbidities, such as DM1 and hyperglycemia, is caused by elements in the diseased myocardium itself, while these comorbidities seem to have no effect on the release of humoral factors after RIPC. These findings are of high importance in overcoming critical translation of conditioning strategies into the clinical setting in light of comorbidities. Further studies need to place a focus on clarifying blocked signaling cascades in diseased myocardium under diabetic and hyperglycemic conditions, as humoral factor release after RIPC is still effective under these comorbidities.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22168880/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.T., A.R. and R.H.; methodology, L.G., A.R. and M.S.; formal analysis, K.F. and R.H.; investigation, L.G. and A.R.; writing—original draft preparation, C.T.

and R.H.; writing—review and editing, A.H. and M.W.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by a research grant from the European Association of Cardiothoracic Anaesthesiology and Intensive Care (EACTAIC).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and investigations were approved by the local animal care and use committees (in vivo: North Rhine-Westphalia Office of Nature, Environment and Consumer Protection (LANUV), Germany, reference number: 84-02.04. 2015. A514; in vitro: Heinrich Heine University Duesseldorf, Germany, reference number: O27/12).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** In partial fulfillment of the requirements for a DVM thesis of L. Gnaegy.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Buddeke, J.; Bots, M.L.; van Dis, I.; Visseren, F.L.; Hollander, M.; Schellevis, F.G.; Vaartjes, I. Comorbidity in patients with cardiovascular disease in primary care: A cohort study with routine healthcare data. *Br. J. Gen. Pract.* **2019**, *69*, e398–e406. [[CrossRef](#)]
- Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *157*, 107843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jelesoff, N.E.; Feinglos, M.; Granger, C.B.; Califf, R.M. Outcomes of diabetic patients following acute myocardial infarction: A review of the major thrombolytic trials. *Coron. Artery Dis.* **1996**, *7*, 732–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bellodi, G.; Manicardi, V.; Malavasi, V.; Veneri, L.; Bernini, G.; Bossini, P.; Distefano, S.; Magnanini, G.; Muratori, L.; Rossi, G.; et al. Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **1989**, *64*, 885–888. [[CrossRef](#)]
- Wei, C.H.; Litwin, S.E. Hyperglycemia and Adverse Outcomes in Acute Coronary Syndromes: Is Serum Glucose the Provocateur or Innocent Bystander? *Diabetes* **2014**, *63*, 2209–2212. [[CrossRef](#)]
- Timmer, J.R.; Hoekstra, M.; Nijsten, M.W.; van der Horst, I.C.; Ottervanger, J.P.; Slingerland, R.J.; Dambrink, J.H.; Bilo, H.J.; Zijlstra, F.; van't Hof, A.W. Prognostic value of admission glycosylated hemoglobin and glucose in nondiabetic patients with ST-segment-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Circulation* **2011**, *124*, 704–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ceriello, A. Acute hyperglycaemia: A 'new' risk factor during myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2004**, *26*, 328–331. [[CrossRef](#)]
- Torregroza, C.; Raupach, A.; Feige, K.; Weber, N.C.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1765–1780. [[CrossRef](#)]
- Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. Myocardial Reperfusion Injury. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1121–1135. [[CrossRef](#)]
- Hausenloy, D.; Lim, S. Remote Ischemic Conditioning: From Bench to Bedside. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 27. [[CrossRef](#)]
- Billah, M.; Ridiandries, A.; Allahwala, U.; Mudaliar, H.; Dona, A.; Hunyor, S.; Khachigian, L.M.; Bhindi, R. Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: Search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection. *Oncotarget* **2019**, *10*, 216–244. [[CrossRef](#)]
- Heusch, G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1477–1486. [[CrossRef](#)]
- Roth, S.; Torregroza, C.; Huhn, R.; Hollmann, M.W.; Preckel, B. Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications. *Anesth. Analg.* **2020**, *131*, 1751–1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Meybohm, P.; Kohlhaas, M.; Stoppe, C.; Gruenewald, M.; Renner, J.; Bein, B.; Albrecht, M.; Cremer, J.; Coburn, M.; Schaelte, G.; et al. RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial Dysfunction, Postoperative Neurocognitive Dysfunction, and 1 Year Follow-Up. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e008077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hausenloy, D.J.; Candilio, L.; Evans, R.; Ariti, C.; Jenkins, D.P.; Kolvekar, S.; Knight, R.; Kunst, G.; Laing, C.; Nicholas, J.; et al. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1408–1417. [[CrossRef](#)]
