

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

**Morphininduzierte Präkonditionierung: die Bedeutung des  
Signaltransduktionsweges über die cAMP-abhängige Proteinkinase A  
und die mitochondriale Permeabilitätspore am Rattenherz**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Miriam Raible  
Jahr 2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Armin Polzin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit:

Dorsch M, Behmenburg F, **Raible M**, Blase D, Grievink H, Hollmann MW, Heinen A, Huhn R.

Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PloS One* **11**, e0151025 (2016)

## Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache. Aufgrund dieser Relevanz müssen kardioprotektive Strategien identifiziert werden, welche die Toleranz des Myokards gegenüber Ischämie-/Reperfusionseignissen erhöhen.

Von der bekannten Kardioprotektion von Morphin ausgehend wurden die Proteinkinase A (PKA) und die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP) als mögliche Teile des molekularen Mechanismus dieser protektiven Strategie untersucht. Dafür wurde ein *in vivo* Modell an männlichen Wistar-Ratten angewandt. Die Tiere wurden in sechs Gruppen randomisiert (n=6), die einer 25-minütigen Ischämiephase mit einer folgenden 120-minütigen Reperusionsphase unterliefen. Zuvor wurde Morphin (0,3 mg/kg) alleine, in Kombination mit dem PKA-Inhibitor H-89 (10 µg/kg) und in Kombination mit dem Öffner der mPTP Atractyloside (5 mg/kg) appliziert. H-89 und Atractyloside wurde ebenfalls alleine angewandt; die Kontrollgruppe unterlief keiner weiteren Behandlung. Die Infarktgröße wurde mittels Triphenyltetrazoliumchlorid als prozentualer Anteil am Risikogebiet bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression des phosphorylierten Phospholambans mittels *Western blot* als Maß für die Aktivierung der PKA nach Morphinbehandlung (1 und 10 µM) *in vitro* an primär isolierten Rattenkardiomyozyten untersucht (n=7).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Morphin-Präkonditionierung die Infarktgröße von in der Kontrollgruppe beobachteten 64 (5) % auf 39 (9) % signifikant reduziert ( $p < 0,05$  vs. Con). H-89 hob den Effekt der Präkonditionierung auf (64 (10) %,  $p < 0,05$  vs. M-PC), während H-89 in alleiniger Applikation keine Wirkung auf die Infarktgröße zu verzeichnen hatte (61 (10) %, ns vs. Con). Auch Atractyloside hob den protektiven Effekt der Morphin-Präkonditionierung auf (65 (9) %,  $p < 0,05$  vs. M-PC) und hatte selbst keinen Einfluss auf die Infarktgröße (64 (5) %, ns vs. Con). Die Infarktgrößen sind als Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) angeben.

Die *in vitro* Versuche ergaben eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung des Phospholambans als Rückschluss auf eine Zunahme der Aktivität der Proteinkinase A bei 10-minütiger Behandlung mit 10 µM Morphin (Median 1,18; 25. Perzentile: 1,06; 75. Perzentile: 1,24,  $p < 0,05$  vs. Con), 1 µM hatte keinen signifikanten Effekt (Median 1,05; 25. Perzentile: 0,85; 75. Perzentile: 1,21 ns vs. Con).

Die Ergebnisse geben Hinweise auf eine Beteiligung der PKA und der mPTP in der Signalkaskade der morphininduzierten Präkonditionierung und tragen zur weiteren Entschlüsselung des molekularen Mechanismus dieser effektiven Strategie der Organprotektion bei. Die Signalkaskade könnte neben anderen, bereits beschriebenen Signalkaskaden, folgendermaßen aussehen (s. Abb. 1): Morphin erhöht die cAMP-Konzentration, welche zu einer vermehrten Aktivität der Proteinkinase A führt. Diese führt über einen Kaliumstrom über die mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle ( $mK_{Ca}$ ) zur Schließung der mitochondrialen Permeabilitätspore als Endeffektor. Die ausbleibende Öffnung dieser verhindert den Zelluntergang und induziert so eine Protektion.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalkaskade der M-PC

## Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. Due to this importance, it is of big interest to elucidate strategies having a cardioprotective effect. Morphine can protect the heart by an underlying mechanism called preconditioning. With this, the resistance towards undergoing organ ischemia/reperfusion injury can be raised.

In this study, we examined protein kinase A (PKA) and the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) as an optional part of the molecular mechanism of this protective strategy. Male wistar rats were randomised to six groups (n=6). All animals underwent 25 minutes of myocardial ischaemia and 120 minutes of reperfusion. Morphine was injected alone (0,3 mg/kg), in combination with the PKA-blocker H-89 (10 µg/kg) and the mPTP opener atractyloside (5 mg/kg). H-89 and atractyloside were also investigated without morphine. Control animals underwent no further treatment. Infarct size was determined by triphenyltetrazoliumchloride staining as the percentage area at risk. Furthermore, the expression as a degree of the phosphorylated phospholamban was measured to investigate the activation of PKA in isolated adult rat cardiomyocytes due to morphine stimulation (1 and 10 µM, n=7).

The results show significant infarct size reduction in morphine treated animals (64 (5) % to 39 (9) %,  $p < 0,05$  vs. Con). H-89 abolished the effect of preconditioning (64 (9) %,  $p < 0,05$  vs. M-PC), H-89 itself had no effect on infarct size (61 (10) %, ns vs. Con). Atractyloside combined with morphine blocked infarct size limitation (65 (9) %,  $p < 0,05$  vs. M-PC) and application itself didn't exert an influence (64 (5) %, ns vs. Con). Data are stated as mean ( $\pm$  standard deviation).

Phospholamban phosphorylation was significantly increased with a morphine concentration of 10 µM (median 1,18; 25. percentile: 1,06; 75. percentile: 1,24,  $*p < 0,05$  vs. Con). However, 1 µM morphine had no significant effect on the phosphorylated phospholamban concentration (median 1,05; 25. percentile: 0,85; 75. percentile: 1,21 ns vs. Con).

The results indicate that PKA and mPTP are part of the molecular mechanism of morphine-induced preconditioning and contribute to decode this effective organ protective strategy.

The molecular mechanism could be like as follows: morphine raises concentration of cAMP which leads to an increasing activity of PKA. Therefore, a calcium dependent potassium channel causes the closure of mPTP. Consequently, cell death can be prevented.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAR</b>	<i>area at risk</i> , Infarkt-gefährdetes Gebiet
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AKAP</b>	<i>A-kinase anchoring protein</i>
<b>ANT</b>	Adenin-Nukleotid-Translokase
<b>Aqua dest.</b>	destilliertes Wasser
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Atr</b>	Atractyloside, mPTP-Öffner
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin abhängige Proteinkinase II
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	cyclisches Guanosinmonophosphat
<b>CK</b>	Creatinkinase
<b>CK-MB</b>	<i>Muscle-Brain type Creatinkinase</i>
<b>Con</b>	Kontrollgruppe
<b>CREB</b>	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
<b>Cyc-D</b>	Cyclophilin D
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>(e) NOS</b>	(endotheliale) Stickstoffmonoxidsynthetase
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<b>FWOP</b>	<i>first window of protection</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GC</b>	Guanylatcyclase
<b>GSK-3β</b>	Glykogen Synthase Kinase-3β
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoff

<b>H-89</b>	N-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, Proteinkinase A Inhibitor
<b>HRP</b>	<i>Horse-radish-Peroxidase</i>
<b>IBMX</b>	1-methyl-3-isobutylxanthin, PDE-Hemmer
<b>IPC</b>	ischämische Präkonditionierung
<b>IPoC</b>	ischämische Postkonditionierung
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>LAD</b>	<i>left anterior descending artery, Ramus interventricularis anterior</i>
<b>LKB1</b>	<i>Liver Kinase B1</i>
<b>MAP</b>	<i>mean arterial pressure</i> , arterieller Mitteldruck
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Min.</b>	Minute(n)
<b>mK<sub>ATP</sub></b>	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
<b>mK<sub>Ca</sub></b>	mitochondrialer calciumabhängiger Kaliumkanal
<b>ml</b>	Milliliter
<b>M-PC</b>	morphininduzierte Präkonditionierung
<b>mPTP</b>	mitochondriale Permeabilitätspore
<b>mTOR</b>	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
<b>µg</b>	mikrogramm
<b>µl</b>	mikroliter
<b>M</b>	Molar
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>p38 MAPK</b>	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>

<b>PCI</b>	<i>percutaneous coronary intervention</i> , perkutane koronare Intervention
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PEEP</b>	<i>positive endexpiratory pressure</i>
<b>PI3</b>	Phosphatidylinositol 3
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>(a/c/n) PKC</b>	<i>(atypical/conventional/novel)</i> Proteinkinase C
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>PKI</b>	Proteinkinase-Inhibitor
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>PPIase</b>	Peptidyl-propyl-cis-trans Isomerase
<b>pPLB</b>	phosphoryliertes Phospholamban
<b>tPLB</b>	Gesamt-Phospholamban
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RIPC</b>	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i> , Fernpräkonditionierung
<b>RISK</b>	<i>reperfusion injury survival kinases</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SERCA</b>	<i>sarcoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>SWOP</b>	<i>second window of protection</i>
<b>Trop-T</b>	Troponin-T
<b>TSPO</b>	<i>translocator protein of the outer membrane</i> , peripherer Benzodiazepinrezeptor
<b>TTC</b>	Triphenyltetrazoliumchlorid
<b>TTF</b>	Triphenyltetrazoliumformazan
<b>VDAC</b>	<i>voltage-dependent anion channel</i> , spannungsabhängiger Anionenkanal
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

# Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Myokardinfarkt .....	1
1.1.1	Pathophysiologie .....	1
1.1.2	Klinische Bedeutung .....	5
1.2	Kardioprotektion .....	6
1.2.1	Ischämische Präkonditionierung .....	8
1.2.2	Pharmakologische Präkonditionierung .....	9
1.3	Morphin .....	10
1.3.1	Morphin als Medikament .....	10
1.3.2	Morphininduzierte Präkonditionierung .....	11
1.4	Übersicht über molekulare Mechanismen der M-PC .....	13
1.4.1	Die Signalkaskade über die Proteinkinase C .....	14
1.4.2	Die Rolle der Proteinkinase A .....	17
1.4.3	Die Rolle des Endeffektors mitochondriale Permeabilitätspore .....	20
1.5	Fragestellung und Zielsetzung .....	23
2	Material und Methoden .....	25
2.1	Materialien .....	25
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Medikamente .....	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial, Geräte und <i>Software</i> .....	28
2.1.3	Lösungen .....	31
2.1.3.1	<i>In vivo</i> Versuche .....	31
2.1.3.2	Kardiomyozytenisolierung .....	32
2.1.3.3	<i>Western blot</i> .....	33
2.1.4	Antikörper .....	37
2.1.4.1	Primärantikörper .....	37
2.1.4.2	Sekundärantikörper .....	37
2.2	Methoden .....	38
2.2.1	<i>In vivo</i> Versuche .....	38
2.2.1.1	Vorbereitung der Versuchstiere .....	38
2.2.1.2	Versuchsprotokoll .....	39
2.2.1.3	Infarktgrößenbestimmung .....	41

2.2.2	Primäre Kardiomyozytenisolierung .....	41
2.2.2.1	Aufbau und Vorbereitung der Langendorff-Apparatur .....	42
2.2.2.2	Herzpräparation und Kollagenaseperfusion .....	44
2.2.2.3	Nachverdau und Separierung der Kardiomyozyten.....	45
2.2.2.4	Zellkultivierung .....	46
2.2.3	<i>In vitro</i> Versuche.....	47
2.2.3.1	Versuchsprotokoll.....	47
2.2.3.2	<i>Western blot</i> .....	47
2.2.4	Statistische Auswertung .....	52
3	Ergebnisse .....	54
3.1	<i>In vivo</i> Versuche.....	54
3.1.1	Hämodynamik.....	54
3.1.2	Infarktgrößen .....	57
3.2	<i>In vitro</i> Versuche .....	59
4	Diskussion.....	61
4.1	Diskussion der Methodik .....	62
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	68
4.2.1	Die Rolle der PKA in der M-PC.....	69
4.2.2	Die Rolle der mPTP in der M-PC .....	71
4.3	Ausblick.....	75
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	78

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalkaskade der M-PC .....	I
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ischämiekaskade .....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Reperfusionsschadens .....	5
Abbildung 4: Strukturformel Morphin .....	11
Abbildung 5: Signaltransduktion der M-PC über die PKC .....	16
Abbildung 6: Aufbau und Aktivierungsweg der PKA .....	18
Abbildung 7: Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	24
Abbildung 8: Versuchsprotokoll der <i>in vivo</i> Experimente .....	40
Abbildung 9: Langendorff-Apparatur .....	44
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Gelelektrophorese .....	50
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips des <i>Western blots</i> .....	52
Abbildung 12: Hämodynamik: Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ] .....	55
Abbildung 13: Hämodynamik: <i>Mean arterial pressure</i> (MAP) [mmHg] .....	56
Abbildung 14: Auswertung der Infarktgrößen .....	58
Abbildung 15: Repräsentativer <i>Western blot</i> .....	59
Abbildung 16: <i>Western blot</i> -Analyse .....	60
Abbildung 17: Signaltransduktion der M-PC über die PKA .....	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hämodynamik – Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ] .....	56
Tabelle 2: Hämodynamik – <i>Mean arterial pressure</i> (MAP) [mmHg] .....	57

# 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind bis heute die häufigste Todesursache in Deutschland und der gesamten westlichen Welt. 2015 waren 38,5 % aller Sterbefälle in Deutschland durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Myokardinfarkte verursacht<sup>1</sup>. Es wird geschätzt, dass im Jahr 2012 weltweit von 56 Millionen Todesfällen etwa 17,5 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen verstorben sind. Die führende Ursache ist die koronare Herzerkrankung (KHK) mit der Folge der ischämischen Kardiomyopathie (7,4 Millionen) gefolgt von zerebrovaskulären Erkrankungen, zu denen auch der Schlaganfall gehört (6,7 Millionen)<sup>2</sup>.

Auch perioperativ steigt die Morbidität und Mortalität bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren mit möglichen Komplikationen des Myokardinfarkts, Arrhythmien, Herzinsuffizienz und Schlaganfall<sup>3</sup>. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, Strategien zu entwickeln, mit denen das Myokard vor Ischämien und dadurch bedingter Gewebeschädigung geschützt werden kann.

## 1.1 Myokardinfarkt

### 1.1.1 Pathophysiologie

Die wichtigste Genese eines Myokardinfarkts ist die KHK. In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz einer KHK bei Frauen im Alter zwischen 40 und 79 Jahren 6,4 % und bei Männern dieser Altersgruppe 12,3 %, was einer Gesamtprävalenz von 9,3 % entspricht. Die Prävalenz eines Myokardinfarkts liegt in dieser Altersgruppe bei 4,7 %<sup>4</sup>.

Eine KHK entsteht auf dem Boden einer Arteriosklerose und kann zu Plaquebildung und Koronarstenosen in den betroffenen Gefäßen führen.

Diese Gefäßstenosen bewirken, dass unter verschiedenen Bedingungen die Blutversorgung des Myokards und damit eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet werden kann. Dies bezeichnet man als Ischämie. Die Ischämie führt im betroffenen Myokard zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch.

Perioperativ sind hierfür insbesondere arterielle Hyper- oder Hypotonien, auftretende Arrhythmien mit Tachykardien sowie Anämien ursächlich. Sie bewirken die Erhöhung

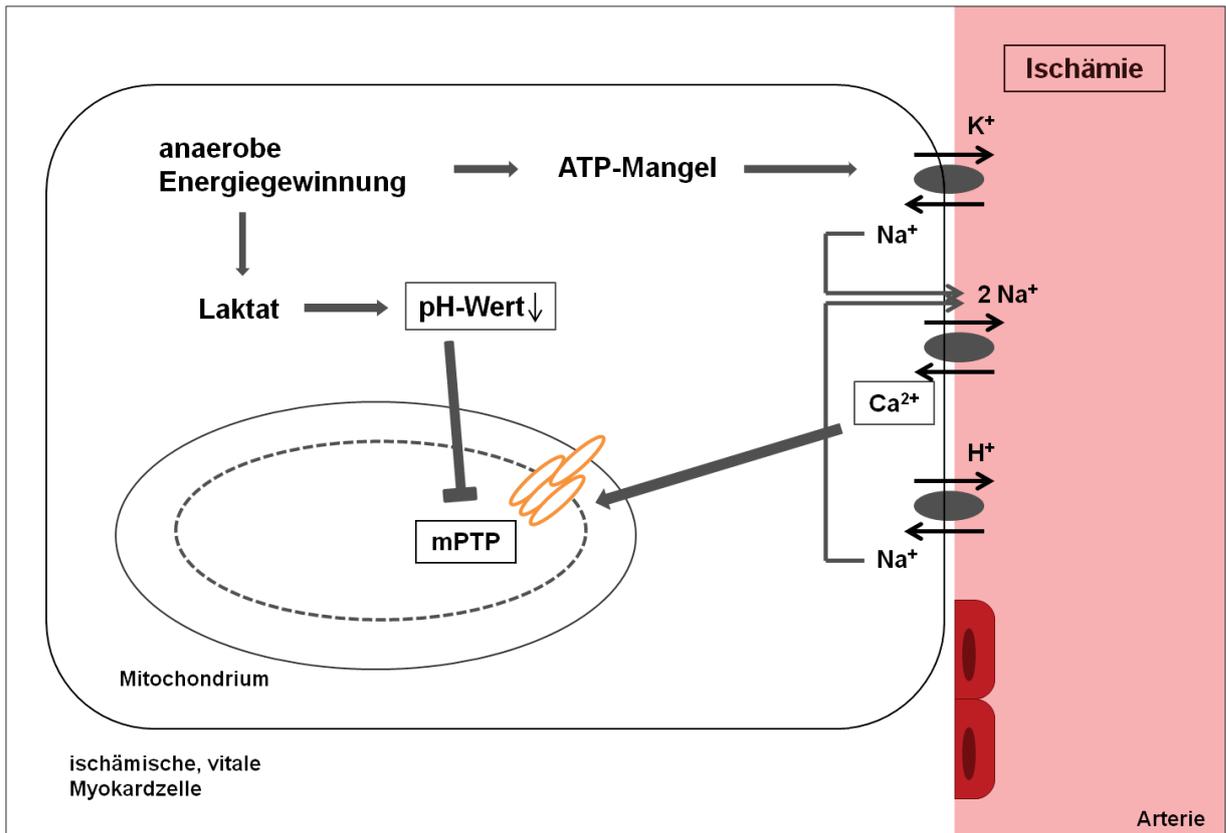
der Wandspannung und der Herzarbeit. Durch die Aktivierung des Sympathikus kommt es zur Ausschüttung von Katecholaminen und Cortisol. Die chronischen, stabilen Plaques können instabil werden. Instabile Plaques rupturieren und setzen thrombogenen Plaqueinhalt, Makrophagen und Lipide frei, die durch Thrombozytenaggregation zum Thrombus und damit zum partiellen oder auch kompletten Verschluss der Arterie führen können<sup>5</sup>. In bis zu 15 % der Fälle sind nicht stenosierende arterielle Plaques, sondern Emboli, Vaskulitiden, Koronarspasmen oder Koronardissektionen für einen veränderten Blutfluss in der Herzkranzarterie verantwortlich<sup>6</sup>.

Das Infarktgeschehen läuft in mehreren Phasen ab. Die frühe Ischämiephase (s. Abb. 2) ist durch einen Adenosintriphosphat(ATP)mangel und durch den anaeroben Stoffwechsel mit Laktatproduktion charakterisiert. Diese veränderte Stoffwechsellage führt zu einer Elektrolytverschiebung und einer Abnahme des zellulären pH-Werts, was dazu führt, dass das Membranpotential nicht weiter aufrechterhalten werden kann. Es kommt zur Einschränkung der kontraktile Fähigkeit des Myokards.

Bei ausbleibender Reperfusion entwickelt sich durch eine verminderte Aktivität der Natrium( $\text{Na}^+$ )-Kalium ( $\text{K}^+$ )-ATPase und eine erhöhte Aktivität des  $\text{Na}^+$ -Wasserstoff ( $\text{H}^+$ )-Antiporters primär eine Akkumulation von intrazellulärem  $\text{Na}^+$ . Die hohe  $\text{Na}^+$ -Konzentration aktiviert den  $2\text{Na}^+$ -Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Antiporter, der  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle transportiert und in der Zelle sekundär zu einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führt<sup>7</sup>. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung induziert eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP), zusätzlich entwickelt sich ein intrazelluläres Ödem. Die daraus resultierende Ruptur des Sarkolemms setzt Phosphatasen und Lipasen frei. Dieser Prozess sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei beginnender Reperfusion führen zur weiteren Schädigung der gesamten Zelle und letztendlich zum Zelluntergang<sup>7</sup> (s. Abb. 3). Jedoch ist auch ein Überleben der Zelle möglich: So kann der niedrige pH-Wert die Öffnung der mPTP und dadurch den Zelltod verhindern.

Das Resultat der abgelaufenen Ischämie ist die Nekrose, die subendokardial im Zentrum des Versorgungsgebiets der betroffenen Arterie beginnt und sich nach epikardial ausbreitet. Die endgültige Infarktgröße wird nach ca. 4 bis 6 Stunden erreicht<sup>8</sup>. Der Schaden kann sowohl irreversibel als auch bei nicht transmuraler Ischämie reversibel sein. Dieser Zustand des Myokards wird als hibernierend bezeichnet. Das Gewebe kann bei gelungener Reperfusion die ursprüngliche kontraktile Funktion wiedererlangen<sup>9</sup>.

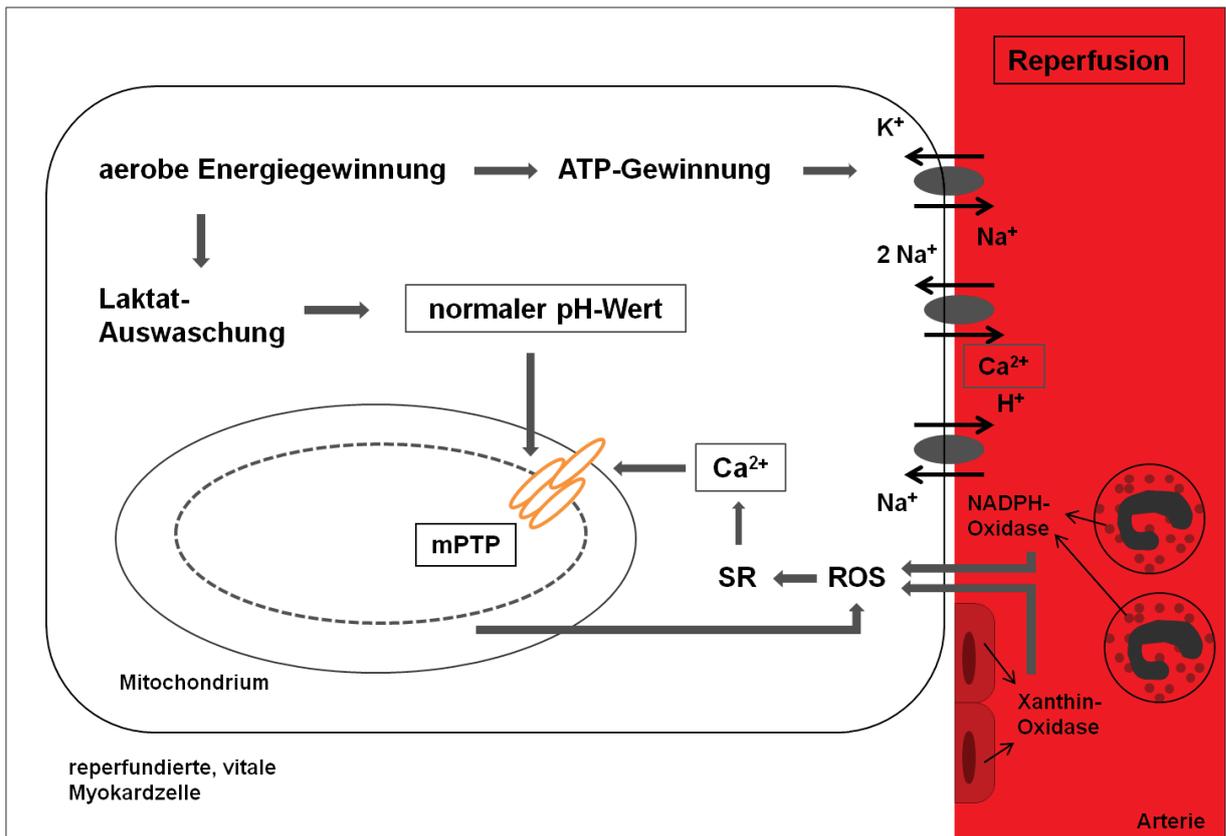
Klinisches Ziel ist also, den Blutfluss in der betroffenen Arterie so früh wie möglich mittels Revaskularisationstherapie in erster Linie im Rahmen einer interventionellen Koronarangiographie wiederherzustellen. Obwohl durch diese Vorgehensweise das ischämieinduzierte Infarktgebiet limitiert oder gar deutlich reduziert werden kann, ist zu erwähnen, dass die Reperfusion im betroffenen Gebiet paradoxerweise auch Gewebeschäden auslösen kann. Dieses Ereignis wird als Reperfusionsschaden bezeichnet<sup>10</sup> und betrifft solche Zellen, die die Phase der Ischämie primär überlebt haben (s. Abb. 3). Mit Beginn der Reperfusion werden vermehrt ROS aus den Mitochondrien und extrazellulär aus neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen freigesetzt, was zu erhöhtem oxidativen Stress führt<sup>11</sup>. Die rasche Normalisierung des pH-Werts durch Auswaschung des Laktats und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung begünstigen die Öffnung der mPTP<sup>7,12,13</sup>. Der Reperfusionsschaden führt infolgedessen zu einer Zunahme der Infarktgröße, myokardialer Hypokontraktilität und zur Neigung zu Arrhythmien des Myokards<sup>14</sup>. Die Zellen können aber auch nicht letal betroffen sein, was als Phänomen des *Stunnings* bezeichnet wird. Es beschreibt einen Zustand der reversiblen postischämischen myokardialen Dysfunktion trotz wiederhergestellter Reperfusion und ist vom hibernierenden Myokard abzugrenzen<sup>15,16</sup>.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ischämiekaskade**

Die Ischämie verursacht durch den in der Myokardzelle herrschenden Sauerstoffmangel eine Umstellung der Energiegewinnung von aerob auf anaerob. Dabei fällt als Metabolit vermehrt Laktat an, das den pH-Wert sinken lässt. Der  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiporter transportiert zum Ausgleich  $\text{H}^+$ -Ionen aus der Zelle, die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Kumulation wird durch die Energiemangel-bedingte verminderte Aktivität der  $\text{K}^+\text{-Na}^+$ -ATPase verstärkt. Die hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration treibt den  $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Antiporter an und führt konsekutiv zu einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Durch den niedrigen pH-Wert bleibt die mPTP geschlossen und die Zelle kann die Ischämie überleben. Die Abbildung ist modifiziert nach Hausenloy et al.<sup>7</sup>.

ATP: Adenosintri-phosphat,  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcium,  $\text{K}^+$ : Kalium,  $\text{H}^+$ : Wasserstoff, mPTP: mitochondriale Permeabilitätspore,  $\text{Na}^+$ : Natrium



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Reperfusionsschadens**

Die Reperfusion der Myokardzelle bedingt eine vermehrte Produktion von ROS intrazellulär in den Mitochondrien und extrazellulär in neutrophilen Granulozyten (NADPH-Oxidase) und Endothelzellen (Xanthin-Oxidase). Die hohe ROS-Konzentration bewirkt eine Schädigung des sarkoplasmatischen Retikulums mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom in das Zytoplasma. Darüber hinaus führt die Auswaschung der sauren Metabolite zu einer Normalisierung des pH-Wertes. Diese Vorgänge bewirken eine Hyperkontraktilität der Zelle und die Öffnung der mPTP, es kommt zur Einleitung des Zelltods. Die Abbildung ist modifiziert nach Hausenloy et al.<sup>7</sup>.

ATP: Adenosintriphosphat,  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcium,  $\text{K}^+$ : Kalium,  $\text{H}^+$ : Wasserstoff, mPTP: mitochondriale Permeabilitätspore,  $\text{Na}^+$ : Natrium, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, SR: sarkoplasmatisches Retikulum

### 1.1.2 Klinische Bedeutung

Weltweit werden jährlich über 230 Millionen chirurgische Eingriffe durchgeführt. Dabei sind kardiale Komplikationen der häufigste Grund für perioperative Morbidität und Mortalität<sup>17,18</sup>. Da die Lebenserwartung vor allem in industrialisierten Ländern immer weiter ansteigt, werden in Zukunft zunehmend mehr operative Eingriffe bei Patienten mit multiplen Komorbiditäten durchgeführt werden. So wird gleichermaßen

erwartet, dass sich die Anzahl von perioperativen kardiovaskulären Ereignissen erhöht.

Die Zusammenstellung mehrerer Studien ergab die Erkenntnis, dass 3,9 % der Patienten, die einer elektiven, extrakardialen Operation unterzogen wurden und unterschiedlich ausgeprägte kardiovaskuläre Risikofaktoren aufwiesen, ein perioperatives kardiales Geschehen erlitten. Die Mortalitätsrate jener, die perioperativ einen Myokardinfarkt erlitten, lag bei 15–25 %<sup>19</sup>. Eine Studie von Sabaté et al. kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Es wurden über 3000 Patienten nach chirurgischen Eingriffen auf kardiovaskuläre Ereignisse untersucht. Insgesamt 4,3 % entwickelten Komplikationen wie Schlaganfall, Arrhythmien, Herzinsuffizienz, *Angina pectoris*, Myokardinfarkt und Herzstillstand. Die höchste Rate wiesen Herz-Thorax-chirurgische Eingriffe auf, gefolgt von vaskulären operativen Interventionen. Eine geringe Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse war im Hals-Nasen-Ohren- und gynäkologisch-operativen Bereich zu verzeichnen. Die Krankenhausverweildauer verlängerte sich bei entsprechenden Ereignissen im Mittel von 6 auf 12 Tage<sup>3</sup>.

