

**Aus der Klinik und Poliklinik für Thorax, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Rainer G. Leyh



**Modulatorischer Einfluss von Levosimendan
bei dem Ischämie-Reperfusionsschaden auf die myokardiale
Mitochondrienfunktion.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Khaled Machwart
aus Würzburg

Würzburg 2023

Referent: Prof. Dr. med. Christoph Schimmer

Korreferent: Prof. Dr. med. Christoph Maack

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2024

Der Promovend ist Arzt

Für Sofie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokardialer Ischämie-Reperfusionsschaden	2
1.1.1	Myokardinfarkt.....	4
1.1.2	Bewertung der Infarktgröße	5
1.2	Low Cardiac Output Syndrom	6
1.2.1	Ätiologie des LCOS	7
1.2.2	Herzleistung und Sauerstoffversorgung	8
1.3	Mitochondriale Rolle im Myokard.....	10
1.3.1	Das Mitochondrium: Ein Blick ins „Kraftwerk“ der Zelle	11
1.3.2	Die Rolle der Mitochondrien bei akuter Myokardischämie.....	13
1.3.3	Mitochondriale Ca ²⁺ -Überlastung	14
1.3.4	Rolle der mPTP in der Kardioprotektion	16
1.3.5	Mitochondriale Spalt- und Fusionsproteine für die Kardioprotektion	17
1.3.6	Mitochondriale Funktion bei Ischämie-Reperfusionsschaden	18
1.4	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Geräte und Apparaturen	21
2.2	Verwendete Chemikalien	22
2.3	Versuchstiere	23
2.4	Studiendesign	24
2.5	Langendorff Apparatur und Vorbereitung der Versuchstiere	25
2.6	Analyse der kardialen Enzyme.....	28
2.7	Mitochondrienisolation	28
2.8	Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs.	29
2.9	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	31
2.10	Analyse der mitochondrialen Calcium Aufnahme und Freisetzung	32

2.11 Analyse der mitochondrialen Calcium Retentionskapazität	32
2.12 Messung der mitochondrialen Permeabilität und Schwellung	33
2.13 Analyse des mitochondrialen ATP-Inhalts sowie der ATP-Produktion	33
2.14 Datenanalyse	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Myokardiale Funktion	35
3.2 Myokardiale Marker	37
3.3 Analyse der Atmungskette	42
3.4 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	46
3.5 Analyse der mitochondrialen Ca ²⁺ -Aufnahme und Ca ²⁺ -Freisetzung.....	48
3.6 Mitochondriale Ca ²⁺ -Retentionskapazität (CRC).....	51
3.7 Mitochondriale mPTP-Empfindlichkeit gegenüber Ca ²⁺	53
3.8 Mitochondriale ATP- und ATP-Produktionskapazität.....	56
4 Diskussion	58
4.1 Einführung und Wirkungsweise von Levosimendan	59
4.1.1 Levosimendan Forschungsstand der experimentellen Studien.	64
4.1.2 Levosimendan Forschungsstand der klinischen Studien.....	70
4.2 Diskussion der Studienergebnisse	72
4.3 Limitationen der Studie	76
4.4 Schlussfolgerung	78
5 Zusammenfassung.....	79
6 Literaturverzeichnis.....	80

Appendix	I
I. Abkürzungenverzeichnis	I
II. Abbildungsliste.....	III
III. Tabellenliste	IV
IV. Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
V. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
VI. Eigene Veröffentlichung und Kongressteilnahme	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Im Kontext kardiovaskulärer Interventionen manifestiert sich ein Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) des Myokards, der in ein Low Cardiac Output Syndrom (LCOS) münden könnte und mit einer gesteigerten Mortalität assoziiert ist (1). Levosimendan gewinnt in den letzten Jahren als therapeutische Option bei Herzinsuffizienzpatienten in der perioperativen Phase an klinischer Relevanz (2). Die Pathogenese des I/R-Schadens am Myokard ist primär durch eine mitochondriale Dysfunktion charakterisiert. Diese zellulären Organellen orchestrieren essenzielle bioenergetische Prozesse, darunter die ATP-Generierung, intrazelluläre Calcium-Homöostase sowie die Regulation apoptotischer Zellprozesse(1). Die Ischämie-bedingte Inhibition der oxidativen Phosphorylierung katalysiert den drastischen Rückgang der ATP-Produktion, begleitet von einer Dysregulation der zellulären Natrium-Kalium-ATPase und einem konsekutiven Calcium-Influx, welcher intrazelluläre Signaltransduktion und Enzymphosphorylierung moduliert. Das durch die Atmungskette aufrecht erhaltene negative mitochondriale Membranpotential initiiert die Calcium-Akquisition über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU). Der Calcium-Exflux wird entweder durch den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) oder die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) vermittelt, wobei Calcium-bindende Domänen die Porenaktivität modulieren und somit den mPTP-Status zwischen offenen und geschlossenen Konformationen alternieren lassen (1, 3).

Das Kollabieren des Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, eine überschüssige zelluläre Calcium-Konzentration sowie der abrupte pH-Abfall während der Reperfusion induzieren eine persistente mPTP-Aktivierung, die in mitochondrialem Versagen und folglich Zellapoptose kulminiert (1). Daraus ergibt sich die Imperativität, die Funktion der Atmungskette (RCF), des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und der mitochondrialen Calcium-Homeostase zur Aufrechterhaltung biochemischer Integrität während myokardialer I/R-Events zu stabilisieren (1, 3).

Während das therapeutische Potential von Levosimendan in Bezug auf die Optimierung der myokardialen Pumpfunktion und die Minimierung von I/R-Schaden im Kontext myokardialer Präkonditionierung beleuchtet wurde (4), bleibt dessen Wirkprofil bezüglich des protrahierten I/R-Einflusses auf die Mitochondrienfunktion weitestgehend unerforscht (1).

1.1 Myokardialer Ischämie-Reperfusionsschaden

Die myokardiale Ischämie ist typischerweise eine Folge der koronaren Atherosklerose und tritt auf, wenn der koronare Blutfluss durch die Obstruktion eines Herzkranzgefäßes oder durch eine Umverteilung des Blutflusses weg von einem gegebenen koronaren Gefäßgebiet reduziert wird (5, 6). Der Myokardinfarkt entsteht durch schwere und anhaltende Myokardischämie und tritt typischerweise als Folge eines Bruchs oder einer Erosion einer Herzkranzgefäßplaque auf, die eine überlagerte Thrombose und Okklusion der Herzkranzgefäße auslöst. Alternativ kann ein Myokardinfarkt in Gegenwart von koronarer Arteriosklerose auftreten, wenn eine ungünstige Hämodynamik den Blutfluss von einer Myokardregion, die von einer stenotischen Koronararterie versorgt wird, umverteilt. (6, 7).

Der einzige Weg, das ischämische Myokard vor dem Infarkt zu retten, ist die rechtzeitige Reperfusion. Eine erfolgreiche Reperfusion des ischämischen Myokards wurde erstmals bei Hunden nachgewiesen (6, 8). Bald darauf wurden Reperusionsansätze bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingesetzt, zunächst in Form einer pharmakologischen Thrombolyse und später zunehmend in Form einer interventionellen, katheterbasierten Wiedereröffnung der stenotierten Koronarien (9). Die Reperfusion rettet jedoch nicht nur das ischämische Myokard vor dem Infarkt, sondern induziert auch eine spezifische zusätzliche Komponente irreversibler Verletzungen (6, 10, 11). Trotz des zunehmenden Einsatzes, einer besseren Logistik und einer verbesserten Methodik interventioneller Ansätze für die koronare Reperfusion sind die Sterblichkeit und Morbidität, die mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Folge des akuten Myokardinfarkts verbunden sind, nach wie vor erheblich (6, 12).

Die 1-Jahres Mortalität nach akutem Myokardinfarkt mit koronaren Reperusionsstrategien (PCI) beträgt 2–11% (6, 6, 13–15). Daher ist neben der Reperfusion auch ein zusätzlicher Kardioprotektionsschutz erforderlich (6, 16). Die Schwere des Infarkts ist eine wichtige Determinante der Prognose von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (6, 17). Folglich haben kardioprotektive Interventionen das Ziel, das Ausmaß des Infarkts zu vermindern. Die ischämische Vorkonditionierung ist das klassische Paradigma der Kardioprotektion, d.h. die Größe des Infarkts zu reduzieren. Die Ischämische Vorkonditionierung löst wahrscheinlich die Freisetzung von biochemischen Botenstoffen aus, die entweder über den Blutkreislauf oder über den neurogenen Weg wirken. Dies führt zu einer Verringerung des oxidativen Stresses und zur Erhaltung der

mitochondrialen Funktion. Studien haben gezeigt, dass endotheliales Stickstoffmonoxid (NO), freie Radikale, Kinasen, Opioide, Katecholamine und Kalium_{ATP}-Kanäle als mögliche Mechanismen der ferngesteuerten Vorkonditionierung in Frage kommen. (6, 18–20). Die Anwendung der ischämischen Vorkonditionierung im Tierexperiment, bei der durch wiederholte Phasen kurze anhaltende koronare Okklusion und Reperfusion durch mehrere Zyklen zeigte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße (6).

1.1.1 Myokardinfarkt

Die vierte universelle Definition des Myokardinfarkts der europäischen Gesellschaft für Kardiologie differenziert zwischen [I] akutem Myokardschaden, [II] chronischem Myokardschaden und [III] Myokardinfarkt.

[I] Akuter Myokardschaden wird festgestellt, wenn es zu einer Erhöhung und/oder einem Absinken des hochsensitiven Troponins (hs-Tn) kommt, wobei mindestens ein Wert über der 99. Perzentile des oberen Referenzlimits liegt.

[II] Chronischer Myokardschaden zeichnet sich durch kontinuierlich erhöhte Troponinwerte über mehrere Messungen hinweg aus.

[III] Ein Myokardinfarkt beschreibt einen akuten Myokardschaden in Kombination mit einem klinisch belegten Hinweis auf eine Myokardischämie (21).

Ein Myokardinfarkt resultiert aus einer prolongierten Myokardischämie und ist irreversibel. Die Dauer der Ischämie sowie das Ausmaß des betroffenen Myokardsegments bedingen fortschreitende, irreversible Muskelzellschäden. Morphologisch manifestieren sich diese irreversiblen Schäden durch Glykogenabbau, mitochondriale Schwellungen und Rupturen des Sarkolemms (6, 22). Untersuchungen zur Reduktion der Infarktgröße mittels Interventionen, die ausschließlich während der frühen Reperfusion durchgeführt wurden, lieferten klare Belege für einen irreversiblen Reperfusionsschaden und dessen Beitrag zur Gesamtausdehnung des Myokardinfarkts (6, 23).

1.1.2 Bewertung der Infarktgröße

Zentraler Fokus der Forschung zur postischämischen Reperfusion ist die Quantifizierung des Infarktareals mit dem Ziel einer Reduktion desselben (6, 24). Die Infarktausdehnung wird durch mehrere Determinanten beeinflusst, einschließlich der Ausdehnung der ischämischen Zone, der Ischämiedauer und -schwere sowie sekundär durch die systemische Hämodynamik (6, 25, 26). Um präzise Evaluierungen in vorläufigen Herzinfarkt-Studien durchzuführen, sind genaue Messungen des Infarkt- und des ischämiegefährdeten Arealis essentiell. Postmortale Bestimmungen des Infarktareals erfolgen mittels Färbung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), das lebendes Gewebe mit aktiver Stoffwechsellätigkeit rot einfärbt, während nekrotische Zellen unverändert bleiben. Der ischämiegefährdete Bereich wird durch die Injektion eines Farbstoffs (z.B. Evans-Blau) nach Rekanalisation des okkludierten Koronargefäßes markiert. Das betroffene Areal ist durch den Ausschluss von Blaufärbung gekennzeichnet (6).

Um die Ischämieschwere im Myokard zu bestimmen, werden regionale Myokard-Blutflussmessungen mittels radioaktiv oder farblich markierter Mikrosphären während in-vivo-Ischämie eingesetzt. Nach Injektion in den linken Vorhof werden die Mikrosphären entsprechend dem Blutfluss in das Gewebe verteilt und akkumulieren dort, da sie die Kapillaren nicht passieren können. Die anschließende Analyse der Radioaktivität oder Farbintensität postmortem ermöglicht die Blutflussquantifizierung (6).

Ein etabliertes Prozedere quantifiziert das Infarktareal (TTC-defizientes Areal) in Relation zum erhaltenden Blutfluss (mittels Mikrosphären) im gefährdeten Gebiet. Eine Abweichung von dieser linearen Korrelation indiziert effektiv eine kardioprotektive Intervention (6, 24). Klinisch wird das Infarktausmaß mittels Late-Gadolinium-Enhancement (LGE) in der kardialen MRT erfasst (6, 24). Die Abschätzung des ischämiegefährdeten Bereichs bedingt eine Szintigraphie mit präreperfusioneller Tracer-Applikation. Methoden, die auf dem Nachweis eines myokardialen Ödems im MRT oder angiographischen Markern basieren, gelten als weniger präzise (24). Alternativ kann in klinischen Settings das Infarktausmaß über zeitabhängige Biomarkerfreisetzung (z.B. Kreatinkinase CK, CK-MB-Isoenzym, Troponin I, Troponin T) abgeschätzt werden, wobei hier keine Quantifizierung des gefährdeten Bereichs möglich ist (6, 24).

1.2 Low Cardiac Output Syndrom

Das Low Cardiac Output Syndrom (LCOS) charakterisiert eine Reduktion der kardialen Leistungsfähigkeit, die auf transienten Störungen der Myokardfunktion basiert, insbesondere bei Patienten mit pathologischen Zuständen wie Schock oder jenen, die kardiochirurgischen Eingriffen unterlagen (27). Um morbiditätsassoziierte Manifestationen [bspw. Organminderperfusion anschließend Multiorganversagen] infolge inadäquater systemischer Perfusion abzuwenden, ist eine prompte Diagnose dieser Pathophysiologie und deren konsequente Therapie, zielend auf die suffiziente Sauerstoff- und zelluläre Nährstoff-Versorgung in der Peripherie, von zentraler Bedeutung (27).

Das Herzzeitvolumen, definiert als das Volumen, welches pro Minute vom Myokard in die systemische Zirkulation befördert wird (27–29), repräsentiert den aggregierten Blutstrom im Gesamtorganismus (30). Diese kardiale Performance ist intrinsisch von der Herzfrequenz sowie dem Schlagvolumen determiniert und interagiert mit drei kardialen Parametern: [I] der Vorlast, [II] der Nachlast und [III] der Kontraktilität (28). Dysfunktionen eines oder mehrerer dieser Parameter können zum LCOS führen (27, 31, 32).

Die Vorlast quantifiziert den Grad der myokardialen Faserdehnung vor jedem Kontraktionszyklus (27), und symbolisiert das enddiastolische Ventrikelvolumen, das primär vom intravasalen Volumenstatus moduliert wird. Indikative Parameter wie rechter oder linker Vorhofdruck oder zentraler Venendruck dienen ihrer Einschätzung. Pathologien, die zur vasokapillären Permeabilitätssteigerung oder reduzierten Venenrückfluss beitragen, [z.B. Sepsis, Hämorrhagien, aggressive Diurese, exzessiver Atemwegsdruck und postoperative kardiochirurgische Zustände] induzieren eine Vorlastminderung mit direktem Einfluss auf die kardiale Leistung (27, 33). Vasodilatativa können zusätzlich die venöse Kapazität und somit die Vorlast reduzieren (27). Obgleich eine adäquate Vorlast essenziell ist, kann eine Überdehnung des Ventrikels durch exzessive Volumengabe die kardiale Funktion kompromittieren (27).

Die Nachlast repräsentiert kumulativ alle Widerstände, gegen die der Ventrikel während der Auswurfsphase agieren muss (27, 28). Simplifiziert reflektiert sie den Grad an vaskulärer Konstriktion bzw. Widerstand, gegen den der Ventrikel das Blut auswirft (27, 28). Eine gesteigerte Nachlast intensiviert die myokardiale Arbeitsbelastung,

moduliert die Ejektionsfraktion und wirkt konsekutiv auf das kardiale Output (27). Systemische sowie pulmonale Hypertonie illustrieren pathophysiologische Szenarien, in denen diese Dynamik greift. Ein erhöhter Widerstand führt langfristig zu kompensatorischer Myokardhypertrophie (27).

Die Kontraktilität charakterisiert die intrinsische Fähigkeit des Myokards zur Faserverkürzung während der Systole (27), und kann als die von Vor- und Nachlast unabhängig generierte myokardiale Kraftaufwendung beschrieben werden. Sie korreliert direkt mit der Stärke und Effizienz der myokardialen Kontraktion (27). Üblicherweise wird die Kontraktilität als Ejektionsfraktion quantifiziert und mittels Echokardiographie sowie kardialer Magnetresonanztomographie evaluiert. Störungen des Elektrolythaushalts [Hyperkaliämie, Hypokalzämie, Hypomagnesämie], Hypoglykämie, Azidose oder Hypoxie beeinflussen die kontraktile myokardiale Funktion (27, 32, 34). Ein optimales Kontraktilitätsverhalten ergibt sich aus einer angepassten Balance von Vor- und Nachlast im Kontext der individuellen Herzmorphologie [Frank-Starling-Mechanismus] (35).

1.2.1 Ätiologie des LCOS

Die Ursachen von LCOS sind multifaktoriell. LCOS kann in physiologischen Zuständen auftreten, die durch ein unzureichendes Gefäßvolumen [z. B. verminderte Vorlast] oder durch eine erhöhte systemische Gefäßresistenz, die zu einer übermäßigen Nachlast führt, sowie terminaler Herzinsuffizienz mit Herzpumpversagen. (27, 28, 32). Beispiele für Erkrankungen, die die Herzfunktion beeinträchtigen, sind:

[I] eingeschränkte Kontraktilität aufgrund strukturelle Myokardpathologien.

[II] valvuläre Stenose oder Insuffizienz.

[III] Myokarddysfunktion infolge von Reizungen und Ödemen im Zusammenhang mit chirurgischen Eingriffe.

[IV] Ein entzündlicher Prozess sekundär zur Mediatoren-Freisetzung.

[V] mechanische Ursachen wie bei Myokardtampnade (27, 28).

Diese Anomalien können allein oder in Kombination auftreten und die Durchblutungsstörung verstärken (27, 28). LCOS wurde hauptsächlich mit primärer Herzfunktionsstörung nach postoperativer Sanierung von angeborenen Herzanomalien und kongestiven Myopathien in Verbindung gebracht. Alle Krankheitsprozesse mit

eingeschränkter Sauerstoffzufuhr und Herzfunktionsstörungen, die verminderte Gewebedurchblutung verursachen, könnten zu einem LCOS führen. Herzfunktionsstörungen, die zu LCOS führen, können auf eine diastolische Dysfunktion zurückzuführen sein, die auf einer schlechten Myokard-Compliance oder einer verminderten Herzentspannung basieren (27, 28). Dieser Zustand verändert die Myokardsauerstoffversorgung und erzeugt ein gewisses Maß an Myokardischämie. Darüber hinaus wirkt sich die Interdependenz zwischen beiden Ventrikeln stark auf den diastolischen Druck aus (27).

Beispielsweise beeinträchtigt eine Erhöhung des rechtsventrikulären Drucks die Volumkapazität des linken Ventrikels. Auch Herztamponaden oder hoher intrathorakaler Druck schränken die Myokardaktivität ein und behindern eine venöse ventrikuläre Füllung und tragen somit zu einem niedrigen Herzzeitvolumen bei (27, 32, 36). Myokardfunktionsstörungen werden bis zu 6 Stunden nach dem kardiopulmonalen Bypass festgestellt (27, 37). Anzeichen einer Myokardfunktionsstörung sind verminderte periphere Pulse, kalte Extremitäten, Oligurie/Anurie und niedriger Blutdruck (27). Bei septischem Schock sind die systolischen und diastolischen Dysfunktionen oft mit Veränderungen im peripheren Gefäßtonus verbunden, die den Auswurfanteil des Myokards modifizieren (38). Wenn die ventrikuläre Funktion beeinträchtigt wird, verschlechtert eine Erhöhung der systemischen Gefäßresistenz einen bereits reduzierten Myokardzustand, der zu einem kardiovaskulären Kollaps führen kann (27, 28).

Herzfunktionsstörungen können auch durch Herzrhythmusstörungen entstehen. Ursachen von Arrhythmien können Hypoxie (34, 39), Störungen der Impulsbildung oder Impulsleitung, Wiedereintritt innerhalb des sinoatrialen Knotens, (40) chirurgische Resektion, die Ödeme oder direkte Verletzungen verursacht (29, 40); und Elektrolytungleichgewichte und Stoffwechselstörungen (29, 34, 40).

1.2.2 Herzleistung und Sauerstoffversorgung

Herzleistung und Hämoglobin spielen die größte Rolle bei der Sauerstoffversorgung aller Organe. Letzteres bestimmt die Verfügbarkeit von Sauerstoff für den Gewebeverbrauch, was deutlich macht, wie wichtig es ist, eine ausreichende Durchblutung der Endorgane aufrechtzuerhalten (27, 41). Bei hohen Stoffwechselanforderungen [wie bei Bewegung oder Krankheitszuständen] steigt die Herzleistung, um den Sauerstoffbedarf zu decken (27, 42). Entzündungszustände und

Sepsis können die Sauerstoffextraktionsfähigkeit des Gewebes trotz geeigneter Perfusion verändern. Hierdurch kommt es zu einem Sauerstoff- und Nährstoff-Defizit (27, 41, 43). Dies wiederum löst einen Wechsel zur anaeroben Glykolyse aus und führt zu Azidose und erhöhte Serumlaktatspiegel, die als Anzeichen einer verminderten systemischen Perfusion sind (27, 44, 45).

Der Sauerstoffgehalt stellt die Sauerstoffmenge dar, die das Blut zu den Zellen transportiert. Im gesunden Zustand übersteigt der gelieferte Sauerstoff die Bedürfnisse des Gewebes bei Weitem. Wenn der zelluläre Stoffwechsel als Reaktion auf Stress oder körperliche Aktivität zunimmt, passt sich der Körper durch Erhöhung seiner Herzleistung an. Unter Bedingungen, in denen die Herzleistung beeinträchtigt ist, sollte der Sauerstoffgehalt für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr maximiert werden (27, 34). Hämoglobin ist der wichtigste Träger für den Sauerstofftransport zu den Zellen (27, 34).

Die Anpassung des Hämoglobinspiegels ist unerlässlich, wenn die Durchblutung und die Sauerstoffzufuhr nicht optimiert werden können (28, 32, 46).

1.3 Mitochondriale Rolle im Myokard

Die Koronare Herz Krankheit ist mit 17.9 Millionen Todesfällen pro Jahr weltweit die häufigste Todesursache (47–50). Diese kann sich im Notfall als akuter Myokardinfarkt (AMI) darstellen, bei dem es zu einem akuten thrombotischen Verschluss der Herzkranzgefäße kommt, hierdurch wird der Blutfluss zum Myokard stark eingeschränkt oder vollständig blockiert, wodurch Kardiomyozyten Sauerstoff und Nährstoffe [als akute Myokard-Ischämie bezeichnet] entzogen werden, was zum Tod von Kardiomyozyten führt (47). Die Behandlung der Wahl für AMI ist die schnellstmögliche Entfernung der thrombotischen Okklusion um den koronaren Blutfluss wiederherzustellen, um akute ischämische Schäden des Herzens zu verhindern. Dies kann mittels koronarer Herzkatheterintervention [perkutane koronare Intervention (PCI)], oder Myokardrevaskularisation [aortocoronarer bypass ACB] erzielt werden.

Trotz rechtzeitiger PCI/ACB erleben AMI-Patienten immer noch eine signifikante Mortalität und Morbidität. Daher sind neue Behandlungsansätze erforderlich, um das Myokard vor den schädlichen Auswirkungen akuter myokarder Ischämie und Reperfusionsschäden zu schützen, um die Größe des Myokardinfarkts [MI] zu begrenzen, die Herzfunktion zu erhalten und den Beginn der Herzinsuffizienz [HF] zu verhindern (47, 51).

Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung von ATP, Calciumhaushalt und Zelltodregulierung. Diese Mechanismen sind erforderlich, um eine normale herzkontraktile Funktion aufrechtzuerhalten. Daher ist die mitochondriale Dysfunktion während akuter Ischämie und des Ischämier reperfusionsschadens eine kritische Determinante des Zelltodes nach AMI (47, 52). Deshalb ist die Prävention der mitochondrialen Dysfunktion eine wichtige therapeutische Option zur Kardioprotektion (47, 51).

1.3.1 Das Mitochondrium: Ein Blick ins „Kraftwerk“ der Zelle

Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen, die als Hauptorte der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) dienen und somit zentral für die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese in eukaryotischen Zellen sind. Innerhalb der inneren mitochondrialen Membran orchestriert die Atmungskette die Transfersequenz von Elektronen durch eine Reihe von Proteinkomplexen (53).

Beginnend mit Komplex I (NADH-Dehydrogenase) werden Elektronen von NADH an Coenzym Q übertragen, wodurch ein Protonengradient erzeugt wird. Parallel dazu leitet Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) Elektronen von Succinat zu Coenzym Q. Diese Elektronen fließen dann weiter zu Komplex III (Cytochrom c Reduktase), wo sie auf Cytochrom c übertragen werden, bevor sie schließlich von Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) aufgefangen und auf Sauerstoff übertragen werden, um Wasser zu produzieren. Während dieses Prozesses wird ein Protonengradient aufrechterhalten, der als treibende Kraft für die ATP-Synthase, den fünften Komplex, dient, welcher den endgültigen Schritt der ATP-Produktion katalysiert (53).

Die mitochondriale Calcium-Regulierung ist ein essenzieller Aspekt der mitochondrialen Homöostase. Der mitochondriale Calcium Uniporter (MCU) ermöglicht den Ca^{2+} -Eintritt in die Mitochondrien, während der Natrium-Calcium-Lithium-Austauscher (NCLX) für den Ausstrom aus diesen Organellen verantwortlich ist. Eine kritische Akkumulation von Ca^{2+} kann zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) führen, welche die Zellintegrität beeinträchtigen kann. Zudem spielt der mitochondriale Kalium-ATP-Kanal (mito- K^+_{ATP}) eine schützende Rolle, insbesondere in Bezug auf den Ischämie-Reperfusionsschaden (53, 54).

Zum Schutz gegen oxidative Belastung besitzen Mitochondrien ein ausgeklügeltes antioxidatives System. Das Enzym Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) katalysiert die Umwandlung des Superoxid-Anions in Wasserstoffperoxid. Weitere Schutzmechanismen wie die Glutathionperoxidase (GPX), Peroxiredoxin (PRX), Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxin-Reduktase (TR) sind essenziell, um reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren und die Zellintegrität zu gewährleisten. Ergänzend dazu versorgen das Malic Enzyme Phosphat (MEP) und die Isocitrat-Dehydrogenase-Phosphat (IDP) das System mit dem essentiellen Reduktionsmittel NADPH (53, 55, 56).

Zusammenfassend spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle in den zellulären Energiestoffwechselprozessen und antioxidativen Abwehrmechanismen und sind maßgeblich für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Funktion.

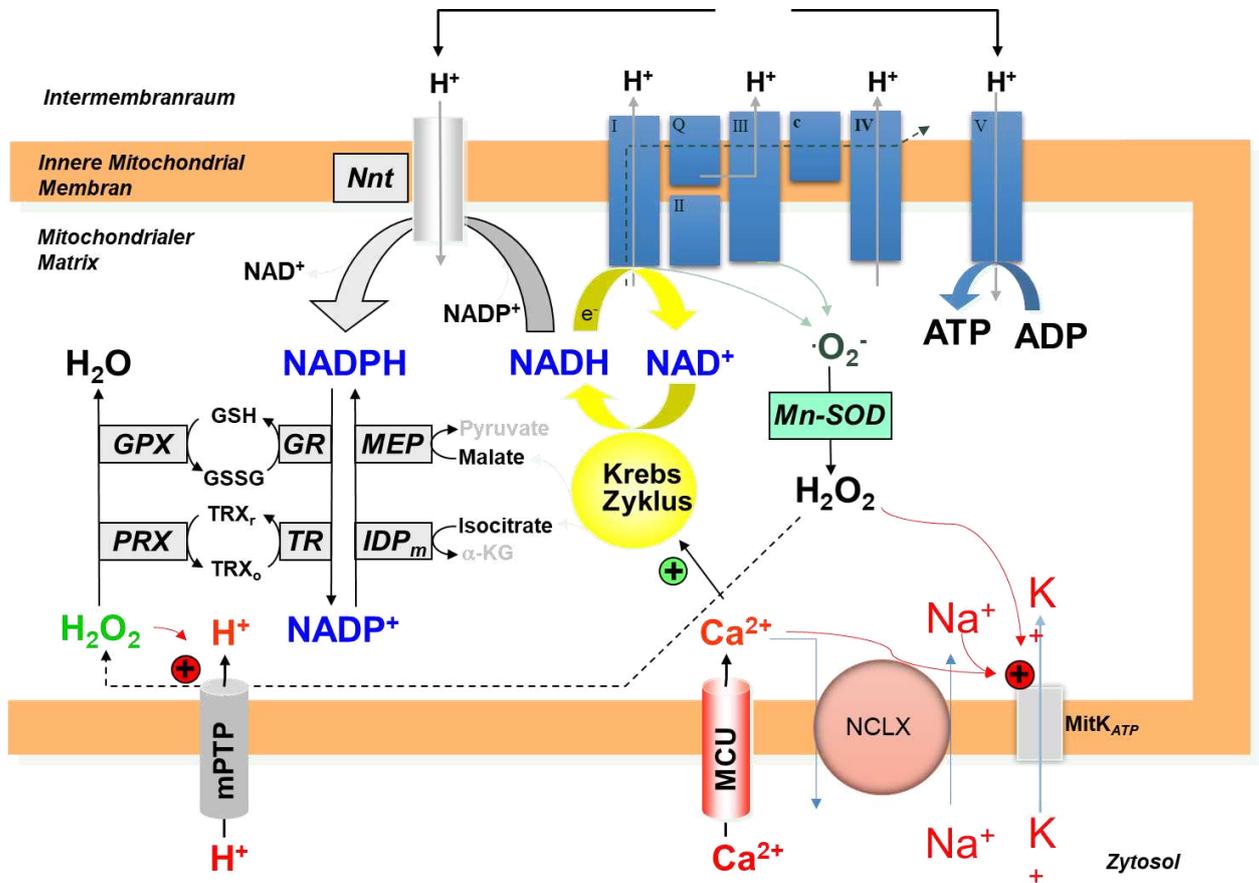


Abbildung 1 Überblick Mitochondrienarchitektur.

Modifiziert mit freundlicher Genehmigung AG Maack C. Deutsches Zentrum für Herzinsuffizienz der Universitätsklinik Würzburg [DZHI]

1.3.2 Die Rolle der Mitochondrien bei akuter Myokardischämie

Während der initiativen Phase der akuten Myokardischämie bei AMI-Patienten führt die Deprivation von Sauerstoff und essentiellen Nährstoffen in den Kardiomyozyten zu einer Kaskade von gravierenden biochemischen und metabolischen Dysregulationen. Ein Großteil dieser Störungen führt zu deleterischen Effekten auf die mitochondriale Funktion und die ATP-Synthese aus (47, 57). Metabolisch manifestiert sich dies durch einen Übergang von der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse, induzierend eine intrazelluläre Akkumulation von Laktat und Protonen, wodurch der intrazelluläre pH-Wert bei manifester Myokardischämie drastisch sinkt (47). Die Akkumulation intrazellulärer Protonen initiiert die Aktivierung des Na^+/H^+ Austauschers, der in der Folge Protonen aus dem zytoplasmatischen Milieu hinausdrängt und zeitgleich einen Na^+ -Einstrom fördert. In Verbindung mit einer herabgesetzten Aktivität der Na^+/K^+ ATPase aufgrund von ATP-Depletion ergibt sich eine deutliche intrazelluläre Na^+ -Anreicherung. Dies veranlasst den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher, im umgekehrten Modus zu agieren, um den überschüssigen Na^+ -Gehalt zu reduzieren. Dies resultiert jedoch in einer intrazellulären und im Anschluss mitochondrialen Ca^{2+} -Anreicherung, während der Versuch unternommen wird, Na^+ auszuleiten (47, 57). In den initialen Momenten der myokardialen Reperfusion treten zusätzliche biochemische und metabolische Anomalien auf, die eine verstärkte mitochondriale Ca^{2+} -Anreicherung, erhöhten oxidativen Stress, pH-Anpassung und die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) einschließen (47, 57). Die induzierten Veränderungen potenzieren die pathophysiologischen Effekte, die im Kontext der akuten myokardialen Ischämie auftreten, und kumulieren in einer mitochondrialen Dysregulation und der konsekutiven Kardiomyozytenapoptose. Dieses Syndrom wird als akuter Myokardreperfusionsschaden charakterisiert und trägt signifikant zur endgültigen Größe des Infarktareals bei (47, 57).