- Kristiansen, S.B.; Paelestik, K.B.; Johnsen, J.; Jespersen, N.R.; Pryds, K.; Hjortbak, M.V.; Jensen, R.V.; Botker, H.E. Impact of hyperglycemia on myocardial ischemia-reperfusion susceptibility and ischemic preconditioning in hearts from rats with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*, 66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ishihara, M.; Inoue, I.; Kawagoe, T.; Shimatani, Y.; Kurisu, S.; Nishioka, K.; Kouno, Y.; Umemura, T.; Nakamura, S.; Sato, H. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 1007–1011. [[CrossRef](#)]

18. Penna, C.; Andreadou, I.; Aragno, M.; Beauloye, C.; Bertrand, L.; Lazou, A.; Falcão-Pires, I.; Bell, R.; Zuurbier, C.J.; Pagliaro, P.; et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 5312–5335. [[CrossRef](#)]
19. Tsang, A.; Hausenloy, D.J.; Mocanu, M.M.; Carr, R.D.; Yellon, D.M. Preconditioning the Diabetic Heart. The Importance of Akt Phosphorylation. *Diabetes* **2005**, *54*, 2360–2364. [[CrossRef](#)]
20. Rehni, A.K.; Dave, K.R. Ameliorative potential of conditioning on ischemia-reperfusion injury in diabetes. *Cond. Med.* **2018**, *1*, 105–115.
21. Yadav, H.N.; Singh, M.; Sharma, P.L. Involvement of GSK-3 $\beta$  in attenuation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in diabetic rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *343*, 75–81. [[CrossRef](#)]
22. Juhaszova, M.; Zorov, D.B.; Yaniv, Y.; Nuss, H.B.; Wang, S.; Sollott, S.J. Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cardioprotection. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 1240–1252. [[CrossRef](#)]
23. Yang, Z.; Tian, Y.; Liu, Y.; Hennessy, S.; Kron, I.L.; French, B.A. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning by inhibiting Akt phosphorylation: Normalizing blood glucose before ischemia restores ischemic preconditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 329183. [[CrossRef](#)]
24. Kersten, J.R.; Montgomery, M.W.; Ghassemi, T.; Gross, E.R.; Toller, W.G.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *280*, H1744–H1750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Baranyai, T.; Nagy, C.T.; Koncsos, G.; Onodi, Z.; Karolyi-Szabo, M.; Makkos, A.; Varga, Z.V.; Ferdinandy, P.; Giricz, Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Diabetol.* **2015**, *14*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bunte, S.; Behmenburg, F.; Eckelskemper, F.; Mohr, F.; Stroethoff, M.; Raupach, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Cardioprotection by Humoral Factors Released After Remote Ischemic Preconditioning Depends on Anesthetic Regimen. *Crit. Care Med.* **2019**, *47*, e250–e255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pickard, J.M.; Davidson, S.M.; Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. Co-dependence of the neural and humoral pathways in the mechanism of remote ischemic conditioning. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jensen, R.V.; Støttrup, N.B.; Kristiansen, S.B.; Bøtker, H.E. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res. Cardiol.* **2012**, *107*, 285. [[CrossRef](#)]
29. Gu, W.; Pagel, P.S.; Warltier, D.C.; Kersten, J.R. Modifying cardiovascular risk in diabetes mellitus. *Anesthesiology* **2003**, *98*, 774–779. [[CrossRef](#)]
30. Lin, K.Y.; Ito, A.; Asagami, T.; Tsao, P.S.; Adimoolam, S.; Kimoto, M.; Tsuji, H.; Reaven, G.M.; Cooke, J.P. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* **2002**, *106*, 987–992. [[CrossRef](#)]
31. Hassouna, A.; Loubani, M.; Matata, B.M.; Fowler, A.; Standen, N.B.; Galiñanes, M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 450–458. [[CrossRef](#)]
32. Saeid, F.; Aniseh, J.; Reza, B.; Manouchehr, V.S. Signaling mediators modulated by cardioprotective interventions in healthy and diabetic myocardium with ischaemia-reperfusion injury. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2018**, *25*, 1463–1481. [[CrossRef](#)]
33. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: Signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 674–699. [[CrossRef](#)]
34. Torregroza, C.; Feige, K.; Schneider, L.; Bunte, S.; Stroethoff, M.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Raupach, A. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1445. [[CrossRef](#)]