Eine Studie bei rein kardialen Operationen zeigte perioperative Komplikationsraten von 5,6 % bei Frauen und 11,8 % bei Männern<sup>20</sup>.

Diese Studien verdeutlichen, dass der Einsatz kardioprotektiver Strategien eine große Bedeutung für den klinischen Alltag haben könnte. Durch Anwendung protektioninduzierender Medikamente bzw. Meidung derer, die solche Effekte aufheben, könnte die Anzahl kardialer Ereignisse bzw. deren Ausmaß reduziert werden. Von Nutzen könnte dies vor allem in Situationen sein, in denen Ischämien vorausgesehen sind. Dies betrifft vor allem elektive Eingriffe wie PCIs (perkutane koronare Intervention) und herzchirurgische Operationen mit Einleitung eines Herzstillstands, beispielsweise Bypass-Operationen und Organtransplantationen. Jedoch ist aufgrund des potentiellen Auftretens kardialer Risikosituationen grundsätzlich jeder chirurgische Eingriff für die Anwendung kardioprotektiver Strategien geeignet.

## **1.2 Kardioprotektion**

“Alle Mechanismen und Strategien, die zum Schutz des Herzens beitragen, indem sie myokardialen Gewebeschaden vorbeugen oder reduzieren“, werden unter dem Begriff Kardioprotektion zusammengefasst<sup>21</sup>. Anlehnend an diese Definition von

Kübler und Haass gehören sowohl physiologische Prozesse als auch therapeutische Strategien zur Kardioprotektion.

Als entscheidende myokardschädigende Faktoren gelten sowohl die Ischämie und Reperfusion jeweils für sich alleine als auch deren kombinierte Wirkung (Ischämie-Reperfusionsschaden). Eine Reihe von kardioprotektiven Strategien zielt darauf hin, das Ausmaß der Schädigung durch diese bedeutenden Prozesse zu begrenzen.

Dies kann beispielsweise durch die Durchführung wiederholter kurzer Zyklen von Ischämie und Reperfusion vor einem ischämischen Ereignis erreicht werden – ein Phänomen, das als ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet wird<sup>22</sup>. Findet die Durchführung kurzer Zyklen von Ischämie und Reperfusion nach einer Ischämie statt, wird die kardioprotektive Strategie als ischämische Postkonditionierung (IPoC) bezeichnet<sup>23</sup>. Diese wenige Minuten andauernde Minderperfusion, auf die eine ähnlich lange Reperfusion folgt, führt nicht nur im betroffenen Organ zu einer Protektion, sondern auch in entferntem Gewebe. Dieser schützende Effekt wird als Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic Preconditioning, RIPC*) bezeichnet<sup>24,25</sup>. Dabei muss die Ischämie nicht zwangsläufig invasiv ausgelöst werden, sondern ist auch nichtinvasiv, beispielsweise an der Skelettmuskulatur durch Anlegen eines Tourniquets, möglich<sup>26</sup>.

Eine Reihe von Studien gibt Hinweise auf die klinische Bedeutung der kardioprotektiven Strategien IPC, IPoC und RIPC<sup>27</sup>.

Die IPC kann nur bei vorhersehbaren, potentiell ischämischen Situationen eingesetzt werden. Die klinische Studienlage bezieht sich deshalb vornehmlich auf elektive Herz-Thorax chirurgische Eingriffe. Bei operativen Eingriffen wurde diese Erkenntnis über die Messung der Herzproteine *Muscle-Brain type Creatin-Kinase* (CK-MB) und Troponin-T (Trop-T) gewonnen<sup>28-31</sup>. Im Gegensatz zur IPC kann der protektive Effekt der IPoC auch nach unvorhergesehenen ischämischen Ereignissen angewandt werden. Beim abgelaufenen Myokardinfarkt ist die Durchführung der IPoC während einer PCI möglich<sup>32-34</sup>.

Obwohl diese Phänomene als effektive und protektive Prozesse beschrieben sind, sind deren molekulare Mechanismen noch immer nicht vollständig entschlüsselt. Im Folgenden werden einzelne therapeutische Strategien und die bisher bekannten Mechanismen näher erläutert.

### 1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung wurde erstmals durch Murry et al. im Jahr 1986 beschrieben<sup>22</sup>. Sie setzten Hunde vier Zyklen einer jeweils fünfminütigen, regionalen Ischämie des Herzens mit darauffolgender ebenfalls fünfminütiger Koronarperfusion aus, an die sich eine 40-minütige Koronarokklusion anschloss. Diese Maßnahme reduzierte die Infarktgröße im Vergleich zu der Kontrollgruppe, in der die Hundeherzen eine 40-minütige Koronarokklusion ohne vorherige subletale Ischämien erhielten, um etwa 75 %.

Im Rahmen der Verhinderung von nekrotischem Zelluntergang des Myokards schützt die IPC außerdem vor Arrhythmien<sup>35</sup> und verbessert Pumpfunktionsstörungen<sup>36</sup>, zwei mögliche Komplikationen einer myokardialen Ischämie, die potentiell lebensbedrohlich sein können.

Seit der Erstbeschreibung des Phänomens ist die IPC für eine Vielzahl von Spezies einschließlich dem Menschen und einer Vielzahl von Organen beschrieben worden. So wurden protektive Effekte einer IPC neben dem Herzen auch für Niere<sup>37</sup>, Leber<sup>38,39</sup>, Gastrointestinaltrakt<sup>40</sup>, Lunge<sup>41</sup>, Gehirn<sup>42</sup> und Skelettmuskel<sup>43</sup> gezeigt.

Die protektive Wirkung ist auf einen zeitlich beschränkten Rahmen festgelegt: Das frühe Fenster (*first window of protection, FWOP*) erscheint bis etwa drei Stunden nach der IPC, das späte und weniger potente Fenster (*second window of protection, SWOP*) öffnet sich etwa 24–72 Stunden nach dem präkonditionierenden Stimulus<sup>44,45</sup>.

Die molekularen Prozesse der beiden Fenster unterscheiden sich grundsätzlich. Der Mechanismus des FWOP unterliegt überwiegend der Aktivierung bereits vorhandener Proteine, während beim SWOP die Induktion der Expression von Signalproteinen maßgeblich ist<sup>27,46</sup>.

Diese unterschiedlichen zugrundeliegenden Mechanismen bieten einen Erklärungsansatz, warum ein Zeitraum existiert, in dem der Effekt der IPC wirkungslos ist.

Essentielle molekulare Bestandteile der IPC sind G-gekoppelte Rezeptoren, Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS), Guanylylcyclase (GC), Proteinkinase G (PKG) und Proteinkinase C (PKC), ROS und mPTP<sup>47</sup>.

## 1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Vergleichbar zur ischämischen Stimulation kann die Präkonditionierung auch durch verschiedene Pharmaka ausgelöst werden. Diese Form wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet und führt ebenfalls zu einem protektiven Effekt bezüglich längerer Ischämien und deren potentiellen Komplikationen.

Nachgewiesen wurde eine IPC-nachahmende Wirkung für volatile Anästhetika, darunter Desfluran, Sevofluran, Halothan und Isofluran<sup>48-50</sup>, sowie Agonisten, die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, wie Katecholamine, Adenosin und Bradykinin<sup>51</sup>. Auch Muskarinrezeptoragonisten und Erythropoetin gehören zu Auslösern der pharmakologischen Präkonditionierung<sup>52</sup>. Interessanterweise sind auch Edelgase wie das anästhesiologisch wirksame Xenon<sup>53</sup> und Helium<sup>54</sup> dazu fähig, eine Gewebeprotektion zu induzieren.

Darüber hinaus wurde auch für Opioide eine solche Nachahmung der IPC bestätigt<sup>55</sup>. Es gibt zahlreiche Anhaltspunkte, dass die Rezeptorliganden, die ihre Wirkung über einen G-gekoppelten Rezeptor vermitteln, untereinander im sogenannten *Receptor-Cross-Talk* kommunizieren und in der Aktivierung der PKC als gemeinsames Zielprotein zusammentreffen<sup>47</sup>.

Dabei können die G-gekoppelten Rezeptoren als Homo- oder Heterodimere vorliegen. Die Heterodimerisation kann durch Kopplung von G-Rezeptoren der gleichen Gruppe oder durch G-Rezeptoren unterschiedlicher Gruppen erfolgen<sup>56,57</sup>.

Beispielsweise wurde durch Peart et al. gezeigt, dass die kardioprotektive Wirkung eines A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptoragonisten sowohl bei Applikation eines selektiven A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptorantagonisten als auch selektiven  $\delta_1$ -Opioidantagonisten aufgehoben wird<sup>58</sup>.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Opioid Morphin als Induktor der pharmakologischen Präkonditionierung. Es gibt Hinweise, dass die morphininduzierte Präkonditionierung (M-PC), ähnlich wie die IPC, während eines frühen (bis 3 Stunden nach Morphinapplikation) und eines späten (24–48 Stunden nach Morphinapplikation) Fensters kardioprotektiv wirkt<sup>59</sup>.

## 1.3 Morphin

### 1.3.1 Morphin als Medikament

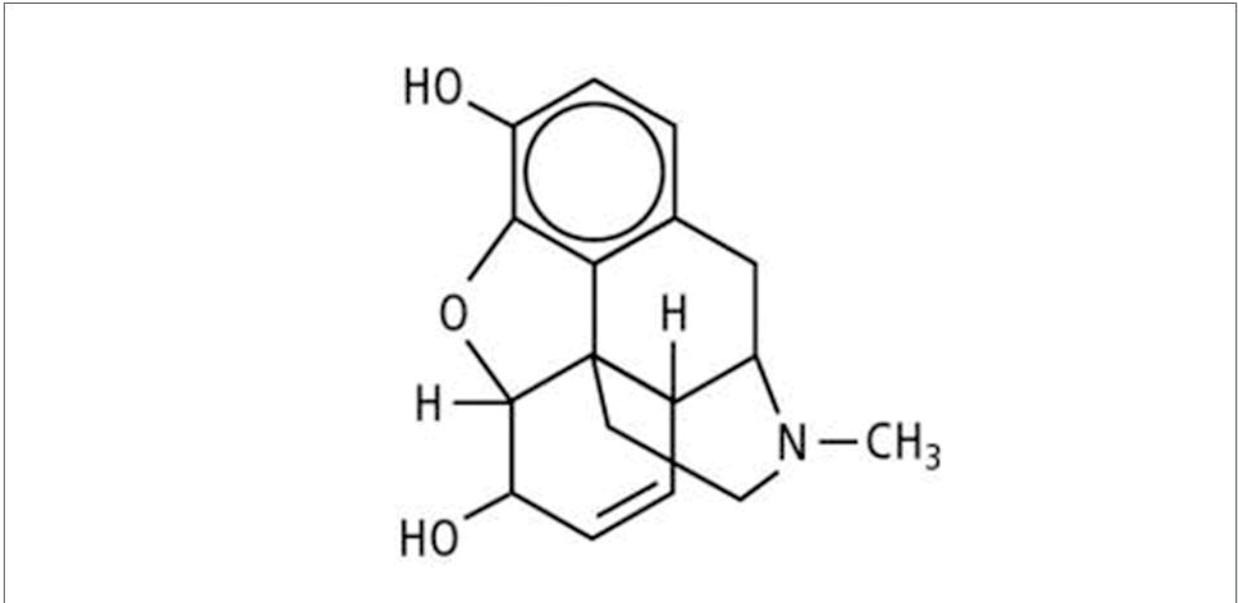
Morphin gehört zur Gruppe der Opiode, bei denen zwischen endogenen und exogenen, hier wiederum zwischen natürlich vorkommenden und synthetischen, unterschieden wird.

Die Wirkung der Opiode wird über drei verschiedene Rezeptoren  $\mu$ ,  $\delta$ , und  $\kappa$  vermittelt. Sie gleichen sich in der Eigenschaft, durch Naloxon antagonisiert werden zu können, vermitteln *in vivo* jedoch unterschiedliche Wirkungen. So ist der  $\mu$ -Rezeptor vor allem für die Weiterleitung von Analgesie, Euphorie und Atemdepression verantwortlich,  $\kappa$ -Rezeptoren sind vornehmlich an der Vermittlung von analgetischen, dysphorischen und sedierenden Effekten beteiligt, eine Stimulation der  $\delta$ -Rezeptoren führt u. a. zur Atemdepression und Hemmung der Magen-Darm-Motilität. Zu den Nebenwirkungen gehören Obstipation, Herz-Kreislauf-Depression mit Bradykardie und Hypotonie, Muskelrigidität, Miosis und Übelkeit/Emesis. Morphin ist ein reiner Rezeptoragonist, weiter existieren partielle Rezeptoragonisten wie Buprenorphin und komplette Rezeptorantagonisten wie Naloxon und Naltrexon. Opiode werden bei akuten (z. B. perioperativ, Myokardinfarkt) und chronischen (z. B. Tumorerkrankungen) Schmerzzuständen eingesetzt. Die World Health Organisation (WHO) gibt ein Therapieschema vor, das Opiode in analgetisch schwache und starke Opiode einteilt. Die Wirkungsweise dieser Substanzgruppe beruht zentral auf der Hemmung der Schmerzübertragung im Myelon und peripher in einer Abnahme der Empfindlichkeit der Nozizeptoren<sup>60</sup>.

Nach bereits kurzer Anwendungsdauer von Opioiden kann es zur Toleranzentwicklung kommen, was dazu führt, dass die Dosis gesteigert werden muss, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Dies betrifft vor allem die analgetische, atemdepressive, sedierende und emetische Wirkungskomponente, die Obstipationsneigung jedoch unterliegt kaum der Toleranz. Daher sollte therapiebegleitend immer ein abführendes Medikament eingenommen werden<sup>61</sup>.

Aufgrund des physischen und psychischen Abhängigkeits- und Missbrauchspotentials unterstehen Opiode dem Betäubungsmittelgesetz und bedürfen für die Verschreibung eines speziellen Betäubungsmittelrezepts<sup>61</sup>.

Morphin fungiert als pharmakologische Bezugssubstanz der Opiode. Am Anfang des 19. Jahrhunderts wurde es erstmals von Friedrich Wilhelm Adam Sertürner aus dem getrockneten Milchsafte des Schlafmohns isoliert<sup>62</sup> (Strukturformel s. Abb. 4).



**Abbildung 4: Strukturformel Morphin**

Es interagiert als reiner Opiodrezeptoragonist vor allem mit dem  $\mu$ -Rezeptor und weist eine geringe Affinität zum  $\kappa$ -Rezeptor auf. Die Indikation besteht über die der Opiode im Allgemeinen hinaus in der Therapie des kardialen Lungenödems zur venösen Vor- und arteriellen Nachlastsenkung. Diese Wirkungen der Substanz beruhen möglicherweise auf einer Reduktion des Sympathikotonus im Rahmen der anxiolytischen Eigenschaften<sup>63</sup>.

Morphin hat als Opioid einen unabdingbaren Stellenwert in der Schmerztherapie und wird in Deutschland immer häufiger eingesetzt<sup>64</sup>. Es ist davon auszugehen, dass die klinische Bedeutung des Pharmakons auch in Zukunft wachsen wird.

### **1.3.2 Morphininduzierte Präkonditionierung**

Die Induktion einer Gewebeprotektion mittels pharmakologischer Präkonditionierung mit Morphin wurde anhand experimenteller und klinischer Studien untersucht.

Eine frühe Studie zur Untersuchung des Effekts einer Morphin-Vorbehandlung auf die Infarktgröße bei der Ratte zeigte dabei allerdings einen signifikant größeren

Infarkt bei Tieren, die Morphin erhielten, im Vergleich zu vehikelbehandelten Kontrollen. Den Versuchstieren wurde 10 Minuten vor einer koronaren Ischämie subkutan eine hohe Dosis Morphin appliziert<sup>65</sup>. Es existieren in der Literatur allerdings keine weiteren Anhaltspunkte auf potentiell kardial schädliche Effekte einer Vorbehandlung mit Morphin. Mittlerweile sind am Herzen und auch an anderen Organen<sup>66-68</sup> protektive Effekte gezeigt worden.

Schultz et al. zeigten, dass Opioidrezeptoren am molekularen Mechanismus der IPC involviert sind. Die Applikation von Naloxon bei Ratten hob den protektiven Effekt des zuvor gesetzten, ischämisch präkonditionierten Stimulus auf<sup>55</sup>. Die Beobachtung, dass nicht nur der ischämische Stimulus, sondern auch Morphin als unselektiver Opioidagonist zur Aktivierung des Opioidrezeptors und zur deutlichen Infarktgrößenreduktion führt, machten Schultz et al. 1996 an Rattenherzen. Die M-PC wurde durchgeführt, indem auf eine fünfminütige, intravenöse Morphininfusion eine fünfminütige Auswaschphase folgte. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Durch Applikation des selektiven  $\delta$ -Opioidrezeptorantagonisten Naltrindol wurde die pharmakologische Präkonditionierung durch Morphin aufgehoben<sup>69</sup>.

Mayfield et al. lieferten den Hinweis, dass durch die Anwendung des selektiven  $\delta_1$ -Opioidrezeptor-Agonisten [D-Pen2,5]-Enkephalin die Überlebensrate von Mäusen nach Hypoxien erhöht ist<sup>70</sup>. Diese Beobachtungen lenkten die Aufmerksamkeit auf den  $\delta_1$ -Rezeptor. Die M-PC und die damit verbundene Infarktgrößenreduktion wurde durch den selektiven  $\delta_1$ -Rezeptorantagonisten Benzylidennaltrexon aufgehoben<sup>71,72</sup>.

In adulten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten werden  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren exprimiert<sup>73</sup>,  $\mu$ -Rezeptoren kommen hauptsächlich im neonatalen Herzgewebe vor<sup>74</sup>. In der morphininduzierten Kardioprotektion ist die Beteiligung des  $\delta_1$ -Rezeptors mehrfach beschrieben<sup>69-72,75</sup>, die Rolle des  $\kappa$ -Rezeptors ist unklar. Einige Studien berichten protektive, die Infarktgröße reduzierende<sup>76,77</sup>, andere über gegenteilige Effekte im Rahmen der Begünstigung proarrhythmischer Effekte<sup>78</sup>. Die Aktivierung des  $\kappa$ -Rezeptors durch den  $\kappa$ -Rezeptoragonisten U50,488 reduzierte in einer Studie von Peart et. al die Infarktgröße an einem *in vivo* Rattenmodell und *in vitro* am isolierten Mäuseherz bei Applikation vor Beginn der Reperfusionphase, bei Anwendung vor der Ischämiephase konnte im *in vitro* Modell im Gegensatz zu *in vivo* keine protektive Auswirkung verzeichnet werden<sup>77</sup>.

Eine große Anzahl tierexperimenteller Studien hat die protektive Wirkung der M-PC bestätigt. Die Übertragung auf den Menschen wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht und beobachtet.

In einer randomisierten Studie im Jahr 1999 infundierten Tomai und Mitarbeiter Patienten während einer PCI entweder den Opioidantagonisten Naloxon oder ein Placebo. Sie evaluierten jeweils am Ende zweier Phasen der Ballondilatation intrakoronare ST-Streckenveränderungen und die subjektive Schmerzempfindung mittels einer visuellen Schmerzskala. Am Ende der ersten Ballondilatation unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich ST-Streckenveränderungen und Schmerz kaum, bei der zweiten Prozedur jedoch waren EKG-Veränderungen und Schmerzausprägung in der Placebo-Gruppe signifikant geringer<sup>79</sup>. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch beim Menschen Opioidrezeptoren und endogen synthetisierte Opioide an der Kardioprotektion beteiligt sind.

Im Jahr 2005 untersuchten Murphy et al. Patienten auf den kardioprotektiven Effekt der M-PC durch exogen applizierte Opioide. Sie erhielten vor aortokoronarer Bypass-Operation 40 mg Morphin. Die Patientengruppe, welcher vorher Morphin verabreicht wurde, wies im Vergleich zur Fentanylgruppe einen besseren *Myocardial Performance Index* (Tei-Index) auf<sup>80</sup>, ein echokardiographischer Parameter, welcher die globale diastolische und systolische ventrikuläre Funktion des Herzens kombiniert und ausdrückt.

Die Beobachtungen, dass Morphin protektiv am Herzen wirkt, würde gerade bei kardialen Risikopatienten eine Möglichkeit schaffen, vor einem chirurgischen Eingriff zum entsprechenden Zeitfenster das Opioid gezielt zu applizieren. Damit könnte die Gefahr, eine perioperative Ischämie zu erleiden, gesenkt bzw. die Größenausdehnung des Infarkts reduziert werden.

## **1.4 Übersicht über molekulare Mechanismen der M-PC**

Insgesamt sind mehrere komplex ablaufende Signalwege der M-PC beschrieben, die parallel ablaufen. Letztendlich ist der gesamte molekulare Mechanismus aber noch nicht vollständig entschlüsselt. Die Signalkaskaden der IPC und M-PC weisen dabei einige Gemeinsamkeiten auf. Sie beinhalten Proteine, die sowohl in der Zellmembran als auch im Zytoplasma und im Mitochondrium lokalisiert sind und folglich die Kommunikation zwischen den Zellkompartimenten für die Ausbildung des protektiven

Effekts gewährleistet sein muss. Proteinkinasen sind dabei ein wichtiger Teil der M-PC.

#### 1.4.1 Die Signalkaskade über die Proteinkinase C

Die PKC ist eine Familie aus Serin-Threonin-Kinasen. Es sind bisher elf Isoformen in drei funktionell und strukturell verschiedenen Subgruppen beschrieben. Die Gruppe der *conventional* PKC (cPKC) umfasst die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$  und  $\gamma$ . Sie sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und durch Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin (PS) aktivierbar. Die Isoformen der *novel* PKC (nPKC)  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  sind durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit und die Abhängigkeit von DAG und PS gekennzeichnet. Die letzte Gruppe wird durch die *atypical* PKC (aPKC)  $\zeta$  und  $\iota/\lambda$  repräsentiert, welche nur durch PS aktivierbar sind<sup>81</sup>.

Ihre physiologischen Funktionen sind vielfältig. Die PKC greift u. a. in immunologische Vorgänge<sup>82</sup>, Zellproliferation und -differenzierung, Genexpression und apoptotische Mechanismen ein<sup>83</sup>. Außerdem ist sie an kardioprotektiven Strategien beteiligt. Welche Isoform für die pharmakologische Präkonditionierung von entscheidender Bedeutung ist, bleibt fraglich. Eine Aktivierung der Isoform PKC- $\epsilon$  scheint dabei ausschließlich organprotektive Effekte auszulösen<sup>84</sup>. Die Rolle der PKC- $\delta$  bei der IPC wird in der Literatur kontrovers dargestellt<sup>85</sup>. Bei der opioidinduzierten Präkonditionierung stellte sich eine Aktivierung als protektiv heraus<sup>86</sup>.

Verschiedene Studien belegen, dass die PKC mit weiteren, für den molekularen Ablauf der M-PC unabdingbaren Proteinen interagiert. Nachgeschaltet sind mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $\text{mK}_{\text{ATP}}$ )<sup>55,69</sup> und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )<sup>87</sup>, deren Wirkung dazu führt, die Schließung der mPTP als Endeffektor einzuleiten. Abbildung 5 veranschaulicht diese Abläufe, welche im Einzelnen in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

Die Inhibition der Öffnung der mPTP erfolgt über einen komplexen Mechanismus, der mehrere, gleichzeitig ablaufende Signalwege beinhaltet<sup>59,88–90</sup>.

Morphin aktiviert den  $G_i$ -gekoppelten  $\delta_1$ -Opioidrezeptor, der in der Zellmembran lokalisiert ist. Durch ihn wird die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) aktiviert<sup>91</sup>.

Durch die Produktion von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat wird Akt in die Plasmamembran transloziert und durch Aktivierung verschiedener Phospholipid-abhängiger Kinasen phosphoryliert<sup>92</sup>. Das phosphorylierte Akt wirkt aktivierend auf die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)<sup>93</sup>, welche durch Stickstoffmonoxid(NO)-Produktion die GC stimuliert. NO kann aber auch – sofern es in geringen Konzentrationen vorliegt – ohne weitere zwischengeschaltete Proteine die Öffnung der mPTP hemmen<sup>94</sup>. Das von der GC produzierte cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert die Proteinkinase G (PKG). Sie ist für die Kommunikation zwischen Zytosol und Mitochondrium verantwortlich, die für den nächsten Schritt unabdingbar ist.

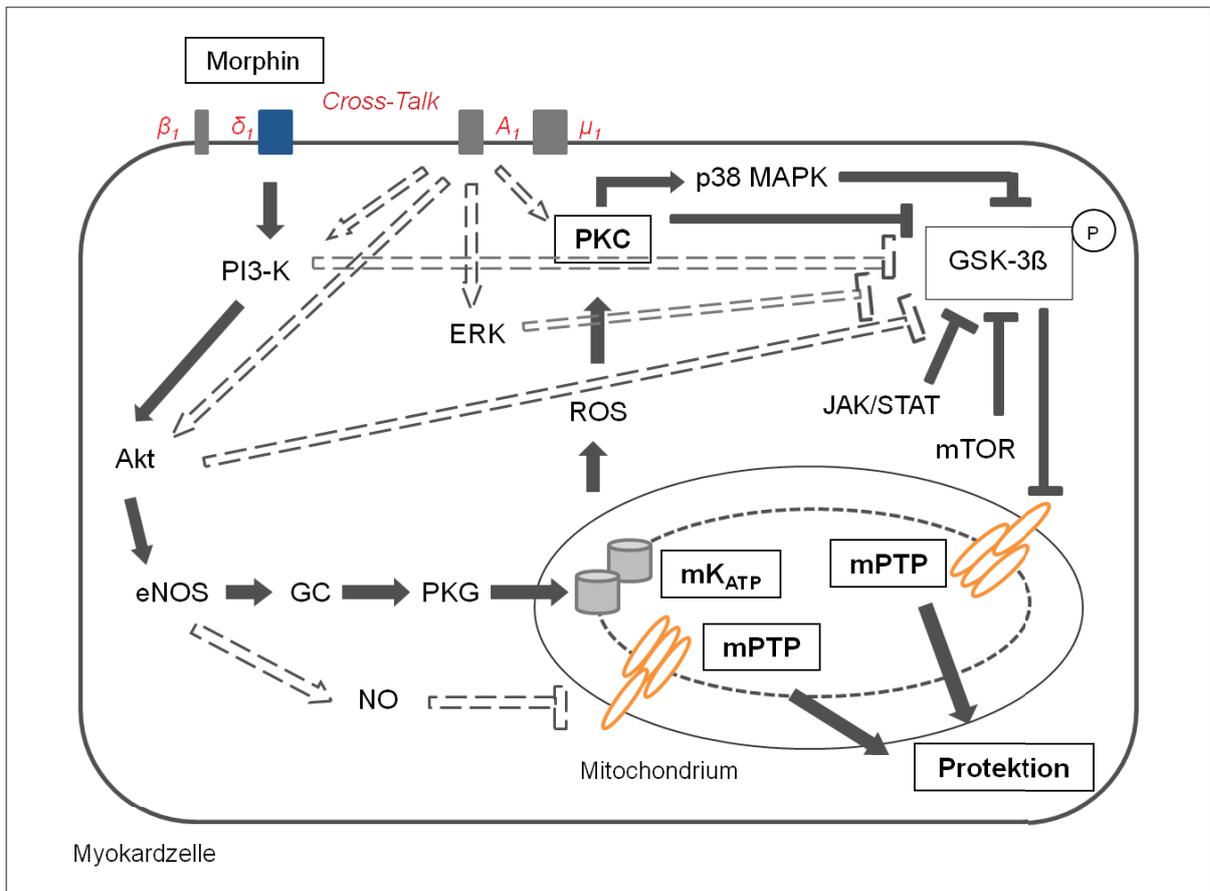
Dieser wichtige Zwischeneffektor ist der mK<sub>ATP</sub>-Kanal, der sich an der inneren mitochondrialen Membran befindet. Es kommt zum Kaliumstrom ins Mitochondrium. Vermutet wird, dass die erhöhte Konzentration von Kalium in diesem Zellorganell die mitochondriale Funktion beeinflusst<sup>95</sup>. Das Elektronentransportsystem wird durch Volumenschwankungen des intermembranösen Spalts verändert. Durch einen Elektronenverlust werden ROS produziert, welche bei der Aktivierung der PKC eine entscheidende Rolle spielen<sup>47,96</sup>. Die PKC kann darüber hinaus über *Cross-Talk* der Opioidrezeptoren mit Adenosinrezeptoren mittels Phospholipase C (PLC) direkt aktiviert werden<sup>47</sup>.

Der mPTP unmittelbar vorgeschaltet ist die GSK-3 $\beta$ . Sie wird durch Phosphorylierung inaktiv und vermittelt darüber die Hemmung der Öffnung der mPTP.

Die vorgeschalteten Kinasen, die mittels Phosphorylierung zur Hemmung der GSK-3 $\beta$ -Aktivität führen, sind zahlreich. Die aktivierte PKC hat die Fähigkeit, die GSK-3 $\beta$  direkt<sup>97</sup> oder über die Aktivierung der p38 *mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) zu phosphorylieren<sup>98</sup>. Außerdem findet über *Cross-Talk* mit Adenosinrezeptoren die Aktivierung der *Reperfusion injury survival kinases* (RISK) statt, zu denen die PI3-Kinase, Akt und die *extracellular signal-regulated proteinkinase* (ERK) gehören. Des Weiteren sind für *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) und Januskinase 2 (JAK2)/*signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) eine entsprechende Rolle gezeigt worden<sup>99,100</sup>.

Zusammenfassend unterliegt der Mechanismus der M-PC über die PKC einem komplexen molekularen Mechanismus, an dem weitere zahlreiche Proteine beteiligt

sind. Diese können teilweise mehrfach untereinander interagieren, um die zelluläre Weiterleitung des protektiven Effekts zu gewährleisten.



