

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Benedikt Pannen

Signalweg der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion:
Beteiligung von Proteinkinase G und Akt an der Aktivierung
mitochondrialer kalziumabhängiger
Kaliumkanäle in der Ratte *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Osameh Daniel Jalajel
2025

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Carolin Torregroza, Osameh Jalajel, Annika Raupach, Katharina Feige, Sebastian Bunte, André Heinen, Alexander Mathes, Markus W. Hollmann, Ragnar Huhn, Martin Stroethoff, *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

Zusammenfassung

Fragestellung: Pharmakologische Präkonditionierung führt zu einer deutlichen Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens des Herzens. Ramelteon (Ram) ist ein Melatonin-Rezeptoragonist und findet klinisch Anwendung bei der Behandlung von Schlafstörungen.

Eine Aktivierung von Melatonin Rezeptoren durch Ram schützt vor einem myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden via Aktivierung mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanäle (mK_{Ca}). Der vorangeschaltete Signalweg einer Ramelteon-induzierten Kardioprotektion ist unbekannt. Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, ob (1) die Akt Kinase und Proteinkinase G (PKG) an der kardioprotektiven Signalvermittlung beteiligt sind und (2) ob Akt vor PKG und proximal vom mK_{Ca} -Kanal in der Signalkaskade liegt.

Material, Methoden: Alle Versuche wurden mit Genehmigung des Tierschutzbeauftragten (O 27/12) an männlichen Wistar Ratten (2-3 Monaten) *in vitro* durchgeführt. Die Herzen wurden an einer Langendorff-Anlage mit Krebs-Henseleit Puffer bei einem konstanten Druck von 80 mmHg perfundiert. Alle Herzen durchliefen eine globale Ischämie von 33 Minuten, gefolgt von 60 Minuten Reperfusion. Um die Beteiligung von PKG oder Akt zu untersuchen, wurden die Tiere in sechs Gruppen ($n = 6$ pro Gruppe) randomisiert. Kontrollherzen (Kon) blieben unbehandelt. Ram ($0,03 \mu\text{M}$) wurde über 10 Minuten vor der Ischämie appliziert. In vier weiteren Gruppen wurden der PKG-Inhibitor KT5823 ($1 \mu\text{M}$) und der Akt Inhibitor MK2206 (15 nM) jeweils mit und ohne Ram untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Reihenfolge der Signalvermittlung untersucht. Dafür wurden die Herzen in 5 Gruppen ($n = 6$ pro Gruppe) randomisiert. Kontrollherzen blieben wieder unbehandelt. Die Abfolge in der Signaltransduktion wurde durch indirekte Aktivierung von PKG mittels Applikation des Aktivators der löslichen Guanylatcyclase (sGC) BAY60-2770 (5 nM) und Aktivierung der mK_{Ca} -Kanäle mit NS1619 ($10 \mu\text{M}$) untersucht. Beide Aktivatoren wurden mit Ram und den jeweiligen PKG bzw. Akt Inhibitoren (KT5823 bzw. MK2206) kombiniert. Am Versuchsende wurde die Infarktgröße mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt und verblindet planimetrisch ausgewertet. Statistik: Mittelwerte \pm Standardabweichung, Varianzanalyse und Tukey post hoc Test, $P < 0,05$.

Ergebnisse: Ram reduzierte die Infarktgröße von $56\pm 14\%$ auf $28\pm 7\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Sowohl der PKG- als auch der Akt-Inhibitor blockierten die Ram-induzierte Kardioprotektion (KT5823+Ram: $48\pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Ram und MK2206+Ram: $49\pm 8\%$, $P < 0,05$ vs. Ram), ohne einen eigenen Effekt auf die Infarktgröße zu haben (KT5823: $51\pm 6\%$, $P = \text{ns}$ vs. Kon; MK2206: $52\pm 3\%$, $P = \text{ns}$ vs. Kon). In der zweiten Versuchsreihe reduzierte der GC-Aktivator die Infarktgröße von $48\pm 5\%$ auf $33\pm 6\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Die Kombination von BAY60-2770 mit Ram und Akt-Inhibitor (MK2206+Ram+BAY60-2770) zeigte eine Infarktgröße von $31\pm 11\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Sowohl die Kombination von NS1619 mit MK2206 und Ram reduzierte die Infarktgröße (MK2206+Ram+NS1619: $29\pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Kon), als auch NS1619 mit Ram und KT5823 (KT5823+Ram+NS1619: $33\pm 6\%$, $P < 0,05$ vs. Kon).

Schlussfolgerung: Diese Ergebnisse zeigen, dass (1) PKG und Akt bei der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion beteiligt sind und dass (2) Akt proximal von PKG und beide Kinasen proximal des mK_{Ca} -Kanals in der Signaltransduktionskaskade liegen.

Summary

Introduction: Pharmacological preconditioning reduces ischemia/reperfusion induced damage of the heart. Ramelteon (Ram) is a Melatonin receptor agonist which is used in the treatment of insomnia. In addition to that the activation of Melatonin receptors protects the heart from an ischemia/reperfusion-induced damage by activating calcium-dependent potassium channels (mK_{Ca}), which are located in the mitochondria of cardiac muscle cells. The signal transduction pathway within the cell that leads to the cardioprotective effect of Ram is unknown. The goal of this study was to determine whether (1) the Akt kinase and protein kinase G (PKG) take part in this signal transduction and whether (2) Akt is proximal compared to PKG and whether both protein kinases in turn are upstream compared to the mK_{Ca} -channels.

Methods: All experiments of this study were conducted in accordance with the ethics committee and the animal protection commissioner (O 27/12) with male Wistar rats (2-3 months) *in vitro*. The hearts were perfused on the Langendorff system by Krebs-Henseleit-buffer with a constant pressure of 80 mmHg. All hearts run through a global ischemia of 33 minutes, followed by 60 minutes of reperfusion. In order to examine a possible involvement of PKG and Akt, the laboratory animals were randomized in six groups (n= 6 per group). The control group remained untreated without any pharmacological intervention. Ram (0,03 μ M) was applied over 10 minutes before the global ischemia. In the four other groups the PKG inhibitor KT5823 (1 μ M) and the Akt kinase inhibitor MK2206 (15 nM) were each applied with and without Ram. In the second part of this study the order of the signal transduction pathway was examined by indirectly activating the PKG with the aid of a soluble Guanylatcyclase activator (sGC) BAY60-2770 (5 nM) and activation of the mK_{Ca} channels by dint of NS1619 (10 μ M). Both activators were combined with Ram and each of the inhibitors (KT5823 respectively MK2206). Subsequent to the experiment the infarct size was ascertained by Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining and appraised blindly and planimetrically. Statistics: mean value \pm standard deviation, variance analysis and Tukey post hoc test, P <0,05.

Results: In both parts of the study, there were no significant differences within the heart rate and the mean arterial pressure. Concerning the infarct extent,

Ram reduced the infarct size from $56\pm 13\%$ to $28\pm 7\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Both the PKG inhibitor and the Akt inhibitor blocked the cardioprotective effect of Ram (KT5823+Ram: $48\pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Ram and MK2206+Ram: $49\pm 8\%$, $P < 0,05$ vs. Ram), without having any own effect on the infarct size (KT5823: $51\pm 6\%$, $P = \text{ns}$ vs. Kon and MK2206: $52\pm 3\%$, ns vs. Kon). In the second part of the study the GC-activator BAY60-2770 decreased the infarct size from $48\pm 5\%$ to $33\pm 6\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). The combination of BAY60-2770 with Ram and Akt-inhibitor (MK2206+Ram+BAY60-2770) revealed an infarct size of $31\pm 11\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Both the combination of NS1619 with MK2206 and Ram reduced the infarct size (MK2206+Ram+NS1619: $29\pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Kon), and NS1619 with Ram and KT5823 (KT5823+Ram+NS1619: $33\pm 6\%$, $P < 0,05$ vs. Kon).

Interpretation: The results indicate that (1) PKG and Akt participate in the signal transduction pathway of the Ramelteon-induced cardio protection and that (2) the Akt is proximal to PKG and both are proximal to the mK_{Ca} -channel in the signaling cascade.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ANT	Adenosin Nukleotid Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
CaCl₂	Calciumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cGTP	cyclisches Guanosintriphosphat
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
C1QBP	complement component 1 Q subcomponent-binding protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDHF	<i>endthelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fa.	Firma
g	gramm
GC	Guanylatcyclase
GIK	Glukose-Insulin-Kalium
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 <i>beta</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
I.E.	internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IPC	ischämische Präkonditionierung
IPostC	ischämische Postkonditionierung
I/R-Schäden	Ischämie- und Reperfusionsschäden
JAK2	Janus Kinase 2
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit

KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
Kon	Kontrolle
l	Liter
LVP, LVD	linksventrikulären Druck
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i>
mg	Milligramm
MgSO₄ 7 H₂O	Magnesiumsulfatheptahydrat
mitoBK_{Ca}	<i>mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channel</i>
mitoKv7.4	<i>mitochondrial voltage-regulated potassium channel</i>
mitoSlo2	<i>mitochondrial sodium-activated potassium channel</i>
mK_{ATP}-Kanal	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
mK_{Ca}-Kanal	Calcium-abhängiger Kaliumkanal
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
mM, nM	Milli Molar, Nanomolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mSK_{Ca}	<i>mitochondrial small conductance calcium-activated potassium channels</i>
mtCypD	mitochondriales Cyclophilin D
MT1/2/3	Melatoninrezeptor 1/2/3
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NPs	natriuretische Peptide
ns	nicht signifikant
O₂	Sauerstoff
PCI	perkutane Koronarintervention
pCO₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pGC	<i>particulate guanylyl cyclase</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B; = Akt

PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PPC	pharmakologische Präkonditionierung
Ram	Ramelteon
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i>
RISK	reperfusion injury salvage kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAFE	<i>survivor activating factor enhancement</i>
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i>
SPF	spezifisch-pathogenfrei
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STEMI	<i>ST- elevation myocardial infarction</i> , ST-Hebungsinfarkt
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR1/2	TNF Rezeptor 1/2
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VDAC	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Definition	1
1.1.3	Physiologie und Pathophysiologie	2
1.2	Das Langendorff Modell	4
1.3	Das Prinzip der Kardioprotektion durch Konditionierung	6
1.3.1	Ischämie- und Reperfusionsschaden	6
1.4	Konditionierung	8
1.4.1	Kardioprotektive Signalwege	10
1.5	Pharmaka	13
1.5.1	Ramelteon	13
1.5.2	MK2206	14
1.5.3	KT5823	14
1.5.4	BAY60-2207	15
1.5.5	NS1619	15
1.6	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Versuchstiere	16
2.1.2	Modifizierter Krebs-Henseleit Puffer	17
2.1.3	Langendorff-Anlage	18
2.1.4	Laborgeräte	19
2.1.5	Pharmaka	20
2.1.6	Chemikalien	20
2.1.7	Gase	22
2.1.8	Computer und Software	22
2.1.9	Besteck und Pipetten	22
2.2	Methodik	23
2.2.1	Präparation der Rattenherzen	23
2.2.2	Allgemeiner Versuchsablauf für beide Studienteile	25
2.2.3	Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbung	25
2.2.4	Infarktgrößen-Auswertung	26
2.2.5	Hämodynamik-Auswertung	26

2.2.6	Untersuchung der Beteiligung von Akt bzw. PKG an der Kardioprotektion durch Ramelteon	27
2.2.7	Reihenfolge der Signaltransduktion	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Infarktgrößen	31
3.2	Hämodynamische Parameter	33
3.3	Weitere Messdaten.....	40
4	Diskussion	42
4.1	Klinische Bedeutung der pharmakologischen Konditionierung und Einordnung der Ergebnisse	47
4.2	Interpretation der weiteren Ergebnisse	51
4.2.1	Hämodynamik	51
4.3	Methodenkritik.....	51
4.3.1	Perfusion des isolierten Herzens.....	51
4.3.2	KHP-Lösung	53
4.3.3	Pharmaka dieser Arbeit.....	55
4.4	Schlussfolgerung.....	56
4.5	Ausblick	57
5	Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland gelten Herz-Kreislauf-Erkrankungen als häufigste Todesursache [1]. Insgesamt waren 36 % der Todesfälle 2018 auf Erkrankungen des Kreislaufsystems zurückzuführen [1]. Gerade der akute Myokardinfarkt war 2018 mit 46.200 Todesfällen eine der häufigsten Todesursachen [1].