35. Grill, V.; Adamson, U.; Cerasi, E. Immediate and time-dependent effects of glucose on insulin release from rat pancreatic tissue. Evidence for different mechanisms of action. *J. Clin. Investig.* **1978**, *61*, 1034–1043. [[CrossRef](#)]
36. Nesher, R.; Cerasi, E. Modeling phasic insulin release: Immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* **2002**, *51* (Suppl. 1), S53–S59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ng, K.W.; Allen, M.L.; Desai, A.; Macrae, D.; Pathan, N. Cardioprotective Effects of Insulin. *Circulation* **2012**, *125*, 721–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fan, Y.; Zhang, A.-M.; Xiao, Y.-B.; Weng, Y.-G.; Hetzer, R. Glucose–insulin–potassium therapy in adult patients undergoing cardiac surgery: A meta-analysis. *Eur. J. Cardio Thorac. Surg.* **2011**, *40*, 192–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Marfella, R.; Sasso, F.C.; Cacciapuoti, F.; Portoghese, M.; Rizzo, M.R.; Siniscalchi, M.; Carbonara, O.; Ferraraccio, F.; Torella, M.; Petrella, A.; et al. Tight Glycemic Control May Increase Regenerative Potential of Myocardium during Acute Infarction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 933–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sasso, F.C.; Rinaldi, L.; Lascar, N.; Marrone, A.; Pafundi, P.C.; Adinolfi, L.E.; Marfella, R. Role of Tight Glycemic Control during Acute Coronary Syndrome on CV Outcome in Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.* **2018**, *2018*, 3106056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Akbarzadeh, A.; Norouzian, D.; Mehrabi, M.R.; Jamshidi, S.; Farhangi, A.; Verdi, A.A.; Mofidian, S.M.; Rad, B.L. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* **2007**, *22*, 60–64. [[CrossRef](#)]
42. Stanley, W.C.; Dabkowski, E.R.; Ribeiro, R.F., Jr.; O’Connell, K.A. Dietary fat and heart failure: Moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ. Res.* **2012**, *110*, 764–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Leon, B.M.; Maddox, T.M. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J. Diabetes* **2015**, *6*, 1246–1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sasso, F.C.; Pafundi, P.C.; Simeon, V.; De Nicola, L.; Chiodini, P.; Galiero, R.; Rinaldi, L.; Nevola, R.; Salvatore, T.; Sardu, C.; et al. Efficacy and durability of multifactorial intervention on mortality and MACEs: A randomized clinical trial in type-2 diabetic kidney disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **2021**, *20*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Roth, S.; Torregroza, C.; Feige, K.; Preckel, B.; Hollmann, M.W.; Weber, N.C.; Huhn, R. Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Davidson, S.M.; Ferdinandy, P.; Andreadou, I.; Bøtker, H.E.; Heusch, G.; Ibáñez, B.; Ovize, M.; Schulz, R.; Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J.; et al. Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2019**, *73*, 89–99. [[CrossRef](#)]
47. Heusch, G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat. Rev. Cardiol.* **2020**, *17*, 773–789. [[CrossRef](#)]
48. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2010.
49. Behmenburg, F.; van Caster, P.; Bunte, S.; Brandenburger, T.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R. Impact of Anesthetic Regimen on Remote Ischemic Preconditioning in the Rat Heart In Vivo. *Anesth. Analg.* **2018**, *126*, 1377–1380. [[CrossRef](#)]
50. Ahmet, I.; Wan, R.; Mattson, M.P.; Lakatta, E.G.; Talan, M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* **2005**, *112*, 3115–3121. [[CrossRef](#)]
51. Snorek, M.; Hodyc, D.; Sedivý, V.; Durišová, J.; Skoumalová, A.; Wilhelm, J.; Neckář, J.; Kolář, F.; Herget, J. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol. Res.* **2012**, *61*, 567–574. [[CrossRef](#)]
52. Al-Awar, A.; Kupai, K.; Veszelka, M.; Szűcs, G.; Attieh, Z.; Murlasits, Z.; Török, S.; Pósa, A.; Varga, C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J. Diabetes Res.* **2016**, *2016*, 9051426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wu, J.; Yan, L.J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2015**, *8*, 181–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Furman, B.L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2015**, *70*, 5–47. [[CrossRef](#)]
55. Raupach, A.; Reinle, J.; Stroethoff, M.; Mathes, A.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Huhn, R.; Bunte, S. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Behmenburg, F.; Dorsch, M.; Huhn, R.; Mally, D.; Heinen, A.; Hollmann, M.W.; Berger, M.M. Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144737. [[CrossRef](#)]