**Abbildung 5: Signaltransduktion der M-PC über die PKC**

Die Abbildung zeigt bisher beschriebene Mechanismen der M-PC über die PKC. Als relevante Zwischeneffektoren agieren mK<sub>ATP</sub>-Kanäle und GSK-3β sowie die mPTP als Endeffektor.

Hauptweg:  $\longrightarrow$  Aktivierung,  $\dashv$  Inhibierung

Nebenweg:  $\dashrightarrow$  Aktivierung,  $\dashv$  Inhibierung

Die Abbildung ist modifiziert nach Tanaka et al.<sup>88</sup>.

A<sub>1</sub>: Adenosinrezeptor A<sub>1</sub>, β<sub>1</sub>: Adrenorezeptor β<sub>1</sub>, δ<sub>1</sub>: Opioidrezeptor δ<sub>1</sub>, eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*, ERK: *extracellular signal-regulated proteinkinase*, GC: *Gyanylylcyclase*, GSK-3β: *Glykogen Synthase Kinase-3β*, JAK/STAT: *Januskinase/Signal transducer and activator of transcription*, μ<sub>1</sub>: Opioidrezeptor μ<sub>1</sub>, mK<sub>ATP</sub>: *mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal*, NO: *Stickstoffmonoxid*, mPTP: *mitochondrial permeability transition pore*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, P: phosphoryliert, p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinase*, PI3-K: *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, PKC: *Proteinkinase C*, PKG: *Proteinkinase G*, ROS: *reaktive Sauerstoffspezies*

### 1.4.2 Die Rolle der Proteinkinase A

Die PKA wurde erstmals von Edwin G. Krebs und Edmond H. Fischer beschrieben<sup>101</sup> und gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen. Sie ist an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt, da sie dazu fähig ist, andere Proteine zu phosphorylieren und damit zu aktivieren oder zu inaktivieren.

In inaktivem Zustand liegt die PKA in eukaryotischen Zellen als Heterotetramer ( $R_2C_2$ ) vor, bestehend aus zwei regulatorischen Untereinheiten (R) und zwei katalytischen Untereinheiten (C)<sup>102</sup>. Eine regulatorische Untereinheit besitzt jeweils zwei Bindungsstellen für zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Insgesamt konnten vier Isoformen der R-Untereinheit (R1 $\alpha$ , R1 $\beta$ , R2 $\alpha$  und R2 $\beta$ ) sowie drei der C-Untereinheit (C $\alpha$ , C $\beta$  und C $\gamma$ ) beschrieben werden. Durch sie wird auch die Isoform der PKA abgeleitet (PKA I und PKA II). Die R-Untereinheiten verfügen über eine unterschiedliche Affinität für cAMP, sodass die Isoformen bei unterschiedlich vorliegenden Konzentrationen von cAMP aktiviert werden. Dabei zeichnet sich die PKA Typ I durch ein Dimer aus R1 $\alpha$  und R1 $\beta$ , Typ II durch R2 $\alpha$  und R2 $\beta$  aus. Grundsätzlich ist die PKA I typischerweise im Zytoplasma lokalisiert, während Typ II vor allem in den weiteren Zellkompartimenten vorkommt<sup>103</sup>.

Die monomere C-Untereinheit der PKA verfügt über eine Bindungsstelle für ATP und erlangt durch dessen Bindung die Fähigkeit, katalytisch aktiv zu sein<sup>104</sup>. Die cAMP-Synthese findet durch die Adenylatcyclase (AC) aus AMP statt und wird G-Rezeptor-gekoppelt vermittelt.

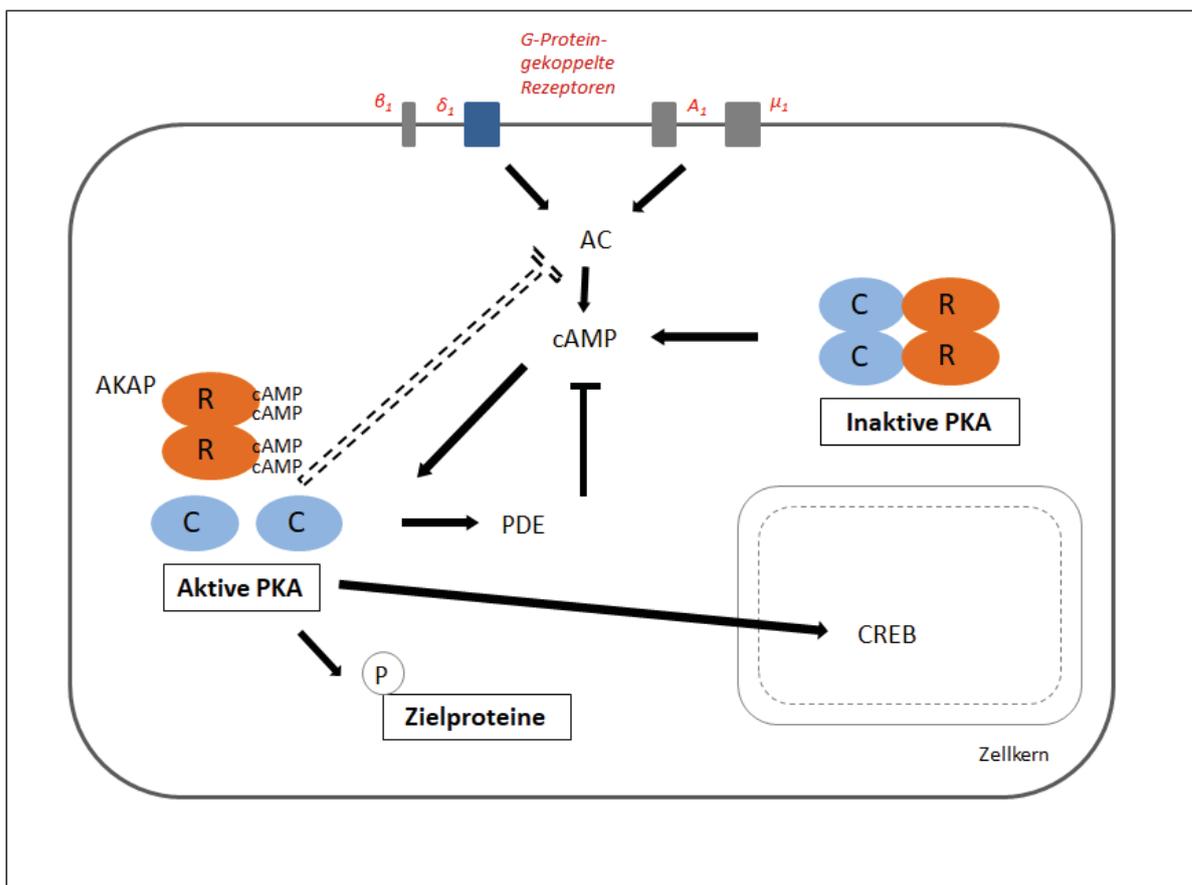
Die gleichzeitige Besetzung der zwei Bindungsstellen senkt die Affinität zwischen den R- und C-Untereinheiten; sie zerfallen in ein R-Dimer und zwei C-Monomere. Die C-Monomere sind nun aktiv und besitzen die Fähigkeit, eine Phosphorylierung anderer Proteine einzuleiten und damit die Aktivität und Funktion dieser zu verändern<sup>105</sup>. Hierfür wird die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATPs der C-Untereinheit transferiert und somit Threonin- bzw. Serinreste der Zielproteine phosphoryliert. Dieser Prozess läuft für eine kurze Zeit ab, kann aber verlängert werden, indem die aktive Untereinheit in den Zellkern wandert und dort die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren einleitet<sup>106</sup>.

Die Regulation und damit auch die Beendigung der PKA-Aktivität erfolgt durch unterschiedliche Strategien. Zum einen ist die Konzentration von cAMP in der Zelle ausschlaggebend. Diese wird kontrolliert, indem gleichzeitig zur Aktivierung der PKA

die Phosphodiesteraseaktivität erhöht wird. Sie spaltet cAMP in AMP und macht den *second messenger* unwirksam. Zusätzlich wird die AC mittels Rückkopplungsmechanismus gehemmt und der Proteinkinase-Inhibitor (PKI) aktiviert, welcher zur Inaktivierung der C-Untereinheit führt<sup>107</sup>.

Gleichermaßen ist der subzelluläre Aufenthaltsort der PKA wichtig, welcher durch *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs) modifiziert werden kann. Die Interaktion mit AKAPs, die an die R-Untereinheit der PKA binden können, ermöglicht der PKA die Verankerung in bestimmten Zellkompartimenten und führt so zur besseren Koordination der Signaltransduktion. Hierdurch wird somit die Lokalisation und auch maßgeblich die Funktion beeinflusst<sup>108</sup>.

Der Aufbau und Aktivierungsweg der PKA sind in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Aufbau und Aktivierungsweg der PKA**

Hauptweg:  $\rightarrow$  Aktivierung,  $\dashv$  Inhibierung

Die PKA liegt inaktiv als Heterotetramer vor. Die Besetzung zweier Bindungsstellen mit cAMP lässt die PKA in ein R-Dimer und zwei aktive C-Monomere differenzieren, welche nun eine Phosphorylierung der Zielproteine in verschiedenen Zellkompartimenten einleiten können. Die cAMP-Konzentration wird durch die AC und die PDE reguliert. Die Modifikation der PKA erfolgt durch AKAPs.

Die Abbildung ist modifiziert nach Sassone-Corsi et al.<sup>109</sup>

A1: Adenosinrezeptor, AC: Adenylatcyclase, AKAP: *A-kinase anchoring protein*, C: katalytische Untereinheit der PKA,  $\beta_1$ : Adrenorezeptor  $\beta_1$ , cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, CREB: *cAMP-responsive element-binding protein*,  $\delta_1$ : Opioidrezeptor  $\delta_1$ ,  $\mu_1$ : Opioidrezeptor  $\mu_1$ , P: Phosphorylierung, PDE: Phosphodiesterase, PKA: Proteinkinase A, R: Regulatorische Untereinheit der PKA

Die Funktionen der PKA sind vielfältig und greifen teilweise in fundamentale zelluläre Prozesse ein. Sie beinhalten die Regulation von Ionenkanälen in der glatten Muskulatur sowie im Myokard<sup>110</sup>. Zu den Zielproteinen gehören außerdem die Glykogensynthese und Phosphorylasekinase, welche im Glykogenstoffwechsel zu einer erhöhten Glukosebereitstellung führen<sup>111</sup>. Die Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase führt zu einer verminderten Lipidsynthese. Außerdem kann die PKA in das zelluläre Wachstum und die Differenzierung eingreifen. Eine veränderte Aktivität von PKA wird mit der Entstehung verschiedener Tumore assoziiert<sup>112,113</sup>.

Des Weiteren verfügt die PKA über ein Zielprotein, das im Zellkern die Transkription von verschiedenen Genen steuern kann (*cAMP-responsive element-binding protein*, CREB). Speziell in Kardiomyozyten induziert die PKA die Phosphorylierung von Phospholamban zu phosphoryliertem Phospholamban (pPLB), was die Hemmung der *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) aufhebt und zu erhöhter intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Aufnahme führt. Die Kardiomyozyten sind auf diese Weise dazu fähig, schneller relaxieren zu können<sup>114</sup>.

Durch die Rolle der PKA in vielfältigen zellulären Prozessen ist die Beteiligung an kardioprotektiven Strategien denkbar und konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden.

Im Jahr 1999 konnten Lochner und Mitarbeiter zeigen, dass das cAMP-Level und die PKA-Aktivität durch IPC im Myokard erhöht werden<sup>115</sup>.

Sanada et. al beobachteten 2001, dass die Applikation von Olprinone, einem PDEIII-Hemmer, möglicherweise über eine cAMP-Erhöhung und PKA-Aktivierung zu einer Infarktgrößenreduktion führt. Sie applizierten Hunden 30 Minuten vor 90-minütiger Ischämie Olprinone oder dibutryl-cAMP und kombinierten die Applikation von Olprinone mit H-89, einem PKA-Inhibitor. Es zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion bei den Tieren, die mit Olprinone und dibutryl-cAMP behandelt wurden, die gleichzeitige Applikation von H-89 hob den kardioprotektiven Effekt von Olprinone auf<sup>116</sup>.

2004 konnte dieselbe Arbeitsgruppe ebenfalls an Hunden zeigen, dass ein hoher Spiegel an cAMP und eine Aktivierung der PKA während der IPC die Infarktgröße reduziert<sup>117</sup>.

Auch in der pharmakologischen, anästhetikainduzierten Präkonditionierung wurde die Involvierung der PKA beobachtet. Isofluran kann die PKA-Aktivität erhöhen<sup>118</sup>, im molekularen Mechanismus der Desfluran-Präkonditionierung ist sie dem mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanal (mK<sub>Ca</sub>) vorgeschaltet<sup>119</sup>.

Gleichermaßen kann Morphin den zellulären cAMP-Spiegel anheben und darüber die PKA aktivieren<sup>120</sup>.

Es gibt also deutliche Hinweise, dass die PKA auch am molekularen Mechanismus der M-PC als Zwischeneffektor beteiligt ist. Es ist wahrscheinlich, dass neben dem bereits bekannten Teil der Signaltransduktion über die PKC ein parallel ablaufender, PKA-involvierter Mechanismus stattfindet. Bis jetzt ist dieser Signalweg und die damit assoziierten Proteine nicht hinreichend auf eine Beteiligung in der M-PC untersucht worden.

### **1.4.3 Die Rolle des Endeffektors mitochondriale Permeabilitätspore**

Bereits 1965 gaben Crofts und Mitarbeiter Anhaltspunkte dafür, dass das hepatozytäre Mitochondrium in der Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> mit einer Schwellung reagiert<sup>121</sup>. Crompton et al. zeigten mehr als 20 Jahre später, dass die gesteigerte Durchlässigkeit durch einen Kanal verursacht wird, der als Ca<sup>2+</sup>-abhängige Pore bezeichnet wurde<sup>122</sup>. Der Begriff wurde bereits 1979 von Haworth und Hunter geprägt<sup>123</sup>. Seitdem wird die mitochondriale Pore intensiv erforscht und als Zielprotein für zahlreiche kardioprotektive Prozesse beschrieben, darunter bei der IPoC, der IPC und der pharmakologischen Präkonditionierung<sup>124–127</sup>.

Die mPTP wird als Kanal mit großer Leitfähigkeit beschrieben und ist an der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert. Ihr molekularer Aufbau ist bis heute nicht komplett ermittelt. Bekannt ist die Konfiguration aus mehreren Bestandteilen, deren einzelne Bedeutung aber noch nicht ausreichend erforscht ist.

Eine der Komponenten ist das Cyclophilin D (Cyc-D). Es wurde erstmals von Halestrap et al. beschrieben und als in der mitochondrialen Matrix befindliche Peptidyl-prolyl-cis-trans Isomerase (PPIase) identifiziert, die durch Cyclosporin A gehemmt werden kann<sup>128</sup>. Cyc-D kann durch Bindung an der Adenin-Nukleotid-

Translokase (ANT), dem Phosphatkanal und dem *oligomycin sensitivity conferring protein* der F-ATP-Synthase eine transmembranöse Öffnung der inneren Mitochondrienmembran bewirken<sup>129–131</sup>. Oxidativer Stress führt zu einer vermehrten Konnektion dieser Proteine mit Cyc-D. Jedoch ist es essentiell zu wissen, dass *Knockout*-Mäuse bei Fehlen der PPIase in Lebermitochondrien weniger sensitiv auf  $\text{Ca}^{2+}$  reagieren, sich jedoch bei adäquat hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulus die mPTP trotzdem öffnet<sup>132</sup>.

Auch *ANT-Knockout*-Mäuse reagieren zwar weniger sensitiv auf eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die Abwesenheit der ANT verhindert aber nicht die Öffnung der mitochondrialen Pore<sup>133</sup>. Die ANT kann grundsätzlich durch (Carboxy-)Atractyloside, einem toxischen Glykosid, aktiviert werden<sup>134</sup>.

Dies wirft die Frage auf, ob die Bestandteile vor allem regulatorische Aufgaben erfüllen oder im Falle ihrer Abwesenheit andere Proteine ihre Eigenschaften übernehmen können.

Als alternativer Bestandteil der mPTP zur ANT werden der mitochondriale Phosphatkanal<sup>130</sup> und die FoF1-ATP-Synthase<sup>131</sup> gesehen. Diese sind momentan Gegenstand intensiver Forschung.

Durch die Lokalisation der mPTP an der inneren Mitochondrienmembran ist es durchaus wahrscheinlich, dass auch verschiedene Proteine der äußeren Mitochondrienmembran eine Rolle bei der Öffnung der mPTP spielen. Weitgehend erforschte spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC) und periphere Benzodiazepinrezeptoren (*translocator protein of the outermembrane, TSPO*) scheinen nicht wesentlich an der Formierung der mPTP beteiligt zu sein; bei *Knockout*-Mäusen konnten auch ohne jene Bestandteile mPTPs nachgewiesen werden<sup>135,136</sup>. Die Hexokinase-2 und Mitglieder der Bcl-2-Familie binden an die äußere Mitochondrienmembran und können die mPTP-Öffnung beeinflussen. Daher sind sie weitere mögliche Regulatoren<sup>137</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen ist die mitochondriale Membran weitgehend undurchlässig für Ionen oder andere Metaboliten. Dies dient dazu, das Membranpotential und den pH-Wert aufrechtzuerhalten. Die absolute Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Mitochondrienmatrix, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der mPTP und der pH-Wert bestimmen ihren Öffnungszustand. Oxidativer Stress, ein hoher Phosphatgehalt und ein hoher pH-Wert setzen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Pore herauf, auch bei absoluter hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es schneller zur Öffnung. Atractyloside (Atr) kann

durch Aktivierung der ANT eine Öffnung der Pore induzieren. Dagegen wirken Adenosindiphosphat (ADP) und ATP, Cyclosporin A und ein niedriger pH-Wert protektiv, indem sie die Öffnung der Pore verhindern<sup>138</sup>.

Während einer Ischämie begünstigen die Erhöhung von  $\text{Ca}^{2+}$ , Phosphat und der ATP-Verlust der Zelle die Durchlässigkeit der mPTP, der pH-Wert ist zunächst aber in azidotischen Bereichen. Dieser Zustand bahnt die Öffnung der mPTP während der Reperfusionphase, in der es zur Zunahme des pH-Wertes, vermehrtem  $\text{Ca}^{2+}$  und oxidativem Stress durch Produktion von ROS kommt<sup>139</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass diejenigen Kardiomyozyten von kardioprotektiven Stimuli profitieren, die nach Ischämie noch vital sind, jedoch einen Reperfusionsschaden durch mPTP-Öffnung erleiden würden. Die Inhibierung der Öffnung der mPTP wirkt also in der Reperfusionphase protektiv auf die Kardiomyozyten.

Die Öffnung der mPTP greift tief in die Funktion der Zelle ein. Sie führt zum Protoneneinstrom und zum Ausgleich von Ionen und niedriggewichtigen Molekülen von  $<1,5$  kDa zwischen Mitochondrienmatrix und Zytosol. Dabei spielt der Ausgleich von  $\text{Ca}^{2+}$  eine bedeutende Rolle: Es fungiert als Trigger, um innermitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Vorräte auszuschütten. Es kommt zum Ausgleich des osmotischen Drucks zwischen den zwei Zellkompartimenten, was zur mitochondrialen Schwellung führt. Die äußere Mitochondrienmembran kann in diesem Zustand rupturieren und es kommt zur Freisetzung des proapoptotischen Proteins Cytochrom C<sup>140</sup>.

Die Beteiligung der mPTP in der Signaltransduktion der IPC wurde initial durch Hausenloy et. al. beschrieben. Der mPTP-Öffner Atr verhinderte den kardioprotektiven Mechanismus im Rahmen der Signalvermittlung der IPC<sup>141</sup>.

Die mPTP ist auch an der M-PC beteiligt. Über welche molekularen Mechanismen die Schließung der mPTP vermittelt wird, ist noch nicht ausreichend untersucht. Beschrieben ist die Vermittlung über die GSK-3 $\beta$  während der Reperfusionphase, die durch verschiedene vorgeschaltete Proteine phosphoryliert wird und dadurch die Öffnung der mPTP inhibiert (s. 1.4.1).

Hinweise, dass auch andere vorgeschaltete Proteine zur Schließung der mPTP führen können, lieferten Fräßdorf et al., die eine Mitwirkung von  $\text{mK}_{\text{Ca}}$ -Kanälen an der M-PC zeigten<sup>142</sup>. Cao und Mitarbeiter erweiterten diese Erkenntnis, indem sie eine Öffnung der mPTP bei gleichzeitiger  $\text{mK}_{\text{Ca}}$ -Kanal-Aktivierung induzierten. Auf diese Weise wurde der kardioprotektive Prozess aufgehoben. Daraus konnte

abgeleitet werden, dass der  $mK_{Ca}$ -Kanal möglicherweise als vorgeschalteter Regulator der mPTP in der Signaltransduktion der M-PC wirkt.

Die Aktivität der  $mK_{Ca}$ -Kanäle kann durch die PKA reguliert werden. Dies wurde in der glatten Muskulatur<sup>143</sup> und der Herzmuskulatur gezeigt<sup>144</sup>. Ob PKA,  $mK_{Ca}$ -Kanäle und mPTP tatsächlich miteinander interagieren und bei der M-PC eine Rolle spielen, muss noch beleuchtet werden.

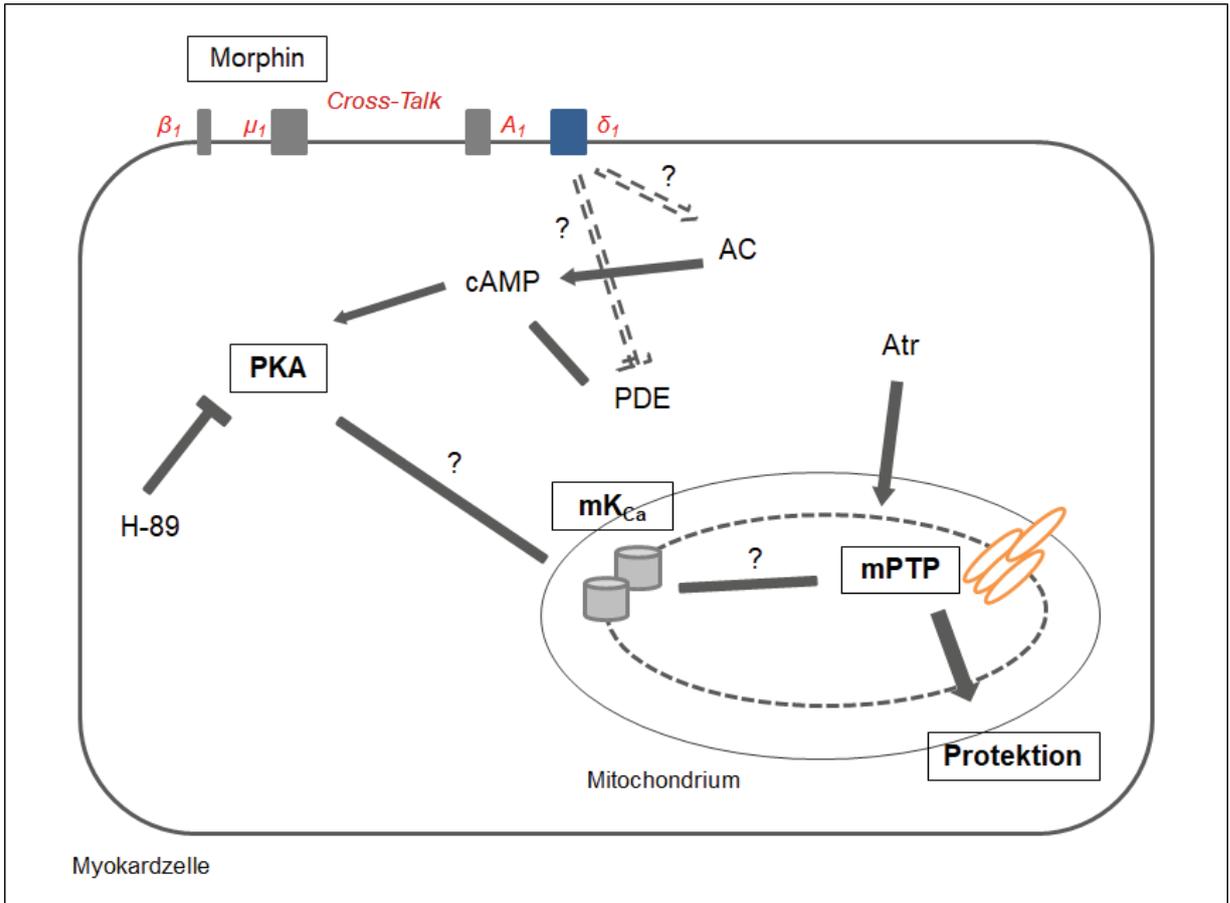
## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Bisher ist der molekulare Mechanismus der M-PC nur unzureichend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die  $mK_{Ca}$ -Kanäle in dieser Signalkaskade involviert sind, bisher bleibt aber unklar, welche Zwischeneffektoren vor- und nachgeschaltet sind. Möglicherweise vorgeschaltet sein kann die PKA, die hauptsächlich durch cAMP reguliert wird. Als Endeffektor könnte die mPTP fungieren. Um das Ziel zu verwirklichen, die M-PC therapeutisch im klinischen Alltag anwenden zu können, fehlen immer noch essentielle Erkenntnisse. Es ist daher Ziel der Studie, die folgenden Fragen zu beantworten (s. Abb. 7):

1. Spielt die Aktivierung der PKA bei der M-PC eine Rolle?
2. Induziert die Öffnung der mPTP den Verlust des kardioprotektiven Effekts der M-PC und ist damit in der Signalkaskade der M-PC beteiligt?

Für die Beantwortung dieser Fragen wird zum einen *in vivo* an Ratten die Beteiligung der PKA und der mPTP getestet. Durch die Inhibition der Proteine bei gleichzeitiger M-PC wird eine mögliche Auswirkung auf die myokardiale Infarktgröße gemessen. Das Ergebnis wird mit der Infarktgröße der M-PC ohne entsprechende Hemmung von PKA bzw. mPTP verglichen und auf Signifikanz untersucht.

Die Involvierung der PKA wird zusätzlich durch den Nachweis von pPLB *in vitro* nach M-PC in isolierten Kardiomyozyten mittels *Western blot* bestimmt.



**Abbildung 7: Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

➔ Aktivierung, —| Inhibition

Mögliche Signalkaskade der M-PC: Vermittlung über  $\delta_1$ -Rezeptor, Aktivierung der PKA über verminderten Abbau von cAMP durch Hemmung der PDE bzw. erhöhte Produktion von cAMP durch Steigerung der AC-Aktivität. Mögliche Zwischenschaltung der  $mK_{Ca}$ -Kanäle zur Inhibition der Öffnung der mPTP als Endeffektor der Zellprotektion. Beeinflussung der PKA durch den Inhibitor H-89 und der mPTP durch Induktion der Öffnung mittels Atr.

