

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Experimentelle Untersuchungen zum Ischämie- und
Reperfusionsschaden am isoliert perfundierten Rattenherzen –
neue pharmakologische Optionen der myokardialen Protektion**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Anästhesiologie

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Martin Ströthoff

2023

Meiner Familie gewidmet.

Präambel und Übersicht der zugrundeliegenden Originalarbeiten

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift werden die Ergebnisse aus folgenden Originalarbeiten dargestellt und diskutiert, die eine pharmakologische Prä- und Postkonditionierung mittels Ramelteon (Melatonin-Rezeptor-Agonist) und Omecamtiv mecarbil (Myosin-Aktivator) am isoliert perfundierten Rattenherzen an der Langendorff-Anlage untersucht haben. Für beide Substanzen sind dies Erstbeschreibungen ihrer kardioprotektiven Potenz.

Nach einer Einleitung in die Thematik folgt die Beschreibung der Methoden und eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den genannten Originalarbeiten. Abschließend werden die Ergebnisse im Kontext mit der aktuellen Literatur diskutiert.

1. **Stroethoff M**, Behmenburg F, Spittler K, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R, Mathes A
Activation of melatonin receptors by ramelteon induces cardioprotection by postconditioning in the rat heart

Anesth Analg. 2018 Jun;126(6):2112-2115
2. **Stroethoff M**, Christoph I, Behmenburg F, Raupach A, Heinen A, Bunte S, Senpolat S, Heinen A, Hollmann MW, Mathes A, Huhn R
The melatonin receptor agonist ramelteon induces preconditioning via activation of mitochondrial potassium channels

J Cardiovasc Pharmacol. 2018, Aug;72(2):106-111
3. Torregroza C, Jalajel O, Raupach A, Feige K, Bunte S, Heinen A, Mathes A, Hollmann MW, Huhn R, **Stroethoff M**
Activation of PKG and Akt Is Required for Cardioprotection by Ramelteon-Induced Preconditioning and Is Located Upstream of mKCa-Channels

Int J Mol Sci. 2020 Apr, 8;21(7):2585

4. **Stroethoff M**, Goetze L, Bunte S, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, Mathes A, Huhn R
The Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Induces Cardioprotection That Requires MT2 Receptor Activation and Release of Reactive Oxygen Species
Cardiovasc Drugs Ther. 2020 Jun, 34(3):303-310

5. **Stroethoff M**, Behmenburg F, Meierkord S, Bunte S, Mayer F, Mathes A, Heinen A, Hollmann MW, Huhn R
Cardioprotective properties of omecamtiv mecarbil against ischemia and reperfusion injury
J Clin Med. 2019, Mar 18;8(3): E375

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
[x]	Konzentration von x
4P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
5-HD	5-Hydroxydecanoat
AG490	Tyrosinkinase-Inhibitor
Akt / PKB	Proteinkinase B, Serin/Threonin-Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BAY	BAY 60-2770, sGC-Aktivator
bpm	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CsA	Cyclosporin A
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FDA	US-amerikanische Arzneimittelbehörde (<i>Food and Drug Administration</i>)
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 beta
Hz	Hertz, Frequenz
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration

IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPostC	ischämische Postkonditionierung
IR-Schaden	Ischämie- und Reperfusionsschaden
JAK	Januskinase
K ⁺	Kaliumion
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
K _i	Inhibitorkonstante
Kon	Kontrolle
KT	KT 5823, PKG-Inhibitor
Luz	Luzindol
LVDP	entwickelter linksventrikulärer Druck (<i>left ventricular developed pressure</i>)
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (<i>left ventricular end-diastolic pressure</i>)
LVESP	linksventrikulärer endsystolischer Druck (<i>left ventricular end-systolic pressure</i>)
M, mM, μM, nM	molare Masse, milli-, micro, nanomolar
Mel	Melatonin
min	Minute
MK	MK-2206, Akt-Inhibitor
mK _{ATP} , K _{ATP}	(mitochondrialer) ATP-abhängiger Kaliumkanal
mK _{Ca} , K _{Ca}	(mitochondrialer) kalziumabhängiger Kaliumkanal

ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MPG	N-2-Mercaptopropionylglycin
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
MT	Melatonin-Rezeptor
Na ⁺	Natriumion
NS1619	<i>1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one</i> , mK _{Ca} -Kanal-Aktivator
ns	nicht signifikant
OM	Omecamtiv mecarbil
Pax	Paxillin
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Ram	Ramelteon
RNA	Ribonukleinsäure
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
RIPer	ischämische Fernperkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SAFE	<i>survivor activating factor enhancement</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschaden	2
1.2	Kardioprotektion durch ischämische Prä- und Postkonditionierung	3
1.3	Mechanismen der myokardialen Protektion	4
1.4	Rolle der Mitochondrien	5
1.5	Mitochondriale Kaliumkanäle.....	6
1.6	Kardioprotektion durch pharmakologische Prä- und Postkonditionierung	8
1.6.1	Vorstellung der Substanz Ramelteon.....	8
1.6.2	Vorstellung der Substanz Omecamtiv mecarbil	10
1.7	Fragestellung	12
2	Methoden	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Versuchsaufbau	13
2.2.1	Präparation der Versuchstiere	13
2.2.2	Langendorff-Anlage.....	14
2.3	Infarktgrößenmessung	15
2.4	Versuchsprotokolle	15
2.4.1	Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in der Reperfusion	15
2.4.2	Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen	17
2.4.3	Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon	20
2.4.4	Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung und reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion	22
2.4.5	Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil.....	24

3	Ergebnisse	27
3.1	<i>Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in der Reperfusion</i>	<i>27</i>
3.2	<i>Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen</i>	<i>28</i>
3.3	<i>Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon</i>	<i>33</i>
3.4	<i>Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung und reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion</i>	<i>35</i>
3.5	<i>Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil.....</i>	<i>38</i>
3.5.1	<i>Hämodynamik.....</i>	<i>40</i>
4	Diskussion	42
4.1	<i>Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren</i>	<i>42</i>
4.2	<i>Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen</i>	<i>44</i>
4.3	<i>Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon</i>	<i>46</i>
4.4	<i>Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion.....</i>	<i>50</i>
4.5	<i>Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion</i>	<i>52</i>
4.6	<i>Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil.....</i>	<i>53</i>
4.7	<i>Ausblick.....</i>	<i>56</i>
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Danksagung.....	72
8	Originalarbeiten	73
9	Eidesstattliche Versicherung.....	74

1 Einleitung

Im Jahr 2020 war laut Statistischem Bundesamt, wie schon in den Jahren zuvor, eine Herz-/Kreislauferkrankung mit 34 % die häufigste Todesursache [1]. Der Anteil der über 65-jährigen Patienten lag dabei mit 93 % sogar noch um 2,1 % höher als 2019 [1]. In absoluten Zahlen ausgedrückt verstarben 44 529 Menschen im Jahr 2020 aufgrund eines Myokardinfarktes in Deutschland [1]. Zudem verursachen seit Jahren Herz-Kreislauferkrankungen die höchsten Krankheitskosten in der Bundesrepublik Deutschland [2] und zeigen dabei, dass dieser Krankheitsgruppe neben der medizinischen Herausforderung auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung und auch Belastung zugeschrieben werden kann. In der Anästhesiologie zählen kardiovaskuläre Komplikationen perioperativ zu den häufigsten und schwerwiegendsten Ereignissen für den Patienten. Insbesondere der perioperative Myokardinfarkt ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert und stellt nicht nur für unser Fachgebiet, sondern auch interdisziplinär eine große Herausforderung dar.

Vor diesem Hintergrund ist es wichtig neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die die Mortalität und Morbidität der Herz- und Kreislauferkrankungen mildern können.

Kardioprotektive Strategien, wie beispielsweise die ischämische Prä- bzw. Postkonditionierung (IPC bzw. IPostC), die den Ischämie- und Reperfusionsschaden (IR-Schaden) reduzieren können, zeigen seit Jahren vielversprechende experimentelle Ergebnisse. Hierbei führen kurze Ischämie- und Reperusionsphasen vor bzw. nach einer länger andauernden Ischämie und nachfolgenden Reperfusion zu einem geringeren Schaden am Myokard [3, 4].

Bisherige klinische Untersuchungen konnten die hoffnungsvollen Erwartungen aus experimentellen Daten nicht erfüllen, was die Übertragung in die Klinik limitiert [5]. Zudem ist oftmals eine Umsetzung der experimentellen Erkenntnisse in den klinischen Alltag schlicht nicht möglich, z.B. aufgrund einer zu großen Invasivität der Intervention.

Die pharmakologische Prä- oder Postkonditionierung stellt hingegen eine nicht-invasive Alternative dar, mit dem Potenzial, vielversprechende experimentelle Ergebnisse auf die Klinik zu übertragen und damit eine neue Strategie zu entwickeln, um die Morbidität und Mortalität des Myokardinfarktes zu reduzieren.

Es war das Ziel dieser Arbeit, neue pharmakologische Optionen der myokardialen Protektion durch Ramelteon und Omecamtiv mecarbil zu untersuchen.

1.1 Myokardialer Ischämie- und Reperfusionsschaden

Bei einem akuten Myokardinfarkt herrscht während der Ischämiephase im betroffenen Areal ein Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf und –angebot. Dies führt zu einem fortschreitenden Untergang von Kardiomyozyten, der nur durch die schnelle Wiederherstellung der Perfusion bspw. während einer Koronarangiographie in diesem Areal, aufgehalten werden kann. Die Reperfusion selbst führt allerdings auch zu einer myokardialen Schädigung. Diese Prozesse werden als Ischämie- und Reperfusionsschaden (IR-Schaden) bezeichnet.

In der Ischämiephase ist das Myokard auf die anaerobe Glykolyse zur ATP-Bereitstellung angewiesen, um vorübergehend energieabhängige zelluläre Prozesse aufrecht zu erhalten [6]. Bei länger andauernder Ischämie reicht diese Energiebereitstellung nicht mehr aus und es kommt innerhalb der Kardiomyozyten zu schwerwiegenden Folgen, wie Störungen der Elektrolythomöostase, Ansammlung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels und Veränderungen des Membranpotenzials. Sowohl anorganisches Phosphat, als auch Laktat sammeln sich an und der pH-Wert fällt [6]. Durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Aktivierung von Lipasen und Proteasen und durch ein intrazelluläres Ödem werden Zellorganellen und Sarkolemm geschädigt [6]. Die sarkolemmale Na^+/K^+ -ATPase wird durch den Energiemangel gehemmt und durch den niedrigen pH mit Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration (H^+) die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers erhöht [7]. In der Folge steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration an. Dies aktiviert den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher mit der Folge, dass Kalzium im Austausch mit Natrium massiv in die Zelle einströmt [7-9]. Kalzium wiederum aktiviert den kontraktilen Apparat sowie Proteasen und Lipasen, so dass der Ischämieschaden weiter fortschreitet [8].

In der Reperfusion sorgt die plötzliche Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung für eine weitere Bildung von ROS [10]. Das angereicherte Kalzium, sowie die rasche Normalisierung des pH-Wertes schaffen ein intrazelluläres Milieu, in dem sich Mikroporen der mitochondrialen Membran (*mitochondrial permeability transition pore*,

mPTP) öffnen, was zu einem weiteren Reperfusionsschaden führen kann [10-12]. Die Öffnung der mPTP bewirkt den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials [13, 14], die Unterbrechung der ATP Bereitstellung [14], eine mitochondriale Schwellung [13, 14] und die Einleitung von Apoptose durch Cytochrom C Freisetzung [10, 15].

1.2 Kardioprotektion durch ischämische Prä- und Postkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung ist der stärkste körpereigene Schutzmechanismus, um die Folgen einer Myokardischämie und den Ischämie- und Reperfusionsschaden zu reduzieren. Im Jahr 1986 haben Murry und Kollegen dieses Phänomen erstmals beschrieben [3]. Sie konnten zeigen, dass mehrere kurze Phasen von Ischämie und Reperfusion vor einer länger andauernden Ischämie zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion, im Sinne einer Kardioprotektion, führen [3]. Diese ischämische Präkonditionierung konnte im Laufe der letzten Jahre in vielen verschiedenen Spezies nachgewiesen werden [16-18] und zeigte auch bei anderen Organen neben dem Herzen eine ausgeprägte Protektion, wie beispielsweise auch in der Niere oder der Leber [19, 20].

Eine klinische Umsetzung der vielversprechenden experimentellen Ergebnisse einer ischämischen Präkonditionierung ist sehr eingeschränkt, da akute Ischämien in der Regel nicht vorhersehbar und protektive Maßnahmen zu invasiv sind, außer es handelt sich um koronarangiographische Interventionen oder herzchirurgische Eingriffe. Ein Äquivalent zur Auslösung einer ischämischen Präkonditionierung zum Zeitpunkt einer Myokardischämie könnten eine vorangegangene *Angina pectoris*-Symptomatik sein [21-23]. Vorangegangene *Angina pectoris*-Episoden können für eine besser erhaltene linksventrikuläre Ejektionsfraktion [24] und geringere Mortalität nach Myokardinfarkt, [21] und damit einen kardioprotektiven Effekt nach länger andauernden Ischämie sorgen. Weitere Einflussfaktoren für eine Kardioprotektion im Rahmen einer Myokardischämie sind sicherlich auch im Vorfeld der Ischämie gebildete Kollateralflüsse [22, 23], Unterschiede im angeborenen Fibrinolyse-System oder auch die antianginöse Medikation der Patienten [21].

Neben der Präkonditionierung konnten Zhao und Kollegen 2003 zum ersten Mal zeigen, dass auch kurze nicht-letale Ischämie- und Reperusionsphasen nach einer länger

andauernden Ischämie in der darauffolgenden Reperfusionsphase eine Kardioprotektion auslösen können [4]. Dies wird als ischämische Postkonditionierung (IPostC) bezeichnet.

1.3 Mechanismen der myokardialen Protektion

Auch wenn die Mechanismen der Kardioprotektion bisher nicht vollständig geklärt sind, wurden einige Mediatoren und zelluläre Signalwege beschrieben, die eine Protektion auslösen können.

Als Endeffektor aller protektiven Mechanismen in der Zelle wird das Mitochondrium angesehen. Es herrscht mittlerweile Übereinkunft, dass primär zwei verschiedene Signalwege zu einer Öffnung mitochondrialer Kaliumkanäle führen und dadurch in der Folge die Öffnung der mPTP inhibiert wird. Diese zwei Signalkaskaden sind zum einen der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK) Signalweg und zum anderen der *survivor activating factor enhancement* (SAFE) Signalweg.

Hausenloy und Kollegen beschreiben den RISK Signalweg als G-Protein gekoppelten Signalweg, der wiederum die Phosphoinositid-3-Kinase und nachgeschaltete Proteine wie Proteinkinase B (Akt), Proteinkinase A (PKA) und *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) aktiviert [25]. Akt phosphoryliert unter anderem Proteinkinase C (PKC), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK-3 β). Die Phosphorylierung und Aktivierung von GSK-3 β inhibiert schließlich die mPTP Öffnung und damit den Zelluntergang [26-28].

Lecour beschreibt einen weiteren Signalweg, der als SAFE Signalweg bezeichnet wird und über Tumornekrosefaktor (TNF), Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2 (TNF-R2), Januskinase (JAK) und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) vermittelt wird und ebenfalls in der Folge die mPTP-Öffnung inhibiert [29]. STAT3 wird durch Phosphorylierung aktiviert, durch Cyclophilin D stabilisiert und kann in der Folge den Gehalt an ROS, die Atmungskette und auch die mPTP regulieren [30-33]. Der SAFE-Signalweg scheint eine wichtige Rolle bei einer Reihe kardioprotektiver Mechanismen zu spielen, die exakte Abfolge ist allerdings nicht vollständig geklärt.

SAFE und RISK sind grundsätzlich unabhängige Signalwege zur Protektion, allerdings ist bisher ungeklärt welche Einflussfaktoren auf beide Signalkaskaden einwirken können und welche Interaktionen beider Wege existieren, die zur vollständigen Protektionsvermittlung notwendig sind [33].

So könnten kardioprotektive Maßnahme existieren, die die Aktivierung beider Kaskaden, RISK und SAFE Signalweg, oder lediglich einer der beiden Kaskaden zur vollständigen Protektion benötigen [33].

1.4 Rolle der Mitochondrien

Nach vielen Jahren intensiver Forschung im Bereich der Kardioprotektion herrscht Einigkeit darüber, dass die Mitochondrien die Schlüsselrolle im Rahmen der Kardioprotektion einnehmen, unabhängig vom vorgeschalteten Signalweg. [12, 27, 34, 35].

Die Mitochondrien dienen als „Kraftwerke der Zelle“ zur Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Energieträgern in Form von ATP. Neben diesem Prozess der oxidativen Phosphorylierung sorgen Mitochondrien auch für eine Homöostase der Ionen, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und regulieren Apoptose und Nekrose der Zelle [36]. Ischämie- und Reperfusion führen letztendlich zum Verlust der mitochondrialen Funktion. Auf dem Erhalt dieser mitochondrialen Funktion beruht das Prinzip der Konditionierung und somit der Kardioprotektion.

Zum Erhalt der mitochondrialen Funktion ist die innere Mitochondrienmembran unter physiologischen Bedingungen außer für bestimmte Metaboliten und Ionen undurchlässig [15]. Dadurch kann das Membranpotenzial mit seiner Funktion aufrechterhalten werden. Die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP) ist eine unspezifische Membranpore, deren dauerhafte Öffnung, wie im Falle eines Ischämie- und Reperfusionsschadens, die selektive Barriere löst, die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, [14] und die Mitochondrien damit zum Vermittler des Zelltodes werden lässt [35]. Die Öffnung der mPTP wird ausgelöst durch zelluläre Bedingungen, die in der frühen Reperfusion vorliegen. Dazu zählt die mitochondriale Ca^{2+} Überladung [37], große Mengen ROS [11], Mangel an ATP [37], hohe Phosphat-Konzentrationen [11] und ein saures pH-Milieu [10]. Die Öffnung führt durch den osmotischen Gradienten zur Schwellung der Mitochondrien, eine Zerreißung der äußeren Mitochondrienmembran setzt proapoptotische Faktoren wie Cytochrom C frei und die Zelle geht unter [15]. Das Ausmaß und die Dauer der mPTP-Öffnung bestimmen die Zellschädigung [13, 15].

Auch die Bildung von ROS ist am Ischämie- und Reperfusionsschaden beteiligt. Große Mengen von ROS in der Reperfusion tragen zum Reperfusionsschaden und dem Verlust der Mitochondrienfunktion bei [26]. Geringe Mengen ROS wie auch die transiente Öffnung der mPTP scheinen paradoxerweise essenziell für eine Kardioprotektion zu sein [26, 27].

1.5 Mitochondriale Kaliumkanäle

Eine Regulation der mitochondrialen Funktion und die Beeinflussung der mPTP zur Vermeidung des Ischämie- und Reperfusionsschadens wird durch mitochondriale Kaliumkanäle vermittelt und diese nehmen dadurch eine zentrale Rolle in der Vermittlung protektiver Signale ein [38, 39]. Eine Öffnung dieser Kanäle führt dazu, dass vermehrt Kalium in die Mitochondrienmatrix gelangt. Allerdings ist bisher nicht vollständig geklärt, wie durch Inhibition der mPTP eine Kardioprotektion ausgelöst wird.

Wichtige Vertreter dieser kardioprotektiven mitochondrialen Kaliumkanäle sind sowohl ATP-abhängige (mK_{ATP}) [40] als auch kalziumabhängige Kaliumkanäle (mK_{Ca}) [41] und beide Kanäle werden als essenzieller Bestandteile der kardioprotektiven Signalvermittlung beschrieben [42]. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf eine funktionelle Verbindung dieser mitochondrialen Kaliumkanäle mit der mPTP [38, 43, 44]. Der genaue Mechanismus ist allerdings erst unvollständig verstanden. Eine Öffnung von mK_{Ca} -Kanälen führt zu einer regulierten ROS-Freisetzung der Mitochondrien und dies ist wiederum ein Triggersignal für eine reduzierte zelluläre Ca^{2+} -Überladung und hemmt die massive ROS-Freisetzung in der Ischämie- und frühen Reperusionsphase [43]. Die Regulation des Ca^{2+} -Gehaltes und das Ausmaß der ROS-Freisetzung bestimmen die Inhibition der mPTP. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Interaktion von mK_{Ca} -Kanälen und mPTP sein.

Durch Agonisten (z.B. Diazoxid) und Antagonisten (z.B. 5-Hydroxydecansäure, 5-HD) des mK_{ATP} -Kanals kann eine Kardioprotektion ausgelöst bzw. verhindert werden [40, 45], so dass dieser Kaliumkanal essenziell für die protektive Signalvermittlung ist. Mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle wurden 1991 erstmals durch Inoue und Kollegen beschrieben [46], zuvor wurden sie lediglich der Zellmembran (pmK_{ATP} Kanal) zugeschrieben [47]. Allerdings herrschte bis zuletzt eine Debatte über deren Existenz,

denn in der Zeit nach der ersten Beschreibung wurden die Kanäle ausschließlich über ihre pharmakologischen Interaktionen beschrieben. Agonisten wie Diazoxid, aber auch die Antagonisten wie 5-HD und Sufonylharnstoff besitzen spezifische Effekte am mK_{ATP} und pmK_{ATP} Kanal. Hier ist als Beispiel auch die pharmakologische Kardioprotektion zu nennen, die durch Diazoxid über den mK_{ATP} Kanal vermittelt wird [45, 48], auch während der selektiven Blockade der pmK_{ATP} Kanäle [49]. 2019 konnte der Kanal erstmals an der Mitochondrienmembran identifiziert werden [50]. Paggio und Kollegen konnten zeigen, dass dieser sich aus einer poren-bildenden (MITOK) und einer ATP-bindenden (MITOSUR) Untereinheit zusammensetzt [50]. Die Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass Diazoxid in MITOK Knockout-Mäusen keine Kardioprotektion auslöst und dass dieser nachgewiesene mK_{ATP} Kanal das molekulare Ziel der Diazoxid-induzierten Kardioprotektion darstellt [50].

Neben dem mK_{ATP} -Kanal sorgt die Aktivierung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen am Myokard für eine erhöhte Resistenz gegenüber einem Ischämie- und Reperfusionsschaden [41]. Das *Kcnma-1* Gen kodiert für die kalziumabhängigen Kaliumkanäle und durch alternatives Splicen werden Funktion und Lokalisation der Kanäle bestimmt [51, 52]. Die Kanalpore besteht aus vier alpha-Untereinheiten und weitere beta-Untereinheiten bestimmen regulatorische Funktionen und sind gewebespezifisch [44, 51, 52]. Die mitochondriale Lokalisation in Kardiomyozyten wird durch eine Splice-Variante am C-Terminus bestimmt und somit sind am Sarkolemm der Kardiomyozyten keine K_{Ca} -Kanäle zu finden [52]. Xu et al. konnten zeigen, dass 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazole-2-one (NS1619) bei isoliert perfundierten Herzen eine Kardioprotektion auslöst. Eine gleichzeitige Blockade des Kanals mittels Paxillin einem K_{Ca} -Kanal Antagonisten, hebt diesen protektiven Effekt durch NS1619 und durch IPC vollständig auf [38]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei *Kcnma1^{-/-}*-Mäusen keine Kardioprotektion durch IPC ausgelöst werden kann. In diesen *Kcnma1^{-/-}*-Mäusen ist das entsprechende Gen inaktiviert. Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen die essenzielle Bedeutung des mK_{Ca} -Kanals von Kardiomyozyten nicht nur bei der pharmakologischen, sondern auch bei der ischämischen Konditionierung.