Im Zuge der Reperfusion wird eine zusätzliche intrazelluläre und mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation durch Dysregulation der Plasmamembran, oxidativen Stress-induzierte Veränderungen des sarkoplasmatischen Retikulums und die Reaktivierung mitochondrialer Prozesse hervorgerufen. Dies fördert die Regenerierung des mitochondrialen Membranpotentials, welches den Einstrom von Ca^{2+} über den mitochondrialen Ca^{2+} Uniporter (MCU) intensiviert (47).

Am Beginn der Reperfusion wird eine akute oxidative Stressreaktion ausgelöst. Dies geschieht durch eine reaktivierte mitochondriale Aktivität, die durch verschiedene Mechanismen, einschließlich der Aktivierung der mPTP, zur Kardiomyozytentod führen kann (47, 57).

Die Normalisierung des zytosolischen pH-Werts, als kardioprotektiver Ansatz zur Minimierung des akuten Myokardreperfusionsschadens, kann durch die Reperfusion von ischämischen Tierherzen mit sauren Puffern (47, 58), durch pharmakologische Blockade des Na^+/H^+ -Austauschers (47, 59) oder durch Implementierung endogener kardioprotektiver Techniken erreicht werden (47, 60). Bekannte Faktoren und Komorbiditäten bei AMI-Patienten, wie Alter, Adipositas, metabolisches Syndrom und Diabetes mellitus, modulieren die mitochondriale Homöostase im Kontext kardiovaskulärer Pathologien und beeinflussen sowohl die Vulnerabilität gegenüber akutem Myokard-I/R-Schaden als auch die Effizienz kardioprotektiver Ansätze (47, 61). Schlüsselp Parameter, die zum Myokardreperfusionsschaden beitragen - einschließlich mitochondrialer Calcium-Dysregulation, oxidativem Stress, ATP-Depletion und rascher pH-Anpassung - fokussieren sich um das mPTP, welches folglich als essentielles therapeutisches Ziel für kardioprotektive Interventionen hervorgehoben wird (47, 62).

1.3.3 Mitochondriale Ca^{2+} -Überlastung

Die Reperfusion verursacht in den Mitochondrien erhebliche Schädigungen, wodurch ihre Kapazität, ATP zu generieren, beeinträchtigt wird (1, 63, 64). Die Verminderung der ATP-Produktion in den Mitochondrien korreliert direkt mit einer Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration, was auf eine Interaktion dieser beiden Vorgänge hinweist (1, 63, 64). Zusätzliche Einflussfaktoren für die Entwicklung der mitochondrialen Ca^{2+} Akkumulation sind beispielsweise eine Anhebung der Konzentration an anorganischem Phosphat in den Mitochondrien. Dies resultiert aus einer suboptimalen Kopplung zwischen oxidativer Phosphorylierung und der Verwendung von anorganischem Phosphat für die ATP-Generierung, was den Zutritt von Ca^{2+} in die Mitochondrien stimuliert (64). Es tritt auch eine vermehrte Abgabe von H^+ aus den Mitochondrien ins Sarkoplasma auf, assoziiert mit einem gegenläufigen Ca^{2+} -Transport in Richtung dieser Organellen, infolge der Aktivität des mitochondrialen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauschers (64).

Ein exzessiver Anstieg von Ca^{2+} in die Mitochondrien hat negative Konsequenzen für die Kardiomyozyten. Dies kann zur Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung führen, was die aerobe ATP-Produktion vermindert und die adäquate Energieversorgung des reperfundierten Myokards verhindert (64). Zudem kann sie den passiven Ionen transfer zu den Mitochondrien beeinflussen, eine Schwellung der Mitochondrien und einen Zerfall der inneren mitochondrialen Membran bewirken. Ergänzend geht die exzessive Ca^{2+} -Akkumulation in den Mitochondrien mit einer Freisetzung von Mg^{2+} und K^+ einher, was zur Manifestation von Reperfusionsarrhythmien, inklusive Kammerflimmern, beiträgt (64, 65). Die Ansammlung von Ca^{2+} in der mitochondrialen Matrix verläuft in einem zweiphasigen Prozess. Die initiale Phase beinhaltet den energieabhängigen Zutritt von Ca^{2+} in die Matrix, die Anregung der mitochondrialen Atmung und die Abgabe von H^+ aus der Matrix. In der nachfolgenden Phase beginnen angesammelte Ca^{2+} -Ionen infolge der Aktivierung des Ca^{2+} -gesteuerten unspezifischen Kanals in der inneren mitochondrialen Membran, die Matrix zu verlassen. Daraufhin steigt die Durchlässigkeit der inneren mitochondrialen Membran markant an, was die H^+ -Reaufnahme und den Austritt von K^+ aus der Matrix erleichtert (64). Hierbei wird der energieabhängige Zutritt von Ca^{2+} in die Mitochondrien von erheblichen Veränderungen in der mitochondrialen Morphologie und Funktion, spontanen strukturellen Anpassungen ihrer inneren und äußeren Membranen, der Öffnung des Ca^{2+} -gesteuerten unspezifischen Kanals in der inneren mitochondrialen Membran und der Aktivierung der programmierten Zelltodmechanismen begleitet (64, 66). Unter den Bedingungen der Ischämie/Reperfusion dominieren freie Oxidationsprozesse in den Mitochondrien, welche den Einstrom von Ca^{2+} in die mitochondrialen Matrix der Kardiomyozyten begünstigen (64, 67).

1.3.4 Rolle der mPTP in der Kardioprotektion

Das mitochondriale Permeabilitätstransitions-Pore (mPTP) stellt einen umfangreichen, nicht-selektiven Kanal dar, welcher bei Aktivierung u.a. durch Reperfusion sowohl Ionen als auch andere lösliche Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kDa durch die innere mitochondriale Membran (IMM) transferieren lässt. Die Konsequenzen einer solchen Öffnung sind mitochondriale Schwellung, Depolarisation der mitochondrialen Membran, Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, ATP-Depletion und Zelltod (47, 68). Unter ischämischen Bedingungen bleibt das mPTP infolge des sauren pH-Milieus in Kardiomyozyten geschlossen. Es öffnet sich erst während der initialen Reperusionsphase als Reaktion auf Faktoren wie mitochondriale Ca^{2+} -Überlast, oxidativen Stress, ATP-Mangel und rasche pH-Wiederherstellung (47, 68). Therapeutische Ansätze, die diese induzierenden Faktoren während akuter Myokard-I/R-Events adressieren, könnten folglich indirekt das Öffnen des mPTP zu Reperusionsbeginn unterbinden und somit das Infarktausmaß reduzieren (47).

Experimentelle Untersuchungen bestätigen die Relevanz des mPTP als potentiell therapeutisches Ziel zur Minderung fataler Myokardreperfusionsschäden (47, 69, 70).

Eine Modulation der mPTP-Öffnung während der Reperfusion kann auch indirekt durch Optimierung der zellulären Bioenergetik, Kontrolle des oxidativen Stresses und Steigerung der Kreatin- sowie Phosphokreatin-Konzentrationen erreicht werden, wodurch die ATP-Verfügbarkeit steigt (47, 71). Abseits des mPTP-induzierten Zelltods existieren diverse mitochondriale Mechanismen, die zum Tod von Kardiomyozyten während akuter Myokard-I/R-Ereignisse beitragen, darunter Apoptose, Mitophagie, Nekroptose, Pyroptose und Ferroptose (47, 72). Die Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran bei Reperfusion begünstigt den Cytochrom-C-abhängigen apoptotischen Zelltod, welcher insbesondere während der Reperfusion auftritt. Interventionen, die sowohl die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom-C als auch die Caspase-Aktivierung hemmen, haben sich als protektiv bezüglich der Infarktgröße erwiesen (47, 72).

Nekroptose, eine spezifische Form des kontrollierten nekrotischen Zelltods, wird durch die Interaktion des Rezeptor-assoziierten Serin/Threonin-Protein-Kinase 3 (RIP3)

und des Phosphoglycerat-Familienmitglieds 5 (PGAM5) getriggert und trägt zum akuten myokardialen I/R-Geschehen bei, wobei eine mitochondriale Fragmentierung stattfindet (47, 73).

Pyroptose repräsentiert ein proinflammatorisches Zelltodprogramm, das infolge der Freisetzung schadensassoziierter molekularer Muster wie mitochondrialer DNA initiiert wird und zur Pathophysiologie des akuten Myokard-I/R beiträgt (47, 74).

Ferroptose ist charakterisiert durch einen kontrollierten Zelltod in Antwort auf eine Akkumulation von eisenbedingter Lipidperoxidation, die während des akuten Myokard-I/R aufgrund von mitochondrialem Eisenüberfluss und oxidativem Stress eintritt (47, 75). Gen- und Medikamenten-basierte Strategien zur Reduzierung des mitochondrialen Eisenanteils und oxidativen Stresses schützen nachweislich das Myokard vor Ferroptose-induziertem Zelltod nach akutem I/R-Geschehen (47, 76).

1.3.5 Mitochondriale Spalt- und Fusionsproteine für die Kardioprotektion

Mitochondrien präsentieren sich als dynamische Zellorganellen, die ständigen morphologischen Änderungen unterzogen sind. Sie durchlaufen Prozesse der Spaltung, wodurch fragmentierte, voneinander getrennte Mitochondrien entstehen. Diese Morphologie spielt insbesondere bei zellulären Teilungsvorgängen und bei der Eliminierung defekter Mitochondrien durch Mitophagie eine zentrale Rolle (47). Parallel dazu existiert der Prozess der Fusion, bei dem sich Mitochondrien zu elongierten, interkonnektiven Strukturen verbinden. Eine solche Fusion ist essenziell für die Reparatur mitochondrialer DNA und für die Erhaltung der mitochondrialen Atmungskapazität (47, 57). Ein Ungleichgewicht der Prozesse von Fusion und Fission kann die mitochondrialen Atemfunktionen, die Qualität der Organellen und die Zelltodempfindlichkeit im Kontext von Myokard-I/R-Ereignissen beeinflussen (47, 57). Im adulten Herzen präsentieren sich die überwiegenden kardialen Mitochondrien in einer fragmentierten Morphologie und sind dicht lokalisiert an drei intrazellulären Lokalisationen, welche die mitochondriale Mobilität beschränken: adjazent zu den Myofibrillen (IFM), sub-sarkolemmal (SSM) und in Nähe des Zellkerns (47).

Untersuchungen legen nahe, dass die für die mitochondrialen Dynamik verantwortlichen Proteine im Herzen exprimiert werden. Interessanterweise zeigen Experimente, dass eine genetische Depletion dieser Proteine der Spaltung oder Fusion zu

signifikanten Änderungen in der mitochondrialen Morphologie führt. Diese Morphologieveränderungen sind assoziiert mit einer kompromittierten mitochondrialen Atmungsleistung und manifestieren sich in einer dilatativen Kardiomyopathie. Diese Beobachtungen unterstreichen die essenzielle Rolle dieser Proteine für die Aufrechterhaltung der kardialen Homöostase (47, 57).

1.3.6 Mitochondriale Funktion bei Ischämie-Reperfusionsschaden

Die rasche und effektive Wiederherstellung des Blutflusses [Reperfusion] ist essenziell, um die Folgen der akuten Myokardischämie zu minimieren. Diese Reperfusion kann durch pharmakologische Maßnahmen oder durch chirurgische Interventionen erreicht werden, ist jedoch oft mit molekularen Schädigungen assoziiert (77–79).

Das I/R-Modell stellt ein prägnantes experimentelles Paradigma dar, um den Einfluss von oxidativem Stress auf Kardiomyozyten zu analysieren. Eine protrahierte Ischämie resultiert in Kardiomyozyten-Nekrose infolge inadäquater Sauerstoffzufuhr (78). Es wurde jedoch festgestellt, dass während der Reperfusion die betroffenen Zellen zusätzlichen, sekundären Schädigungen ausgesetzt sind, sobald die Oxygenierung wiederhergestellt wird (78).

Unter ischämischen Bedingungen manifestieren Kardiomyozyten Hypoxie und eine reduzierte Aktivität der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette. Dies resultiert in der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid, Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und Hydroxylradikalen. Speziell beeinflusst der I/R-Schaden die Funktionen der mitochondrialen Komplexe I und III, was zu einer gesteigerten ROS-Produktion aus NADH führt (77, 78). Eine Dysfunktion des Komplex I korreliert mit beschädigtem Kardiolipin, das die Elektronenleckage potenziert und ROS-Generation stimuliert (78, 80).

Weitere relevante ROS-Quellen im reperfundierten Myokard sind die Monoaminoxidase-Isoformen (MAO-A und MAO-B), lokalisiert an der äußeren mitochondrialen Membran (78). Während der Reperfusion trägt eine verstärkte MAO-A Aktivität zur Progression von linker Ventrikelhypertrophie und kardialem Remodeling bei. Ebenfalls potenziert ein gesteigerter mitochondrialer Eiseninflux die Generierung potenter Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid (76, 78).

Zusätzlich kompromittiert eine exzessive ROS-Produktion das dynamische Gleichgewicht von mitochondrialer Fission und Fusion (78, 81). Hierbei führt eine Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung von Schlüsselsubstraten zur Hemmung der Apoptose in geschädigten Mitochondrien (78, 82). ROS beeinflusst negativ die mitochondriale Fusion (78, 83) und die Reperfusion induziert die Aktivierung des mPTP-Kanals, welcher die Freisetzung von Cytochrom c und folglich die Apoptose stimuliert. Eine übermäßige ROS-Produktion während I/R korreliert mit Endothelzelloberfläche infolge beeinträchtigter Telomer-Integrität, was letztlich Apoptose begünstigt (78, 84).

Kardiomyozyten beherbergen distinkte mitochondriale Subpopulationen: [I] perinukleäre (PNM), [II] intermyofibrilläre (IFM) und [III] subsarkolämische (SSM) Mitochondrien. Diese unterscheiden sich in Morphologie, Funktion, Größe und Cristae-Organisation (85–87). Sie weisen nicht nur morphologische und biochemische Differenzen auf, sondern variieren auch in ihrer funktionellen Spezialisierung, abhängig von ihrer zellulären Lokalisation und den speziellen zellulären Anforderungen. Diese mitochondrialen Subtypen können unterschiedlich auf pathologische Prozesse, wie I/R (87, 88) und diverse Kardiomyopathien reagieren (89). Zudem variieren sie in ihrer Anfälligkeit und Funktionsstörungen gegenüber solchen schädigenden Einflüssen (87).

Hinsichtlich der mitochondrialen Morphologie können primär zwei Hauptpopulationen, nämlich subsarkolämische Mitochondrien (SSM) und interfibrilläre Myokardmitochondrien (IFM), differenziert werden (1). Diese Subpopulationen zeichnen sich durch diverse biochemische Eigenschaften und spezifische Anfälligkeiten für Ischämie aus. SSM neigen dazu, stärker durch ischämische Schädigungen betroffen zu sein, und ein diazoxid-vermittelter Schutzmechanismus scheint bei SSM besonders effektiv zu sein (1).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Levosimendan Effekte auf das Myokard sind bereits in Tiermodellen sowie klinischen Untersuchungen gut untersucht worden. Die Kenntnislage bezüglich seiner Effekte auf Mitochondrien während aktiver I/R-Schädigung bleibt bislang eingeschränkt.

Die Intention der vorliegenden Studie ist es, den modulatorischen Einfluss von Levosimendan im Kontext eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf Aspekte der myokardialen Mitochondrienfunktion hinsichtlich der Atmungskette, der Calciumhaushaltregulierung und der ATP-Synthese im Rattenherzmodell detailliert zu untersuchen.

Der vorliegende Forschungskontext ist auf den Erkenntnissen von Sommer et al. (2016) aufgebaut, wobei der Verfasser dieser Dissertation die experimentellen Untersuchungen und Auswertung eigenständig unter der Anleitung der Hauptautoren jener Publikation durchgeführt hat.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Apparaturen

Die nötigen Geräte, Software und Apparaturen sind in **Tabelle 1** dargestellt

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen

Methode / Gerät	Hersteller
Messung der Aktivität der Atmungskette	Clark Sauerstoff-Elektrode Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK
Herz-Perfusion	Langendorff Apparatur Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Analyse des mitochondrialen Membranpotentials, der mitochondrialen Calcium Resorption, des mitochondrialen ATP-Inhalts sowie der ATP-Produktion	Infinite® 200 Pro Multimode-Lesegerät Tecan, Crailsheim, Deutschland
Messung der mitochondrialen Permeabilität und Schwellung	Ultrospect 3000-Spektrophotometer Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden
Proteingehaltbestimmung Spektrophotometer	Tecan Spectra II Photometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
IKA® VORTEX GENIUS 5	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
IKA® T25 digital ULTRA TURRAX®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
5 ml Glaspotter Duall 22	Omnilab, Bremen, Deutschland
Zentrifuge I	Rotanta 46 R Zentrifuge Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge II	Multifuge 1 S-R Heraeus Holding GmbH, Deutschland
Alaris GH Spritzenpumpe	Cardinal Health, Dublin, Irland
Herzschrittmacher	Osypka Medical GmbH, Berlin, Deutschland
SAB 71 Waage	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland
Inkubator	Nu-5500 Autoflow IR Direct Heat CO2 Inkubator Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland

Methode / Gerät	Hersteller
Chirurgische Nahtmaterial	Eticon PROLENE® / PH-Seide Johnson & Johnson Medical GmbH
Hamilton® spritzen	Hamilton Company Nevada, USA
Datenbearbeitung, Analyse und Zeichnungen	Graphpad Prism für Mac OS X, Version 6.0 Graphpad Software, Inc Microsoft® Excel Oxygraph Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK Labchart® 6.0 ADInstruments Ltd – Europe Lucidapp, Biorender EdrawMax

2.2 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 2** dargestellt. Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien über die Firma Sigma Aldrich GmbH (München, Deutschland) bereitgestellt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Puffer/Assay	Zusammensetzung / Hersteller
Levosimendan	Simdax® Orion Oyj, Espoo, Finnland
Krebs-Henseleit-Lösung	180 mmol NaCl, 4,7 mmol KCl, 1,2 mmol MgSO ₄ , 1,25 mmol CaCl ₂ , 1,2 mmol KH ₂ PO ₄ , 25 mmol NaHCO ₃ , 11 mmol D-Glucose
Kardioplegie-Lösung	10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 180 mM KCl, pH 7,4
Isolationspuffer (Puffer 1)	0,225 mol/l Mannitol, 0,005 mol/l 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 0,075 mol/l Sucrose, 0,002 mol/l EDTA, 1 mg/ml bovines Serumalbumin, pH 7,4 (180 mM KCl, 10 mM EDTA und 0,5% Albumin bei pH 7,4)
Waschpuffer (Puffer 2)	0,225 mol/l Mannitol, 0,075 mol/l Sucrose, 20 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4 (225 mM mannitol, 75 mM sucrose und 20 mM Tris, pH 7.4)
Custodiol® Lösung	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Deutschland
Puffer zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (Respirationspuffer)	300 mM Mannit, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl und 5 mM MgCl ₂ , pH 7,2 (300 mM Mannit, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl und 5 mM MgCl ₂ , pH 7,2)
Puffer zur Lagerung von SSM	20 mM Hepes, 250 mM Saccharose, 10 mM MgCl ₂ und 12,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2

Puffer/Assay	Zusammensetzung / Hersteller
Puffer zur Analyse der mitochondrialen Ca-Resorption	250 mM Saccharose, 10 mM 3- (N-Morpholino) propansulfonsäure (MOPS) und 0,005 mM EGTA, pH 7,2
Puffer zur Analyse der mitochondrialen Ca-Retentionskapazität	250 mM Sucrose, 10 mM MOPS und 0,005 mM EGTA, pH 7,2
Puffer zur Messung der mitochondrialen Permeabilität und Schwellung	250 mM Saccharose und 5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
Biolumineszenz-Assay	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
400 nM 5,50,6,60 -Tetrachlor-1,10,3,30-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyaniniodid	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Bicinchonin-Assay	BCA-Kit, Fisher Scientific, Deutschland
HK141 ELISA Kit	Hycult Biotech, Uden, Niederlande

2.3 Versuchstiere

In der experimentellen Studie kamen männliche Wistar-Ratten (280g -320g) zum Einsatz, die von Janvier-Labs (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß europäischer Tierschutzstandards und den Richtlinien der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Die Tierversuchsgenehmigung wurde von der Bezirksregierung Unterfranken unter dem Aktenzeichen 31/11 erteilt. Die Pflege und Unterbringung der Tiere fand im Zentrum der operativen Medizin der Universitätsklinik Würzburg statt, wobei 5-6 Ratten pro Käfig mit Wasser, Fertigfutter und einem 24-stündigen Tag/Nacht-Zyklus versorgt wurden. (1).

2.4 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Langendorff-Herz-Perfusion angewandt. Hierbei handelt es sich um eine ex-vivo Technik, wobei das Herz aus dem Körper des Tieres entfernt wird. Über die Aorta wird eine retrograde Perfusion durchgeführt, mit einer nährstoffreichen, sauerstoffhaltigen Lösung (90–92). Der retrograde Druck bewirkt, dass die Aortenklappe schließt, wodurch die Versuchslösung in die Herzkranzgefäße zirkuliert. Dies speist Nährstoffe und Sauerstoff an den Herzmuskel, so dass es weiterhin für mehrere Stunden nach seiner Explantation aus dem Tier schlägt. Diese Methode ermöglicht die Zugabe von Medikamenten und die Beobachtung ihrer Wirkung isoliert auf das Herz ohne die Komplikationen im Rahmen von in-vivo-Experimenten (90–92).

Abgesehen von dem Perfusionsprotokoll war die Explantation, Mitochondrien-Aufarbeitung sowie alle restlichen Versuche identisch. Um die Wirkung von Levosimendan in Ab-/Anwesenheit der Ischämie zu untersuchen wurden die Versuchstiere zufällig 4 verschiedener Gruppen (n=8/Gruppe) zugewiesen.

Die Gruppeneinteilung ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3 Gruppeneinteilung

Gruppe	Bezeichnung	
Kontrollgruppe	Kontrol	30 min. Perfusion
Ischämiegruppe	IR	40 min. Ischämie, 30 min. Perfusion
Levosimendangruppe	Levo	30 min. Perfusion, Levosimendan-Gabe
Levosimendan-Ischämiegruppe	Levo IR	40 min. Ischämie, 30 min. Perfusion, Levosimendan-Gabe

Nach erfolgter Organexplantation wurden die Herzen an die Langendorff Apparatur angeschlossen. Es erfolgte zunächst eine 5 minutige Vorperfusionsphase, um eine Ausgangsgrundlage zu erzielen. Je nach -zufällig gewählter Gruppe- wurde die Perfusion fortgeführt oder die Ischämie eingeleitet. Die Levosimendangabe erfolgte in der Levo und Levo IR Gruppen in der (Re-)Perfusionsphase ab Minute 5 für insgesamt 20 Minuten bei einer Laufrate von $0.07\mu\text{mol}/\text{min}$.

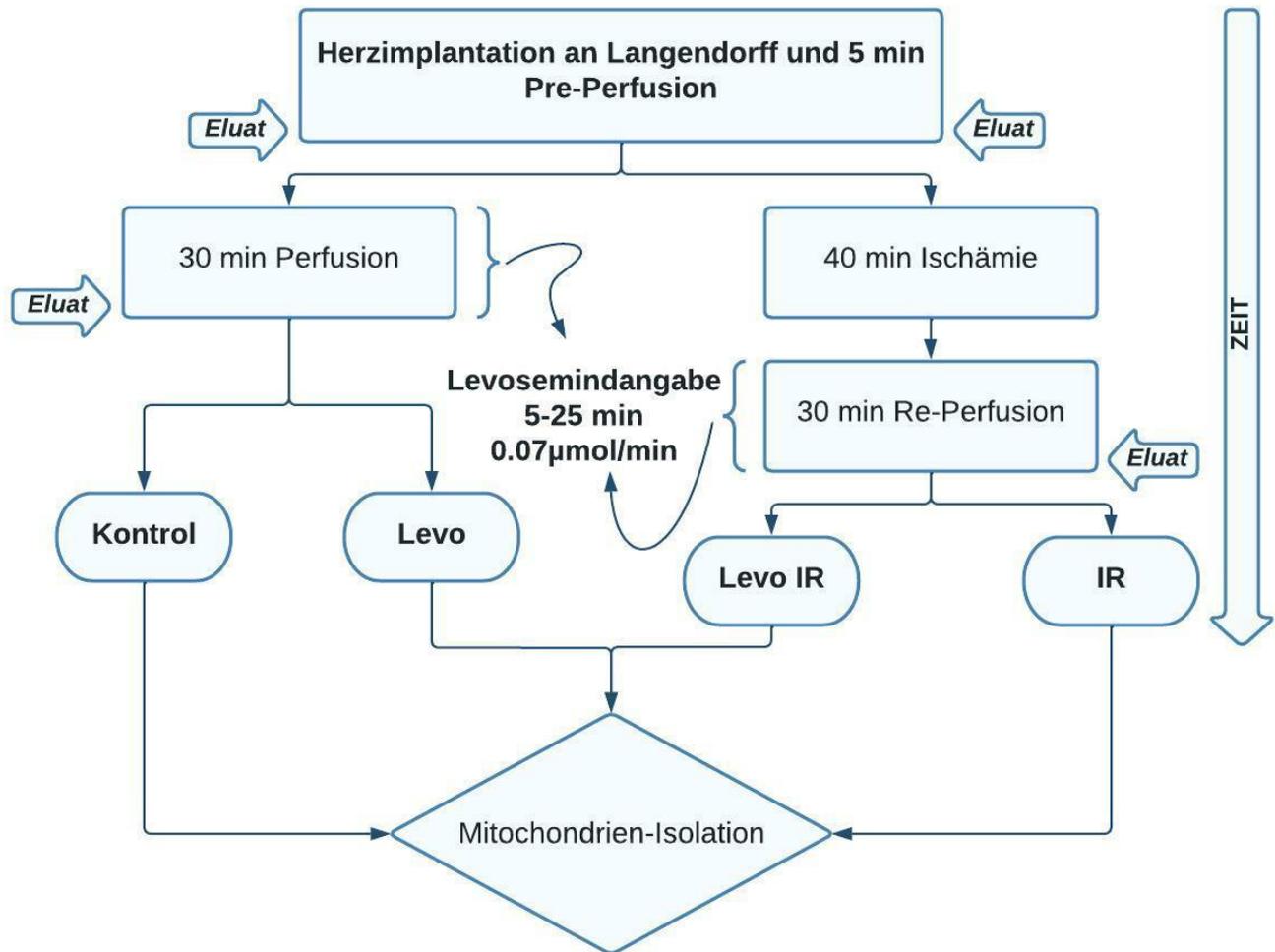


Abbildung 2 Flussdiagramm des Studiendesigns

Das Eluat wurde zur weiteren Bestimmung der kardialen Markers erneut zum Abschluss der Perfusion asserviert. Nach Beenden des Perfusionsprotokolls wurde unmittelbar mit der Mitochondrienaufarbeitung begonnen. Anschließend wurde die Funktion der Atmungskette sowie weitere unten genannte Versuche an den vitalen Mitochondrien parallel durchgeführt.

2.5 Langendorff Apparatur und Vorbereitung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden mit einem Isofluran/Sauerstoff (5%/95%) Gasmisch betäubt. Anschließend gewogen und rasiert. Nach Dekapitation erfolgte die Rückenlagerung und Hautantiseptikum. Der Brustkorb wurde mittels medianer Sternotomie eröffnet. Das Herz-Lungenpaket wurde schonend entnommen und in eine

eisgekühltes [Phosphat gepufferter] Saline (PBS) bis zum Erreichen des Herzstillstands eingebettet.

Auf einer feuchten eisgekühlten Gaze wurde unter dem Mikroskop die weitere Präparation durchgeführt. Nach Aortapräparation und Fixierung der Langendorff-Perfusionskanüle ca. 3-4mm oberhalb des Sinutubulären-Übergangs wurde -nach -Entlüftung- zur weiteren Kardioprotektion bis zur Langendorff-Implantation die kontinuierliche Herzperfusion mittels 4°C kaltem Custadiol® mit einer Laufrate von 10ml/h durchgeführt (Maximaler Custadiol®-Gabe Zeit 3 min. /Alaris GH Spritzenpumpe, Cardinal Health, Dublin, Irland).

Während dieser Zeit wurde die Lunge, die zu- und abführende Gefäße sowie das restliche anhaftende Bindegewebe mikrochirurgisch entfernt. Es erfolgte zunächst die Eröffnung des linken Vorhofes, um einen Zugang für die links-ventrikuläre Druckmessung mittels eines Ballonkatheters zu ermöglichen. Um mögliche Bradykardien zu beheben, wurde eine Schrittmacherelektrode epikardial am rechten Ventrikel mittels 8-0 PROLENE® fixiert. Anschließend erfolgte der Transport vom Kleintierlabor zur Langendorff-Apparatur.

Gemäß Protokolle zur Durchführung der Langendorffperfusion (93) wurde nach Anbringen der Perfusionskanüle samt Herzen an die Langendorffanlage die Spülung mit 1 ml 37°C- warmer Custadiol®-Lösung durchgeführt. Der deflatierte luftfreie Ballonkatheter wurde über den bereits eröffneten linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel platziert. Anschließend wurde die Perfusion mit Carbogenangereicherter (Dräger, Lübeck, Deutschland, 5 Vol.-% CO₂, 95 Vol.-% O₂) Krebs-Henseleit-Lösung begonnen. Dieser Zeitpunkt zeichnet dem Beginn der Stabilisierung Pre-Perfusionsphase. Ein konstanter Perfusionsdruck von 73,6 mmHg wurde am Steigrohr aufrechterhalten. Der externe Schrittmacher wurde angeschlossen und bei Bradykardie mit einer Frequenz von 100 Schläge pro Minute (Bpm) aktiviert. Der Ballonkatheter wurde mit H₂O bis zum Erreichen eines diastolischen Druckes (LVEDP) vom 18 mmHg luftblasenfrei gefüllt. Abhängig vom Versuchsprotokoll wurde mit der Perfusion und ggf. Levosemindangabe (Control, Levo) weiter fortgeführt oder die warme globale Ischämiephase eingeleitet (IR, Levi IR). Bei den Ischämie Gruppen wurde die Perfusion für 40 min. gestoppt, das Herz mit einem Deckel in dem 37°C warmen Schutztrichter vor Abkühlung geschützt und der Ballonkatheter wurde entleert. Das Eluat wurde bei 0 und 30 min. während der (Re-)Perfusion gesammelt und bei -80°C gelagert.

Anschließend wurden die Herzen in einen eisgekühlten Perfusionspuffer zur Isolierung von Mitochondrien überführt. Die Herzspitze (Apex) wurde für eine spätere Analyse bei -80°C gelagert.