Nicht nur vor dem Hintergrund, dass sich 60 % der Todesfälle beim akuten Myokardinfarkt innerhalb der ersten 60 Minuten ereignen [2], sondern ebenso aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der zunehmenden Prävalenz [7], wird die Relevanz zusätzlicher adäquater Therapien und Präventionen des akuten Myokardinfarkts deutlich.

Im Jahre 2020 wurden insgesamt circa 432 Milliarden Euro als Krankheitskosten angegeben – 5190 Euro je Einwohner und Einwohnerin [3]. Davon entfielen circa 56,6 Milliarden auf Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems. Das entspricht einem Anteil von 13,1% [3]. Die Zahlen zeigen, dass die Kosten des Gesundheitssystems seit 2008 kontinuierlich steigen [4]. Davon sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach wie vor der größte Kostenfaktor [5]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur aus epidemiologischer, sondern auch aus ökonomischer Sicht zusätzliche Therapien und Präventionen außerordentlich wichtig sind.

1.1.2 Definition

Bei der Definition des Myokardinfarktes ist zu unterscheiden zwischen einem Myokardschaden und einem Myokardinfarkt. Bei einem Myokardschaden ist der Troponinwert $>99.$ Perzentile des oberen Referenzwertes [6, 7]. Zeigt sich bei mehrmaligen Troponinmessungen eine Dynamik in Form eines Anstiegs oder Abfalls, ist von einem akuten Myokardschaden auszugehen. Ist dies nicht der Fall, spricht man von einem chronischen Myokardschaden [6, 7]. Ein Myokardschaden und damit einhergehender erhöhter Troponinwert lässt jedoch keinen Schluss auf die Ursache zu. Ursächlich könnte daher eine koronare Herzkrank-

heit (KHK), Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie oder Sepsis sein [6]. Bei einem Myokardinfarkt hingegen zeigen sich zusätzlich zu den oben genannten Kriterien Zeichen einer Myokardischämie in Form von: klinischen Symptomen, EKG-Veränderungen, Vitalitätsverlust in der Bildgebung oder angiographischem Thrombusnachweis [6, 7].

1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie

Physiologisch kommt es im Myokard bereits im Ruhezustand zu einer hohen Sauerstoffextraktion des Blutes von 75-80% [8]. Demnach lässt sich ein erhöhter Sauerstoffbedarf bei Belastung lediglich über eine Steigerung der Koronardurchblutung decken [8]. Ein Parameter, um dies zu beschreiben, ist die sogenannte koronare Flussreserve. Diese bezeichnet die Differenz zwischen den Koronarflüssen in Ruhe und bei Belastung [8]. Um die koronare Flussreserve zu regulieren, gibt es sowohl endotheliale, als auch nervale, metabolische und myogene Mechanismen. Als endothelialer Mechanismus spielt der endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) als eine Gruppe von Vasodilatoren eine wichtige Rolle [8]. Außerdem wird bei erhöhtem Fluss in den Koronargefäßen durch erhöhte Scherkräfte vom Endothel ebenso Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) gebildet [8]. Nervale Mechanismen zur Vasodilatation sind eine Aktivierung der β -Rezeptoren in intramyokardialen Gefäßen (durch Sympathikusaktivierung) und eine Acetylcholinausschüttung (durch den Parasympathikus), was wiederum zu einer NO-Bildung führt [8]. Myogene Mechanismen zur Durchblutungsregulation sind koronare Selbstregulationssysteme, die den Blutfluss trotz Perfusionsdruckänderungen konstant halten, überwiegend durch ein Ca^{2+} -abhängiges Signal [8]. Vasoaktive Metaboliten wie Adenosin oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hingegen beeinflussen vor allem die Durchblutung kleiner Arteriolen und Kapillaren [8].

Atherosklerotische Plaques, die durch diverse Risikofaktoren begünstigt werden, sorgen für eine Einengung des Gefäßlumens und für einen Umbau (*remodeling*) der luminalen Gefäßwand [9]. Durch eine generalisierte Atherosklerose entwickeln sich im Bereich der Herzkranzgefäße Stenosen, die ab einer Lumeneinengung von 70 % als hämodynamisch wirksam gelten [2],[9]. In Folge dessen kann es zu einem akuten Myokardinfarkt kommen, wenn Teile des Myokards plötzlich unter Sauerstoffmangel leiden und untergehen [2]. Es kommt

zu Ischämien und Nekrosen in den Herzmuskelregionen, die von der verschlossenen Koronararterie versorgt werden [2]. Schon vier bis sechs Stunden nach Beginn der Ischämie erreicht der Infarkt seine endgültige Größe [2].

Zudem kann es in den Plaques zu inflammatorischen Prozessen kommen [9]. Eine Ruptur der Plaques führt zu einer Thrombusbildung, die den Prozess der Stenosierung nochmal aggraviert [9]. Ist das Gefäßlumen so weit verengt, dass das zu versorgende Herzmuskelareal nicht mehr genügend perfundiert werden kann, kommt es zu einem Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot und folglich zu einer Ischämie. Entwickelt sich ein vollständiger Verschluss des Gefäßes, spricht man von einem Infarkt, der zu einer Nekrose, also einem Absterben der Herzmuskelzellen führt [9]. Bei 50-60% der Patienten liegt dem Myokardinfarkt eine Plaqueruptur zugrunde [6].

Arteriosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache [10]. Zwar sank die 30-Tages-Mortalität des akuten Myokardinfarkts seit 2000 signifikant, nichtsdestotrotz bleibt diese mit 7,8% hoch [11]. Weitere Komplikationen, die die Sterblichkeit noch weiter steigen lassen, gliedern sich in mechanische, embolische, ischämische, dysrhythmische und entzündliche Prozesse [12, 13]. Durch interventionelle Therapiemöglichkeiten wie die perkutane Koronarintervention (PCI) konnte die Inzidenz dieser Komplikationen beispielsweise bei ST-Hebungsinfarkten (STEMI) auf weniger als ein Prozent reduziert werden [12, 13]. Zu den genannten Komplikationen gehören die Ruptur der freien Ventrikelwand (0,52%), der Papillarmuskelabriss (0,26%) und die Ventrikelseptumruptur (0,17%) [12, 13]. Wichtige dysrhythmische Komplikationen sind Vorhofflimmern, Kammerflimmern oder die ventrikuläre Tachykardie [14]. Auch andere Organsysteme können betroffen sein. Durch ischämische Komplikationen kann es zum Nierenversagen oder durch sekundäre Embolien zum Hirninfarkt kommen [15].

Auch die Lebensqualität der Patienten direkt nach dem Myokardinfarkt ist stark eingeschränkt. Während der Hospitalisierung leiden ca. 69% der Patienten unter Problemen aus den Bereichen Mobilität, Selbstständigkeit, Routinetätigkeiten, Schmerzen/Unbehagen und Ängste/Depression [16]. Auch zwölf Monate nach dem Infarkt geben immer noch ca. 60% der Patienten an, dass sie in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind [16].

Insgesamt zeigt der akute Myokardinfarkt viele kurzfristige und längerfristige Komplikationen mit schwerwiegenden Folgen, weshalb neuen kardioprotektiven Therapiestrategien eine umso wichtigere Bedeutung zukommt.

1.2 Das Langendorff Modell

Carl Ludwig gilt als Initiator und Vorantreiber der Versuche an isolierten perfundierten Organen und war an den ersten Versuchen im physiologischen Institut in Leipzig 1846 beteiligt [17]. Hier wurden jedoch zunächst nur zwei Gefäß-Kreisläufe von Tieren miteinander verbunden [17]. Ein Problem war jedoch, dass keine Asystolie und anschließende Wiederaufnahme der Herztätigkeit induziert werden konnte [17]. Der nächste Schritt war eine vollständige Exzision des Herzens. Dafür wurden in den Versuchen von Elias Cyon Froschherzen verwendet, die durch ihre schwammartige Struktur ohne Koronarien auskommen [17]. Unter anderem fand der Gasaustausch hier durch Diffusion statt [17]. Bei dem vollständig exzidierten Herzen wurden anschließend die Aorta und die Vena cava mit einer Kanüle versehen und mit Hasenserum perfundiert [17]. Man entdeckte so zum Beispiel, dass die Schrittmacherzentren des Herzens im rechten Vorhof und im atrioventrikulären Bereich liegen [17].

Die nächste Weiterentwicklung an isolierten perfundierten Organen erfolgte durch H.M. Martin. Er nutzte zum ersten Mal das Herz eines Säugetiers und trieb seine Versuche um 1880 voran [17]. Er präparierte ein Herz-Lungen-Modell mit einem künstlich beatmeten Säugetier (Hund oder Katze), wobei der systemische Kreislauf vollständig ausgeschlossen wurde.

Auf Martin folgte dann der Namensgeber des heute gängigen Langendorff-Modells: Oscar Langendorff [17]. Die Methode nach Langendorff sieht eine Kanülierung der Aorta vor, wodurch das Perfusat retrograd, also entgegen der physiologischen Flussrichtung in die Aorta fließt [18]. Durch den konstanten Druck des Perfusats bleibt die Aortenklappe geschlossen und das Perfusat fließt durch die Koronarostien in das Koronarsystem [18]. Von dort drainiert das Perfusat über die Koronarvenen in die Koronarsinus in den rechten Vorhof [18]. In der originalen Beschreibung der Langendorffmethode folgt dann eine freie Drainage des Perfusats, sodass die Ventrikel frei von Perfusat bleiben [18]. Oscar Langendorff fand mit dieser Methode unter anderem heraus, dass das exzi-

dierte Herz wieder zur regelmäßigen Kontraktion gebracht werden kann, wenn es wieder perfundiert wird [19]. Dies wurde als Beweis angesehen, dass die Ventrikelfüllung keinen Effekt auf die Erregbarkeit des Herzens habe, da sich im Langendorff Modell kein Volumen in den Ventrikeln befindet, sondern lediglich die Koronarien perfundiert werden [17]. Des Weiteren erkannte man zu jener Zeit, dass die Herzfrequenz temperaturabhängig ist: während hohe Temperaturen zu hohen Herzfrequenzen führen, ergeben sich bei niedrigen Temperaturen niedrige Herzfrequenzen [17]. All diese Erkenntnisse spielen auch in dieser vorliegenden Arbeit noch eine Rolle.