Auch aus translationaler Sicht erscheint der mK_{Ca} -Kanal interessant, da seine Aktivierung auch im höheren Alter eine Kardioprotektion vermitteln kann [53]. Andere kardioprotektive Maßnahmen, wie auch die ischämische Präkonditionierung, scheinen im

höheren Alter deutlich an Effektivität zu verlieren [54]. Daher könnte der mK_{Ca} -Kanal ein Zielprotein darstellen, das die Translation der vielversprechenden experimentellen Ergebnisse der Kardioprotektion in einen klinischen Kontext ermöglichen könnte.

1.6 Kardioprotektion durch pharmakologische Prä- und Postkonditionierung

Die ischämische Prä- und Postkonditionierung sind invasive Verfahren und daher ist eine klinische Anwendung auf ausgewählte, planbare Interventionen wie Koronarangiographien oder herzchirurgische Eingriffe limitiert. Die pharmakologische Konditionierung bietet die Möglichkeit, protektive Signalwege zu aktivieren, ohne dass ein ischämischer Stimulus erfolgen muss.

Hierbei findet entweder eine Induktion protektiver Prozesse oder Signalwege statt oder eine Inhibition schädlicher Signaltransduktionskaskaden.

Beispielsweise kann die Öffnung der mPTP inhibiert werden oder reaktive Sauerstoffspezies abgefangen werden. Einzelne Komponenten nachgewiesener protektiver Signalkaskaden können durch Pharmaka gezielt aktiviert werden und damit das Myokard vor IR-Schäden schützen.

Im Folgenden werden die Substanzen Ramelteon und Omecamtiv mecarbil vorgestellt, die in dieser kumulativen Arbeit auf ihre protektive Potenz untersucht wurden.

1.6.1 Vorstellung der Substanz Ramelteon

Ramelteon, ein Melatonin-Rezeptor-Agonist, wurde entwickelt, um eine neue Therapiemöglichkeit bei Schlafstörungen zu etablieren [55], denn gebräuchliche Substanzen wie Benzodiazepine oder auch die sogenannten Z-Substanzen wie Zopiclon haben zahlreiche unerwünschte Wirkungen wie auch ein Abhängigkeitspotenzial. Das S-Enantiomer von Ramelteon ist seit 2005 in den USA klinisch zur Behandlung von Schlafstörungen zugelassen [56, 57].

Ramelteon wurde als selektiver Melatonin-Rezeptor-Agonist entwickelt [57]. Es besitzt eine deutlich längere Halbwertszeit als Melatonin und hat einen hohen *first-pass* Effekt

(98%) mit einer Plasmaproteinbindung von 82% [58]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Ramelteon einen „schlaf-anstoßenden“ Effekt besitzt, ohne residuale Effekte am Folgetag wie wiederkehrende Müdigkeit, Sedierung und unerwünschte Wirkungen auszulösen [57].

Melatonin-Rezeptoren 1 und 2 (MT1 und MT2) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren [59], die neben anderen Organen und Spezies auch an Rattenherzen nachgewiesen wurden [60] und hauptverantwortlich für den zirkadianen Rhythmus und den Schlaf sind [61]. *In vitro* Daten zeigen, dass Ramelteon ein potenter und hoch selektiver Melatonin-Rezeptor Agonist am MT1- bzw. MT2-Rezeptor ist [62]. Ramelteon hat eine 6-fach höhere Bindungsaffinität zu MT1-Rezeptoren und 3-fach höhere zu MT2 Rezeptoren als Melatonin [55]. Die Bindungsaffinität von Ramelteon zum MT3-Rezeptor ist hingegen 110-fach schwächer als die von Melatonin und damit vernachlässigbar [55].

Ramelteon zeigt keine signifikante Bindungsaffinität zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Transportern oder Ionenkanälen. Die Affinität zu GABA-, Monoamin- oder Opioidrezeptoren ist vernachlässigbar klein. Ramelteon stellt damit zur Untersuchung der kardioprotektiven Eigenschaften ein ideales Molekül dar, da mögliche kardioprotektive Eigenschaften durch Affinität zu anderen Zielmolekülen nahezu ausgeschlossen werden können [55]. Zudem besitzt Ramelteon keine direkten antioxidativen Wirkungen als Radikalfänger [63]. Die untersuchten kardioprotektiven Eigenschaften von Ramelteon sind somit praktisch vollständig auf die Wirkung am Melatonin-Rezeptor zurückzuführen. Dies ist der Hauptunterschied zu Melatonin, dessen Wirkung auf andere Rezeptoren und Moleküle sehr vielfältig ist [64].

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) ist ein endogenes Hormon, das hauptsächlich durch die Glandula pinealis bzw. Epiphyse produziert und ins Blut freigesetzt wird [61]. Neben dem Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus, besitzt Melatonin einen positiven Einfluss unter anderem auf die Therapie der Herzinsuffizienz, eine arterielle Hypertonie und den myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschadens [65]. Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die sich einer perkutanen Koronarintervention unterziehen, zeigen eine erniedrigte Melatoninkonzentration im Blut [66]. Experimentell reduziert Melatonin den Ischämie- und Reperfusionsschaden sowohl *in vivo* [67], beim isoliert perfundierten Herzen [68, 69] als auch bei isolierten Kardiomyozyten [70]. Es wird postuliert, dass die Kardioprotektion von Melatonin sowohl Rezeptor-abhängig über MT-Rezeptoren [71],

als auch durch die antioxidative Wirkung als Radikalfänger und durch Aktivierung antioxidativer Signalkaskaden [65, 67, 72] vermittelt wird. Allerdings wurde die ebenfalls signifikante Bedeutung der MT-Rezeptor vermittelten Kardioprotektion von Melatonin durch die vollständige Aufhebung der protektiven Effekte durch den MT-Rezeptor-Antagonisten Luzindol unterstrichen [59, 71, 73]. Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein Myokardinfarkt im Rattenherz zu einer signifikanten Steigerung der Melatoninkonzentration im linken Ventrikel und Plasma innerhalb eines Tages führt. Weiterhin war nach 14 Tagen eine Zunahme der MT1-RNA Expression zu verzeichnen [74]. Diese Ergebnisse deuten auf die Bedeutung von Melatonin als endogener Protektor im Rahmen einer kardialen Ischämie hin [65]. Es ist allerdings weitestgehend ungeklärt, welchen Anteil die direkte antioxidative oder die rezeptorvermittelte Wirkung an der Protektion einnimmt.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass Ramelteon als selektiver Melatonin-Rezeptor Agonist keine direkte antioxidative Potenz besitzt, [63] und die Wirkung Ramelteons auf seine rezeptorvermittelte Aktivität reduziert werden kann. Zudem ist Ramelteon ein klinisch zugelassenes und oral verfügbares Medikament zur Behandlung von Schlafstörungen. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Studien existierten keine Hinweise auf kardioprotektive Effekte von Ramelteon. In einem translationalen Ansatz könnte daher bei Nachweis einer kardioprotektiven Wirkung von Ramelteon potentiell ein weiterer klinisch bedeutsamer Nutzen der Substanz erschlossen werden.

1.6.2 Vorstellung der Substanz Omecamtiv mecarbil

Omecamtiv mecarbil (OM) ist ein spezifischer kardialer Myosin-Aktivator zur Inotropiesteigerung und Behandlung der Herzinsuffizienz [75].

Bisher klinisch eingesetzte Inotropika wie β -Sympathomimetika, Herzglykoside, Phosphodiesterase-Hemmer oder Kalziumsensitizer haben eine Vielzahl von erheblichen unerwünschten Wirkungen wie beispielsweise Herzrhythmusstörungen oder erhöhter kardialer Energiebedarf, die oftmals eine weitere Therapie limitieren.

Somit erfüllen die bisher klinisch eingesetzten Inotropika nicht vollständig die Erwartungen an ein ideales inotropiesteigerndes Medikament und sind sogar langfristig mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [76]. Das ideale Inotropikum sollte die kardiale Pumpfunktion steigern, ohne andere kardiale Funktionen einzuschränken, sowie den

kardialen Energieverbrauch und das Risiko von Herzrhythmusstörungen nicht erhöhen. Die bisher klinisch etablierten Inotropika wirken alle im kontraktile Prozess oberhalb des Myosin-Aktin Apparates, der letztendlich die Kontraktion ausführt. Somit rückte in der Entwicklung von OM erstmals der kontraktile Myosin-Aktin Apparat in den Fokus.

OM ist der erste Myosin-Aktivator und wird auch Myotropikum genannt. Seine Wirkung wird durch die selektive Bindung an die S1 Domäne der schweren Kette des kardialen β -Myosins ausgelöst [77]. Die Bindung führt zu einer Konformitätsänderung in der Nukleotidbindungsdomäne und damit zu einer gesteigerten ATPase-Aktivität des Myosins [77]. Dies führt letztendlich zu einer gesteigerten anorganischen Phosphatabspaltung, was der geschwindigkeitslimitierende Schritt im Zyklus der Interaktion von Aktin und Myosin und damit der Kontraktion ist [77]. OM beschleunigt somit den Aktin- und Myosin-Zyklus, indem es den Übergang der schwachen Aktin-Myosin Bindung zur starken Bindungskonfiguration verkürzt [78]. Es entstehen somit deutlich mehr Querbrücken, denn normalerweise interagieren lediglich 10-30 % aller kardialer Myosinköpfe mit Aktinfilamenten [79]. Funktionell betrachtet resultiert dies in einer energieunabhängigen Kontraktionssteigerung mit einer gleichzeitigen Zunahme der Kontraktionszeit und damit längeren Dauer der Systole auf Kosten der Diastole [77, 78].

Der ATPase-stimulierende Effekt wirkt ausschließlich auf α - und β -Myosin Isoformen in den Kardiomyozyten und langsamen Skelettmuskelzellen [75]. Die schnelle Skelettmuskulatur und die glatte Muskulatur werden nicht beeinflusst [75].

In rund zwei Drittel der Fälle ist die koronare Herzkrankheit der Grund für eine Herzinsuffizienz [80]. Patienten mit Herzinsuffizienz wären zum einen die Zielgruppe einer Therapie mit OM, zum anderen haben genau diese Patienten ein erhöhtes Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden. Daher erscheint es vor allem aus klinischer Sicht betrachtet sehr sinnvoll, mögliche kardioprotektive Eigenschaften von OM erstmalig zu untersuchen.

1.7 Fragestellung

Mit dem Ziel neue potentielle Ansätze zur pharmakologischen Prä- und Postkonditionierung zu identifizieren, wurden in den vorliegenden Arbeiten folgende Fragestellungen experimentell untersucht.

- 1) Besitzt der Melatonin-Rezeptor-Agonist Ramelteon eine kardioprotektive Potenz?
- 2) Wird der kardioprotektive Effekt von Ramelteon über Melatonin-Rezeptoren vermittelt?
- 3) Sind für die Vermittlung der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion sowohl MT2-Rezeptoren als auch reaktive Sauerstoffspezies nötig?
- 4) Wird der kardioprotektive Effekt von Ramelteon über mitochondriale Kaliumkanäle vermittelt und sind intrazelluläre Kinasen wie PKG und / oder Akt an der Signalkaskade beteiligt?
- 5) Besitzt Omecamtiv mecarbil eine kardioprotektive Potenz und ist dieser protektive Effekt dosisabhängig?

2 Methoden

In diesem Kapitel werden die in den Originalpublikationen beschriebenen Methoden dargestellt.

2.1 Versuchstiere

Die für die Organentnahme verwendeten männlichen Wistar-Ratten stammten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf (Aktenzeichen O 27/12). Alle Untersuchungen erfolgten übereinstimmend mit den Richtlinien für Pflege und Gebrauch von Labortieren gemäß Tierschutzgesetz.

Die Wistar Ratten wurden in Einzelkäfigen des Typs 3 (Makrolon®, ca. 800cm²) unter kontrollierten klimatischen Bedingungen (22±2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50±5%) gehalten. Alle 12 Stunden erfolgte ein Tag-Nacht-Wechsel. Ad libitum stand Futtermittel und entkeimtes Trinkwasser (ozonisiert, angesäuert mit HCl, pH 2,6-3,0) für die Tiere bereit. Das Alter der Tiere lag zwischen 2 – 4 Monaten.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Präparation der Versuchstiere

Zu Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere mittels Natrium-Pentobarbital (80 mg/kg) intraperitoneal narkotisiert. Zeitgleich erfolgte ebenfalls eine intraperitoneale Injektion von 1000 IE Heparin, um eine Koagulation des Blutes während der Organentnahme zu verhindern. Befand sich das Tier in ausreichend tiefer Narkose, wurde es mittels Guillotine dekapitiert. Durch eine mediane Thorakotomie und Perikarderöffnung wurde das Herz präpariert und an der *Aorta ascendens* abgesetzt und bis zum Transfer auf die Langendorff-Anlage in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen.

2.2.2 Langendorff-Anlage

Alle in dieser Habilitationsschrift eingereichten Untersuchungen wurden an derselben Langendorff-Anlage durchgeführt.

An der Langendorff-Anlage wurde das Herz an der Aortenwurzel oberhalb der Klappenebene aufgehängt und somit retrograd perfundiert. Als Transportmedium und Perfusat diente ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP: 116 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24,9 mM NaHCO₃; 2,5 mM CaCl₂; 8,3 mM Glukose; 2,2 mM Pyruvat) mit einer konstanten Temperatur von 37 °C. Mittels peristaltischer Pumpe wurde in der Anlage ein konstanter Perfusionsdruck von 80 mmHg am Herzen gewährleistet. Die gesamte Anlage war zusätzlich mit Wasserkammern umgeben, um eine Temperatur von 37 °C aufrecht zu erhalten und eine Auskühlung des Herzens zu verhindern. Um einen konstanten linksventrikulären enddiastolischen Druck von 3-8 mmHg zu gewährleisten, wurde ein flüssigkeitsgefüllter Ballon über das linke Vorhofrohr bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dieser Ballon diente mit Hilfe eines Druckaufnehmers als Messinstrument für die Aufzeichnung der hämodynamischen Daten mit einer Aufnahmerate von 500 Hz (Datenerfassungssystem PowerLab). Die erfassten Signale wurden am Computer mittels „Charts für Windows V 5.0“ aufgezeichnet (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien). Folgende hämodynamischen Variablen wurden dabei erfasst: linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHg), linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP in mmHg), linksventrikulärer entwickelter Druck (LVDP = LVESP – LVEDP in mmHg), Herzfrequenz (bpm), Zeitpunkt der maximalen Ischämiekontraktion (min) und Druckmaximum der Ischämiekontraktion (mmHg). Der Koronarfluss (ml/min) wurde manuell anhand des Perfusatdurchflusses zu vorher festgelegten Zeitpunkten gemessen.

Die isoliert perfundierten Herzen durchliefen an der Langendorff-Anlage zu Beginn eine 20-minütige Stabilisierungsphase, gefolgt von einer 33-minütigen Globalischämiephase und einer 60-minütigen Reperfusion. Über angeschlossene Perfusoren wurden die jeweils zu untersuchenden Substanzen entweder vor oder nach der Ischämie verabreicht. Während der Globalischämie erfolgte keine Perfusion mit Sauerstoff-gesättigtem KHP über die Koronararterien und das Herz wurde in Stickstoff-haltigem KHP inkubiert, bevor es in der Reperfusion wieder über die Koronarien mit Sauerstoff-haltigem KHP perfundiert wurde.

2.3 Infarktgrößenmessung

Am Ende des Versuchs wurden die Herzen von der Herzspitze ausgehend in acht transversale Scheiben bis kurz vor der Klappenebene geschnitten. Diese wurden daraufhin für 15 Minuten bei 37 °C mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung 0,75% (TTC) gefärbt und mit 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Somit konnte vitales Gewebe durch die Reduktion des TTC und somit rote Färbung von avitalem Gewebe, das weißlich erscheint, abgegrenzt werden.

Die eingescannten Herzen wurden am Computer planimetrisch ausgewertet, indem die Fläche des Infarktgebietes in Relation zur Gesamtfläche des linken Ventrikels gesetzt wurde. Dies wurde durch verblindete Untersucher mit der Software Sigma Scan Pro 5 (SPSS Science Software, Chicago, USA) bestimmt.

2.4 Versuchsprotokolle

Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsprotokolle der entsprechenden Originalpublikationen dieser Habilitationsschrift kurz erläutert.

2.4.1 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in der Reperfusion

In dieser Studie wurde untersucht, ob Ramelteon als Melatonin-Rezeptor-Agonist eine Kardioprotektion durch eine Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in der frühen Reperusionsphase auslösen kann.

Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 1 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert sechs Gruppen zugeordnet (n=6 pro Gruppe, s. Abb. 1).

Alle Herzen durchliefen die bereits erwähnte 20-minütige Stabilisierungsphase, gefolgt von einer 33-minütigen Globalischämie und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

Die Kontrollgruppe erhielt zu Beginn der Reperfusion nur die Vehikellösung (Puffer und Lösungsmittel in entsprechender Konzentration). Die übrigen Gruppen erhielten die entsprechenden Substanzen in der jeweiligen Konzentration über zehn Minuten zu

Beginn der Reperfusion. Am Ende des Versuchs wurde die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung durchgeführt.

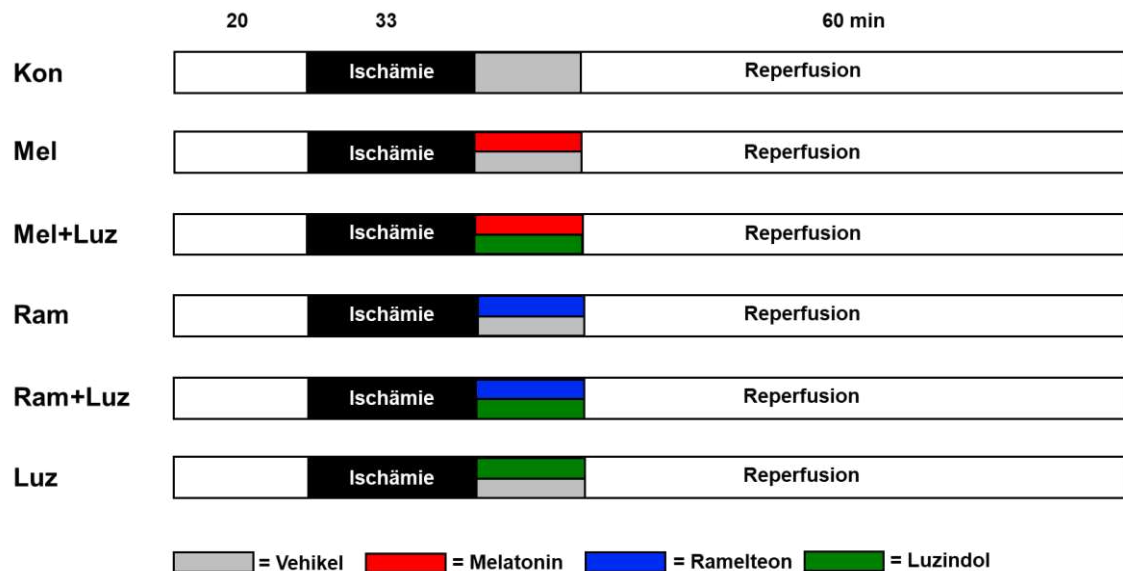


Abb. 1: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [81], mit freundlicher Genehmigung des Verlags) zur Untersuchung der kardioprotektiven Eigenschaften von Ramelteon. Kon = Kontrollgruppe, Mel = Melatonin [5 μ M], Luz = Luzindol [5 μ M], Ram = Ramelteon [5 μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase Auslösung einer Globalischämie über 33 Minuten, zu Beginn der 60-minütigen Reperusionsphase Substanzgabe über 10 Minuten.

Zur Überprüfung kardioprotektiver Eigenschaften von Ramelteon wurde die Substanz über 10 Minuten in der frühen Reperfusion verabreicht. In dieser Studie wurde zunächst eine Konzentration von 5 μ M Ramelteon verwendet, da in der Literatur ebendiese Konzentration für Melatonin als kardioprotektiv beschrieben wird [71] und dies für Ramelteon eine Erstbeschreibung war. Zur Überprüfung, ob der kardioprotektive Effekt über Melatonin-Rezeptoren vermittelt wird, wurde der unspezifische Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol in einer Konzentration von 5 μ M [71] sowohl in Kombination mit Melatonin als auch mit Ramelteon verabreicht. Zum Ausschluss einer eigenen Wirkung auf die Infarktgröße wurde Luzindol zusätzlich alleine gegeben. Melatonin in der Konzentration von 5 μ M [71] diente als Positivkontrolle für eine Infarktgrößenreduktion.

2.4.2 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen

In der zweiten Publikation wurde untersucht, ob die Applikation von Ramelteon auch vor einer globalen Ischämie kardioprotektiv wirkt und ob dieser schützende Effekt über mitochondriale Kaliumkanäle vermittelt wird.

Insgesamt gab es in dieser Studie vier Kohorten.

In der ersten Kohorte sollte zunächst untersucht werden, ob eine Ramelteon Gabe vor der Globalischämie kardioprotektiv im Sinne einer Infarktgrößenreduktion wirkt. Dazu wurde, wie in der vorherigen Studie, der mögliche Effekt von Ramelteon mit der kardioprotektiven Wirkung von Melatonin verglichen.

Das erste Versuchsprotokoll ist in Abbildung 2 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert drei Gruppen zugeordnet (n=6-7 pro Gruppe) (s. Abb. 2).

Die Kontrollgruppe erhielt nur die Vehikellösung. Die beiden anderen Gruppen erhielten die entsprechenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen (5 μ M Melatonin und 5 μ M Ramelteon) über zehn Minuten vor der 33-minütigen Globalischämie. Am Ende des Versuchs wurde ebenfalls die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung durchgeführt.

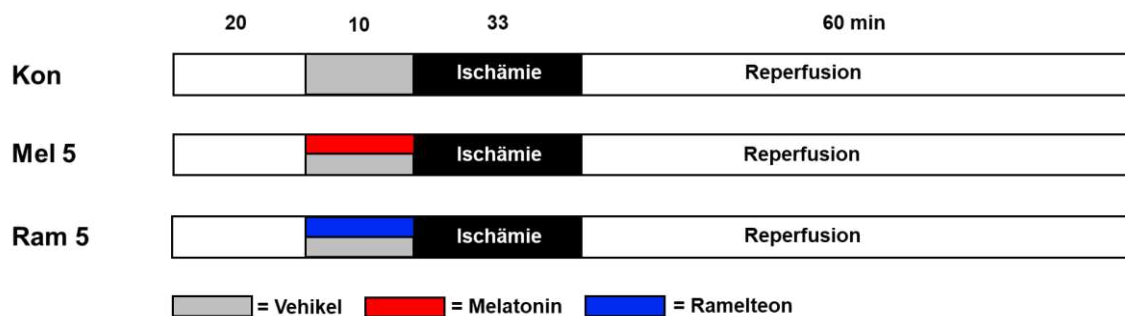


Abb. 2: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Mel = Melatonin [5 μ M], Ram = Ramelteon [5 μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

In der zweiten Kohorte sollte die niedrigste protektive Konzentration für Ramelteon ermittelt werden. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 3 dargestellt. Männliche Wistar

Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert acht Gruppen zugeordnet (n=8 pro Gruppe, s. Abb. 3). In absteigender Reihenfolge wurden Konzentrationen von Ramelteon verabreicht. Die entsprechenden Konzentrationen (5; 3; 1; 0,5; 0,3; 0,1; 0,05; 0,03; 0,01 μ M) wurden zehn Minuten vor der 33-minütigen Ischämie und anschließenden Reperfusion appliziert. Am Versuchsende wurden ebenfalls die Infarktgrößen mittels TTC-Färbung bestimmt.