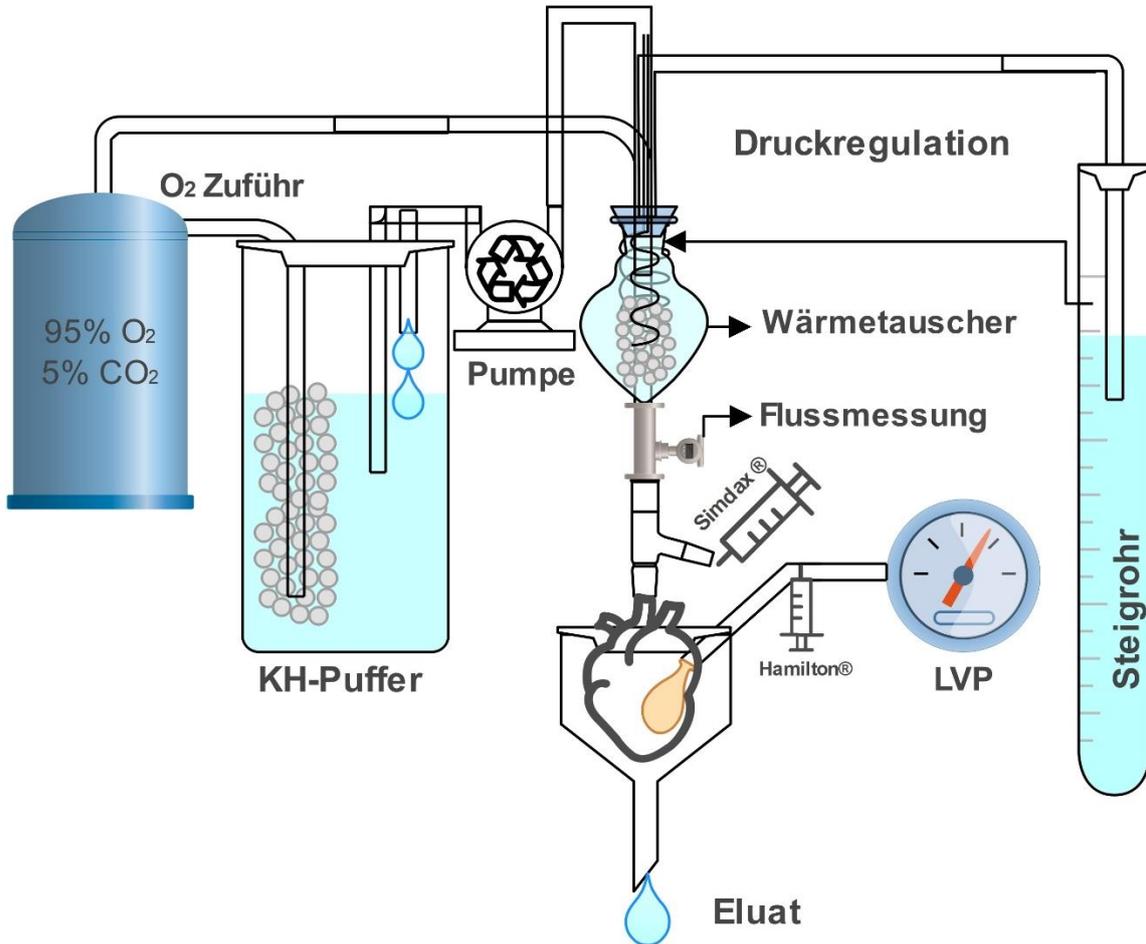


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Langendorff-Perfusionsapparates

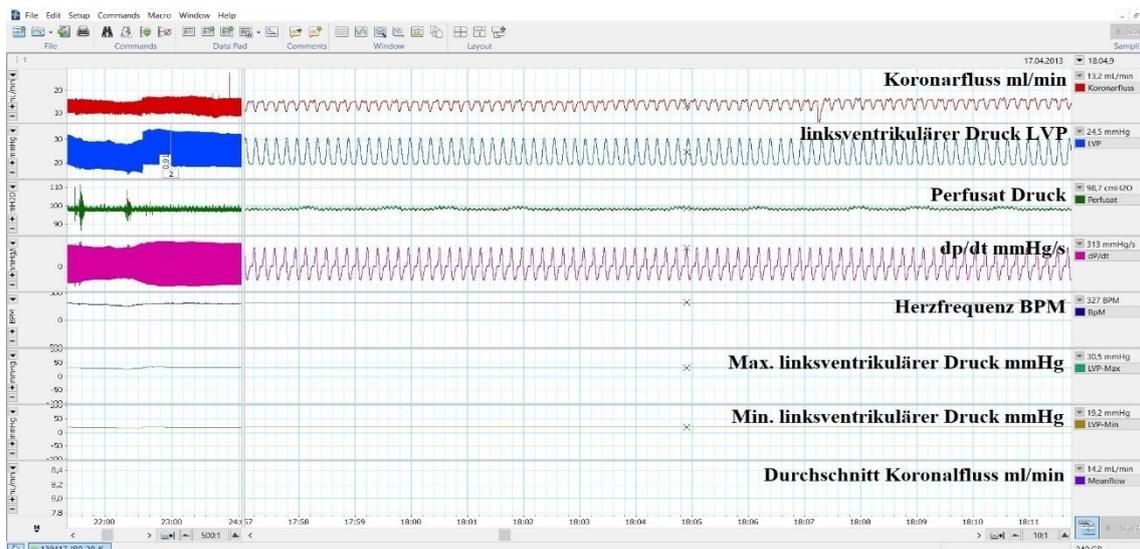


Abbildung 4 Messungen aus dem Langendorff-Versuch

2.6 Analyse der kardialen Enzyme

Troponin T, CK-MB-Isoenzym, Myoglobin und Herzfettsäure-Bindungsprotein (hFABP) wurden aus den Eluaten quantifiziert. Die Herzenzyme wurden nach den validierten Standardverfahren der lokalen Abteilung für medizinische Chemie der Universitätsklinik bestimmt. Die Werte wurden als internationale Einheiten pro Milliliter (U/ml) angegeben. hFABP wurde aus der Eluat- sowie auch aus der Zytoplastfraktion der SSM-Isolierung gemäß den Anweisungen des Herstellers (HK141 ELISA Kit, Hycult Biotech, Uden, Niederlande) quantifiziert (1).

2.7 Mitochondrienisolation

Die Mitochondrien wurden gemäß einem modifizierten Protokoll nach Palmer et al. (1977) (94, 95) unter Verwendung eines Isolationspuffers **Puffer 1** (180 mM KCl, 10 mM EDTA und 0,5% Albumin bei pH 7,4) durchgeführt. Das Gewebe wurde unter Verwendung der Potter-Technik dispergiert, gefolgt von differentiellen Zentrifugationsschritten. Das Waschen und Lagern des IFM/SSM-Pellets wurde in **Puffer 2** (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose und 20 mM Tris, pH 7,4) durchgeführt. Ein Bicinchonin-Assay bestimmte die SSM/IFM-Proteinkonzentrationen (1).

Nach stoppen der Langendorff-Perfusion wurde der Ballonkatheter deflatiert und aus dem linken Ventrikel gezogen. Nach Entfernen der Schrittmacherelektrode wurde das Herz diskonnektiert anschließend in Eis gekühlter PBS-Lösung eingebettet. Auf einer eisgekühlten Petrischale wurden die Vorhöfe, restliche Bindegewebe sowie die Herzklappen reseziert. Die Herzspitze wurde in Formalin für spätere Anfertigung von Paraffinblöcke eingelagert. Das Kammermyokard wurde zur Mitochondrien Aufarbeitung zuerst mittels Schere zerkleinert anschließend mittels Pinzette mit 5ml Puffer 1 in ein kleines Gefäß überführt. Es erfolgte die Homogenisierung mittels IKA® T25 digital ULTRA TURRAX (IKA, Staufen, Deutschland) für 1 min. auf Stufe 8 und 30 sek Auf Stufe 12.

Das Homogenisat wurde schrittweise mittels eines Glaspotters dispergiert mit 18ml **Puffer 1** vermischt und bei 500 g, 4°C 10 min. lang mit Rotana 46R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren SSM-Isolierung (Zentrifugenröhrchen 1) auf Eis gelagert. Das übrige Pellet wurde mit 10 mg Proteinase in 2 ml **Puffer 1** mit einer Einwirkzeit von 1,5 min. gelöst. Durch die Zugabe von 18ml **Puffer 1** wurde die Proteinase-Wirkung deaktiviert. Es erfolgte erneut das schrittweise

Dispergieren mittels Glasspotter anschließend das Zentrifugieren mit 4600g 4°C für 10 min. mit Multifuge® 1 S-R (Heraeus, Deutschland). Der Überstand wurde nun verworfen und das Pallet mit 20 ml **Puffer 1** gelöst und erneut bei 500g 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, Der Überstand mit den IFM sowie das im Zentrifugationsröhrchen 1 enthaltener SSM wurden mit 3000g 4°C für 10 min. mit Rotana 46R zentrifugiert. Der Überstand, der die zytosolische Fraktion der Mitochondrien wurde auf -80°C eingefroren. Die SSM und IFM-Pellets wurden mit **Puffer 2** aufgelöst und anschließend mit 3000g 4°C Rotana 46 R für 10 min. gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und das SSM/IFM-Pellet wurde auf ein Gesamtvolumen von 500µl mit **Puffer 2** aufgelöst.

Anhand der Hersteller Einweisung führten wir ein Bicinchoninsäure-assay Pierce® BCA (Thermo Scientific, Waltham, USA) zur Quantifizierung der Menge an IFM/SSM. Die Extinktion erfolgte bei $\lambda = 562$ nm mit einem Tecan Spectra II Photometer (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland). Anhand der Standardreihe wurde die Konzentration ermittelt.

Die gewonnenen Mitochondrien wurde durch einer vorangefertigte EXCL®-Vorlage anhand der Konzentration an allen weiteren Versuchen verteilt. Es wurde über den gesamten Verlauf auf suffiziente Kühlung geachtet.

2.8 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs.

Gemäß einem modifizierten Protokoll von Zini et al. (96) wurde der Sauerstoffverbrauch somit die Funktion der Atmungskette der isolierten Mitochondrien bei 25°C mittels Clark-Type Elektrode (Oxytherm System, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) polarographisch gemessen. Die Elektrode besteht aus einer Silber-Anode, und eine Platin-Kathode, die über eine Messkammer elektrisch unter eine Polarisationsspannung stehen. Die Metallelektroden sind mit einem KCL-Lösungshaltiger Papierträger und einer Sauerstoffdurchlässige Polytetrafluorethylen (PTFE) Membran überzogen und somit von der Messgut-lösung getrennt. Diffundiert das Sauerstoff O₂ entsprechend sein Partialdruck durch die Membran so wird es an der Messkathode reduziert. An der Anode kommt es hingegen zu einer Oxidation des Silbers zu Silberionen. Proportional zu dem Sauerstoffpartialdruck in der Messkammer entsteht ein elektrischer Strom I, der mit einem Amperemeter aufgezeichnet wird. Kommt es zu einem Sauerstoffverbrauch der mitochondrialen Atmungskette in der Messkammer, wird dies durch Stromstärkeveränderung registriert (97, 98).

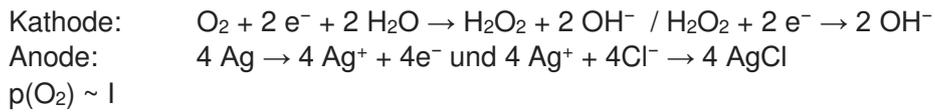


Abbildung 5 Clark-Type Elektrode mit Oxytherm System

(modifiziert nach freundlicher Genehmigung Hansatech Instruments Ltd)

Gemäß der Hersteller Angaben wurde die Elektrode regelmäßig gewartet, gewechselt und gereinigt. Vor jedem Versuchstag wurde die Elektrode mit einer neuen Membran bezogen und bei 25°C mit einer Kammer-Rührer Umdrehung von 75/min. kalibriert.

Zur Aktivitätsanalyse der einzelnen Atmungskettenkomplexe wurde eine Messzeit von einer Minute nach entsprechender Substratsgabe gewählt. Über die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs pro Zeiteinheit ($d\text{O}_2/dt$) und die daraus entstandene Kurvenveränderung wurden die Raten Z2 und Z3 berechnet. Der respiratorische Kontrollindex wurde aus dem Verhältnis Z3/Z2 errechnet.

Entsprechend eines modifizierten Protokoll nach Zini et al und Rustin et al (96, 99) wurde die Messung mit jeweils 150µg Mitochondrien auf 400µl **Puffer 2** (Konstante Proteinkonzentration 0,375µg/µl) bei 25°C und Rührer Umdrehung von 75/min. wie folgt durchgeführt:

Komplex I-V

Äquilibration 30 Sek.	Z2 Atmung 1 min.	Z3 Atmung 1 min.
400µl Mitochondrien	5 µl Pyruvat (1M) /5 µl Malat (1M)	5 µl ADP (0,2mM)

Komplex II-V

Äquilibration 30 Sek.	Blockade Komplex I und Z2 Messung 1 min.	Z3 Atmung 1 min.
400µl Mitochondrien	5 µl Rotenone (0,2 mM) 5 µl Succinat (1M)	5µl ADP (0,2M)

Blockade der ATP-Synthase (Komplex V)	Entkoppler
5 µl Oligomycin (1 mM)	5µl CCCP (1mM)

Komplex IV

Äquilibration 30 Sek.	Blockade Komplex I und V Messung 1 min.	Entkoppler
400µl Mitochondrien	5 µl Rotenone (0,2 mM) + 5 µl Succinat (1mM) +5 µl Oligomycin (1 mM)	5µl CCCP (1mM)

Blockade Komplex III	Elektronendonator für Komplex IV anschließend Aktivitätsmessung
5 µl Antimycin (0,1mM)	5 µl Ascorbat (0,5 M), 5 µl TMPD (0,1 M)

2.9 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

100 µg SSM wurden in einem 200 µl Puffer (20 mM Hepes, 250 mM Saccharose, 10 mM MgCl₂ und 12,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) suspendiert und mit 10 mM Succinat versetzt. Rotenon in einer Konzentration von 2 mM verhinderte den Elektronen-Rückfluss im Atemketten-Komplex I. Das SSM wurde mit JC1, einem Farbstoff von Enzo Life Sciences, markiert. Die grüne JC1-Fluoreszenz bei 525 nm entspricht JC1-

Monomeren, während die Bildung von J-Aggregaten eine orangene Fluoreszenz bei 590 nm erzeugt, die von einem Infinite® 200 Pro-Lesegerät erfasst wird. Das Verhältnis von J-Aggregat-zu JC1-positiven Mitochondrien wurde in nativen Mitochondrien nach JC1-Färbung und nach Succinat-Stimulation ermittelt. Nach einer CCCP-induzierten (20 mM) Entkopplung von SSM wurde die Stabilität von $\Delta\Psi_m$ beurteilt, wobei der Abfall von $\Delta\Psi_m$ durch den Unterschied zwischen den Maximal- und Minimalwerten vor und nach der CCCP-Entkopplung bestimmt wurde (1).

2.10 Analyse der mitochondrialen Calcium Aufnahme und Freisetzung

Zu 200 μg SSM wurden Pyruvat und Malat (jeweils 2,5 mM) in einem Puffer hinzugefügt. Der Puffer bestand aus 250 mM Saccharose, 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) und 0,005 mM EGTA bei einem pH-Wert von 7,2. Um die Ca^{2+} -Aufnahme der SSM zu bestimmen, wurde 0,5 μM Calcium Green®-5N bei einer Temperatur von 25 °C verwendet. Die Injektion von 50 μM Ca^{2+} initiierte die Ca^{2+} -Aufnahme. Ein Infinite® 200 Pro-Multimodus-Lesegerät erfasste das Signal freier extra-mitochondriale Ca^{2+} -Ionen bei Anregung und Emission bei 500 nm bzw. 530 nm (1).

2.11 Analyse der mitochondrialen Calcium Retentionskapazität

Gemäß einem modifizierten Protokoll von Matas et al. (2009) wurden aktivierte Mitochondrien (2,5 mM Pyruvat / Malat) in einem Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM MOPS und 0,005 mM EGTA, pH 7,2) mit 0,5 μM Calcium Green®-5N bei 25 °C inkubiert (Sommer et al., 2016). CaCl_2 -Impulse (5 μmol), die in Intervallen von 60 s appliziert wurden, bestimmten die Ca^{2+} -Menge, die zur mPTP-Öffnung erforderlich ist. Ein schnelles Fluoreszenzinkrement zeigte die SSM- Ca^{2+} -Freisetzung durch mPTP-Öffnung. In einem parallelen Assay verzögerte die zusätzliche Anwendung von 0,5 μM Cyclosporin A (CsA) die mPTP-Öffnung (1).

2.12 Messung der mitochondrialen Permeabilität und Schwellung

Die Ca^{2+} -induzierte Schwellung von aktivierten SSM wurde nach einem modifizierten Protokoll von Simon et al. (2003) durchgeführt. SSM (165 μg) wurde in 200 μl -Puffer (250 mM Saccharose und 5 mM KH_2PO_4 , pH 7,2) suspendiert. Der Atemketten-Komplex I wurde durch 3 μM Rotenon blockiert. Die Zugabe von 6 mM Succinat aktivierte die SSM. Die Zugaben von Ca^{2+} (50 μM) induzierte die Schwellung, bestimmt durch eine Verringerung der Absorption bei 520 nm durch ein Ultrospect 3000-Spektrophotometer (GE Healthcare, München, Deutschland). Die Ca^{2+} -induzierte Schwellung wurde in einem parallelen Test durch 50 mM Pyruvat inhibiert (1).

2.13 Analyse des mitochondrialen ATP-Inhalts sowie der ATP-Produktion

Zum Nachweis des ATP-Gehalts wurden 100 μg SSM mit 2,5 mM Pyruvat und Malat versetzt. Der Biolumineszenz-Assay wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers (Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die ATP-Produktion wurde in aktiviertem SSM (50 μg) quantifiziert und mit steigenden ADP-Konzentrationen (0,4, 0,5 und 0,6 μM) inkubiert. Das Biolumineszenzsignal wurde mit einem Infinite® 200 Pro Multimode-Lesegerät (Tecan, Crailsheim, Deutschland) detektiert (1).

2.14 Datenanalyse

Die Datenerfassung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Die Datenanalyse wurde mit Graphpad Prism für Mac OS X, Version 6.0, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Eine Analysis of Variance (ANOVA) wurde in Kombination mit Bonferroni-Korrekturformel-Vergleichstests angewendet, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen. Die Analyse der kontinuierlichen Daten wurde unter Verwendung einer Zwei-Wege-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für mehrere Vergleichstests durchgeführt. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (1).

3 Ergebnisse

Die Forschung an isolierten Mitochondrien hat in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen, da sie zentrale Akteure in der Energieproduktion und -regulation von Zellen sind. Ihre Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen und ihre potenzielle Beteiligung an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen machen sie zu einem wichtigen Untersuchungsgegenstand (100).

Der Fokus der vorliegenden Studie wurde auf diese Aspekte gelegt. Dementsprechend wurde in dieser Studie der Einfluss von Levosimendan und die Auswirkungen des Ischämie/Reperfusion-Schadens analysiert. Ferner wurde die Kombination beider Faktoren auf die Funktion des isolierten Rattenherzens und im Anschluss auf deren mitochondriale Funktion untersucht.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen systematisch und gemäß ihrer experimentellen Abfolge dargestellt. Zunächst wird die myokardiale Funktion beleuchtet, danach erfolgt eine eingehende Analyse der myokardialen Marker.

Nach Abschluss der Langendorffperfusion, wie im Versuchsablauf skizziert, wurde die Isolierung der Herz-Mitochondrien durchgeführt. Daraufhin folgten spezifische Experimente mit diesen isolierten Mitochondrien. Hierbei wird zunächst die Atmungskette und das mitochondriale Membranpotential betrachtet. Anschließend konzentriert sich der Fokus auf den mitochondrialen Calcium-Stoffwechsel, wobei Aspekte wie die Ca^{2+} -Aufnahme und -Freisetzung, die mitochondriale Ca^{2+} -Retentionskapazität (CRC) und die Empfindlichkeit des mitochondrialen mPTP gegenüber Ca^{2+} im Vordergrund stehen. Den Schlusspunkt setzt eine detaillierte Betrachtung der mitochondrialen ATP-Produktion und deren Kapazität.

Ein Teil der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erlangte Anerkennung durch ihre Publikationen im *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* (1, 101).

3.1 Myokardiale Funktion

Die Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe führte zu einem Verlust des maximalen systolischen Drucks im linken Ventrikel (LVP_{sys}, $p = 0,04$). Ein ähnlicher Verlust von LVP_{sys} ($p = 0,001$) wurde bei Levo-IR im Vergleich zu Levo festgestellt (Abbildung 6).

Darüber hinaus induzierte die Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Verlust der linksventrikulären Kontraktilität (LVdp/dt_{max}, $p = 0,004$). Ein signifikanter Verlust von LVdp/dt_{max} ($p < 0,0001$) wurde ebenfalls bei Levo-IR im Vergleich zu Levo beobachtet (Abbildung 7).

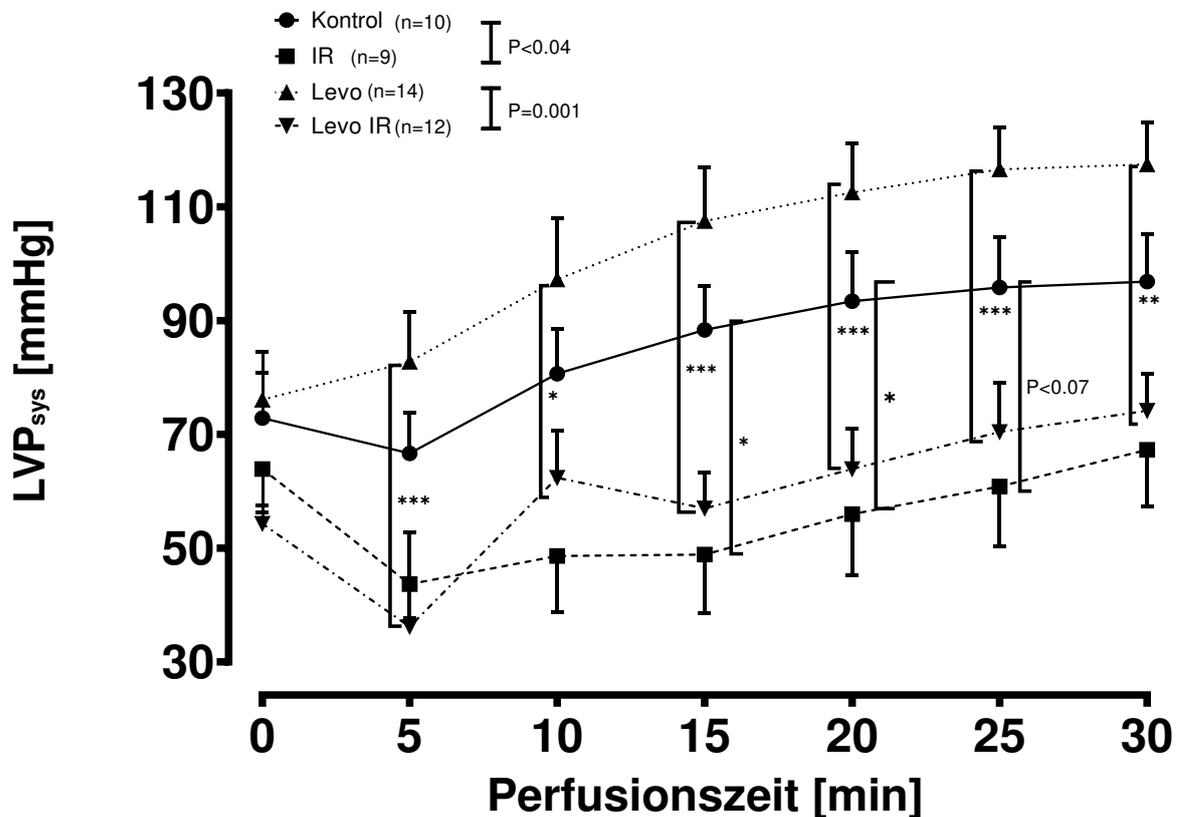


Abbildung 6 Myokardfunktion 1

(LVP_{sys}, maximaler linksventrikuläre systolische Druck).

Der Zeitpunkt „0“ gibt den Beginn der Datenerfassung nach der Perfusion (Kontrol und Levo) oder nach beenden der Ischämie (IR und Levo IR) an. Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ausgedrückt. Sternchen geben statistische Signifikanzen der Zeilen an (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). LVP_{sys}: linksventrikulärer Druck

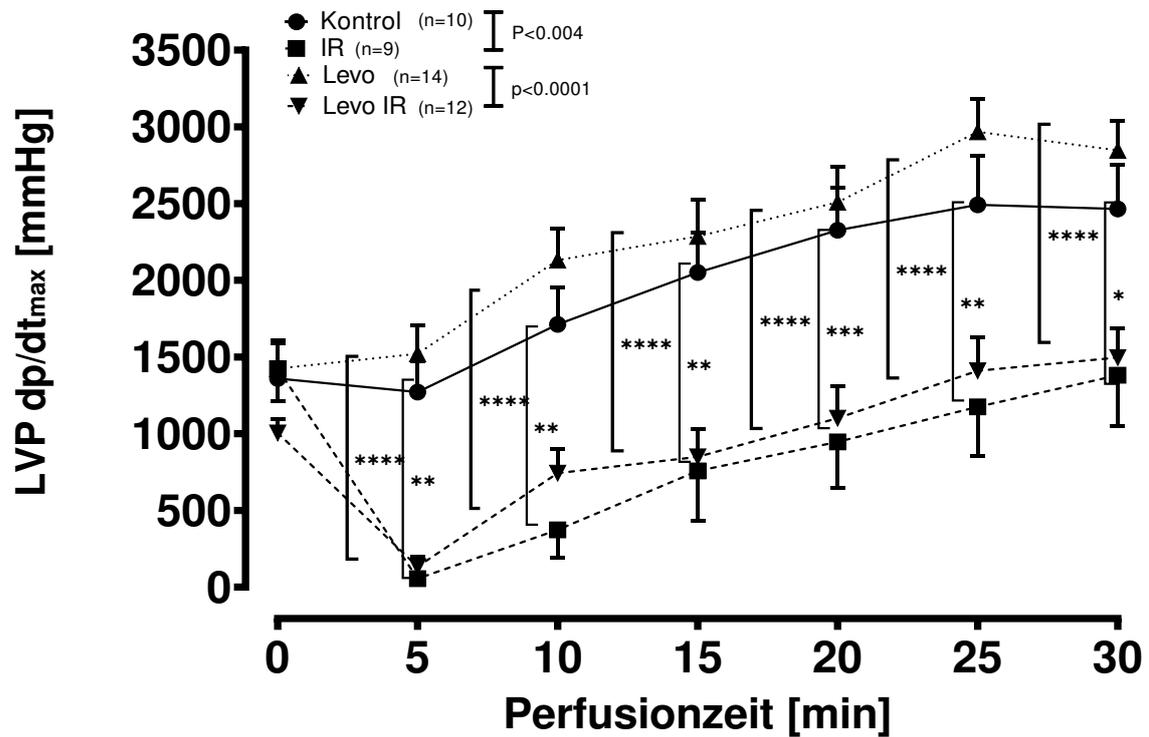


Abbildung 7 Myokardfunktion 2

(LVdp / dtmax: Linksventrikuläre Kontraktilität.)

Der Zeitpunkt „0“ gibt den Beginn der Datenerfassung nach der Perfusion (Kontrol und Levo) oder nach beenden der Ischämie (IR und Levo IR) an. Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ausgedrückt. Sternchen geben statistische Signifikanzen der Zeilen an (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001). LVdp / dtmax: Linksventrikuläre Kontraktilität.

3.2 Myokardiale Marker

Die aus dem Eluat ermittelten myokardialen Marker [Trop T, CK-MB, LDH, GOT, Myoglobin und hFABO] zeigten signifikante Unterschiede zwischen den IR-Gruppen (IR und Levo IR) und den entsprechenden Kontrollgruppen (Kontrol und Levo) nach 30 min. Reperfusion für Troponin T, CK-MB, Myoglobin, hFABP, LDH und GOT. Levosimendan hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung myokardialer Markerenzyme.

Zu Beginn des Versuches gab es keine signifikanten Unterschiede in den Troponin T-Werten zwischen den Gruppen IR, und Levo IR im Vergleich zu dessen Kontrollen. Nach 30 Minuten Perfusion waren jedoch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und IR ($651,3 \pm 583,0$ gegenüber $2541,3 \pm 1502,7$ pg/ml; $p = 0,0009$) sowie zwischen Levo und Levo IR ($1427,1 \pm 1122,1$ gegenüber $4223,3 \pm 1340,2$ pg/ml; $p < 0,0001$) zu beobachten (Abbildung 8.)

Ähnliche Ergebnisse wurden für CK-MB unter den Kontrol, IR, Levo und Levo-IR beobachtet. Nach 30 min. Perfusion zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und IR ($0,3 \pm 0,3$ gegenüber $23,4 \pm 28,2$ U/l; $p = 0,0366$) oder Levo und Levo-IR ($8,7 \pm 10,3$ vs. $30,5 \pm 20,4$ U/l; $p = 0,0227$) (Abbildung 9).

Myoglobin- und hFABP-Werte wurden ausschließlich nach 30 min. Perfusionszeit erhalten. Bei Myoglobin zeigten sich Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und IR ($18,3 \pm 10,1$ vs. $224,5 \pm 128,5$ ng / ml; $p = 0,0004$) sowie IR und Levo IR ($19,7 \pm 4,1$ vs. $111,1 \pm 33,5$ ng / ml; $p = 0,0816$) (Abbildung 10).

hFABP wurden signifikante Unterschiede zwischen Levo und Levo IR ($0,72 \pm 0,88$ gegenüber $2,82 \pm 1,21$ µg / mg Protein; $p < 0,002$) festgestellt (Abbildung 11).

Bei der Laktatdehydrogenase wurden Signifikate Unterschiede nach 30 min. Perfusionszeit zwischen der Levo und Levo IR beobachtet ($4,9 \pm 6,4$ vs. $24,3 \pm 12,5$ U/l $p = 0,0017$) (Abbildung 12).

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase unterschied sich nach 30 min. Perfusion in den Kontrol vs. IR sowie Levo vs. Levo IR ($0,5 \pm 0,09$ vs. $17,9 \pm 15,5$ U/l; $p = 0,0052$ sowie $5,4 \pm 6,5$ vs. $15,6 \pm 7,8$ U/l; $p = 0,0147$) (Abbildung 13).

Die Messergebnisse sind in **Tabelle 4 Myokardiale Enzymmarker** zusammengefasst.