Darauf folgten Howard E. Morgan und James R. Neely Mitte des 20. Jahrhunderts mit den nächsten Modifikationen am Langendorff-Modell. Zunächst wurde das Herz mittels einer Kanüle in der Aorta ebenfalls retrograd perfundiert. Die Kanüle war mit einem Reservoir verbunden ist, das circa 70 cm über dem Herzen lag [17]. Es erfolgte eine Kanülierung des linken Vorhofs. Von dort floss das Perfusat in den linken Ventrikel und durch Kontraktion über die Kanüle in der Aorta in eine Druckkammer (die durch Füllung mit etwas Luft eine Art Windkesselsystem ausübte). Zuletzt wurde das Perfusat durch den Druck in das Reservoir 70 cm über dem Herzen gedrückt [17]. Der kardiale Auswurf sorgte über die Koronarien für eine ausreichende Perfusion der Herzkranzgefäße [17]. Der auch heute verwendete modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer, welcher mit einem 95% O₂ und 5% CO₂ Gasgemisch angereichert wird, kam auch damals schon als Perfusionslösung zum Tragen [17].

Heutzutage unterscheidet man in der retrograden Herzperfusion zwei verschiedene Methoden, wobei einerseits druckkontrolliert und andererseits flusskontrolliert perfundiert werden kann [18]. Für ersteres wird zumeist durch eine Wassersäule mit fixiertem Reservoir ein konstanter hydrostatischer Druck hergestellt [18]. Heutige Pumpsysteme können darüber hinaus nahtlos zwischen druck- und flusskontrollierter Perfusion wechseln [18]. Die druckkontrollierte Perfusion hat den Vorteil, dass sie autoregulatorische Mechanismen nicht einfach übergeht [18]. Dem gegenüber wird die flusskontrollierte Perfusion vor allem verwendet, wenn es darum geht den koronaren Gefäßtonus, die glatte Muskulatur oder das Endothel in ihren Funktionen zu beurteilen [18]. Bei definierter Flussrate ist der Perfusionsdruck dann noch abhängig vom koronarvas-

kulären Widerstand, welcher dann beispielsweise experimentell durch vasoaktive Medikamente beeinflusst werden kann [18].

1.3 Das Prinzip der Kardioprotektion durch Konditionierung

1.3.1 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Im Folgenden soll erläutert werden, was sich auf biochemischer und metabolischer Ebene in den Kardiomyozyten abspielt, wenn es zu Ischämie- und Reperfusionsschäden (I/R-Schäden) kommt. Durch einen Sauerstoffmangel bei einer Ischämie, kommt es zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung [20]. Dies führt zu einer Depolarisation der Membran, zu einem ATP-Mangel und zur Inhibition der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten [20]. Um das Membranpotential der Mitochondrien wiederherzustellen, kommt es zur Hydrolyse des ATPs durch die F_1F_0 ATPase, die somit genau andersherum arbeitet als unter physiologischen Umständen [20]. Durch den Sauerstoffmangel kommt es in der Folge zur anaeroben Glykolyse, wodurch Protonen innerhalb der Zelle akkumulieren. Diese Akkumulation aktiviert den Na^+H^+ -Austauscher [20]. Im Austausch gegen ein Wasserstoffatom wird Natrium in die Zelle aufgenommen. Diese Natrium-Überladung wird weiter verstärkt, indem die $3Na^+-2K^+$ -ATPase durch den ATP-Mangel nicht mehr Natrium ausschleusen kann [20]. Diese hohe intrazelluläre Natriumkonzentration aktiviert wiederum den Na^+-Ca^{2+} -Ionenaustauscher. Dadurch entsteht allerdings eine intrazelluläre Calcium-Überladung [21]. Dies hat die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) zur Folge und führt zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran [22] und schließlich durch einströmende Protonen zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, Störung der ATP-Produktion [23] und damit zum Zelluntergang.

Bei Wiederherstellung der Reperfusion des Herzens nach einer Ischämie kommt es paradoxerweise auch zu einem Zellschaden [24]. Das Paradoxon des Reperfusionsschadens wurde schon 1973 beobachtet. Hearse *et al.* zeigte dabei, dass die Reperfusion eines zuvor über eine längere Zeit hypoxischen Herzens sofort einen Zellschaden hervorruft [25]. Trotz der Tatsache, dass die Zellen eine Oxygenierung benötigen, um sich zu erholen, sorgt genau ebenjene Oxygenierung nach einer Hypoxie für einen zusätzlichen Schaden. Man vermu-

tete schon früh, dass freie Sauerstoffradikale in großer Menge hierfür verantwortlich sein könnten. Zehn Jahre später gab die Arbeitsgruppe um Jolly *et al.* Hinweise darauf, dass freie Radikalfänger im Hundemodell Ischämie- und Reperfusionsschäden (I/R Schäden) verringern [26].

Im Wesentlichen werden verschiedene Arten von Reperfusionsschäden unterschieden [20]. Dazu zählen Reperfusion-induzierte ventrikuläre Arrhythmien, die meistens jedoch reversibel sind, da sie entweder selbstlimitierend oder therapierbar sind [27]. Darüber hinaus kommt es zum sogenannten *myocardial stunning*, was die reversible kontraktile Dysfunktion des Herzens direkt nach einer Ischämie beschreibt [28, 29]. Ein weiteres Phänomen des Reperfusionsschadens ist die mikrovaskuläre Obstruktion, die schon 1966 von Krug *et al.* beobachtet wurde [30]. Zu guter Letzt kommt es durch die Reperfusion auch zu einem Untergang von Kardiomyozyten [31, 32]. Wichtige Mediatoren des Reperfusionsschadens sind reaktive Sauerstoffspezies [25], ein Ca^{2+} -Overload [20], das schnelle Wiederherstellen des physiologischen pH-Wertes bei der Reperfusion [20] und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) [20]. Ein sich normalisierender pH-Wert, die nach Reperfusion vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies und die Ca^{2+} -Überladung sind alle Faktoren, die schließlich die genannte mPTP öffnen lassen. Die Öffnung der mPTP führt zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran [22] und ermöglicht größeren Molekülen die Passage in die mitochondriale Matrix. Die einströmenden Protonen sorgen für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und Störung der ATP-Produktion [23]. Durch den Mangel an Energieträgern schwillt das Mitochondrium an und es kommt zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran [22, 33]. Dadurch wird die Apoptose eingeleitet. Es kommt zur Cytochrom C Freisetzung, was wiederum Caspasen aktiviert und zum Zelltod führt [23].

1.4 Konditionierung

Murry *et al.* beschrieb im Jahre 1986 zum ersten Mal das Prinzip der ischämischen Konditionierung des Herzens. Damals konnte die Arbeitsgruppe um Murry an Hundeherzen zeigen, dass Zyklen von kleinen subletalen Ischämie- und Reperfusionen vor einer länger andauernden Ischämie, die Infarktgrößen signifikant vermindern können (siehe Abb. 1) [34]. Dazu wurde ein Herzkranzgefäß für fünf Minuten verschlossen und dann für ebenfalls fünf Minuten wiedereröffnet. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss daran wurde das Herzkranzgefäß für 40 Minuten verschlossen, dann vier Tage reperfundiert und zum Schluss die Infarktgröße ausgewertet. Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine ischämische Konditionierung vor der 40-minütigen Ischämie erhielt, eine signifikante Infarktgrößenreduktion von 29,4% (Kontrollgruppe) auf 7,3 % (Konditionierungsgruppe) [34]. Diese Studie gab somit schon vor über 30 Jahren Hinweise darauf, welches Potenzial eine Konditionierung des Herzens hat.

Diese Art der Protektion bezeichnet man als ischämische Präkonditionierung. Die positiven Effekte der ischämischen Präkonditionierung konnten nicht nur bei Hunden [34] (1986) sondern auch für andere Tierarten gezeigt werden: Schweine [35] (1990), Nagetiere [36] (1992), Hasen [37] (1991), Vögel [38] (1998) und Primaten [39] (2010).

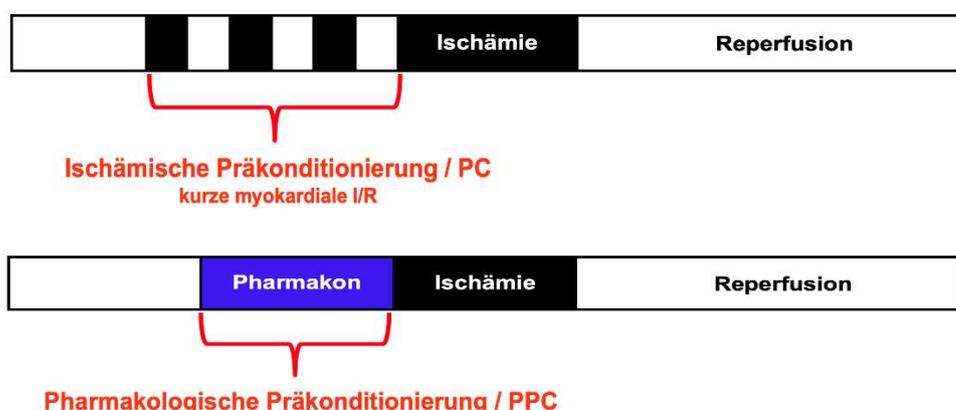


Abb. 1: Das Prinzip der ischämischen (PC) und pharmakologischen (PPC) Präkonditionierung im Vergleich

Bei der PC werden Zyklen kurzer subletaler Ischämie- und Reperfusionen vor einer großen Ischämie gesetzt. Im Vergleich dazu, wird bei der PPC ein Pharmakon vor der Ischämie verabreicht. Sowohl die große Ischämie als auch die Reperfusion läuft bei beiden Prinzipien gleich ab.

Kurz nachdem das Prinzip der ischämischen Präkonditionierung entdeckt wurde, erkannte man auch das mögliche Potenzial einer pharmakologischen Präkonditionierung. Volatile Anästhetika wie Desfluran, Sevofluran und Isofluran wirkten kardioprotektiv, wenn sie in kurzen Zyklen vor einem Koronarverschluss gegeben wurden (1997) [40]. Unter einer pharmakologischen Präkonditionierung versteht man demnach, dass man vor einer induzierten Ischämie ein Pharmakon verabreicht. Dieses Pharmakon aktiviert bestimmte kardioprotektive Signalwege und schützt somit das Herz vor den genannten Ischämie- und Reperfusionsschäden (siehe Abb. 1).

Die genauen Signalwege der Kardioprotektion sind bis heute nicht vollständig verstanden. Allerdings konnten verschiedene Signalschritte bzw. Moleküle innerhalb der Zelle als kardioprotektiv wirksam identifiziert werden.

Beispiele für diese Signalmoleküle sind unter anderem die Proteinkinase C (1995, Liu *et al.* [41]), aber auch Proteinkinase A (2004, Sanada *et al.* [42] bzw. die Proteinkinase G (2004, Oldenburg *et al.* [43]).