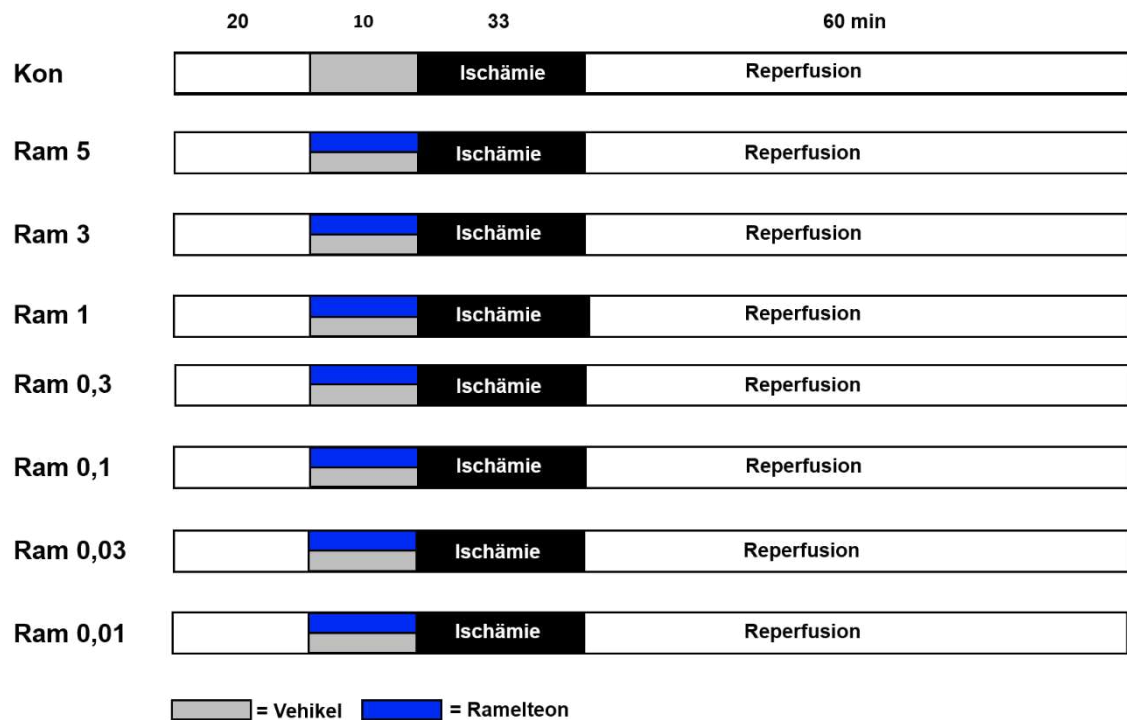


Abb. 3: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon in den entsprechenden Konzentrationen [μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe von Ramelteon vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

Die dritte Kohorte diente der Überprüfung, ob der Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol die kardioprotektive Wirkung der niedrigsten protektiven Konzentration von Ramelteon (0,03 μ M) aufhebt. Luzindol wurde wiederum in der Konzentration von 5 μ M appliziert. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 4 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert vier Gruppen zugeordnet (n=5 pro Gruppe) (s. Abb. 4). Die entsprechenden Substanzen wurden wieder 10 Minuten vor der Globalischämie verabreicht. Nach der Reperfusion wurden ebenfalls die Infarktgrößen mittels TTC-Färbung bestimmt.

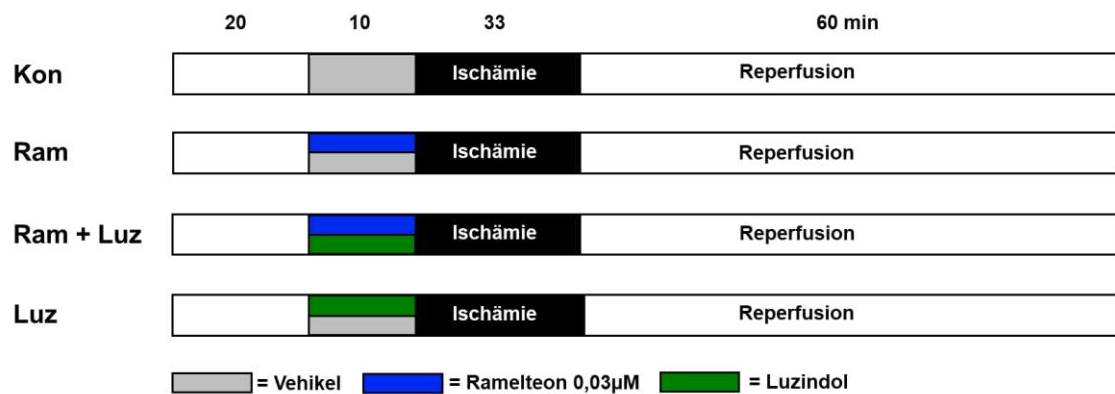


Abb. 4: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon [0,03 µM], Luz = Luzindol [5 µM], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der entsprechenden Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperfusionsphase.

In der vierten Kohorte sollte abschließend überprüft werden, ob mitochondriale Kaliumkanäle an der Protektion durch Ramelteon beteiligt sind. Hierfür wurde der mK_{Ca} -Kanal Inhibitor Paxillin (1 µM)[38] und der mK_{ATP} -Kanal Inhibitor 5-HD (100 µM)[83] mit Ramelteon (0,03 µM) kombiniert appliziert. Zum Ausschluss eines eigenen Effektes auf die Infarktgrößen der beiden Inhibitoren wurden diese ebenfalls alleine verabreicht. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 5 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert sechs Gruppen zugeordnet (n=8-9 pro Gruppe) (s. Abb. 5). Am Ende des Versuchs wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ermittelt.

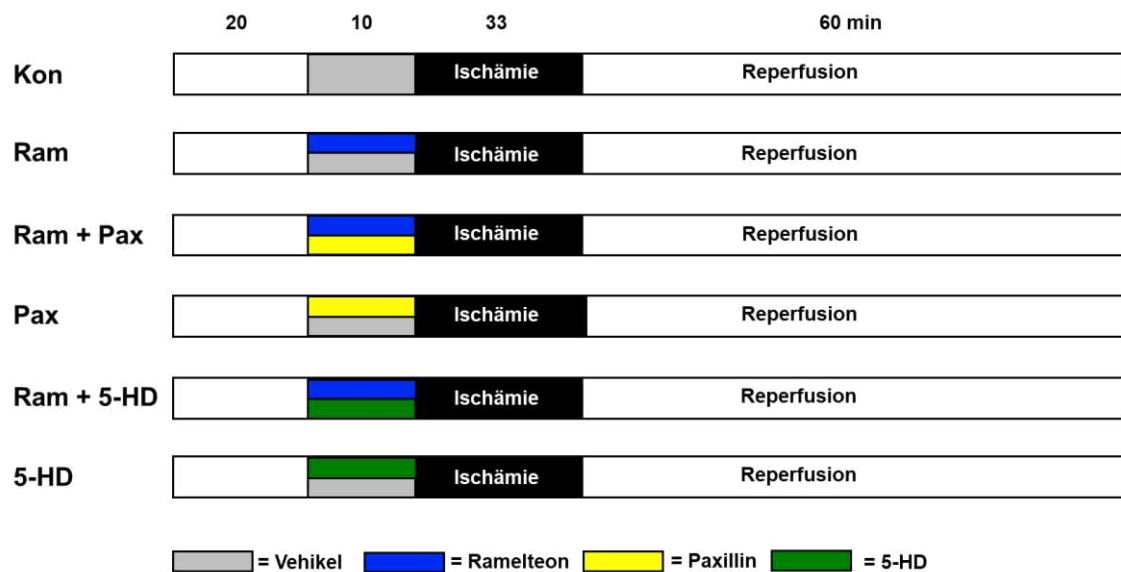


Abb. 5: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon [0,03 μ M], Pax = Paxillin [1 μ M], 5-HD = 5-hydroxydecanoate [100 μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

2.4.3 Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon

In der dritten Publikation wurde untersucht, ob die Proteinkinase G (PKG) und Akt (Proteinkinase B/PKB, Akt-Kinase) an der Vermittlung der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion beteiligt sind.

Es gab in dieser Studie zwei Kohorten.

In der ersten Kohorte wurde die Gabe des PKG-Inhibitors KT5823 und des Akt-Inhibitors MK2206 mit Ramelteon (0,03 μ M) kombiniert. Die Konzentrationen von KT5823 (1 μ M) und KM2206 (15 nM) wurden aus der Literatur entnommen [84] [85]. Zum Ausschluss eines eigenen Effektes der Inhibitoren wurden diese ebenfalls alleine appliziert. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 6 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert sechs Gruppen zugeordnet (n=6 pro Gruppe, s. Abb. 6). Nach einer 20-minütigen Stabilisierungsphase wurden die entsprechenden Substanzen über 10 Minuten verabreicht, bevor eine 33-minütige Globalischämie und 60-minütige Reperusionsphase gestartet wurden. Am Ende wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung bestimmt.

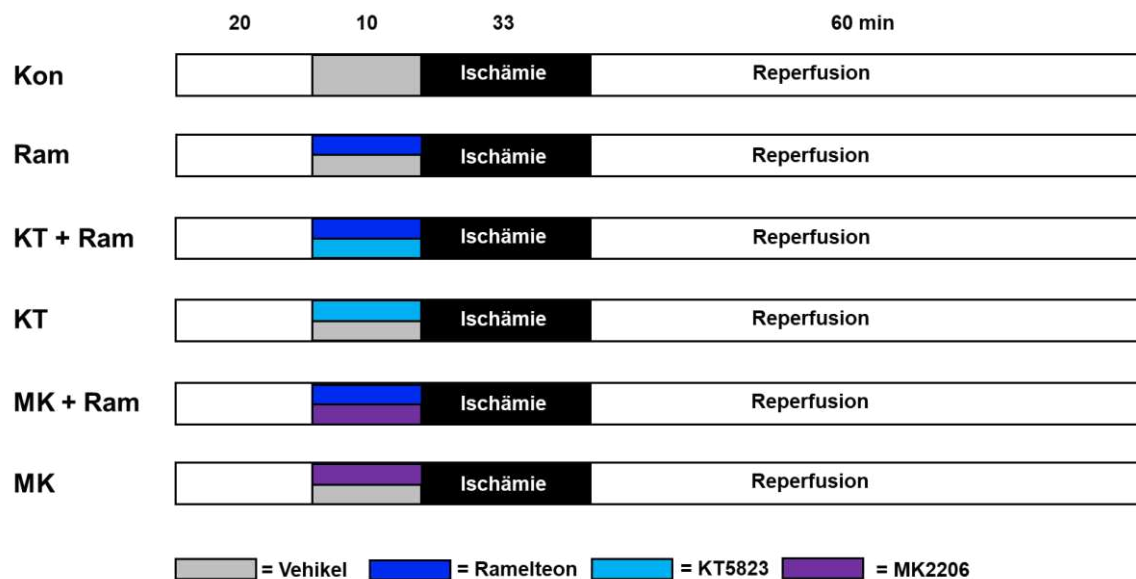


Abb. 6: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [86], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon [0,03 μ M], KT = KT5823 [1 μ M], MK = MK2206 [15 nM], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

Die Versuche in der zweiten Kohorte bauten auf den Ergebnissen aus der ersten Kohorte auf. Es sollte geprüft werden, in welcher Reihenfolge die Kinasen (PKG und Akt) und damit die Signalkaskade aktiviert werden. Daher kombinierten wir die Gabe des Akt-Inhibitors MK2206 und Ramelteon (0,03 μ M) mit dem indirekten PKG-Aktivator BAY60-2770. Die Konzentrationen von BAY60-2770 (5 nM)[87] und NS1619 (10 μ M) [88], einem mK_{Ca} -Kanal Aktivator, wurden aus der Literatur entnommen.

Zur Untersuchung, ob beide Kinasen (PKG bzw. Akt) in der Signalkaskade vorgeschaltet zum mK_{Ca} -Kanal gelegen sind, kombinierten wir die Gabe der Inhibitoren (MK2206 bzw. KT5823) und Ramelteon mit dem mK_{Ca} -Kanal Aktivator NS1619. Zur besseren Darstellung ist der Versuchsablauf in Abbildung 7 dargestellt. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert sechs Gruppen zugeordnet (n=6 pro Gruppe, s. Abb. 7). Am Ende des Versuchs wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ermittelt.

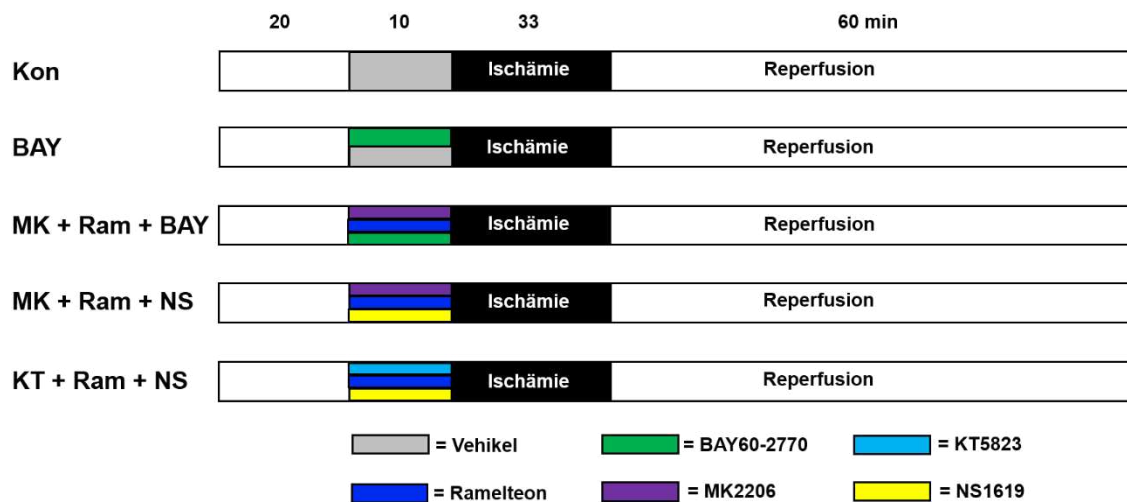


Abb. 7: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [86], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, BAY = BAY60-2770 [5 nM], Ram = Ramelteon [0,03 μ M], KT = KT5823 [1 μ M], MK = MK2206 [15 nM], NS = NS1619 [10 μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperfusionsphase.

2.4.4 Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung und reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion

In der vierten Publikation wurde untersucht, welche Bedeutung der Melatonin-Rezeptor Subtyp 2 in der Ramelteon-induzierten Protektion hat. Zudem sollte der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies in dieser protektiven Signalkaskade von Ramelteon gezeigt werden. Alle Herzen durchliefen an der Langendorff-Anlage dasselbe Protokoll mit 20-minütiger Stabilisierungsphase und 10-minütiger Substanzgabe vor der 33-minütigen Globalischämie und 60-minütigen Reperfusionsphase.

Im ersten Schritt kombinierten wir Ramelteon in der niedrigsten protektiven Dosis (0,03 μ M) mit dem selektiven MT2-Rezeptor-Antagonisten 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) in einer Konzentration von 1 μ M [89, 90]. Zum Ausschluss eines eigenen Einflusses von 4P-PDOT auf die Infarktgröße, wurde dieser ebenfalls alleine appliziert. Am Ende des Versuchs wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ermittelt. Die Abb. 8 zeigt das Versuchsprotokoll. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert vier Gruppen zugeordnet (n=6-7 pro Gruppe, s. Abb. 8).

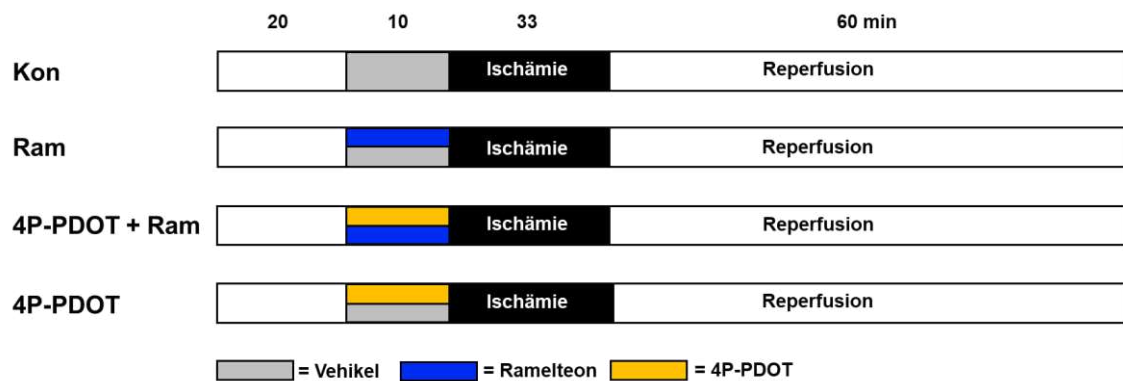


Abb. 8: Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [91], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon [0,03 μ M], 4P-PDOT = 4-phenyl-2-propionamidotetralin [1 μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase.

Im zweiten Schritt wurde der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Signalkaskade untersucht. Dazu kombinierten wir Ramelteon (0,03 μ M) mit dem „Radikalfänger“ N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG) in einer Konzentration von 1 mM [92]. Zur Überprüfung, ob eine direkte mPTP-Blockade eine Kardioprotektion auslöst, kombinierten wir die Gabe von Ramelteon und MPG mit Cyclosporin A (CsA) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. CsA wurde sowohl vor der Ischämie (CsAe), als auch danach in der frühen Reperusionsphase verabreicht (CsAi). CsA ist ein direkter Inhibitor der mPTP [93]. In einer vorherigen Arbeit konnten wir in einem ähnlichen Versuchsaufbau zeigen, dass CsA in einer Konzentration von 0,2 μ M eine signifikante Infarktgrößenreduktion induziert [94]. Die Abbildung 9 zeigt das zugehörige Versuchsprotokoll. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert fünf Gruppen zugeordnet (n=6-8 pro Gruppe, s. Abb. 9).

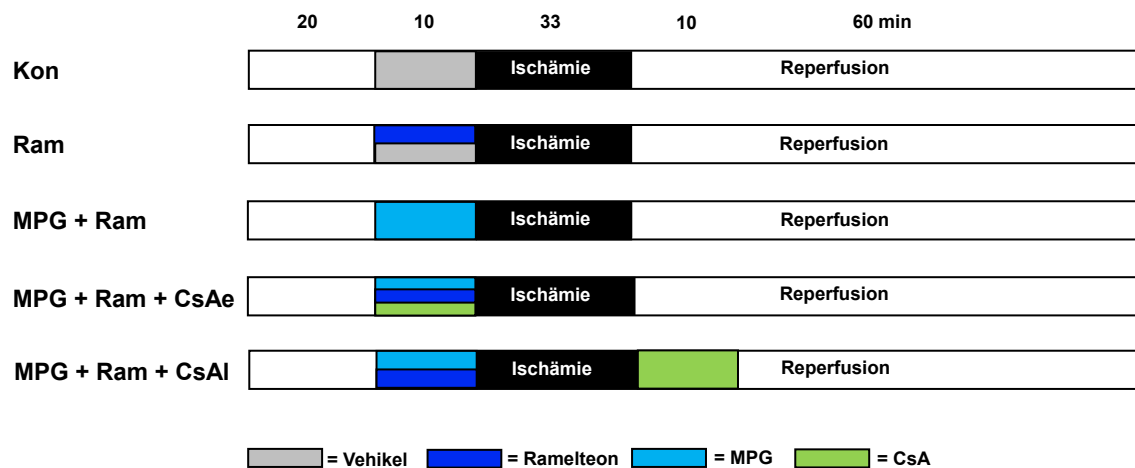


Abb. 9 Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [91], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon [0,03 μ M], MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin [1 mM], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperfusionsphase, CsA = Cyclosporin A [0,2 μ M], CsAe = frühe Gabe von CsA vor der Ischämie, CsAl = späte Gabe nach der Ischämie

2.4.5 Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil

In der fünften Publikation untersuchten wir, ob der neu entwickelte Myosin-Aktivator Omecamtiv mecarbil (OM) in der Lage ist, einen kardioprotektiven Effekt im Sinne einer Infarktgrößenreduktion auszulösen.

An der Langendorff-Anlage durchliefen alle Herzen die bereits erwähnte 20-minütige Stabilisierungsphase, gefolgt von einer 33-minütigen Globalischämie und 60-minütigen Reperfusionsphase.

Die Kontrollgruppe erhielt nur die Vehikellösung. Alle anderen Gruppen erhielten die entsprechenden Substanzen in der jeweiligen Konzentration über zehn Minuten vor der Globalischämie. Am Ende des Versuchs wurde die Infarktgrößenbestimmung mittels TTC-Färbung durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die protektiven Eigenschaften von OM überprüft und gleichzeitig die niedrigste protektive Dosis von OM ermittelt. Dazu wurden aufsteigende Konzentrationen von OM an der Langendorff-Anlage vor der globalen Ischämie appliziert (1; 3, 10; 30 μ M). Die Abbildung 10 zeigt das entsprechende

Versuchsprotokoll. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert fünf Gruppen zugeordnet (n=6-8 pro Gruppe, s. Abb. 10).

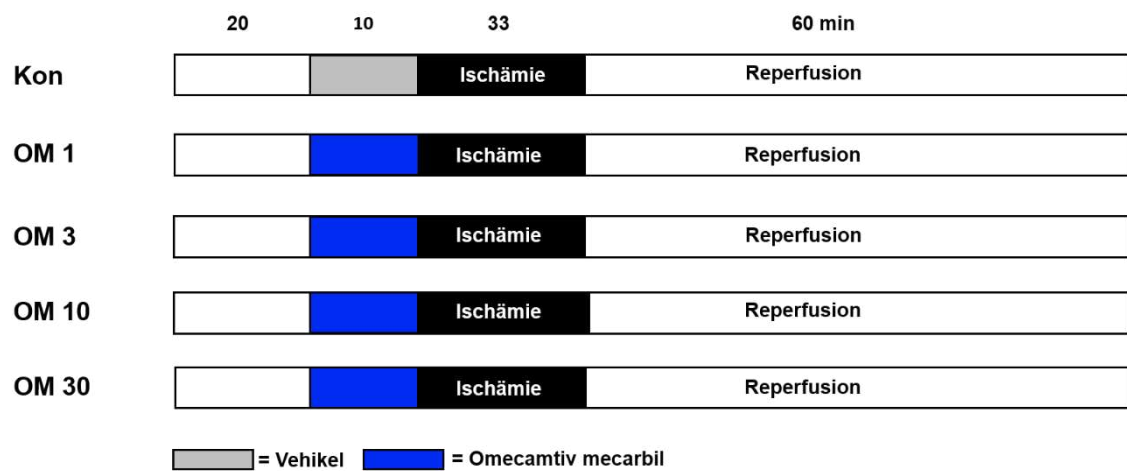


Abb. 10 Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [95], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecamtiv mecarbil in entsprechenden Konzentrationen [μM], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 10-minütige Gabe der Substanzen vor einer Globalischämie über 33 Minuten und einer 60-minütigen Reperusionsphase

Im zweiten Schritt wurde überprüft, ob OM ebenfalls in der Lage ist nach einer längeren Ischämie und in der frühen Reperfusion eine Kardioprotektion auszulösen. Daher applizierten wir die im ersten Schritt ermittelte niedrigste protektive Dosis von OM (10 μM) und die nächst niedrigere Konzentration (3 μM) nach der Ischämie, in der frühen Reperusionsphase ebenfalls über 10 Minuten. Die Abbildung 11 zeigt das Versuchsprotokoll. Männliche Wistar Ratten (2-4 Monate) wurden randomisiert drei Gruppen zugeordnet (n=8 pro Gruppe, s. Abb. 11).