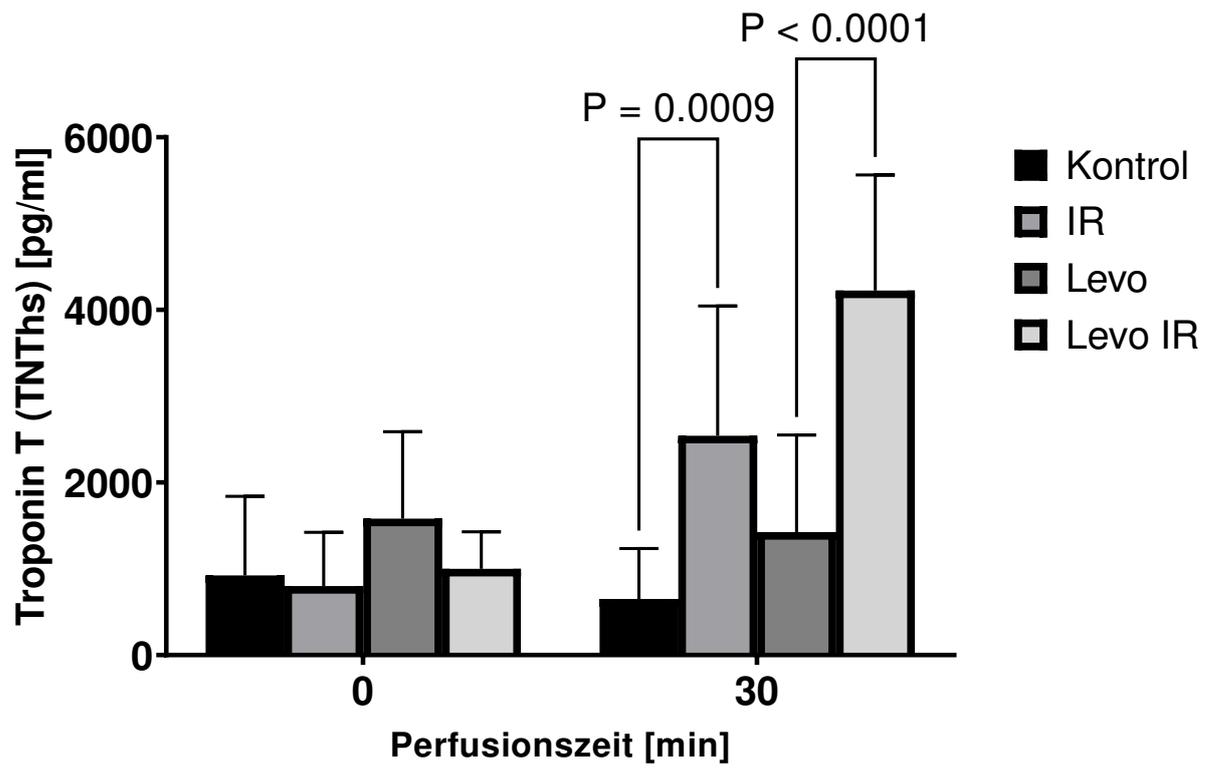


Abbildung 8 High sensitiv Troponin

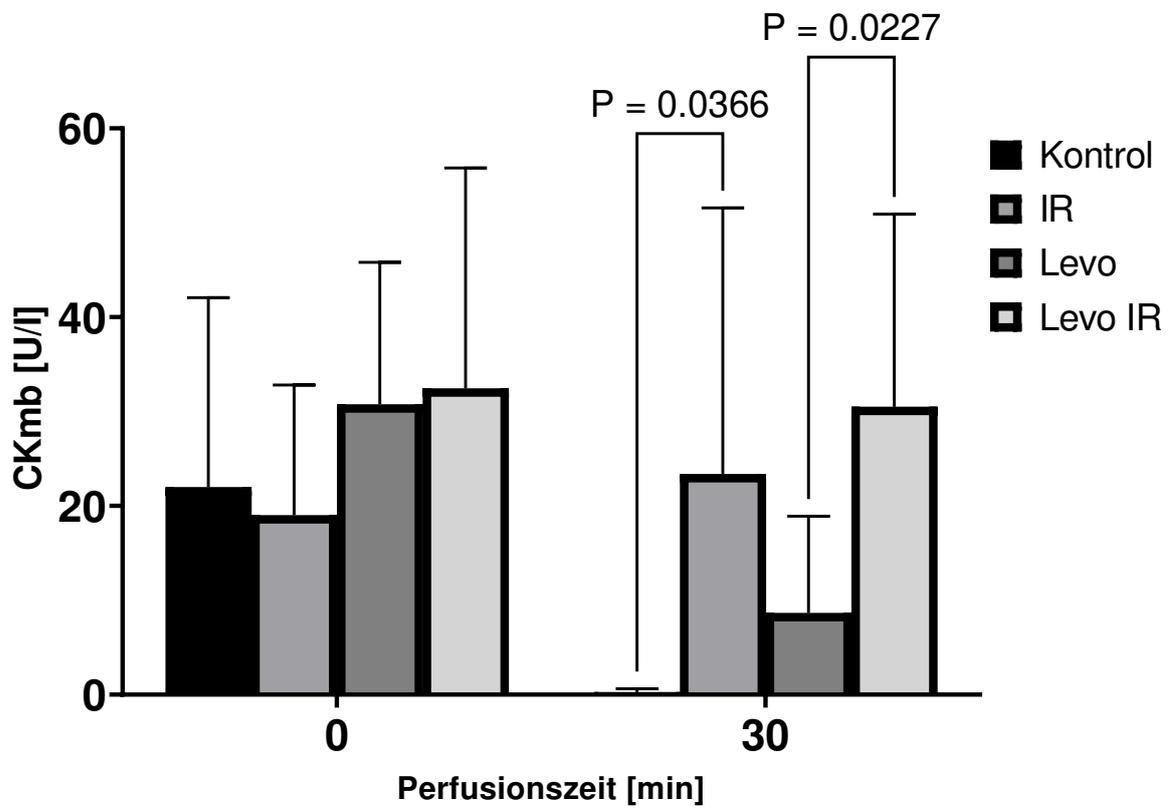


Abbildung 9 CK-MB

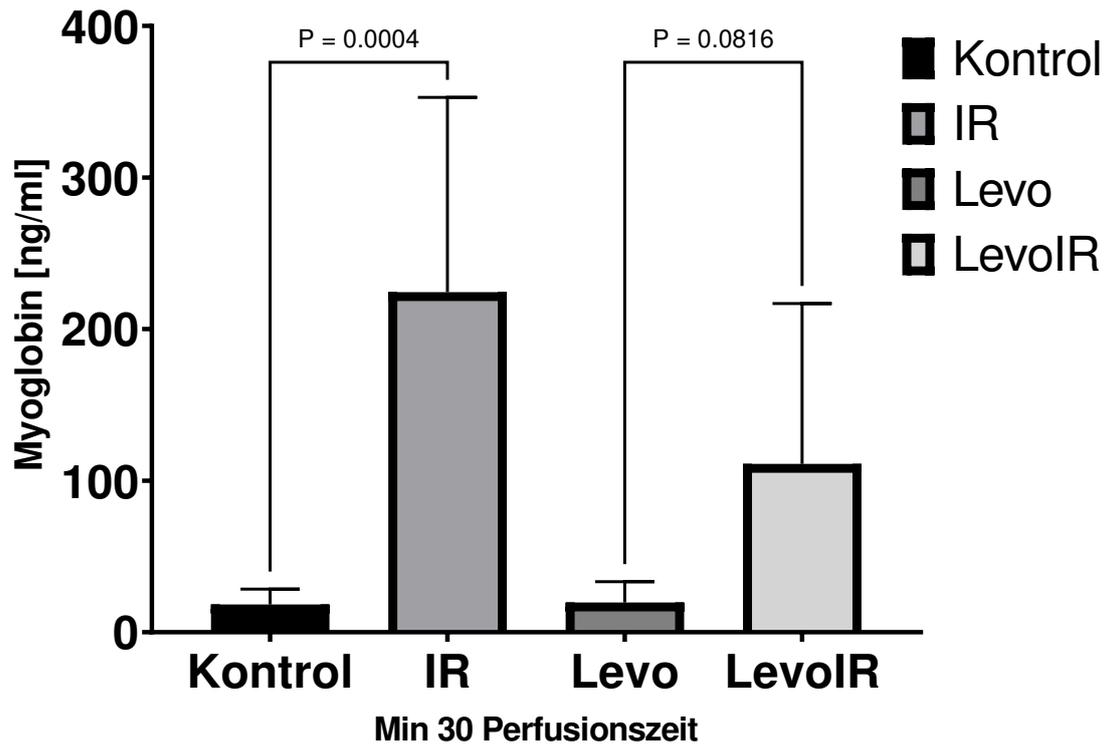


Abbildung 10 Myoglobin

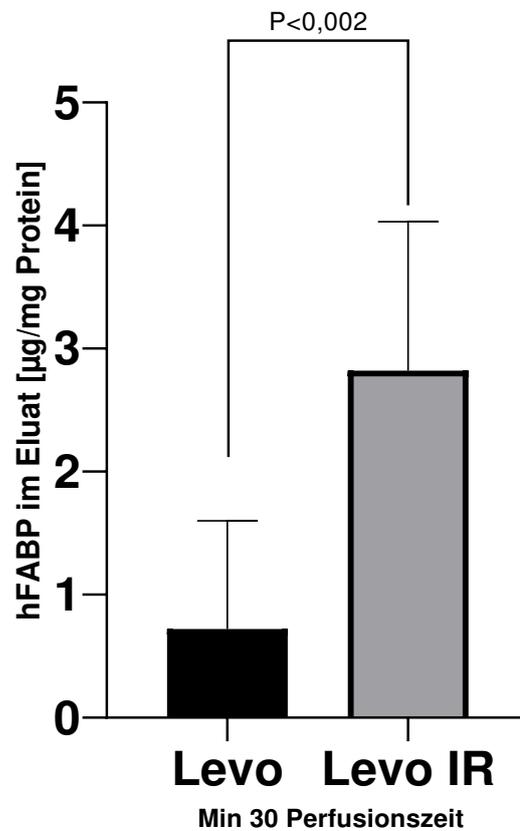


Abbildung 11 hFABP

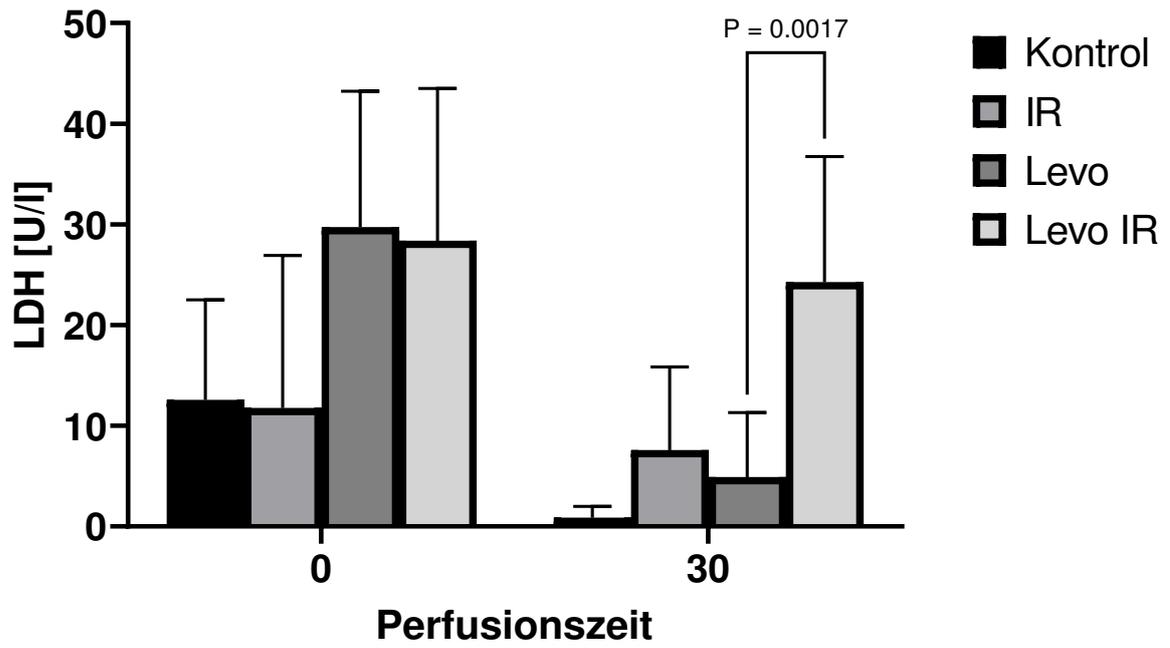


Abbildung 12 LDH

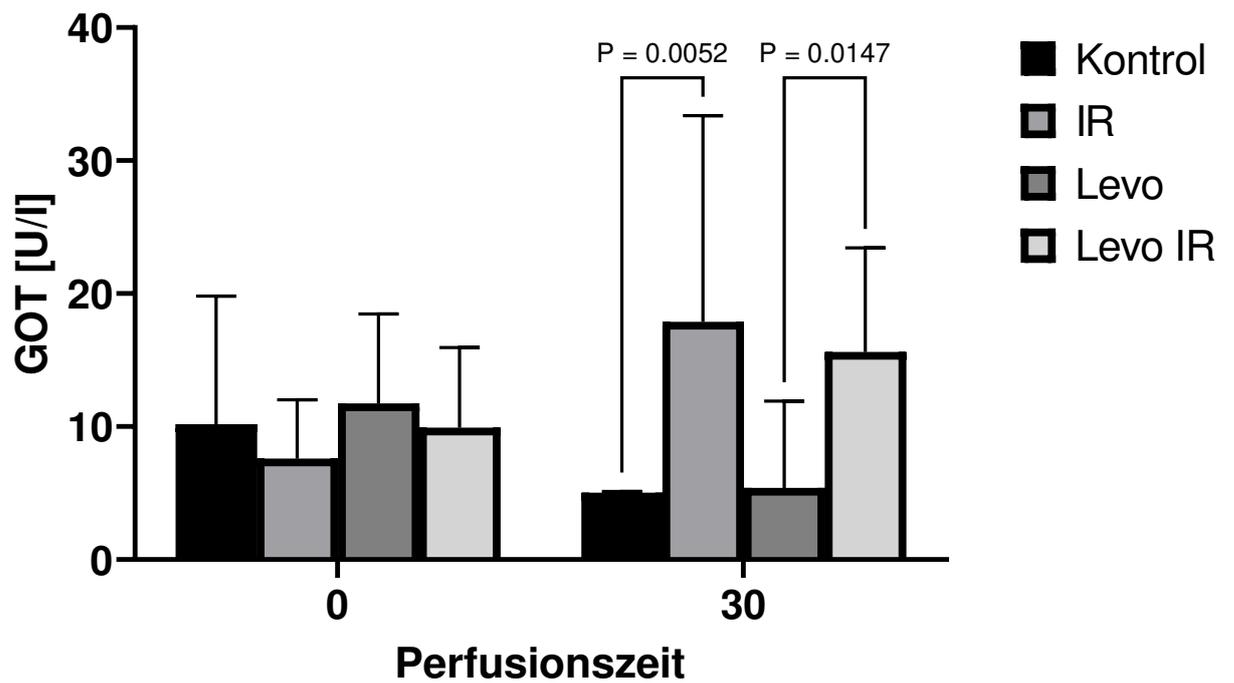


Abbildung 13 GOT

Tabelle 4 Myokardiale Enzymmarker

	Zeitpunkt (min.)	Kontrol (n=10)	IR (n=8)	Levo (n=13)	Levo IR (n=10)
Trop T	0	924,7 ±914,2	798,9±625,4	1582,3±1007,5	999,0±428,5
[pg/ml]	30	651,3±583,0	2541,3±1502,7	1427,1±1122,1	4223,3±1340,2
CKmb	0	21,9±20,1	19,1±13,8	30,7±15,1	32,5±23,4
[U/l]	30	0,3±0,3	23,4±28,2	8,7±10,3	30,5±20,4
LDH	0	12,5±9,9	11,7±15,1	29,7±13,5	28,4±15,1
[U/l]	30	0,87±1,12	7,5±8,2	4,9±6,4	24,3±12,5
GOT	0	10,1±9,6	7,5±4,4	11,7±6,7	9,9±6,1
[U/l]	30	05,0±0,09	17,9±15,5	5,4±6,5	15,6±7,8
Myoglobin [ng/ml]	30	18,3±10,1	224,5±128,5	19,7±4,1	111,1±33,5
hFABP [µg/mg Protein]	30	Unter der Messbaren Grenze		0,72 ± 0,88	2,82 ± 1,21

3.3 Analyse der Atmungskette

Komplex I-V

Im Rahmen der SSM-Untersuchung wurde festgestellt, dass die Ischämie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verlangsamte Atmung im Zustand 3 in Bezug auf Komplex I-V ($p=0,044$) aufwies. Die Levosemindan-Gruppen (Levo und Levo IR) zeigten ebenfalls im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen eine signifikante reduzierte Zustand 3 Atmung (Kontrol vs. Levo ($p < 0,0001$) und IR vs. Levo IR ($p = 0,06$)). (Abbildung 14)

Für den Respirationszustand 3 bei der Analyse von Komplex I-V in den IFM-Ergebnissen wurden ähnliche, wenn auch weniger signifikante Ergebnisse gefunden (Kontrol vs. IR ns; Kontrol vs. Levo ns; Levo vs. Levo IR ($P=0,0237$) IR vs. Levo IR ($p=0,0052$) Kontrol vs. Levo IR ($p < 0,0001$)) (Abbildung 15).

Komplex II-V

Im Falle von Komplex II-V wurde eine hochsignifikante Reduktion der Atmung im Zustand 3 bei den Gruppen IR, Levo und Levo-IR im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden ($p < 0,0001$) (Abbildung 16). Die Ergebnisse der IFM-Analyse zeigten ähnliche, jedoch nicht signifikante Tendenzen (Abbildung 17).

Komplex IV

Hinsichtlich Komplex IV zeigte die Levo-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine eingeschränkte Atmung ($p = 0,04$) (Abbildung 18). Die IFM-Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es keine signifikanten Unterschiede gab, aber dennoch eine reduzierte Atmung im Vergleich zu den Kontrollen vorlag. (Abbildung 19)

In diesem Zusammenhang war eine signifikante Hemmung der Atmungskette durch die Kombination von Ischämie und Levosemindan summiert, verglichen mit der Kontrolle.

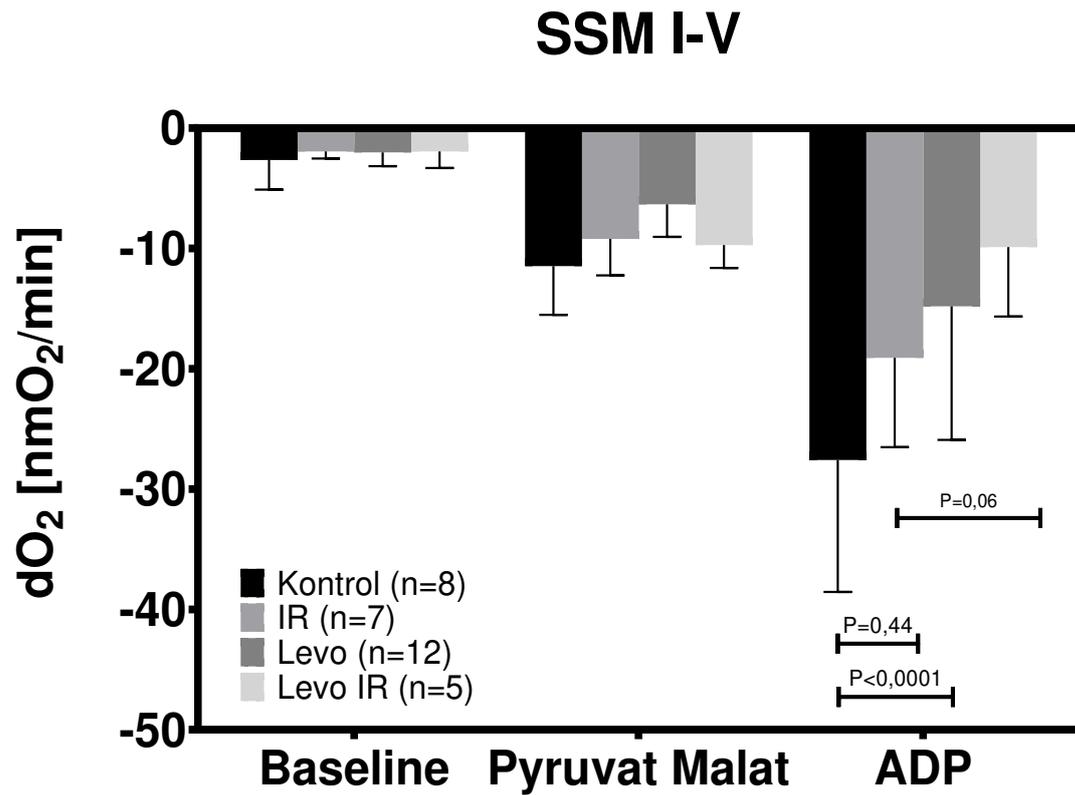


Abbildung 14: Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex I-V.
 Werte wurden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt.

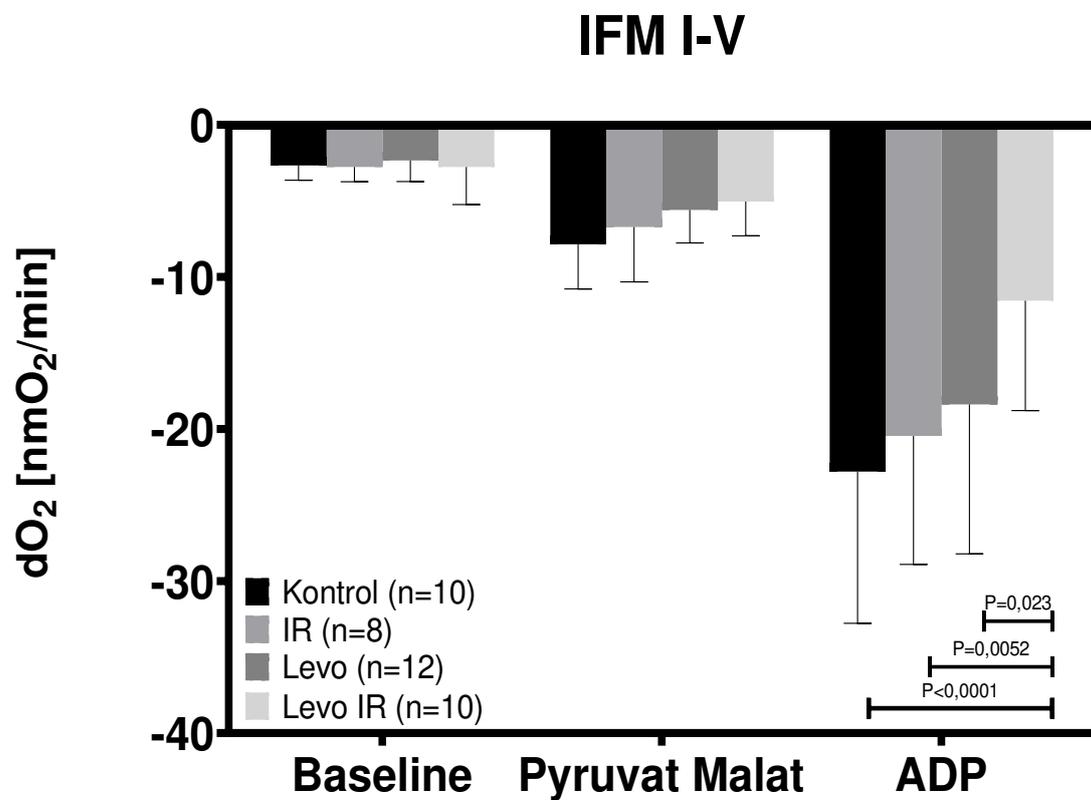


Abbildung 15 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex I-V.
 Werte wurden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt.

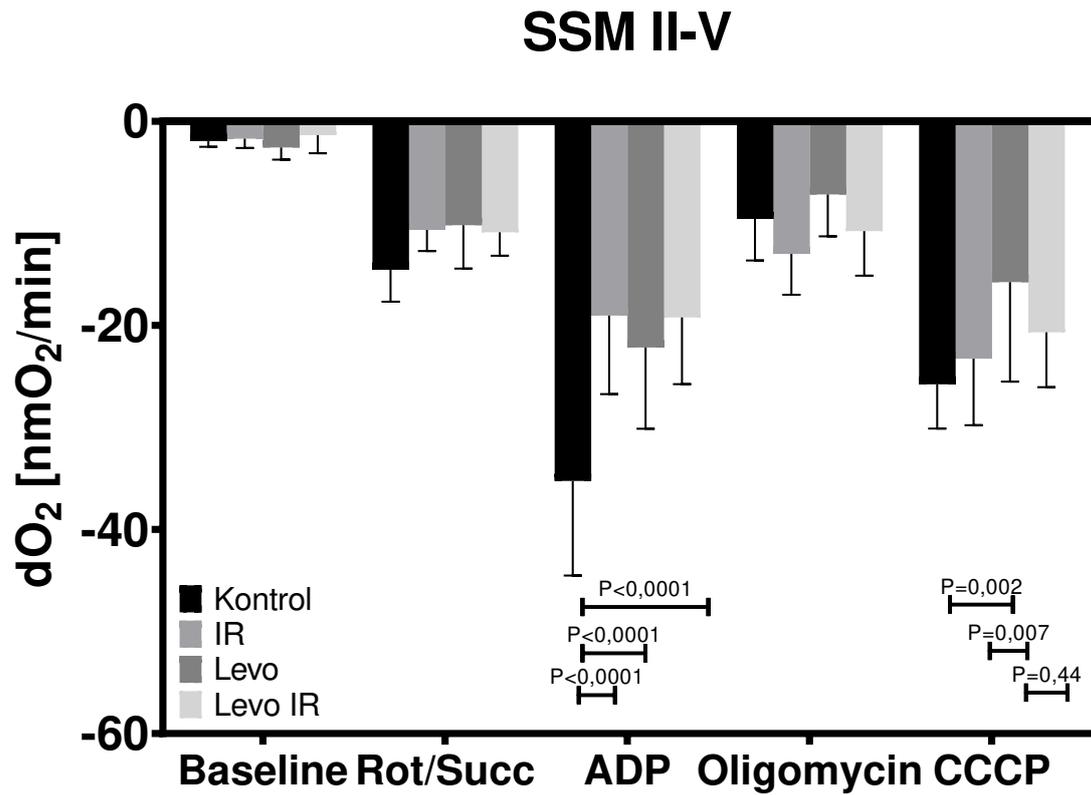


Abbildung 16 Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex II-V.
Werte wurden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt

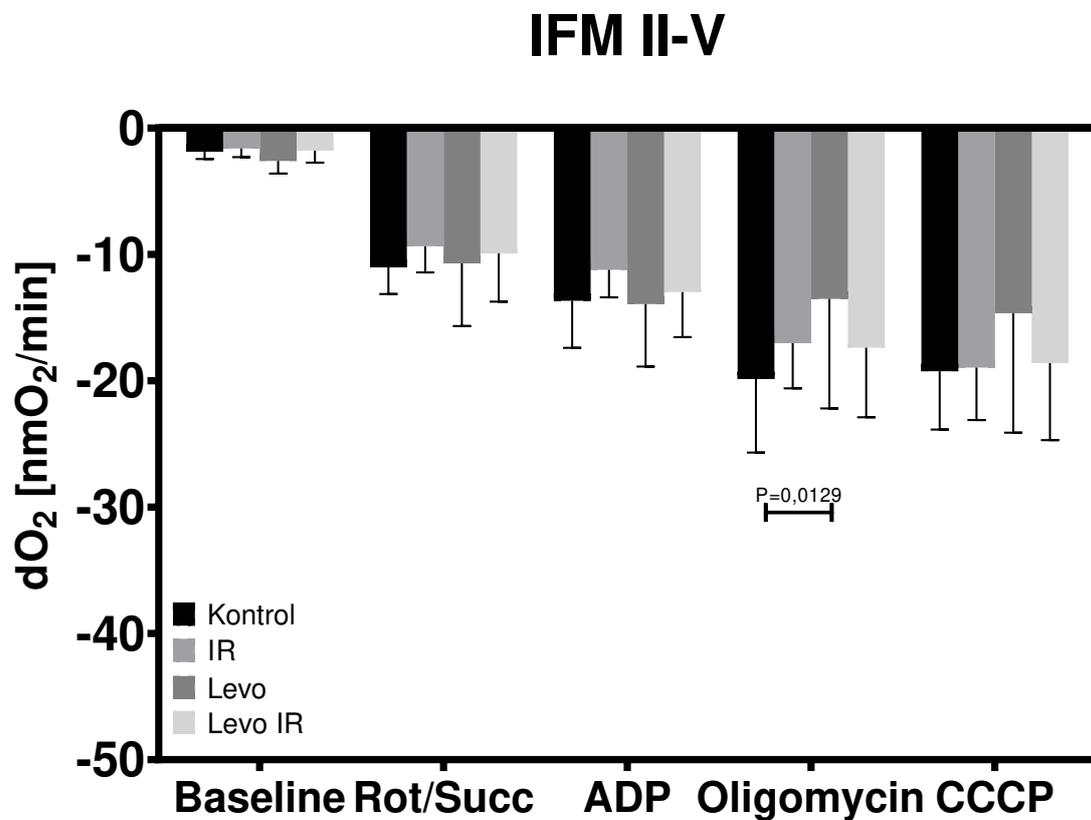


Abbildung 17 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex II-V.
Werte wurden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt.

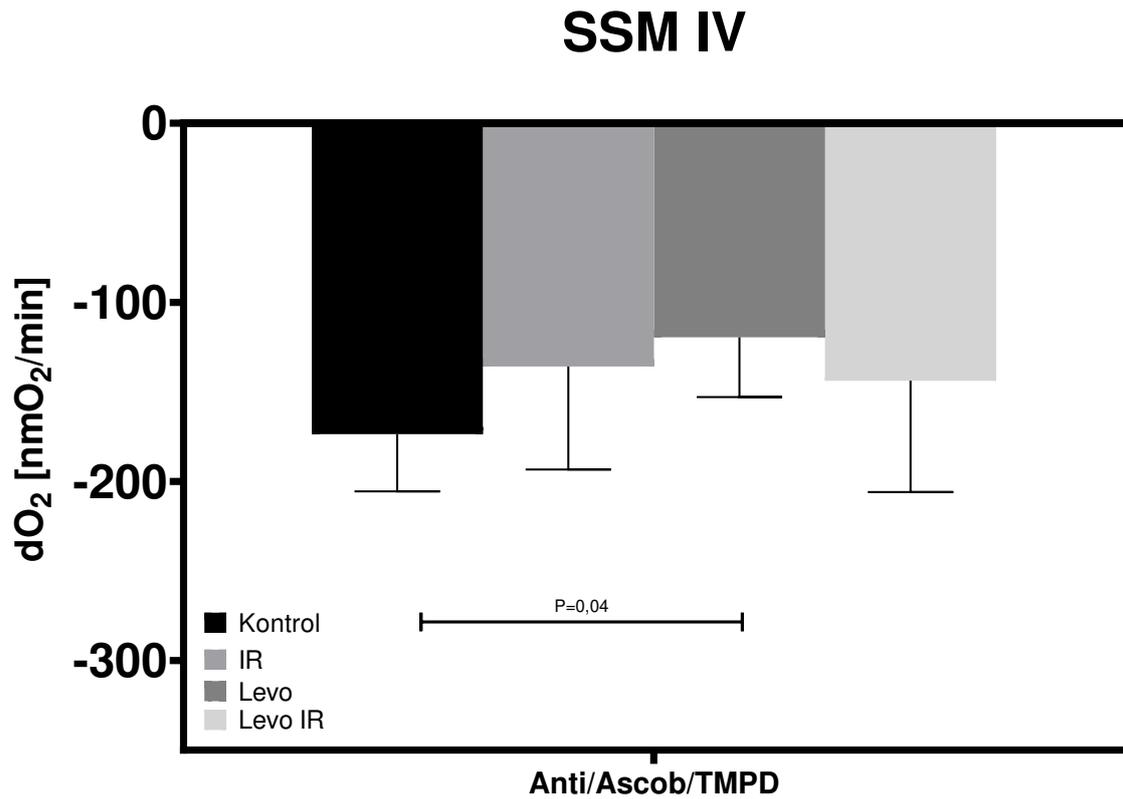


Abbildung 18 Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex IV.
Werte wurden als Mittelwert ± SD ausgedrückt

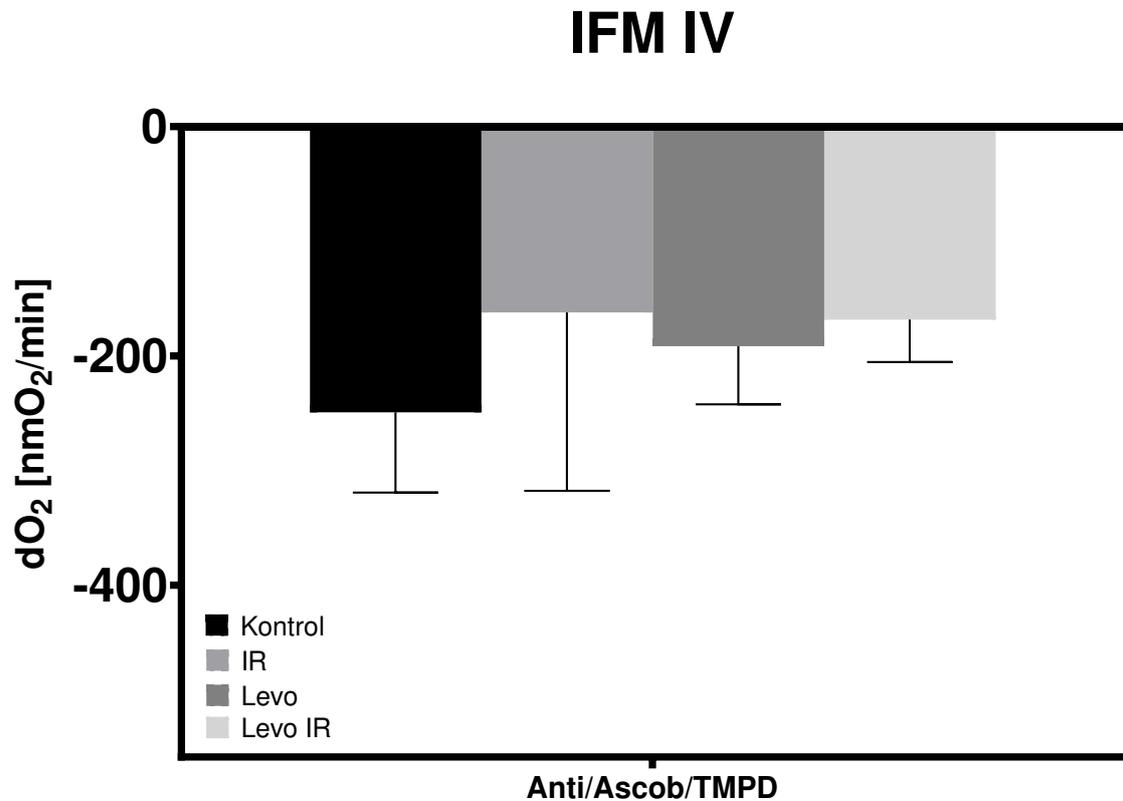


Abbildung 19 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex IV.
Werte wurden als Mittelwert ± SD ausgedrückt

3.4 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Bei den Mitochondrien, die entweder der IR-Gruppe ($p = 0,04$) oder der Levo-Gruppe ($p = 0,02$) angehörten, zeigte sich eine signifikante Hypopolarisierung des Membranpotentials im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vor der Anregung durch Succinat erreichten die Kontroll-Mitochondrien den höchsten Wert des Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Im Gegensatz dazu wurde bei den Mitochondrien aus den Gruppen Levo ($p = 0,02$), IR ($P = 0,05$) und Levo-IR ($p = 0,05$) eine signifikante Hypopolarisierung beobachtet. In Gegenwart von Rotenon und Succinat erzielten die Kontroll-Mitochondrien den höchsten $\Delta\Psi_m$ -Wert. Demgegenüber zeigten die Mitochondrien aus den Gruppen IR ($P = 0,01$), Levo ($p = 0,02$) und Levo-IR ($p = 0,006$) eine signifikante Hypopolarisierung. Während des von CCCP verursachten $\Delta\Psi_m$ -Abfalls, infolge der mitochondrialen Entkopplung, präsentierten die Kontroll-Mitochondrien einen langsameren Abfall des $\Delta\Psi_m$. Dieser Abfall war bei den Mitochondrien der IR-Gruppe ($p = 0,08$) und der Levo-Gruppe ($P = 0,045$) beschleunigt. In der Levo-IR Gruppe wurde lediglich ein begrenzter $\Delta\Psi_m$ -Abfall während der 20-minütigen Messung festgestellt (Abbildung 20).