Im Laufe der Zeit konnten auch Infarktreaktionen für weitere Formen der Konditionierung gezeigt werden. Bei der ischämischen Postkonditionierung (IPostC) wird das Herz nach der Ischämie in der frühen Reperfusionsphase mit kurzen Zyklen von Ischämie- und Reperfusionsphasen konfrontiert. Hier zeigte sich 2003, dass die IPostC im Vergleich zur Präkonditionierung ähnlich gute signifikante Infarktreaktionen aufweist [44]. Eine weitere Möglichkeit der Konditionierung ergab sich aus der sogenannten ischämischen Fernpräkonditionierung, kurz RIPC (*remote ischemic preconditioning*), bei der die ischämischen Interventionen nicht am Herzen direkt, sondern an den Extremitäten durchgeführt werden. Neben dem Herzen gibt es Hinweise, dass auch die Fernkonditionierung anderer Organe möglich ist: Sales *et al.* konnten 2017 zeigen, dass drei Zyklen einer fünfminütigen Ischämie der Extremitäten die Inzidenz von ischämischen Läsionen im Gehirn nach einer Hirntumorresektion reduzieren konnten [45].

Trotz der vielversprechenden experimentellen Daten in den letzten Jahren, bleibt die klinische Datenlage zur Konditionierung insgesamt unklar. Große klinische Studien wie die RIPHEART Studie aus dem Jahre 2015 mit fast 1400

Patienten[46] oder die ERICCA-Studie mit mehr als 1600 Patienten [47] konnten die guten experimentellen Daten klinisch nicht bestätigen.

1.4.1 Kardioprotektive Signalwege

Bekannt sind mittlerweile unzählige verschiedene Signalmoleküle der Konditionierung [33]. Drei bisher etablierte Signalwege sind dabei der cGMP/PKG-Signalweg, der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalweg und der *survivor activating factor enhancement* (SAFE)-Signalweg [22].

Der erste wichtige Signalweg ist der cGMP/PKG-Signalweg: das Signalmolekül Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wurde erstmals 1963 beschrieben [48] und wird aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet. Entscheidend an der Bildung von cGMP beteiligt, ist die Guanylatcyclase (GC). Das cGMP akkumuliert während einer Ischämie. Dieser Vorgang verstärkt sich des Weiteren bei präkonditionierten Herzen, was ein Hinweis auf den kardioprotektiven Effekt des cGMPs ist [49]. Die Bildung von cGMP ist weitestgehend NO (Stickstoffmonoxid)-abhängig [50]. NO und natriuretische Peptide (NPs) sind die bisher bekannten Trigger des cGMP-PKG-Signalweges [51]. NO aktiviert dabei besonders die lösliche GC (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) [51]. NPs wiederum aktivieren die membranständige GC (*particulate guanylyl cyclase*, pGC) [51]. Beide Guanylatcyclasen sorgen dabei für den gleichen Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration, was gleichzeitig die PKG aktiviert [51]. Durch die Aktivierung der PKG werden u.a. mitochondriale Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Kaliumkanäle (mK_{ATP}-Kanäle) auf der inneren Mitochondrienmembran aktiviert [51]. Durch den Kalium Einstrom, kommt es zur vermehrten Wasserstoffperoxid-(H₂O₂) Bildung [51]. Diese aktiviert die Proteinkinase C (PKC) [51]. Am Ende dieses Signalweges bewahrt die Inhibition der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) so die Kardiomyozyten vor dem Zelltod [51].

Ein weiterer wichtiger Signalweg ist der RISK-Signalweg. Der Signalweg umfasst den PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH Kinase)-Akt Signalweg und die Erk 1/2. Dieser Signalweg wird von Wachstumsfaktoren und G-Proteingekoppelten-Rezeptoren aktiviert [52]. Es konnte schon 1996 gezeigt werden,

dass die PI3-Kinase die Akt Kinase direkt aktiviert [53]. Wenige Jahre später wurde nachgewiesen, dass auch dieser Signalweg kardioprotektiv wirkt [54, 55].

Der PI3K-Akt Signalweg phosphoryliert dabei diverse Substrate wie Glykogen Synthase Kinase-3 oder apoptotisch wirkende Proteine wie BAD, BAX, BIM, p53 und Caspasen [52]. Durch die Phosphorylierung der apoptotischen Proteine und der Caspasen werden diese inaktiviert und damit ein Zelltod verhindert [56]. Außerdem aktiviert dieser Signalweg die endotheliale NO-Synthase (e-NOS), was zu einer Akkumulation von NO und einer Inhibition der mPTP führt (vgl. auch NO als Trigger des cGMP/PKG-Signalweg) [56].

Der dritte wichtige Signalweg ist der sogenannte SAFE-Signalweg. Dabei akkumuliert bei einer Ischämie zunächst der sogenannte Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) [57]. TNF α wird beim Menschen in allen Zellen des Myokards mit Zellkern exprimiert und wirkt dabei über TNF Rezeptor 1 und 2 (TNFR1 und TNFR2) [58]. Je nach Konzentration [59] und welcher Subtyp von Rezeptor aktiviert wird, scheint TNF α entweder protektiv (TNFR2) oder schädlich (TNFR1) zu wirken [60, 61]. Bei Bindung von TNF α an den Rezeptor wird die Janus Kinase 2 (JAK-2) aktiviert, die wiederum den *signal transducer and activator of transcription 3 pathway* (STAT-3 Signalweg) aktiviert. Insgesamt wird so ein Zellüberleben hervorgerufen [62].

Endeffektor der verschiedenen Signalwege scheinen am Ende mitochondriale Kaliumkanäle zu sein, die wiederum, unter anderem durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, für eine Inhibition der mPTP und damit für eine Kardioprotektion sorgen [63].

Bereits im Jahre 1993 wurde gezeigt, dass die mPTP eine entscheidende Funktion bei Reperfusionsschäden ausübt [64]. Eine Öffnung der mPTP gilt hierbei als Auslöser von Reperfusionsschäden [23]. Der genaue Aufbau und die beteiligten Regulatoren der mPTP sind jedoch bis heute nicht vollständig verstanden [23]. In der Vergangenheit zeigten verschiedene Arbeiten, dass die mPTP aus mehreren Molekülen besteht, die sich an der inneren Mitochondrien-Membran befinden [23]. Beteiligte Regulator-proteine sind der Adenosin Nukleotid Transporter (ANT), *voltage-dependent anion-selective channel* (VDAC), mitochondriales Cyclophilin D (mtCypD), Hexokinase, Kreatinkinase, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-

α_L , Benzodiazepin-Rezeptor, GSK-3 β , PKC ϵ , PKG, p53 und *complement component 1 Q subcomponent-binding protein* (C1QBP) [23]. Der genaue molekuläre Aufbau ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnten Pinton *et al.* 2013 zeigen, dass die c-Untereinheit der ATP-Synthase eine entscheidende Rolle innerhalb der mPTP einzunehmen scheint [65].

Die mPTP ist ein Kanal mit hoher Leitfähigkeit und öffnet sich unter anderem bei hohen Calciumkonzentrationen [23]. Die Bedeutung des Ca^{2+} -Overloads für die Öffnung der mPTP zeigt sich anhand des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters (MCU). Mitochondrien von Mäusen ohne Expressierung von MCU, wiesen keine Ca^{2+} vermittelte mPTP Öffnung auf [23]. Nichtsdestotrotz kam es auch bei diesen Mäusen zu keinem vollständigen Schutz vor Reperfusionsschäden, was noch weitere entscheidende Mediatoren für eine Öffnung der mPTP nahelegt [23].

Begünstigt wird eine Öffnung des mPTP demnach auch bei Akkumulation von anorganischem Phosphat und reaktiver Sauerstoffspezies [22].

Die Öffnung der mPTP führt wie bereits beschrieben zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran [22] und ermöglicht größeren Molekülen die Passage in die mitochondriale Matrix. Die einströmenden Protonen sorgen für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und Störung der ATP-Produktion [23]. Der Energie-Stoffwechsel kommt somit zum Erliegen, wodurch das Mitochondrium anschwillt, es zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran kommt und die Apoptose eingeleitet wird [22, 33]. Aus diesem Grund führt eine Inhibition der Öffnung der mPTP somit zu einer Kardioprotektion.

Einer der an den kardioprotektiven Signalwegen beteiligten Kaliumkanälen ist der mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanal (mK_{ATP}-Kanal) [59]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch der mitochondriale kalziumabhängige Kaliumkanal (mK_{Ca}-Kanal) eine entscheidende Bedeutung in der Vermittlung kardioprotektiver Signale spielt [66, 67].

Der molekulare Aufbau des mK_{ATP}-Kanals ist nicht vollständig verstanden [33]. Es scheint sich bei dem Kanal um einen Multiprotein-Komplex zu handeln, bestehend aus einem Sulfonylharnstoffrezeptor und einer Kaliumkanaleinheit [33]. Unter anderem NO, PKC und PKG sind Aktivatoren des Kanals [33]. Sicher ist

jedoch, dass jene Kaliumkanäle eine tragende Rolle in kardioprotektiven Signalwegen innehaben.

Auch beim mK_{Ca} -Kanal konnte die Arbeitsgruppe um Cao *et. al* schon 2005 die Bedeutung des Kanals als Mediator der Kardioprotektion darstellen [68]. Den Aufbau des mK_{Ca} -Kanals begann man jedoch erst im letzten Jahrzehnt zu verstehen: Clements *et al.* fanden heraus, dass der porenbildende Teil des Kanals aus vier alpha-Untereinheiten besteht. Darüber hinaus gibt es beta- und gamma-Untereinheiten, die vor allem Kanaleigenschaften wie zum Beispiel die Spannungsabhängigkeit regulieren [69].

Die Calcium-abhängigen Kaliumkanäle sorgen bei Öffnung für einen Kalium-einstrom in die mitochondriale Matrix, was wiederum durch Limitierung der mitochondrialen Calcium-Einstroms die mPTP Öffnung inhibiert und damit kardioprotektiv wirkt [69]. Der genaue Signalweg bleibt jedoch noch unbekannt [69]. Untersuchungen mit mK_{Ca} -Kanal Knock-out Mäusen zeigen bei einem Myokardinfarkt keinen kardioprotektiven Effekt nach Gabe eines mK_{Ca} -Kanal-Aktivators [69].

1.5 Pharmaka

1.5.1 Ramelteon

Ramelteon (Ram) ist ein Melatonin-Rezeptoragonist und findet klinisch Anwendung bei der Behandlung von Schlafstörungen [70].

Eine Aktivierung von Melatonin Rezeptoren durch Ramelteon schützt vor einem myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden via Aktivierung mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanäle (mK_{Ca}) [67]. Die Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren durch Ramelteon zeigt sich darin, dass bei gleichzeitiger Gabe von Ramelteon und dem Melatonin-Rezeptor Antagonisten Luzindol die kardioprotektive Wirkung von Ramelteon vollständig aufgehoben wird [67].

Dabei besitzt Ramelteon eine hohe Affinität zu Melatoninrezeptor 1 (MT1) und Melatoninrezeptor 2 (MT2), jedoch eine geringe zu Melatoninrezeptor 3 (MT3) [71]. Daten aus vorherigen Studien zeigen, dass sowohl MT1 als auch MT2 zur Kardioprotektion aktiviert werden müssen [63, 67].