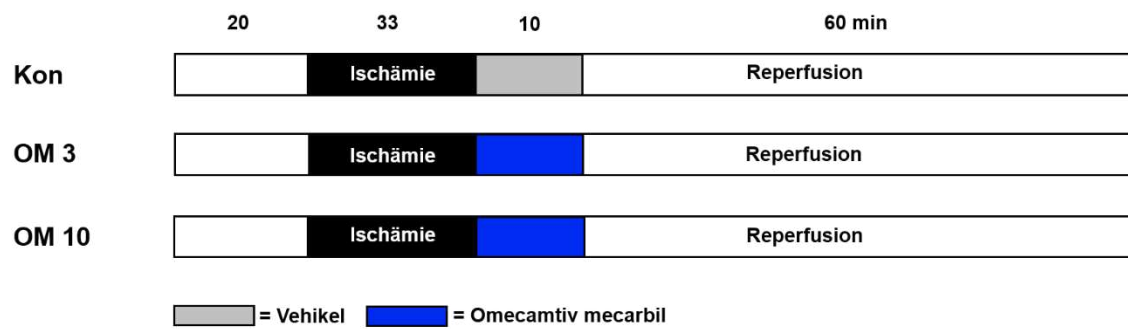


Abb. 11 Experimentelles Protokoll (modifiziert nach [95], mit freundlicher Genehmigung des Verlags), Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecamtiv mecarbil in entsprechenden Konzentrationen [μ M], nach 20-minütiger Stabilisierungsphase, 33-minütige Globalischämie und zu Beginn der 60-minütigen Reperusionsphase Substanzgabe über 10 Minuten.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Publikationen zusammengefasst.

3.1 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in der Reperfusion

In der ersten Studie wurde überprüft, ob Ramelteon und Melatonin eine Kardioprotektion durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren in unserem Langendorff-Modell in der frühen Reperfusionsphase im Sinne einer Postkonditionierung auslösen können.

Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 12 dargestellt. In der Kontrollgruppe (Kon) betrug die Infarktgröße $46 \pm 8\%$. Melatonin (Mel) reduzierte die Infarktgröße auf $22 \pm 3\%$ ($p < 0,05$ versus Kon). Der Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol (Luz) hob diesen Effekt vollständig auf (Mel + Luz: 50 ± 8 , $p < 0,05$ versus Mel).

Eine Gabe von Ramelteon (Ram) in der frühe Reperfusion reduzierte ähnlich wie Melatonin die Infarktgröße auf $25 \pm 5\%$ ($p < 0,05$ versus Kon), wohingegen eine gleichzeitige Gabe von Luzindol (Mel + Luz) diese Reduktion wieder vollständig aufhob (Ram + Luz: $51 \pm 5\%$, $p < 0,05$ versus Ram).

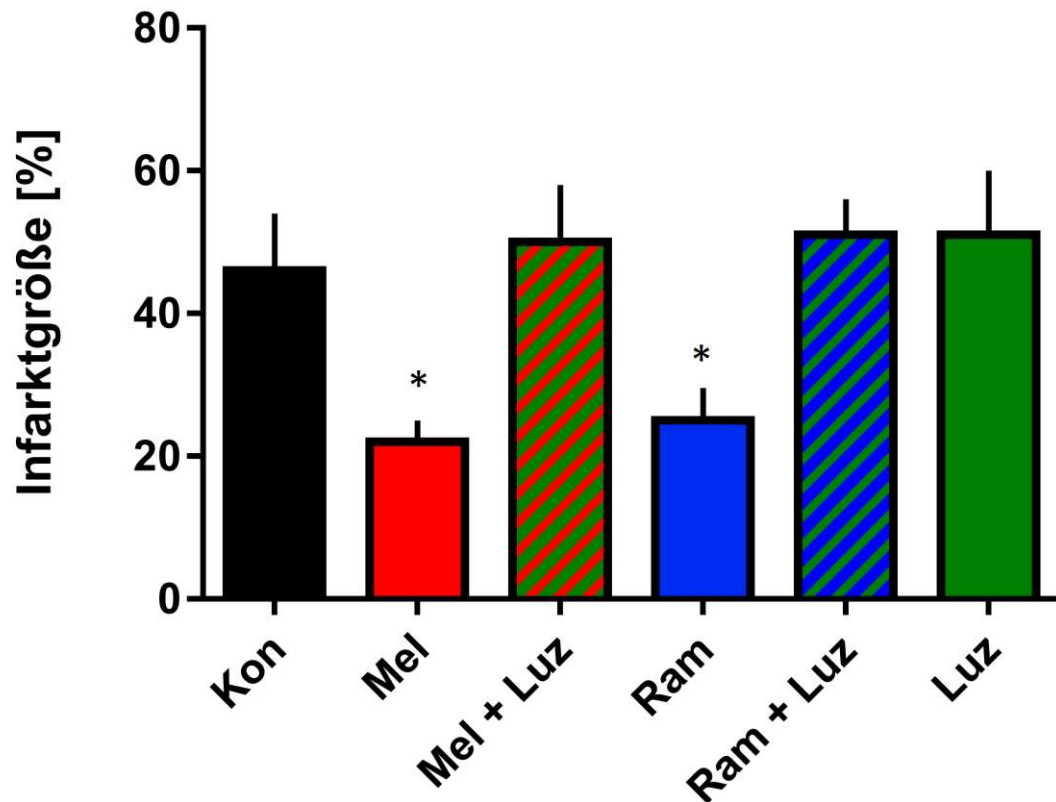


Abb. 12: Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert±Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Mel = Melatonin 5 μ M, Luz = Luzindol 5 μ M, Ram = Ramelteon 5 μ M, alle Gruppen n = 6, *p<0,05 versus Kon, modifiziert nach [81], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

3.2 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen

In der 1. Kohorte wurden zunächst die kardioprotektiven Eigenschaften von Melatonin und Ramelteon verglichen. Diesmal wurden die Substanzen vor der 33-minütigen Ischämie im Sinne einer Präkonditionierung verabreicht. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 13 dargestellt. In der Kontrollgruppe (Kon)

betrug die Infarktgröße $41 \pm 4\%$. Ramelteon (Ram) reduzierte die Infarktgröße in gleichem Maße wie Melatonin (Mel) (Ram: $22 \pm 8\%$, Mel: $24 \pm 7\%$, $p < 0,05$ versus Kon).

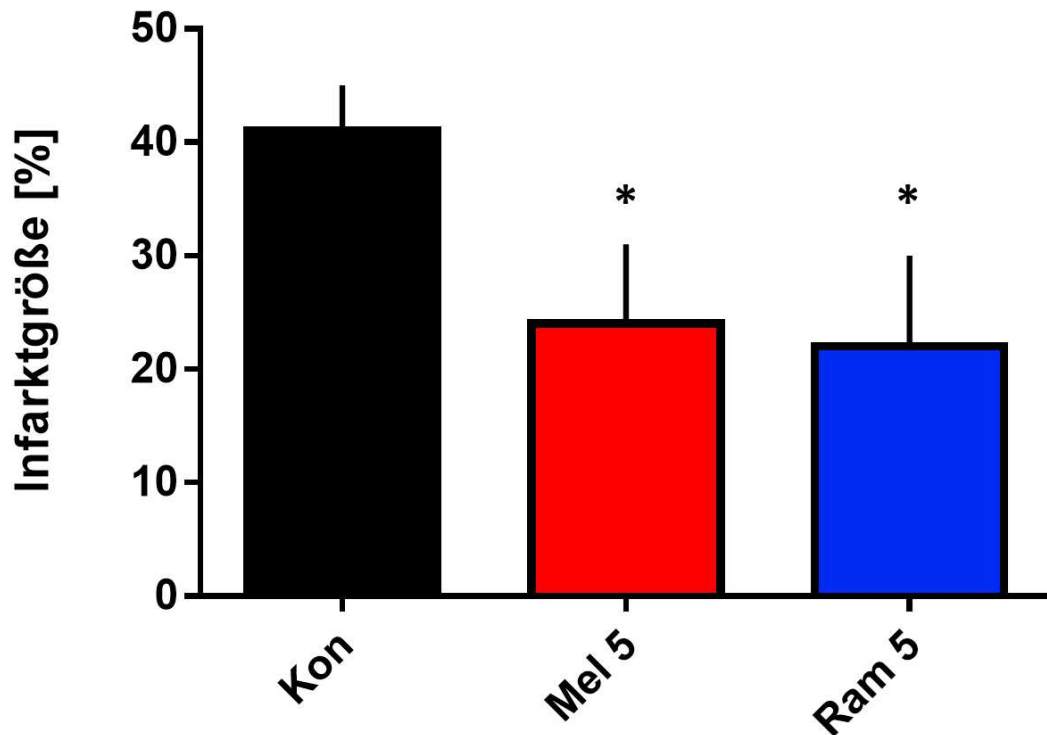


Abb. 13: Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Mel = Melatonin 5 μM , Ram = Ramelteon 5 μM , alle Gruppen $n = 6-7$, $*p < 0,05$ versus Kon, modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Ramelteon nach Ischämie in der frühen Reperfusionsphase (siehe Kapitel 3.1.) einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt wie bei Gabe vor Ischämie auslöst und dieser Effekt in gleichem Maße wie der von Melatonin nachweisbar ist.

In der 2. Kohorte wurde die niedrigste protektive Dosis von Ramelteon ermittelt. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 14 dargestellt. In der Kontrollgruppe (Kon) betrug die Infarktgröße $63 \pm 7\%$. Die niedrigste protektive Dosis von Ramelteon (0,03 μM) reduzierte die Infarktgröße auf $28 \pm 4\%$ ($p < 0,05$ versus Kon). Die Gabe von höheren Konzentrationen an Ramelteon (0,1; 0,3; 1; 3; 5 μM) führten nicht

zu einem stärkeren protektiven Effekt als die Gabe von 0,03 μM Ramelteon. Die Infarktgrößenreduktionen bei diesen Konzentrationen sind alle auf einem ähnlichen Niveau. Eine niedrigere Ramelteon Konzentration von 0,01 μM löst keinen protektiven Effekt im Sinne einer Infarktgrößenreduktion aus und diese ist ähnlich wie in der Kontrollgruppe (Ram 0,01: $60 \pm 4\%$, ns versus Kon).

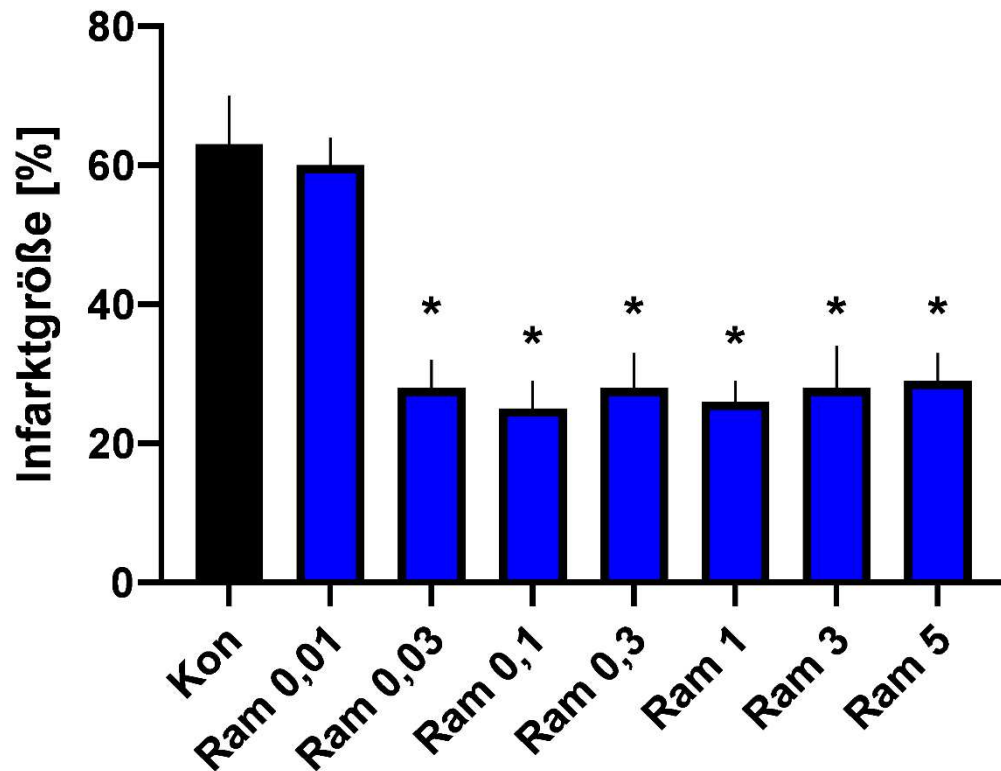


Abb. 14 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon in [μM], alle Gruppen $n = 8$, * $p < 0,05$ versus Kon, modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

In der 3. Kohorte wurde überprüft, ob die Kardioprotektion durch Ramelteon mit dem Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol aufgehoben wird. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 15 dargestellt. Es wurde die niedrigste protektive Dosis von Ramelteon benutzt (0,03 μ M). Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination mit Luzindol die Infarktgrößenreduktion vollständig aufhebt (Ram + Luz: $55 \pm 7\%$, $p < 0,001$ versus Ram: $38 \pm 7\%$). Luzindol alleine besitzt keinen Einfluss auf die Infarktgröße (Luz: 56 ± 6 , ns versus Kon: $60 \pm 6\%$).

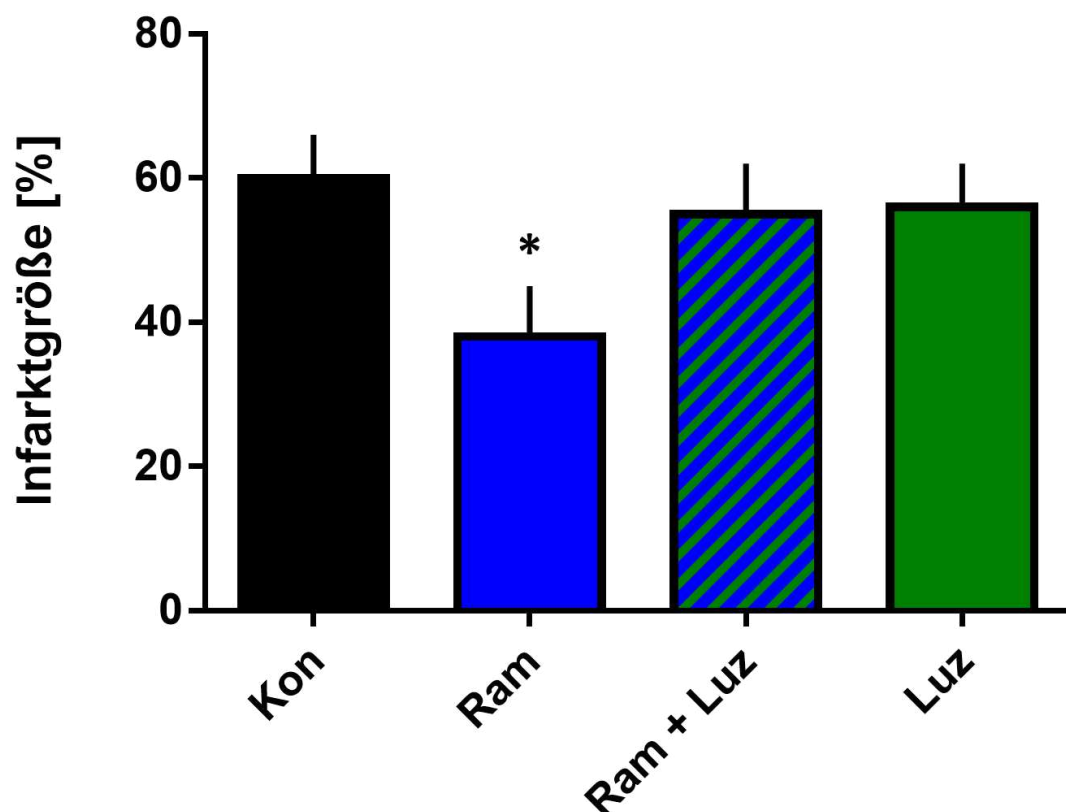


Abb. 15 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon 0,03 μ M, Luz = Luzindol 5 μ M, alle Gruppen n = 5, * $p < 0,05$ versus Kon, modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

Die 4. Kohorte diente zur abschließenden Überprüfung, ob die mitochondrialen Kaliumkanäle, der mK_{Ca} - und der mK_{ATP} -Kanal, an der protektiven Signalkaskade beteiligt sind. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Applikation von Paxillin ($1\ \mu\text{M}$), einem mK_{Ca} -Kanal Inhibitor, hob die Ramelteon-induzierte ($0,03\ \mu\text{M}$) Infarktgrößenreduktion vollständig auf (Pax + Ram: $54\pm 11\%$, $p<0,0001$ versus Ram: $26\pm 6\%$). Auch bei der Kombination aus mK_{ATP} -Kanal Inhibitor 5-HD ($100\ \mu\text{M}$) mit Ramelteon war keine Infarktgrößenreduktion erkennbar (5-HD + Ram: $49\pm 11\%$, $p<0,0001$ versus Ram). Die beiden Inhibitoren haben alleine keinen Einfluss auf die Infarktgröße (Pax: $53\pm 4\%$, 5-HD: $56\pm 10\%$, ns versus Kon: $56\pm 10\%$). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl der mK_{Ca} - als auch der mK_{ATP} -Kanal an der Signalvermittlung beteiligt sind.

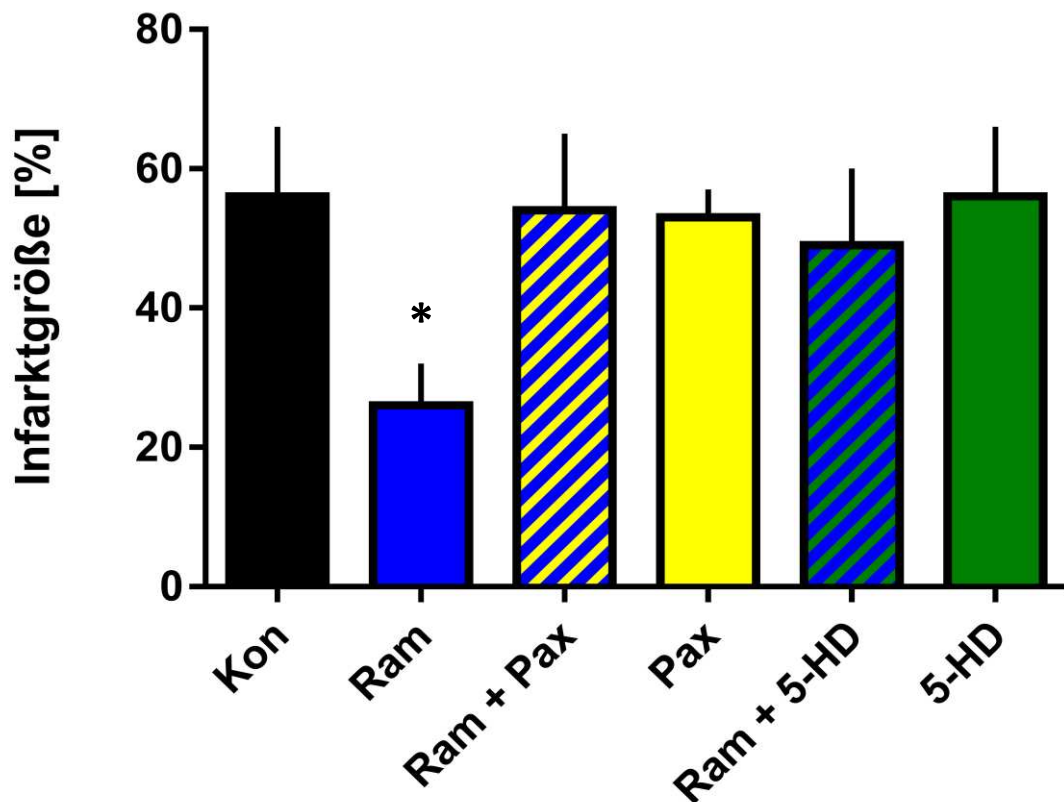


Abb. 16 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon $0,03\ \mu\text{M}$, Pax = Paxillin $1\ \mu\text{M}$, 5-HD = 5-Hydroxydecanoat $100\ \mu\text{M}$, alle Gruppen $n = 8-9$, $*p<0,05$ versus Kon, modifiziert nach [82], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

3.3 Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon

In der dritten Publikation gab es zwei Versuchsreihen und in der ersten Reihe wurde die Beteiligung von PKG und Akt am Ramelteon-induzierten Signalweg untersucht. Hierfür wurde Ramelteon mit dem PKG-Inhibitor KT5823 oder dem Akt-Inhibitor MK2206 in Kombination appliziert. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 17 dargestellt. In der Kontrollgruppe (Kon) lag die Infarktgröße bei $56 \pm 14\%$ und die niedrigste protektive Dosis von Ramelteon (Ram, $0,03 \mu\text{M}$) reduzierte die Infarktgröße auf $28 \pm 7\%$ ($p < 0,0001$ versus Kon). Die beiden Inhibitoren von PKG und Akt hoben die Infarktgrößenreduktion durch Ramelteon vollständig auf (KT+Ram: $48 \pm 5\%$, $p = 0,0012$ versus Ram und MK+Ram: $49 \pm 8\%$, $p < 0,05$ versus Ram). Beide Inhibitoren haben bei alleiniger Applikation keinen Einfluss auf die Infarktgrößen (KT: $51 \pm 6\%$, $P = 0,9311$ versus Kon und MK: $52 \pm 3\%$, $P = 0,9734$ versus Kon). Somit sind beide Kinasen, PKG und Akt, an der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion beteiligt.

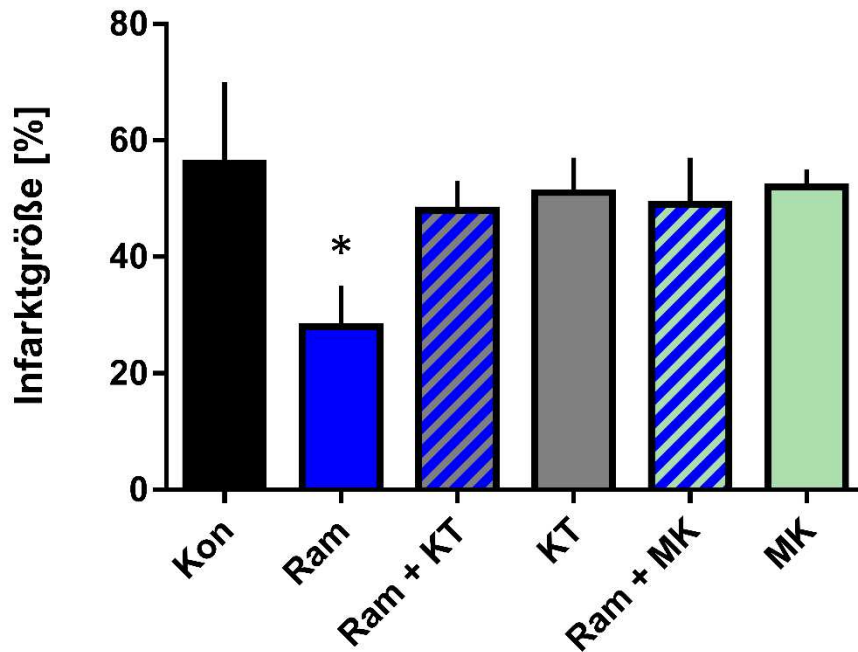


Abb. 17 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon 0,03 μ M, KT = KT5823 1 μ M [84], MK = MK2206 15nM [85]; alle Gruppen n = 6, * $p < 0,05$ versus Kon, modifiziert nach [86], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

In der zweiten Kohorte wurde zum einen die Reihenfolge der Kinasen im Signalweg überprüft und zum anderen, ob beide Kinasen proximal des mK_{Ca} -Kanals im Signalweg zu finden sind. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 18 dargestellt. Der indirekte PKG-Aktivator BAY60-2770 reduzierte die Infarktgröße auf $33 \pm 6\%$ gegenüber der Kontrolle Kon von $48 \pm 5\%$ ($p < 0,05$ vs. Kon). Die Kombination von BAY60-2770 mit Ramelteon und Akt-Inhibitor MK2206 reduzierte ebenfalls signifikant die Infarktgröße auf $31 \pm 11\%$ gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$ vs. Kon). Dies deutet daraufhin, dass PKG im protektiven Signalweg nachgeschaltet zu Akt gelegen sein muss. Zur Klärung, ob beide Kinasen zum mK_{Ca} -Kanal im Signalweg vorgeschaltet sind, wurden die jeweiligen Inhibitoren und Ramelteon mit NS1619 als mK_{Ca} -Aktivator kombiniert. Die Kombination von MK2206 (Akt-Inhibitor) mit Ramelteon und NS1619 reduzierte die Infarktgröße auf $29 \pm 5\%$ ($p < 0,05$ vs. Kon). Eine ähnliche Reduktion zeigte die Kombination von KT5823 (PKG-Inhibitor) mit Ramelteon und NS1619

(KT+Ram+NS: 33±6%; $p < 0,05$ vs. Kon). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Kinasen, PKG und Akt, im vorgeschalteten Signalweg vom mK_{Ca} -Kanal zu finden sind.