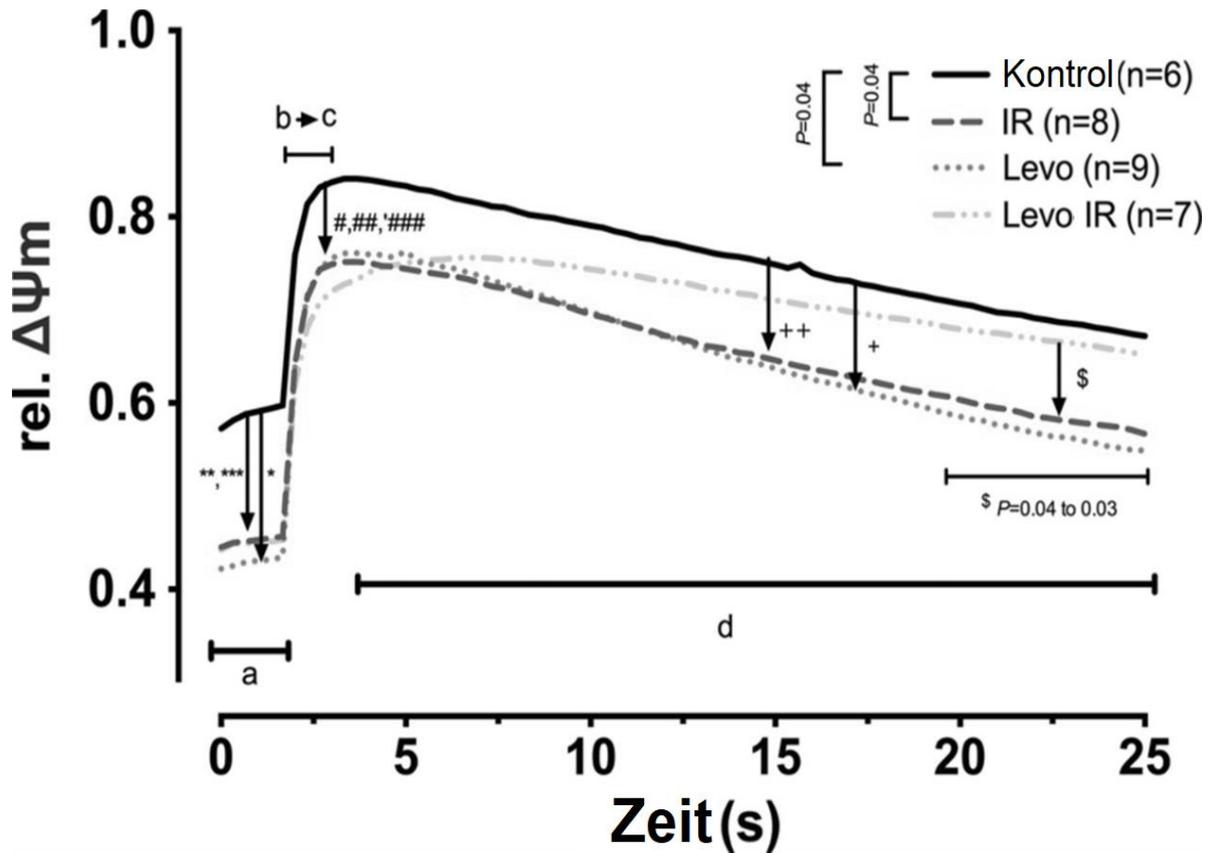


Abbildung 20 Analyse des Membranpotential der SSM

Bei der $\Delta\Psi_m$ -Analyse in JC1-markierten SSM zeigte (a) die $\Delta\Psi_m$ -Erzeugung, die durch das Verhältnis von J-Aggregat+/JC1+ vor und nach Rotenon/Succinat-Zugabe ($b \rightarrow c$) festgestellt wurde. (d) spiegelt den Maximalverlust von $\Delta\Psi_m$ wider, gemessen durch das Verhältnis von J-Aggregat+/JC1+ vor und nach CCCP-Zugabe. Im Vergleich zur Kontrolle gab es basale $\Delta\Psi_m$ -Abweichungen bei Levo (* $P = 0,02$), IR (** $P = 0,05$) und Levo-IR (** $P = 0,05$). Nach Rotenon/Succinat-Zugabe ($b \rightarrow c$) waren Unterschiede in IR (### $P = 0,01$), Levo (# $P = 0,02$) und Levo-IR (### $P = 0,006$) erkennbar. Bei CCCP-Induktion (d) verzeichneten Kontrollen einen gemäßigten $\Delta\Psi_m$ -Rückgang, der in IR (++ $P = 0,08$) und Levo (+ $P = 0,045$) stärker ausfiel. Nach 20 Minuten zeigte Levo-IR im Vergleich zu IR (\$ $P = 0,04-0,03$) einen eingeschränkten $\Delta\Psi_m$ -Abfall. Dargestellte Werte sind Durchschnittswerte; Standardfehler wurden aus Klarheit weggelassen. $\Delta\Psi_m$ bezeichnet das mitochondriale Membranpotential und SSM steht für subsarkolemmale Mitochondrien.

3.5 Analyse der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme und Ca^{2+} -Freisetzung

Die nichtlinearen Regressionsanalysen der Ca^{2+} -Aufnahme und -Freisetzung der Mitochondrien zeigten, dass die Mitochondrien der Kontrollgruppe eine effiziente und schnelle Ca^{2+} -Aufnahme hatten, wie durch den K-Wert (Zeitkoeffizient) von $0,043 \pm 0,016$ deutlich wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Kontrollgruppe in der Lage war, Ca^{2+} effizient in die Mitochondrien aufzunehmen. In der Ischämie ausgesetzte Mitochondrien (IR-Gruppe), wurde die Ca^{2+} -Aufnahme verlangsamt, und der K-Wert betrug $0,030 \pm 0,044$. In der mit Levosemindan behandelte Gruppe (Levo) blieb die Ca^{2+} -Aufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert und hatte einen K-Wert von $0,038 \pm 0,095$. Interessanterweise zeigte die Kombination von Levosemindan und Ischämie (Levo-IR-Gruppe) im Vergleich zur IR-Gruppe keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Aufnahme ($K = 0,027 \pm 0,041$) (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus den geladenen Mitochondrien variierte zwischen den verschiedenen Gruppen. In der Kontrollgruppe war die Freisetzung von Ca^{2+} eher langsam und zeigte ein Gefälle von $1,77 \pm 0,17$ RFU/s. Im Vergleich dazu blieb die Ca^{2+} -Freisetzung in der Levo-Gruppe unverändert und lag bei $1,62 \pm 0,59$ RFU/s. In der IR-Gruppe hingegen wurde eine beschleunigte Freisetzung von Ca^{2+} beobachtet, die einen Wert von $4,85 \pm 0,65$ RFU/s erreichte. Die Levo-IR-Gruppe zeigte eine noch stärkere Freisetzung von Ca^{2+} mit einem Gefälle von $7,38 \pm 0,75$ RFU/s im Vergleich zur IR-Gruppe. Die Gefälle zwischen den Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0.0001$) (Abbildung 23).

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass die Ischämie die Ca^{2+} -Aufnahme verlangsamt, Levosemindan allein keine Änderung bewirkt, die Kombination von Levosemindan und Ischämie keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Aufnahme hat, und die Ca^{2+} -Freisetzung durch Levosemindan und Ischämie verstärkt wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Levosemindan und Ischämie die Funktion der Mitochondrien beeinflussen und potenziell eine Rolle bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts spielen könnten.

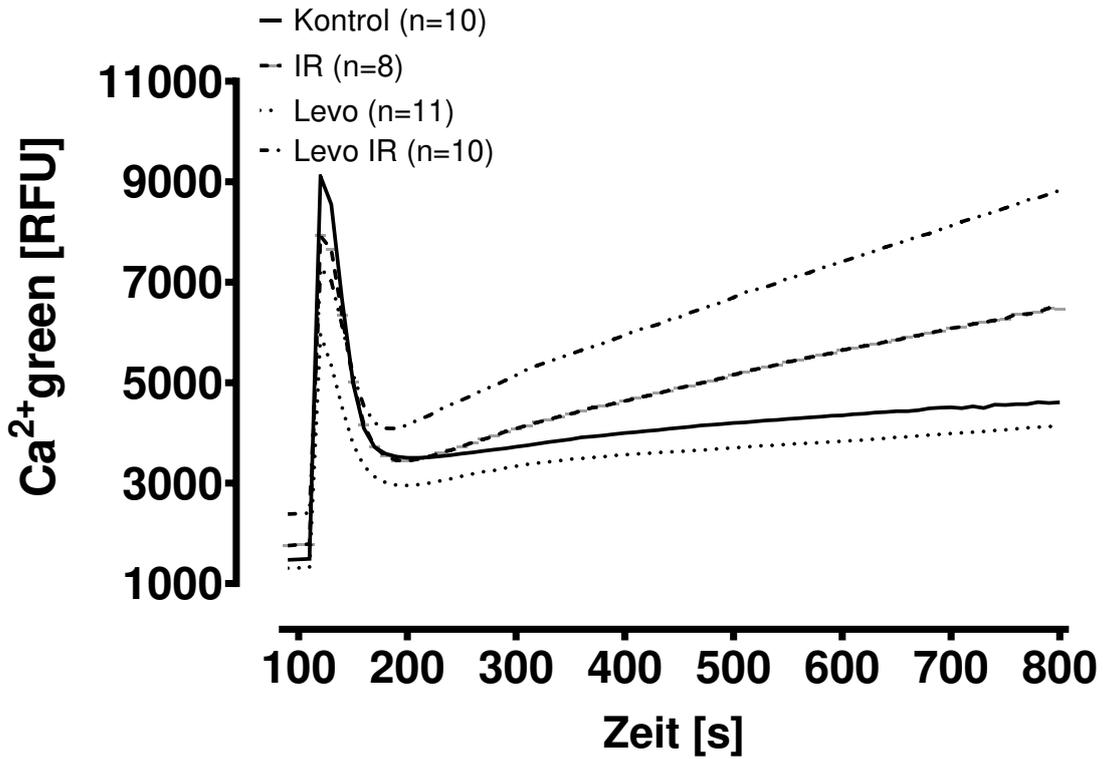


Abbildung 21 Übersicht über das mitochondriale Ca²⁺ -Aufnahme und Freisetzung.

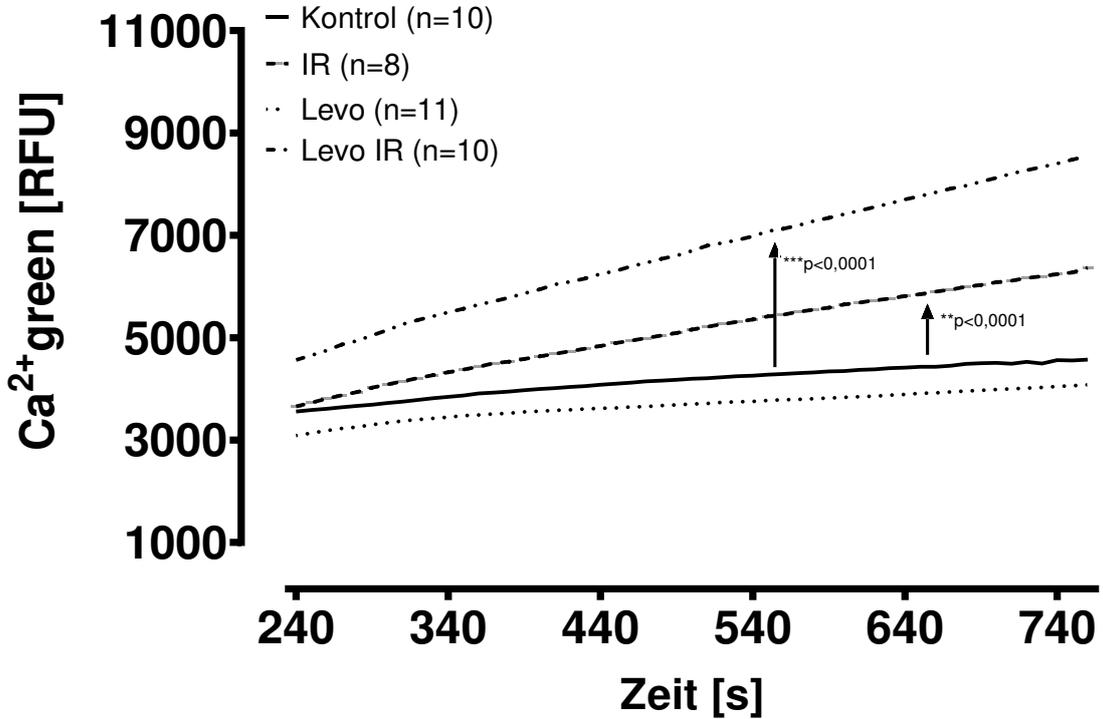


Abbildung 22 Analyse der Ca²⁺-Aufnahme durch SSM

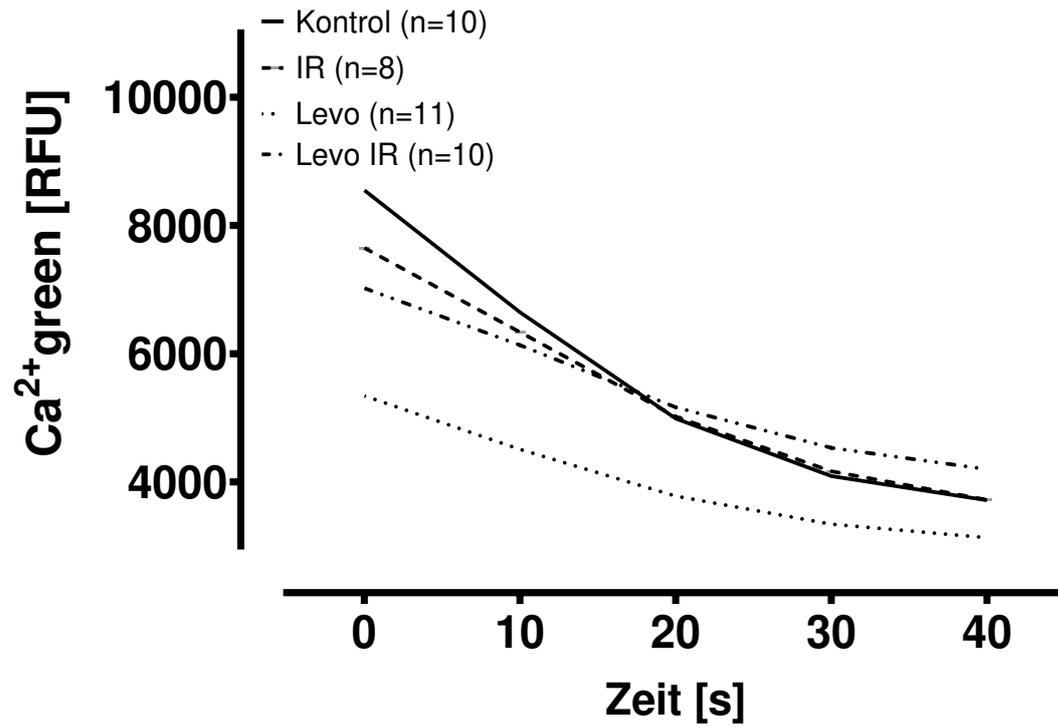


Abbildung 23 Analyse der Ca²⁺-Freisetzung durch SSM

3.6 Mitochondriale Ca^{2+} -Retentionskapazität (CRC)

Die Fähigkeit der Mitochondrien, Calcium Ionen (Ca^{2+}) zurückzuhalten, als mitochondriale Ca^{2+} -Retentionskapazität (CRC) bezeichnet, wurde in zwei Situationen untersucht: einmal in Abwesenheit von Cyclosporin A (CsA) und nach der CsA⁺ Blockade.

In Abwesenheit von CsA widerstanden die Mitochondrien der Kontrollgruppe durchschnittlich (SSM: $10,5 \pm 2,6$; IFM: $9,6 \pm 2,7$) Ca^{2+} -Impulsen, bevor die mPTP-Öffnung ausgelöst wurde. Die Gruppe, die der Ischämie (IR) ausgesetzt war, zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine eingeschränkte CRC von (SSM: $6,4 \pm 2,1$ Impulsen ($p = 0,04$) IFM: $6 \pm 1,4$ ($p=\text{ns}$)). Ähnlich zeigten die Mitochondrien, die mit Levosemindan (Levo) behandelt wurden, eine ähnliche Begrenzung mit (SSM: $6,5 \pm 2,0$ Impulsen ($p = 0,023$) IFM: $6,3 \pm 2,54$ ($p=\text{ns}$)). Die Kombination von Levosemindan und Ischämie (Levo-IR) führte zu einer weiteren Reduzierung der CRC auf (SSM: $4,9 \pm 1,7$ Impulsen ($p = 0,0008$), IFM $4,62 \pm 2,2$ ($p=0,026$)).

Nach der Behandlung mit CsA, einem Medikament, das die mPTP-Öffnung blockiert, zeigten die Mitochondrien der Kontrollgruppe erneut die höchste CRC von (SSM: $18,5 \pm 4,7$; IFM: $16,8 \pm 4,4$) Impulsen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe widerstanden die Mitochondrien der Ischämie (SSM: $10,1 \pm 2,3$ Impulsen ($p < 0,0001$); IFM: $8,3 \pm 1,7$ ($p=0,0003$)) die mit Levosemindan behandelten Mitochondrien (SSM: $13,1 \pm 4,5$ Impulsen ($p < 0,001$); IFM $12,2 \pm 4,75$ ($p=0,029$)) und die Levo-IR-Mitochondrien (SSM: $9,8 \pm 3,9$ Impulsen ($p < 0,0001$); IFM: $9,7 \pm 4,1$ ($p=0,0005$)).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Ischämie als auch Levosemindan die Fähigkeit der Mitochondrien, Ca^{2+} zurückzuhalten, beeinflussen können. Darüber hinaus hat die Blockade der mPTP-Öffnung durch CsA den Effekt Ischämie oder Levosemindan bestätigt. (Abbildung 24 und Abbildung 25)

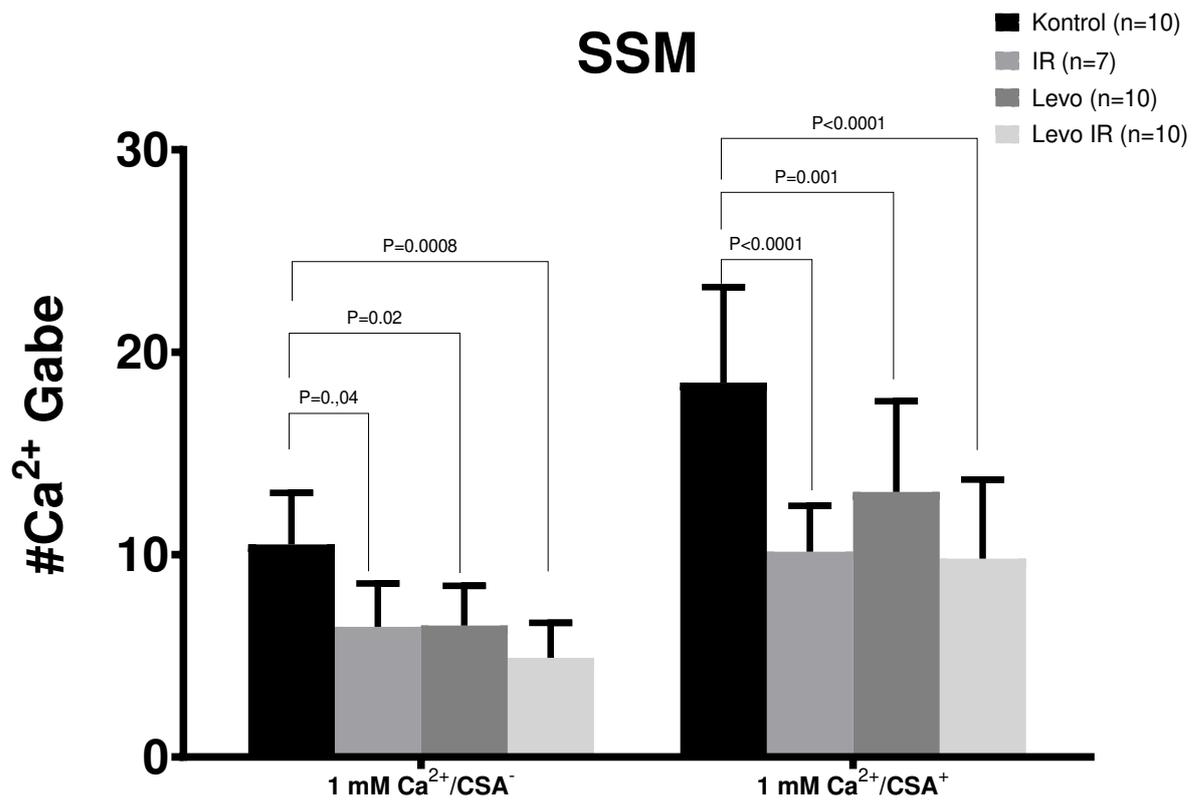


Abbildung 24 SSM Ca²⁺ Retentionskapazität von nativem SSM und nach mPTP-Blockade durch CsA. Werte wurden als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt.

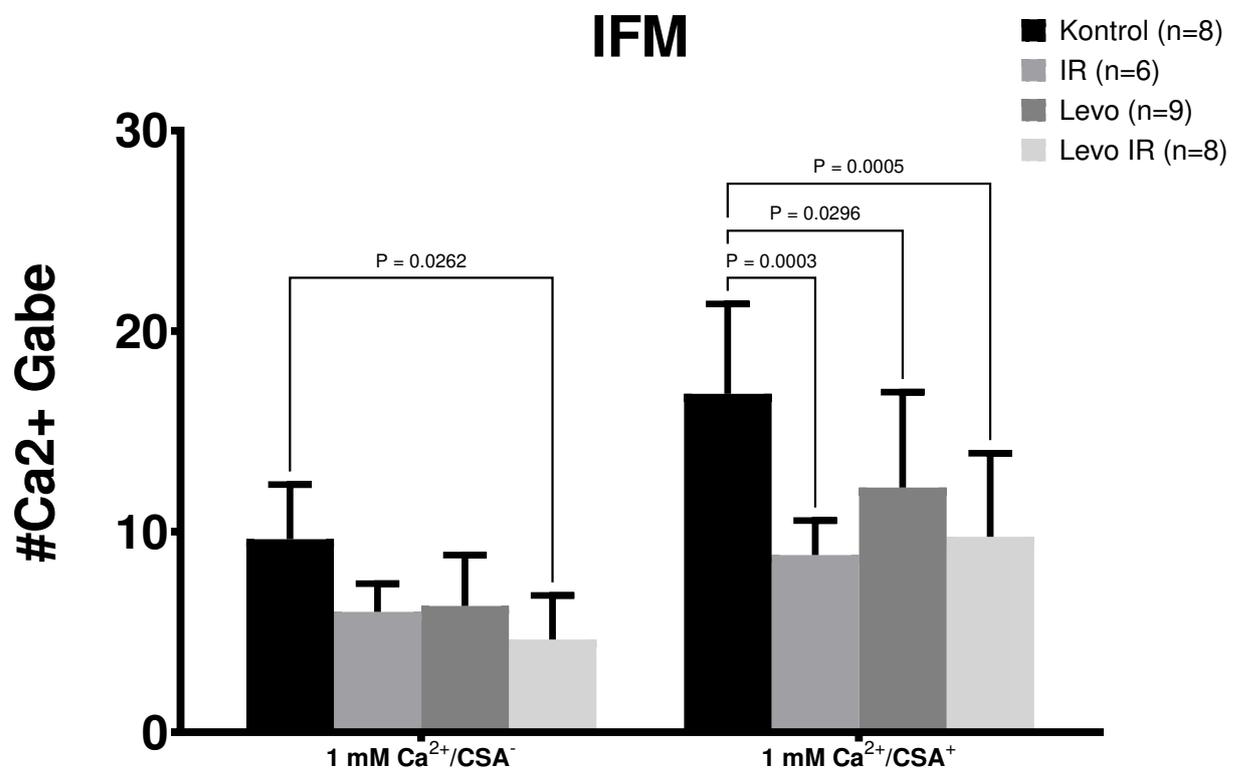


Abbildung 25 IFM Ca²⁺ Retentionskapazität von nativem IFM und nach mPTP-Blockade durch CsA. Werte wurden als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt.

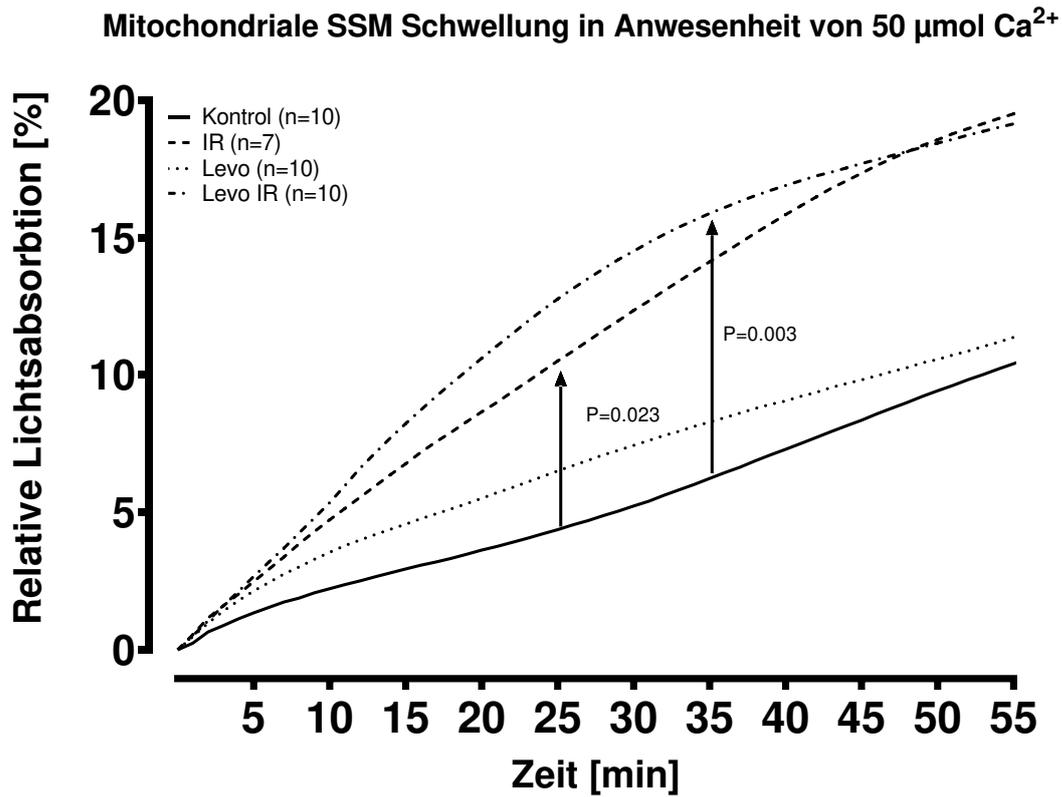
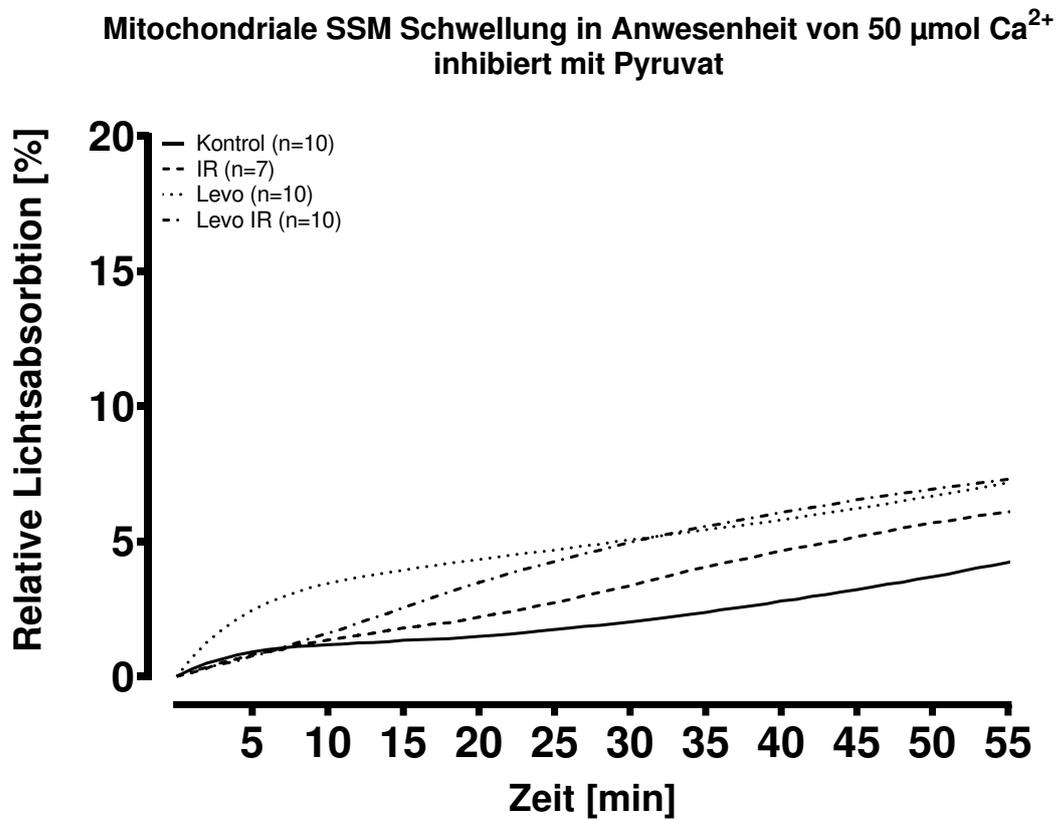
3.7 Mitochondriale mPTP-Empfindlichkeit gegenüber Ca^{2+}

In Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} führte die Öffnung des mitochondrialen Übergangsporenkomplexes (mitochondrial membrane transition pore, mPTP) zu einer Schwellung der Mitochondrien.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei den SSM-Ischämie Gruppen (IR) und Levo-IR eine deutlich schnellere Schwellung beobachtet ($p = 0,023$; $p = 0,003$). Bei den IFM war die Beschleunigung der Schwellung ebenfalls vorhanden, jedoch mit geringerer Signifikanz (IR p-Wert = $0,037$; Levo-IR: ns) (Abbildung 26 und Abbildung 28).

Die Anwendung von $0,1 \text{ M}$ Pyruvat verzögerte die Ca^{2+} -induzierte Öffnung des mPTP in allen vier Studiengruppen, wodurch die Unterschiede zwischen den Gruppen geringer wurden ($p\text{-Wert} = 0,2$) (Abbildung 27 und Abbildung 29).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl die Ischämie (IR) als auch die Behandlung mit Levosimendan (Levo-IR) zu einer beschleunigten Schwellung der Mitochondrien führen können. Die Zugabe von Pyruvat wirkt dem entgegen und verhindert die beschleunigte Schwellung.

Abbildung 26 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von SSMAbbildung 27 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von SSM in Anwesenheit von Pyruvat

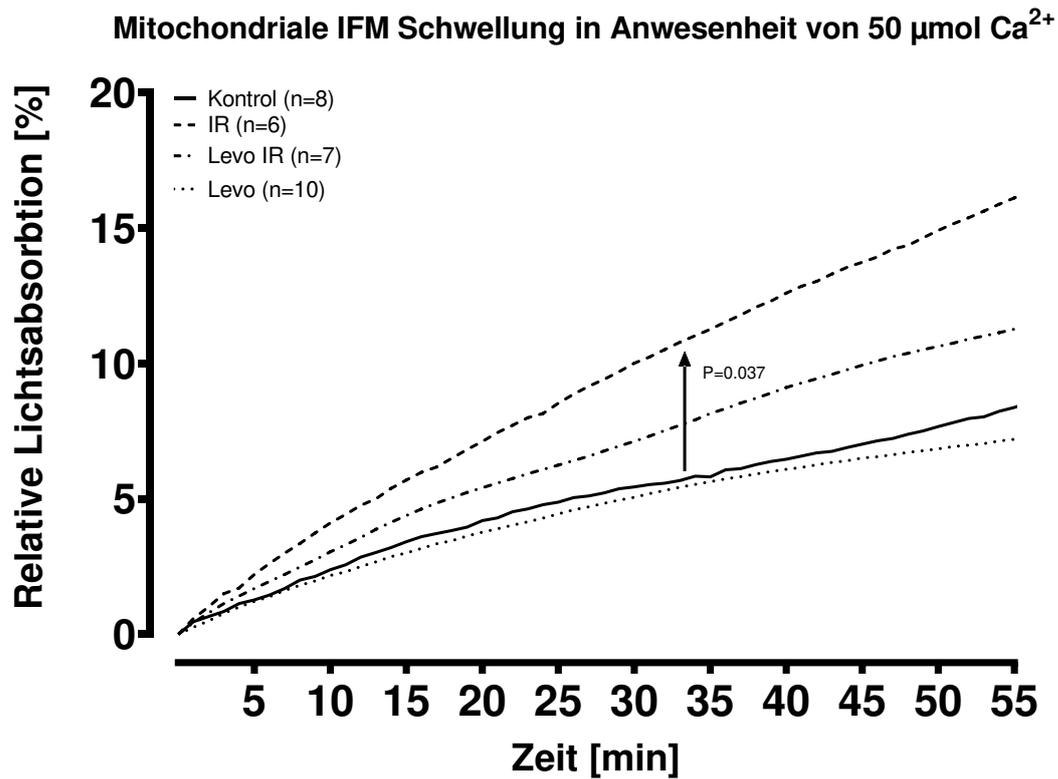


Abbildung 28 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von IFM.