Ramelteon induziert eine Infarktgrößenreduktion sowohl durch Prä- als auch Postkonditionierung [72].

Die kardioprotektive Potenz von Ramelteon scheint vergleichbar mit dem protektiven Effekt von Melatonin zu sein [67]. Der Vorteil des Ramelteons im Vergleich zum Melatonin ist neben der oben genannten spezifischen Rezeptorbindung, dass es keine direkten antioxidativen Effekte aufweist und sich somit der kardioprotektive Effekt des Ramelteons hauptsächlich durch Aktivierung der Melatonin-Rezeptoren ergibt [67]. Auch Affinitäten zu anderen Rezeptoren oder rezeptorunabhängige Effekte spielen für Ramelteon keine messbare Rolle [71]. Bisher ist bezüglich des kardioprotektiven Ramelteon-Signalweges lediglich bekannt, dass mK_{Ca} und mK_{ATP} Kanäle beteiligt sind [67]. Der darüber hinaus vorgeschaltete Signalweg einer Ramelteon-induzierten Kardioprotektion ist unbekannt und soll in dieser Arbeit weiter untersucht werden. Ramelteon könnte demnach eine neue Möglichkeit darstellen, um einen Transfer der guten experimentellen Daten in die Klinik zu ermöglichen.

1.5.2 MK2206

MK2206 ist ein allosterischer Akt Kinase Inhibitor und inhibiert dabei alle drei menschlichen Isoformen der Akt Kinase (Akt 1-3) [73, 74].

Der Vorteil des MK-2206 besteht darin, dass keine Inhibierung von anderen Kinasen stattfindet und MK2206 somit hochselektiv auf die Akt Kinase wirkt [74].

Es gibt Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der Serin/Threonin Protein Kinase Akt einen kardioprotektiven Effekt hat [55, 75].

1.5.3 KT5823

KT5823 ist ein hochspezifischer Inhibitor der Proteinkinase G [76, 77]. Andere Kinasen wie die Proteinkinase A oder C werden erst bei signifikant höheren Konzentrationen des Inhibitors beeinflusst [76, 77]. Es ist bekannt, dass PKG an kardioprotektiven Signalwegen, wie zum Beispiel dem wichtigen cGMP/PKG-Signalweg, beteiligt ist. Sie aktiviert mK_{Ca} -Kanäle durch Phosphorylierung [78]. Auch andere Studien zeigten bereits eine Verbindung von PKG und mK_{Ca} -Kanälen [79].

1.5.4 BAY60-2207

BAY60-2207 ist ein Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (sGC) [80]. Die sGC ist ein wichtiges Enzym des kardiovaskulären Systems und wird in Gefäßendothelzellen [81], glatten Muskelzellen [82] und Kardiomyozyten [83, 84] exprimiert. Der physiologische Aktivator der sGC ist Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) [85]. Durch die Aktivierung wird unter anderem cGTP (cyclisches Guanosin triphosphat) zu cGMP (cyclisches Guanosin monophosphat) umgesetzt [85]. Der *second messenger* cGMP wiederum sorgt durch Aktivierung verschiedener cGMP-abhängiger Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanälen für die Aktivierung von diversen Signalwegen [85]. Der für diese Arbeit hervorzuhebende Effekt ist die Aktivierung der PKG und somit das Einleiten des cGMP/PKG-Signalweges, ohne jedoch selbst die Expression der PKG zu erhöhen [86].

1.5.5 NS1619

NS1619 ist ein spezifischer Aktivator des mK_{Ca} -Kanals [87]. Der mK_{Ca} -Kanal gehört neben dem mK_{ATP} -Kanal zu den wichtigsten an der Kardioprotektion beteiligten Akteuren [88, 89]. Eine Aktivierung dieser Kanäle wiederum inhibiert die mPTP, was schlussendlich in einem Zellüberleben resultiert [89].

1.6 Ziele der Arbeit

Die Fortschritte der Konditionierung und die damit einhergehenden Hinweise auf neue kardioprotektive Signaltransduktionswege und neue Erkenntnisse zur Rolle altbekannter Transduktionswege mehrten sich stetig.

Aus den Vorstudien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Ramelteon kardioprotektiv wirken kann. Außerdem sind Akt und PKG bekannte Enzyme kardioprotektiver Signalwege. Unklar ist jedoch bisher, welche Rolle jene Signalschritte in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion spielen und in welcher Reihenfolge die entsprechenden Enzyme aktiv werden.

Ziel dieser Studie war es somit zu untersuchen, ob (1) die Kinasen Akt und PKG an der Ramelteon-induzierten kardioprotektiven Signalvermittlung beteiligt sind und (2) ob Akt vor PKG und proximal vom mK_{Ca} -Kanal in der Signalkaskade liegt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Es liegt eine Genehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf vor (Projektnummer: O27/12 vom 10.05.2012). Für beide Teile dieser experimentellen Studie wurden insgesamt 87 junge, männliche Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich) im Alter von zwei bis drei Monaten verwendet. Vor Versuchsbeginn hatten die Tiere unter Standardbedingungen eine Eingewöhnungszeit von 8 Tagen in spezifisch-pathogenfreien (SPF) Räumen im ZETT. Die Tierhaltung erfolgte unter klimatisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55\pm 5\%$. Als Einstreu für die Käfige stand das entkeimte und entstaubte Weichholzgranulat Lignocel 3-4 (Fa. J. Rettenmaier und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) zur Verfügung. Das Futtermittel (R/M-H V1534-0 10 mm Pellets, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) stand den Ratten zu jeder Zeit zur Verfügung. Außerdem erhielten die Tiere nach Belieben keimfreies Wasser, das mittels Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 angesäuert wurde. Regelmäßige tierärztliche Kontrollen wurden durchgeführt und es wurden nur gesunde Tiere für die experimentellen Versuche verwendet.

2.1.2 Modifizierter Krebs-Henseleit Puffer

Zur retrograden Perfusion des isolierten Herzens wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung (KHP-Lösung) verwendet. Die Zusammensetzung des Puffers ist aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung

Substanz	Summenformel	Menge in g auf 5 l	Molarität in mM
Natriumchlorid	NaCl	34,48	118
Kaliumchlorid	KCl	1,751	4,7
Magnesiumsulfatheptahydrat	MgSO ₄ 7 H ₂ O	1,479	1,2
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	0,817	1,2
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	10,501	4,25
Ethylendiamintetraacetat	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,731	0,5
D-Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	9,909	11
L-Laktat Natriumsalz	C ₃ H ₅ NaO ₃	0,561	1
Calciumchlorid	CaCl ₂	1,249	2,25

g = Gramm; l = Liter, mM = Milli Molar

Gelöst wurden die Stoffe in destilliertem Milipore Wasser. Calciumchlorid wurde zuletzt hinzugegeben, um Kristallisierungsprozesse zu vermeiden. Während der Versuche wurde die Pufferlösung durchgehend mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Bei einer Temperatur von 37 °C hatte die KHP-Lösung somit einen pH- Wert von 7,4. Der Puffer wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Die mit KHP-Lösung befüllte Langendorff-Anlage war durch die entstehende Wassersäule druckkonstant, so dass später am untersuchten Herz ein konstanter Druck von 80 mmHg einwirkte. Der Puffer wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und dann luftfrei in die Anlage gefüllt. Sowohl mit Raumtemperatur (RT) als auch im erwärmten Zustand wurde eine Blutgasanalyse (BGA) mit dem BGA Gerät gemacht. Die Normwerte hierfür sind der Tabelle 2: Normwerte des Krebs-Henseleit Puffers zu entnehmen.

Tabelle 2: Normwerte des Krebs-Henseleit Puffers

Parameter	Normwerte des Puffers unter RT	Normwerte des Puffers mit 37°C
pH-Wert	7,01 ±0,05	7,3-7,4
Kalium	5,7 mmol/l	5,7 mmol/l
Natrium	140 mmol/l	140 mmol/l
Calcium	1,44 ± 0,05 mmol/l	1,33 mmol/l
Chlorid	115 ±2 mmol/l	112 mmol/l
pCO ₂	>40 mmHg	< 40 mmHg
Glukose	~200 mg/dl	~200 mg/dl
Laktat	~1 mmol/l	~1 mmol/l

pCO₂ = Kohlenstoffdioxidpartialdruck, mmol/l = Milli Molar pro Liter, mmHg = Millimeter Quecksilbersäule

2.1.3 Langendorff-Anlage

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
<i>Ballonschläuche</i>	Fine Bore Polythene Tubing	Fa Smith Medical International Ltd	Kent, Großbritannien
<i>Folie für Ballons</i>	Polyethylen-Folie		
<i>Fäden</i>	Polyester grün, nicht resorbierbar, geflochten	Fa. Resorba	Nürnberg, Deutschland
<i>Glasfritten</i>	25 cm Länge		
<i>Luftfänger</i>	7,5 cm Länge, 5 cm Breite 12,5 cm Länge, 6,5 cm Breite		
<i>Wärmekolben</i>	14,5 cm Länge x 3 cm Breite, 10 Windungen 28 cm Länge x 3,5 cm Breite, 23 Windungen		
<i>Wärmeschild</i>	4 cm Innendurchmesser, 6 cm Breite x 6 cm Länge		
<i>Stativ</i>	70 cm Länge		
<i>Ventil</i>	5,5 cm Länge		
<i>Brückenverstärker</i>	Bridge Amp., ML110 & FE221	Fa. AD Instruments	New South Wales, Australien
<i>USB-Datenerfassung</i>	PowerLab 8/30 ML870 PowerLab 4/26	Fa. AD Instruments	New South Wales, Australien
<i>Druckaufnehmer</i>	Blood Pressure Trans-	Fa. Harvard	Holliston, Massa-

	ducer APT300	Apparatus	chusetts
<i>Einhängethermostat</i>	Julabo EC	Fa. Sigma-Aldrich	Seelbach, Deutschland
<i>Umwälzthermostat</i>	Julabo MW6	Fa. Sigma-Aldrich	Seelbach, Deutschland
<i>Guillotine</i>	Kleintierdekapitator Modell 7950	Fa. Ugo Basile	Comero, Italien
<i>Perfusatflasche</i>	5000 ml und 2000 ml	Fa. Schott Duran	Wertheim, Deutschland
<i>Perfusatschläuche</i>	-Tygon Tube E-3603 (3,2 mm Innendurchmesser, 1,6 mm Wanddicke) -Tygon Tube (6 mm Innendurchmesser und 1,5 mm Wanddicke) -Tube Versilic 5x 8 mm	Fa. Saint-Gobain	Charny, Frankreich
<i>Perfusoren</i>	Perfusor Space Perfusor fm	Fa. Braun	Melsungen, Deutschland
<i>Perfusorleitung</i>	Original Perfusor Line Type IV-Standard-PE	Fa. Braun	Melsungen, Deutschland
<i>Schlauchpumpe</i>	Minipuls 3 Peristaltic Pump 2 channels	Fa. GILSON	Middleton, Wisconsin, USA
<i>Schlauchpumpenschlauch</i>	Phthalate Free PVC Pump Tubes (3,18 mm Innendurchmesser)	Fa. GILSON	Middleton, Wisconsin, USA
<i>Dreiwegehähne</i>	Discofix C	Fa. Braun	Melsungen, Deutschland
<i>Druckeichgerät</i>	Typ 367	Fa. Hugo Sachs Elektronik	March, Deutschland