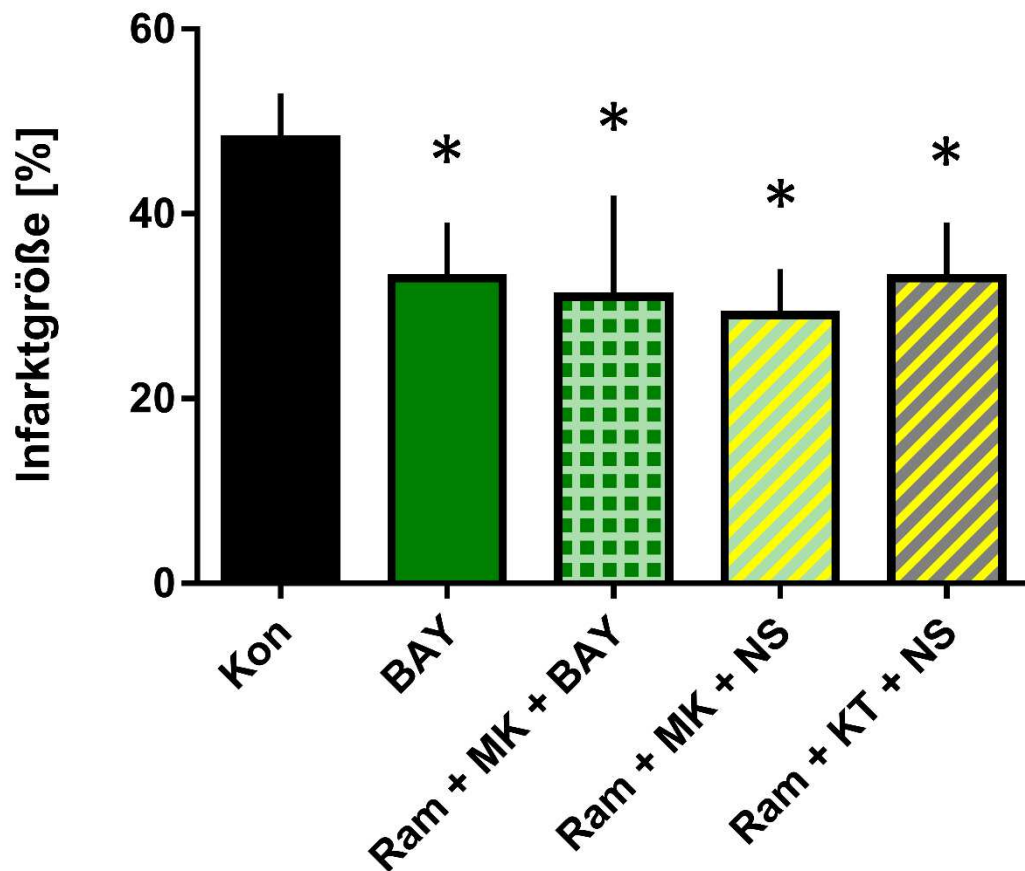


Abb. 18 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon 0,03 μ M, BAY = BAY60 2770 5nM [87], KT = KT5823 1 μ M [84], MK = MK2206 15nM [85], NS = NS1619 10 μ M; alle Gruppen n = 6, * $p < 0,05$ versus Kon, modifiziert nach [86], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

3.4 Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung und reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion

In der vierten Publikation wurde die Bedeutung des Melatonin-Rezeptor Typ 2 (MT2) und reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Protektion untersucht. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 19 und 20 dargestellt.

In der ersten Kohorte wurde an der Langendorff-Anlage Ramelteon mit dem selektiven MT2-Inhibitor 4P-PDOT kombiniert. Diese Kombination hob die Ramelteon induzierte

Infarktgrößenreduktion vollständig auf (4P-PDOT + Ram $53 \pm 8\%$, $p < 0,05$ vs. Ram $34 \pm 7\%$). 4P-PDOT hatte alleine appliziert keinen Einfluss auf die Infarktgröße (4P-PDOT $55 \pm 7\%$, ns vs. Kon $53 \pm 13\%$). Das protektive Signal scheint über den MT2-Rezeptor vermittelt zu werden.

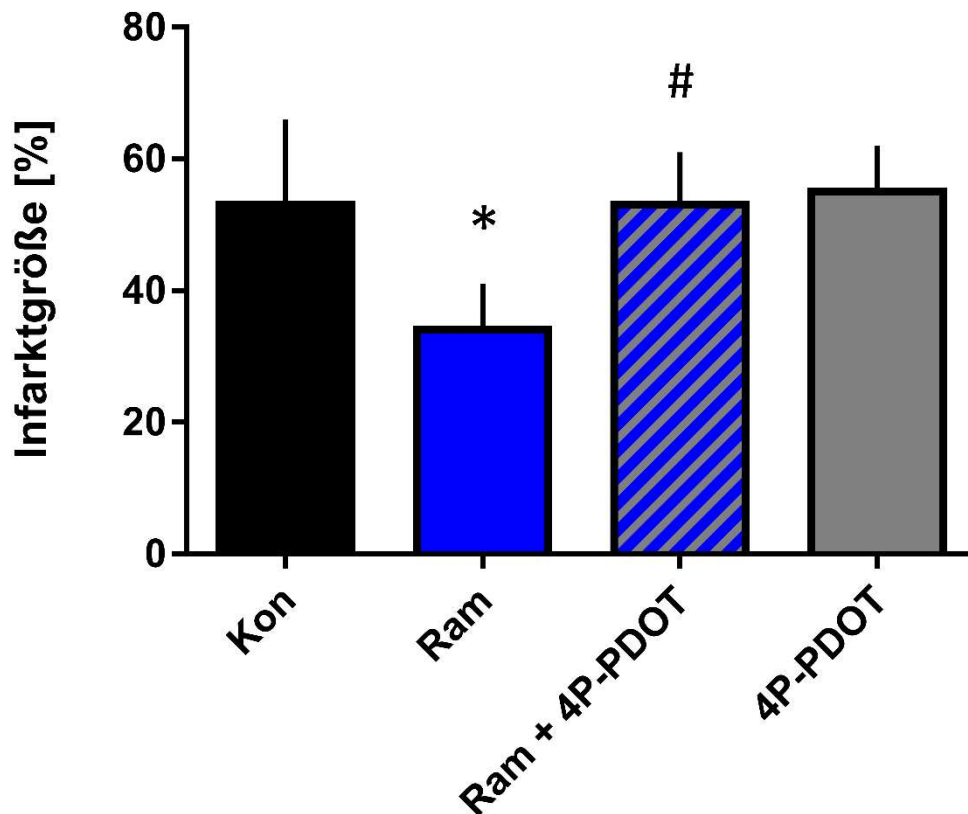


Abb. 19 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon $0,03 \mu\text{M}$, 4P-PDOT = 4-phenyl-2-propionamidotetralin $1 \mu\text{M}$ [89, 90]; alle Gruppen $n = 6-7$, * $p < 0,05$ versus Kon, # $p < 0,05$ vs. Ram; modifiziert nach [91], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

In der zweiten Kohorte sollte die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies ermittelt werden. Dafür kombinierten wir den Radikalfänger MPG mit Ramelteon an der Langendorff-Anlage. In der Kombination mit dem Radikalfänger wurde die Infarktgrößenreduktion durch Ramelteon vollständig aufgehoben (s. Abb. 20, MPG + Ram: $48 \pm 5\%$, # $p < 0,05$ vs. Ram: $29 \pm 7\%$). Somit scheinen reaktive Sauerstoffspezies essenziell für die Vermittlung kardioprotektiver Signale durch Ramelteon zu sein.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die durch MPG aufgehobene Protektion mit dem mPTP Inhibitor Cyclosporin A (CsA) wieder hergestellt werden kann. Die Kombination aus Ramelteon, MPG und CsA Gabe vor der Globalischämie (CsAe) zeigte keine Wiederherstellung der Protektion und die Infarktgröße ist vergleichbar mit der Kontrollgruppe (MPG+Ram+CsAe: $47 \pm 9\%$; ns vs. Kon: $53 \pm 8\%$). Hingegen zeigte eine Kombination aus Ramelteon, MPG und CsA Gabe nach der Globalischämie und in der frühe Reperusionsphase (CsAI) eine signifikante Infarktgrößenreduktion (MPG+Ram+CsAI: $34 \pm 5\%$, § $p < 0,05$ vs MPG+Ram: $48 \pm 5\%$).

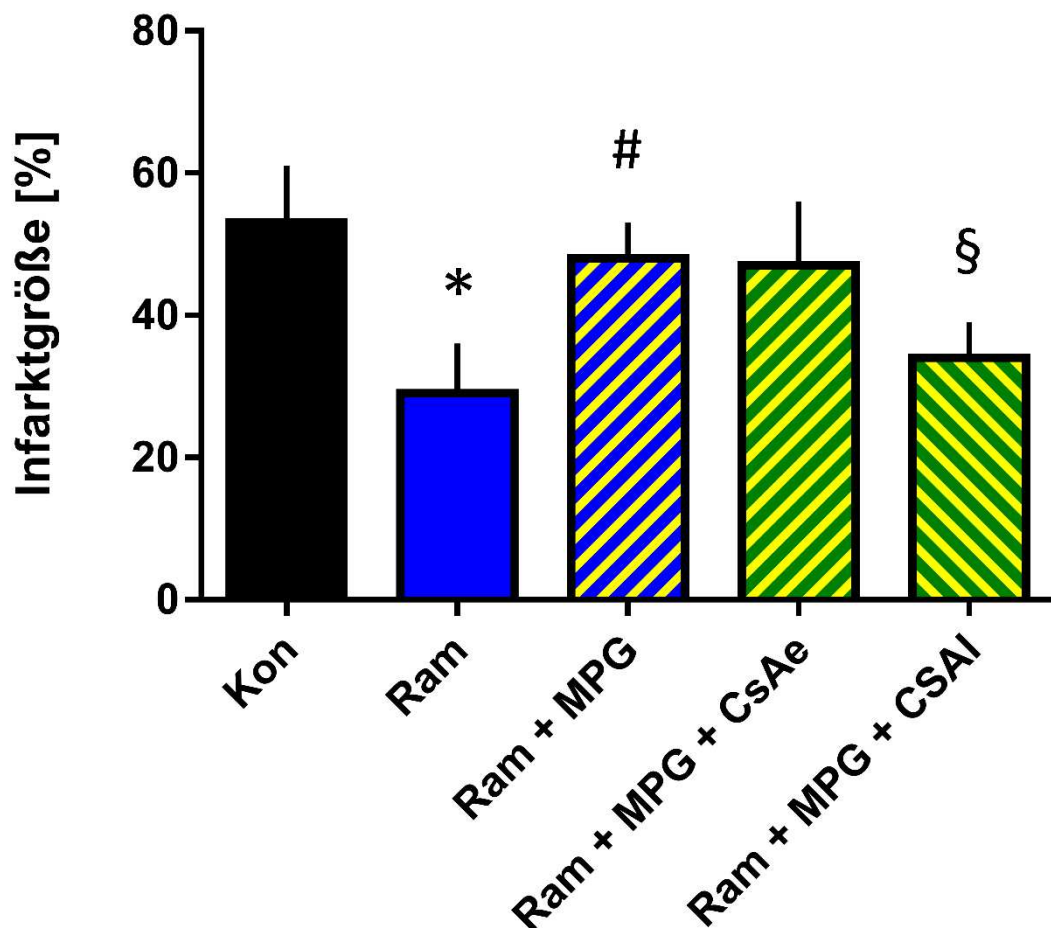


Abb. 20 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, Ram = Ramelteon $0,03 \mu\text{M}$, MPG = N-2-mercaptopropionylglycine 1mM [92], CsA = Cyclosporin A $0,2\mu\text{M}$ [94] (CsAe = CsA early, CsAI = CsA late); alle Gruppen $n = 6-7$, * $p < 0,05$ versus Kon, # $p < 0,05$ vs. Ram, § $p < 0,05$ vs. Ram+MPG; modifiziert nach [91], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

3.5 Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil

Die fünfte Publikation untersuchte die kardioprotektiven Eigenschaften des Myosin-Aktivators OM. Die Ergebnisse der Infarktgrößenmessung sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt.

In einer ersten Kohorte wurde die niedrigste protektive Konzentration von OM ermittelt und die Frage geklärt, ob OM einen dosisabhängigen, protektiven Effekt besitzt. Die Kontrollgruppe zeigte eine Infarktgröße von $60 \pm 10\%$. OM mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zeigte eine signifikante Infarktgrößenreduktion und damit die niedrigste protektive Konzentration (OM10: $33 \pm 8\%$, $p < 0,05$ vs. Kon). Die höhere Konzentration von OM ($30 \mu\text{M}$) zeigte einen ähnlichen Effekt wie $10 \mu\text{M}$ und somit keine stärkere Protektion (OM30: $32 \pm 8\%$, $p < 0,05$ vs. Kon und ns vs. OM10). Geringere Konzentrationen von OM (1 oder $3 \mu\text{M}$) zeigten keine Infarktgrößenreduktion (OM1: $60 \pm 4\%$, OM3: $59 \pm 5\%$, ns vs. Kon).

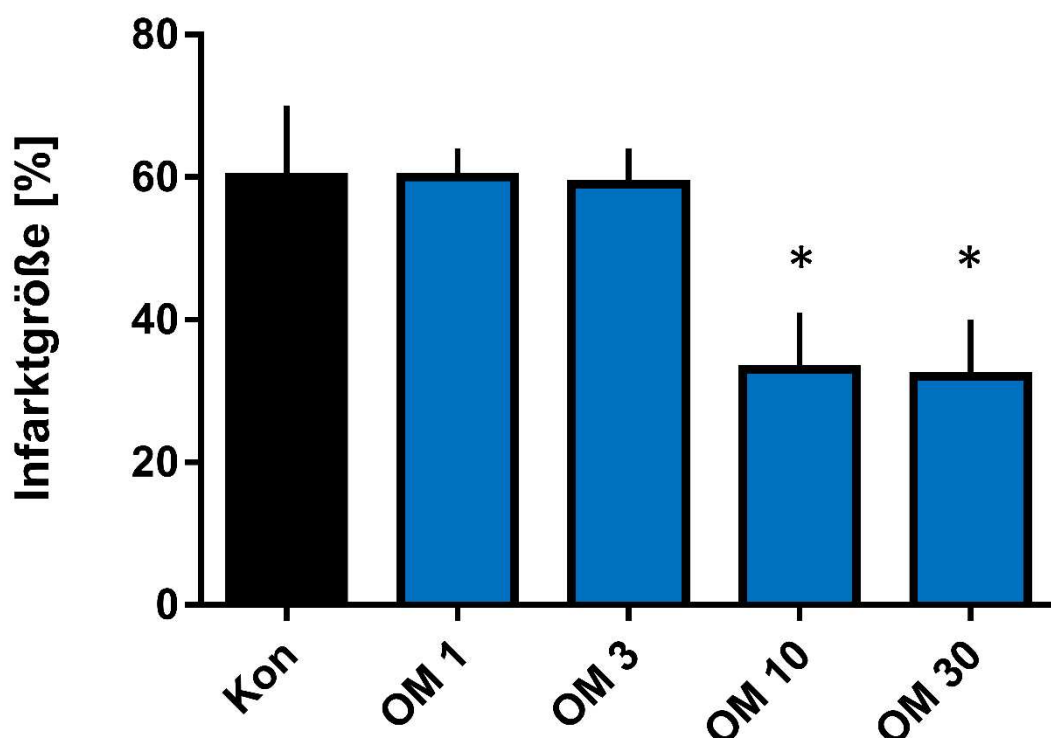


Abb. 21 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecamtiv mecarbil [μM]; alle Gruppen $n = 6$, * $p < 0,05$ versus Kon; modifiziert nach [95], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob auch nach der Globalischämie und in der frühen Reperfusionphase eine Kardioprotektion durch OM ausgelöst werden kann. Eine Applikation von 10 μ M OM in der frühen Reperusionsphase zeigte ebenfalls eine signifikante Infarktgrößenreduktion (OM10: $31 \pm 6\%$, $p < 0,05$ vs. Kon: $59 \pm 12\%$). Die geringere Konzentration von OM (3 μ M) löste ebenso wie in der ersten Kohorte keine Protektion aus (OM3: $58 \pm 15\%$, ns vs. Kon).

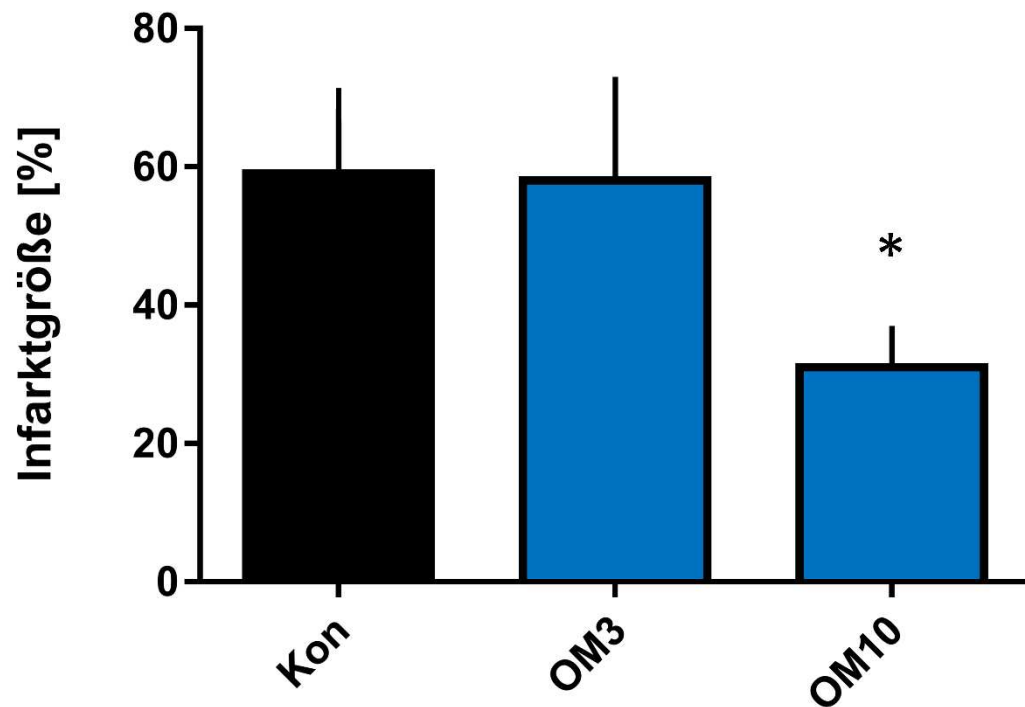


Abb. 22 Ergebnisse der Infarktgrößenmessung, die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecantiv mecarbil [μ M]; alle Gruppen $n = 8$, * $p < 0,05$ versus Kon; modifiziert nach [95], mit freundlicher Genehmigung des Verlags

3.5.1 Hämodynamik

In beiden Kohorten war in der Reperfusion im Vergleich zur Stabilisierungsphase der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) signifikant erhöht und der Koronarfluss signifikant erniedrigt (alle $p < 0,05$ vs. Stabilisierungsphase). Die Herzfrequenz war in beiden Kohorten innerhalb der Gruppen und Zeitpunkte nicht signifikant verändert (s. Tabelle 1). Während der Stabilisierungsphase in der Gruppe mit 3 bzw. 10 μM OM war der Koronarfluss signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dies zeigte sich auch während der Präkonditionierung mit 1 bzw. 3 μM OM ($p < 0,05$ vs. Kon.). Die Applikation von 3, 10 und 30 μM OM sorgte für eine signifikante Steigerung des LVEDP gegenüber der Kontrollgruppe bzw. der Gruppe mit 1 μM OM (s. Tabelle 2, $p < 0,05$)

Tabelle 1 Hämodynamische Variablen Dosisfindung OM (modifiziert nach [95] mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecamtic mecarbil mit entsprechender Konzentration in [μ M], PC = Präkonditionierung, Mittelwerte $\pm$ SD, n = 6-8 pro Gruppe, * = p<0,05 vs. Stabilisierungsphase, # = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe

	Stabilisierungsphase	PC	Reperfusion	
			30	60
Herzfrequenz (min ⁻¹)				
Kon	309 ± 40	314 ± 31	275 ± 39	272 ± 29
OM1	330 ± 39	314 ± 55	287 ± 61	261 ± 54
OM3	328 ± 29	313 ± 27	281 ± 56	284 ± 53
OM10	332 ± 45	292 ± 44	230 ± 56	287 ± 42
OM30	320 ± 55	295 ± 62	222 ± 92	275 ± 66
LVEDP (mmHg)				
Kon	4 ± 1	5 ± 2	116 ± 13*	102 ± 9*
OM1	5 ± 1	14 ± 9	113 ± 17*	98 ± 13*
OM3	5 ± 1	68 ± 17*#	96 ± 30*	83 ± 25*
OM10	6 ± 1	79 ± 8*#	85 ± 19*#	72 ± 15*#
OM30	4 ± 1	79 ± 8*#	82 ± 25*#	76 ± 20*#
Koronarfluss (mL/min)				
Kon	13 ± 2	12 ± 2	7 ± 1*	6 ± 2*
OM1	14 ± 2	16 ± 3 [‡]	7 ± 2*	6 ± 1*
OM3	14 ± 3	14 ± 3 [‡]	9 ± 2*	8 ± 2*
OM10	16 ± 2 [‡]	11 ± 2	10 ± 2*#	9 ± 2*#
OM30	16 ± 2 [‡]	14 ± 1	10 ± 3*#	10 ± 1*#

Tabelle 2 Hämodynamische Variablen Postkonditionierung (modifiziert nach [95] mit freundlicher Genehmigung des Verlags). Kon = Kontrollgruppe, OM = Omecamtic mecarbil mit entsprechender Konzentration in [μ M], Mittelwerte $\pm$ SD, n = 8 pro Gruppe, * = p < 0,05 vs. Stabilisierungsphase

Stabilisierungsphase		Reperfusion		
		30	45	60
Herzfrequenz (min ⁻¹)				
Kon	323 ± 32	220 ± 78*	271 ± 33	278 ± 51
OM3	320 ± 32	231 ± 51	257 ± 37	261 ± 56
OM10	312 ± 23	205 ± 55*	211 ± 58	220 ± 72
LVEDP (mmHg)				
Kon	4 ± 1	90 ± 23*	82 ± 19*	81 ± 19*
OM3	5 ± 2	81 ± 27*	78 ± 23*	75 ± 22*
OM10	5 ± 1	92 ± 18*	85 ± 17*	83 ± 14*
Koronarfluss (ml/min)				
Kon	16 ± 2	9 ± 2*	9 ± 2*	8 ± 2*
OM3	16 ± 2	11 ± 4*	10 ± 4*	9 ± 4*
OM10	17 ± 2	11 ± 2*	9 ± 2*	9 ± 2*

4 Diskussion

Herz-Kreislaferkrankungen, die auch den akuten Myokardinfarkt umfassen, zählen weltweit zu den führenden Todesursachen. Damit stellen die Herz-Kreislaferkrankungen eine der größten medizinischen wie auch wirtschaftlichen Belastungen für das Gesundheitssystem dar.