$A_1$ : Adenosinrezeptor  $A_1$ , AC: Adenylatcyclase, Atr: Atractyloside;  $\beta_1$ : Adrenorezeptor  $\beta_1$ , cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, H-89: Proteinkinase A Inhibitor,  $\delta_1$ : Opioidrezeptor  $\delta_1$ ,  $mK_{Ca}$ : mitochondrialer, calciumabhängiger Kaliumkanal,  $\mu_1$ : Opioidrezeptor  $\mu_1$ , mPTP: mitochondriale Permeabilitätspore, PDE: Phosphodiesterase, PKA: Proteinkinase A

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Medikamente

Name	Zusatzbezeichnung/ Artikelnummer	Hersteller
2-β- Mercaptoethanol	28625	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Aqua ad injectabilia</i> 10 ml	2351744	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>Aqua destillata</i>	Aqua B, 0082479E	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Atractyloside	A6882	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	108122	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	A9418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	1.02378.0500	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Coomassie Staining</i>	A152	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cytosin-β-D- Arabinofuranoside (Ara-C)	C1768-100mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Glukosemonohydrat	6780.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	0908	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DL-Carnitin	7212.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dextran	00268	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

<i>Dried skimmed milk</i>	T145	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL)</i>	Sc-2048	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
<i>Evans Blue, Dye Content &gt; 75 %</i>	E2129	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
fetales Kälberserum	FCS Gold, A11-151	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Folin-Ciocalteus-Phenol	F9252	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehydlösung, etwa 37 %	1040031000	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Glycerol	G5516	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	3790.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
H-89 (N-[2-p- bromocinnamylamino)ethyl]- 5-isoquinoline sulfonamide)	B1427	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Hydrochloric acid (HCl) 37 %</i>	258148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	HN02.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3904.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kalium-Natrium-Tartrat (KNa-Tartrat)	S2377	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kollagenase, CLSII	C2-28	Biochrom AG, Berlin
Kreatin	27910	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	P023	Carl Roth GmbH & Co. KG,

		Karlsruhe
M 199	T061-01; 1L (Earle's Salt)	Biochrom AG, Berlin
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	P027.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Morphinsulfat Pentahydrat	M8777	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	HN77	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	S2127	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	AnalaR Normapur	VWR Chemicals, Radnor, PA, USA
Natrium-EDTA (Na <sub>2</sub> -EDTA)	ED2SS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumfluorid (NaF)	201154	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Natriumhydroxid (NaOH)	106498	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Nonidet P40 (NP 40)	Tergitol® 119-01929-1107	The Dow Chemical Company, Midland MI, USA
Pentobarbital-Natrium	16 g/100 ml	Merial GmbH, Hallbergmoos
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	P4417	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin (10.000 IU) Streptomycin (10 mg/ml)	P11-010	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Polyacrylamid 30 % (PAA)	A3699	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease-Inhibitor	Complete™ 04693116001	F.Hoffmann La Roche AG, Basel, Switzerland
Protein-Marker 1:1000	Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signaling, Beverly, MA USA

Sodiumdodecylsulfat 10 % (SDS)	L4522	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Taurin	T0625-25G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Temed	110732	Merck KGaA, Darmstadt
Tris Base (=Sigma 7-9)	5429.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	37130	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Tween 20 (0,1 %)	655204	Merck KGaA, Darmstadt

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial, Geräte und Software

Name	Typ/ Artikelnummer	Hersteller
96-Well-Platte	72.1979.202	Sarstedt, Nürnberg
Absauganlage	M35	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Abzug		Vinitrex Laboreinrichtungen GmbH & Co KG, Coswig
Analysenwaage	BP 1200	Sartorius AG, Göttingen
Anästhesiemonitor	Capnomac Ultima	Datex Engstrom, Duisburg
Arterielle Kanüle	Vasofix® Safety 20G (1,1x33 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Beatmungsgerät	Babylog 8000	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
Büchnertrichter, PP 70ml	519-2362	VWR International GmbH, Darmstadt
CanonScan	FB620P	Canon, Krefeld
Computergestützte Messungen des arteriellen Drucks	PowerLab/8SP	ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia
Chirurgischer Faden	PDS™II (5-0)	Ethicon, Johnson-Johnson,

		New Brunswick NJ, USA
Chirurgische Nadel, atraumatisch	4-0 Prolene	Ethicon, Johnson&Johnson, New Brunswick NJ, USA
Chirurgische Klemme		Aesculap GmbH, Tuttlingen
Drei-Wege-Hahn	Discofix®C-3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3 cell	BioRad, Hercules, California, USA
Endotrachealtubus	Vasofix® Safety 14G (2,2x50 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Folie für 96-Well-Platte	95.1994	Sarstedt, Nürnbrecht
Gen5-Software		BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
GraphPad StatMate™	Version 1.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Infusionsleitung	Original Perfusor®-Leitung PE (150cm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Inkubator	Art.-No 9040-0052	Binder GmbH, Tuttlingen
Kanüle zur intraperitonealen Injektion	BD Microlance™ 3 27G (0,4x19mm)	BD, Drogheda, Irland
Kamera und Dunkelkammer	DeVision DBox, SNo A08C83309	Dexon Science Tec GmbH, Hohengandern
Kühlelement	<i>Blue Cooling Unit</i>	BioRad, Berkeley, USA
Langendorff-Apparatur		Eigenbau der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
McllwainTissue Chopper mit Unterlegplättchen	MICI2E	The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Gomshall, Guildford, Surrey, UK
Mikroskop	AE30	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

Nylonfilter, Porengröße 200 µm	4-1413	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
O <sub>2</sub> -Gasflasche	32376028, UN1071	Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleissheim
Parafilm	PM996	Pechiney Plastic Packaging Inc., Newark, CA, USA
Peristaltische Pumpe	Minipuls 3	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Petrischale 1x94x16 mm	Cellstar steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Immobilon-P Transfer Membran	Milipore, Billerica, USA
Präzisionswaage	LA 230 S	Sartorius AG, Göttingen
Rasierklinge	Wilkinson Classic	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Reaktionsgefäß, Safe lock	2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schläuche für peristaltische Pumpe	PVC Standard; 38-0080	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
SigmaScan Pro 5®		SPSS Science Software, Chicago, USA
Skalpell	Klinge BB521	Aesculap AG, Tuttlingen
Sockel für 96-Well-Platte	MicroAmp, No 4312063	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
<i>Software</i> Excel	Version 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<i>Software</i> GelPro Analyzer	Version 6.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA
<i>Software</i> GelScan	Version 6.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA
Spektrometer	Synergy 2	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA

Spritze, 50ml	Original-Perfusor®- Spritze OPS 50 ml Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
SPSS <i>Science Software</i>	Version 17.0	IBM, Chicago, USA
Sterilbank	HERAsafe KS 15	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermometer	GTH 1160	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf
Tischzentrifuge	VWR Galaxy Mini	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wärmeplatte	Mgw Lauda Cs	Lauda, Lauda-Königshofen
Wasserbad	001-0505	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Germany
Wasserbad mit Pumpe	Thermomix 420	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellarbeitsbank	HERAsafe KS 15	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Zellkulturschale	353004	BD BioSciences, Heidelberg
Zellschaber	99003	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.1.3 Lösungen

### 2.1.3.1 *In vivo* Versuche

#### 1) *Evans Blue*-Färbelösung

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse
<i>Evans Blue</i>		1,0 g

Dextran		5,0 g
NaCl	0,9 %	500 ml

## 2) TTC-Färbelösung

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse
Trishydroxymethylaminomethan		2,42 g
TTC		1,5 g
NaCl	0,9 %	200 ml

### 2.1.3.2 Kardiomyozytenisolierung

#### 1) HEPES-gepuffertes Powell-Medium

Chemikalie	Konzentration	Masse
NaCl	110 mM	6,43 g
KCl	2,5 mM	0,19 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,16 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,30 g
HEPES	25 mM	5,96 g
D(+)-Glukose-Monohydrat	10 mM	1,98 g

Mit *Aqua destillata* auf 1 l auffüllen. Titration des pH mit 2 M NaOH auf 7,4 und Sterifiltration. Aufbewahrung bei 4 °C.

#### 2) Kollagenaselösung

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse
Kollagenase		gewünschte Menge in mg
Powell-Medium		5 ml
CaCl <sub>2</sub>	100 mmol/l	12,5 µl

Zu den 45 ml Powell-Medium in der Langendorff-Apparatur hinzugeben.

### 3) CCT-Medium

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse/ Anzahl
M199		2 Packungen
<i>Aqua bidestillata</i>		10 l
HEPES	15 mM	36 g
Kreatin	5 mM	5,66 g
L-Carnitin	2 mM	3,95 g
Taurin	5 mM	6,26 g
ARA-C	10 µM	24,3 mg

Titration des pH mit 2 M NaOH auf 7,4 und steril filtrieren. Aufbewahrung bei 4 °C.

### 4) Vorplattiermedium

Chemikalie	Konzentration	Volumen
CCT-Medium		40 ml
Penicillin-Streptomycin	2 %	0,8 ml
fetales Kälberserum	4 %	1,6 ml

### 5) Ausplattier- und Waschmedium

Chemikalie	Konzentration	Volumen
CCT-Medium		40 ml
Penicillin-Streptomycin	2 %	0,8 ml

#### 2.1.3.3 Western blot

##### 1) Lowry-Reagenz

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		10,0 g
NaOH	0,1 M	500 ml
KNa-Tartrat	2 %	
CuSO <sub>4</sub>	1 %	

Zur Herstellung 100 Teile des in 500 ml 0,1 M NaOH gelösten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit einem Teil 2 % Kalium-Natrium-Tartrat und einem Teil 1 % CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O mischen.

### 2) 0,5 M Tris HCL

Chemikalie	Volumen/Masse
Tris HCl	15,8 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 200 ml

Lösung mit NaOH bzw. HCl auf pH je nach Vorgabe einstellen.

### 3) 1,5 M Tris Base

Chemikalie	Volumen/Masse
Sigma 7-9	54,51 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 300 ml

Lösung mit NaOH auf pH 8,8 einstellen.

### 4) 1,25 M Tris Base

Chemikalie	Volumen/Masse
Sigma 7-9	15,14 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 100 ml

Lösung mit NaOH auf pH 6,8 einstellen.

### 5) Ganzzellextraktion Lysepuffer

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse
Tris HCL pH 7,5	50 mM	0,39 g
NaCl	250 mM	0,73 g
NP 40	0,5 %	0,25 ml
Na-EDTA	50 mM	1,04 g
NaF	50 mM	0,11 g
Protease-Inhibitor		2 ml
DTT	1 mM	0,08 g

<i>Aqua destillata</i>	50 ml
------------------------	-------

### 6) Sammelgel

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen/Masse</b>
PAA 30 %		2,55 ml
<i>Aqua destillata</i>		10,5 ml
Tris Base, pH 6,8	1,25 M	1,5 ml
SDS	10 %	150 µl
Temed		30 µl
APS	10 %	150 µl

### 7) Trenngel (12 %)

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen/Masse</b>
PAA 30 %		7,92 ml
<i>Aqua destillata</i>		6,88 ml
Tris Base, pH 8,8	1,5 M	5 ml
SDS	10 %	200 µl
Temed		20 µl
APS	10 %	100 µl

### 8) Loading Buffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen/Masse</b>
Bromphenolblau		30 mg
SDS	10 %	1,0 g
Glycerol		2 ml
Tris-HCl, pH 6,8	500 mM	1 ml
<i>Aqua destillata</i>		7 ml

### 9) Running Buffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen/Masse</b>
Tris Base		3,0 g
Glycin		14,4 g
SDS	10 %	1,0 g

<i>Aqua destillata</i>	ad 1000 ml
------------------------	------------

### 10) Transfer Buffer

Chemikalie	Endkonzentration	Volumen/Masse
Tris Base	12 mM	1,45 g
Glycin	96 mM	7,21 g
<i>Aqua destillata</i>		ad 1000 ml

### 11) Färbelösung

Chemikalie	Volumen/Masse
<i>Coomassie Blue</i>	750 mg
Essigsäure	25 ml
Ethanol 96 %	112,5 ml
<i>Aqua destillata</i>	112,5 ml

Zur Abtrennung unlöslicher Farbstoffanteile wird die Lösung nach Mischen unter Abzug filtriert.

### 12) Entfärbelösung

Chemikalie	Volumen/Masse
Ethanol 96 %	333,3 ml
Eisessig	100 ml
<i>Aqua destillata</i>	ad 1000 ml

### 13) Blocklösung 5 %

Chemikalie	Konzentration	Volumen/Masse/ Menge
<i>Dried skimmed milk</i>		50,0 g
PBS		5 Tabletten
Tween 20	0,1 %	1 ml
<i>Aqua destillata</i>		ad 1000 ml

Zur Herstellung der 1 %igen Blocklösung wird die 5 %ige 1:5 mit TBS-T (pH 8,0) verdünnt.

#### 14) Waschpuffer TBS-T = TPBS

Chemikalie	Konzentration	Volumen/ Masse/Menge
PBS		10 Tabletten
Tween 20	0,1 %	2 ml
<i>Aqua destillata</i>		ad 2000 ml

Die Lösung wird mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

#### 15) BSA 5 %

Chemikalie	Volumen/Masse
BSA	50,0 g
TPBS	ad 1000 ml

### 2.1.4 Antikörper

#### 2.1.4.1 Primärantikörper

Name und eingesetzte Verdünnung	Zusatzbezeichnung	Hersteller
Rabbit-Anti-PLB 1:1000	Ab86930	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit-Anti-Phospho-PLB (Ser16) 1:1000	07-052	Merck KGaA, Darmstadt
Rabbit-Anti-Actin 1:10000	A2066	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### 2.1.4.2 Sekundärantikörper

Name und eingesetzte Verdünnung	Zusatzbezeichnung	Hersteller
Donkey-Anti-Rabbit IgG	711-035-152	Dianova, Hamburg, Germany

(H+L) 1:10000, Peroxidase-konjugiert		
Anti-Biotin, <i>HRP-linked</i> <i>Antibody</i> , 1:10000	7075S	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In vivo* Versuche

#### 2.2.1.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Mit der Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 8.87-51.04.20.09.388) wurden die Versuche an männlichen, ca. drei Monate alten Wistar-Ratten durchgeführt, die von der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen wurden. Die operative Ausführung erfolgte nicht durch mich selbst, sondern durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen und Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen.

Die zum Zeitpunkt des Experimentes durchschnittlich 296 +/- 30 Gramm schweren Tiere wurden bei freiem Zugang zu Wasser und Futter nach den Richtlinien des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*<sup>145</sup> gehalten, der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch Anschalten des Lichtes für 12 Stunden von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr simuliert.

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von 90 mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital als Bolus. Nachdem die adäquate Anästhesietiefe mittels Schmerzreizsetzung überprüft wurde, indem eine Reaktion auf diese ausblieb, wurde die orotracheale Intubation durchgeführt und die Beatmung der Ratte maschinell gewährleistet. Die Beatmungsfrequenz betrug 60/Min. bei einem Tidalvolumen von 2 ml. Der PEEP wurde bei 2–3 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Während der gesamten Narkosezeit wurde der pCO<sub>2</sub> und der pO<sub>2</sub> in physiologischen Bereichen gehalten. Für die Konstanthaltung der Körpertemperatur von 38 °C wurde die Ratte auf eine Wärmeplatte gelegt und zur Temperaturkontrolle ein Thermometer rektal eingeführt. Zur arteriellen Druckmessung und Ermittlung der Herzfrequenz wurde eine Kanüle über die rechte *Arteria carotis communis* in die Aorta eingebracht und visualisiert bzw. digitalisiert. Der venöse Katheter über die *Vena jugularis interna*

diente zur intravenösen Injektion von Infusionen und Medikamenten. Morphin, Atr und H-89 wurden vor Applikation in *Aqua ad inject.* gelöst.

Anschließend wurde über eine linkslaterale Thorakotomie und eine Perikardiotomie ein Koronarokkluder angelegt, indem eine Fadenschlinge um den *Ramus interventricularis anterior (left anterior descending artery, LAD)* der linken Koronararterie mit einer atraumatischen Nadel platziert wurde. Die beiden Fadenenden wurden durch ein kleines Kunststoffröhrchen mit ca. 1 mm Durchmesser gesteckt, durch Verschieben konnte später eine Koronarokklusion verursacht werden, die mit einer Klemme fixiert wurde. Eine erfolgreiche koronare Okklusion zeigte sich in einer zyanotischen Verfärbung des Epikardiums und umschriebene Hypokinesie in der Ischämiezone.

Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde intravenös über eine 50 ml-Spritze pro Stunde 40 mg/kg KG Pentobarbital infundiert und zur Abschätzung der Narkosetiefe die Vitalparameter herangezogen.

Nachdem die Präparation der Ratten beendet war, schloss sich eine 20-minütige Stabilisierungsphase an. Anschließend wurden die Tiere randomisiert den verschiedenen Gruppen zugeordnet.

### **2.2.1.2 Versuchsprotokoll**

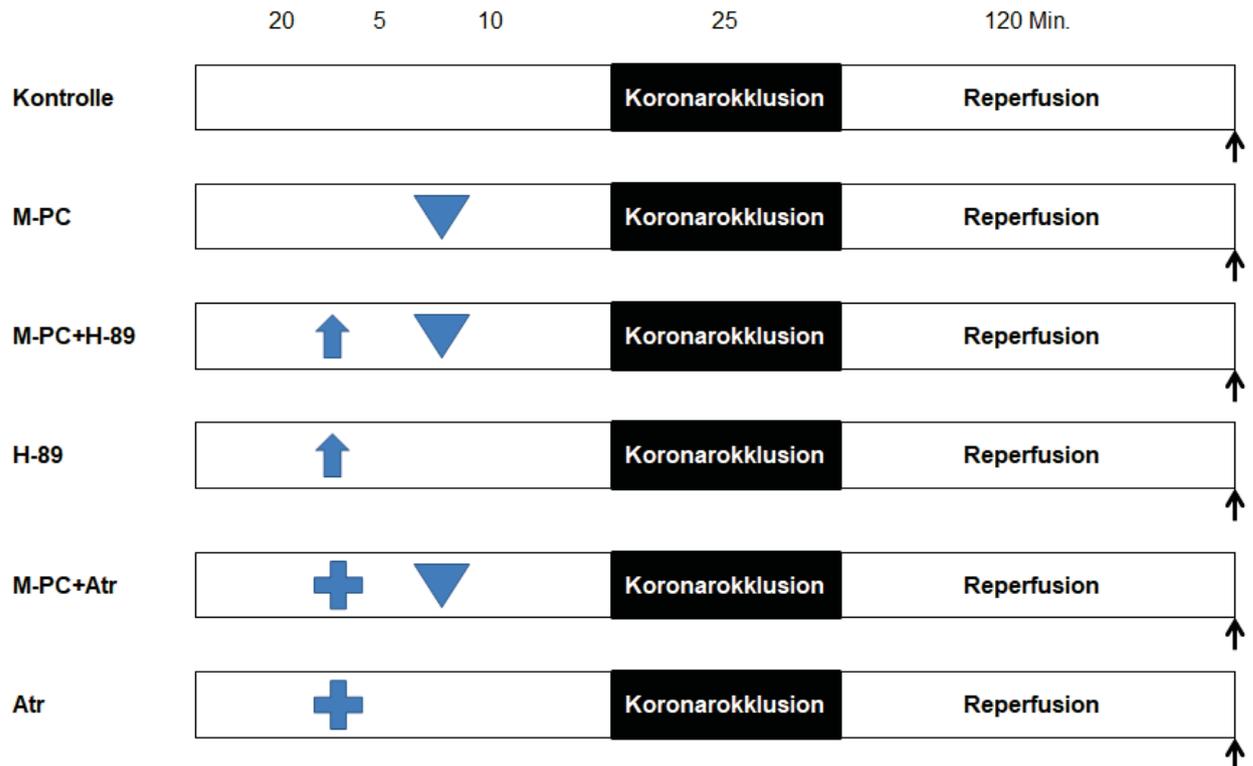
Die Tiere wurden in sechs Gruppen randomisiert (n=6 pro Gruppe). Die Kontrolltiere (Con) unterliefen dann ausschließlich einer 25-minütigen Ischämie, gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusion.

Der zweiten Gruppe wurde 10 Minuten vor Koronarokklusion Morphin in der Dosierung 0,3 mg/kg intravenös appliziert (M-PC). Die dritte Gruppe erhielt sowohl den PKA-Inhibitor H-89 (10 µg/kg i.v.) 15 Minuten vor Ischämie als auch 5 Minuten später und damit 10 Minuten vor koronarer Okklusion Morphin in der oben erwähnten Dosierung (M-PC+H-89). Einer weiteren Gruppe wurde nur H-89 appliziert (H-89). Um die Beteiligung der mPTP zu prüfen, wurde der fünften Gruppe 15 Minuten vor Ischämie Atr (5 mg/kg i.v.), ein selektiver mPTP-Öffner und 5 Minuten danach Morphin infundiert (M-PC+Atr). Die letzte Gruppe wurde nur mit Atr behandelt (Atr).

Bei allen behandelten Gruppen schloss sich an die Applikation der Medikamente eine 25 Minuten lange Koronarokklusion an. Nach Beendigung der Ischämie folgte eine 120-minütige Reperfusion durch Lockerung der Schlinge, die durch Rückgang

der zyanotischen Verfärbung verifiziert wurde. Das beschriebene Versuchsprotokoll ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Herzen wurden nach Ablauf der Reperfusionphase zur Infarktgrößenbestimmung von den großen Gefäßen getrennt und aus dem Thorax entnommen.



**Abbildung 8: Versuchsprotokoll der *in vivo* Experimente**

- ▼ : Morphin (0,3 mg/kg i.v.)
- ↑ : H-89 (10 µg/kg i.v., selektiver PKA-Antagonist)
- +
- ↑ : Infarktgrößenbestimmung

n=6 pro Gruppe

Versuchsprotokoll mit entsprechender Applikation der Substanzen Morphin, H-89 und Atractyloside nach Protokoll in den verschiedenen Versuchsgruppen nach 20-minütiger Stabilisierungsphase. Nach Anwendung folgte eine 25-minütige Koronarokklusion, an welche sich eine Reperfusionphase von 120 Minuten Dauer anschloss. Die Abbildung ist angelehnt an Dorsch et al.<sup>100</sup>

Atr: Atractyloside, M-PC: morphininduzierte Präkonditionierung, H-89: Proteinkinase A Inhibitor

### **2.2.1.3 Infarktgrößenbestimmung**

Die Färbung zur Infarktgrößenbestimmung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde das Risikogebiet durch Perfusion mit *Evans Blue* bestimmt, im zweiten Schritt durch die Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Färbung das eigentliche Nekrosegebiet sichtbar gemacht. Die Bestimmung der Infarktgröße in diesen zwei aufeinanderfolgenden Schritten diente dazu, das Ausmaß der ischämischen Schädigung im Perfusionsgebiet der betroffenen okkludierten Koronararterie zu quantifizieren.

Nach 120 Minuten Reperfusion wurde das Herz aus dem Thorax des Versuchstiers entnommen und über die Aortenwurzel an eine modifizierte Langendorff-Apparatur überführt. Zunächst erfolgte eine fünfminütige Auswaschung des in den Koronargefäßen verbliebenen Bluts mit Hilfe von kalter, physiologischer Kochsalzlösung mit einem Perfusionsdruck von 60 mmHg. Der Koronarokkluder, der an seinem ursprünglichen Platz um die LAD belassen wurde, kam erneut zum Einsatz, um das Koronargefäß noch einmal zu verschließen. In dieser Konstellation wurde das Herz mit einer 0,2%igen *Evans Blue*-Lösung für 10 Minuten durchspült. Dabei wurden die ischämisch-reperfundierten Areale nicht angefärbt und damit als Risikogebiet (*area at risk, AAR*) kenntlich gemacht. Anschließend wurde die überschüssige *Evans Blue*-Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Daraufhin wurde das Herz in 1–2 mm dicke transversale Scheiben geschnitten, in eine 0,75%ige TTC-Lösung bei 37 °C eingelegt und 10 Minuten inkubiert. In vitalem Gewebe wird TTC durch aktive Dehydrogenasen zu Triphenyltetrazoliumformazan (TTF) reduziert und erhält eine rote Farbe. Die rote Farbe kennzeichnet also vitales Gewebe in der AAR, nicht angefärbt wird der nekrotische Anteil<sup>146,147</sup>.

Danach wurden die Scheiben 24 Stunden in 4%iger Formalinlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung des Risiko- und anteilhaften Nekrosegebiets wurde mittels computerunterstützter Planimetrie festgelegt. Zuvor wurden die Herzscheiben eingescannt.

Die Infarktgrößen wurden als Prozent des Risikogebiets ausgedrückt.

### **2.2.2 Primäre Kardiomyozytenisolierung**

Die Kardiomyozytenisolierung wurde an männlichen, ca. 3 Monate alten und 300-350 g schweren Wistar-Ratten durchgeführt, die von der ZETT des Universitätsklinikums

Düsseldorf bezogen wurden (Projektnummer O 37/10). Sie hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrung und Wasser, der Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit einem Hell-Dunkel Zyklus von 12:12 Stunden eingehalten.

Das Protokoll zur Isolierung primärer Kardiomyozyten wurde durchgeführt in Anlehnung an die Veröffentlichung von Schlüter und Piper<sup>148</sup> und folgte folgenden Hauptschritten: Nach Herausnahme des Herzens aus dem Thorax des Versuchstiers wurde es rasch an eine modifizierte Langendorff-Apparatur überführt und mit Powell-Medium perfundiert. Diesem Medium wurde für die Separierung der Kardiomyozyten im Verlauf sowohl Kollagenase hinzugefügt als auch eine Nachverdauphase eingeleitet. Die Kultivierung der separierten Zellen stellte die Grundlage für die spätere Behandlung mit Morphin dar.

### **2.2.2.1 Aufbau und Vorbereitung der Langendorff-Apparatur**

Bevor das präparierte Herz an die Langendorff-Apparatur angeschlossen werden konnte, musste diese entsprechend vorbereitet werden.

Die Funktion einer Langendorff-Apparatur besteht darin, das vom Versuchstier entnommene und damit isoliert schlagende Herz perfundieren zu können. Das System besteht aus einer geschlossenen Kammer, die wiederum aus verschiedenen Einzelteilen aufgebaut ist: einem oberen Auffangbehälter, einem Glaskolben mit Regulator und einem unteren Auffangbehälter (s. Abb. 9).

Der obere Auffangbehälter, der über einen Anschluss von Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) verfügt, wird durch den Glaskolben nach unten verlängert. Am Ende dieses Glaskolbens wird das Herz an der Aortenwurzel befestigt.

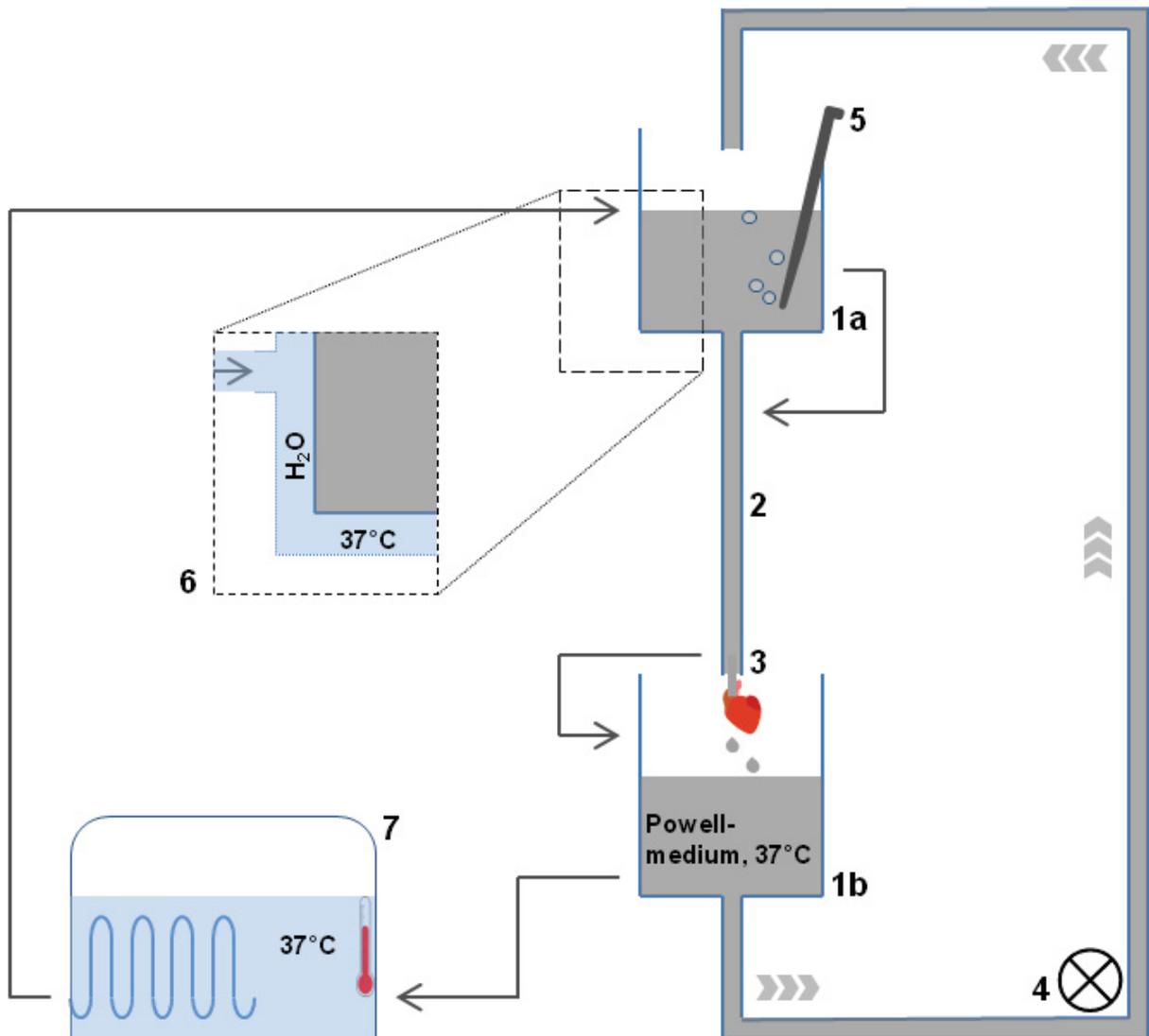
Der Regulator, ein Drei-Wege-Hahn, ist dem Glaskolben zwischengeschaltet, erlaubt die Einstellung der Flussrate und dient zur Entlüftung des Mediums. Unter dem Glaskolben befindet sich der zweite Auffangbehälter, so kann das im System zirkulierende Medium aufgefangen werden und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zurück in den ersten Auffangbehälter fließen. An diesem Punkt kann die geschlossene Apparatur geöffnet werden, indem das passende Auffangreservoir entfernt und durch einen Behälter ersetzt wird, der nicht mit dem ersten verbunden ist.

Um die Perfusionstemperatur auf Körpertemperatur halten zu können, sind beide Auffangbehälter und der Glaskolben mit einer doppelten Wand ausgestattet, die zwei

getrennte Räume bilden. Im Äußeren kann somit, getrennt vom Perfusionsmedium im Inneren, Wasser zirkulieren, das aus einem 37 °C warmen Wasserbad gespeist wird. Die Konstanthaltung der Temperatur wird durch ein digitales Steuersystem garantiert, welches die Ist- mit der Solltemperatur vergleicht und reguliert.

Um die optimale Perfusion des isolierten Herzens gewährleisten zu können, wurden vor Versuchsbeginn ca. 200 ml steriles Powell-Medium hergestellt. Mit Hilfe einer Glasfritte wurde das Medium mit Carbogen begast und nach Verschluss mit Parafilm im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Apparatur wurde mit 100 ml *Aqua dest.* gespült, dieses wurde verworfen und ein weiterer Waschschrift mit 20 ml Perfusionsmedium vorgenommen, das nach 5-minütiger Zirkulation ebenfalls verworfen wurde.

Im Anschluss wurden 80 ml des Powell-Mediums luftblasenfrei eingegeben, durch eine Pasteurpipette oxygeniert und die Herzpräparation vorgenommen.



**Abbildung 9: Langendorff-Apparatur**

Die Langendorff-Apparatur besteht aus zwei Auffangbehältern (1a+b), die durch einen Glaskolben (2) verbunden sind. Am Ende des Glaskolbens ist das Herz fixiert; ein Drei-Wege-Hahn (3) dient zur Flussregulierung und Entlüftung. Das Powell-Medium (graue Schattierung) wird durch eine Pumpe (4) in Flussrichtung transportiert und mit Carbogen (5) begast. Um die Temperatur des Mediums konstant auf 37 °C zu halten, sind die Behälter doppelwandig ausgestattet, in der äußeren Wand zirkuliert 37 °C warmes Wasser (H<sub>2</sub>O) (6, blaue Schattierung), das durch ein Wasserbad (7) erwärmt wird.