2.1.4 Laborgeräte

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
BGA-Messgerät	ABL700 Flex	Fa. Radiometer	Willich, Deutschland
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1160	Fa. Greisinger	Regenstauf, Deutschland
Laborwaagen	440-45N Scout Pro SPU202 200 g	Fa. Kern & Sohn Fa. Ohaus Corporation, Pine	Balingen, Deutschland Brook, New Jersey,

			USA
Präzisionswaage	SECURA 224-IS	Fa. Sartorius	Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646 #4498	Fa. Knick	Berlin, Deutschland
Wärmebad	Modell 1001	Fa. GFL	Hannover, Deutschland
Wasserkocher	Bueno 1,71	Fa. WMF Consumer electric GmbH	Jettingen-Scheppach, Deutschland
Magnetrührer mit Temperatursensor:	Typ MR Hei-Tech	, Fa. Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	MiliQ-Biocel	Fa. Milipore corporation	Massachusetts, USA

2.1.5 Pharmaka

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
Heparin-Natrium Injektionslösung	CAS-Nr. 9041-08-1, 25.000 I.E.	Fa. Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Pentobarbital Injektionslösung	CAS-Nr. 76-74-4 Narcoren für Tiere	Fa. Merial GmbH	Halbergmoos, Deutschland
Ramelteon-Lösung	CAS-Nr. 196597-26-9	Fa. Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Akt Kinase Inhibitor	MK-2206 (dihydrochloride), CAS-Nr. 1032350-13-2	Fa. Med-ChemExpress	Monmouth Junction, New Jersey, USA
Proteinkinase Inhibitor	G KT5823, Item 10010965	Fa. Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA
GC Aktivator	BAY 60-2770, CAS-Nr. 1027642-43-8	Fa. Sigma Aldrich	München, Deutschland
NS1619	Item Nr. 18876	Fa. Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA

2.1.6 Chemikalien

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
Dimethylsulfoxid	CAS-Nr. 67-68-5,	Fa. Sigma AI-	München,

	Reinheit \geq 99,9%	drich	Deutschland
Acetonitril	271004-100ML, 99,8%	Fa. Sigma- Aldrich	München, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid	CAS-Nr. 298-96-4, Reinheit \geq 99%,	Fa. Serva Elec- trophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	CAS-Nr. 77-86-1, Reinheit \geq 99,9%,	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	CAS-Nr. 10043-52-4, Reinheit \geq 98%	Fa. Merck Euro- lab GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	CAS-Nr. 60-00-4, Reinheit \geq 98,5%	Fa. Sigma Al- drich	München, Deutschland
Formaldehyd 37%	CAS-Nr. 50-00-0, Reinheit \geq 37%	Fa. Merck Euro- lab GmbH	Darmstadt, Deutschland
Glukose (D-Glukose)	CAS-Nr. 50-99-7, Reinheit \geq 99,5%,	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	CAS-Nr. 14431-43-7, Reinheit \geq 99,5%	Fa. Fluka GmbH	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	CAS-Nr. 7647-14-5, Reinheit 100%,	Fa. VWR BDH Chemicals	Leuven, Belgien
Magnesiumsulfatheptahydrat	CAS-Nr. 10034-99-8, Reinheit \geq 99%	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Art. 4873, Reinheit \geq 99,5%	Fa. Merck Euro- lab GmbH	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	CAS-Nr. 144-55-8, Reinheit \geq 99,5%	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Laktat (L-Laktat-Natriumsalz)	CAS-Nr. 867-56-1, Reinheit \geq 99%	Fa. AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxidplättchen	C217321	Fa. Merck Euro- lab GmbH	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37%:	CAS-Nr. 7647-01-0, Reinheit 37%	Fa. Merck Euro- lab GmbH	Darmstadt, Deutschland
Eichlösungen (pH-Meter)	pH 4.0 Technischer Puffer pH 7.0 \pm 0,02	Fa. WTW Fa. Roth,	Weilheim, Deutschland Karlsruhe, Deutschland
0,9% NaCl Lösung	CAS-Nr. 7647-14-5, 500ml Infusion- slösung	Fa. Fresenius Kabi GmbH	Bad Homburg, Deutschland

2.1.7 Gase

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
Carbogen	5% CO ₂ , 95% O ₂	Fa. Linde AG	München, Deutschland
Stickstoff 5.0		Fa. Linde AG	München, Deutschland

2.1.8 Computer und Software

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
Aufzeichnungssoftware	LabChart Pro v. 8.0.5	ADInstruments Pty Ltd	Castle Hill, Australien
Flachbettscanner	CanoScan LIDE 700F	Fa. Canon	Krefeld, Deutschland
Planimetriesoftware:	SigmaScan V.5	SPSS Inc.	San Jose, CA, USA

2.1.9 Besteck und Pipetten

Material	Beschreibung	Hersteller	Herkunft
Große Präparierschere:	Mayo BC252R 170 mm	Fa. Aesculap	Tuttingen, Deutschland
Kleine Präparierschere	BC257R 115 mm	Fa., Aesculap	Tuttingen, Deutschland
Große Pinzette	Tissue Forcep BD587R	Fa., Aesculap	Tuttingen, Deutschland
Kleine Pinzetten	OC022R	Fa., Aesculap	Tuttingen, Deutschland
Thorax-Retraktor	BV101R	Fa., Aesculap	Tuttingen, Deutschland
Bulldogklemme	Diefenbach BH020R 38 mm x 12 mm	Fa. Braun	Melsungen, Deutschland
Skalpellsgriff	BB084R	Fa. Aesculap Inc	Pennsylvania, USA
Skalpells Klinge	Sterile Skalpellklingen #21	Fa. Braun	Melsungen, Deutschland
Pipette	2,5-5000 µl	Fa. Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Fa. Hirschmann Laborgeräte	Stuttgart, Deutschland
Serologische Pipette	Costar Stripette (Non-Pyrogenic 2ml in 2/10)	Fa. Corning Inc.,	Corning, USA

Einweg-Pipette	Pateur-Pipette 3ml	Fa. VWR	Leuven, Belgien
Mehrfachdispenser	Eppendorf-Multipipette Plus	Fa. Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Combitip	2x Eppendorf Combitips (1,0-50ml)	Fa. Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling-Berzdorf, Deutschland

2.2 Methodik

2.2.1 Präparation der Rattenherzen

Für die Präparation der Herzen wurden die Ratten intraperitoneal mit 80 mg/kg Pentobarbital sediert und erhielten zeitgleich 1000 I.E. Heparin i.p. zur Antikoagulation. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Ratte gewogen und tierschutzgerecht mit einer Guillotine dekapitiert. Im Anschluss wurde das Abdomen bzw. der Thorax epigastrisch mit einer großen Präparierschere inzidiert und anschließend wurde der Thorax rechts am Sternum vorbei bis zur Clavicula eröffnet. Mit einem Thoraxretraktor wurde der Thorax offengehalten und das Herz dann vorsichtig an der Aorta ascendens mit einer kleinen Präparierschere herausgeschnitten. Das präparierte Herz wurde in 0,9% Kochsalzlösung blutfrei gewaschen und dann an der Langendorff-Anlage mit Hilfe einer Knopfkanüle an der Aortenwurzel aufgehängt (siehe Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Langendorff-Anlage). Das Herz sollte somit nach weniger als drei Minuten retrograd über die Aorta mit dem Puffer in der Langendorff-Anlage perfundiert werden.

Im nächsten Schritt wurde das linke Vorhofrohr eröffnet und durch die Mitralklappe im linken Ventrikel ein wassergefüllter Ballon platziert. Dieser Ballon aus Polyethylen diente der Herzfunktionsmessung und einem konstanten linksventrikulären enddiastolischen Druck. Die hämodynamischen Daten, wie Herzfrequenz und linksventrikulären Druck (LVDP), wurden am Computer erfasst und gespeichert (LabChart Pro v. 8.0.5). Während des gesamten Versuchs wurde zu definierten Zeiten zusätzlich manuell der Koronarfluss gemessen.

Insgesamt wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz, linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP, Differenz aus systolischem und enddiastolischem Druck) und der Koronarfluss erfasst. Auch das Kontrakturmaximum in

mmHg während der Ischämie (*IS Peak*) wurde der LabChart Aufzeichnung entnommen.