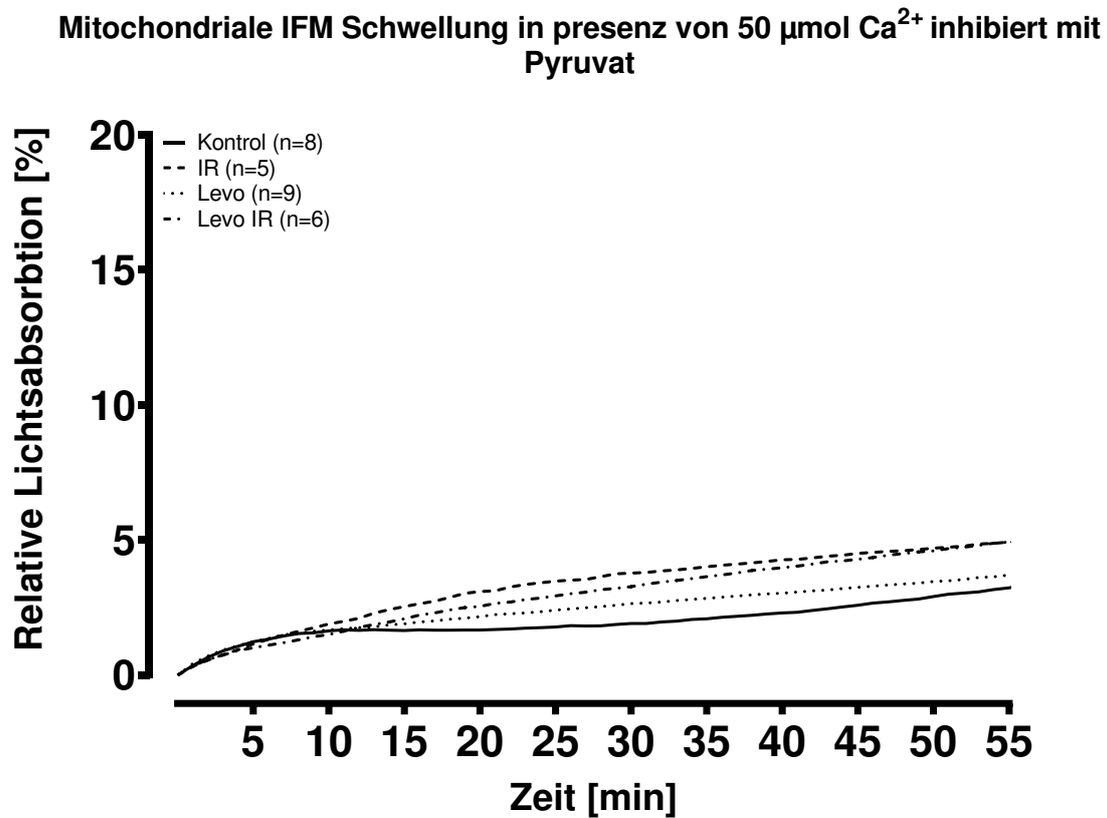


Abbildung 29 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von IFM in Anwesenheit von Pyruvat.

Werte wurden als Mittelwerte ausgedrückt.

3.8 Mitochondriale ATP- und ATP-Produktionskapazität

Die Messungen des ATP-Gehalts wurden an den SSM durchgeführt, und zwar in Abwesenheit von ADP. Dabei stellte sich heraus, dass Levo-IR im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduzierung des ATP-Gehalts verursachte ($p=0,04$). Um die ATP-Produktionskapazität zu ermitteln, wurden die SSM mit steigenden Konzentrationen von ADP versetzt. Es wurde beobachtet, dass Levo-IR im Vergleich zur Kontrolle zu einer begrenzten ATP-Produktion führte ($p=0,0006$). Die ATP-Produktion wurde auch im Vergleich zu IR reduziert ($p=0,006$). Insbesondere wurde diese Reduzierung der ATP-Produktion unter Levo-IR verstärkt, wenn $0,5 \mu\text{M}$ ($p=0,04$) und $0,6 \mu\text{M}$ ADP ($p=0,007$) vorhanden waren (Abbildung 30).

Die relative ATP-Produktionskapazität wurde berechnet, indem die absoluten ATP-Produktionswerte durch den mittleren ATP-Gehalt zu Beginn der Messung in Abwesenheit von ADP geteilt wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde die relative ATP-Produktionskapazität unter IR beschleunigt ($p\text{-Wert}=0,003$). Jedoch zeigte Levo-IR im Vergleich zu IR eine gehemmte Beschleunigung der relativen ATP-Produktionskapazität ($p\text{-Wert}=0,0005$). Im Vergleich zu IR zeigte Levo-IR eine beeinträchtigte ATP-Produktion bei allen getesteten ADP-Konzentrationen ($p=0,02$ bis $0,0002$) (Abbildung 31).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Levo-IR die ATP-Produktion in den Mitochondrien verringert, insbesondere bei Zugabe von ADP. Die relative ATP-Produktionskapazität, die die Effizienz der ATP-Produktion im Verhältnis zum ATP-Gehalt angibt, ist unter Levo-IR im Vergleich zu IR ebenfalls gehemmt. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass Levo-IR die Energieproduktion in den Mitochondrien beeinträchtigt, was wichtige Auswirkungen auf die zelluläre Energiehomöostase haben könnte.

SSM ATP Produktion

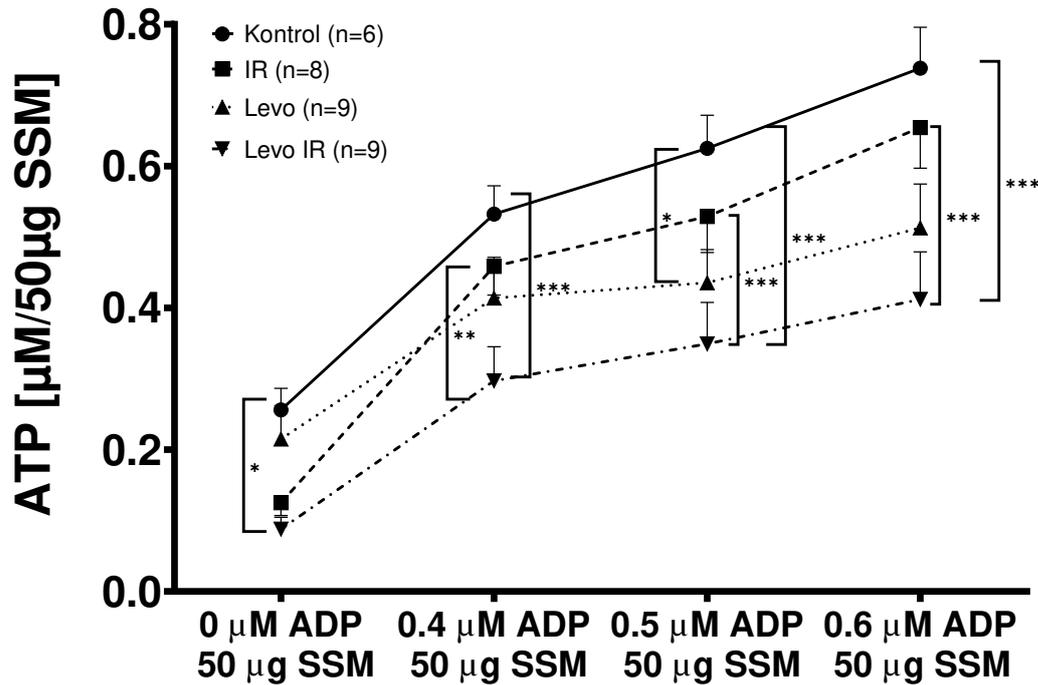


Abbildung 30 absoluter ATP-Gehalt und Produktionskapazität von SSM.

SSM ATP Produktion/Gehalt

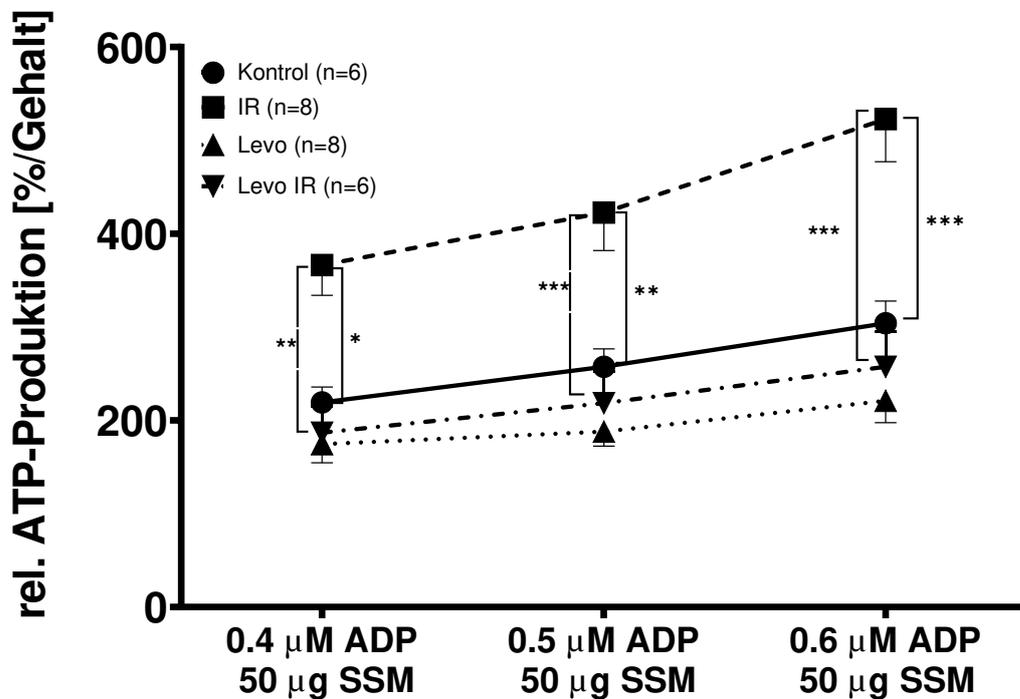


Abbildung 31 relative ATP-Produktionskapazität
Absolute Werte geteilt durch Inhaltswert auf 100 %.

Werte werden als Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts ausgedrückt. Sternchen geben statistische Signifikanzen der Zeilen an (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

4 Diskussion

Im Kapitel "Diskussion" erfolgt eine umfangreiche und detaillierte Auseinandersetzung mit den Forschungsergebnissen und ihrer Relevanz.

Der erste Abschnitt bietet eine kurze Einführung in das Medikament Levosimendan und beleuchtet dessen Wirkungsweise. Nicht nur die generelle Funktion und Bedeutung von Levosimendan werden erläutert, sondern auch ein tieferer Einblick in die bisherige Forschung und Zulassungsstudien gegeben. Dieser Abschnitt wird durch zwei Unterabschnitte vertieft: Der erste konzentriert sich auf experimentelle Studien zu Levosimendan und stellt die bisherigen Erkenntnisse aus Laborversuchen dar, während der zweite den Fokus auf klinische Studien legt. Hier werden die Anwendungen und Ergebnisse von Levosimendan im klinischen Setting und deren Auswirkungen auf Patienten diskutiert.

Der darauffolgende Abschnitt vertieft die Diskussion, indem er sich speziell den in dieser Arbeit erzielten Studienergebnissen widmet. Die Hauptkenntnisse der Arbeit werden analysiert, interpretiert und im Kontext bestehender Literatur gesetzt.

Im nächsten Abschnitt werden kritische Betrachtungen vorgenommen. Hier werden Limitationen und Einschränkungen der durchgeführten Studie beleuchtet.

Zum Abschluss werden die zentralen Erkenntnisse der gesamten Arbeit zusammengefasst und Schlussfolgerungen hinsichtlich ihrer Bedeutung und möglichen Implikationen für die weitere Forschung und Praxis gezogen.

4.1 Einführung und Wirkungsweise von Levosimendan

Levosimendan, ein in der klinischen Praxis zugelassener Ca^{2+} -Sensibilisator, hat in jüngster Zeit an Bedeutung bei der Behandlung von Myokardversagen im Anschluss an kardiale Interventionen gewonnen. Molekular gesehen interagiert Levosimendan mit der hydrophoben Region im aminoterminalen Abschnitt von Troponin C (Trop C) während systolischen intrazellulären Ca^{2+} -Spitzen und potenziert so die Bindungsaffinität von Ca^{2+} an Trop C (1, 102–104). Darüber hinaus stabilisiert Levosimendan die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung von Trop C, was zu einer positiven inotropen Wirkung führt, ohne die Relaxation der Herzen zu beeinflussen (1, 102, 103).

Ergänzend agiert Levosimendan als K^+ _{ATP}-Kanalaktivator, was sich als entscheidend für die Entspannungsprozesse in der glatten Muskulatur sowie für vasodilatatorische Mechanismen erweist (1, 102, 105). Eine Reduzierung der Myokardwandspannung kann durch eine Levosimendan-bedingte Modulation von Vor- und Nachbelastung beobachtet werden, wodurch die koronare Durchblutung optimiert wird. Diese Modulation transformiert die Mito- K^+ _{ATP}-Kanalaktivität zu einem Mechanismus, der das Herz schützt. Untersuchungen von Kopustinskiene et al. (2004) an nativen Myokardmitochondrien unterstreichen die protektive Wirkung von Levosimendan in einem präkonditionellen I/R-Schadensmodell (106). Zudem vermuteten Hönisch et al. (2010) eine Minderung der Infarktausdehnung in einem postkonditionellen Modell, wobei sie die mito K^+ _{ATP}-Kanalaktivität als Schlüsselfaktor identifizierten (1, 107).

Levosimendan beeinflusst weder die Relaxationsszeit noch die diastolische Funktion. Dies ist auf seine Rolle als Ca^{2+} -Sensibilisator, der an Troponin C bindet, und als möglicher potenter PDE3 (Phosphodiesterase-3) -Inhibitor zurückzuführen, wodurch der cAMP-Spiegel und die kontraktile Kraft steigen (108). Hauptverantwortlich für Levosimendans Langzeitwirkung ist der Metabolit *OR-1896* mit längerer Halbwertszeit. *OR-1896* stimuliert die kontraktile Kraft, ist jedoch weniger potent als Ca^{2+} -Sensibilisator und PDE3-Inhibitor (108). Ein Grund, warum Levosimendan die Diastole nicht verlängert, könnte seine systolische Ca^{2+} -abhängige Bindung an Troponin C sein (109). Zusätzlich aktiviert Levosimendan Glibenclamid-empfindliche K^+ -Ströme, die vasodilatatorisch wirken. Insgesamt kombiniert Levosimendan PDE3-Hemmung und Ca^{2+} -Sensibilisierung (108, 110, 111).

Levosimendan ist primär indiziert für die kurzzeitige Therapie von schweren akuten dekomponierten chronischen Herzinsuffizienz Zuständen (acute decompensated chronic heart failure – ADHF), besonders in Fällen, in denen herkömmliche Ansätze unzureichend sind oder eine inotrope Unterstützung als geeigneter Ansatz angesehen wird. Seine klinische Effizienz wurde in Studien mit über 2800 Herzinsuffizienz-Patienten evaluiert (103).

Die Effektivität und Verträglichkeit von Levosimendan bei der Therapie von ADHF wurden in den unten aufgeführten, zusammenfassend beschriebenen randomisierten, doppelblinden, internationalen klinischen Studien geprüft. (103, 112)

- **REVIVE-Programm**

Das REVIVE-Programm setzte sich zum Ziel, die Wirksamkeit von Levosimendan in Kombination mit einer Standardtherapie und von Placebo in Verbindung mit einer Standardtherapie bei Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz (ADHF) zu evaluieren. Patienten, die wegen ADHF hospitalisiert wurden, mit einer linksventrikulären Auswurffraktion von $\leq 35\%$ in den letzten 12 Monaten und anhaltender Dyspnoe im Ruhezustand wurden in die Studie aufgenommen. Die Anwendung aller Basistherapien war gestattet, ausgenommen intravenöses Milrinon. Ausschlusskriterien umfassten das Vorliegen einer ventrikulären Abflussstrakt-Obstruktion [Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM)], kardiogener Schock, systolischer Blutdruck von ≤ 90 mmHg oder eine Herzfrequenz von ≥ 120 Schlägen pro Minute sowie die Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung (4, 103).

- REVIVE I-Studie:

In dieser doppelblinden, placebokontrollierten Pilotstudie wurden 100 ADHF-Patienten einer 24-stündigen Infusion von Levosimendan unterzogen. Ein positiver Therapieeffekt wurde bei jenen Probanden festgestellt, die Levosimendan erhielten, verglichen mit einer Placebobehandlung zusätzlich zur Standardbehandlung (4, 113–115).

- REVIVE II-Studie:

Die REVIVE II-Studie, eine doppelblinde, placebokontrollierte Zulassungsstudie, involvierte 600 Patienten, die mit einer 10-minütigen Belastungsdosis von 6-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/min behandelt wurden. Dies wurde gefolgt von einer titrierten Infusion von Levosimendan mit 0,05-0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/Minute für bis zu 24 Stunden. Die Ergebnisse zeigten einen Vorteil für ADHF-Patienten, die trotz intravenöser Diuretika-Therapie

weiterhin Dyspnoe zeigten. Ein höherer Prozentsatz der Patienten zeigte eine Verbesserung in einem zusammengesetzten klinischen Endpunkt nach sechs Stunden, 24 Stunden und fünf Tagen. Eine signifikante Reduktion des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) wurde bei der Levosimendan-Gruppe im Vergleich zur Placebo- und Standardbehandlungsgruppe nach 24 Stunden und fünf Tagen beobachtet (4, 103, 113).

- **SURVIVE-Studie:**

Die Studie wurde zwischen 2003 und 2004 in 75 Zentren in 9 Ländern durchgeführt, war eine randomisierte, doppelblinde Untersuchung mit 1327 hospitalisierten Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz. (ADHF) Die Interventionen umfassten intravenöses Levosimendan (n = 664) im Vergleich zu intravenösem Dobutamin (n = 663). Die Hauptergebnisbewertung basierte auf der Gesamtmortalität nach 180 Tagen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden (26% vs. 28%; p= 0,40). Levosimendan führte zu stärkeren Abnahmen des B-Typ natriuretischen Peptidwerts (BNP) in den ersten 24 Stunden. Bezüglich Nebenwirkungen zeigte die Dobutamin-Gruppe häufiger Herzversagen, während die Levosimendan-Gruppe mit Vorhofflimmern, Hypokaliämie und Kopfschmerzen assoziiert war. Schlussendlich reduzierte Levosimendan die Gesamtmortalität nach 180 Tagen nicht signifikant im Vergleich zu Dobutamin, trotz anfänglicher Vorteile im Peptidniveau (116).

- **LIDO-Studie**

In der LIDO-Studie wurde die Effektivität von Levosimendan bei 203 Patienten mit ausgeprägter Herzinsuffizienz (Auswurffraktion $\leq 0,35$) evaluiert. Um Levosimendan und Dobutamin hinsichtlich ihrer hämodynamischen Leistungen und klinischen Resultate bei Patienten mit dem Low Cardiac Output Syndrom zu bewerten, wurde ein multizentrisches, randomisiertes und doppelblindes Parallelgruppen-Design angewandt. Unter kontinuierlichem hämodynamischem Monitoring wurde Levosimendan initial mit einer Dosis von 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ über 10 Minuten infundiert, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$ über 24 Stunden. Dobutamin wurde 24 Stunden lang ohne Initialdosis mit einer Anfangsdosis von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$ infundiert, wobei die Infusionsrate bei unzureichender Reaktion nach 2 Stunden verdoppelt wurde. Das primäre Endziel, eine Erhöhung des Herzzeitvolumens um mindestens 30% und eine Reduktion des Pulmonalkapillärendrucks um mindestens 25% nach 24 Stunden, wurde von 28% der mit Levosimendan behandelten Patienten und 15% der mit Dobutamin behandelten Patienten

erreicht. Bei einer 180-tägigen Nachbeobachtung lag die Sterblichkeitsrate in der Levosimendan-Gruppe bei 26%, verglichen mit 38% in der Dobutamin-Gruppe. Insgesamt zeigte Levosimendan im Vergleich zu Dobutamin sowohl hinsichtlich der hämodynamischen Verbesserungen als auch der längerfristigen Mortalität klare Vorteile (117).

- **RUSSLAN-Studie**

Eine multizentrische Untersuchung, primär initiiert zur Evaluierung der Sicherheit von Levosimendan. Hier wurden 504 Patienten, die infolge eines akuten Myokardinfarkts an dekompensierter Herzinsuffizienz litten und inotroper Unterstützung bedurften, über einen Zeitraum von 6 Stunden entweder mit Levosimendan oder einem Placebo therapiert.

Die in die Studie aufgenommenen Patienten waren stark symptomatisch und hatten Beschwerden wie Atemnot und Anzeichen für eine schlechte Durchblutung. Die Studie zeigte, dass Levosimendan in diesen Patienten sowohl gut verträglich als auch wirksam war. Die 14-tägige Nachbeobachtung ergab eine Sterblichkeitsrate von 20% in der Placebo-Gruppe, die sich bei der 180-tägigen Nachbeobachtung auf 31% erhöhte. Im Vergleich war die 14-tägige Mortalitätsrate in der Levosimendan-Gruppe bei 12% und in 180 Tagen bei 23%. Dies legt nahe, dass Levosimendan dazu beitragen könnte, die Sterblichkeit in dieser Patientengruppe zu reduzieren.

Obwohl Levosimendan nur geringfügige Auswirkungen auf die Verbesserung der Symptome von Herzinsuffizienz während der Infusionsperiode zeigte, reduzierte es signifikant das kombinierte Risiko von Tod und Verschlechterung der Herzinsuffizienz. Dieser Nutzen war auch 24 Stunden nach Beginn der Behandlung noch nachweisbar.

Bemerkenswert ist, dass die Studie gezeigt hat, dass die Verringerung der Sterblichkeit durch Levosimendan hauptsächlich innerhalb der ersten 14 Tage der Nachbeobachtung auftrat, ohne weitere Überlebensvorteile danach. Dies war das erste Mal, dass ein intravenöses positiv inotropes Medikament in dieser Patientengruppe eine Verringerung der Sterblichkeit gezeigt hat, was auf die kardioprotektiven Effekte von Levosimendan zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Levosimendan eine vielversprechende Therapieoption zur Behandlung von linksventrikulärem Versagen nach einem akuten Myokardinfarkt darstellt, mit potenziellen Vorteilen bei der Verringerung von

Sterblichkeit und Verschlechterung der Herzinsuffizienz. Zwischen den jeweiligen Therapiegruppen ließen sich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Inzidenz von Hypotonie und Ischämie detektieren (118).

4.1.1 Levosimendan Forschungsstand der experimentellen Studien.

Aufgrund seiner positiven Auswirkungen im Kontext von Ischämie/Reperfusion (I/R) hat Levosimendan erhöhte wissenschaftliche Beachtung erfahren (119). Es wird angenommen, dass die protektive Funktion von Levosimendan bei I/R hauptsächlich durch die Aktivierung von ATP-sensitiven K⁺-Kanälen in Mitochondrien (106) sowie im Zytoplasma (119, 120), vermittelt wird, welche zudem eine zentrale Rolle in der ischämischen Präkonditionierung spielen (119, 121).

Experimentelle Beobachtungen offenbarten erstmalig die antiischämischen Effekte von Levosimendan an isolierten Kaninchenherzen (119, 122). Hierbei zeigte sich nach Applikation von Levosimendan in bestimmten Konzentrationen ein signifikanter Anstieg des linken ventrikulären Drucks sowie des koronaren Blutflusses über einen Zeitraum von 120 Minuten. Zudem reduzierte Levosimendan den epikardialen NADH-Fluoreszenzbereich, was als Indikator für eine reduzierte transmurale ischämische Schädigung gedeutet wurde. In besagter Studie wurde keine Reperfusionsphase eingeschlossen (119, 122). In nachfolgenden In-vivo-Experimenten, bei denen Levosimendan direkt in die Koronargefäße verabreicht wurde, verbesserte es die kontraktile Funktion nach mehreren Zyklen von Okklusion und Reperfusion der linken vorderen absteigenden Koronararterie (LAD) in barbituranästhesierten Hunden (119, 123).

Zusätzliche Forschungen bezüglich der Charakterisierung der positiven inotropen und lusitropen Effekte von Levosimendan wurden an Meerschweinchenherzen durchgeführt (124) und zudem in Relation zu den Wirkungen von Dobutamin verglichen (125).

In der Studie von Kristof et al. (1999) (124) wurde die Möglichkeit evaluiert, ob Levosimendan die depressiven kontraktile Funktionen des ischämischen Myokards (Myokard-Stunning) reaktivieren kann (124). Die Wirkungen von Levosimendan auf die linksventrikuläre Funktion und die in-vivo-Proteinphosphorylierung wurden sowohl im nicht-ischämischen als auch im ischämischen Myokard untersucht. Um die Myokardischämie herbeizuführen, wurden Meerschweinchenherzen mittels der Langendorff-Technik perfundiert und der Kreislauf für 8 Minuten unterbrochen, anschließend folgte eine Reperfusionsphase von 20 Minuten. Die Perfusion post-ischämischer Meerschweinchenherzen mit Levosimendan (0,03–0,48 µM, 6 min.)

korrelierte mit dosis- und zeitabhängigen Zunahmen sowohl in dP/dt_{max} (Kontraktilität) als auch in dP/dt_{min} (Entspannungsgeschwindigkeit) (124). Die Untersuchung ergab, dass Levosimendan die Kontraktions- und Entspannungsfunktionen von sowohl nicht-ischämischen als auch post-ischämischen Herzen in ähnlicher Weise beeinflusst. In einer spezifischen Konzentration ($0,3 \mu M$) hatte Levosimendan keinen ausgeprägten Einfluss auf zelluläre Signalkaskaden im Myokard. Bei zusätzlicher Anwendung von Isoproterenol wurde allerdings eine Modifikation in der Molekülbindung von ^{32}P an Troponin I in post-ischämischen Herzen bemerkt. Diese Resultate lassen vermuten, dass Levosimendan therapeutisches Potential nach kardialen Ereignissen besitzt und Kalziumdynamiken in Herzmuskelzellen bei kardialen Pathologien eine bedeutende Funktion einnehmen könnten (124).

Du Toit et al. (1999) (125) analysierte die Wirkung von Levosimendan auf Meerschweinchenherzen nach Ischämie. Die Herzen wurden einer 40-minütigen Ischämie ausgesetzt und die Herzfunktion mittels des linksventrikulären entwickelten Drucks (LVDP) gemessen (125). Die Ergebnisse zeigten, dass Herzen, die mit Levosimendan behandelt wurden, deutlich bessere LVDP-Werte aufwiesen als Kontrollherzen. Während einige Kontrollherzen Arrhythmien entwickelten, war dies bei Levosimendan-behandelten Herzen nicht der Fall. Im Gegensatz dazu zeigte eine Behandlung mit Dobutamin bei vielen Herzen Arrhythmien. Die Schlussfolgerung lautete, dass Levosimendan die Herzfunktion nach Ischämie positiv beeinflusst und gleichzeitig Arrhythmien vermeidet (125).

In der Studie von Kersten et al. (2000) wurde die potenzielle schützende Wirkung von Levosimendan bei Hunden nach einer 60-minütigen LAD-Koronararterienokklusion und anschließender 3-stündiger Reperfusion untersucht (126). Ziel war es herauszufinden, ob Levosimendan die Adenosintriphosphat-regulierten Kaliumkanäle (K_{ATP}) aktiviert und ob es die Myokardinfarktgröße beeinflusst. Hundeherzen wurden entweder eine Salzlösung oder Levosimendan verabreicht, wobei einige zusätzlich mit dem K^+_{ATP} -Kanalantagonisten Glyburid vorbehandelt wurden. Die Resultate zeigten, dass Levosimendan die Herzfunktion signifikant verbesserte, den Infarktbereich um mehr als die Hälfte reduzierte und vermutlich über K^+_{ATP} -Kanalaktivierung wirkt, da die Infarktreduktion durch Glyburid blockiert wurde (126).

Eine weitere Studie von du Toit et al. (2001) (127) wurde die Wirkung der oralen Gabe von Levosimendan bei Schweinen untersucht. Vor dem experimentellen

Herzereignis – einer 30-minütigen Ligation der LAD-Koronararterie und anschließender 30-minütiger Reperfusion – erhielten die Schweine über 10 Tage oral Levosimendan (0,08 mg/kg) und unmittelbar vor dem Eingriff eine intravenöse Dosis von 11,2 µg/kg (127). Dieser Bolus wurde von einer 30-minütigen Infusion von 0,2 µg/kg/min. Levosimendan gefolgt. Die Ergebnisse zeigten, dass, obwohl Levosimendan die Herzleistung und die Kontraktilität des Myokards verbesserte, es gleichzeitig während der Ischämie zu einer erhöhten Anzahl von arrhythmischen Ereignissen führte (127).

Eriksson et al. (2014) untersuchten an isolierten, perfusionierten Meerschweinchenherzen, wie Levosimendan das Phosphorylierungspotential beeinflusst. Dabei beobachteten sie das Gleichgewicht zwischen ATP-Produktion und -Verbrauch in normalen und postischämischen Zuständen. Interessanterweise zeigte Levosimendan in einer Konzentration von 0,1µmol keine Veränderung dieses Gleichgewichts. Allerdings verursachte die postischämische Gabe von Levosimendan in einer Konzentration von 100nM einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs um 10%. Dieser Anstieg wurde jedoch hauptsächlich auf eine durch Levosimendan verursachte erhöhte Herzfrequenz zurückgeführt und nicht auf einen zusätzlichen ATP-Umsatz (128).

Bei Untersuchungen von Busk und seinem Team im Jahr 2006 (129) an Schweinen wurde festgestellt, dass Levosimendan die linksventrikuläre Funktion sowohl in der systolischen als auch in der diastolischen Phase positiv beeinflusst, allerdings ohne die Größe des Herzinfarkts zu beeinflussen (129). Während der Untersuchung erhielten anästhesierte Schweine entweder eine Infusion von Levosimendan oder Kochsalzlösung, die 30 Minuten vor einer geplanten Ischämie begonnen wurde. Hierzu wurde die linke vordere absteigende Koronararterie der Tiere für 45 Minuten mittels Ballon okkludiert, gefolgt von 2,5 Stunden Reperfusion. Schon vor der künstlichen Ischämie konnte durch Levosimendan eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Funktion festgestellt werden, wobei die Herzleistung um 10% anstieg. Zudem sanken sowohl der pulmonale Kapillardruck als auch der mittlere arterielle Druck signifikant. Ähnliche positive Effekte auf die Hämodynamik wurden auch während der Ischämie und Reperfusion beobachtet. Dennoch hatte Levosimendan keinen Einfluss auf die Größe des Infarkts in diesem Modell (129).

Epran und Kollegen aus dem Jahr 2006 haben der Effekt der ischämischen Präkonditionierung mit einer Levosimendan-Perfusion in Langendorff-perfundierten Kaninchenherzen analysiert (130). Interessanterweise zeigte die Levosimendan-

Vorbehandlung, bestehend aus zwei Zyklen zu je fünf Minuten, vorteilhafte Effekte auf den linksventrikulären enddiastolischen Druck während der Reperfusion. Die Parameter für Kontraktilität und Relaxation waren bei den mit Levosimendan behandelten Herzen stabil und das Volumen des infarzierten Myokards war nach einer globalen Ischämie-Reperfusion deutlich reduziert, sowohl unter ischämischer Präkonditionierung als auch nach Levosimendan-Behandlung, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (130).