### 2.2.2.2 Herzpräparation und Kollagenaseperfusion

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 90 mg/kg KG Pentobarbital anästhesiert.

Im Anschluss wurde eine mediane Thorakotomie durchgeführt, das Herz zügig an der Aortenwurzel herausgetrennt und in 4–5 °C kalter 0,9%iger Kochsalzlösung geschwenkt, damit die metabolischen Prozesse verlangsamt und die Koronargefäße

und Herzhöhlen grob von verbliebenem Blut gereinigt werden konnten. Zusätzlich wurden eventuelle Lungen- und Fettreste mit der Schere entfernt. Schließlich wurde das Herz an der *Aorta ascendens* an der Perfusionsanlage zunächst mit einer Krokodilklemme befestigt. Dabei wurde beachtet, die Kanüle nicht zu tief einzuführen, um ein mögliches Durchbrechen der Aortenklappe zu vermeiden und damit die Perfusion der Herzkranzgefäße zu gewährleisten. Das Ventil wurde mit der Durchflussgeschwindigkeit von ca. 10 ml/Min. geöffnet, die primäre Befestigung durch die Krokodilklemme wurde währenddessen durch einen chirurgischen Faden ersetzt. Die weitere Spülung mit 35 ml Powell-Medium sorgte für ein gründliches Ausspülen von Blutresten aus den Koronargefäßen, das Medium-Blut-Gemisch wurde in einem Becherglas aufgefangen und verworfen. Zu den von den 80 ml verbliebenen 45 ml Medium wurden die 5 ml der vorbereiteten Kollagenaselösung hinzugefügt, womit sich ca. 50 ml kollagenasehaltiges Powell-Medium in der nun geschlossenen modifizierten Langendorff-Apparatur befanden und das Herz damit 25 Minuten durchspült wurde. Die offenen Auffangbehälter wurden mit Parafilm verschlossen.

Nach Ablauf der Perfusionszeit von 25 Minuten wurde der Fluss beendet und das Herz auf Vorhofebene abgetrennt, sodass die verbliebenen Ventrikel auf einer Petrischale halbiert werden konnten. Die weitere Zerkleinerung auf eine Schnittgröße von etwa 0,7 mm fand durch den Einsatz eines Gewebezerkleinerers statt, durch Drehung der Platte um 90° konnte die Schnittgröße weiter reduziert werden. Eventuell verbliebene Gewebsbrücken wurden manuell mittels Skalpell abgetrennt.

### **2.2.2.3 Nachverdau und Separierung der Kardiomyozyten**

Die durch das kollagenasehaltige Medium entstandene homogene, dickflüssige Suspension wurde einer zusätzlichen Phase unterzogen, dem Nachverdau. Dafür wurde die Suspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt, das zuvor mit 12 ml der kollagenasehaltigen, aus dem oberen Auffangbehälter kommenden Perfusionslösung gefüllt wurde. Während des 5-minütigen Nachverdaus wurde die Suspension einmal pro Minute mit einer 10-ml-Pipette vorsichtig auf- und abgesaugt. Die gesamte Zeit über wurde das Röhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Prozess der Separierung der Zellen intensiviert. Die Zellsuspension wurde hierfür in einen Büchnertrichter überführt. Dieser Trichter

besteht aus zwei Teilen, zwischen denen ein Nylonnetz mit der Maschenweite 200 µm gespannt wurde, um grobe, nichtzelluläre Verklumpungen herauszufiltern und entfernen zu können. Die gefilterte Suspension wurde in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen und bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 20 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die schwereren Kardiomyozyten wurden als Zellpellet weiter behandelt.

Nach Resuspension des Pellets mit 6 ml Powell-Medium und 12,5 µl CaCl<sub>2</sub> (0,2 mmol/l) folgte eine erneute Zentrifugation bei Raumtemperatur für zwei Minuten bei 20 g. Auf diese Weise wurden die Kardiomyozyten steigenden Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub> ausgesetzt. Nach erneuter Verwerfung des Überstands wurde das Pellet noch einmal in 6 ml Powell-Medium und 25 µl CaCl<sub>2</sub> (0,4 mmol/l) resuspendiert und auf zwei 12-ml-Röhrchen mit je 6 ml Perfusionsmedium und 60 µl CaCl<sub>2</sub> (1 mmol/l) verteilt. Zum Abschluss wurde die Suspension erneut für eine Minute mit 20 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

#### **2.2.2.4 Zellkultivierung**

Für die Kultivierung der Zellen wurden am Vortag der Zellisolierung Zellkulturplatten mit 2,5 ml Vorplattiermedium vorbereitet und im Inkubator bei 37 °C mit 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Das Pellet bestehend aus Kardiomyozyten, die durch Kollagenaseperfusion, Nachverdauphase und Zellseparierung gewonnen wurden, wurde mit Ausplattiermedium vermischt und 2,5 ml der Zellsuspension auf eine vorbereitete Platte gegeben. Um die Vitalität der Kardiomyozyten zu prüfen und sie ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl setzen zu können, wurden sie mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer *Improved*-Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet. Intakte Kardiomyozyten stellen sich als ungefärbte, längliche Zellen dar. Mit Hilfe dieser Eigenschaften gelang die Unterscheidung zu blaugefärbten, toten Zellen. Nach zweistündiger Inkubation der Zellkulturplatten fanden zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml Waschmedium statt, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Nach weiterer Inkubation mit 2,5 ml Ausplattiermedium standen die Kardiomyozyten für weiterführende *in vitro* Experimente bereit.

## **2.2.3 In vitro Versuche**

### **2.2.3.1 Versuchsprotokoll**

Die aus einem Herz isolierten Kardiomyozyten wurden auf bis zu zehn Zellkulturplatten ausplattiert. Die Behandlung der Kardiomyozyten erfolgte mit 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  Morphin für 10 Minuten, die Kontrollgruppe verblieb ohne weitere Behandlung. Pro Konzentration Morphin wurden zwei Doppelansätze durchgeführt und damit vier Platten behandelt. Die bearbeiteten Zellen zweier Zellplatten wurden nach dem Ernten zur Lowry-Proteinbestimmung gepoolt, pro Versuchsgruppe wurden sieben separate Versuche durchgeführt (n=7).

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch frisches Ausplattiermedium ersetzt. Im Anschluss wurde die entsprechende Menge Morphin gegeben und zur Verteilung die Platten vorsichtig hin- und herbewegt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das morphinhaltige Medium abgesaugt, mit 2 ml PBS gewaschen und wiederum entfernt. Zum Ernten der behandelten Herzmuskelzellen wurde erneut 1 ml PBS auf je eine Platte gegeben. Die mit einem Zellschaber gelöste Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 37500 g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand noch einmal verworfen. Dem Pellet wurde 40  $\mu\text{l}$  Lysepuffer hinzugefügt und nach vorsichtigem Durchmengen wurden die Proben 20 Minuten auf Eis gestellt. Darauf folgte die Zentrifugation bei 16000 g für 10 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde gewonnen und entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt für die Proteinbestimmung verwendet.

### **2.2.3.2 Western blot**

#### **Lowry-Proteinbestimmung**

Für die Bestimmung der Proteinmenge und Angleichung der einzelnen Proben für die nächsten Schritte wurde die Methode nach Lowry angewandt<sup>149</sup>.

Zur Quantifizierung der Proteine wurde eine Standardreihe erstellt, indem eine definierte Menge Rinderserumalbumin (BSA) mit *Aqua dest.* gemischt wurde (0–200  $\mu\text{g/ml}$  BSA). 5  $\mu\text{l}$  jeder Probe wurden zunächst mit 495  $\mu\text{l}$  *Aqua dest.* 1:100 verdünnt. Für die Proteinbestimmung wurde das Lowry-Reagenz frisch angesetzt. Davon wurden 500  $\mu\text{l}$  mit 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Probe bzw. der Eichreihe gut vermischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  des 1:1 mit

*Aqua dest.* verdünntem Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz wurde erneut gut gemischt und die Proben 30 Minuten inkubiert. Das Reagenz führt zum blauen Farbumschlag der Proben proportional der Proteinmenge, indem die Proteine mit der alkalischen Kupferlösung reagieren und damit der Protein-Kupfer-Komplex das Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz reduziert.

Jede Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung in einer 96-Well-Platte angelegt und die Extinktion bei 740 nm gemessen. Mit *Gen5-Software* wurde die jeweilige Proteinkonzentration durch den Vergleich mit der pipettierten Eichreihe berechnet.

Zur Bestimmung des einzufügenden Volumens der Probe in das Sammelgel wurde die Probe mit der geringsten Proteinkonzentration als Bezugswert für die anderen Proben ermittelt, damit exakt die gleiche Proteinkonzentration in jeder Tasche vorhanden ist.

## **Durchführung**

### **Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)***

Das Prinzip des *Western blots* besteht darin, spezifische Proteine durch eine Antikörperreaktion nachweisen zu können. Die hier gewählte Arbeitsweise entsprach der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli<sup>150</sup>. Der Vorteil dieser Methode beruht auf einer hohen Trennschärfe und einer guten Nachweisempfindlichkeit von Proteinen aufgrund von verschiedenen Pufferzusammensetzungen und der Diskontinuität zweier Gele: dem Sammel- und Trenngel.

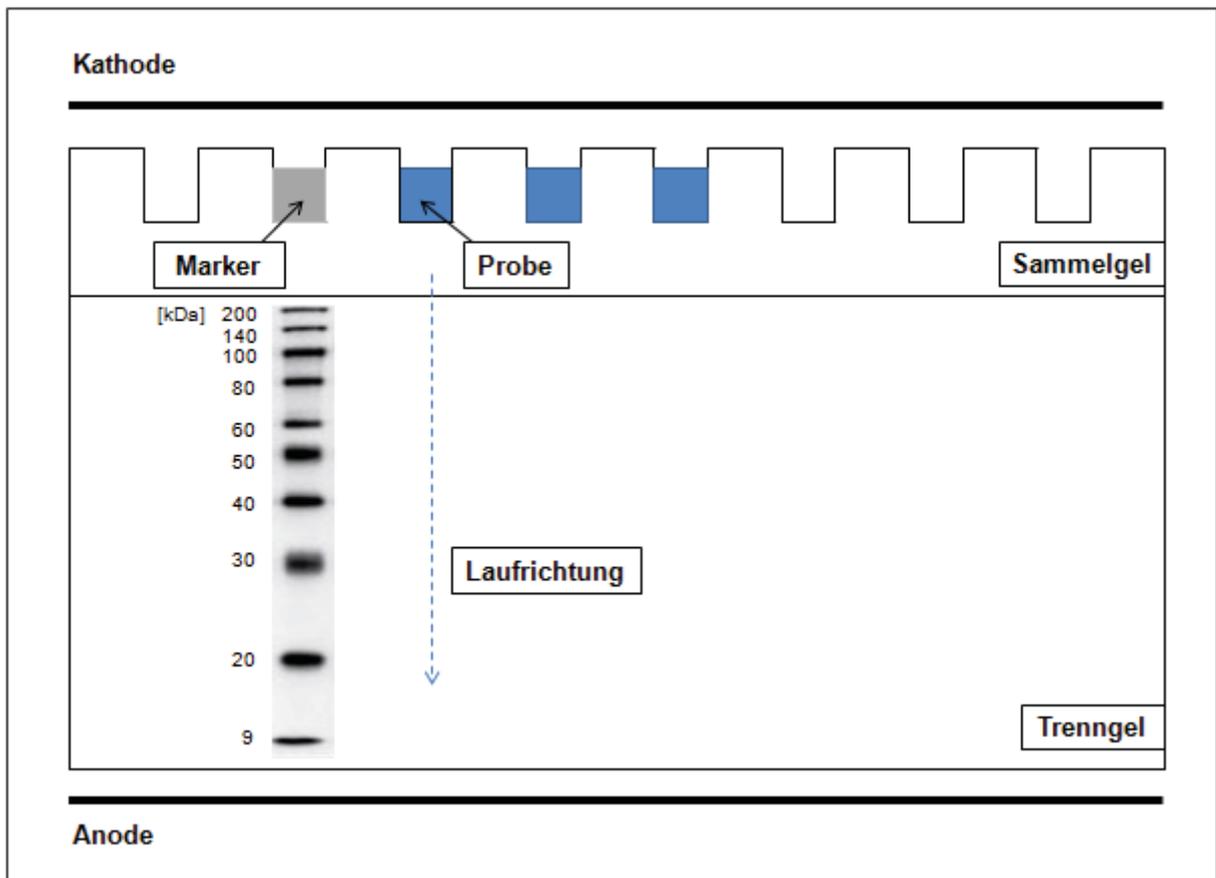
Für den Nachweis eines Proteins wird ein elektrisches Feld angelegt, um die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse zu separieren.

Anfänglich als Proteinoligomere vorliegend werden die Moleküle in Monomere aufgetrennt, indem die Disulfidbrücken durch 2-β-Mercaptoethanol gespalten werden. Weiter lagert sich SDS entlang der Aminosäureketten der Proteine an und bildet einen Komplex mit nach außen zeigenden, negativ geladenen Sulfatgruppen. Die Form der Proteine wird somit mehr oder weniger einheitlich, die Eigenladung vernachlässigbar und die Auftrennung erfolgt aufgrund der Molekülgröße. Je größer das Protein, desto langsamer wird das Trenngel durchwandert; folglich ist die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülmasse des Proteins.

Während das Sammelgel grobporig ist, verfügt das Trenngel über eine gewisse Siebfunktion und trägt zur Auftrennung nach Größe bei.

Für die elektrophoretische Auftrennung zur nachfolgenden Detektion von pPBL wurde ein 12%iges Trenngel verwendet, über das ein Sammelgel geschichtet wurde. Die Gele wurden 1,5 mm dick gegossen und hatten eine Lauflänge von 6 cm. Die Proteinproben wurden zu gleichen Mengen mit *Loading Buffer*, welchem vorher Mercaptoethanol im Verhältnis 1:10 hinzugegeben wurde, verdünnt und das Proben-Puffer-Gemisch für 30–45 Minuten auf 37 °C erwärmt.

Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, der einem Proteinstandardgemisch entspricht. In jede Tasche wurde dieselbe Menge an Protein geladen (s. Abb. 10). Nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit *Running Buffer* wurde die Kammer verschlossen und ein elektrisches Feld bei 100 V angelegt, das ca. 85 Minuten aufrechterhalten wurde. Sobald das Bromphenolblau des *Loading Buffer* das Gel bis nach unten durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese beendet, das Gel zwischen den Platten entfernt und auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran geblottet.



**Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Gelelektrophorese**

Abbildung des Größenmarkers, übernommen aus dem *Data Sheet* des verwendeten Proteinmarkers (s. Kapitel 2.1.4).

kDa: Kilodalton

### Elektrotransfer und Immunoblot

Die aufgetrennten Proteine werden mittels Elektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuerst wurde der Transferpuffer vorbereitet, der bei 4 °C für ca. eine Stunde gekühlt wurde. Anschließend wurden sechs Filterpapiere zugeschnitten und diese zusammen mit zwei Fasermatten mindestens fünf Minuten in den gekühlten Transferpuffer eingelegt. Die auf Gelgröße zugeschnittene Membran wurde vor ihrer Verwendung fünf Minuten in Methanol getränkt. Das Sammelgel wurde nach Abschluss der SDS-PAGE vom durchlaufenen Trenngel abgetrennt und verworfen. An der Kathode wurden eine Fasermatte und drei Filterpapiere platziert, darüber das Gel mit der vorbereiteten Membran gestapelt und wieder folgten Richtung Anode zunächst drei Filterpapiere und eine Fasermatte. Dabei wurde darauf geachtet, die verschiedenen Bestandteile luftblasenfrei übereinander zu stapeln. Die Halterung wurde geschlossen und die Transferkammer eingesetzt, diese wiederum in dem

Tank befestigt. Dazu wurden ein Kühlelement und ein Magnet-Rührstab gegeben und mit etwa 450 ml Transferpuffer aufgefüllt.

Der Elektrotransfer wurde ca. 60 Minuten bei einer Stromstärke von 190 mV durchgeführt.

Nach Ablauf dieser 60 Minuten wurde das Trenngel zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen mit *Coomassie-Staining*-Lösung bedeckt und eine halbe Stunde darin unter leichtem Schütteln eingelegt. Es folgte die Entfärbung unspezifischer Anfärbungen zunächst zwei Mal je 30 Minuten mit *Coomassie-Destaining*-Lösung und zusätzlich über Nacht mit Leitungswasser. Durch den Farbstoff spezifisch visualisierte Proteinbanden stellten sich blau dar. Sie entstehen durch die Komplexbildung des *Coomassie Blue* mit Aminosäuren der Proteine durch Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatischen Interaktionen.

Die geblottete Membran wurde parallel für den Immunoblot vorbereitet.

Für den Immunoblot wurde die Membran unter vorsichtigem Schütteln für zwei Stunden in einen Behälter mit 5 %iger Blocklösung bei Raumtemperatur gegeben, um die restlichen freien und unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen.

Der geblockte Blot wurde zuerst mit dem ersten Antikörper Anti-phospho-Phospholamban in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 %iger Blocklösung über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und danach dreimal für je zehn Minuten mit jeweils frischem Waschpuffer TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper *Rabbit polyclonal to Phospholamban*, der *horse-radish-peroxidase*(HRP)-gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet ist, wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml einer 1 %igen Blocklösung hinzugefügt. Zusätzlich wurde Anti-Biotin im Verhältnis 1:2000 benötigt, um die Detektion des Markers sicherzustellen. Nach zweistündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten mit TBS-T gewaschen.

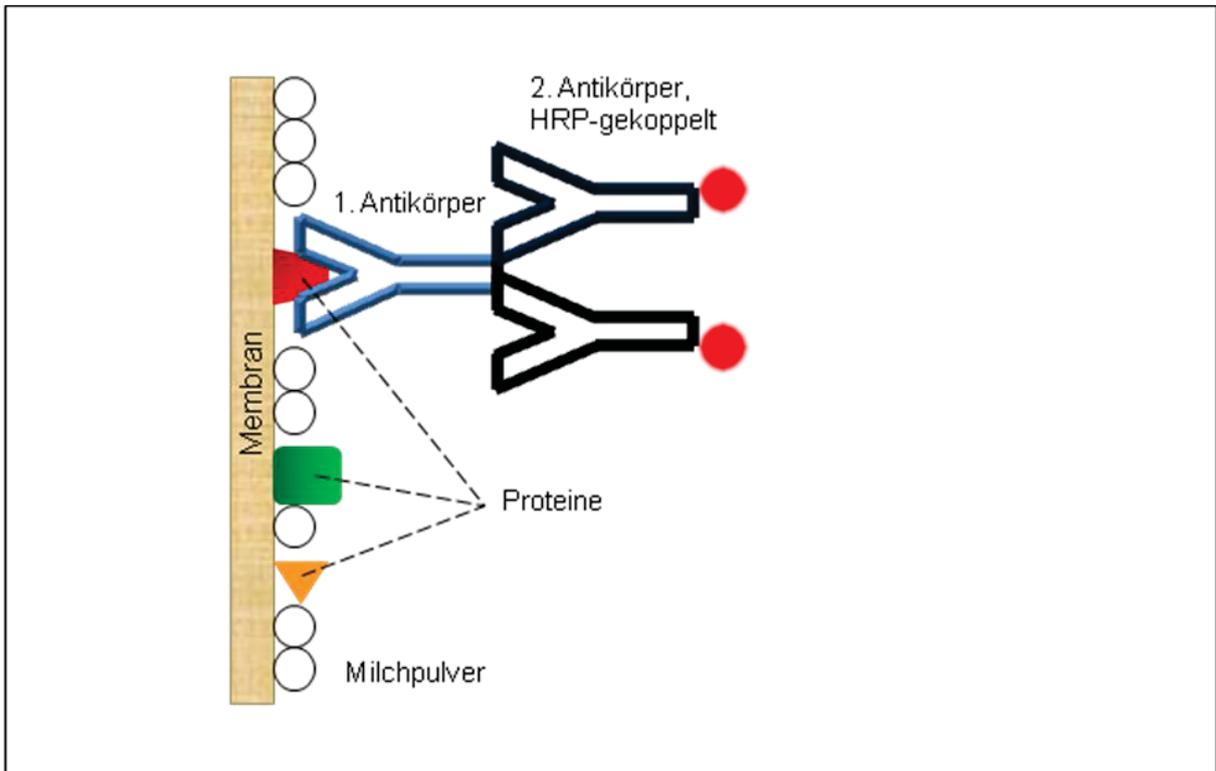
Um die Aktivierung von phosphoryliertem PBL zu untersuchen, wurde dieselbe Membran auf die Expression des Referenzproteins  $\beta$ -Actin (1:10000) und Gesamt-Phospholamban (tPBL, 1:1000) untersucht, um das Verhältnis zum aktivierten Protein vergleichen zu können.

### **Detektion und Auswertung**

Für die Detektion der Immunreaktion wurde die Membran mit ECL-Reagenz in Verbindung gebracht (s. Abb. 11). Die HRP katalysiert die Oxidation von Luminol,

wobei Licht der Wellenlänge 428 nm entsteht. Mit einem Kamerasystem wurde diese Reaktion visualisiert.

Durch Nutzung der *GelScan 6.0 Software* wurden die *Blots* quantifiziert.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips des Western blots**

Der erste Antikörper bindet an das zu untersuchende Protein. Der HRP-gekoppelte zweite Antikörper wird durch den ersten Antikörper gebunden und durch eine luminolinduzierte Reaktion visualisiert.

## 2.2.4 Statistische Auswertung

Für die Berechnung der Gruppengröße wurde das Programm GraphPad StatMate Version 1.01 genutzt. Diese zeigte sich mit  $n=6$  bei einer Güte von 80 % bei  $\alpha < 0,05$ . Die Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben, im Boxplot als Median mit 25. und 75. Perzentile. Die Statistiken der Hämodynamik wurden durch eine zweifache Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey-Test ausgewertet.

Die Infarktgrößen wurden durch eine einfache Varianzanalyse bestimmt, der ebenso ein Tukey-Test folgte.

Die statistische Analyse der *Western blot* wurde durch den Kruskal-Wallis H-Test ausgeführt, danach wurde der *post hoc* Test Student-Newman-Keuls angewandt.

Wenn  $p < 0,05$  wurde die Auswertung als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 *In vivo* Versuche

Für die *in vivo* Experimente wurden insgesamt 36 Tiere präpariert und einer regionalen Myokardischämie durch Okklusion der LAD unterzogen. Jeweils sechs Tiere wurden pro Gruppe entsprechend vor Ischämieinduktion vorbehandelt oder als Kontrollgruppe unbehandelt belassen. Insgesamt beliefen sich die Experimente auf sechs Gruppen: die Kontrolle (Con), die alleinige Anwendung von Morphin zur M-PC (M-PC), die M-PC verbunden mit der pharmakologischen PKA-Inhibition durch H-89 (H-89+M-PC), H-89 alleine (H-89), M-PC kombiniert mit dem pharmakologischen mPTP-Öffner Atr (Atr+M-PC) und die ausschließliche Anwendung von Atr (Atr).

Die Gesamtdauer der einzelnen Versuche betrug 180 Minuten (*Baseline* 20 Minuten, Applikation der einzelnen Substanzen 15 Minuten, Ischämie 25 Minuten, Reperfusion 120 Minuten).

#### 3.1.1 Hämodynamik

Die Daten aller Versuchsgruppen wurden während der *Baseline*, in der 15. Minute nach Beginn der Koronarokklusion und 30 bzw. 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion analysiert.

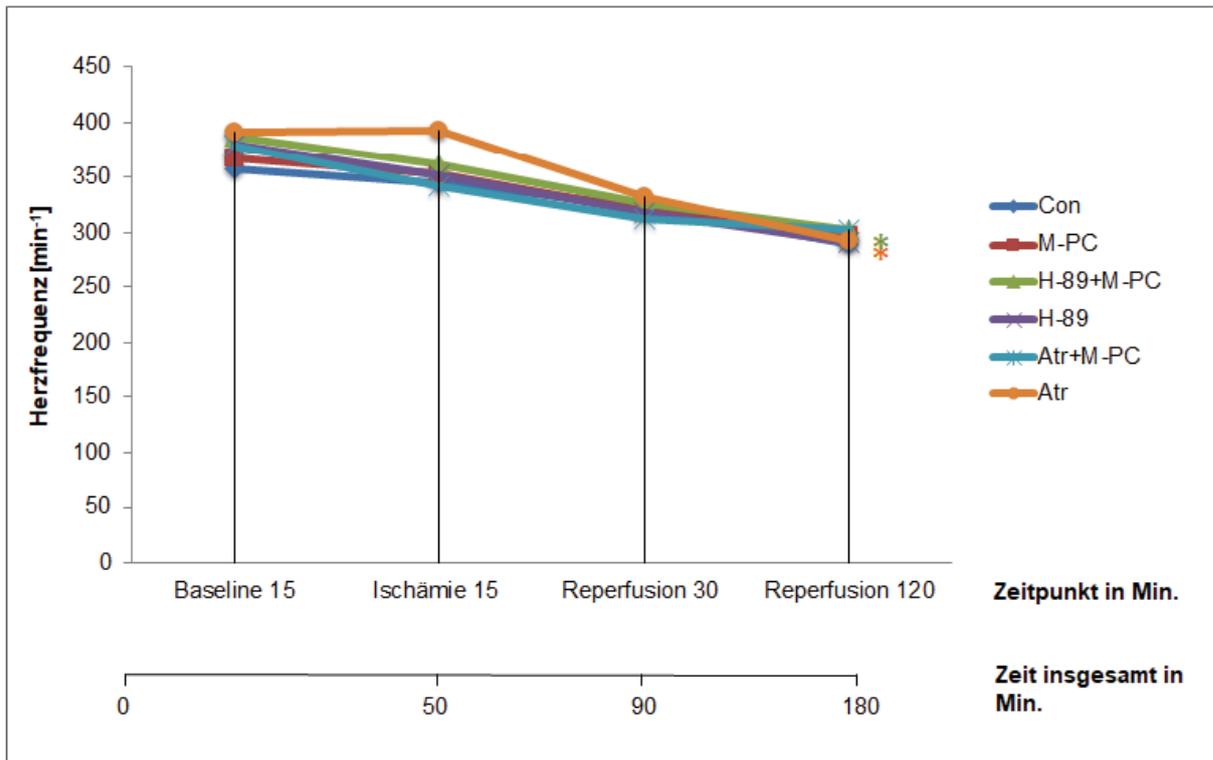
Die Aufzeichnungen der Herzfrequenz während der *in vivo* Experimente zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten während der *Baseline*, Ischämie und Reperfusion zum Zeitpunkt von 30 Minuten und 120 Minuten. Am Ende der Reperfusionszeit bei 120 Minuten war die Herzfrequenz signifikant geringer in der Gruppe mit Behandlung mit H-89+M-PC und Atr alleine im Vergleich zur *Baseline*.

Die Aufzeichnungen des arteriellen Mitteldrucks (*mean arterial pressure, MAP*) ergaben zwischen den Gruppen in der Phase der *Baseline*, Ischämie, Reperfusion bei 30 Minuten und 120 Minuten keine signifikanten Veränderungen. Hingegen zeigten die Analysen zum Zeitpunkt der 120-minütigen Reperfusion in der Gruppe Con und Atr alleine signifikant geringere Mitteldrücke bezogen auf die *Baseline*. Abbildung 12 und 13 bzw. Tabelle 1 und 2 zeigen den Zeitverlauf von *Baseline*, der 15. Minute nach Beginn der Koronarischämie und 30 bzw. 120 Minuten

nach Beginn der Reperfusion jeder einzelnen Gruppe und damit die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bezüglich der Herzfrequenz (Abb. 12 und Tabelle 1) und des MAP (Abb. 13 und Tabelle 2).

Die Körpertemperatur blieb bei allen Versuchstieren konstant bei 38 °C +/- 0,5 °C.

Die Daten sind entnommen aus Dorsch et al<sup>100</sup>.



**Abbildung 12: Hämodynamik: Herzfrequenz [min<sup>-1</sup>]**

Die Abbildung zeigt die Herzfrequenz der sechs verschiedenen Versuchsgruppen: die Kontrolle (Con), die alleinige Anwendung von Morphin zur morphininduzierten Präkonditionierung (M-PC), die M-PC verbunden mit PKA-Inhibition durch H-89 (H-89+M-PC), H-89 alleine (H-89), M-PC kombiniert mit mPTP-Öffner Atractyloside (Atr+M-PC) und die alleinige Anwendung von Atr (Atr) während des Experiments, n=6. Die Daten wurden während der *Baseline*, in der 15. Minute nach Beginn der Koronarokklusion und 30 bzw. 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion aufgezeichnet (vertikale, graue Linien).

Die Aufzeichnungen der Herzfrequenz zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten während der *Baseline*, Ischämie und Reperfusion zum Zeitpunkt von 30 Minuten und 120 Minuten. Am Ende der Reperusionszeit bei 120 Minuten war die Herzfrequenz signifikant geringer in der Gruppe mit Behandlung mit H-89+M-PC und Atr alleine im Vergleich zur *Baseline*.

Daten sind angegeben als Mittelwert, n=6, \*p<0,05 vs. *Baseline*, zur Erhaltung der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet (s.Tabelle 1).