Im Falle einer akuten Myokardischämie ist die schnellstmögliche Wiederherstellung der Perfusion die einzige kausale Therapieoption. Diese Reperfusion sorgt allerdings paradoxerweise ebenfalls für eine Schädigung des Myokards und dies wird als Ischämie- und Reperfusionsschaden (IR-Schaden) zusammengefasst. Es existiert ein endogener Schutzmechanismus, der durch kurze nicht letale Ischämie- und Reperusionsphasen vor oder nach der länger andauernden Ischämiephase einen ausgeprägten Schutz des Myokards vor dem Ischämie- und Reperfusionsschaden bietet. Dieser Mechanismus ist der stärkste bekannte Schutz und wurde 1986 erstmals von Murry und Kollegen als ischämische Konditionierung beschrieben [3]. Abgesehen von speziellen klinischen Szenarien wie beispielsweise der koronaren Herzkatheteruntersuchung oder herzchirurgischer Bypass-Operationen ist dieses Verfahren invasiv und im klinischen Alltag nicht regelhaft durchführbar. Eine Alternative, vor allem im Hinblick auf eine klinische Implementierung, stellt die pharmakologische Konditionierung dar. Diese aktiviert gezielt und nicht invasiv jene Signalwege, die möglicherweise auch durch eine ischämische Konditionierung aktiviert werden. Die vorliegende Arbeit hat sich mit neuen Möglichkeiten der pharmakologischen Konditionierung durch Ramelteon und Omecamtiv mecarbil beschäftigt und soll neue Ansätze liefern, um das Myokard vor einem Ischämie- und Reperfusionsschaden besser schützen zu können.

4.1 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren

In der ersten Publikation konnte erstmals gezeigt werden, dass Ramelteon als Melatonin-Rezeptor-Agonist einen kardioprotektiven Effekt besitzt und dieser über Melatonin-Rezeptoren vermittelt wird [81].

Melatonin, ein Hormon der Glandula pinealis, besitzt unter anderem durch die Eigenschaft als Radikalfänger die Fähigkeit, einen Ischämie- und Reperfusionsschaden zu reduzieren [96, 97]. Es konnte bereits in der Vergangenheit mehrfach gezeigt werden,

dass Melatonin auch am Myokard protektiv im Rahmen einer Ischämie wirken kann [98, 99]. Sowohl der Anstieg des Melatoninspiegels im Plasma bzw. im linken Ventrikel als auch eine Zunahme der MT1-RNA-Expression nach Myokardischämie unterstreichen zusätzlich die mögliche Bedeutung von Melatonin im Rahmen der Kardioprotektion [74].

In der ersten Publikation konnte mit dem etablierten Langendorff-Modell des isoliert perfundierten Herzens gezeigt werden, dass 5 μ M Melatonin eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Sinne einer Kardioprotektion auslösen kann. Diese Konzentration für Melatonin wurde bereits als kardioprotektiv beschrieben [71] und in der frühen Reperfusionsphase appliziert. Luzindol, als Melatonin-Rezeptor-Antagonist, konnte diesen Melatonin-induzierten Effekt vollständig aufheben. Die Protektion durch Melatonin scheint somit über Melatonin-Rezeptoren vermittelt zu werden. Dies konnte auch in der Vergangenheit in anderen Arbeiten beobachtet werden [59, 71, 73]. Die alleinige Gabe von Luzindol führte nicht zu einer Infarktgrößenreduktion. Allerdings besitzt Luzindol antioxidative Eigenschaften [63], so dass eine eigene protektive Eigenschaft von Luzindol nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Diese kann möglicherweise mit dem hier gewählten Endpunkt, der Infarktgröße, nicht vollständig erfasst werden.

Ramelteon ist ein Melatonin-Rezeptor-Agonist, der als schlafinduzierendes Medikament entwickelt worden ist und für diese Indikation klinisch eingesetzt wird [55]. Die pharmakologische Besonderheit ist, dass Ramelteon selektiv an Melatonin-Rezeptoren Typ 1 und 2 (MT1 / MT2) bindet [62] und lediglich vernachlässigbare Bindungen an andere Rezeptoren zeigt [55]. Für Ramelteon wurden bisher keine kardioprotektiven Eigenschaften untersucht oder in der Literatur beschrieben. Wir konnten erstmals mit Publikation 1 zeigen, dass Ramelteon eine signifikante Infarktgrößenreduktion im Sinne einer Kardioprotektion auslösen kann, indem es in der frühen Reperfusionsphase appliziert wird. Das Ausmaß der Infarktgrößenreduktion in unserer Versuchsreihe ist vergleichbar mit der Reduktion durch Melatonin.

Zusammengefasst zeigt Melatonin vielfache Wirkungen unabhängig von Rezeptorbindungen, wie beispielsweise als Radikalfänger oder als Aktivator zellulärer antioxidativer Kaskaden [65]. Ramelteon scheint hingegen keine direkte antioxidative Wirkung zu haben [63]. So weisen unsere Ergebnisse daraufhin, dass der protektive Effekt von Ramelteon über Melatonin-Rezeptoren vermittelt wird. Unterstrichen wird

dies auch durch die Feststellung, dass der protektive Effekt durch Luzindol vollkommen aufgehoben wird. Zusammenfassend löst Ramelteon somit einen protektiven Effekt im Sinne einer Postkonditionierung in der frühen Reperfusionsphase aus und dieser Effekt wird über Melatonin-Rezeptoren vermittelt.

4.2 Kardioprotektiver Effekt von Ramelteon durch Aktivierung von mitochondrialen Kaliumkanälen

Neben dieser Erstbeschreibung der protektiven Effekte von Ramelteon im Sinne einer Postkonditionierung, konnte in der Publikation 2 gezeigt werden, dass eine Applikation von 5 μM Ramelteon auch vor einer Ischämie eine Protektion auslösen kann. Somit wirkt Ramelteon protektiv durch Prä- als auch durch Postkonditionierung. Die Infarktgrößenreduktion ist bei beiden Fällen auf ähnlichem Niveau.

In einem weiteren Schritt wurde die niedrigste protektive Konzentration von Ramelteon im verwendeten Langendorff-Modell ermittelt. Diese niedrigste protektive Dosis sollte dann in weiteren Untersuchungen verwendet werden, um mögliche unerwünschte Wirkungen zu minimieren und einen Effekt durch Überstimulation zu vermeiden. Zudem sollte ein möglicher konzentrationsabhängiger protektiver Effekt untersucht werden.

Ramelteon zeigt eine niedrigste protektive Dosis von 0,03 μM . Höhere Konzentrationen haben keinen stärkeren protektiven Effekt auf die Infarktgröße. Die Protektion wird somit ab einer Konzentration von 0,03 μM nach dem „Alles-oder-Nichts Prinzip“ ausgelöst.

Mitochondriale Kaliumkanäle konnten in der Vergangenheit als wichtige Bausteine in der Vermittlung kardioprotektiver Signale identifiziert werden [12, 42]. Insbesondere sind hier die mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mK_{ATP} -Kanal)[40] und die kalziumabhängigen Kaliumkanäle (mK_{Ca} -Kanal)[39] zu nennen. Eine Aktivierung und Öffnung dieser mitochondrialen Kaliumkanäle führen zu einer Inhibierung einer mPTP -Öffnung und sind damit ein zentraler Schritt der Kardioprotektion [38, 100]. Die genauen Mechanismen und Interaktionen der mitochondrialen Kaliumkanäle und mPTP sind nicht vollständig verstanden. Im Kontext der mK_{Ca} -Kanäle gibt es Hinweise auf ROS-Triggersignale, die durch Öffnung der Kaliumkanäle ausgelöst werden, wodurch wiederum in der Folge eine Ca^{2+} -Überladung und eine massive ROS-Freisetzung in der späten Ischämie- und frühen Reperfusionsphase verhindert werden [43]. Sowohl eine

Regulation des mitochondrialen Ca^{2+} -Gehaltes als auch der ROS-Freisetzung sind Faktoren, die durch den mK_{Ca} -Kanal beeinflusst werden, [44] und die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP reduzieren [11, 37]. Weitere zelluläre Bedingungen, die eine mPTP-Öffnung triggern können, sind ein ATP-Mangel [35], erhöhte Phosphat-Konzentration [11] und ein ansteigender pH-Wert [10]. Diese Konstellation herrscht vor allem in der frühen Reperusionsphase.

Bisher existieren wenige Hinweise auf eine funktionelle Verbindung von Melatonin und mK_{Ca} - oder mK_{ATP} -Kanälen [101, 102], allerdings nicht im Kontext der Kardioprotektion. Zu Ramelteon existieren dazu bisher keine Untersuchungen. In der Publikation 2 konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion sowohl der mK_{Ca} - als auch der mK_{ATP} -Kanal eine entscheidende Rolle in der Signalvermittlung einnimmt. Durch Blockade des mK_{ATP} -Kanals mittels 5-HD und des mK_{Ca} -Kanals mittels Paxillin wird die Infarktgrößenreduktion durch Ramelteon vollständig aufgehoben. Die Blocker alleine haben keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Somit scheinen beide Kanäle einen entscheidenden Schritt in der untersuchten Signalkaskade zu repräsentieren.

Interessant an diesem Ergebnis ist, dass für eine protektive Signalvermittlung scheinbar die Aktivierbarkeit beider Kanäle entscheidend ist. Sobald einer der beiden Kanäle blockiert wird, kommt es zu keiner erfolgreichen protektiven Signalvermittlung. Ein ähnliches Phänomen wurde ebenfalls durch Wang und Kollegen beschrieben [42]. An isolierten Mausherzen wurde im Langendorff-Modell eine Globalischämie ausgelöst. Der mK_{ATP} -Kanal wurde mit 5-HD und der mK_{Ca} -Kanal mit Paxillin blockiert und in beiden Fällen die Kardioprotektion durch Sildenafil vollständig aufgehoben. Möglicherweise existiert hier ein Synergismus beider Kaliumkanäle, so dass für eine protektive Vermittlung beide Kanäle aktiviert werden müssen, auch wenn man bisher von einer parallelen Aktivierung ausgegangen ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass nur bei einer gleichzeitigen Aktivierung beider Kanäle eine Schwelle überwunden wird, so dass die protektiven Signale weitergeleitet werden. Bei einer Aktivierung nur eines Kanals wird diese Schwelle möglicherweise nicht überwunden. In ähnlicher Weise argumentieren auch Wang und Kollegen [42]. Eine wechselseitige Einflussnahme verschiedener Signalschritte ist ein bekanntes Phänomen in der Vermittlung kardioprotektiver Signale. Schaut man sich die propagierten Signalwege RISK und SAFE genauer an, so fällt auf, dass auch hier eine gegenseitige Beeinflussung existiert. Tamareille und Kollegen haben

den Einfluss der lokalen ischämischen Postkonditionierung (IPostC) und ischämischen Fern-perkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPer) auf den IR-Schaden verglichen [103]. Sie nutzten ein *in vivo* Modell in der Ratte mit einer lokalen Myokardischämie. In der Kombination von IPostC mit RIPer und einem RISK-Inhibitor (Wortmannin) wird nicht nur die Kardioprotektion aufgehoben, sondern gleichzeitig auch die Phosphorylierung von STAT-3, die Teil des SAFE-Signalweges ist. Im Gegensatz blockiert ein SAFE-Inhibitor (AG490) ebenfalls die Kardioprotektion und auch die Phosphorylierung von Akt und GSK-3 β , die Teile des RISK Signalweges sind [103]. An diesem Beispiel sieht man die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Signalwege und die große Herausforderung, die eine exakte Entschlüsselung der kardioprotektiven Signalvermittlung darstellt. Die Signalschritte der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion sollten in weiteren Untersuchungen aufgeschlüsselt werden, denn eine exakte Identifizierung der Signalschritte von Ramelteon ermöglicht auch eine Aussage über mögliche Beeinflussungen der kardioprotektiven Potenz.

4.3 Beteiligung von PKG und Akt an der Kardioprotektion durch Ramelteon

Mithilfe der Daten aus Publikation 1 und 2 konnte gezeigt werden, dass die Ramelteon-induzierte Signalkaskade mit der Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren initiiert wird und dass in der Folge mitochondriale Kaliumkanäle (mK_{Ca}- / mK_{ATP}-Kanal) aktiviert werden, wodurch die mPTP-Öffnung verhindert wird. Die Signalschritte zwischen den Melatonin-Rezeptoren und mitochondrialen Kaliumkanälen wurde mit der Publikation 3 genauer untersucht.

Für die Melatonin-induzierte Kardioprotektion ist beschrieben, dass der Signalweg der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängigen Proteinkinase (PKG) einen entscheidenden Schritt einnimmt [104]. Zudem ist PKG ein Regulatorprotein des mK_{Ca}-Kanals [84, 105, 106]. Die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt wirkt kardioprotektiv, schützt vor einem IR-Schaden [107, 108] und ist beteiligt an einer pharmakologischen Präkonditionierung wie beispielweise durch Remifentanyl [109]. Auch das kardioprotektiv wirkende Sildenafil [84], ein Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Hemmer), vermittelt seine Protektion über eine Phosphorylierung von Akt [110]. Zudem führt eine PDE-5-Hemmung zu erhöhten cGMP-Spiegeln, die wiederum zur

PKG-Aktivierung führen. Somit werden beide Proteine, PKG und Akt, durch Sildenafil, einem kardioprotektiven Agens, beeinflusst und könnten auch in anderen protektiven Signalwegen entscheidende Schritte repräsentieren.

Die Ergebnisse aus Publikation 3 zeigen, dass sowohl PKG als auch Akt essenzielle Signalschritte in der Kaskade der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion einnehmen. Durch gezielte Blockade eines der beiden Proteine wird die Infarktgrößenreduktion vollständig aufgehoben. KT5823 ist ein potenter, spezifischer Inhibitor der PKG. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wird mit 60 nM und die Inhibitorkonstante (K_i) mit 234 nM angegeben [111, 112]. Es werden ebenfalls Einflüsse von KT5823 auf PKA und PKC beschrieben. Diese sind allerdings erst bei deutlich höherer Konzentration von KT5823 von Bedeutung (K_i PKC: 4 μ M und K_i PKA >10 μ M) [112], so dass bei den vorliegenden Versuchen eine spezifische Wirkung auf PKG angenommen werden kann und PKG einen entscheidenden Schritt in der propagierten Signalkaskade darstellt.

MK2206 ist ebenfalls ein hoch-selektiver Akt-Inhibitor aller drei Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) [85]. Der Inhibitor bindet an die katalytische und regulatorische Domäne und hält die Kinase in einer inaktiven Konformation [85]. In der Literatur gibt es keine Hinweise für inhibitorische Effekt auf andere Kinasen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der protektive Effekt von Ramelteon neben PKG auch über Akt vermittelt wird.

Im zweiten Teil der Publikation 3 zeigte sich, dass Akt vor PKG innerhalb der Signalkaskade aktiviert werden muss (s. Abb. 23). Die gleichzeitige Blockade von Akt durch MK2206 und indirekte Aktivierung von PKG durch BAY60-2770 führt zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion. Wäre Akt nachgeschaltet zu PKG in der Signalkette, hätte durch die Blockade eine Infarktgrößenreduktion ausbleiben müssen.

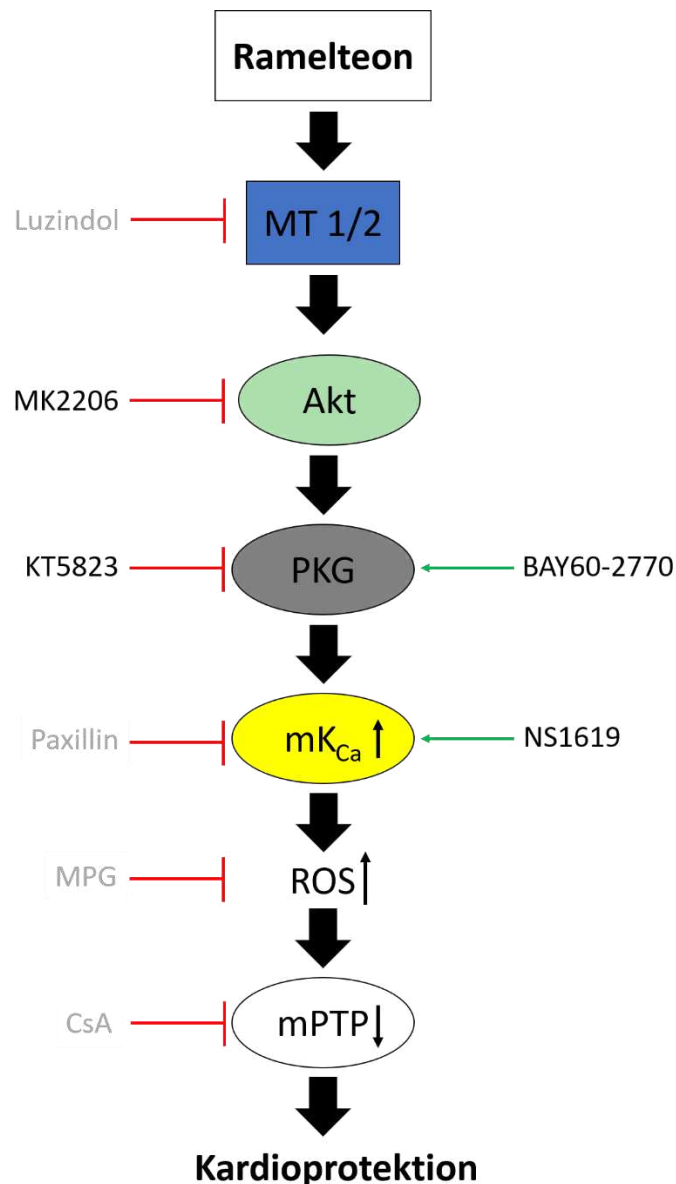


Abb. 23 Vereinfachte Darstellung des möglichen Signalweges der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion, rot bzw. links sind Antagonisten dargestellt, grün bzw. rechts Aktivatoren des jeweiligen Zielproteins, MT1/2 = Melatonin-Rezeptoren 1 und 2, Akt = Proteinkinase B, PKG = Proteinkinase G, mK_{Ca} = mitochondrialer, kalziumabhängiger Kaliumkanal, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, MK2206 = Akt-Inhibitor, KZ5823 = PKG-Inhibitor, BAY60-2770 = indirekter PKG-Aktivator, NS1619 = mK_{Ca}-Kanal-Aktivator, MPG = N-2-Mercaptopropionylglycin, Radikalfänger, CsA = Cyclosporin A (modifiziert nach [86], mit freundlicher Genehmigung des Verlags)

BAY60-2770 ist ein indirekter PKG-Aktivator, da es NO-unabhängig die lösliche Guanylatcyclase (sGC) aktiviert. Diese Molekülgruppe gilt übereinstimmend als

wertvolles Hilfsmittel zur Untersuchung des NO-cGC-cGMP-PKG Signalweges. In der Literatur finden sich vielfach Hinweise, dass BAY60-2770 die PKG-Aktivität erhöht, ohne die Expression von PKG zu steigern [113-115]. In isoliert perfundierten Langendorff-Herzen konnten 2-fach erhöhte cGMP-Spiegel gemessen werden, begleitet von einer erhöhten PKG-Aktivität [87], so dass wir auch in unserem Modell von einer ausreichenden PKG-Aktivierung durch BAY60-2770 ausgehen können.

So zeigt sich, dass die Ramelteon-induzierte Kardioprotektion über Signalwege vermittelt wird, die auch bei der ischämischen Präkonditionierung aktiviert werden. Der für die IPC allgemein akzeptierte RISK-Signalweg vermittelt ebenfalls über Akt und PKG eine Kardioprotektion [26]. Ob allerdings bekannte Zwischenschritte des RISK-Signalweges auch bei Ramelteon von Bedeutung sind, bleibt aktuell ungeklärt. Im RISK-Signalweg aktiviert Akt die PI3-Kinase, die wiederum eNOS, NO und sGC bzw. PKG aktiviert[26].

Wir konnten in dieser Untersuchung darüber hinaus zeigen, dass der mK_{Ca} -Kanal zu PKG nachgeschaltet aktiviert wird. Eine gleichzeitige Gabe von Ramelteon und den Inhibitoren von Akt oder PKG mit dem mK_{Ca} -Kanal Aktivator NS1619 resultiert in einer signifikanten Infarktgrößenreduktion. Folglich muss der mK_{Ca} -Kanal nachgeschaltet zu PKG oder Akt in der Signalkaskade aktiviert worden sein. Unklar ist allerdings, ob es eine direkte Interaktion von PKG und mK_{Ca} -Kanal gibt oder ob noch weitere Zwischenschritte in diesem Signalweg zu finden sind. Hinweise für eine direkte Interaktion von PKG und K_{Ca} -Kanal geben Deenadayalu und Kollegen [105], denn Daten zeigen, dass PKG für eine Phosphorylierung des K_{Ca} -Kanals an Serin 1072 sorgt [116]. Ob diese auch für mitochondriale K_{Ca} -Kanäle des Myokards gilt, ist jedoch bisher unklar.

Der mK_{Ca} -Kanal scheint einer der letzten Signalschritte in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion zu sein. Auch bei der IPC spielt dieser Kanal eine entscheidende Rolle [38]. Allerdings weiß man, dass sowohl im steigenden Alter[54] als auch aufgrund von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, [117] die kardioprotektiven Wirkungen durch IPC verloren gehen. Eine direkte Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals mittels NS1619 kann allerdings die kardioprotektiven Effekte auch im hohen Alter wiederherstellen, [53] und dies unterstreicht damit die zentrale Bedeutung dieses Kaliumkanals. Ob Ramelteon auch im hohen Alter für eine Kardioprotektion durch Signalvermittlung über den mK_{Ca} -Kanal sorgen kann, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Aus translationaler Sicht ist es interessant, dass Nakao und Kollegen herausgefunden haben, dass es einen Zusammenhang zwischen Melatonin und seiner Agonisten im Rahmen endothelialer Dysfunktionen und kardiovaskulärer Erkrankungen gibt. Diese Krankheitsbilder zeigen im steigenden Lebensalter eine erhöhte Prävalenz. Laut Nakao und Kollegen ist ein Angiotensin-II induzierter endothelialer und in der Folge vaskulärer Schaden durch Melatonin wie auch Ramelteon deutlich abgeschwächt [118]. Dies scheint durch indirekte-antioxidative Effekte ausgelöst zu werden [118]. Somit lässt sich zusammenfassen, dass Ramelteon durch Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals zum einen kardioprotektiv wirkt, und dieser Effekt bei direkter Aktivierung auch im Alter eine Kardioprotektion wiederherstellen kann, [53] und zum anderen positive Einflüsse bei kardiovaskulären Erkrankungen zeigt [118]. Dies macht Ramelteon auch im Hinblick auf einen möglichen translationalen klinischen Einsatz interessant.