Ein anderer Versuch mit Hunden setzte Levosimendan und Milrinon während einer 25-minütigen Okklusion der linken absteigenden Koronararterie (LAD) in Relation (131). Obwohl beide Medikamente 10 Minuten vor dem Eingriff in äquivalenten Dosen verabreicht wurden, zeigte Levosimendan einen signifikanten Vorteil in der Hemmung ventrikulärer Arrhythmien im Vergleich zu Milrinon. Levosimendan steigerte zudem die Gesamtüberlebensrate und war somit in der Prävention von ventrikulären Arrhythmien während und nach regionaler Myokardischämie überlegen (131).

Meyer et al. (2008) konzentrierten sich auf die Effekte von Epinephrin und Levosimendan in isolierten, perfundierten Kaninchenherzen nach einer Ischämie (132). Nachdem die Herzen einer 25-minütigen totaler-Ischämie und einer 20-minütigen Reperfusion ausgesetzt waren, zeigte Epinephrin eine signifikante Verbesserung mehrerer hämodynamischer Parameter. Levosimendan wiederum optimierte ebenfalls diese Parameter in postischämischen Herzen, aber bemerkenswerterweise ohne den Sauerstoffbedarf zu steigern, was zu einer deutlichen Erhöhung der externen Effizienz führte (132). Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Levosimendan eine bevorzugte Wahl sein könnte, um die ventrikuläre Funktion zu steigern, ohne dabei den Sauerstoffbedarf zu beeinflussen (132).

Toit et al. (2008) (133) analysierten, ob das Herz durch Vor- oder Nachbehandlung mit Levosimendan konditioniert werden kann und ob bestimmte Kinasen und K^+ _{ATP}-Kanäle dabei eine Rolle spielen. Sie behandelten isolierte Meerschweinchenherzen entweder mit Levosimendan oder mit Ischämie/Reperfusion-Zyklen vor einer koronaren Arterienligation. Überraschenderweise reduzierten sowohl Vor- als auch Nachkonditionierung mit Levosimendan die Infarktgröße im Vergleich zu den Kontrollen. K^+ _{ATP}-Kanalblocker negierten jedoch diesen schützenden Effekt. Levosimendan erhöhte zudem die Aktivität der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK), was mit einer reduzierten Infarktgröße korrelierte (133).

Yapici et al. (2008) (134) erforschten die Wirkung von Levosimendan auf Herzschäden bei hypothermischer Ischämie und Reperfusion in Rattenherzen. Die Ratten wurden in drei Gruppen unterteilt: eine Kontrollgruppe, eine nicht behandelte Gruppe und eine mit Levosimendan behandelte Gruppe. Nach einer hypothermen globalen Ischämie gefolgt von Reperfusion stellten sie fest, dass die Herzenzyme in der Levosimendan-behandelten Gruppe signifikant besser waren als in der unbehandelten Gruppe (134). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte weniger kardiomyozytische Degeneration in der Levosimendan-Gruppe (134).

Das und Sarkar et al. (2007) (135) untersuchten, ob Levosimendan, ähnlich wie ischämische Vorbehandlung, kardioprotektive und antiarrhythmische Effekte gegen Ischämie in einem Kaninchenmodell bietet (135). Die ischämische Vorbehandlung, Levosimendan oder beidem vor einer Koronarokklusion führte zu einer deutlich reduzierten Infarktgröße und antiarrhythmischen Effekten. NO-Inhibitoren hoben diese schützenden Effekte von der ischämischen Vorbehandlung im Vergleich zu Levosimendan auf, was darauf hindeutet, dass diese Effekte durch die Aktivierung von mitochondrialen K^+ _{ATP}-Kanälen in Kardiomyozyten erzielt werden könnte (135).

Hein et al. (2009) (136) untersuchten die Wirkung von Milrinon, Levosimendan und Dobutamin auf Myokardschäden in einem Schweinmodell von rechtsventrikulärer Ischämie und Reperfusionsschäden. Der I/R-Schaden wurde durch vorübergehende Ligation der distalen rechten Koronararterie verursacht. Milrinon und Levosimendan wurden als Behandlungen getestet und mit einer Kontrollgruppe sowie einer Dobutamingruppe verglichen (136). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Milrinon als auch Levosimendan die resultierende Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verringerten, während Dobutamin keinen solchen Schutzeffekt zeigte. Alle untersuchten Medikamente reduzierten entzündliche Marker, wobei Milrinon und Levosimendan besonders effektiv die Konzentrationen von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) während der Reperfusion senkten (136).

In einer jüngeren Studie von Rysz et al. (2020) (137) wurde Levosimendan in einem ischämischen Herzstillstandmodell bei Schweinen getestet. Das Hauptziel war es, die Auswirkungen von Levosimendan auf das Überleben und die Herzleistung nach einem Herzstillstand zu bewerten (137). Die Ergebnisse zeigten, dass Tiere, die mit Levosimendan behandelt wurden, im Vergleich zur Placebogruppe eine höhere Rückkehr

der spontanen Zirkulation und ein verbessertes Überleben hatten. Des Weiteren erholte sich die Herzleistung in der Levosimendan-Gruppe schneller. Trotz dieser positiven Effekte zeigte die MRT-Untersuchung keinen Unterschied in der Größe des Myokardinfarkts oder des gefährdeten Myokardbereichs zwischen den Gruppen (137). Das Fazit war, dass Levosimendan, das während und nach einem Herzstillstand verabreicht wurde, sowohl das Überleben als auch die Herzleistung in diesem Modell verbesserte (137).

Zusammenfassend legen diese Studien nahe, dass Levosimendan in bestimmten Situationen von Myokardischämie und Reperfusion potenziell kardioprotektive Effekte haben kann, wobei das genaue Wirkungsprofil und die Mechanismen je nach Modell und klinischem Kontext variieren können.

4.1.2 Levosimendan Forschungsstand der klinischen Studien

In der randomisierten, placebo-kontrollierten RUSSLAN-Studie mit 504 Patienten wurde die Effektivität und Sicherheit von Levosimendan bei linksventrikulärer Herzinsuffizienz evaluiert. Die Verabreichung bestand aus einem initialen intravenösen Bolus von Levosimendan, gefolgt von einer 6-stündigen Infusion in vier Dosen. Obwohl jede Dosis mit einer verminderten 14-Tage-Sterblichkeitsrate korrelierte, zeigte die 180-Tage-Sterblichkeitsrate keinen Unterschied zur Placebo-Gruppe (119, 138).

In einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Studie mit 24 Patienten führte ein 24g/kg Levosimendan Bolus zu einer signifikanten Verbesserung des Stunning-Myokards nach PTCA infolge einer myokardialen Ischämie, ohne die diastolische Funktion zu beeinträchtigen (119, 139).

Michaels et al. (2005) stellten fest, dass 24g/kg Levosimendan i.v. Bolus während einer PTCA zu einer koronaren Vasodilatation führte, charakterisiert durch eine reduzierte koronare Gefäßresistenz und einen verringerten venösen Sauerstoffgehalt im Koronarbereich. Dies ging einher mit einem verbesserten koronaren Blutfluss, einem verminderten linksventrikulären endsystolischen Volumenindex und einer gesteigerten Auswurfraction (119, 140) .

Tritapepe et al. (2009) (141) führten eine sorgfältig konzipierte Studie durch, um die möglichen vorteilhaften Auswirkungen einer pharmakologischen Vorbehandlung mit Levosimendan bei Patienten zu untersuchen, die sich einer elektiven Myokardrevaskularisation unter kardiopulmonalem Bypass unterzogen. Das Hauptziel dieser Untersuchung bestand darin, festzustellen, ob Levosimendan die postoperative Erholungszeit in der Intensivstation beeinflussen kann (141).

Insgesamt 106 Patienten, die eine koronare Bypass-Operation erhielten, wurden zufällig entweder der Levosimendan- oder der Placebo-Gruppe zugeordnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Levosimendan-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine kürzere Beatmungszeit und einen verkürzten Intensivaufenthalt aufwies (141). Zudem hatten die mit Levosimendan behandelten Patienten postoperativ niedrigere Troponin-Konzentrationen und einen höheren Herzleistungsindex (141). Zusammenfassend legt die Studie nahe, dass eine Vorbehandlung mit Levosimendan die postoperative Erholungszeit und die Herzfunktion bei Patienten, die sich einer Myokardrevaskularisation unterziehen, möglicherweise positiv beeinflussen kann (141).

In einer aktuellen systematischen Übersichtsstudie wurde die Auswirkung von Levosimendan auf die Sterblichkeit bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz analysiert. Neun randomisierte kontrollierte Studien mit 413 Patienten wurden berücksichtigt (142). Im Ergebnis fand man heraus, dass Levosimendan, im Vergleich zu anderen Substanzen wie Placebo, Dobutamin, Furosemid und Prostaglandin, den BNP-Spiegel effektiv senkte (142). Nichtsdestotrotz hatte Levosimendan keinen signifikanten Einfluss auf den Hazard Ratio (142). Daraus leiteten die Autoren ab, dass intravenöses Levosimendan den BNP-Spiegel bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz reduzieren und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) erhöhen kann, was potenziell die Sterblichkeit in der kurzfristigen Nachbeobachtung reduziert (142).

In einer systematischen Metaanalyse von Weber et al. (2020) (143) wurde die Anwendung von Levosimendan bei herzchirurgischen Eingriffen untersucht. Dabei wurden 27 randomisierte, kontrollierte Studien mit insgesamt 3.198 Patienten berücksichtigt. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Levosimendan mit einer verringerten Sterblichkeitsrate in Verbindung gebracht wurde und positive Effekte auf das Low-Cardiac-Output-Syndrom (LCOS) hatte. Zudem war eine verbesserte Organperfusion feststellbar, die sich in einem reduzierten Auftreten von akuten Nierenschäden äußerte.(143, 144).

Neueste Forschungsergebnisse weisen auf erweiterte Anwendungsmöglichkeiten von Levosimendan hin, insbesondere in der Kinderkardiochirurgie. Hier hat sich Levosimendan gegenüber Milrinone als überlegen herausgestellt. Kinder, die aufgrund eines angeborenen Herzfehlers kardiochirurgisch behandelt wurden und Levosimendan erhielten, verbrachten weniger Zeit sowohl unter Beatmung als auch im Krankenhaus und auf der Intensivstation. Ein weiterer positiver Befund war die reduzierte Inzidenz von LCOS bei Patienten, die mit Levosimendan behandelt wurden (144, 145, 145–147).

Zusammenfassend wurde Levosimendan erstmals 2000 in Schweden für den klinischen Einsatz bei akut dekompensierter chronischer Herzinsuffizienz zugelassen. Seitdem hat sich die Zulassung dieses Arzneimittel, das die Herzkontraktilität durch Kalziumsensibilisierung erhöht und Vasodilatation fördert, auf über 60 Länder ausgeweitet. Die Anwendungsgebiete sind vielfältig. Von kardiogenem Schock über Takotsubo-Kardiomyopathie bis hin zu Herzchirurgie und Notfallmedizin. Levosimendan wird derzeit in den USA geprüft und in der Forschung sowohl für herzbezogene als auch andere Krankheiten eingesetzt. Eine orale Version wird aktuell in Bezug auf amyotrophe Lateralsklerose untersucht (148).

4.2 Diskussion der Studienergebnisse

Die Zielsetzung der vorliegenden Forschungsarbeit bestand darin, die Interaktion zwischen Levosimendan und Ischämie-Reperfusionsschaden in Bezug auf die myokardiale subsarkolemmale und interfibrilläre Mitochondrienfunktion im Rattenherzmodell zu untersuchen.

In der Analyse wurde festgestellt, dass Levosimendan in dieser Untersuchung keine signifikante Potenzierung der ventrikulären Funktion bewirkte. Das gewählte I/R-Schadensmodell simulierte hinzu, durch Anwendung eines erhöhten LVEDP (linksventrikulärer enddiastolischer Druck = 18 mmHg), eine kongestive Herzinsuffizienz. Diese Befunde korrespondieren mit den Untersuchungsergebnissen von Kolseth et al. (2012) (149), bei denen die dosisabhängigen Effekte von Levosimendan auf die linksventrikuläre Kontraktilität sowie auf die mitochondriale Atmung in einem akuten ischämischen Herzinsuffizienz-Modell bei Schweinen evaluiert wurden. Hierfür wurden sechs Schweine in einem anästhesierten offenen Thoraxmodell herangezogen (1, 149). Die Herzinsuffizienz wurde mittels Mikroembolisierung der linken Koronararterien initiiert, gefolgt von der Applikation von vier unterschiedlichen Levosimendan-Dosierungen. Die Mitochondrienfunktion wurde mittels Clark-Elektrode nach Aufarbeitung der Muskelfasern mit Saponin nach Veksler et al (1987) untersucht (149, 150). Levosimendan hatte keine signifikanten, lastunabhängige Wirkung auf die kontraktile Kraft (1, 149). Die Funktion der Atmungskette blieb über alle Dosierungen konstant. Nach der Induktion der Herzinsuffizienz zeigte die maximale mitochondriale Atmung eine Abnahme und persistierte während der Levosimendan-Infusion auf diesem reduzierten Niveau.

Aus diesen Daten leiteten die Autoren ab, dass Levosimendan keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktilität, die energetische Effizienz und die mitochondriale Atmung des linken Ventrikels in einem Schweinemodell der akuten Herzinsuffizienz ausübt. Bei hohen Dosierungen bewirkte Levosimendan jedoch eine Vasodilatation und eine Steigerung der Herzfrequenz sowie der kardialen Auswurfleistung (149).

Das Fehlen einer detektierbaren Wirkung von Levosimendan in der aktuellen Untersuchung lässt sich womöglich auf Limitationen des verwendeten Modells zurückführen, einschließlich einer kurzen Perfusionszeit und der eingeschränkten

Möglichkeit, vaskuläre Relaxation oder Verbesserungen der ventrikulären Vor/Nachlast zu überwachen.

Im Kontext eines I/R-Schadens ist die mitochondriale Energiebereitstellung für die Rekonvaleszenz des Organs von essenzieller Bedeutung (1). Subsarkolemmale Mitochondrien (SSM) zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber ischämischen Einflüssen. Die Funktionstüchtigkeit der Atmungskette ist für die Gewährleistung der kontinuierlichen Energiebereitstellung Essenziell. Ihre regulatorische Dynamik ist intrinsisch mit der Generierung des Membranpotentials, ATP-Produktion und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verknüpft (1).

Gemäß den Erkenntnissen von Hüttemann et al. (2008) (151) spiegeln die Kontroll-SSM einen physiologischen Status wider, während die IR-SSM einen hypoaktiven Zustand repräsentieren, der durch eine kompromittierte Funktionalität der Atmungskette, des Membranpotentials und der Energieproduktion charakterisiert ist (1, 151).

Zhang et al. (2002) (73) und Paradies et al. (1999) (152) postulierten, dass Protein- und Lipidperoxidation ursächlich für die Dysfunktionalität der Atmungskette sind. Im Rahmen der hier diskutierten Studie inhibierten sowohl IR als auch Levo-IR synergetisch die Funktion des Komplexes I-V im Zustand 3. Dies untermauert die Hypothese von zwei differenzierten Mechanismen: Während die Ischämie zu Protein- und Membranveränderungen beiträgt, scheint Levosimendan mit hydrophoben Molekülstrukturen der Atmungskettenkomplexe zu interferieren (1, 73, 152, 153).

Die vorliegenden Daten illustrieren eine Hemmung des Komplex V als primär signifikanten Determinante aufgrund einer Dysfunktion im Respirationszustand 3 (+Substrat +ADP) im Vergleich zur Respirationszustand 2 Dysfunktion (+Substrat) (1). Diese Beobachtung korreliert mit vorangegangenen Literaturangaben, die ebenfalls den Komplex V als kritischen Faktor für beobachtete Hemmungen im Komplex I-V sowie II-V identifizieren (1, 154, 155).

Doussiere et al. (1984) (154) führten Inhibitortitrationsanalysen in kardialen Mitochondrien von Ratten mit Carboxyatractylosid, Oligomycin und Rotenone durch. Ihre Erkenntnisse legen nahe, dass die membranassoziierte ATPase und die Atmungskette Hauptregulatoren der oxidativen Phosphorylierungsrate sind. Die Carboxyatractylosid-Titrationsprofile zeigten die wechselnde Bedeutung des Adeninnukleotidtransports in Bezug auf ADP-zu-ATP Regeneration, Adeninnukleotid-Konzentration und spezifische

Atmungslimitationen (wie durch Zyanid, Rotenon, Oligomycin oder Mersalyl verursacht). Ferner zeigte sich, dass Carboxyatractylosid während es den O₂-Verbrauch hemmt, das Membranpotenzial erhöht (154). Ein inverser Zusammenhang zwischen diesen Vorgängen wurde bei Carboxyatractylosid-Konzentrationen von 0,7 bis 1,5 nmol/mg Protein festgestellt. Jenseits dieses Bereichs beeinflusste Carboxyatractylosid das Membranpotenzial, ohne die Atmungsaktivität wesentlich zu ändern. Die Studie schlussfolgert, dass die respiratorische Kapazität in kardialen Mitochondrien den oxidativen Phosphorylierungsprozess limitiert (154).

Kopustinskiene et al. (2010) (106) untersuchten den Einfluss von K⁺_{ATP}-Kanalaktivatoren, speziell Pinacidil und Diazoxid, auf die Atmungskette von Rattenherzmitochondrien in situ. Die Atmungsaktivität wurde bei 37°C unter Verwendung der Clark-Sauerstoffelektrode in einer physiologischen Salzlösung und in Gegenwart von Malat und Pyruvat gemessen (106). Es stellte sich heraus, dass Pinacidil und Diazoxid in Konzentrationen von 60-1250 µM die Pyruvat-Malat-gesteuerte State 2-Atmung der Herzfasern konzentrationsabhängig um 15-120% steigerten. Während Diazoxid keine Wirkung auf die State 3-Atmungsrate zeigte, reduzierte Pinacidil diese Rate in denselben Konzentrationen um 4-27%. Die Studie suggeriert, dass Modifikationen in der Atmungskette zum kardioprotektiven Effekt von K⁺_{ATP}-Kanalöffnern beitragen könnten (106).

Riess äußerte, dass der mito-K⁺_{ATP}-Kanalöffner unterschiedliche Auswirkungen auf mitochondriale Funktionen hatte. Insbesondere variierten die Aktivitäten von Komplex I und II je nach dem verwendeten mito-K⁺_{ATP}-Öffner und der jeweiligen Arbeitsgruppe, bedingt durch verschiedene energetische Zustände der Mitochondrien. Dies könnte die Unterschiede zwischen den aktuellen Ergebnissen und denen anderer Gruppen erklären (1, 155, 156).

Die Atemkettenkomplexe I, III und IV erzeugen durch die Energieübertragung durch die Elektronentransportkette das Membranpotential. Die Erzeugung des Membranpotentials hängt daher von einer intakten Funktion der Atmungskette ab (1, 151). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hypopolarisation des Membranpotentials ist jedoch unwahrscheinlich eine Folge der Unterdrückung der Atmungskettenfunktion, da die gruppenabhängigen Auswirkungen auf die Funktion des Respirationzustands 2 unbedeutend blieben. Bei I/R-Schäden führt vermutlich eine innere mitochondriale Membranschädigung zu H⁺-Leckagen, die den Verlust des

Membranpotentials erzeugen. Die Levosimendan-abhängige Membran-Hypopolarisation hingegen resultierte höchstwahrscheinlich aus der Mito- K^+_{ATP} -Öffnung, wie sie von Kopustinskiy et al. Ebenfalls beschrieben wurde (1, 155). Mito- K^+_{ATP} -Kanalöffner verringern das Membranpotential durch einen direkten H^+ / K^+ Austausch.

Neben der ATP-Synthese ist das Membranpotential die treibende Kraft für die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme. Racay et al. (2009) (157) zeigten, dass die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme proportional zum Membranpotential war. Je nach I/R-Schaden wurde in der vorliegenden Arbeit eine begrenzte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme nach einer beeinträchtigten Ca^{2+} -Freisetzung beobachtet. Dies wurde von einer beschleunigten Ca^{2+} -Freisetzung begleitet, die mit Levo-IR verstärkt wurde. Die beobachtete Veränderung der Ca^{2+} -Haushaltregulation kann als Ergebnis der Mito- K^+_{ATP} -Aktivierung und der Ca^{2+} -induzierten mPTP-Öffnung betrachtet werden (1, 158, 159).

In diesem Zusammenhang wurde in den Ergebnissen der vorliegenden Studie eine maximale Reduktion der Ca^{2+} -Retentionskapazität (CRC) mit Levo-IR gezeigt, was auf eine frühe temporäre Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung hindeutet. Huser et al. (1999) (160) beschrieben kurze intermittierende mPTP-Öffnungen als Rettungsphänomen, um die Überladung durch Ca^{2+} in Gegenwart von Zellstressvorgängen zu lindern. Die Reduktion des CRC wurde in Levo oder Levo-IR beobachtet; bei der Überprüfung einer nicht beeinflussten Ca^{2+} -Aufnahme oder Ca^{2+} -induzierten Schwellung durch Levosimendan deuten die vorliegenden Daten auch auf eine frühe temporäre Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung hin. Im Gegensatz zu CRC deutete die Ca^{2+} -induzierte mitochondriale Schwellung auf eine permanente mPTP-Öffnung hin. Die mPTP-Öffnung wurde durch die I/R-Schaden gefördert, aber nicht durch Levosimendan. Eine zusätzliche Pyruvat-Zugabe hemmte die Ca^{2+} -induzierte mPTP-Öffnung vermutlich aufgrund der Übersäuerung und Komplex I-Aktivierung, sowie der Erhöhung des Membranpotentials. In Gegenwart von Pyruvat verschwanden gruppenabhängige Unterschiede der mPTP-Ergebnisse, was auch darauf hindeutet, dass Levosimendan keine nachteilige Wirkung auf das mitochondriale Ca^{2+} -Handling hat.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass der I/R-Schaden der relevante Faktor ist, der zu einer permanenten mPTP-Öffnung führte, wobei Levosimendan keine relevanten Auswirkungen auf mPTP hatte. Die ATP-Synthese spiegelt den gemeinsamen Endpfad der Atemkettenfunktion und des Membranpotentials wider. In Gegenwart von Levosimendan war eine begrenzte ATP-Produktion offensichtlich. Dieser Effekt hängt

mutmaßlich von der beobachteten Komplex IV- und V-Hemmung ab. Die Komplex IV-Hemmung zusammen mit der Mito-K⁺_{ATP}-Öffnung führte zu einem niedrigen Membranpotential, wodurch die treibende Kraft für die ATP-Synthese bei Komplex V gehemmt wurde. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits früher für den Mito-K⁺_{ATP}-Öffner Pinacidil berichtet, was ebenfalls zu einer verzögerten mitochondrialen ATP-Synthese durch erhöhten K⁺-Fluss führte (1, 159). Die Auswirkungen einer eingeschränkten ATP-Synthese auf die mitochondriale Energieversorgung bleiben vage. Eine negative Levosimendan-abhängige Energiebilanz während einer I/R-Schaden ist vorstellbar.

4.3 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie hat einige Einschränkungen. Es wurden eine Vielzahl mitochondrialer Prozesse in Abhängigkeit von Levosimendan, I/R-Schaden oder der Kombination von beidem untersucht. Obwohl mögliche zugrundeliegende Prozesse zur Interpretation der Ergebnisse diskutiert wurden, gab es keine Beweise dieser Behauptungen in isolierter Mitochondrien in Gegenwart spezifischer Inhibitoren oder Kanalöffner.

Der in der vorliegenden Studie genutzte Versuchsaufbau könnte dahingehend ebenfalls die Ergebnisse verzerrt haben. Zukünftige Studien sollten sich auf die Auswirkungen von Levosimendan auf Ionenströme durch die innere mitochondriale Membran mit spezifischen Inhibitoren von z.B. H⁺, Na⁺ und K⁺ Kanälen konzentrieren. Zusätzlich wurden materialintensive Analysen durchgeführt. Die Menge an SSM und IFM, die aus dem Myokard zur Verfügung stand, war weniger effektiv als berechnet, was zu unterschiedlichen Replikationen der durchgeführten Tests führte. Dennoch sind die vorgestellten Studien ausreichend zuverlässig und bieten einen zuverlässigen Überblick über die Auswirkungen von Levosimendan auf die Mitochondrien unter den Umständen laufender I/R-Schaden.

Ramachandra et al. (2020) (47) beleuchteten intensiv die Herausforderungen bei der Übertragung von experimentellen Erkenntnissen aus Tiermodellen auf den klinischen Kontext, insbesondere im Bereich der Kardioprotektion. Ein Hauptkritikpunkt dieser Studie betraf die Repräsentativität der Tiermodelle. Während in der experimentellen Forschung vorwiegend gesunde Jungtiere eingesetzt werden, präsentiert sich die Patientenpopulation mit einem akuten Myokardinfarkt (AMI) zumeist als älter und häufig

von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie begleitet. Diese Diskrepanz kann signifikante Auswirkungen auf die Effektivität und Anwendbarkeit kardioprotektiver Therapieansätze haben (47).

Die Autoren machten ebenfalls darauf aufmerksam, dass in vielen klinischen Kardioprotektionsstudien innovative Therapieansätze untersucht werden, die in präklinischen Tiermodellen entweder inkonsistente Ergebnisse zeigten oder nicht rigoros genug evaluiert wurden. Die Selektion einer geeigneten Patientenpopulation für kardioprotektive Studien wird als ein entscheidender Faktor hervorgehoben. Beispielsweise könnten Patienten mit nahezu vollständigen Okklusionen der Koronararterien und umfangreichen Infarkten besonders von kardioprotektiven Maßnahmen profitieren (1, 47, 51).

Weiterhin kritisierten sie den häufigen Fokus vieler Studien auf monotherapeutische Ansätze, die sich ausschließlich an einem therapeutischen Ziel innerhalb der Kardiomyozyten orientieren. Angesichts der Komplexität der I/R-Schädigung, die neben mitochondrialer Dysfunktion auch Kalziumüberlastung und oxidativen Stress umfasst und zudem diverse Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten einbezieht, betonen sie die Notwendigkeit eines integrierten, multi-komponenten Ansatzes (1).

Ein weiterer zentraler Punkt ist das Timing der Therapie. Um effektiv gegen die mitochondriale Dysfunktion vorzugehen, muss die Therapie bereits vor dem Beginn der Reperfusion eingeleitet werden. Verspätete Interventionen erweisen sich oft als ineffektiv. Einige Therapien könnten sogar nur dann wirksam sein, wenn sie bereits vor dem einsetzenden ischämischen Ereignis angewendet werden – ein Szenario, das in der klinischen Realität oft unerreichbar ist (47).

Zusammenfassend unterstreicht die Analyse von Ramachandra et al. (2020) die Komplexität und Vielschichtigkeit der Kardioprotektion. Trotz vielversprechender präklinischer Daten ist die Übertragung auf den klinischen Kontext oft enttäuschend, wodurch ein klarer Bedarf an innovativen Ansätzen und neuartigen therapeutischen Zielen in der Kardioprotektionsforschung hervortritt.

4.4 Schlussfolgerung

Die in dieser Untersuchung erhobenen Daten betonen die signifikante Rolle von Levosimendan bei der Modulation der mitochondrialen Atmungsfunktion im Kontext von I/R-Schäden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Levosimendan gezielt auf die Aktivität der Komplexe IV und V der Atmungskette einwirkt und dabei zu einer Hypopolarisation des Membranpotentials führt. Dieses Phänomen deutet auf einen durch den mito- K^+ _{ATP}-Kanal vermittelten Mechanismus hin.

Zusätzlich zeigen die Daten, dass Levosimendan die intramitochondriale Ca^{2+} -Dynamik während I/R-Schäden beeinflusst. Diese Regulierung könnte von zentraler Bedeutung sein, um das mPTP-Öffnen und damit die daraus resultierende Ca^{2+} -Überlastung, einen Hauptfaktor der mitochondrialen Schädigung im Rahmen von I/R-Schäden, zu verhindern. Beachtenswert ist, dass, obwohl Levosimendan das mPTP-Öffnen initiierte, dies nicht zu einer dauerhaften Ca^{2+} -induzierten mPTP-Aktivierung führte.

Ein zentrales Ergebnis der Studie ist auch die durch Levosimendan bedingte Hemmung der ATP-Produktion. Dies scheint in direkter Verbindung mit den Beeinträchtigungen der Atmungskomplexe IV und V und der daraus resultierenden Verringerung des Membranpotentials zu stehen. Die damit einhergehende reduzierte ATP-Generierung könnte tiefgreifende Auswirkungen auf die zelluläre Energiebilanz und -homöostase haben. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das gesamte Ausmaß ihrer Auswirkungen und die daraus resultierenden klinischen Implikationen zu erfassen.

Die begrenzte Menge an Mitochondrien, die aus dem Herzmuskel gewonnen werden konnte, erwies sich als weniger ausreichend als erwartet, was zu variablen Wiederholungen der durchgeführten Tests führte. Darüber hinaus stellen die aufwendigen Materialanalysen, Anwendung von gesunden Rattenherzen und das Fehlen spezifischer Kanalinhhibitoren die Hauptbeschränkungen dieser Studie dar und bieten Ansatzpunkte für zukünftige Forschungsansätze.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersuchte den Effekt von Levosimendan auf die mitochondriale Funktionen im Herzmuskel, insbesondere im Zusammenhang mit dem Ischämie/Reperfusions-Schaden.

Methoden: In der Studie wurde ein retrogrades Langendorff-Modell verwendet, um die Auswirkungen von Levosimendan, dem Ischämie/Reperfusions-Schaden sowie deren Kombination auf die mitochondrialen Funktionen im Herzmuskel zu untersuchen. Dazu wurden vier verschiedene Gruppen von Rattenherzen entsprechend den experimentellen Bedingungen perfundiert, und ihre Funktionen wurden analysiert.

Ergebnisse: Der Ischämie/Reperfusions-Schaden beeinträchtigte die myokardiale Ventrikelfunktion. Zusätzlich wurde eine Hypopolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in den mit Levosimendan oder Ischämie behandelten Gruppen festgestellt. Die ATP-Synthese in den Gruppen mit Levosimendan und Ischämie war reduziert.

Schlussfolgerung: Levosimendan zeigt signifikante Einflüsse auf die Atmungsfunktion der mitochondrialen Komplexe IV und V sowie auf das Membranpotential. Diese Phänomene könnten einem mito- K^+ _{ATP}-abhängigen Mechanismus zugrunde liegen. Obwohl Levosimendan während des Ischämie/Reperfusionsschadens eine protektive Wirkung hinsichtlich einer Ca^{2+} -Überlastung aufweist, bleibt der kumulative Einfluss der beeinträchtigten ATP-Generierung auf die gesamte Myokardfunktion zu klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Sommer S, Leistner M, Aleksic I, Schimmer C, Alhussini K, Kanofsky P et al. **Impact of levosimendan and ischaemia–reperfusion injury on myocardial subsarcolemmal mitochondrial respiratory chain, mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ cycling and ATP synthesis.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2016; 49(2):e54-e62.
2. Cornejo-Avendaño J, Azpiri-López J, Ramírez-Rosales A. **Levosimendan in acute decompensated heart failure: Systematic review and meta-analysis.** *Medicina Universitaria* 2017; 19(75):80–97.
3. O'Reilly CM, Fogarty KE, Drummond RM, Tuft RA, Walsh JV. **Quantitative Analysis of Spontaneous Mitochondrial Depolarizations.** *Biophysical Journal* 2003; 85(5):3350–7.
4. Nieminen MS, Fruhwald S, Heunks LMA, Suominen PK, Gordon AC, Kivikko M et al. **Levosimendan: current data, clinical use and future development.** *Heart Lung Vessel* 2013; 5(4):227–45.
5. Heusch G. **Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what?** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 316(6):H1439-H1446. doi: 10.1152/ajpheart.00139.2019.
6. Gerd Heusch. **Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective.** *Nat Rev Cardiol* 2020; 17(12):773–89.
7. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli Ducci C, Bueno H et al. **2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation.** *European heart journal* &illable_bvb01_containers=BV002566954&illable_bvb01_containers=BV012958528 2018; 39&__01_=3(2):119–77. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393.
8. W. R. Ginks, H. D. Sybers, P. R. Maroko, J. W. Covell, B. E. Sobel, J. Ross. **Coronary Artery Reperfusion: II. REDUCTION OF MYOCARDIAL INFARCT SIZE AT 1 WEEK AFTER THE CORONARY OCCLUSION.** *J Clin Invest* 1972; 51(10):2717–23.