[min<sup>-1</sup>]: pro Minute, Min.: Minute(n)

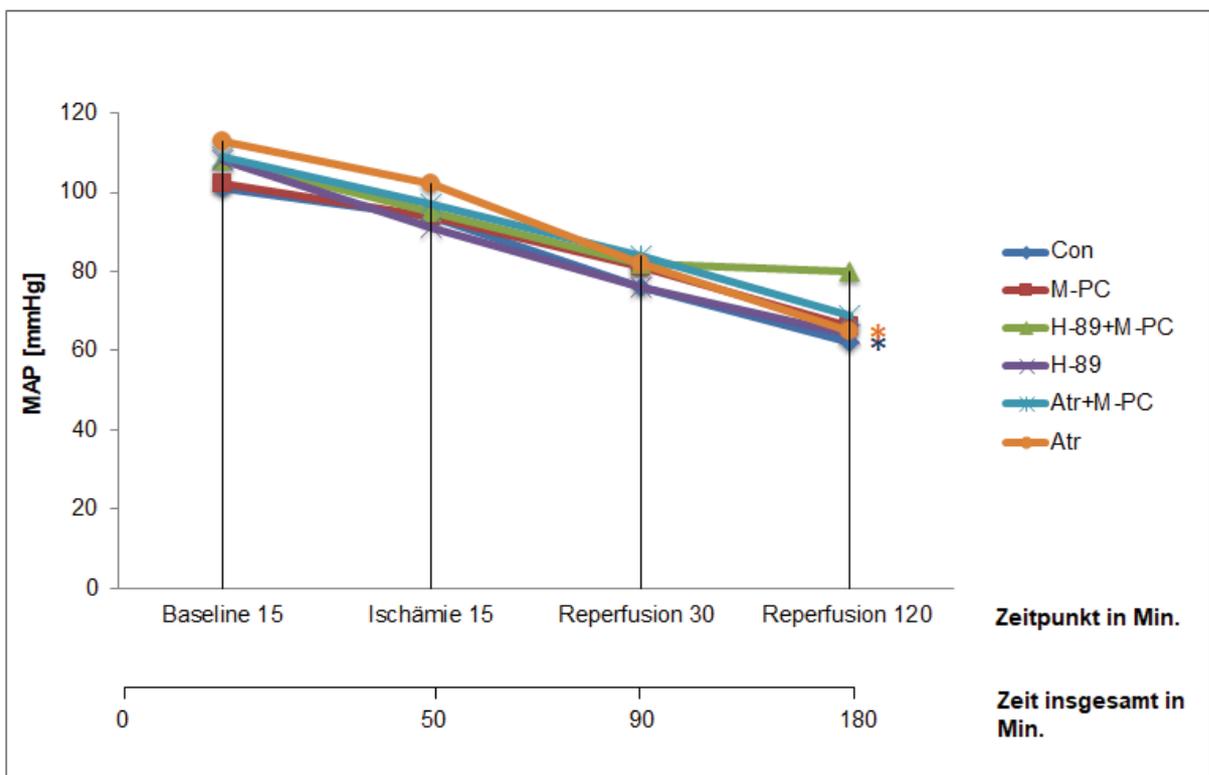
	<i>Baseline</i>	Ischämie	Reperfusion	
	15 Min.	15 Min.	30 Min.	120 Min.
Con	357 (32)	345 (22)	323 (47)	290 (46)
M-PC	367 (24)	353 (24)	319 (68)	297 (41)
H-89+M-PC	387 (27)	361 (29)	326 (52)	302 (73)*
H-89	380 (72)	352 (52)	318 (40)	292 (25)
Atr+M-PC	378 (86)	342 (62)	312 (41)	302 (32)
Atr	391 (36)	392 (26)	332 (25)	293 (23)*

**Tabelle 1: Hämodynamik – Herzfrequenz [min<sup>-1</sup>]**

Herzfrequenz im Verlauf des Experiments pro Minute, ausgedrückt in MW ( $\pm$  Standardabweichung), n=6 pro Gruppe. \*p< 0,05 vs. *Baseline*

Die Daten sind entnommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>

Atr: Atractyloside, Con: unbehandelte Kontrolle, H-89: Proteinkinase A Inhibitor, Min.: Minute(n), M-PC: morphininduzierte Präkonditionierung



**Abbildung 13: Hämodynamik: Mean arterial pressure (MAP) [mmHg]**

Die Abbildung zeigt den MAP der sechs verschiedenen Versuchsgruppen: die Kontrolle (Con), die alleinige Anwendung von Morphin zur morphininduzierten Präkonditionierung (M-PC), die M-PC plus PKA-Inhibition durch H-89 (H-89+M-PC), H-89 alleine (H-89), M-PC kombiniert mit mPTP-Öffner Atractyloside (Atr+M-PC) und die alleinige Anwendung von Atr (Atr) während des Experiments, n=6.

Die Daten wurden während der *Baseline*, in der 15. Minute nach Beginn der Koronarokklusion und 30 bzw. 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion aufgezeichnet (vertikale, graue Linien).

Der MAP wurde in der Aorta gemessen und zeigte zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt der *Baseline*, der Koronarischämie, 30 und 120 Minuten nach Reperfusion keine signifikanten Unterschiede. Zum Zeitpunkt der 120-minütigen Reperfusion zeigten die Analysen in der Gruppe Con und Atr alleine signifikante Unterschiede bezogen auf die *Baseline*.

Daten sind angegeben als Mittelwert, n=6, \*p<0,05 vs. *Baseline*, aufgrund der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet (s.Tabelle 2).

MAP: *mean arterial pressure*, Min.: Minute(n), mmHg: Millimeter Quecksilbersäule

	<i>Baseline</i>	Ischämie	Reperfusion	
	15 Min.	15 Min.	30 Min.	120 Min.
Con	101 (21)	94 (17)	76 (17)	62 (7)*
M-PC	102 (12)	94 (9)	81 (18)	66 (24)
H-89+M-PC	108 (18)	95 (25)	82 (31)	80 (43)
H-89	108 (39)	91 (39)	76 (25)	64 (7)
Atr+M-PC	109 (45)	97 (36)	84 (30)	69 (23)
Atr	113 (23)	102 (35)	82 (27)	65 (17)*

**Tabelle 2: Hämodynamik – Mean arterial pressure (MAP) [mmHg]**

Arterieller Mitteldruck im Verlauf des Experiments in mmHg, angegeben als MW ± Standardabweichung, n=6 pro Gruppe. \*p < 0,05 vs. *Baseline*

Die Daten sind entnommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>

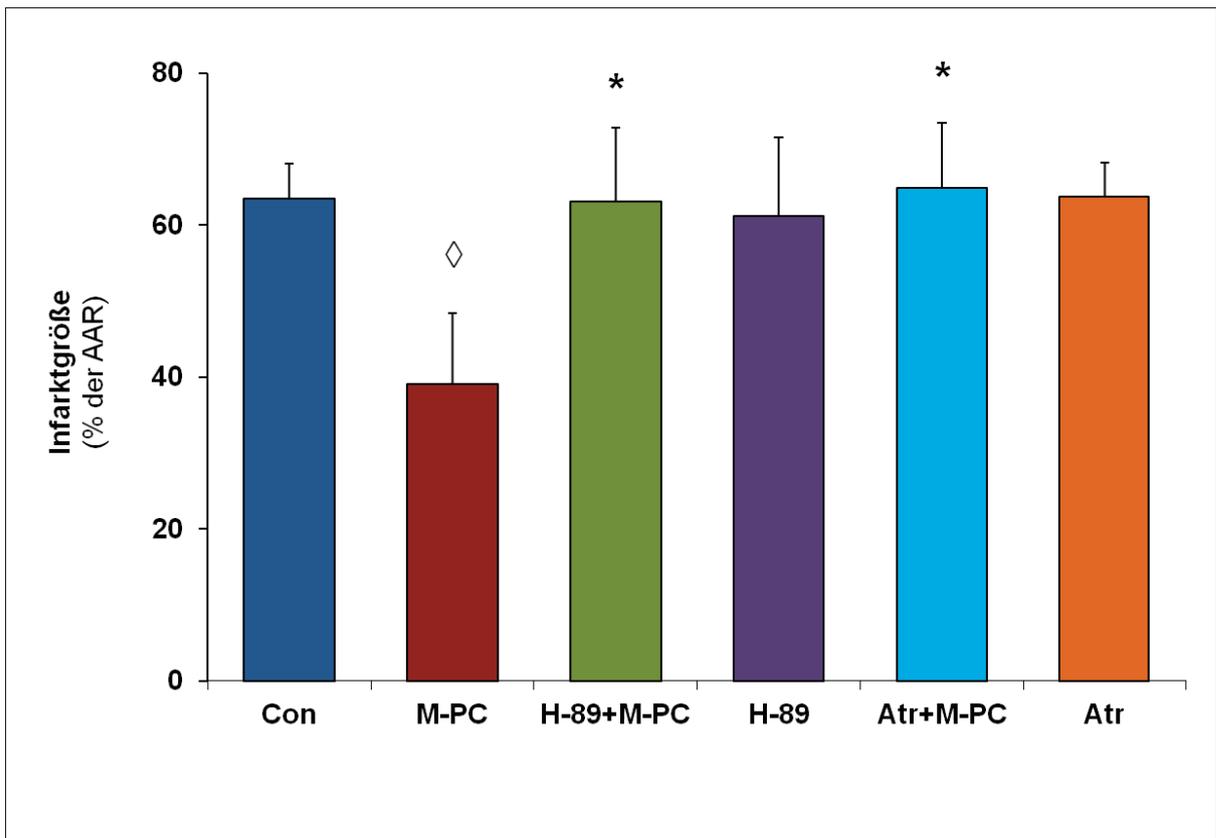
Atr: Atractyloside, Con: unbehandelte Kontrolle, H-89: Proteinkinase A Inhibitor, Min.: Minute(n), M-PC: morphininduzierte Präkonditionierung

### 3.1.2 Infarktgrößen

Mittels der *in vivo* Experimente wurde die Involvierung der PKA und der mPTP in die Signaltransduktion der M-PC untersucht. Dafür wurden die Tiere einer regionalen Myokardischämie unterzogen und die Infarktgröße bestimmt. Die Infarktgröße wurde dabei prozentual auf das gesamte Gebiet der AAR bezogen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 wiedergegeben. Die Kontrollgruppe wies eine Infarktgröße von 64 (5) % auf (Mittelwert (±Standardabweichung)). Im Vergleich hierzu reduzierte eine Vorbehandlung mit Morphin die Infarktgröße auf 39 (9) % (p<0,05 vs. Con). Die gleichzeitige Applikation des PKA-Inhibitors H-89 hob den

kardioprotektiven Effekt von Morphin auf. In dieser Gruppe betrug die Infarktgröße 63 (10) % ( $p < 0,05$  vs. M-PC). Die alleinige Anwendung von H-89 hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Infarktgröße (61 (10) %, nichtsignifikant (ns) vs. Con). Auch die Kombination von M-PC mit dem mPTP-Öffner Atr hob den protektiven Effekt von Morphin auf (65 (9) %,  $p < 0,05$  vs. M-PC). Das in der letzten Gruppe alleinig applizierte Atr veränderte die Infarktgröße nicht signifikant (64 (5) %, ns vs. Con). Die Daten sind entnommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>



**Abbildung 14: Auswertung der Infarktgrößen**

Die Abbildung zeigt ein Histogramm der ausgewerteten Infarktgrößen. Die Kontrollgruppe (Con) erbrachte eine Infarktgröße von 64 (5) %. Im Vergleich dazu reduzierte sich die Infarktgröße bei morphininduzierter Präkonditionierung (M-PC) auf 39 (9) % ( $\diamond p < 0,05$  vs. Con). Die Kombination des Proteinkinase A Inhibitors H-89 und M-PC hob den Effekt der M-PC auf (63 (10) %) ( $*p < 0,05$  vs. M-PC). Die Applikation von H-89 alleine wies keine Veränderung der Infarktgröße auf (61 (10) % ns vs. Con), M-PC und mPTP-Öffner Atractyloside (Atr) 65 (9) % hoben die protektive Wirkung der M-PC auf ( $*p < 0,05$  vs. M-PC), Atr alleine hatte keine Auswirkungen auf die Infarktgröße (64 (5) % ns vs. Con). Die Gruppengröße betrug jeweils  $n=6$ , die Infarktgröße ist als prozentualer Anteil der AAR angegeben. Infarktgrößen ausgedrückt in Prozent als MW ( $\pm$  Standardabweichung). Die Abbildung ist angelehnt an Dorsch et al.<sup>100</sup>

AAR: *area at risk*, MW: Mittelwert

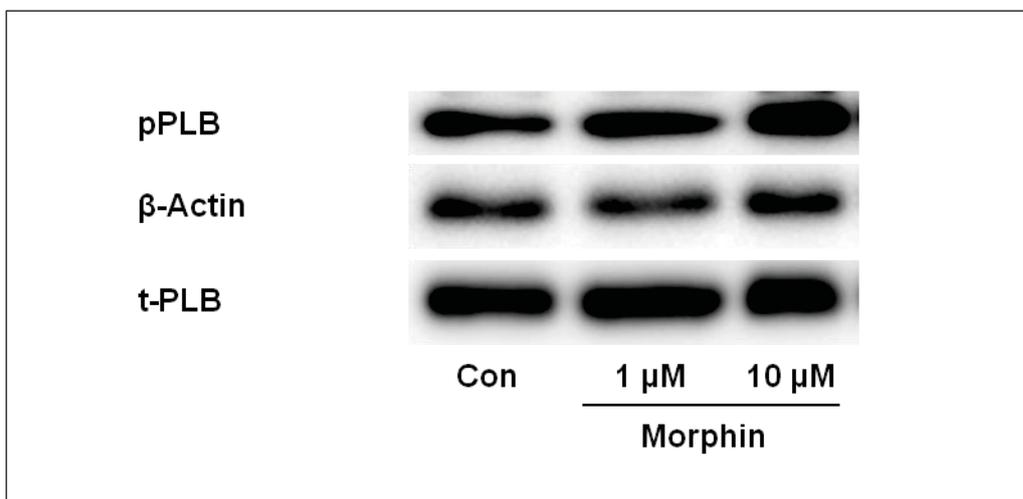
### 3.2 *In vitro* Versuche

Die Bedeutung der PKA am molekularen Mechanismus der M-PC wurde *in vitro* an isolierten Rattenkardiomyozyten in drei verschiedenen Gruppen untersucht, jeweils  $n=7$ . Die Kontrollgruppe wurde ohne weitere Behandlung belassen, die beiden anderen Gruppen wurden zehn Minuten lang mit 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Morphin behandelt.

In welchem Ausmaß Morphin die Aktivierung der PKA induziert, wurde als Verhältnis der Intensitäten der Banden des pPLB (s. Abb. 15, oberer *Western blot*) und des  $\beta$ -Actins (s. Abb. 15, mittlerer *Western blot*) bzw. des tPLB (Abb. 15, unterer *Western blot*) ausgedrückt.

Zur Visualisierung wurde die mittlere Lichtintensität der Kontrollgruppe gleich eins gesetzt und die Banden der anderen beiden Gruppen ins Verhältnis gebracht.

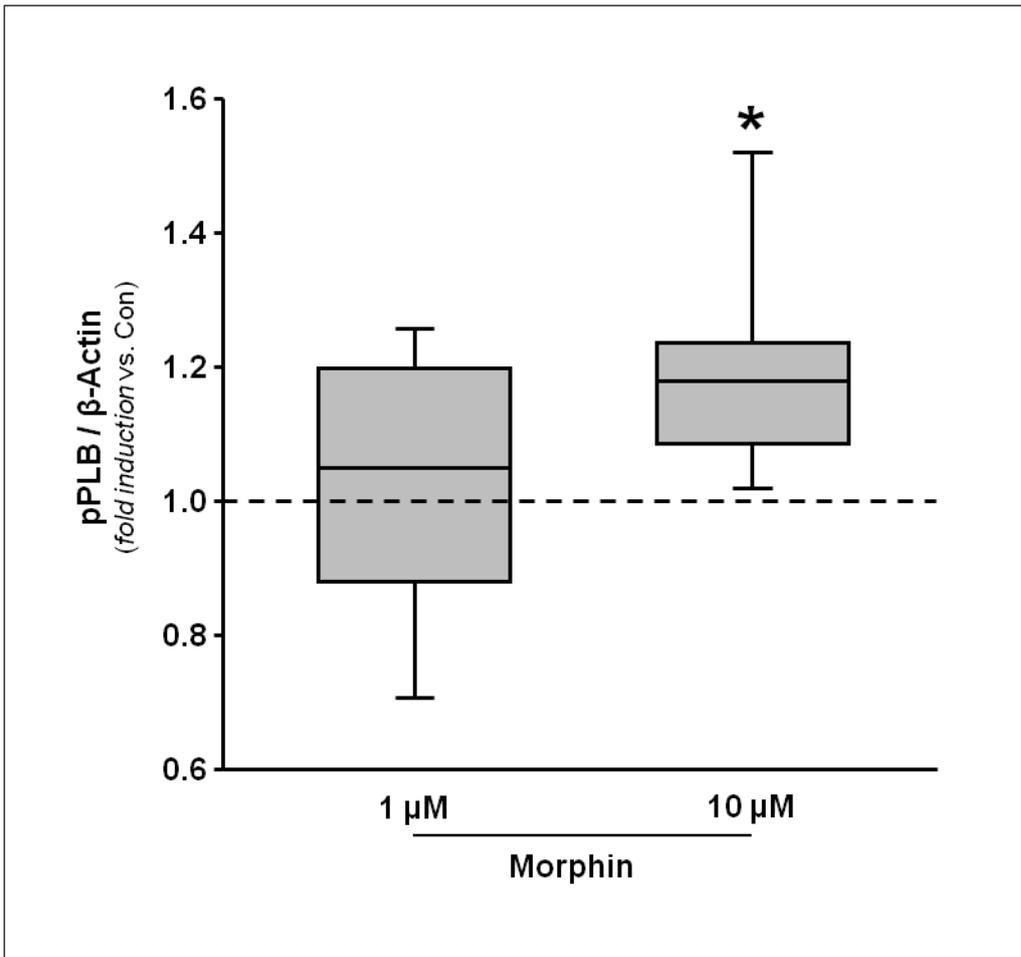
Nach 10-minütiger Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Morphin zeigte sich keine signifikante Veränderung im Phosphorylierungsstatus von Phospholamban verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Median 1,05; 25. Perzentile: 0,85; 75. Perzentile: 1,21) (s. Abb. 16). Das Ergebnis der 10-minütigen Inkubation der Kardiomyozyten mit 10  $\mu\text{M}$  Morphin zeigte eine signifikante Steigerung der PLB-Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Median 1,18; 25. Perzentile: 1,06; 75. Perzentile: 1,24;  $p<0,05$  vs. Con). Die Daten sind übernommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>



**Abbildung 15: Repräsentativer *Western blot***

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen *Western blot* der Kontrollgruppe und nach 10-minütiger Behandlung der Kardiomyozyten mit 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Morphin, übernommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>

Con: unbehandelte Kontrolle, pPLB: phosphoryliertes Phospholamban, tPLB: Gesamt-Phospholamban



**Abbildung 16: Western blot-Analyse**

Die Ergebnisse der *Western blot*-Analyse sind als *Boxplot* visualisiert. Dargestellt sind Median (horizontale Linie innerhalb des Kastens), 25. Quartil (untere horizontale Begrenzung) und 75. Quartil (obere horizontale Linie). Die *Whisker* erweitern auf ein 95 %-Konfidenzintervall.

Zunächst wurde dafür die mittlere Lichtintensität der Banden von phosphoryliertem PLB (pPLB) und  $\beta$ -Actin innerhalb einer Gruppe ins Verhältnis gebracht. Die Kontrolle (Con) wurde dann gleich eingesetzt und mit den zwei behandelten Gruppen verglichen. Die Analyse ergab eine nicht signifikante Erhöhung des pPLB für die 10-minütige Behandlung mit 1  $\mu$ M Morphin (Median 1,05; 25. Perzentile: 0,85; 75. Perzentile: 1,21 ns vs. Con). Das Ergebnis der 10-minütigen Inkubation der Kardiomyozyten mit 10  $\mu$ M Morphin zeigte eine signifikante Steigerung der PLB-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Median 1,18; 25. Perzentile: 1,06; 75. Perzentile: 1,24 \* $p$ <0,05 vs. Con.  $n$ =7).

Die Abbildung wurde übernommen aus Dorsch et al.<sup>100</sup>

Con: unbehandelte Kontrolle, pPLB: phosphoryliertes Phospholamban

## 4 Diskussion

Die IPC ist ein Phänomen, bei dem durch wiederholte Zyklen kurzer Ischämien eine erhöhte Toleranz der Zelle gegenüber einer späteren, länger anhaltenden Ischämie getriggert wird<sup>22</sup>. Dieser Schutzmechanismus kann mit verschiedenen Substanzen wie Adenosin, Bradykinin, Erythropoetin, Katecholaminen, volatilen Anästhetika und Opioiden nachgeahmt werden und wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet<sup>48,51,52</sup>.

Das Opioid Morphin wird klinisch vor allem als Analgetikum eingesetzt. Es stellt unter dem Mechanismus der M-PC aber auch eine vielversprechende prophylaktische bzw. therapeutische Strategie für Patienten dar, die einem erhöhten Risiko der Organischämie ausgesetzt werden (Organtransplantationen, PCI oder kardiovaskuläre Chirurgie) oder ausgesetzt worden sind (Myokardinfarkt, Schlaganfall). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus dieser Form der Kardioprotektion ist aber bis heute unzureichend geklärt.

Ziel der Arbeit war es, die Beteiligung der PKA und der mPTP am Signalmechanismus der M-PC zu erforschen.

Durch Hemmung der zu untersuchenden Proteine alleine und in einer kombinierten Anwendung der M-PC in einer weiteren Gruppe im *in vivo* Modell der Ratte konnte in der resultierenden Infarktgröße die Involvierung der PKA und der mPTP beobachtet werden: Die signifikante Reduktion der Infarktgröße durch M-PC wurde durch gleichzeitige Hemmung der genannten Proteine aufgehoben. Für die Inhibition der PKA wurde H-89, für die Hemmung der mPTP Atr eingesetzt. Dass eine Morphinbehandlung *in vitro* an kultivierten, zuvor isolierten Kardiomyozyten der Ratte die Phosphorylierungsrate des PLB erhöht und damit Rückschlüsse auf eine erhöhte Aktivität der PKA erlaubt, konnte mittels *Western blot* gezeigt werden.

Die beschriebenen Materialien und Methoden sowie die Ergebnisse der Arbeit werden im Folgenden kritisch betrachtet.

## 4.1 Diskussion der Methodik

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Myokardischämiemodell der männlichen Wistar-Ratte eingesetzt. Es ist mit anderen Spezies wie Mäusen, Hunden und Kaninchen ein weit verbreitetes Standardmodell zur *in vivo* Untersuchung von kardioprotektiven Strategien und wird seit vielen Jahren in unserer Klinik etabliert und erfolgreich angewendet<sup>151,152</sup>.

Im vorliegenden Modell der Kardioprotektion könnten sowohl Spezies als auch Alter und Geschlecht der Tiere eine Rolle spielen. Da weibliche Tiere abhängig vom endogen ablaufenden hormonellen Zyklus unterschiedlich sensitiv sowohl auf kardioprotektive als auch -schädigende Strategien reagieren<sup>153,154</sup>, wurden ausschließlich männliche Tiere für die Versuche eingesetzt.

Für die Wahl der Ischämiedauer ist die Reversibilität des Ischämieschadens relevant. Jennings et al. zeigten an Hundeherzen, dass eine Ischämiedauer von weniger als 15 Minuten einen reversiblen Schaden induziert, bei dem keine Myozyten zugrunde gehen. Eine Dauer von mehr als 60 Minuten führte jedoch zu einem komplett irreversiblen kardiomyozytären Schaden<sup>155</sup>. Bei Rattenherzen kann davon ausgegangen werden, dass die Irreversibilität schon früher eintritt, da das Herz im Vergleich zum Hund über weniger Kollateralen verfügt<sup>156</sup>. Zu beachten ist, dass insbesondere solche Zellen von potentiell kardioprotektiven Strategien einen Nutzen erzielen, die nach Ischämie noch vital sind, jedoch einen potentiellen Zelltod durch Reperfusionsschaden erleiden würden. Auf diesen Aspekten beruhend wurde in unseren Versuchen eine Ischämiedauer von 25 Minuten gewählt. Dadurch wurde außerdem eine hohe Überlebensrate der Tiere während der Versuche gewährleistet. Um das protektive Ausmaß der M-PC beurteilen zu können, wurde die Bestimmung der Infarktgröße mittels TTC herangezogen, die zu den etablierten Methoden zur *ex vivo* Ermittlung der kardialen AAR und des Ischämiegebiets zählt<sup>157–159</sup>.

Die resultierende Infarktgröße wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wovon einige im Folgenden diskutiert werden.

Für Morphin wird die Eigenschaft einer geringen venösen Vorlast- und arteriellen Nachlastsenkung durch Vasodilatation beschrieben<sup>63</sup>. Dadurch besteht ein günstigeres Verhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf zur Versorgung des Myokards. Die Sauerstoffausschöpfung wurde während der Experimente nicht bestimmt, folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass der gemessene

infarktreduzierende Effekt auch zum Teil auf diesem Mechanismus beruht. Der MAP war jedoch in den M-PC-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erniedrigt, sodass nicht anzunehmen ist, dass diese Eigenschaft zu wesentlichen Auswirkungen auf die Infarktgröße geführt hat. Fraglich ist auch, ob Pentobarbital als Einleitungnarkotikum Einfluss auf die Infarktgröße genommen hat. Der Stellenwert von Barbituraten in der pharmakologischen Präkonditionierung bleibt unklar. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche an Kaninchen von Haessler et. al zeigen, dass bei einer Dosierung von 30 mg/kg als intravenöser Bolus und nachfolgender Injektion von 30–50 mg/kg KG pro Stunde bei Tieren ohne präkonditionierenden Stimulus keine signifikante Reduktion der Infarktgröße stattfindet. Bei bei vorheriger IPC hingegen konnte eine höhere Infarktgrößenreduktion als bei Anwendung von Ketamin/Xylazin oder Isofluran verzeichnet werden<sup>160</sup>. Ob ebenfalls ein Infarktgrößen-limitierender Effekt in Kombination mit der M-PC besteht, bleibt offen. Aufgrund der Anwendung von Pentobarbital in allen Gruppen würde der mögliche Effekt die Gruppen mit M-PC bzw. Gruppen ohne M-PC in gleichem Ausmaß betreffen.

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Ausmaß des ischämischen Areal ist die myokardiale Temperatur<sup>161</sup>. Sie konnte nicht direkt gemessen werden, jedoch wurde über eine rektale Temperatursonde und eine gekoppelte Heizplatte eine Hyper- oder Hypothermie perioperativ vermieden. Die gemessenen Temperaturen waren während der Experimente konstant bei  $38,0 \pm 0,5$  °C, ein Einfluss auf die Größe der Ischämie ist daher unwahrscheinlich.

Zudem sind unsere Ergebnisse unter weiteren Aspekten der Material- und Methodenanwendung potentiell limitierend zu betrachten.

In unserer *in vivo* Studie wurde den Tieren Morphin als einmalige Applikation zehn Minuten vor Ischämieinduktion verabreicht. Ob der protektive Effekt bei diesem Applikationszeitpunkt am stärksten ausgeprägt ist, bleibt ungeklärt. Auch Okubo et al. wählten in einem *in vivo* Modell mit Kaninchenherzen den Applikationszeitpunkt von Morphin 15 Minuten vor Ischämieinduktion und erreichten damit eine signifikante Reduktion des Infarktgebiets ähnlichen Ausmaßes wie in unserer Studie<sup>75</sup>. Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass das Zeitfenster für die protektive Anwendung von Morphin sehr groß ist. Gross et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Applikation von Morphin sowohl vor Ischämieinduktion als auch vor Reperfusion

zur Infarktgrößenreduktion führte (morphininduzierte Postkonditionierung)<sup>98</sup>. Auch Obama et al. applizierten Ratten *in vivo* Morphin nach der Ischämiephase und erreichten eine Kardioprotektion mit signifikantem Größenausmaß<sup>162</sup>.

Es ist also davon auszugehen, dass die Wirksamkeit von Morphin bezüglich der M-PC nach Applikation innerhalb einer gewissen Zeitspanne wirksam ist und nicht einem gewissen Zeitpunkt unterliegt. Ähnlich zum SWOP der IPC konnten auch Fryer et al. eine Kardioprotektion an Rattenherzen mit dem  $\delta_1$ -Agonist TAN-67 zum Zeitpunkt von 24 und 48 Stunden auslösen. 12 und 72 Stunden nach Ischämiephase wurde keine signifikante Infarktgrößenreduktion festgestellt<sup>163</sup>.

Bisher ist unbekannt, ob die pharmakologische Präkonditionierung in Anlehnung an die Definition der IPC<sup>22</sup> ebenfalls mehrerer Zyklen kurzer Anwendungen mit Auswaschphasen bedarf oder ob diese entsprechend der Pharmakokinetik der Substanz auf eine einmalige Applikation reduziert werden kann. Die Eliminations-Halbwertszeit von Morphin beträgt 2–3 Stunden<sup>164</sup>, sodass von einer ausreichenden Wirksamkeit bereits bei einmaliger Anwendung auszugehen ist und die Substanz nicht mehrfach appliziert werden muss, um den protektiven Effekt der M-PC zu erreichen.

Auch über die Dosierung von Morphin sowohl bei *in vivo* als auch *in vitro* Anwendung existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. In dieser Studie verwendeten wir für die *in vivo* Untersuchung eine Dosierung von 0,3 mg/kg KG, Schultz et al. applizierten in einem *in vivo* Rattenmodell 0,1 mg/kg KG zur M-PC. Auch sie erreichten dadurch eine signifikante Reduktion der Infarktgröße<sup>69</sup>, die in einem höheren Anteil der Größenreduktion beruhte als in unserer Studie. Ursächlich kann hier auch die dreimalige Applikation mit jeweils zwischenliegenden Phasen ohne Medikamentenapplikation des Pharmakons gesehen werden als Anlehnung an die Definition der IPC. Eine *in vivo* Untersuchung an Rattenherzen durch Gross und Mitarbeiter wurde ebenfalls mit der Dosierung von 0,1 mg/kg durchgeführt und ergab bei Anwendung von 10 Minuten vor Ischämiesetzung eine signifikante und verglichen mit unseren Ergebnissen ähnliche Infarktgrößenreduktion<sup>98</sup>. Okubo et al. erreichten mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg an Kaninchenherzen eine prozentual höhere Infarktreduktion bei einer Ischämiezeit von 30 Minuten und einer dreistündigen Reperfusionphase<sup>75</sup>. Aufgrund der Untersuchungsdurchführung am Kaninchen ist ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich.