4.4 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion

Wie bereits erwähnt gibt es Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der mK_{Ca} -Kanäle ROS Triggersignale auslösen und diese eine mPTP-Öffnungswahrscheinlichkeit reduzieren [43]. Eine gewisse, geringe ROS-Freisetzung scheint für die Vermittlung kardioprotektiver Signale nötig zu sein, damit in der späten Ischämie- und frühen Reperusionsphase eine massive ROS-Freisetzung und damit einhergehende Schädigung verhindert wird [119]. In der Publikation 4 konnte nachgewiesen werden, dass Ramelteon durch den Einsatz eines Radikalfängers nicht protektiv wirken kann. Die kombinierte Gabe von Ramelteon und dem Radikalfänger MPG hebt die Infarktgrößenreduktion vollständig auf. Somit sind auch in dieser Signalkaskade ROS von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der bereits erläuterten Daten aus der Literatur kann man davon ausgehen, dass diese ROS eine Rolle in der Vermittlung zwischen mK_{Ca} -Kanal und mPTP spielen. Stowe und Kollegen zeigten, dass eine Kardioprotektion, die über den mK_{Ca} -Kanal vermittelt wird, bei Aktivierung des Kanals zur ROS-Bildung führt [119]. Diese ROS werden als Triggersignal zur Inhibition der mPTP gesehen [43]. Von entscheidender Bedeutung scheint zudem die Menge an ROS zu sein. Ein geringer Anstieg von ROS wird als Triggersignal für eine Kardioprotektion gesehen, so dass in der Folge ein massiver, starker ROS Anstieg und dadurch der Untergang der Zelle verhindert wird [43]. Die

vorliegenden Daten aus Publikation 4 zeigen übereinstimmend auch die Bedeutung von ROS im Rahmen der Ramelteon-induzierten Protektion. Die genaue Rolle von ROS innerhalb der Signalkette von Ramelteon bleibt damit allerdings ungewiss und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Öffnung der mPTP ist assoziiert mit dem Untergang der Zelle und dem Verlust kardioprotektiver Wirkungen. Die vorherigen Daten zeigten, dass bei Einsatz eines effizienten Radikalfängers (z.B. MPG) dieser Zelluntergang stattfindet. Zur Untersuchung, ob eine Kardioprotektion trotz fehlender ROS wiederhergestellt werden kann, wurden Ramelteon und MPG mit dem mPTP Inhibitor CyclosporinA (CsA) kombiniert. Interessanterweise führt die gleichzeitige Gabe aller drei Substanzen vor der Globalischämie zu keiner Kardioprotektion und die Infarktgröße ist auf dem gleichen Niveau der Kontrollgruppe. CsA stellt somit die Kardioprotektion nicht wieder her, wenn es vor der Ischämie appliziert wird (CsAe). Da die Öffnung der mPTP in der frühen Reperfusionphase stattfindet [15], wurde noch eine weitere Versuchsgruppe gebildet, in der CsA in der frühen Reperfusionphase gegeben und Ramelteon und MPG vor der Globalischämie appliziert wurde. Diese spätere Gabe von CsA (CsAl) sorgt für eine ausgeprägte Infarktgrößenreduktion und stellt die Kardioprotektion wieder her.

CsA scheint die Wirkung von MPG nicht direkt zu beeinflussen und die Protektion zu erhalten. Vielmehr lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Wiederherstellung der Infarktgrößenreduktion durch Inhibition der mPTP deutlich nachgeschaltet in der Signalkette abläuft. Die Wirkung von CsA in der frühen Reperfusion, in der die Öffnung der mPTP initiiert werden würde, ist damit am größten. Möglicherweise gibt es auch eine direkte Interaktion von Ramelteon mit CsA. Betrachtet man die Ergebnisse aus klinischer Sicht, so könnte man sagen, dass möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen beiden Substanzen besteht. Auch wenn dies für Ramelteon und CsA in der Literatur bisher nicht explizit genannt wird, weiß man, dass auch konkurrierende Umstände einen protektiven Effekt gänzlich aufheben, wie beispielsweise Hyperglykämie bzw. Diabetes mellitus [117], höheres Lebensalter [54] oder auch Begleitmedikation [120]. Ein anderes Beispiel zeigen Huhn und Kollegen [121]. In deren Arbeit wird der protektive Effekt des inhalativen Anästhetikums Sevofluran durch Hyperglykämie aufgehoben und durch eine CsA Gabe in der frühen Reperfusion wiederhergestellt [121]. Das Ziel der Publikation 4 war jedoch nicht die Interaktion von Ramelteon mit anderen Substanzen bzw.

Komorbiditäten zu untersuchen. Dies sollte in weiteren Arbeiten, auch im Hinblick auf einen möglichen klinischen Nutzen von Ramelteon, erfolgen.

4.5 Bedeutung der MT2-Rezeptor Aktivierung in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion

Ramelteon ist ein spezifischer Melatonin-Rezeptor Agonist und wurde als solcher, ohne Einfluss auf andere Rezeptoren, entwickelt [122]. Es wird beschrieben, dass Ramelteon eine 6-fach höhere Bindungsaffinität zu MT1-Rezeptoren und 3-fach höhere zu MT2 Rezeptoren als Melatonin besitzt [55]. Die Bindungsaffinität zum MT3-Rezeptor ist 110-fach schwächer als die von Melatonin und damit vernachlässigbar [55]. Für Melatonin ist mittlerweile bekannt, dass vor allem der MT2-Rezeptor für die Kardioprotektion entscheidend ist [123, 124]. Nach einer myokardialen Ischämie ist eine erhöhte Expression von MT2-Rezeptoren messbar [124]. Protektive Effekt wie eine geringere Infarktgröße, weniger Arrhythmien und linksventrikuläre Dysfunktionen sind durch eine MT2 Blockade aufgehoben [125].

Es konnte in der Publikation 4 erstmals gezeigt werden, dass der MT2-Rezeptor auch in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade einnimmt. Die gleichzeitige Gabe von Ramelteon und 4P-PDOT hebt die kardioprotektiven Effekte von Ramelteon vollständig auf.

Die MT2 Blockade wurde mit dem selektiven MT2 Blocker 4P-PDOT durchgeführt. Dieser Ligand hat eine 300 bis 1500-fach höhere MT2-Bindungsaffinität als für MT1-Rezeptoren [64]. Ein spezifischer Blocker für den MT1-Rezeptor existiert aktuell nicht. Somit lässt sich nicht sicher sagen, inwieweit die Aktivierung von MT1-Rezeptoren ebenfalls nötig ist. Luzindol als nicht-selektiver Blocker hat zwar eine 15 bis 25-fach höhere Bindungsaffinität für MT2 [64], trotzdem kann es den MT1-Rezeptor effizient blockieren. Es kann aus unseren Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass der MT2-Rezeptor essenziell für die protektive Signaltransduktion von Ramelteon aktiviert werden muss. Ob beide Rezeptoren für eine Kardioprotektion durch Ramelteon nötig sind, können wir mit unseren Daten nicht sicher sagen. Han und Kollegen hingegen konnten zeigen, dass in der Maus durch Gen-Stilllegung (Gen-Silencing) des MT2-Rezeptors die protektiven Effekte von Melatonin in ihrem *in vivo* Regionalischämie-Modell vollständig

aufgehoben sind [124], wohingegen bei der Gen-Stillegung des MT1-Rezeptors Melatonin weiterhin kardioprotektiv ist. Ob diese Erkenntnisse der Signaltransduktion von Melatonin auch für Ramelteon gelten, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Fasst man die Arbeiten zu Ramelteon zusammen, so konnte gezeigt werden, dass die Ramelteon-induzierte Kardioprotektion über Melatonin-Rezeptoren vermittelt wird und dass der MT2-Rezeptor dabei eine entscheidende Rolle spielt. Eine Protektion kann durch eine Applikation von Ramelteon vor der Globalischämie als auch in der frühen Reperfusionphase ausgelöst werden. Der weitere Signalweg wird nach Aktivierung der Melatonin-Rezeptoren über die Proteinkinasen Akt und PKG vermittelt und PKG aktiviert in der Folge mitochondriale Kaliumkanäle (mK_{Ca} - bzw. mK_{ATP} -Kanäle). Reaktive Sauerstoffspezies scheinen nach Aktivierung der Kaliumkanäle entscheidend zu sein, wodurch letztendlich die Öffnung der mPTP verhindert wird und eine Infarktgrößenreduktion im Sinne einer Kardioprotektion messbar wird (s. Abb 23).

4.6 Kardioprotektive Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil

In dieser Publikation konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass OM eine Infarktgrößenreduktion im Sinne einer Kardioprotektion auslöst und dass die niedrigste protektive Konzentration von OM 10 μ M beträgt.

Eine Kardioprotektion durch pharmakologische Prä- oder Postkonditionierung wäre potentiell klinisch einfach umsetzbar, da sie im Gegensatz zur IPC nicht invasiv ist. Neben den vielversprechenden experimentellen Daten in den letzten Jahren, zeigten klinische Studien bisher nicht den erhofften protektiven Effekt [5]. Viele klinisch etablierte Medikamente mit unterschiedlichen Indikationen und Wirkmechanismen zeigten nicht die erhoffte Kardioprotektion in der klinischen Anwendung [126]. Omecamtiv mecarbil ist ein neuer kardialer Myosin-Aktivator und befindet sich aktuell im FDA-Zulassungsverfahren. Für OM wurde 2021 durch Teerlink et al. eine Phase-III-Studie veröffentlicht [127]. OM soll eine neue Therapieoption in der Behandlung der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) bieten. OM ist in der Lage an das Myosin zu binden und damit das Myosinköpfchen in einer Stellung zu fixieren, in der es mit dem Aktin interagiert und es zu einem Kraftschlag kommt. Präklinische Daten zeigen eine Steigerung der kardialen Leistung ohne erhöhten Sauerstoffbedarf des

Myokards durch OM [127]. Aufgrund des epidemiologischen Zusammenhangs von chronischer Herzinsuffizienz und myokardialer Ischämie wurden die möglichen kardioprotektiven Eigenschaften von OM von uns überprüft. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es in der Literatur keine Beschreibung einer direkten kardioprotektiven Potenz von OM. Es gibt lediglich experimentelle Daten, die eine aktivierende Wirkung von OM auf kardiale Ryanodin-Rezeptoren beschreiben [75]. Ryanodin-Rezeptoren sind wiederum involviert in der Kardioprotektion durch Prä- als auch Postkonditionierung [128, 129]. Somit ist unsere Publikation mit OM eine Erstbeschreibung der direkten kardioprotektiven Potenz. Myokardiale Ischämien und Infarkte sind die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz [130] und OM soll in der Zukunft bei genau diesen Patienten mit einer Herzinsuffizienz als neue Therapie eingesetzt werden. Diese Patienten haben ein erhöhtes Risiko einen erneuten Myokardinfarkt zu erleiden und würden von einer gleichzeitigen kardioprotektiven Potenz von OM neben der Herzinsuffizienztherapie zusätzlich profitieren.

Zur weiteren experimentellen Analyse von OM führten wir zunächst eine Konzentrationsfindungsstudie durch, um die niedrigste protektive Konzentration zu ermitteln. Die niedrigste protektive Konzentration beträgt 10 μM . Eine niedrigere Konzentration sorgt für keine Infarktgrößenreduktion und eine höhere Konzentration (30 μM) hat keinen stärkeren protektiven Effekt. Dieser ist somit durch ein „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ charakterisiert.

Diese Konzentrationsfindung wurde durch Applikation von OM vor der globalen Ischämie durchgeführt. Aus klinischer Sicht wäre allerdings eine protektive Anwendung von OM nach einer abgelaufenen Ischämie praktikabler und von größerer potentieller klinischer Relevanz, da myokardiale Ischämien außer bei klinischen Interventionen wie Koronarangiographien oder herzchirurgischen Eingriffen in der Regel nicht vorhersagbar sind. Die Ergebnisse zeigen, dass auch eine Gabe von 10 μM OM nach der Ischämie und in der frühen Reperfusionsphase protektiv ist. Auch hier zeigt sich keine Protektion mit der geringeren Konzentration von 3 μM .

OM bindet an der Aminosäure Serin 148 von kardialem Myosin. Durch diese reversible Bindung kommt es zu einer allosterischen Änderung und dies führt zu einer veränderten Aktivität des Myosins, so dass die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung von Phosphat, ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Kontraktion, schneller abläuft. Diese Kaskade

ist entscheidend für die kardiale Muskelkraftentfaltung und die Erhöhung der Geschwindigkeit sorgt dafür, dass pro Zeiteinheit mehr Myosin-Köpfe an Aktin-Filamente binden und dadurch die Kraftentwicklung ohne Kalziumüberladung zunimmt. Somit erhöht OM die Anzahl der Querbrücken zwischen Myosin und Aktin und verlängert dadurch ebenfalls die Systolendauer. In klinischen Studien konnte festgestellt werden, dass die Verlängerung der Systole auf Kosten der Diastolendauer ein dosislimitierender Faktor ist. Dabei zeigte sich, dass eine Plasmahöchstkonzentration von 0,25 bis 1,25 μM von den Patienten gut toleriert wurde [131], wohingegen in einer Phase-2 Studie Probanden bei einer Plasmakonzentrationen von 3-4 μM Symptome wie Angina pectoris im Sinne einer myokardialen Ischämie angegeben haben [132]. Diese Symptomatik könnte durch die deutlich verkürzte Diastolendauer mit konsekutiv verminderter Koronarperfusion erklärt werden. Auch in dem vorliegenden Langendorff Modell kann man nicht ausschließen, dass die Koronarperfusion bei steigender OM Konzentration aufgrund verkürzter Diastolendauer abgenommen hat und dadurch eine Ischämie mit protektivem Effekt im Sinne einer ischämischen Präkonditionierung entstanden ist. OM besitzt allerdings eine etwa 82%ige Plasmaeiweißbindung [133]. Das bedeutet, dass Erkenntnisse aus *in vivo* Studien wie bspw. auch Angina pectoris Beschwerden bei erhöhter Konzentration von OM nur mit Einschränkungen auf *in vitro* Untersuchungen im isoliert perfundierten Herzen übertragen werden können.

Interessanterweise sind Konzentrationen von OM protektiv, bei denen auch ein signifikanter Anstieg des LVEDP gemessen wurde, sodass ein Zusammenhang zwischen Infarktgrößenreduktion und hämodynamischen Variablen erwogen werden kann. Allerdings wird der Koronarfluss in diesen Gruppen nicht signifikant beeinflusst, was möglicherweise an einer metabolisch gesteuerten Vasodilatation liegen könnte, die den Koronarfluss aufrechterhält. In den Gruppen, in denen eine protektive Konzentration von OM (10 μM und 30 μM) verabreicht wurde, steigt der LVEDP auf ca. 80 mmHg während der Applikation. Dies könnte durch die verkürzte Diastolendauer mit konsekutivem Verlust sowohl der Relaxation und Füllungsphase des Herzens bedingt sein. Diese erhöhten Werte des LVEDP verringern möglicherweise die koronare und damit myokardiale Perfusion, auch wenn wir keine Reduzierung des Koronaraflusses messen können. Allerdings kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass durch diesen Effekt eine ischämische Prä- bzw. Postkonditionierung durch OM getriggert wird. In der Gruppe, die OM in der Reperfusionsphase erhalten haben, ist kein Unterschied im

LVEDP und im Koronarfluss zwischen protektiver und nicht protektiver Konzentration zu erkennen. Dies kann als indirekter Hinweis auf einen am ehesten Signalweg und nicht hämodynamisch induzierte Protektion gedeutet werden. In diesem Zusammenhang konnten Szentandrassy und Kollegen elektrophysiologische Veränderungen an ventrikulären Kardiomyozyten von Kaninchen unter dem Einfluss von OM nachweisen [134]. Die Autoren zeigen, dass 10 μ M OM ein erhöhtes positives Membranpotenzial während der frühen Plateauphase verursacht und dies mit veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften verbunden ist. Geringere Konzentrationen zeigten diese Veränderungen nicht. Die Studie kann nicht die Frage beantworten, ob diese Veränderungen durch den direkten Einfluss von OM auf Ionenkanäle begründet ist oder durch die veränderte Myosin-Aktin Interaktion zustande kommt.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass OM kardioprotektive Effekte am isoliert perfundierten Rattenherzen besitzt, und dass die niedrigste protektive Konzentration 10 μ M beträgt. Dabei ist der protektive Effekt nicht konzentrationsabhängig und folgt einem „Alles-oder-nichts-Prinzip“. Sowohl die Regulierung der regionalen myokardialen Perfusion unter OM-Einfluss, als auch die Frage, ob OM seine protektive Wirkung primär durch veränderte Hämodynamik, funktionale Prozesse oder durch direkte Effekte auf protektive Signalwege und -proteine vermittelt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.7 Ausblick

Im Hinblick auf die sowohl medizinische als auch volkswirtschaftliche Relevanz kardiovaskulärer Erkrankungen und insbesondere des Myokardinfarktes, spielt die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien eine bedeutsame Rolle. Die pharmakologische Prä- als auch Postkonditionierung stellen sowohl aus theoretischer Überlegung, als auch auf Grundlage der vielversprechenden experimentellen Daten hoffnungsvolle Kandidaten zur Verbesserung des Krankheitsverlaufs von Patienten im Rahmen einer kardialen Ischämie dar.

Seit der Erstbeschreibung des grundlegenden Phänomens der kardialen Konditionierung in den 1980er Jahren durch Murry [3] sind eine nahezu unüberschaubare Zahl an Studien veröffentlicht worden. Die vielversprechenden experimentellen Daten konnten die hohen

Erwartungen in der klinischen Umsetzung jedoch bisher nicht erfüllen. Sowohl die ischämische Prä- oder Postkonditionierung, als auch die pharmakologische Konditionierung zeigten nicht den erhofften Benefit in der klinischen Erprobung [5].

Die vorliegenden Ergebnisse tragen dazu bei, neue Möglichkeiten der pharmakologischen Konditionierung aufzuzeigen und die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen, auch um die Translation und die Etablierung in die klinische Praxis voranzutreiben. Mögliche Einflüsse, die bisher dafür gesorgt haben, dass klinische Ergebnisse den erhofften Benefit nicht erzielen sind sicherlich u.a. Komorbidität [117], Komedikation [135] [136] und erhöhtes Alter der Patienten [54]. In unserer zweiten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Ramelteon-induzierte Kardioprotektion über den mK_{Ca} -Kanal vermittelt wird. Eine Aktivierung dieses Kanals bewirkt auch im höheren Alter eine ausgeprägte Kardioprotektion [53], was über andere Signalwege in diesem Kollektiv nicht möglich ist [54]. Daher sollte für Ramelteon geklärt werden, ob diese Substanz eine protektive Potenz im höheren Alter besitzt, da sie ihren protektiven Effekt über jenen mK_{Ca} -Kanal vermittelt. Andere Komorbiditäten bzw. Komedikationen könnten natürlich weitere negative Einflüsse haben. Die experimentellen Untersuchungen konzentrieren sich in der Regel auf eine einzige mögliche Beeinflussung, was zum einen die Untersuchungen sehr aufwendig macht und die Übertragung in die klinische Anwendung ebenfalls erschwert. Der Patient in der Klinik leidet an unterschiedlichen Komorbiditäten und nimmt verschiedene Medikamente zusätzlich ein, was in der Kombination komplexe wechselseitige Beeinflussungen zur Folge haben kann.

Zukünftig könnte die pharmakologische Konditionierung möglicherweise neue Wege für eine personalisierte, auf den jeweiligen Patienten abgestimmte Kardioprotektion erschließen. Es könnte genau jene protektive Substanz ausgewählt werden, die auch unter Berücksichtigung der individuellen Komorbiditäten und Medikamenten dazu in der Lage ist, eine kardioprotektive Wirkung zu vermitteln. Es werden somit gezielt die protektiven Signalwege stimuliert, die bei dem jeweiligen Patienten unter den gegebenen Bedingungen aktivierbar sind. Um dieses Ziel zu erreichen, bedarf es weitere Studien zur Beeinflussung der Signaltransduktionskaskaden protektiver Pharmaka durch Co-Medikation und Co-Morbiditäten.

Bei den untersuchten Substanzen handelt es sich um Medikamente, die bereits klinisch eingesetzt werden bzw. in Zukunft angewendet werden sollen. Die Indikationen für

Ramelteon und auch OM sind bisher gänzlich andere als die einer akuten Myokardischämie. Allerdings könnte dies die Prüfung dieser Substanzen in retro- oder prospektiven klinischen Studien erleichtern. OM könnte somit zukünftig potentiell eine Erweiterung der Indikation im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz im Kontext einer koronaren Herzerkrankung erfahren. Diese Patienten sind besonders gefährdet, eine erneute akute Myokardischämie zu erleiden.

Schlafstörungen sind besonders im höheren Alter häufig [137]. Die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung und damit das Risiko einer akuten Myokardischämie steigt ebenfalls im höheren Alter deutlich an [2]. Auch hier könnte sich durch die Indikationsstellung der Schlafstörung und den Einsatz von Ramelteon als Schlafmedikament zukünftig möglicherweise ein zusätzlicher Nutzen in Form einer klinisch messbaren Kardioprotektion nachweisen lassen.

Die zukünftige, weiterreichende Charakterisierung der kardioprotektiven Signalwege von Ramelteon und OM und deren Beeinflussung durch patientenspezifische Faktoren und Begleitmedikation könnte somit eine neue Perspektive für die Translation des Konzeptes der pharmakologischen Konditionierung in die klinische Praxis eröffnen.

5 Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt mit der Folge eines Ischämie- und Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) zählt weltweit zu den führenden Todesursachen. Daher ist es von großer klinischer Bedeutung neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die das Myokard vor einem I/R-Schaden und dessen Folgen schützen können. Der effektivste endogene Mechanismus den I/R-Schaden zu minimieren ist die ischämische Konditionierung. Dabei lösen kurze, nicht-letale Ischämie- und Reperfusionszyklen am Herzen kardioprotektive Mechanismen in den Kardiomyozyten aus. Das Ausmaß der induzierten Kardioprotektion ist unter anderem anhand einer signifikanten Infarktgrößenreduktion messbar. Außer durch ischämische Stimuli können kardioprotektive Signalwege auch mittels Pharmaka sowohl vor (pharmakologische Präkonditionierung) als auch nach (pharmakologische Postkonditionierung) einer Myokardischämie aktiviert werden. Die genauen Mechanismen sind trotz intensiver Forschung bisher nicht vollständig verstanden. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, neue Möglichkeiten der pharmakologischen Konditionierung zu evaluieren und mögliche zugrundeliegende Mechanismen aufzuklären. Dazu wurde die kardioprotektive Potenz von Ramelteon, einem Melatonin-Rezeptor-Agonisten, und Omecamtiv mecarbil, einem neu entwickelten Inotropikum analysiert.

Die Untersuchungen wurden *in vitro* an isoliert perfundierten Herzen von männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Die Herzen wurden an einer Langendorff-Anlage mit Krebs-Henseleit Puffer bei einem konstanten Druck von 80 mmHg perfundiert. Alle Herzen durchliefen eine Globalischämie von 33 Minuten, gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusionsphase. Die entsprechenden Pharmaka wurden über 10 Minuten je nach Versuchsprotokoll vor bzw. nach der Globalischämie appliziert. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC-Färbung) bestimmt und verblindet planimetrisch ausgewertet. Bei den vorliegenden Untersuchungen lag der Fokus auf der Suche nach dosisabhängigen Effekten und möglichen Mechanismen bzw. zugrundeliegenden Signalkaskaden.

In der ersten Publikation wurde gezeigt, dass Ramelteon eine Kardioprotektion im Sinne einer Postkonditionierung auslöst. Die gemessene Infarktgrößenreduktion war vergleichbar mit der hier bestätigten protektiven Wirkung durch Melatonin. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ramelteon-induzierte Kardioprotektion über Melatonin-

Rezeptoren vermittelt wird, da eine gleichzeitige Gabe von Luzindol, einem Melatonin-Rezeptor Antagonist, die Kardioprotektion vollständig aufhob.