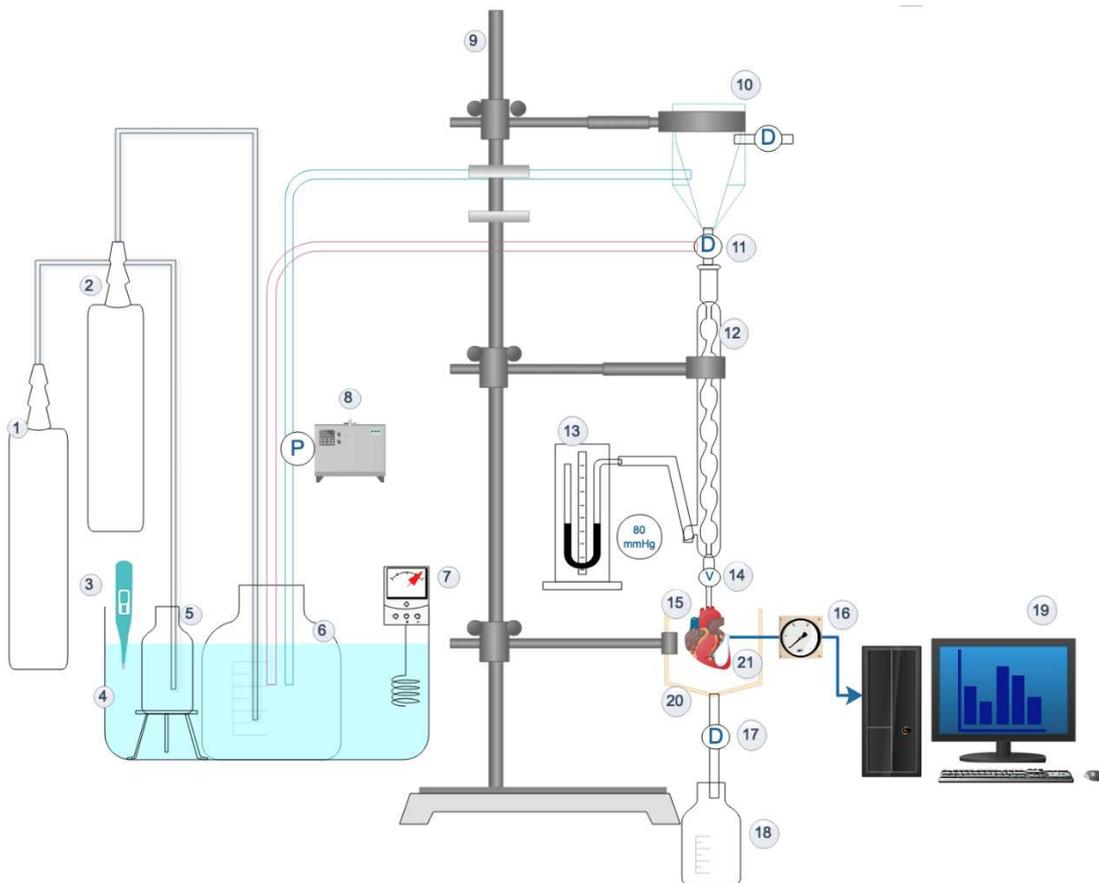


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Langendorff-Anlage

Aufbau der Langendorff-Anlage (nicht maßstabsgetreu): Der Krebs-Henseleit-Puffer (6) wird in einem Wasserbad (4) mittels eines Einhängethermostats (7) temperaturkontrolliert (3) erwärmt. Eine Rollerpumpe (8) zieht den Puffer in die Anlage. Um durch eine bestimmte Höhe der Anlage einen konstanten hydrostatischen Druck von 80 mmHg zu garantieren, wird die Anlage vor Versuchsbeginn durch ein Eichgerät (13) auf den genannten Druck geeicht. Der Puffer wird zunächst in den Luftfänger (10) gezogen. Sowohl im Luftfänger als auch anschließend im Wärmekolben (12) wird der Puffer durch einen Umwälzerhitzer mit einem zweiten Wärmekreislauf erwärmt, sodass der Puffer konstant bei 37° Celsius gehalten werden kann. Bei Öffnung des Ventils (14) wird das Herz (15) retrograd mit der Pufferlösung perfundiert. Dabei wird sowohl der Druck als auch die Herzfrequenz im linken Ventrikel durch einen mit Wasser gefüllten Ballon (21) von einem Druckaufnehmer (16) detektiert und grafisch dargestellt (19). In einer Ischämie wird der obere Dreiweghahn (11) nach unten hin blockiert, sodass der Puffer über den abfließenden Schlauch (roter Schlauch) wieder zurück in das Puffergefäß (6) läuft. Gleichzeitig wird der untere Dreiweghahn (17) schräggestellt und das Wärmeschild (20) mit Ischämie-Puffer (5) gefüllt. Weitere: Stickstoff (1), Carbogen (2), Stativ/Klemmen (9), Sammelgefäß für den Koronarfluss (18), Dreiweghahn (D).

2.2.2 Allgemeiner Versuchsablauf für beide Studienteile

Für beide Teile galt zunächst, dass das entsprechende Pharmakon zwanzig Minuten nach Versuchsbeginn über zehn Minuten jeweils vor der 33-minütigen Globalischämie gegeben wurde. Handelte es sich bei dem Pharmakon um einen Antagonisten, verlängerte sich diese Zeit um eine Minute auf elf Minuten. Falls Agonist und Antagonist in einem Versuch gegeben wurden, hatte der Antagonist somit eine Minute Zeit, um anzufuten und eine Rezeptorblockade zu ermöglichen, noch bevor der Agonist an den Rezeptor binden konnte. Bezüglich der Gabe der Pharmaka liefen in jeder Gruppe immer zwei Perfusoren gleichzeitig, die, abhängig vom Koronarfluss dafür sorgten, dass das Volumen der Lösung mit dem Pharmakon ein Prozent des Koronarflusses ausmachte. Direkt nach der Gabe der Pharmaka wurde in beiden Teilen eine 33-minütige Globalischämie eingeleitet. Dafür wurde zunächst der Pufferfluss in Richtung des Herzens gestoppt und direkt danach das Wärmeschild mit Puffer gefüllt, welches zusätzlich mit Stickstoff während der Globalischämie begast wurde. Außerdem galt über alle Versuche hinweg, dass Koronarflussmessungen zur *Baseline* von Minute 15, zur Hälfte der pharmakologischen Intervention von Minute 25 und 30 bzw. 60 Minuten nach Reperfusion erfolgten. Zum Schluss wurde das Herz von der Langendorff-Anlage entfernt, bei -20°C eingefroren und dann für die TTC-Färbung vorbereitet.

2.2.3 Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbung

Für die TTC Färbung wurden die Herzen mit einem Einmalskalpell in acht ca. 1-2 mm dicke axiale Scheiben geschnitten und mit der Schnittfläche nach unten in Wells Platten gelegt. Diese waren mit 0,75% TTC-Lösung in 1,4% TRIS-Puffer gefüllt und wurden in einem 37°C warmen Wasserbad für genau 15 Minuten inkubiert. Bei 37°C hatte die Lösung einen pH von 7,42. Für 100 ml Färbelösung wurde zunächst 0,75 g TTC und 1,41 g TRIS $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ in ein Becherglas gegeben. Anschließend wurde mit 0,9% NaCl Lösung ca. 95 ml aufgefüllt. Dann wurde die Lösung auf 37°C erhitzt und ein pH von 7,42 eingestellt. Die TTC-Färbemethode beruht auf einer Redox-Reaktion, die von Dehydrogenasen in vitalen Myokardzellen katalysiert wird. Tetrazolium liegt zunächst im oxidierten Zustand vor und ist farblos. Handelt es sich bei den Zellen um vitale Zellen mit funktionstüchtigen Dehydrogenasen, wird das Tetrazolium zu Forma-

zan reduziert und färbt sich rötlich. Schlussfolgernd färbt sich infarziertes Gewebe nicht an und bleibt farblos, da die entsprechenden Enzyme inaktiv sind [90]. Nach der 15-minütigen Inkubation wurden die Herzscheiben für ungefähr 20 Stunden mit einer 4% Formaldehyd Lösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Herzscheiben getrocknet und mittels eines Scanners, sortiert von Herzspitze bis zur Herzbasis, digitalisiert. Im Anschluss an das Scannen wurden die Herzscheiben zurück in die Wells Platten gelegt und 7 Tage lang unter einem Abzug getrocknet, bevor das Trockengewicht der Herzen bestimmt wurde.

2.2.4 Infarktgrößen-Auswertung

Die planimetrische Auswertung der Infarktgröße erfolgte verblindet mittels der Software SigmaScan Pro 5 (vergleiche Abb. 3).

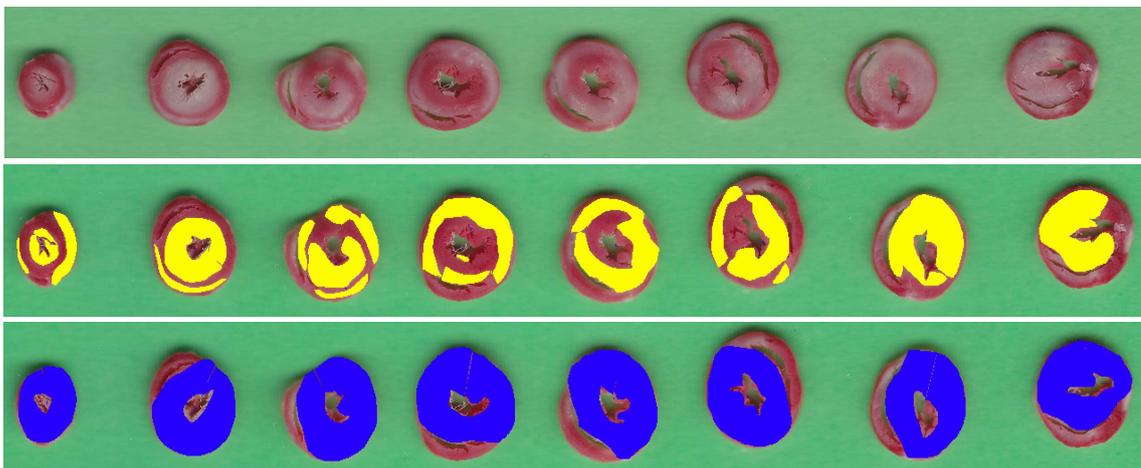


Abb. 3: Infarktgrößenbestimmung mittels Planimetrie der digitalisierte Herzscheiben

Dargestellt sind die gescannten Herzscheiben nach Färbung und Fixierung. Die oberste Reihe stellt die unbearbeiteten Herzscheiben dar. In der Mitte sieht man in Gelb die markierten Infarktareale. Zusätzlich wird die gesamte Fläche des linken Ventrikels markiert (hier in Blau, unterste Reihe). Zum Schluss wird aus der gelbmarkierten Infarktfläche und der blauen Gesamtfläche des linken Ventrikels der Quotient gebildet, der den relativen Infarktanteil ergibt.

2.2.5 Hämodynamik-Auswertung

Die relevanten Parameter für die hämodynamische Auswertung waren die Herzfrequenz und der LVDP. Diese Daten wurden aus der Software „LabChart“ in eine Excel Tabelle übertragen. Der Koronarfluss wurde zu den entsprechenden Zeiten (Minute 14, 25, 30 und 60) manuell während des laufenden Versuchs gemessen und notiert.

2.2.6 Untersuchung der Beteiligung von Akt bzw. PKG an der Kardioprotektion durch Ramelteon

In der ersten Kohorte wurde zunächst untersucht, ob beide Proteinkinasen, Akt bzw. PKG, einen Einfluss auf die Ramelteon-induzierten Signalwege haben. Es wurden sechs Versuchstiere in sechs Gruppen randomisiert. Das genaue Versuchsprotokoll der ersten Kohorte ist in Abb. 4 zu sehen.

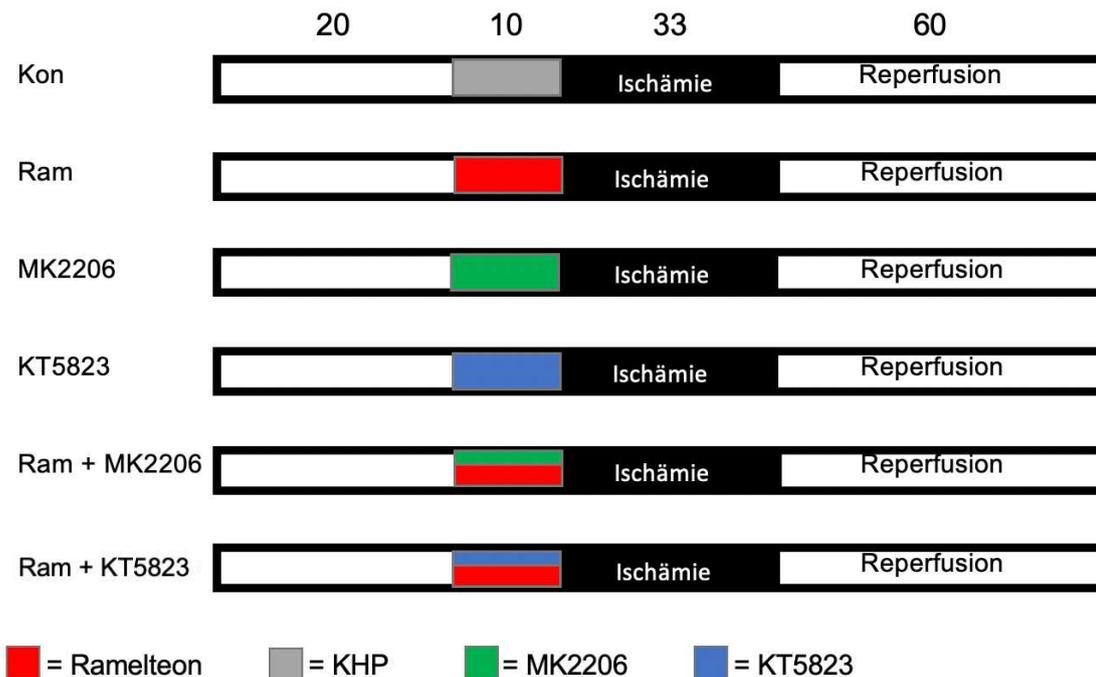


Abb. 4: Studienaufbau der ersten Kohorte

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Versuche in den sechs Gruppen in der ersten Kohorte. Randomisiert wurden je Gruppe n = 6 Tiere. Nach 19 bzw. 20 Minuten Perfusionszeit, folgte die 10- bzw. 11-minütige Substanzgabe, nach der 33-minütigen globalen Ischämie, folgte eine 60-minütige Reperfusion.