Wir entschieden uns auf diesen Daten basierend für eine Dosierung von 0,3 mg/kg Morphin.

Für die Morphindosierung *in vitro* infundierten Liang und Gross im Modell des isoliert perfundierten Herzens der Ratte 1  $\mu$ M Morphin in einer zweimaligen Applikation mit einer intermediären, fünfminütigen Auswaschphase<sup>72</sup>. Sie erreichten eine Infarktgrößenreduktion, die ein ähnliches Ausmaß zeigte wie unsere *in vivo* Ergebnisse. Die Reperfusionzeit lag dabei mit insgesamt einer Stunde kürzer als in unserem Protokoll. Ebenso wandten Kim und Mitarbeiter in einer Studie an isolierten Rattenherzen zur Untersuchung der morphininduzierten Postkonditionierung 1  $\mu$ M Morphin an. Das Versuchsprotokoll war mit 30 Minuten andauernder Ischämie und zwei Stunden bestehender Reperfusionzeit unserem *in vivo* Protokoll vergleichbar mit Ausnahme des Zeitpunkts der Morphinapplikation, die nach der Ischämiephase statt fand<sup>165</sup>. Unsere Arbeitsgruppe führte ebenfalls eine Untersuchung am isolierten Rattenherz zur morphininduzierten Postkonditionierung durch, in der 1  $\mu$ M Morphin eingesetzt wurde<sup>151</sup>.

Die hier gezeigten *in vitro* Versuche wurden an primären Rattenkardiomyozyten durchgeführt, sodass die Gegenüberstellung mit Studien an isolierten Tierherzen nur bedingt aussagekräftig ist. Das Ziel war dabei nicht, das Ausmaß der Kardioprotektion zu messen, sondern eine mögliche Beteiligung der PKA am Signaltransduktionsweg der M-PC zu untersuchen. Hierfür wurde auch in dieser Studie eine Dosierung von 1 und 10  $\mu$ M Morphin gewählt.

Auch die Kardiomyozytenisolierung an Rattenherzen stellt ein anerkanntes *in vitro* Modell dar. Die Durchführung wurde an das Protokoll von Schlüter und Piper<sup>148</sup> angelehnt und modifiziert. Zur Detektion von pPLB als Marker für die Aktivierung der PKA nach Morphinbehandlung der Kardiomyozyten diente der *Western blot* als standardisierte Methode zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen; z. B. deren Phosphorylierungsstatus mittels spezifischer Antikörper.

Primäre Kardiomyozyten weisen im Vergleich zu klonalen Zellreihen verschiedene Vorteile auf. In weiterführenden Untersuchungen von Hescheler et al. zur Zellreihe H9C2, welche ein Subklon der klonalen Zellreihe embryonalen Herzzattengewebes der Art BD1X darstellt, konnten mehrere wichtige Unterschiede gegenüber primären Kardiomyozyten erhoben werden<sup>166</sup>. Bezüglich der Morphologie wiesen H9C2-Zellen

große Unterschiede zu adulten Kardiomyozyten auf. Es konnten keine *gap junctions*, Caveolae, T-Tubuli oder Myofibrillen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Kimes und Brandt konnten hier aber keine multinukleären Zellen als zunehmende morphologische Annäherung an Myozyten der Skelettmuskulatur detektiert werden<sup>167</sup>. Bisher sind keine vergleichbaren, weiterführenden Studien zur besagten Zellreihe durchgeführt worden. Es kann also zur weiteren Entdifferenzierung gekommen sein.

Primär isolierte Kardiomyozyten weisen diese möglichen Nachteile nicht auf und sind somit für die Detektion verschiedener Proteine als Teil einer Signaltransduktion besser geeignet.

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der PKA am molekularen Mechanismus der M-PC wurde in der vorliegenden Untersuchung der pharmakologische Inhibitor H-89 verwendet, für dessen Einsatz möglicherweise ebenfalls Einschränkungen gelten. Weder die PKA-Aktivität noch der Öffnungszustand der mPTP wurde in unseren Untersuchungen direkt gemessen, daher hängt die Aussagekraft von der Selektivität der eingesetzten Substanzen ab.

Die Hemmung der PKA zur Ermittlung am Signaltransduktionsweg der M-PC wurde durch den selektiven PKA-Antagonist H-89 induziert. H-89 wirkt, indem es als kompetitiver Antagonist zur ATP-Bindungsstelle der katalytischen C-Untereinheit agiert und damit verhindert, dass die PKA ihre Zielproteine phosphoryliert<sup>168</sup>.

Verschiedene Studien konnten die Selektivität des PKA-Inhibitors nicht bestätigen und zeigten, dass durch H-89 außer der PKA auch andere Proteine gehemmt werden. Darunter fallen die *AMP-activated protein kinase*, *MAPK-activated protein kinase 2*, Akt, *Serum- and glucocorticoid-induced kinase*, *checkpoint kinase 1* sowie *Mitogen- and stress-activated protein kinase 1*, *Rho associated kinase II* und *p70 ribosomal protein S6 kinase*, welche in dieser Konzentration sogar einer stärkeren Inhibition als die PKA selbst unterlagen<sup>169,170</sup>. Bisher ist eine Beteiligung am Signalmechanismus der M-PC von Akt nur über die PKC ermittelt worden, sodass nach aktueller Studienlage ein Einsatz von H-89 im Zusammenhang mit unserer Fragestellung möglich ist.

Zusätzlich zeigte eine Studie von Hussain et al., dass H-89 die Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums durch Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase reduziert<sup>171</sup>.

Eine nennenswerte Interaktion von H-89 ist außerdem die potentielle Hemmung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren, die durch Penn und Mitarbeiter an menschlichen Zellen der Atemwege beschrieben wurde<sup>172</sup>. Der oben erwähnte *Cross-Talk*, der zwischen den Opioid- und Adrenorezeptoren stattfindet, könnte aus diesem Grund eingeschränkt funktionieren und bei ähnlicher Wirkung auf das kardiale Gewebe die Abschwächung der Kardioprotektion durch die initiale Hemmung der Weiterleitung des morphininduzierten Zellsignals zur Folge haben.

Bei weiterführenden Untersuchungen wäre die zusätzliche Inhibition der PKA mit Rp-cAMPS denkbar, eine Substanz, die kompetitiv zu cAMP wirkt und die PKA somit bereits vor Aktivierung hemmt. Alternativ könnte das *Protein Kinase Inhibitor Peptide 14-22 Amid* (PKI) verwendet werden, das ähnlich wie H-89 anstatt ATP an die C-Untereinheit der bereits aktiven PKA bindet und somit die Phosphorylierung von Zielproteinen verhindert<sup>170</sup>.

Die Beteiligung der PKA an der M-PC wurde in der vorliegenden Arbeit nicht ausschließlich *in vivo* durch Anwendung von H-89 untersucht. Zusätzlich konnte eine vermehrte Phosphorylierung des PLB an mit Morphin behandelten Kardiomyozyten mittels *Western blot* beobachtet werden. Dieser Effekt wurde auf die Aktivierung der PKA zurückgeführt. In diesem Fall lag auch keine mögliche Hemmung des *Cross-Talks* vor; *in vitro* erfolgte kein Zusatz von H-89, und wir beobachteten eine Erhöhung der PLB-Phosphorylierung nach Morphinstimulation der Kardiomyozyten.

Die PKA verfügt über die Fähigkeit, eine Phosphorylierung des PLBs als deren Zielprotein einzuleiten. Grundsätzlich besteht jedoch die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch die PKC, die PKG und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Der von uns eingesetzte Antikörper weist eine Phosphorylierung von PLB an der Aminosäure Ser16 nach. Die Phosphorylierungsstellen Thr17 und Ser10, die durch die CaMKII bzw. die PKC phosphoryliert werden, werden somit nicht erfasst. Lediglich die PKG setzt, wie die PKA, ebenfalls an Ser16 an<sup>173-175</sup>. Zum Ausschluss einer zusätzlichen Wirkung der PKG müsste der direkte Nachweis der aktivierten PKA erfolgen, eine Phosphorylierung durch die PKG kann in unseren Versuchen nicht ausgeschlossen werden. Durch die kombinierte Untersuchung der PKA am Signaltransduktionsweg der M-PC *in vivo* und *in vitro* liegen deutliche Hinweise einer Involvierung der PKA vor.

Für die Untersuchung der Beteiligung der mPTP an der M-PC wurde der pharmakologische mPTP-Öffner Atr verwendet. Die Wirkung beruht auf der Aktivierung der ANT, eines molekularen Bestandteils der mPTP. Gleichzeitig gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Atr zu Beeinträchtigungen des ADP-Transports führt. Auf diese Weise kann es zur Begrenzung der ATP-Produktion mit konsekutivem Energiedefizit kommen. Durch die verringerte Energieversorgung der Zelle ist es schwierig zu unterscheiden, auf welchem der zwei beschriebenen Mechanismen die Abschwächung der Kardioprotektion der Morphinbehandlung bei gleichzeitiger Applikation von Atr beruht.

Unter diesem Gesichtspunkt sollten weiterführende Untersuchungen den Öffnungszustand der mPTP im Zusammenhang mit der Morphinbehandlung überprüfen, damit weitere Aussagen getroffen werden können, ob die Abschwächung der Kardioprotektion bei kombiniertem Einsatz von Atr und Morphin auf die Öffnung der mPTP zurückzuführen ist oder - zusätzlich - auf einem Energiedefizit beruhen könnte<sup>176</sup>.

In einer Studie von Carpenedo und Mitarbeiter an Ratten wurde gezeigt, dass Atr in einer Dosierung von 50 mg/kg KG eine renal tubuläre Nekrose hervorruft, jedoch keine hepato- oder kardiotoxischen Schäden zu verzeichnen waren<sup>177</sup>. Atr in alleiniger Anwendung rief in unseren Versuchen mit einer Dosierung von 5 mg/kg KG keine erhöhte Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor, sodass eine direkt kardiotoxische Wirkung in der von uns verwendeten Dosierung nicht anzunehmen ist.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Gabe von Morphin vor Myokardischämie- und Reperfusionsphase reduzierte die Infarktgröße verglichen mit der Kontrollgruppe in unseren Untersuchungen signifikant. Morphin wirkt als Stimulus der myokardialen Präkonditionierung und stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zur M-PC überein<sup>69,178,179</sup>. Die Untersuchungen zur M-PC wurden bisher u. a. an Kaninchen<sup>75,180</sup> und Ratten<sup>69,142,179</sup> durchgeführt.

Die Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen brachten zwei weitere wesentliche Erkenntnisse hervor: Zum einen gaben sie Hinweise auf die Beteiligung der PKA am Mechanismus der M-PC, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die im geschlossenen Zustand kardioprotektiv wirkende mPTP Bestandteil der M-PC ist.

#### 4.2.1 Die Rolle der PKA in der M-PC

Ob die PKA im molekularen Mechanismus der IPC eine Rolle spielt, wurde zunächst kontrovers diskutiert. Da der Großteil der Studien diesbezüglich Hinweise für die Beteiligung der PKA gibt, ist davon auszugehen, dass sie ein Teil der zellulären Vermittlung der IPC ist<sup>115,117,181</sup>.

Inzwischen ist die Beteiligung der PKA auch an der Signalvermittlung der Isofluran-<sup>118</sup> und Desfluran-Präkonditionierung<sup>119</sup> ermittelt worden. Außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung an der Kardioprotektion durch das  $\beta_{1/2}$ -Rezeptormimetikum Isoproterenol<sup>182</sup> und das Antidiabetikum Sitagliptin<sup>183</sup>.

Zunächst wurden bezüglich des Effekts der PKA in der Kardioprotektion unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Makaula und Mitarbeiter stellten fest, dass die Hemmung der PKA durch H-89 zu einer Verbesserung der postischämischen Funktion des isolierten linken Ventrikels der Ratte und zur Reduktion der Infarktgröße führte. Die gleichzeitige Anwendung von H-89 und Forskolin, einem PKA-Aktivator, führte zwar auch zu einem kardioprotektiven Effekt, der jedoch geringer ausgeprägt war als nach Applikation von H-89 alleine<sup>184</sup>.

Die Arbeitsgruppe von Tong beobachtete bei Versuchen an isolierten Mäuseherzen vergleichbare Nekrosraten nach subletaler Ischämiesetzung in der Kontrollgruppe und der Gruppe, der H-89 appliziert wurde<sup>181</sup>. Diese Beobachtungen unterstützend zeigten Inserate et al., dass der linksventrikuläre Druck an isolierten Rattenherzen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollherzen aufwies, wenn sie mit dem PKA-Inhibitor H-89 infundiert wurden<sup>185</sup>.

In unseren Versuchen konnte bei alleiniger Applikation des PKA-Inhibitors H-89 keine signifikante Veränderung der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe erfasst werden. Es bestehen somit überwiegend Hinweise, dass H-89 selbst nicht zu einer Modifikation der kardialen Pumpfunktion führt und keinen Einfluss auf das Überleben der Kardiomyozyten nach Ischämie zeigt.

Grundsätzlich kann durch Opioide eine Aktivierung der PKA induziert werden<sup>186</sup>, ein Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels im Zusammenhang mit Morphin ist ebenfalls beobachtet worden<sup>120</sup>.

Die Arbeitsgruppe von Peart und Gross berichtete über widersprüchliche Ergebnisse. Sie untersuchten eine Beteiligung der PKA an der Präkonditionierung durch eine

akute und eine fünftägige chronische Morphinapplikation an Mäusen<sup>187</sup>. Dafür setzten sie zwei verschiedene PKA-Inhibitoren ein, zum einen H-89, der auch in unseren Versuchen appliziert wurde, und zum anderen PKI, der auch endogen vorkommt. Seine Wirkung beruht auf der Bindung an die freie C-Untereinheit, womit die Phosphorylierung der Zielproteine verhindert wird<sup>168</sup>.

Der Einfluss der PKA-Inhibitoren auf den kardioprotektiven Effekt von Morphin wurde durch Ermittlung des enddiastolischen Drucks und des *rate pressure products* bewertet. Für H-89 konnte sowohl für die chronisch als auch für die akut induzierte M-PC eine Aufhebung der Limitierung der postischämischen diastolischen Dysfunktion und der kontraktile Einschränkung gemessen werden, wohingegen PKI für eine solche Limitierung nur bei der chronischen M-PC sorgte. Diese Diskrepanz erklärten die Autoren durch die nicht selektive Wirkung von H-89 auf andere, unspezifische Kinasen außer der PKA. Sie schlussfolgerten, dass die PKA nur in der zellulären Vermittlung der chronischen M-PC eine Rolle spielt<sup>187</sup>.

Diese Studie unterscheidet sich in einigen Punkten von der vorliegenden Arbeit. Die Versuche unterlagen einer anderen Spezies und einem anderen Versuchsprotokoll, sie wurden *in vitro* an isolierten Mäuseherzen an einem Langendorff-Modell durchgeführt. Die Reperfusionzeit wurde im Versuchsprotokoll mit 45 Minuten deutlich kürzer als in unseren *in vivo* Experimenten gehalten. Einen weiteren Unterschied stellt die zusätzliche Applikation der Inhibitoren während der gesamten Reperfusionzeit dar - momentan ist die Wirkdauer von H-89 unbekannt. Darüber hinaus geben die hier eingesetzten Parameter des enddiastolischen Drucks und des *rate pressure products* zwar Hinweise auf die kardiale Funktion, aus ihnen kann aber nicht die resultierende Infarktgröße ermittelt werden. Diese ist dabei nur ein Faktor, der für die kardiale Funktion bedeutend ist. U. a. nehmen additiv der Koronarstatus der nicht okkludierten Gefäße, die diastolische und systolische Funktion des vitalen Myokards, die Lokalisation des Infarkts und neurohumorale Bedingungen Einfluss auf die ventrikuläre Funktion<sup>188</sup>.

Eine Beteiligung der PKA an der morphininduzierten Kardioprotektion wurde durch die Erhöhung der Phosphorylierung von PLB nach Morphinbehandlung an isolierten Kardiomyozyten unterstrichen; die Phosphorylierung findet durch die aktivierte PKA statt.

Dennoch wies die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Morphin keine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsstatus des PLB auf, eine Tendenz war jedoch messbar. Die Dosierung ist im Vergleich zu unseren *in vivo* Versuchen mit 0,3 mg/kg bereits *in vitro* mit 1  $\mu\text{M}$  höher. Nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Morphin konnte eine signifikante Phosphorylierung des PLB gezeigt werden. Eine Übertragung auf die *in vivo* Situation mit einer Äquivalenzdosierung ist nicht uneingeschränkt möglich und würde übertherapeutische Blutspiegel mit sich bringen<sup>100</sup>.

Der molekulare Mechanismus, der zur Aktivierung der PKA in der M-PC führt, wurde von uns nicht weiter untersucht. Grundlegend existieren verschiedene Wege, die zur Aktivierung der PKA führen können. Eine Möglichkeit besteht in der allosterischen Aktivierung durch cAMP. Der Abbau des *second messengers* kann durch die Hemmung der PDE, die Produktion durch die Hemmung der AC, begrenzt werden<sup>189</sup>.

#### **4.2.2 Die Rolle der mPTP in der M-PC**

Für die weitere Aufklärung des molekularen Mechanismus der M-PC untersuchten wir die Beteiligung der mPTP.

Die mPTP spielt in verschiedenen kardioprotektiven Strategien eine Schlüsselrolle. Möglicherweise dient sie als Endeffektor auf zellulärer Ebene zur Begrenzung eines myokardialen Reperfusionsschadens. Bisher wurde eine Beteiligung der mPTP bei der IPC<sup>141</sup> und IPoC<sup>126</sup> gezeigt.

Auch die pharmakologische Konditionierung durch verschiedene Anästhetika wie Isofluran<sup>190</sup>, Sevofluran und Propofol<sup>191</sup> beinhaltet in ihrem molekularen Mechanismus die mPTP. Die Schließung der unselektiven Pore wirkt protektiv und führt dazu, dass die Zelle nicht durch Nekrose oder Apoptose zugrunde geht.

Reguliert wird der Zustand der mPTP über verschiedene Faktoren. Der stärkste Öffner der mPTP ist ein hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in der mitochondrialen Matrix, dagegen wirken Cyclosporin A, ein niedriger pH-Wert mit einem hohen Protonengehalt und geringer oxidativer Stress protektiv.

Wir applizierten Atr sowohl alleine als auch in Kombination mit Morphin. Atr ist ein Ligand, der die Translokation von Adeninnukleotiden verhindert und damit zur Öffnung der mPTP führt, ähnlich wie es im Rahmen eines Ischämie- und

Reperfusionsschaden geschieht. Atr alleine ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe in unseren Versuchen keine signifikante Veränderung der Infarktgröße. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Atr nur als mPTP-Öffner wirkt, wenn die mPTP bereits vorher von einem kardioprotektiven Effekt mit Schließung der Pore erfasst worden ist<sup>141</sup>.

Husainy et al. zeigten, dass die schädliche Wirkung von Atr vom Zeitpunkt der Applikation abhängt. Die Anwendung vor und während der Ischämiephase resultierte in einer hohen myokardialen Schädigung, gemessen an der Freisetzung der Creatinkinase (CK) und der Apoptose- und Nekroserate. Interessanterweise wurde bei Applikation in den ersten zehn Minuten der Reperfusion die CK-Freisetzung und Zelltodrate signifikant erniedrigt. Die Experimente wurden am isolierten linken Ventrikel der Ratte durchgeführt, welcher zuvor in Scheiben geschnitten wurde und einem *in vitro* Modell der IPC mit nachfolgender 90-minütiger Ischämie- und 120-minütiger Reoxygenierungsphase unterlief. Eine mögliche Ursache sahen die Autoren in der transient kardioprotektiven Wirkung von ROS, die während der frühen Reperusionsphase gebildet werden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe unterstreichen, dass der Zustand, in dem sich die mPTP während der frühen Reperfusion befindet, für die Kardioprotektion entscheidend ist<sup>192</sup>.

Morphin kann den Zustand der mPTP verändern und betroffene Kardiomyozyten vor dem Zelltod bewahren; unsere Experimente zeigen eine Aufhebung der morphininduzierten Reduktion der Infarktgröße durch die kombinierte, intravenöse Anwendung von Morphin und dem mPTP-Öffner Atr.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Obame et al., die berichteten, dass die M-PC nach Ischämie-Reperfusion an isolierten Rattenmitochondrien die Sensitivität der mPTP gegenüber  $Ca^{2+}$  herabsetzen kann; für die Öffnung war mit einer Vorbehandlung mit Morphin eine höhere Konzentration von  $Ca^{2+}$  notwendig als in der Kontrollgruppe. Dies galt für die Gruppe, die einer Ischämie-Reperusionsphase unterzogen wurde. Die Untersuchung von Mitochondrien in Kardiomyozyten der Ratte, welche eine Anoxie- und Reoxygenierungsphase unterliefen, ergab eine verlängerte Zeit bis zur mPTP-Öffnung nach Morphinbehandlung<sup>162</sup>.

Xi et al. stellten an mit Morphin präkonditionierten Kardiomyozyten fest, dass die Zellen nach Induktion von oxidativem Stress ihr Membranpotential aufrechterhalten

konnten. Sie machten dafür die Inhibition der Öffnung der mPTP durch Morphin verantwortlich<sup>193</sup>.

Untersuchungen von Kim et al. an Rattenherzen zur morphininduzierten Postkonditionierung zeigten ebenfalls eine Beteiligung der mPTP<sup>165</sup>. Atr konnte bei isolierten Rattenherzen aber erst in einer Dosierung von 60  $\mu$ M zu einer Aufhebung der Kardioprotektion führen, niedrigere Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße. Dies lässt eine Dosisabhängigkeit für *in vitro* Versuche vermuten. Die Übertragbarkeit auf die bei uns in niedrigerer Konzentration durchgeführten *in vivo* Untersuchungen ist schwierig, Atr wurde in unseren Versuchen in einer Dosierung von 5 mg/kg KG ohne Dosis-Wirkungsstudie angewandt und führte zur Aufhebung der morphininduzierten Kardioprotektion.

Unbekannt ist weiterhin, wie die zelluläre Vermittlung der M-PC zum Endeffektor mPTP abläuft.

Neben den beschriebenen, an der M-PC beteiligten  $mK_{ATP}$ -Kanälen gaben Cao et al. Hinweise darauf, dass  $mK_{Ca}$ -Kanäle unabhängig davon zur Protektion im Rahmen der IPC führen<sup>194</sup>. Ähnlich des Mechanismus der  $mK_{ATP}$ -Kanäle geschieht dies durch einen Kaliumeinstrom<sup>195</sup>.

Auch Huhn und Mitarbeiter stellten eine Beteiligung der  $mK_{Ca}$ -Kanäle an der IPC und morphininduzierten Postkonditionierung fest. Am Rattenherz konnte die Aufhebung des Effekts beider protektiver Strategien *in vivo* nach Anwendung des  $mK_{Ca}$ -Inhibitors Paxillin beobachtet werden<sup>151</sup>.

Die Ergebnisse von Xu et al. zeigten, dass diese Kanäle bei ventrikulären Kardiomyozyten des Schweins an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und eine Aktivierung durch NS1619 die Infarktgröße verminderte<sup>195</sup>. Die Hypothese, dass  $mK_{Ca}$ -Kanäle im Molekularmechanismus der IPC als Zwischenschritt und nicht als Endeffektor fungieren, wird durch folgende Ergebnisse gestützt: Im isolierten Schweineherz führte die Hemmung der  $mK_{Ca}$ -Kanäle vor der Ischämiephase zur Verhinderung des protektiven Effekts, während eine Hemmung während Ischämie- oder Reperfusion keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte. Die gleichzeitige Aktivierung von  $mK_{Ca}$ -Kanälen durch NS1619 und Öffnung der mPTP durch Atr führte nicht zu einer Limitierung der Infarktgröße, umgekehrt wirkte die Hemmung der Kaliumkanäle mit Paxillin und die Schließung der mPTP mit Cyclosporin A protektiv<sup>196</sup>, womit folgende Signalkaskade zwischen  $mK_{Ca}$  und mPTP vermutet

werden konnte: Der  $mK_{Ca}$ -Kanal ist der mPTP vorgeschaltet und verhindert durch eine veränderte ROS-Produktion und durch Reduktion der  $Ca^{2+}$ -Überladung eine Öffnung der mitochondrialen Pore<sup>197</sup>.

Eine Verbindung zwischen PKA und mPTP konnte zudem durch die Arbeitsgruppe von Chanoit gezeigt werden. Sie induzierte die mPTP-Öffnung an kardialen H9C2-Zellen und erfasste Veränderungen des Membranpotentials. Durch die gleichzeitige Applikation des Phosphodiesterasehemmers 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und des PKA-Inhibitors H-89 konnte der Verlust nicht verhindert werden, wohingegen IBMX alleine zum Erhalt des Membranpotentials führte. Dies impliziert, dass eine aktive PKA die mPTP-Öffnung schützen kann<sup>198</sup>.

Zudem stellten Sato et al. eine Verbindung zwischen der PKA und dem  $mK_{Ca}$ -Kanal her, indem sie an ventrikulären Kardiomyozyten des Schweins mittels Flavoproteinfluoreszenz die  $mK_{Ca}$ -Aktivität maßen. Durch gleichzeitige Anwendung des PKA-Aktivators Forskolin und des  $mK_{Ca}$ -Öffners NS1619 wurde der kardioprotektive Effekt gesteigert<sup>144</sup>.

Auch Heinen und Mitarbeiter konnten an einem *in vivo* Rattenmodell zur IPC einen Zusammenhang der PKA-Aktivierung und geöffneten  $mK_{Ca}$ -Kanälen zeigen. Die gleichzeitige Anwendung des  $mK_{Ca}$ -Inhibitors Iberiotoxin und des PKA-Aktivators Forskolin führte zur Aufhebung der Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur alleinigen Applikation von Forskolin<sup>199</sup>.

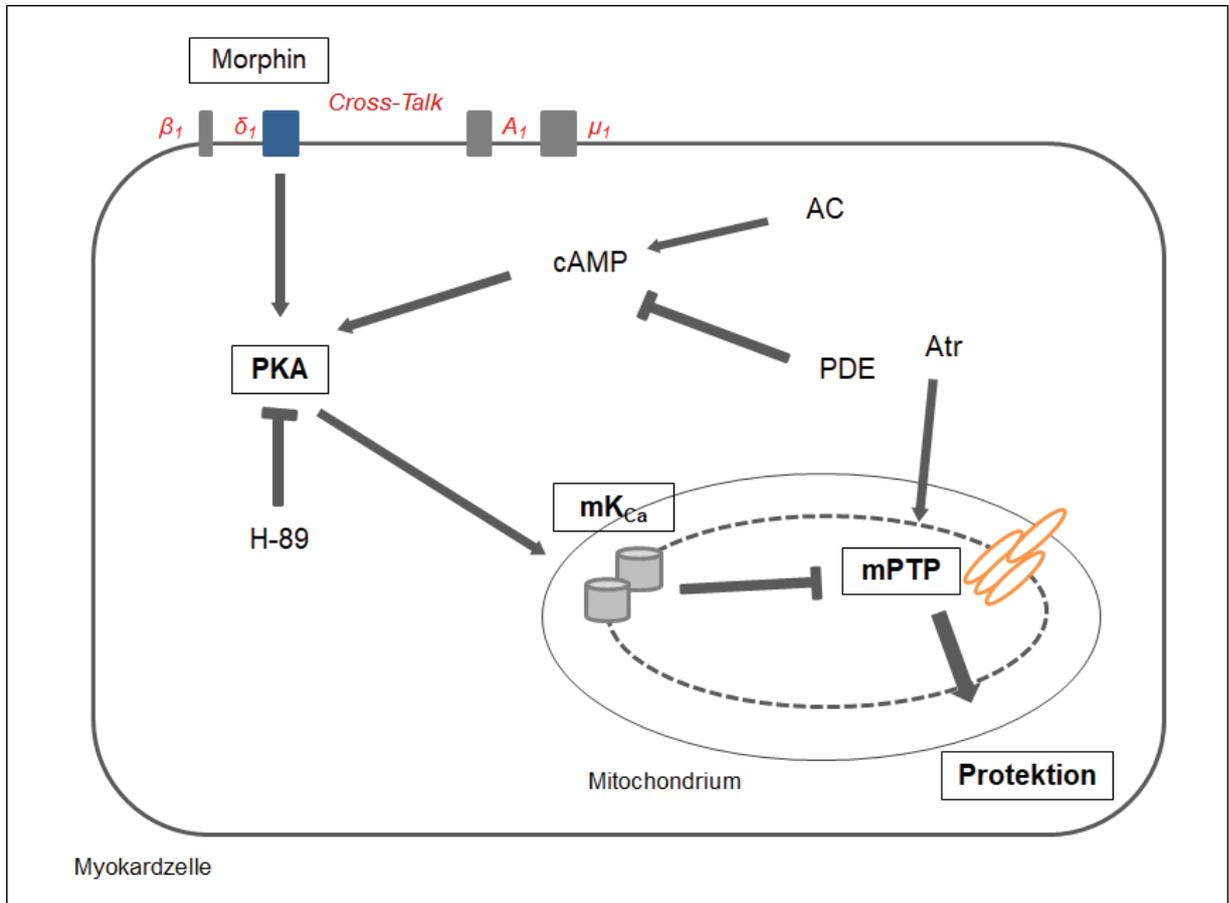
Für die Desfluran-Präkonditionierung ist eine Beteiligung des  $mK_{Ca}$ -Kanals bereits beschrieben, ihm vorgeschaltet ist die PKA<sup>119</sup>. Auch in glatter Muskulatur wurde die Aktivierung von  $mK_{Ca}$ -Kanälen durch die PKA durch einen noch unklaren Mechanismus dargestellt<sup>143</sup>.

Die Autoren Frässdorf und Mitarbeiter berichteten in ihrer Studie von der Beteiligung von  $mK_{Ca}$ -Kanälen in der pharmakologischen Präkonditionierung mit Morphin. Auch hier wurde der  $mK_{Ca}$ -Kanal-Inhibitor Paxillin vor Ischämiephase bei Morphin-präkonditionierten Ratten appliziert und hob die Infarktgrößenreduktion auf<sup>142</sup>.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die PKA, als auch die mPTP Bestandteil der zellulären Vermittlung in der M-PC sind.