Die zweite Publikation zeigte darauf aufbauend, dass Ramelteon auch durch Applikation vor der Ischämie, im Sinne einer Präkonditionierung, kardioprotektiv wirkt. Dabei war ab einer Ramelteon Konzentration von 0,03 μM eine signifikante Infarktgrößenreduktion nachweisbar. Niedrigere Konzentrationen waren nicht kardioprotektiv und höhere Konzentrationen führten nicht zu einem stärkeren protektiven Effekt. Die so ermittelte niedrigste protektive Konzentration von Ramelteon wurde eingesetzt zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung mitochondrialer Kaliumkanäle an der Protektion durch Ramelteon. Hierfür wurde der mK_{Ca} -Kanal Inhibitor Paxillin und der mK_{ATP} -Kanal Inhibitor 5-HD mit Ramelteon (0,03 μM) kombiniert appliziert. Die vollständige Aufhebung der Infarktgrößenreduktion, sowohl durch den mK_{Ca} -Kanal Inhibitor Paxillin als auch durch 5-HD, als mK_{ATP} -Kanal Inhibitor, weist auf die entscheidende Beteiligung beider mitochondrialer Kaliumkanäle an der protektiven Signalkaskade von Ramelteon hin.

Zur weiteren Aufklärung der Signalvermittlung wurde in der dritten Publikation die Beteiligung von PKG und Akt an der Ramelteon-induzierten protektiven Kaskade untersucht. Hierfür wurde Ramelteon zusammen mit dem PKG-Inhibitor KT5823 oder dem Akt-Inhibitor MK2206 appliziert. Sowohl die Inhibition von PKG als auch von Akt hob die Ramelteon-induzierten protektiven Effekte vollständig auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass PKG im protektiven Signalweg nachgeschaltet zu Akt gelegen sein muss und dass beide Kinasen proximal des mK_{Ca} -Kanals vorgeschaltet sind.

Die vierte Publikation diente der Identifikation der Signalkaskade und zeigte, dass sowohl der Melatonin-Rezeptor Typ 2 (MT2-Rezeptor) als auch reaktive Sauerstoffspezies essenziell sind für die Vermittlung kardioprotektiver Signale durch Ramelteon.

Die kardioprotektiven Eigenschaften von Omecamtiv mecarbil konnten erstmals in der fünften Publikation dargestellt werden. Omecamtiv mecarbil ist ein neu entwickeltes Inotropikum, das zukünftig eine weitere Therapieoption bei Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion darstellen soll. Omecamtiv mecarbil induzierte einen kardioprotektiven Effekt. Dabei wurde die Konzentration von 10 μM als niedrigste protektive Konzentration ermittelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass Omecamtiv mecarbil

diesen protektiven Effekt durch Applikation sowohl vor als auch nach der Globalischämie auslösen kann.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen mit Ramelteon und Omecamtiv mecarbil erstmals die kardioprotektiven Eigenschaften der beiden Pharmaka und eröffnen damit neue Möglichkeiten der pharmakologischen Konditionierung. Trotz der großen Anzahl an Studien, die zur Kardioprotektion veröffentlicht wurden, sind zum einen die genauen Mechanismen nicht vollständig verstanden und zum anderen konnten die vielversprechenden experimentellen Daten die klinische Erwartungshaltung nicht erfüllen. Dies scheint durch vielfache Einflussfaktoren wie beispielsweise Patientenalter, Komedikation und Komorbidität begründet zu sein. Die vorliegenden Ergebnisse sollen daher zum besseren Verständnis der pharmakologischen Konditionierung beitragen und neue Möglichkeit der klinischen Anwendbarkeit aufzeigen. Speziell bei Ramelteon konnten beteiligte Proteine und Mechanismen der protektiven Signalkaskade identifiziert werden. Dieses bessere Verständnis bietet die Möglichkeit einer zielgerichteten, auf den jeweiligen Patienten abgestimmten Kardioprotektion, die möglicherweise in der Zukunft etabliert werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Hrsg): *Pressemitteilung Nr. 505: Todesursachenstatistik 2020*. 4. November 2021, Wiesbaden.
URL: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21_505_23211.html (Stand 14.09.2023)
2. Robert Koch Institut (Hrsg): *Gesundheit im Alter. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2015, Berlin. DOI 10.17886/rkipubl-2015-003
3. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. *Circulation*, 1986. 74(5): p. 1124-1136.
4. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H579-88.
5. Roth, S., et al., *Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications*. *Anesth Analg*, 2020. 131(6): p. 1751-1764.
6. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *The cell biology of acute myocardial ischemia*. *Annu Rev Med*, 1991. 42: p. 225-46.
7. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and I. Khaliulin, *The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1767(8): p. 1007-31.
8. Piper, H.M., et al., *[Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2008. 133(12): p. 586-90.
9. Ladilov, Y., et al., *Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger*. *Am J Physiol*, 1999. 276(6 Pt 2): p. H1868-76.
10. Kharbanda, R.K., *Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury*. *Heart*, 2010. 96(15): p. 1179-86.
11. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. *Biochem J*, 1995. 307 (Pt 1): p. 93-8.
12. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Preconditioning: the mitochondrial connection*. *Annu Rev Physiol*, 2007. 69: p. 51-67.
13. Javadov, S. and M. Karmazyn, *Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection*. *Cell Physiol Biochem*, 2007. 20: p. 01-22.
14. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* *J Mol Cell Cardiol*, 2009. 46(6): p. 821-31.

15. Halestrap, A.P., *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection*. Cardiovascular Research, 2004. 61(3): p. 372-385.
16. Moolman, J.A., et al., *Preconditioning with a single short episode of global ischemia in the isolated working rat heart: effect on structure, mechanical function, and energy metabolism for various durations of sustained global ischemia*. Cardiovasc Drugs Ther, 1995. 9(1): p. 103-15.
17. Cason, B.A., et al., *Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits*. Anesthesiology, 1997. 87(5): p. 1182-90.
18. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. 342(8866): p. 276-7.
19. Menting, T.P., et al., *Ischaemic preconditioning for the reduction of renal ischaemia reperfusion injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. 3(3): p. Cd010777.
20. Suzuki, S., K. Inaba, and H. Konno, *Ischemic preconditioning in hepatic ischemia and reperfusion*. Curr Opin Organ Transplant, 2008. 13(2): p. 142-7.
21. Muller, D.W., et al., *Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group*. Am Heart J, 1990. 119(2 Pt 1): p. 224-31.
22. Kloner, R.A., et al., *Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning?* Circulation, 1995. 91(1): p. 37-45.
23. Matsuda, Y., et al., *Effects of the presence or absence of preceding angina pectoris on left ventricular function after acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1984. 108(4 Pt 1): p. 955-8.
24. Cortina, A., et al., *Left ventricular function after myocardial infarction: clinical and angiographic correlations*. J Am Coll Cardiol, 1985. 5(3): p. 619-24.
25. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends Cardiovasc Med, 2005. 15(2): p. 69-75.
26. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. 116(4): p. 674-99.
27. Boengler, K., G. Lochnit, and R. Schulz, *Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. 315(5): p. H1215-h1231.
28. Rosenberg, J.H., et al., *Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning*. J Cardiovasc Transl Res, 2018. 11(4): p. 292-307.

29. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. 47(1): p. 32-40.
30. Boengler, K., et al., *Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion.* Basic Res Cardiol, 2010. 105(6): p. 771-85.
31. Boengler, K., et al., *The STAT3 inhibitor stattic impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation.* Curr Pharm Des, 2013. 19(39): p. 6890-5.
32. Meier, J.A., et al., *Stress-induced dynamic regulation of mitochondrial STAT3 and its association with cyclophilin D reduce mitochondrial ROS production.* Sci Signal, 2017. 10(472).
33. Hadebe, N., M. Cour, and S. Lecour, *The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target?* Basic Res Cardiol, 2018. 113(2): p. 9.
34. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.* Biochem J, 1999. 341 (Pt 2): p. 233-49.
35. Halestrap, A.P., *A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection.* Biochem Soc Trans, 2010. 38(4): p. 841-60.
36. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. 26(6): p. 711-23.
37. Halestrap, A.P., *Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.* Biochem Soc Trans, 2006. 34(Pt 2): p. 232-7.
38. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning.* J Pharmacol Exp Ther, 2005. 312(2): p. 644-50.
39. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A.* Circulation, 2005. 111(2): p. 198-203.
40. Liu, Y., et al., *Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels : Novel Effectors of Cardioprotection?* Circulation, 1998. 97(24): p. 2463-2469.
41. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane.* Science, 2002. 298(5595): p. 1029-33.
42. Wang, X., et al., *Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection.* J Mol Cell Cardiol, 2008. 44(1): p. 105-13.
43. Heinen, A., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 292(1): p. C148-56.

44. Balderas, E., et al., *Mitochondrial BKCa channel*. Front Physiol, 2015. 6: p. 104.
45. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection*. Circ Res, 1997. 81(6): p. 1072-82.
46. Inoue, I., et al., *ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane*. Nature, 1991. 352(6332): p. 244-7.
47. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. Nature, 1984. 312(5993): p. 446-8.
48. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, 2004. 94(4): p. 420-32.
49. Sato, T., et al., *Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection*. Circulation, 2000. 101(20): p. 2418-23.
50. Paggio, A., et al., *Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria*. Nature, 2019. 572(7771): p. 609-613.
51. Clements, R.T., D. Terentyev, and F.W. Sellke, *Ca(2⁺)-activated K(+) channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection*. Circ J, 2015. 79(3): p. 455-62.
52. Singh, H., et al., *MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(26): p. 10836-41.
53. 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, 2014. 56: p. 99-105.
54. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Loss of cardioprotection with ageing*. Cardiovasc Res, 2009. 83(2): p. 247-61.
55. Miyamoto, M., *Pharmacology of ramelteon, a selective MT1/MT2 receptor agonist: a novel therapeutic drug for sleep disorders*. CNS Neurosci Ther, 2009. 15(1): p. 32-51.
56. Karim, A., D. Tolbert, and C. Cao, *Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia*. J Clin Pharmacol, 2006. 46(2): p. 140-8.
57. Buysse, D., G. Bate, and P. Kirkpatrick, *Fresh from the pipeline: Ramelteon*. Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(11): p. 881-2.
58. Stevenson, S.J., et al., *Study to investigate the absolute bioavailability of a single oral dose of ramelteon (TAK-375) in healthy male subjects*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2004. 75: p. P22-P22.

59. Liu, J., et al., *MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016. 56: p. 361-83.
60. Abete, P., et al., *Effects of melatonin in isolated rat papillary muscle*. FEBS Lett, 1997. 412(1): p. 79-85.
61. Pandi-Perumal, S.R., et al., *Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways*. Prog Neurobiol, 2008. 85(3): p. 335-53.
62. Kato, K., et al., *Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist*. Neuropharmacology, 2005. 48(2): p. 301-310.
63. Mathes, A.M., B. Wolf, and H. Rensing, *Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro*. J Pineal Res, 2008. 45(3): p. 337-8.
64. Emet, M., et al., *A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs*. Eurasian J Med, 2016. 48(2): p. 135-41.
65. Lochner, A., E. Marais, and B. Huisamen, *Melatonin and cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: What's new? A review*. J Pineal Res, 2018. 65(1): p. e12490.
66. Dominguez-Rodriguez, A., et al., *Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction*. J Pineal Res, 2002. 33(4): p. 248-52.
67. Lee, Y.M., et al., *Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo*. J Pineal Res, 2002. 33(2): p. 72-80.
68. Genade, S., et al., *Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions*. J Pineal Res, 2008. 45(4): p. 449-58.
69. Petrosillo, G., et al., *Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. 297(4): p. H1487-93.
70. Hu, S., et al., *Melatonin-Induced Protective Effects on Cardiomyocytes Against Reperfusion Injury Partly Through Modulation of IP3R and SERCA2a Via Activation of ERK1*. Arq Bras Cardiol, 2018. 110(1): p. 44-51.
71. Lochner, A., et al., *Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery*. J Pineal Res, 2006. 40(1): p. 56-63.
72. Kaçmaz, A., et al., *Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat*. Surg Today, 2005. 35(9): p. 744-50.
73. Lamont, K., et al., *Role of melatonin, melatonin receptors and STAT3 in the cardioprotective effect of chronic and moderate consumption of red wine*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. 465(4): p. 719-24.

74. Sallinen, P., et al., *The effect of myocardial infarction on the synthesis, concentration and receptor expression of endogenous melatonin*. J Pineal Res, 2007. 42(3): p. 254-60.
75. Nanasi, P., et al., *Omecamtiv Mecarbil: A Myosin Motor Activator Agent with Promising Clinical Performance and New in vitro Results*. Curr Med Chem, 2018. 25(15): p. 1720-1728.
76. Bekfani, T., F. Westphal, and P.C. Schulze, *Therapeutic options in advanced heart failure*. Clin Res Cardiol, 2018. 107(Suppl 2): p. 114-119.
77. Malik, F.I., et al., *Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure*. Science, 2011. 331(6023): p. 1439-43.
78. Liu, Y., et al., *Omecamtiv Mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β -cardiac myosin*. Biochemistry, 2015. 54(10): p. 1963-75.
79. Spudich, J.A., *Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases*. Biophys J, 2014. 106(6): p. 1236-49.
80. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. Bmj, 2000. 320(7227): p. 104-7.
81. Stroethoff, M., et al., *Activation of Melatonin Receptors by Ramelteon Induces Cardioprotection by Postconditioning in the Rat Heart*. Anesth Analg, 2018. 126(6): p. 2112-2115.
82. Stroethoff, M., et al., *Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels*. J Cardiovasc Pharmacol, 2018. 72(2): p. 106-111.
83. Burley, D.S. and G.F. Baxter, *B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart*. Basic Res Cardiol, 2007. 102(6): p. 529-41.
84. Behmenburg, F., et al., *Impact of Mitochondrial Ca^{2+} -Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats*. PLoS One, 2015. 10(12): p. e0144737.
85. Yan, L., *Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor*. Cancer Research, 2009. 69(9 Supplement): p. DDT01-1-DDT01-1.
86. Torregroza, C., et al., *Activation of PKG and Akt Is Required for Cardioprotection by Ramelteon-Induced Preconditioning and Is Located Upstream of mKCa-Channels*. Int J Mol Sci, 2020. 21(7).
87. Lee, K.H., et al., *Cardioprotective effects of PKG activation by soluble GC activator, BAY 60-2770, in ischemia-reperfusion-injured rat hearts*. PLoS One, 2017. 12(7): p. e0180207.
88. Huhn, R., et al., *Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels*. Br J Anaesth, 2010. 105(5): p. 589-95.

89. Cernysiov, V., M. Mauricas, and I. Girkontaite, *Melatonin inhibits granulocyte adhesion to ICAM via MT3/QR2 and MT2 receptors*. Int Immunol, 2015. 27(12): p. 599-608.
90. Gonzalez-Arto, M., et al., *New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality*. Reprod Fertil Dev, 2016. 28(7): p. 924-935.
91. Stroethoff, M., et al., *The Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Induces Cardioprotection that Requires MT2 Receptor Activation and Release of Reactive Oxygen Species*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2020.
92. Raupach, A., et al., *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms*. J Clin Med, 2019. 8(4).
93. Sharov, V.G., et al., *Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2007. 42(1): p. 150-8.
94. Dorsch, M., et al., *Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore*. PLoS ONE, 2016. 11(3): p. e0151025.
95. Stroethoff, M., et al., *Cardioprotective Properties of Omecamtiv Mecarbil against Ischemia and Reperfusion Injury*. J Clin Med, 2019. 8(3).
96. Mathes, A.M., et al., *Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock*. Shock, 2008. 29(1): p. 112-8.
97. Mathes, A.M., et al., *Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats*. Crit Care Med, 2008. 36(1): p. 24-9.
98. Lochner, A., B. Huisamen, and F. Nduhirabandi, *Cardioprotective effect of melatonin against ischaemia/reperfusion damage*. Front Biosci (Elite Ed), 2013. 5: p. 305-15.
99. Baltatu, O.C., et al., *Cardioprotective Melatonin: Translating from Proof-of-Concept Studies to Therapeutic Use*. Int J Mol Sci, 2019. 20(18).
100. Murata, M., et al., *Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Attenuate Matrix Ca²⁺ Overload During Simulated Ischemia and Reperfusion: Possible Mechanism of Cardioprotection*. Circulation Research, 2001. 89(10): p. 891-898.
101. Waseem, M., H. Tabassum, and S. Parvez, *Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced K(ATP) channel inhibition in isolated brain mitochondria*. Mitochondrion, 2016. 31: p. 1-8.
102. Steffens, F., et al., *Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity*. Mol Endocrinol, 2003. 17(10): p. 2103-15.

103. Tamareille, S., et al., *RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning*. Basic Res Cardiol, 2011. 106(6): p. 1329-39.
104. Yu, L.M., et al., *Melatonin protects diabetic heart against ischemia-reperfusion injury, role of membrane receptor-dependent cGMP-PKG activation*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. 1864(2): p. 563-578.
105. Deenadayalu, V., et al., *Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 302(1): p. H115-23.
106. Gragasin, F.S., et al., *The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels*. FASEB J, 2004. 18(12): p. 1382-91.
107. Matsui, T., et al., *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo*. Circulation, 2001. 104(3): p. 330-5.
108. Fujio, Y., et al., *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. 101(6): p. 660-7.
109. Dou, M.Y., et al., *Remifentanyl preconditioning protects rat cardiomyocytes against hypoxia-reoxygenation injury via delta-opioid receptor mediated activation of PI3K/Akt and ERK pathways*. Eur J Pharmacol, 2016. 789: p. 395-401.
110. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta*. J Biol Chem, 2008. 283(43): p. 29572-85.
111. Smolenski, A., et al., *Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1998. 358(1): p. 134-9.
112. Bioscience, T., *Certificate of Analysis - KT 5823, in Product information*. 2016. p. 2.
113. Alexandre, E.C., et al., *Soluble guanylyl cyclase (sGC) degradation and impairment of nitric oxide-mediated responses in urethra from obese mice: reversal by the sGC activator BAY 60-2770*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. 349(1): p. 2-9.
114. Leiria, L.O., et al., *The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 ameliorates overactive bladder in obese mice*. J Urol, 2014. 191(2): p. 539-47.
115. Mendes-Silverio, C.B., et al., *Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e47223.
116. Fukao, M., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072*. J Biol Chem, 1999. 274(16): p. 10927-35.

117. Kersten, J.R., et al., *Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 278(4): p. H1218-24.
118. Nakao, T., et al., *Melatonin ameliorates angiotensin II-induced vascular endothelial damage via its antioxidative properties*. J Pineal Res, 2013. 55(3): p. 287-93.
119. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(1): p. H434-40.
120. Shim, Y.H. and J.R. Kersten, *Preconditioning, anesthetics, and perioperative medication*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2008. 22(1): p. 151-65.
121. Huhn, R., et al., *Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore*. Br J Anaesth, 2008. 100(4): p. 465-71.
122. McGechan, A. and K. Wellington, *Ramelteon*. CNS Drugs, 2005. 19(12): p. 1057-65; discussion 1066-7.
123. Zhang, C., *Activation of Paraventricular Melatonin Receptor 2 Mediates Melatonin-Conferred Cardioprotection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury*. J Cardiovasc Pharmacol, 2020.
124. Han, D., et al., *Activation of melatonin receptor 2 but not melatonin receptor 1 mediates melatonin-conferred cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury*. J Pineal Res, 2019. 67(1): p. e12571.
125. Singhanat, K., et al., *Therapeutic potential of a single-dose melatonin in the attenuation of cardiac ischemia/reperfusion injury in prediabetic obese rats*. Cell Mol Life Sci, 2022. 79(6): p. 300.
126. Roth, S., et al., *Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications*. Int J Mol Sci, 2021. 22(5).
127. Teerlink, J.R., et al., *Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure*. N Engl J Med, 2021. 384(2): p. 105-116.
128. An, J., Z.J. Bosnjak, and M.T. Jiang, *Myocardial protection by isoflurane preconditioning preserves Ca²⁺ cycling proteins independent of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels*. Anesth Analg, 2007. 105(5): p. 1207-13, table of contents.
129. Yu, Y., et al., *Downregulation of Na(+)/Ca(2+) Exchanger Isoform 1 Protects Isolated Hearts by Sevoflurane Postconditioning but Not by Delayed Remote Ischemic Preconditioning in Rats*. Chin Med J (Engl), 2017. 130(18): p. 2226-2233.
130. Cahill, T.J. and R.K. Kharbanda, *Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk*. World J Cardiol, 2017. 9(5): p. 407-415.

131. Teerlink, J.R., et al., *Acute Treatment With Omecamtiv Mecarbil to Increase Contractility in Acute Heart Failure: The ATOMIC-AHF Study*. J Am Coll Cardiol, 2016. 67(12): p. 1444-1455.
132. Cleland, J.G., et al., *The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial*. Lancet, 2011. 378(9792): p. 676-83.
133. Pandi-Perumal, S.R., et al., *Drug Insight: the use of melatonergic agonists for the treatment of insomnia-focus on ramelteon*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. 3(4): p. 221-8.
134. Szentandrassy, N., et al., *Dose-dependent electrophysiological effects of the myosin activator omecamtiv mecarbil in canine ventricular cardiomyocytes*. J Physiol Pharmacol, 2016. 67(4): p. 483-489.
135. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. 373(15): p. 1397-407.
136. Kleinbongard, P., et al., *Co-morbidities and co-medications as confounders of cardioprotection-Does it matter in the clinical setting?* Br J Pharmacol, 2020. 177(23): p. 5252-5269.
137. Feinsilver, S.H., *Normal and Abnormal Sleep in the Elderly*. Clin Geriatr Med, 2021. 37(3): p. 377-386.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Herrn Universitätsprofessor Benedikt Pannen, für sein Vertrauen, die Unterstützung und die Förderung, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Professor Ragnar Huhn, der mich mit seinem außergewöhnlichen Engagement jederzeit unterstützt und gefördert hat. Seine Begeisterung an der Forschung hat mich auch in schwierigen Zeiten wieder aufgebaut und immer wieder motiviert. Vielen Dank Ragnar!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Kardioprotektion bedanken: Dr. Friederike Behmenburg, Dr. Sebastian Bunte, PD Dr. Annika Raupach, Dr. Dr. Carolin Torregroza und Dr. Katharina Feige. Danke für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Ohne euch wäre diese Arbeit niemals so zügig und erfolgreich entstanden.

Danke auch an alle Doktoranden, die in dieser Zeit in der experimentellen Anästhesiologie tätig waren. Alle haben maßgeblich an der Entstehung und am Erfolg der Studien mitgewirkt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Professorin Inge Bauer bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung und Förderung seit meinem Beginn als Doktorand in der experimentellen Anästhesiologie. Es ist zu jeder Zeit eine freundliche und konstruktive Zusammenarbeit. Danke für die stets offene Tür und das offene Ohr!

Mein Dank gilt auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen der experimentellen Anästhesie, insbesondere Claudia Dohle und Birgitt Berke. Vielen Dank für eure große Hilfe im Laboralltag und die gute Arbeitsatmosphäre

PD Dr. Dr. Andre Heinen und auch Prof. Markus Hollmann sage ich vielen Dank für die verlässliche Hilfe und große Unterstützung in all unseren Studien.

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie, meiner Frau Wibke und meiner Tochter Jette. Danke für die große Unterstützung, den „Rücken freihalten“ und die Ablenkungen von der Arbeit. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

8 Originalarbeiten

Die Genehmigung zur Verwendung und Änderungen aller dazugehörigen Abbildungen und Tabellen sind beim jeweiligen Verlag eingeholt worden.

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich es an Eides statt, dass die wissenschaftliche Leistung, die die Grundlage meiner Habilitationsleistung bildet, von mir eigenständig erbracht wurde.

Dr. Martin Ströthoff