9. Ibáñez Borja, Heusch Gerd, Ovize Michel, Van de Werf Frans. **Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury.** *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65(14):1454–71. doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032.
10. Gerd Heusch. **Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning.** In: *Comprehensive Physiology*: American Cancer Society; 2015. S. 1123–45.
11. Hausenloy DJ, Botker HE, Engstrom T, Erlinge D, Heusch G, Ibanez B et al. **Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations.** *Eur Heart J* 2017; 38(13):935–41. doi: 10.1093/eurheartj/ehw145.
12. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A et al. **The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study.** *Circulation* 2014; 129(14):1493–501. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004046.
13. Hausenloy DJ, Kharbanda RK, Møller UK, Ramlall M, Aarøe J, Butler R 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.** *The Lancet* 2019; 394(10207):1415–24.
14. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D et al. **Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction.** *N Engl J Med* 2015; 373(11):1021–31.
15. Tomas Jernberg, Per Johanson, Claes Held, Bodil Svennblad, Johan Lindbäck, Lars Wallentin et al. **Association Between Adoption of Evidence-Based Treatment and Survival for Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction.** *JAMA* 2011; 305(16):1677–84. doi: 10.1001/jama.2011.522.
16. Heusch G, Gersh BJ. **The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge.** *Eur Heart J* 2017; 38(11):774–84.

17. Stone, Stone GW, Selker HP, Thiele H, Patel MR, Udelson JE et al. **Relationship Between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI.** *J. AM. COLL. CARDIOL*&owned_bvb01_containers=BV002561518&owned_bvb01_containers=BV013057331&owned_bvb01_containers=BV020835486 2016; 67(14):1674–83. doi: 10.1016/j.jacc.2016.01.069.
18. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986; 74(5):1124–36. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124.
19. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. **Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review.** *J Surg Res* 2008; 150(2):304–30.
20. Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, Bøtker HE, Heusch G, Ibáñez B et al. **Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week.** *J. AM. COLL. CARDIOL*&owned_bvb01_containers=BV002561518&owned_bvb01_containers=BV013057331&owned_bvb01_containers=BV020835486 2019; 73(1):89–99.
21. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA et al. **Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018).** *J. AM. COLL. CARDIOL*&owned_bvb01_containers=BV002561518&owned_bvb01_containers=BV013057331&owned_bvb01_containers=BV020835486 2018; 72(18):2231–64.
22. Jennings RB, Reimer KA. **Lethal Myocardial Ischemic Injury.** *Am J Pathol* 1981; 102(2):241–55.
23. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA et al. **Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2):H579–88. doi: 10.1152/ajpheart.01064.2002.
24. Hans Erik Bøtker, Derek Hausenloy, Ioanna Andreadou, Salvatore Antonucci, Kerstin Boengler, Sean M. Davidson et al. **Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection.** *Basic Res Cardiol* 2018; 113(5):1–73.

25. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. **The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs.** *Circulation* 1977; 56(5):786–94. doi: 10.1161/01.cir.56.5.786.
26. Reimer KA, Jennings RB. **The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow.** *LAB. INVEST*&owned_bvb01_containers=BV006670721&owned_bvb01_containers=BV012525246&owned_bvb01_containers=BV013613304; 40(6):633–44.
27. Massé L, Antonacci M. **Low cardiac output syndrome: identification and management.** *Crit Care Nurs Clin North Am* 2005; 17(4):375-83, x. doi: 10.1016/j.ccell.2005.07.005.
28. Carcillo JA, Fields AI. **Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock.** *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(6):449–66.
29. Vincent J-L, Gerlach H. **Fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock: An evidence-based review.** *Critical Care Medicine* 2004; 32(11):S451.
30. Beale RJ, Hollenberg SM, Vincent J-L, Parrillo JE. **Vasopressor and inotropic support in septic shock: An evidence-based review.** *Critical Care Medicine* 2004; 32(11):S455.
31. S M Tibby, I A Murdoch. **Monitoring cardiac function in intensive care.** *Archives of Disease in Childhood* 2003; 88(1):46–52.
32. Hoffman TM, Wernovsky G, Atz AM, Bailey JM, Akbary A, Kocsis JF et al. **Prophylactic intravenous use of milrinone after cardiac operation in pediatrics (PRIMACORP) study.** *American Heart Journal* 2002; 143(1):15–21.
33. Dellinger RP. **Cardiovascular management of septic shock.** *Critical Care Medicine* 2003; 31(3):946.
34. Wilson WC, Shapiro B. **Perioperative hypoxia: Perioperative hypoxia the clinical spectrum and current oxygen monitoring methodology.** *Anesthesiology Clinics of North America* 2001; 19(4):769–812.
35. Jacob R, Dierberger B, Kissling G. **Functional significance of the Frank-Starling mechanism under physiological and pathophysiological conditions.** *Eur Heart J* 1992; 13 Suppl E:7–14. doi: 10.1093/eurheartj/13.suppl_e.7.

36. Andrew P. **Diastolic Heart Failure Demystified***. *Chest* 2003; 124(2):744–53.
37. Charpie JR, Dekeon MK, Goldberg CS, Mosca RS, Bove EL, Kulik TJ. **Serial blood lactate measurements predict early outcome after neonatal repair or palliation for complex congenital heart disease**. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2000; 120(1):73–80.
38. Fenton KE, Sable CA, Bell MJ, Patel KM, Berger JT. **Increases in serum levels of troponin I are associated with cardiac dysfunction and disease severity in pediatric patients with septic shock***. *Pediatric Critical Care Medicine* 2004; 5(6):533.
39. Kao W, Surjancev BP. **Management of acute heart failure exacerbation**. *Critical care clinics* 2001; 17(2).
40. Lee C, Mason LJ. **PEDIATRIC CARDIAC EMERGENCIES**. *Anesthesiology Clinics of North America* 2001; 19(2):287–308.
41. Duke, Duke T, Butt W, South M, Karl TR. **Early markers of major adverse events in children after cardiac operations**. *J. THORAC. CARDIOVASC. SURG* 1997; 114(6):1042-1052&has_bvb01_containers=3. doi: 10.1016/S0022-5223(97)70018-7.
42. Breen PH. **Arterial blood gas and pH analysis: Clinical approach and interpretation**. *Anesthesiology Clinics of North America* 2001; 19(4):885–906.
43. Horwitz LD, Atkins JM, Leshin SJ. **Role of the Frank-Starling mechanism in exercise**. *Circ Res* 1972; 31(6):868–75. doi: 10.1161/01.RES.31.6.868.
44. S A Deshpande, M P Ward Platt. **Association between blood lactate and acid-base status and mortality in ventilated babies**. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 1997; 76(1):F15-F20. doi: 10.1136/fn.76.1.F15.
45. Yoshiyuki Takami, Hiroshi Ina. **Significance of the Initial Arterial Lactate Level and Transpulmonary Arteriovenous Lactate Difference After Open-Heart Surgery**. *Surg Today* 2002; 32(3):207–12.
46. Butt W. **SEPTIC STOCK**. *Pediatric Clinics of North America* 2001; 48(3):601–26.
47. Ramachandra CJ, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Lin Y-H, Hausenloy DJ. **Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection**. *EBioMedicine* 2020; 57:102884.

48. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi SKBM, AlKatheeri R et al. **Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study.** *Cureus* 2020; 12(7):e9349.
49. **Cardiovascular diseases;** 2023 [Stand: 09.08.2023]. Verfügbar unter: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
50. World Health Organization, Organization WH. **Global Diffusion of EHealth: Making Universal Health Coverage Achievable: World Health Organization;** 2017.
51. Zuurbier CJ, on behalf of the EU-CARDIOPROTECTION COST Action, Abbate A, Cabrera-Fuentes HA, Cohen MV, Collino M et al. **Innate immunity as a target for acute cardioprotection.** *Cardiovasc Res* 2019; 115(7):1131–42.
52. Neubauer S. **The failing heart--an engine out of fuel.** *N Engl J Med* 2007; 356(11):1140–51. doi: 10.1056/NEJMra063052.
53. Tzagoloff A. **Mitochondria.** 1st ed. 1982. New York, New York: *Plenum Press;* 1982. (Basic Life Sciences).
54. Maack C, Dabew ER, Hohl M, Schäfers H-J, Böhm M. **Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning.** *Circ Res* 2009; 105(8):811–7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206359.
55. Schwemmlin J, Maack C, Bertero E. **Mitochondria as Therapeutic Targets in Heart Failure.** *Curr Heart Fail Rep* 2022; 19(2):27–37. doi: 10.1007/s11897-022-00539-0.
56. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. **Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2014; 73:26–33. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.011.
57. Hernandez-Resendiz S, Prunier F, Girao H, Dorn G, Hausenloy DJ. **Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2020; 24(12):6571–85. doi: 10.1111/jcmm.15384.
58. Inse J, Barba I, Hernando V, Abellán A, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A et al. **Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage.** *Cardiovasc Res* 2008; 77(4):782–90. doi: 10.1093/cvr/cvm082.

59. Avkiran Metin, Marber Michael S. **Na⁺/H⁺-exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects.** *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(5):747–53. doi: 10.1016/S0735-1097(02)01693-5.
60. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H et al. **Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(4):H2004-8. doi: 10.1152/ajpheart.01051.2006.
61. Péter Ferdinandy, Derek J. Hausenloy, Gerd Heusch, Gary F. Baxter, Rainer Schulz. **Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning.** *Pharmacol Rev* 2014; 66(4):1142–74.
62. Zhou M, Yu Y, Luo X, Wang J, Lan X, Liu P et al. **Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutics from a Mitochondria-Centric Perspective.** *Cardiology* 2021; 146(6):781–92.
63. Willis BC, Salazar-Cantú A, Silva-Platas C, Fernández-Sada E, Villegas CA, Rios-Argaiz E et al. **Impaired oxidative metabolism and calcium mishandling underlie cardiac dysfunction in a rat model of post-acute isoproterenol-induced cardiomyopathy.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(5):H467-77. doi: 10.1152/ajpheart.00734.2013.
64. I. V. Shemarova, V. P. Nesterov, S. M. Korotkov, K. V. Sobol'. **Involvement of Ca²⁺ in the development of ischemic disorders of myocardial contractile function.** *J Evol Biochem Phys* 2017; 53(5):368–79.
65. Saakian IR, Sherdukalo LF, Saakian GG. **[Assessment of energy-dependent Ca²⁺ transport in myocardial mitochondria in the ventricular fibrillation: potential diagnostic implication].** *Biomeditsinskaia khimiia* 2003; 49(5).
66. Haworth RA, Hunter DR. **The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1979; 195(2):460–7. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2.
67. Yu.P. Orlov. **Energy Deficit in Critical Conditions: the Value of Succinates.** *EM* 2016; (7.78):124–31.

68. Ong S-B, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. **The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015; 78:23–34.
69. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N et al. **Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2008; 359(5):473–81. doi: 10.1056/NEJMoa071142.
70. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D et al. **Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction.** *N Engl J Med* 2015; 373(11):1021–31. doi: 10.1056/NEJMoa1505489.
71. Lygate CA, Bohl S, Hove M ten, Faller KM, Ostrowski PJ, Zervou S et al. **Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction.** *Cardiovasc Res* 2012; 96(3):466–75.
72. Sean M. Davidson, Adriana Adameová, Lucio Barile, Hector Alejandro Cabrera-Fuentes, Antigone Lazou, Pasquale Pagliaro et al. **Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2020; 24(7):3795–806.
73. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. **Gluing the Respiratory Chain Together: CARDIOLIPIN IS REQUIRED FOR SUPERCOMPLEX FORMATION IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE*.** *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(46):43553–6.
74. Rongbin Zhou, Amir S. Yazdi, Philippe Menu, Jürg Tschopp. **A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation.** *Nature* 2011; 469(7329):221–5.
75. Yan H-F, Tuo Q-Z, Yin Q-Z, Lei P. **The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury.** *Zool Res* 2020; 41(3):220–30. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042.
76. Hsiang-Chun Chang, Rongxue Wu, Meng Shang, Tatsuya Sato, Chunlei Chen, Jason S Shapiro et al. **Reduction in mitochondrial iron alleviates cardiac damage during injury.** *EMBO Molecular Medicine* 2016; 8(3):247–67. doi: 10.15252/emmm.201505748.
77. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. **Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease.** *Advances in Medicine* 2016; 2016.

78. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM et al. **Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment.** *Ann Transl Med* 2018; 6(12). doi: 10.21037/atm.2018.06.21.
79. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. **Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside.** *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; 16(3):123–32. doi: 10.1177/1089253211436350.
80. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. **Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin.** *Circ Res* 2004; 94(1):53–9. doi: 10.1161/01.RES.0000109416.56608.64.
81. Li Q, Di Su, O'Rourke B, Pogwizd SM, Zhou L. **Mitochondria-derived ROS bursts disturb Ca²⁺ cycling and induce abnormal automaticity in guinea pig cardiomyocytes: a theoretical study.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(6):H623–36. doi: 10.1152/ajpheart.00493.2014.
82. Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. **Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Phosphorylation by Protein Kinase Cδ (PKCδ) Inhibits Mitochondria Elimination by Lysosomal-like Structures following Ischemia and Reoxygenation-induced Injury*.** *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(26):18947–60.
83. Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W et al. **Mitofusin-2 Is a Major Determinant of Oxidative Stress-mediated Heart Muscle Cell Apoptosis*.** *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(32):23354–61.
84. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. **Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells.** *J Cell Sci* 2004; 117(11):2417–26.
85. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. **Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: Effects of procedural manipulations.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985; 236(2):691–702.
86. Manneschi L, Federico A. **Polarographic analyses of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria from rat skeletal and cardiac muscle.** *Journal of the Neurological Sciences* 1995; 128(2):151–6. doi: 10.1016/0022-510X(94)00227-F.

87. Kuznetsov AV, Javadov S, Margreiter R, Grimm M, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. **The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury.** *Antioxidants (Basel)* 2019; 8(10). doi: 10.3390/antiox8100454.
88. Lesnefsky EJ, Tandler B, Ye J, Slabe TJ, Turkaly J, HOPPEL CL. **Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria.** *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 2):H1544-54. doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1544.
89. HOPPEL CL, HOPPEL CL, TANDLER B, PARLAND W, TURKALY JS. **HAMSTER CARDIOMYOPATHY: A DEFECT IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN THE CARDIAC INTERFIBRILLAR MITOCHONDRIA** 1982.
90. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. **Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2011; 50(6):940–50.
91. Döring HJ. **The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application.** *Physiol Bohemoslov* 1990; 39(6):481–504.
92. Broadley KJ. **The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs.** *Journal of Pharmacological Methods* 1979; 2(2):143–56.
93. Watanabe M, Okada T. **Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats.** In: Ishikawa K, Hrsg. *Experimental models of cardiovascular diseases: Methods and protocols.* New York: Humana Press; Springer; 2018. S. 107–16 (Methods in molecular biology; vol. 1816).
94. Palmer JW, Tandler B, HOPPEL CL. **Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle.** *Journal of Biological Chemistry* 1977; 252(23):8731–9.
95. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG. **Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart.** *Resuscitation* 2004; 62(1):97–106.
96. Zini R, Simon N, Morin C, Thiault L, Tillement J-P. **Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain.** *Life Sciences* 1998; 63(5):357–68.

97. Bugger H. **Bugger, H., Der Einfluss veränderter Arbeitslast auf die Regulation der respiratorischen Kapazität isolierter Mitochondrien, in Herz- und Gefäßchirurgie. 2006, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. p. 109.**
98. Handatech. <http://www.hansatech-instruments.com/> **Oxygen Electrode Measurement Principles.**
99. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM et al. **Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies.** *Clin Chim Acta* 1994; 228(1):35–51. doi: 10.1016/0009-8981(94)90055-8.
100. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM et al. **Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment.** *Ann Transl Med* 2018; 6(12):256. doi: 10.21037/atm.2018.06.21.
101. Sommer S, Leistner M, Aleksic I, Schimmer C, Alhussini K, Leyh RG. **LEVOSIMENDAN IMPAIRS ATP PRODUCTION BY LIMITATION OF ELECTRON TRANSPORT CHAIN FUNCTION FOLLOWED BY LOSS OF CA²⁺ RETENTION ...;** 2014. 28th EACTS Annual Meeting, Milan, Italy, October 11-15, 2014
102. Papp Z, Édes I, Fruhwald S, Hert SG de, Salmenperä M, Leppikangas H et al. **Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan.** *Int J Cardiol* 2012; 159(2):82–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.07.022.
103. Orion Pharma GmbH. **Summary Product Characteristics.**
104. Levijoki J, Pollesello P, Kaivola J, Tilgmann C, Sorsa T, Annala A et al. **Further Evidence for the Cardiac Troponin C Mediated Calcium Sensitization by Levosimendan: Structure-response and Binding Analysis with Analogs of Levosimendan.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000; 32(3):479–91.
105. Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. **Levosimendan Increases Diastolic Coronary Flow in Isolated Guinea-Pig Heart by Opening ATP-Sensitive Potassium Channels.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2001; 37(4):367.
106. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris N-EL. **Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria.** *Biochem Pharmacol* 2004; 68(5):807–12. doi: 10.1016/j.bcp.2004.05.018.

107. 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* 2009; 105(2):155–67.
108. Maack C, Eschenhagen T, Hamdani N, Heinzel FR, Lyon AR, Manstein DJ et al.
Treatments targeting inotropy. *Eur Heart J* 2019; 40(44):3626–44. doi: 10.1093/eurheartj/ehy600.
109. Grzešek G, Wołowicz Ł, Rogowicz D, Gilewski W, Kowalkowska M, Banach J et al. **The importance of pharmacokinetics, pharmacodynamic and repetitive use of levosimendan.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022; 153:113391.
110. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. **Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat arterial myocytes.** *European Journal of Pharmacology* 1997; 333(2-3):249–59. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01108-4.
111. Schwarte LA, Schwartges I, Thomas K, Schober P, Picker O. **The effects of levosimendan and glibenclamide on circulatory and metabolic variables in a canine model of acute hypoxia.** *Intensive Care Med* 2011; 37(4):701–10. doi: 10.1007/s00134-011-2144-1.
112. Nieminen MS, Fruhwald S, Heunks LMA, Suominen PK, Gordon AC, Kivikko M et al.
Levosimendan: current data, clinical use and future development. *Heart Lung Vessel* 2013; 5(4):227–45.
113. Teerlink JR, Packer M, Colucci WS, Young JB, Massie BM, Fisher LD et al.
Levosimendan Provides Rapid and Sustained Relief in Patient Global Assessment of Acutely Decompensated Heart Failure: The REVIVE II Study. *Journal of Cardiac Failure* 2006; 12(6, Supplement):S86.
114. Packer M, Colucci WS, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young JB et al. **Development of a comprehensive new endpoint for the evaluation of new treatments for acute decompensated heart failure: results with levosimendan in the REVIVE 1 study.** *Journal of Cardiac Failure* 2003; 9(5, Supplement 1):S61.
115. Garratt C, Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie B, Teerlink J et al. **Development of a comprehensive new endpoint for the evaluation of new treatments for acute**

- decompensated heart failure: results with levosimendan in the REVIVE 1 study.** *Crit Care* 2004; 8(Suppl 1):P89. doi: 10.1186/cc2556.
116. Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ et al. **Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial.** *JAMA* 2007; 297(17):1883–91. doi: 10.1001/jama.297.17.1883.
117. Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K et al. **Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial.** *The Lancet* 2002; 360(9328):196–202.
118. Moiseyev VS, Pöder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB et al. **Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN).** *Eur Heart J* 2002; 23(18):1422–32. doi: 10.1053/euhj.2001.3158.
119. Scheiermann, Scheiermann P, Beiras Fernandez A, Mutlak H, Weis FP. **The Protective Effects of Levosimendan on Ischemia/Reperfusion Injury and Apoptosis.** *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2011; 6(1):20–6. doi: 10.2174/157489011794578482.
120. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. **Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat arterial myocytes.** *European Journal of Pharmacology* 1997; 333(2):249–59.
121. Gross GJ, Fryer RM. **Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning.** *Circ Res* 1999; 84(9):973–9. doi: 10.1161/01.res.84.9.973.
122. A. F. E. Rump, D. Acar, R. Rösen, W. Klaus. **Functional and Antiischaemic Effects of the Phosphodiesterase Inhibitor Levosimendan in Isolated Rabbit Hearts.** *Pharmacology & Toxicology* 1994; 74(6):244–8. doi: 10.1111/j.1600-0773.1994.tb01106.x.

123. Jamali IN, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. **Intracoronary Levosimendan Enhances Contractile Function of Stunned Myocardium.** *Anesthesia & Analgesia* 1997; 85(1):23.
124. Kristof E, Szigeti G, Papp Z, Bodi A, Ball NA, Walsh RA et al. **The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts.** *Basic Research in Cardiology* 1999; 94&_01_=002529922&_01_=002673421&_01_=012987013(4):223–30.
125. E. F. Du Toit, C. A. Muller, J. McCarthy, L. H. Opie. **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* 1999; 290(2):505–14.
126. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, Warltier DC. **Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels.** *Anesthesia & Analgesia* 2000; 90(1):5–11. doi: 10.1097/00000539-200001000-00003.
127. E du Toit, D Hofmann, J McCarthy, C Pineda. **Effect of levosimendan on myocardial contractility, coronary and peripheral blood flow, and arrhythmias during coronary artery ligation and reperfusion in the in vivo pig model.** *Heart* 2001; 86(1):81–7.
128. Eriksson O, Pollesello P, Haikala H. **Effect of Levosimendan on Balance between ATP Production and Consumption in Isolated Perfused Guinea-Pig Heart before Ischemia or after Reperfusion.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2004; 44(3):316.
129. Busk M, Maeng M, Kristensen J, Berg JS, Mortensen UM, Nielsen TT et al. **Effects of Levosimendan on Myocardial Infarct Size and Hemodynamics in a Closed-Chest Porcine Ischemia–Reperfusion Model.** *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20(5):335–42.
130. Leprán I, Pollesello P, Vajda S, Varró A, Papp JG. **Preconditioning Effects of Levosimendan in a Rabbit Cardiac Ischemia-Reperfusion Model.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2006; 48(4):148.
131. Papp JG, Pollesello P, Varró AF, Végh AS. **Effect of levosimendan and milrinone on regional myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in dogs.** *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006; 11(2):129–35. doi: 10.1177/1074248406289286.

132. Meyer K, Klocke RC, Schipke JD, Gams E, Korbmacher B. **Ca²⁺ sensitizer superior to catecholamine during myocardial stunning?** *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 34(2):326–31.
133. E F Du Toit, A Genis, L H Opie, P Pollesello, A Lochner. **A role for the RISK pathway and KATP channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart.** *British Journal of Pharmacology* 2008; 154(1):41–50. doi: 10.1038/bjp.2008.52.
134. Yapici D, Altunkan Z, Ozeren M, Bilgin E, Balli E, Tamer L et al. **Effects of levosimendan on myocardial ischaemia-reperfusion injury.** *European Journal of Anaesthesiology | EJA* 2008; 25(1):8.
135. Das B, Sarkar C. **Pharmacological preconditioning by levosimendan is mediated by inducible nitric oxide synthase and mitochondrial KATP channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart model.** *Vascular Pharmacology* 2007; 47(4):248–56.
136. Hein M, Roehl AB, Baumert JH, Scherer K, Steendijk P, Rossaint R. **Anti-ischemic effects of inotropic agents in experimental right ventricular infarction.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53(7):941–8. doi: 10.1111/j.1399-6576.2009.01994.x.
137. Rysz S, Lundberg J, Nordberg P, Eriksson H, Wieslander B, Lundin M et al. **The effect of levosimendan on survival and cardiac performance in an ischemic cardiac arrest model – A blinded randomized placebo-controlled study in swine.** *Resuscitation* 2020; 150:113–20.
138. Moiseyev VS, RUSSLAN Study Investigators, Pöder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP et al. **Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN).** *Eur Heart J* 2002; 23(18):1422–32.
139. Sonntag Steffen, Sundberg Stig, Lehtonen Lasse Antero, Kleber Franz Xaver. **The calcium sensitizer levosimendan improves the function of stunned myocardium after percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial ischemia.** *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(12):2177–82. doi: 10.1016/j.jacc.2004.02.052.

140. Michaels AD, McKeown B, Kostal M, Vakharia KT, Jordan MV, Gerber IL et al. **Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake.** *Circulation* 2005; 111(12):1504–9. doi: 10.1161/01.CIR.0000159252.82444.22.
141. Tritapepe, Tritapepe L, Santis V de, Vitale D, Guarracino F, Pellegrini F et al. **Levosimendan pre-treatment improves outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery** . *British journal of anaesthesia* 2009; 102&__01_=4(2):198–204. doi: 10.1093/bja/aen367.
142. Cui D, Liao Y, Li G, Chen Y. **Levosimendan Can Improve the Level of B-Type Natriuretic Peptide and the Left Ventricular Ejection Fraction of Patients with Advanced Heart Failure: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials.** *Am J Cardiovasc Drugs* 2021; 21(1):73–81. doi: 10.1007/s40256-020-00416-y.
143. Carolyn Weber, Matthias Esser, Kaveh Eghbalzadeh, Anton Sabashnikov, Ilija Djordjevic, Johanna Maier et al. **Levosimendan Reduces Mortality and Low Cardiac Output Syndrome in Cardiac Surgery.** *Thorac Cardiovasc Surg* 2020; 68(05):401–9. doi: 10.1055/s-0039-3400496.
144. Massol J, Simon-Tillaux N, Tohme J, Hariri G, Dureau P, Duceau B et al. **Levosimendan in patients undergoing extracorporeal membrane oxygenation after cardiac surgery: an emulated target trial using observational data.** *Crit Care* 2023; 27(1):51. doi: 10.1186/s13054-023-04328-6.
145. Jothinath K, Balakrishnan S, Raju V, Menon S, Osborn J. **Clinical efficacy of levosimendan vs milrinone in preventing low cardiac output syndrome following pediatric cardiac surgery.** *Ann Card Anaesth* 2021; 24(2):217–23. doi: 10.4103/aca.ACA_160_19.
146. Conti N, Gatti M, Raschi E, Diemberger I, Potena L. **Evidence and Current Use of Levosimendan in the Treatment of Heart Failure: Filling the Gap.** *Drug Des Devel Ther* 2021; 15:3391–409. doi: 10.2147/DDDT.S295214.
147. Tsolaki V, Zakyntinos GE, Papanikolaou J, Vazgiourakis V, Parisi K, Fotakopoulos G et al. **Levosimendan in the Treatment of Patients with Severe Septic Cardiomyopathy.** *Life (Basel)* 2023; 13(6). doi: 10.3390/life13061346.

148. Papp Z, Agostoni P, Alvarez J, Bettex D, Bouchez S, Brito D et al. **Levosimendan Efficacy and Safety: 20 years of SIMDAX in Clinical Use.** *Cardiac failure review* &has_illable_bvb01_containers=2 2020; 6:e19. doi: 10.15420/cfr.2020.03.
149. Kolseth SM, Wahba A, Kirkeby-Garstad I, Aro S, Nordgaard H, Høydal M et al. **A dose-response study of levosimendan in a porcine model of acute ischaemic heart failure.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2012; 41(6):1377–83. doi: 10.1093/ejcts/ezr201.
150. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. **Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers.** *Biochim Biophys Acta* 1987; 892(2):191–6. doi: 10.1016/0005-2728(87)90174-5.
151. Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G et al. **Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2012; 1817(4):598–609.
152. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM. **Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion.** *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27(1):42–50.
153. MITCHELL P. **CHEMIOSMOTIC COUPLING IN OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION.** *Biological Reviews* 1966; 41(3):445–501.
154. Doussiere J, Lighti E, Brandolin G, Vignais PV. **Control of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1984; 766(2):492–500. doi: 10.1016/0005-2728(84)90265-2.
155. Dalia M, Kopustinskiene, Julius Liobikas, Kristina Skemiene, Faustas Malinauskas, Adolfas Toleikis. **Direct Effects of KATP Channel Openers Pinacidil and Diazoxide on Oxidative Phosphorylation of Mitochondria in situ.** *CPB* 2010; 25(2-3):181–6. doi: 10.1159/000276552.

156. Riess ML, Camara AKS, Heinen A, Eells JT, Henry MM, Stowe DF. **KATP Channel Openers Have Opposite Effects on Mitochondrial Respiration Under Different Energetic Conditions.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2008; 51(5):483–91. doi: 10.1097/FJC.0b013e31816bf4a4.
157. Peter Racay, Zuzana Tatarkova, Maria Chomova, Jozef Hatok, Peter Kaplan, Dusan Dobrota. **Mitochondrial Calcium Transport and Mitochondrial Dysfunction After Global Brain Ischemia in Rat Hippocampus.** *Neurochem Res* 2009; 34(8):1469–78.
158. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S-S. **Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.** *American journal of physiology. Cell physiology* 2004; 287(4):C817-33.
159. Holmuhamedov EL, Jovanović S, Dzeja PP, Jovanović A, Terzic A. **Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function.** *Am J Physiol* 1998; 275(5):H1567-76. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.5.H1567.
160. Hüser J, Blatter LA. **Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore.** *Biochem J* 1999; 343 Pt 2(Pt 2):311–7.

Appendix

I. Abkürzungenverzeichnis

ADHF	Akut dekompensierte chronische Herzinsuffizienz
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
Bpm	Schläge Pro Minute (Beat per minute)
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazin
CK-MB	Kreatinkinase Isoenzym MB "Muscle-Brain type"
CO	Kohlenmonoxid
CRC	Ca ²⁺ -Retentionskapazität
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extrazellulären signalregulierte Kinase
HF	Herzinsuffizienz
hFABP	Herzfettsäure-Bindungsprotein
HOCM	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
hs-Tn	Hochsensitives Troponin
I/R	Ischämie-Reperfusionsschaden
IFM	Interfibrilläre Mitochondrien
IMM	Innere mitochondriale Membran
K ⁺ _{ATP}	Adenosintriphosphat-regulierte Kaliumkanäle
LAD	Linke vordere absteigende Koronararterie
LCOS	Low Cardiac Output Syndrom
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LGE	Late-Gadolinium-Enhancement
LVdP/dt	Linksventrikulärer entwickelter Druck/ Δ zeit
LVEDP	Linksventrikuläre enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAO	Monoaminoxidasen
MCU	Mitochondrialer Ca ²⁺ Uniporter
MI	Myokardinfarkt
Mito-K ⁺ _{ATP}	Mitochondriale Adenosintriphosphat-regulierte Kaliumkanäle
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
OMM	Äußere mitochondrien Membran
OXPHOS	Oxidativen Phosphorylierung
PCI	Perkutane koronare Interventionen
PDE3	Phosphodiesterase-3

PNM	Perinucleäre Miochondrien
RCF	Respiratory Chain Function (Funktion der Atmungskette)
ROS	Freie Radikale
SSM	Subsarkolemmale Mitochondrien
Trop T	Troponin T
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
WHO	Weltgesundheitsorganisation
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

II. Abbildungsliste

Abbildung 1 Überblick Mitochondrienarchitektur.....	12
Abbildung 2 Flussdiagramm des Studiendesigns.....	25
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Langendorff-Perfusionsapparates	27
Abbildung 4 Messungen aus dem Langendorff-Versuch.....	27
Abbildung 5 Clark-Type Elektrode mit Oxytherm System	30
Abbildung 6 Myokardfunktion 1.....	35
Abbildung 7 Myokardfunktion 2.....	36
Abbildung 8 High sensitiv Troponin.....	38
Abbildung 9 CK-MB.....	38
Abbildung 10 Myoglobin	39
Abbildung 11 hFABP.....	39
Abbildung 12 LDH.....	40
Abbildung 13 GOT.....	40
Abbildung 14: Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex I-V.....	43
Abbildung 15 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex I-V.....	43
Abbildung 16 Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex II-V.....	44
Abbildung 17 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex II-V.....	44
Abbildung 18 Subsarcolemmale Mitochondrien; Komplex IV.....	45
Abbildung 19 interfibrilläre Mitochondrien; Komplex IV.....	45
Abbildung 20 Analyse des Membranpotential der SSM.....	47
Abbildung 21 Übersicht über das mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und Freisetzung.....	49
Abbildung 22 Analyse der Ca^{2+} -Aufnahme durch SSM.....	49
Abbildung 23 Analyse der Ca^{2+} -Freisetzung durch SSM	50
Abbildung 24 SSM Ca^{2+} Retentionskapazität.....	52
Abbildung 25 IFM Ca^{2+} Retentionskapazität.....	52
Abbildung 26 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von SSM	54
Abbildung 27 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von SSM in Anwesenheit von Pyruvat.....	54
Abbildung 28 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von IFM.....	55
Abbildung 29 Ca^{2+} -induzierte Schwellung von IFM in Anwesenheit von Pyruvat.....	55
Abbildung 30 absoluter ATP-Gehalt und Produktionskapazität von SSM.....	57
Abbildung 31 relative ATP-Produktionskapazität	57

III. Tabellenliste

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen.....	21
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	22
Tabelle 3 Gruppeneinteilung.....	24
Tabelle 4 Myokardiale Enzymmarker.....	41