Der Signaltransduktionsweg könnte also folgendermaßen aussehen: Morphin führt zu einer verstärkten Aktivierung der PKA, diese führt zur Öffnung der  $mK_{Ca}$ -Kanäle.

Durch den Kaliumstrom ins Mitochondrium wird die Öffnung der mPTP während der Ischämie- und Reperfusionphase verhindert (s. Abb. 17).



**Abbildung 17: Signaltransduktion der M-PC über die PKA**

➔ Aktivierung, —| Inhibierung

Dargestellt ist der mögliche Signaltransduktionsweg der M-PC über die PKA. Durch eine Aktivierung der PKA kommt es zum intrazellulären Kaliumstrom durch  $\text{mK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle, was eine Öffnung der mPTP verhindert und damit eine Protektion der Zelle einleitet.

$\text{A}_1$ :  $\text{A}_1$ -Adenosinrezeptor, AC: Adenylatcyclase, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat,  $\beta_1$ :  $\beta_1$ -Adrenorezeptor, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat,  $\delta_1$ : Opioidrezeptor  $\delta_1$ , H-89: Proteinkinase A Inhibitor,  $\mu_1$ : Opioidrezeptor  $\mu_1$ ,  $\text{mK}_{\text{Ca}}$ : mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kaliumkanal, mPTP: mitochondriale Permeabilitätspore, PDE: Phosphodiesterase, PKA: Proteinkinase A

### 4.3 Ausblick

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die PKA und die mPTP an der M-PC beteiligt sind. Zudem erweitern sie das Verständnis des molekularen Mechanismus dieser starken,

endogen und exogen auslösbaren Organprotektion, welches für die spätere gezielte therapeutische Anwendung notwendig ist.

Um den protektiven Effekt zu nutzen können Patienten, die gezielt einer Situation mit dem Risiko der Myokardischämie ausgesetzt sind, mit Morphin behandelt werden. Dies beinhaltet sowohl minimalinvasive Eingriffe wie die PCI als auch offene Herz-Thorax-chirurgische Operationen.

Nutzen lässt sich therapeutisch auch das Phänomen der morphininduzierten Postkonditionierung, das nach einem ischämischen Ereignis ebenso einen kardioprotektiven Effekt ausübt.

Weitergehende Studien sollten sich jedoch auf bisher nicht entschlüsselte Prozesse im molekularen Mechanismus fokussieren.

Ob der organprotektive Effekt der M-PC auch bei multimorbiden Patienten höheren Alters bestehen bleibt, bildet momentan einen Schwerpunkt weiterer Forschung.

Die Ergebnisse leiten sich von tierexperimentellen Versuchen ab, die Übertragung auf den Menschen ist daher nicht unmittelbar möglich. Dabei bestehen vor allem Schwierigkeiten in der Übertragung in Bezug auf das Alter, Komorbiditäten und damit auch Polypharmazie der Patienten. Die Versuche dieser Studie wurden an 10–12 Wochen alten, gesunden Ratten durchgeführt. Generell weisen die Tiere eine durchschnittliche Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren auf.

Sniecinski und Liu beobachteten, dass Ratten im Alter von 22–24 Monaten im Vergleich zu jüngeren nicht von einer sevofluraninduzierten Präkonditionierung profitierten. Dies wurde anhand der Messung der Infarktgröße ermittelt<sup>200</sup>. Weitere Hinweise auf Veränderungen im Alter lieferte eine klinische Studie von Lee et al., die Patienten nach einer PCI auf die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals untersuchten. Patienten über 65 Jahre wiesen eine signifikant verminderte Aktivität im Vergleich zu unter 55-Jährigen auf<sup>201</sup>.

Bezüglich der Rolle der PKA lieferten Huhn und Mitarbeiter Anhaltspunkte dafür, dass der protektive Effekt der Helium-Präkonditionierung bei 22–24 Monate alten Wistar-Ratten abgeschwächt wurde. Eine direkte Aktivierung der PKA mit Forskolin konnte bei diesen Tieren erst in höherer Konzentration zu einer Infarktgrößenreduktion führen, wobei jüngere Tiere bereits bei geringeren Konzentrationen profitierten<sup>202</sup>.

Ein Risikofaktor zur Ausbildung einer KHK ist die Diabetes-Erkrankung. Ob eine IPC auch an hyperglykämischen Ratten einen protektiven Effekt aufweist, wurde in mehreren Studien überprüft. Die Resultate zeigten eine Abschwächung der protektiven Wirkung der IPC am diabetischen Herzen<sup>203-205</sup>.

Auch die Applikation von Morphin führte in streptozotocininduzierten diabeteserkrankten Ratten nicht zur Entwicklung einer Kardioprotektion, wohingegen in nicht erkrankten Tieren eine signifikante Infarktgrößenreduktion erreicht werden konnte. Darüber berichteten die Autoren Gross und Mitarbeiter<sup>206</sup>.

Von Heinen et al. wurde festgestellt, dass es einen signifikanten Unterschied in der Auswirkung durch Forskolin auf 2-4 Monate junge und 22-24 Monate alte Ratten auf die Infarktgröße gab. Mit steigendem Alter konnte keine Kardioprotektion mehr durch Forskolin induziert werden. Die PKA-Aktivität sowie die cAMP-Konzentration waren jedoch vergleichbar in beiden Altersgruppen. Die Autoren schlossen, dass es weitere Zwischeneffektoren geben muss, die die Wirksamkeit des protektiven Mechanismus der IPC steuern<sup>199</sup>.

Somit sind weitergehende Untersuchungen notwendig, um den molekularen Mechanismus im Detail zu entschlüsseln und damit diejenigen Patienten zu identifizieren, welche von einer M-PC den größten Nutzen haben könnten. Hier besteht weiterhin die Möglichkeit, gezielt therapeutisch medikamentös einzugreifen. Eine sichere Aussage zur Übertragung auf den Menschen kann erst nach Durchführung weiterer Studien getroffen werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10, 2015. In [www.destatis.de](http://www.destatis.de) (Thematische Recherche: Zahlen & Fakten - Gesellschaft & Staat - Gesundheit - Todesursachen - Dokumentart: Tabelle). Abrufdatum: 28.07.2017.
2. Organisation mondiale de la santé. *Global status report on noncommunicable diseases 2014: attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility*. (World Health Organization, 2014).
3. Sabaté, S. *et al.* Incidence and predictors of major perioperative adverse cardiac and cerebrovascular events in non-cardiac surgery. *Br. J. Anaesth.* **107**, 879–890 (2011).
4. Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E. & Busch, M. A. Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **56**, 650–655 (2013).
5. Landesberg, G., Beattie, W. S., Mosseri, M., Jaffe, A. S. & Alpert, J. S. Perioperative Myocardial Infarction. *Circulation* **119**, 2936–2944 (2009).
6. White, H. D. & Chew, D. P. Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**, 570–584 (2008).
7. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **123**, 92–100 (2013).
8. Erdmann, E. *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*; S. 306. (Springer-Medizin-Verl., 2006).

9. Rahimtoola, S. H. The hibernating myocardium. *Am. Heart J.* **117**, 211–221 (1989).
10. Fröhlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur. Heart J.* **34**, 1714–1722 (2013).
11. Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1404–1407 (1987).
12. Lemasters, J. J. *et al.* The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* **76**, 99–114 (1996).
13. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* **307** ( Pt 1), 93–98 (1995).
14. Brown, D. A., Sabbah, H. N. & Shaikh, S. R. Mitochondrial inner membrane lipids and proteins as targets for decreasing cardiac ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Ther.* **140**, 258–266 (2013).
15. Heyndrickx, G. R., Millard, R. W., McRitchie, R. J., Maroko, P. R. & Vatner, S. F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* **56**, 978–985 (1975).
16. Talukder, M. A. H. *et al.* Cardiomyocyte-specific overexpression of an active form of Rac predisposes the heart to increased myocardial stunning and ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, H294-302 (2013).
17. Fichtner, K. & Dick, W. The causes of perioperative mortality. A trial of the German ‘CEPOD study.’ *Anaesthetist* **46**, 419–427 (1997).

18. Braz, L. G. *et al.* Mortality in anesthesia: a systematic review. *Clin. Sao Paulo Braz.* **64**, 999–1006 (2009).
19. Devereaux, P. J. *et al.* Perioperative cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review of the magnitude of the problem, the pathophysiology of the events and methods to estimate and communicate risk. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **173**, 627–634 (2005).
20. Javierre, C. *et al.* Age and sex differences in perioperative myocardial infarction after cardiac surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **15**, 28–32 (2012).
21. Kübler, W. & Haass, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. *Heart Br. Card. Soc.* **75**, 330–333 (1996).
22. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136 (1986).
23. Zhao, Z.-Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H579-588 (2003).
24. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A. & Whittaker, P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* **87**, 893–899 (1993).
25. Heusch, G. & Schulz, R. Remote preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 1279–1281 (2002).
26. Kharbanda, R. K. *et al.* Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* **106**, 2881–2883 (2002).

27. Heusch, G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* **381**, 166–175 (2013).
28. Alkhulaifi, A. M., Yellon, D. M. & Pugsley, W. B. Preconditioning the human heart during aorto-coronary bypass surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **8**, 270–276 (1994).
29. Jenkins, D. P. *et al.* Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart Br. Card. Soc.* **77**, 314–318 (1997).
30. Teoh, L. K. K., Grant, R., Hulf, J. A., Pugsley, W. B. & Yellon, D. M. A comparison between ischemic preconditioning, intermittent cross-clamp fibrillation and cold crystalloid cardioplegia for myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc. Surg. Lond. Engl.* **10**, 251–255 (2002).
31. Jebeli, M. *et al.* Evaluation of the effects of ischemic preconditioning with a short reperfusion phase on patients undergoing a coronary artery bypass graft. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **16**, 248–252 (2010).
32. Staat, P. *et al.* Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**, 2143–2148 (2005).
33. Laskey, W. K., Yoon, S., Calzada, N. & Ricciardi, M. J. Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **72**, 212–220 (2008).
34. Xue, F. *et al.* Postconditioning the human heart in percutaneous coronary intervention. *Clin. Cardiol.* **33**, 439–444 (2010).

35. Vegh, A., Komori, S., Szekeres, L. & Parratt, J. R. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc. Res.* **26**, 487–495 (1992).
36. Speechly-Dick, M. E., Grover, G. J. & Yellon, D. M. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ. Res.* **77**, 1030–1035 (1995).
37. Bonventre, J. V. Kidney ischemic preconditioning. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**, 43–48 (2002).
38. Alchera, E., Dal Ponte, C., Imarisio, C., Albano, E. & Carini, R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. *World J. Gastroenterol. WJG* **16**, 6058–6067 (2010).
39. Braun, S. *et al.* Pretreatment with helium does not attenuate liver injury after warm ischemia-reperfusion. *Shock Augusta Ga* **41**, 413–419 (2014).
40. Pajdo, R. *et al.* Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur. J. Pharmacol.* **427**, 263–276 (2001).
41. Soncul, H., Oz, E. & Kalaycioglu, S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest* **115**, 1672–1677 (1999).
42. Barone, F. C. *et al.* Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke J. Cereb. Circ.* **29**, 1937–1951 (1998).
43. Pang, C. Y. *et al.* Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc. Res.* **29**, 782–788 (1995).

44. Kuzuya, T. *et al.* Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ. Res.* **72**, 1293–1299 (1993).
45. Guo, Y. *et al.* Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am. J. Physiol.* **275**, H1375-1387 (1998).
46. Bolli, R. The late phase of preconditioning. *Circ. Res.* **87**, 972–983 (2000).
47. Downey, J. M., Davis, A. M. & Cohen, M. V. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail. Rev.* **12**, 181–188 (2007).
48. Piriou, V. *et al.* Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br. J. Anaesth.* **89**, 486–491 (2002).
49. Cason, B. A., Gamperl, A. K., Slocum, R. E. & Hickey, R. F. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* **87**, 1182–1190 (1997).
50. Redel, A. *et al.* Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **234**, 1186–1191 (2009).
51. Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, G. S., Heusch, G. & Downey, J. M. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ. Res.* **89**, 273–278 (2001).
52. Gross, E. R. & Gross, G. J. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* **70**, 212–221 (2006).
53. Weber, N. C. *et al.* The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 123–132 (2005).

54. Heinen, A. *et al.* Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) -sensitive potassium channel activation. *Anesthesiology* **109**, 830–836 (2008).
55. Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z. & Gross, G. J. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am. J. Physiol.* **268**, H2157-2161 (1995).
56. Jordan, B. A. & Devi, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**, 697–700 (1999).
57. Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R. & Devi, L. A. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 343–348 (2001).
58. Peart, J. N. & Gross, G. J. Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H81-89 (2003).
59. Gross, G. J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 709–718 (2003).
60. Aktories, K., Allgaier, C. & Forth, W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*; S. 219 ff. (Elsevier, Urban et Fischer, 2013).
61. Karow, T. & Lang-Roth, R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (2017), S. 584 ff. (Karow, 2016).
62. Huxtable, R. J. & Schwarz, S. K. The isolation of morphine--first principles in science and ethics. *Mol. Interv.* **1**, 189–191 (2001).

63. Aken, H. *Intensivmedizin: 393 Abbildungen, 495 Tabellen*; S. 975. (Georg Thieme Verlag, 2007).
64. Schubert, I., Ihle, P. & Sabatowski, R. Increase in opiate prescription in Germany between 2000 and 2010: a study based on insurance data. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **110**, 45–51 (2013).
65. Markiewicz, W., Finberg, J. P. & Lichtig, C. Morphine increases myocardial infarction size in rats. *Anesth. Analg.* **61**, 843–846 (1982).
66. Wang, Y., Wong, G. T. C., Man, K. & Irwin, M. G. Pretreatment with intrathecal or intravenous morphine attenuates hepatic ischaemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic rat liver. *Br. J. Anaesth.* **109**, 529–539 (2012).
67. Zhang, Y., Wu, Y. X., Hao, Y. B., Dun, Y. & Yang, S. P. Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. *Life Sci.* **68**, 1013–1019 (2001).
68. Habibey, R. *et al.* Nitric oxide and renal protection in morphine-dependent rats. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1109–1118 (2010).
69. Schultz, J. E., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ. Res.* **78**, 1100–1104 (1996).
70. Mayfield, K. P. & D'Alecy, L. G. Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 683–688 (1994).
71. Schultz, J. E., Hsu, A. K., Nagase, H. & Gross, G. J. TAN-67, a delta 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels. *Am. J. Physiol.* **274**, H909-914 (1998).
72. Liang, B. T. & Gross, G. J. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ. Res.* **84**, 1396–1400 (1999).

73. Ventura, C., Bastagli, L., Bernardi, P., Caldarera, C. M. & Guarnieri, C. Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim. Biophys. Acta* **987**, 69–74 (1989).
74. Zimlichman, R. *et al.* Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* **93**, 1020–1025 (1996).
75. Okubo, S. *et al.* Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1786-1791 (2004).
76. Peart, J. N. & Gross, G. J. Exogenous activation of delta- and kappa-opioid receptors affords cardioprotection in isolated murine heart. *Basic Res. Cardiol.* **99**, 29–37 (2004).
77. Peart, J. N. *et al.* Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res. Cardiol.* **103**, 454–463 (2008).
78. Wong, T. M., Lee, A. Y. & Tai, K. K. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart -an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **22**, 1167–1175 (1990).
79. Tomai, F. *et al.* Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**, 1863–1869 (1999).
80. Murphy, G. S., Szokol, J. W., Marymont, J. H., Avram, M. J. & Vender, J. S. Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **20**, 493–502 (2006).

81. Naruse, K. & King, G. L. Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ. Res.* **86**, 1104–1106 (2000).
82. Spitaler, M. & Cantrell, D. A. Protein kinase C and beyond. *Nat. Immunol.* **5**, 785–790 (2004).
83. Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M. & Manzoli, F. A. Nuclear protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 542–551 (2006).
84. Inagaki, K., Churchill, E. & Mochly-Rosen, D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc. Res.* **70**, 222–230 (2006).
85. Simkhovich, B. Z., Przyklenk, K. & Kloner, R. A. Role of protein kinase C in ischemic ‘conditioning’: from first evidence to current perspectives. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **18**, 525–532 (2013).
86. Fryer, R. M., Wang, Y., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1346-1353 (2001).
87. Juhaszova, M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* **113**, 1535–1549 (2004).
88. Tanaka, K., Kersten, J. R. & Riess, M. L. Opioid-induced cardioprotection. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5696–5705 (2014).
89. Schultz, J. E. & Gross, G. J. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol. Ther.* **89**, 123–137 (2001).
90. Peart, J. N., Gross, E. R. & Gross, G. J. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul. Pharmacol.* **42**, 211–218 (2005).

91. Cohen, M. V. *et al.* Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 842–851 (2007).
92. Andjelković, M. *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**, 31515–31524 (1997).
93. Zhang, H. Y. *et al.* Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 1012–1019 (2002).
94. Heusch, G., Boengler, K. & Schulz, R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* **118**, 1915–1919 (2008).
95. Dos Santos, P. *et al.* Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H284-295 (2002).
96. Pain, T. *et al.* Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* **87**, 460–466 (2000).
97. Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J. R. & Parker, P. J. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* **267**, 16878–16882 (1992).
98. Gross, E. R., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ. Res.* **94**, 960–966 (2004).
99. Gross, E. R., Hsu, A. K. & Gross, G. J. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H827-834 (2006).

100. Dorsch, M. *et al.* Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One* **11**, e0151025 (2016).
101. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763–3765 (1968).
102. Krebs, E. G. & Beavo, J. A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 923–959 (1979).
103. Skalhegg, B. S. & Tasken, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **5**, D678-693 (2000).
104. Fimia, G. M. & Sassone-Corsi, P. Cyclic AMP signalling. *J. Cell Sci.* **114**, 1971–1972 (2001).
105. Shabb, J. B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* **101**, 2381–2411 (2001).
106. Shemarova, I. V. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**, 23–42 (2009).
107. Wen, W., Taylor, S. S. & Meinkoth, J. L. The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 2041–2046 (1995).
108. Kritzer, M. D., Li, J., Dodge-Kafka, K. & Kapiloff, M. S. AKAPs: the architectural underpinnings of local cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 351–358 (2012).
109. Sassone-Corsi, P. The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).

110. Gao, T. *et al.* cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* **19**, 185–196 (1997).
111. Carling, D. & Hardie, D. G. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1012**, 81–86 (1989).
112. Miller, W. R. Regulatory subunits of PKA and breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **968**, 37–48 (2002).
113. Mantovani, G. *et al.* Different expression of protein kinase A (PKA) regulatory subunits in cortisol-secreting adrenocortical tumors: relationship with cell proliferation. *Exp. Cell Res.* **314**, 123–130 (2008).
114. Schmitt, J. P. *et al.* Alterations of phospholamban function can exhibit cardiotoxic effects independent of excessive sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibition. *Circulation* **119**, 436–444 (2009).
115. Lochner, A., Genade, S., Tromp, E., Podzuweit, T. & Moolman, J. A. Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation* **100**, 958–966 (1999).
116. Sanada, S. *et al.* Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* **104**, 705–710 (2001).
117. Sanada, S. *et al.* Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation* **110**, 51–57 (2004).
118. Tanaka, K. *et al.* Isoflurane activates sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle cells: a role for protein kinase A. *Anesthesiology* **106**, 984–991 (2007).

119. Redel, A. *et al.* Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth. Analg.* **106**, 384–391 (2008).
120. Muraki, T., Uzumaki, H. & Kato, R. Effect of morphine on the tissue cyclic AMP and cyclic GMP content in two strains of mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**, 490–492 (1984).
121. Crofts, A. R. & Chappell, J. B. Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. Reversal of Calcium ion-induced swelling. *Biochem. J.* **95**, 387–392 (1965).
122. Crompton, M., Costi, A. & Hayat, L. Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* **245**, 915–918 (1987).
123. Hunter, D. R. & Haworth, R. A. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 468–477 (1979).
124. Crompton, M. & Andreeva, L. On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* **88**, 513–523 (1993).
125. Javadov, S. A. *et al.* Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J. Physiol.* **549**, 513–524 (2003).
126. Argaud, L. *et al.* Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* **111**, 194–197 (2005).
127. Hausenloy, D. J., Maddock, H. L., Baxter, G. F. & Yellon, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc. Res.* **55**, 534–543 (2002).

128. Halestrap, A. P. & Davidson, A. M. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**, 153–160 (1990).
129. Woodfield, K., Rück, A., Brdiczka, D. & Halestrap, A. P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* **336**, 287–290 (1998).
130. Leung, A. W. C., Varanyuwatana, P. & Halestrap, A. P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.* **283**, 26312–26323 (2008).
131. Giorgio, V. *et al.* Cyclophilin D modulates mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 33982–33988 (2009).
132. Basso, E. *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* **280**, 18558–18561 (2005).
133. Kokoszka, J. E. *et al.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461–465 (2004).
134. Pebay-Peyroula, E. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39–44 (2003).
135. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkentin, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* **9**, 550–555 (2007).

136. Šileikytė, J. *et al.* Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J. Biol. Chem.* **289**, 13769–13781 (2014).
137. Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1535–1551 (2003).
138. Halestrap, A. P. & Richardson, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 129–141 (2015).
139. Sedlic, F. *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C506-515 (2010).
140. Halestrap, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 232–237 (2006).
141. Hausenloy, D. J., Maddock, H. L., Baxter, G. F. & Yellon, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc. Res.* **55**, 534–543 (2002).
142. Frässdorf, J. *et al.* Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* **57**, 767–773 (2010).
143. Schubert, R. & Nelson, M. T. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 505–512 (2001).
144. Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. & Nakaya, H. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* **111**, 198–203 (2005).

145. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academies Press (US), 1996).
146. Fishbein, M. C. *et al.* Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am. Heart J.* **101**, 593–600 (1981).
147. Kakimoto, Y. *et al.* The effectiveness and limitations of triphenyltetrazolium chloride to detect acute myocardial infarction at forensic autopsy. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **34**, 242–247 (2013).
148. Schlüter, K.-D., Piper, H. M., Dhein, S., Mohr, F. M. & Demlar, M. *Practical methods in cardiovascular research. Kapitel 5.1 S. 557 ff.* (Springer, 2005).
149. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
150. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
151. Huhn, R. *et al.* Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels. *Br. J. Anaesth.* **105**, 589–595 (2010).
152. Heinen, N. M. *et al.* Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock Augusta Ga* **36**, 45–53 (2011).
153. Wang, M., Baker, L., Tsai, B. M., Meldrum, K. K. & Meldrum, D. R. Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E321-326 (2005).

154. Wang, C. *et al.* Gender-specificity of delayed preconditioning by isoflurane in rabbits: potential role of endothelial nitric oxide synthase. *Anesth. Analg.* **103**, 274–280 (2006).
155. Jennings, R. B. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* **113**, 428–438 (2013).
156. Maxwell, M. P., Hearse, D. J. & Yellon, D. M. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **21**, 737–746 (1987).
157. Vanhaecke, J., Xhonneux, R. & Flameng, W. A comparison of two methods for estimating the area at risk in experimental myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **81**, 231–237 (1986).
158. Redfors, B., Shao, Y. & Omerovic, E. Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice. *Exp. Clin. Cardiol.* **17**, 268–272 (2012).
159. Vivaldi, M. T., Kloner, R. A. & Schoen, F. J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* **121**, 522–530 (1985).
160. Haessler, R. *et al.* Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **28**, 1574–1580 (1994).
161. Hale, S. L. & Kloner, R. A. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am. J. Physiol.* **273**, H220–227 (1997).
162. Obame, F. N. *et al.* Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-

- 1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 252–258 (2008).
163. Fryer, R. M., Hsu, A. K., Eells, J. T., Nagase, H. & Gross, G. J. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ. Res.* **84**, 846–851 (1999).
164. Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. *Pharmakologie und Toxikologie*; S. 264. (Springer Berlin Heidelberg, 2016).
165. Kim, J. H. *et al.* Morphine-induced postconditioning modulates mitochondrial permeability transition pore opening via delta-1 opioid receptors activation in isolated rat hearts. *Korean J. Anesthesiol.* **61**, 69–74 (2011).
166. Hescheler, J. *et al.* Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* **69**, 1476–1486 (1991).
167. Kimes, B. W. & Brandt, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* **98**, 367–381 (1976).
168. Murray, A. J. Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci Signal* **1(22)**, re4 (2008).
169. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95–105 (2000).
170. Lochner, A. & Moolman, J. A. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc. Drug Rev.* **24**, 261–274 (2006).
171. Hussain, M., Drago, G. A., Bhogal, M., Colyer, J. & Orchard, C. H. Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca<sup>2+</sup> regulation in isolated ferret ventricular myocytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **437**, 529–537 (1999).

172. Penn, R. B., Parent, J. L., Pronin, A. N., Panettieri, R. A. & Benovic, J. L. Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89 reveals limitations of usefulness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 428–437 (1999).
173. Drago, G. A. & Colyer, J. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J. Biol. Chem.* **269**, 25073–25077 (1994).
174. Mattiazzi, A., Mundiña-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L. & Kranias, E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc. Res.* **68**, 366–375 (2005).
175. Movsesian, M. A., Nishikawa, M. & Adelstein, R. S. Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J. Biol. Chem.* **259**, 8029–8032 (1984).
176. Patel, H. H., Tsutsumi, Y. M. & Roth, D. M. Mito-controversies: mitochondrial permeability transition pore and myocardial reperfusion injury. *Anesthesiology* **108**, 182–184 (2008).
177. Carpenedo, F., Luciani, S., Scaravilli, F., Palatini, P. & Santi, R. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Arch. Toxicol.* **32**, 169–180 (1974).
178. Shi, E. *et al.* Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion. *Chin. Med. J. (Engl.)* **116**, 1059–1062 (2003).
179. Li, L., Zhang, H., Li, T. & Zhang, B. Involvement of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in Morphine-induced Cardioprotection. *J. Surg. Res.* **169**, 179–187 (2011).

180. Miki, T., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol. Cell. Biochem.* **186**, 3–12 (1998).
181. Tong, H., Bernstein, D., Murphy, E. & Steenbergen, C. The role of beta-adrenergic receptor signaling in cardioprotection. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 983–985 (2005).
182. Salie, R., Moolman, J. A. & Lochner, A. The role of  $\beta$ -adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning ( $\beta$ PC). *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* **25**, 31–46 (2011).
183. Ye, Y. *et al.* The myocardial infarct size-limiting effect of sitagliptin is PKA-dependent, whereas the protective effect of pioglitazone is partially dependent on PKA. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H1454-1465 (2010).
184. Makaula, S. *et al.* H-89, a non-specific inhibitor of protein kinase A, promotes post-ischemic cardiac contractile recovery and reduces infarct size. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **45**, 341–347 (2005).
185. Insete, J. *et al.* Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc. Res.* **64**, 105–114 (2004).
186. Shen, J., Benedict Gomes, A., Gallagher, A., Stafford, K. & Yoburn, B. C. Role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced mu-opioid receptor downregulation and tolerance in mice. *Synap. N. Y. N* **38**, 322–327 (2000).
187. Peart, J. N. & Gross, G. J. Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1746-1753 (2006).

188. Pfeffer, M. A. *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**, 503–512 (1979).
189. Conti, M. & Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 481–511 (2007).
190. Krolkowski, J. G. *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesth. Analg.* **101**, 1590–1596 (2005).
191. He, W. *et al.* Postconditioning of sevoflurane and propofol is associated with mitochondrial permeability transition pore. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **9**, 100–108 (2008).
192. Husainy, M. A., Dickenson, J. M. & Galiñanes, M. The MPTP status during early reoxygenation is critical for cardioprotection. *J. Surg. Res.* **174**, 62–72 (2012).
193. Xi, J., Tian, W., Zhang, L., Jin, Y. & Xu, Z. Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn<sup>2+</sup>/GSK-3 $\beta$  signal pathway in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H601-607 (2010).
194. Cao, C.-M., Xia, Q., Gao, Q., Chen, M. & Wong, T.-M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 644–650 (2005).
195. Xu, W. *et al.* Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* **298**, 1029–1033 (2002).

196. Cao, C.-M., Xia, Q., Gao, Q., Chen, M. & Wong, T.-M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 644–650 (2005).
197. Stowe, D. F. *et al.* Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H434-440 (2006).
198. Chanoit, G. *et al.* Inhibition of phosphodiesterases leads to prevention of the mitochondrial permeability transition pore opening and reperfusion injury in cardiac H9c2 cells. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* **25**, 299–306 (2011).
199. Heinen, A. *et al.* Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp. Gerontol.* **56**, 99–105 (2014).
200. Sniecinski, R. & Liu, H. Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology* **100**, 589–597 (2004).
201. Lee, T.-M., Su, S.-F., Chou, T.-F., Lee, Y.-T. & Tsai, C.-H. Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATP-sensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* **105**, 334–340 (2002).
202. Huhn, R. *et al.* Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A. *Exp. Gerontol.* **47**, 116–121 (2012).
203. Kersten, J. R., Toller, W. G., Gross, E. R., Pagel, P. S. & Warltier, D. C. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1218-1224 (2000).

204. Tosaki, A., Engelman, D. T., Engelman, R. M. & Das, D. K. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc. Res.* **31**, 526–536 (1996).
205. Kristiansen, S. B. *et al.* Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia* **47**, 1716–1721 (2004).
206. Gross, E. R., Hsu, A. K. & Gross, G. J. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* **56**, 127–136 (2007).

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Durch zielführende Diskussionen, anhaltende Hilfestellung sowie der wiederkehrende Ansporn ihrerseits wurde mir diese Arbeit erst möglich gemacht.

Außerdem gilt mein Dank meinen beiden Betreuern Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen und Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen. Meinen Dank aussprechen will ich außerdem Claudia Dohle und PhD Hilbert Grievink, die mich mit der experimentellen Arbeit vertraut gemacht haben.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie, meinem Lebenspartner und meinen Freunden für die immer wiederkehrende Stärkung und Motivation zur Fertigstellung der Arbeit.