Kon = Kontrolle; Ram = Ramelteon [3 µM]; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor [1,5 µM]; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor [100 µM]; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; µM = Mikro Molar

Die Zusammensetzung der Perfusor- und Substanzlösungen ist in Tabelle 3 aufgelistet. Das entsprechende Pipettierschema für die Perfusoren sind Tabelle 4: Pipettierschema zu entnehmen.

Tabelle 3: Stockzusammensetzung und Molarität in der ersten Kohorte

Pharmakon	Stockzusammensetzung	Stock-Molarität	Perfusor-Molarität
Ramelteon	1 mg ist schon vom Hersteller in 1ml ACN gelöst worden, weitere Verdünnung in 2,856 ml 0,9% NaCl-Lösung = 1 mg/3,856 ml	1 mM	3 µM
MK2206	5 mg in 2.0816 ml DMSO	5 mM	1,5 µM
KT5823	1 mg in 201,8 µl DMSO	10 mM	100 µM

mg = Milli Gramm; ml = Milli Liter; NaCl = Natrium-Chlorid; mM = Milli Molar; µM = Mikro Molar; nM = Nanomolar; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; DMSO = Dimethylsulfoxid; ACN = Acetonitril

Tabelle 4: Pipettierschema in der ersten Kohorte

In der Tabelle dargestellt sind die Mengen, die jeweils in die Perfusorspritzen pipettiert wurden. Dabei liefen pro Versuch immer zwei Perfusoren gleichzeitig während der pharmakologischen Präkonditionierung. Die Applikation mittels der Perfusoren erfolgte mit einer Flussrate von 1% des zur *Baseline* (14.-15. Minute) gemessenen Koronarflusses. In jeder Perfusorlösung war als Lösungsmittel entweder Acetonitril mit 0,0778% oder Dimethylsulfoxid mit 2,52 % enthalten.

GRUPPE	KHP (µL)	DMSO (µL)	ACN (µL)	RAM (µL)	MK (µL)	KT (µL)
Kontrolle						
Perfusor 1	4996,11	-	3,89	-	-	-
Perfusor 2	4874	126	-	-	-	-
Ramelteon (3 µM)						
Perfusor 1	4985	-	-	15	-	-
Perfusor 2	4874	126	-	-	-	-
MK2206 (1,5 µM)						
Perfusor 1	4996,11	-	3,89	-	-	-
Perfusor 2	4874	124,5	-	-	1,5	-
KT5823 (100µM)						
Perfusor 1	4996,11	-	3,89	-	-	-
Perfusor 2	4874	76	-	-	-	50
Ramelteon + MK2206						
Perfusor 1	4985	-	-	15	-	-
Perfusor 2	4874	124,5	-	-	1,5	-
Ramelteon + KT5823						
Perfusor 1	4985	-	-	15	-	-
Perfusor 2	4874	76	-	-	-	50

ACN = Acetonitril; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; DMSO = Dimethylsulfoxid; Ram = Ramelteon; MK = Akt Inhibitor; PKG = Proteinkinase G; KT5823 = PKG Inhibitor; µM = Mikro Molar; µl = Mikro Liter

2.2.7 Reihenfolge der Signaltransduktion

Das Ziel der zweiten Kohorte dieser Studie war herauszufinden, in welcher Reihenfolge die Signaltransduktion der Ramelteon-induzierten Protektion in den Kardiomyozyten abläuft.

Für diesen Studienteil wurden je sechs Ratten in fünf Gruppen randomisiert. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 5 dargestellt.

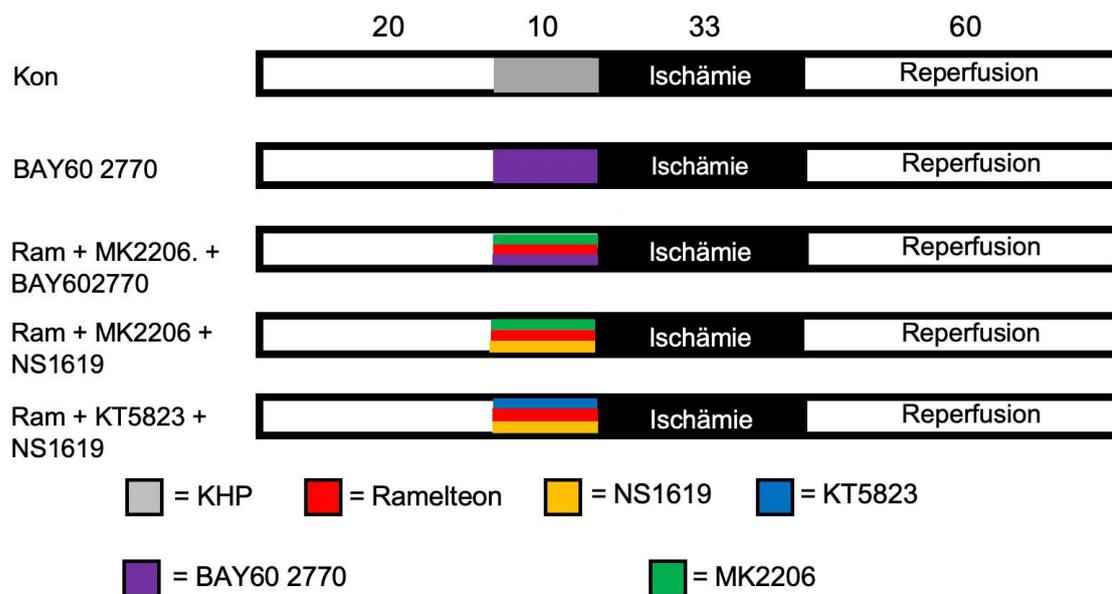


Abb. 5: Studienaufbau in der zweiten Kohorte

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Versuche in den fünf Gruppen in der zweiten Kohorte. Randomisiert wurden je Gruppe n = 6 Tiere. Nach 19 bzw. 20 Minuten Perfusionszeit, folgte die 10- bzw. 11-minütige Substanzgabe, nach der 33-minütigen globalen Ischämie, folgte eine 60-minütige Reperfusion.

Kon = Kontrolle; BAY60 2770 = indirekter PKG Aktivator [500 nM]; Ram = Ramelteon [3 µM]; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor [1,5 µM]; NS1619 = Aktivator des mKCa-Kanals [1000 µM]; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor [100 µM]; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; µM = Mikro Molar; nM = Nanomolar

Das Pipettierschema für die Perfusorlösungen ist in Tabelle 5 und die Zusammensetzung der Perfusorlösungen in Tabelle 6 abgebildet.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Molarität der Stocks in der zweiten Kohorte

Pharmakon	Stockzusammensetzung	Stock-Molarität	Perfusor-Molarität
Ramelteon	1 mg ist schon vom Hersteller in 1ml ACN gelöst worden, weitere Verdünnung in 2,856 ml 0,9% NaCl-Lösung = 1 mg/3,856 ml	1 mM	3 µM

MK2206	5 mg in 2.0816 ml DMSO	5 mM	1,5 µM
KT5823	1 mg in 201,8 µl DMSO	10 mM	100 µM
BAY60-2770	5 mg in 3,208 ml DMSO = Stock A 100µl von Stock A in 900µl KHP = Stock B	Stock A: 2,5 mM Stock B: 250 µM	500 nM
NS1619	5 mg in 138,034 µl DMSO	100 mM	1000 µM

mg = Milli Gramm; ml = Milli Liter; NaCl = Natrium-Chlorid; mM = Milli Molar; µM = Mikro Molar; nM = Nanomolar; KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; DMSO = Dimethylsulfoxid; ACN = Acetonitril

Tabelle 6: Zusammensetzung der Perfusorlösungen in der zweiten Kohorte

In der Tabelle dargestellt sind die Mengen, die jeweils in die Perfusorspritzen pipettiert wurden. Dabei liefen pro Versuch während der pharmakologischen Präkonditionierung immer zwei Perfusoren gleichzeitig. Die Applikation mittels der Perfusoren erfolgte mit einer Flussrate von 1% des zur *Baseline* (14.-15. Minute) gemessenen Koronarflusses. In jeder Perfusorlösung war als Lösungsmittel Acetonitril mit 0,0778% und/oder Dimethylsulfoxid mit 1% enthalten.

GRUPPE	KHP	ACN	DMSO	RAM	MK	KT	BAY	NS
	(µL)							
Kontrolle								
Perfusor 1	4946,11	3,89	50	-	-	-	-	-
Perfusor 2	4950	-	50	-	-	-	-	-
BAY60-2207								
Perfusor 1	4946,11	3,89	50	-	-	-	-	-
Perfusor 2	4941	-	49	-	-	-	10	-
Ram + MK2206 + BAY60-2207								
Perfusor 1	4926	-	49	15	-	-	10	-
Perfusor 2	4950	-	48,5	-	1,5	-	-	-
Ram + MK2206 + NS1619								
Perfusor 1	4935	-	-	15	-	-	-	50
Perfusor 2	4950	-	48,5	-	1,5	-	-	-
Ram + KT5823 + NS1619								
Perfusor 1	4935	-	-	15	-	-	-	50
Perfusor 2	4950	-	-	-	-	50	-	-

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer; ACN = Acetonitril; DMSO = Dimethylsulfoxid; Ram = Ramelteon; MK = MK2206/ Akt Kinase Inhibitor; KT = KT5823/ PKG Inhibitor; BAY = Bay 60-2770/ GC Aktivator; NS = NS1619/ Aktivator des mK_{Ca}-Kanals; µl = Mikro Liter; GC = Guanylatcyclase; Akt = Akt Kinase Inhibitor; PKG = Proteinkinase G Inhibitor

3 Ergebnisse

3.1 Infarktgrößen

In der ersten Kohorte reduzierte die alleinige Gabe von Ramelteon vor der Ischämie die Infarktgröße von $56 \pm 14\%$ (Kontrollgruppe Kon) auf $28 \pm 7\%$ (Ram: $P < 0,05$ vs. Kon). Sowohl der PKG- als auch der Akt-Inhibitor blockierten die Ram-induzierte Kardioprotektion (KT5823+Ram: $48 \pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Ram und MK2206+Ram: $49 \pm 8\%$, $P < 0,05$ vs. Ram), ohne einen eigenen Effekt bei alleiniger Gabe auf die Infarktgröße zu haben (KT5823: $51 \pm 6\%$, ns vs. Kon und MK2206: $52 \pm 3\%$, ns vs. Kon). Alle Infarktgrößen sind abgebildet in Abbildung 6.

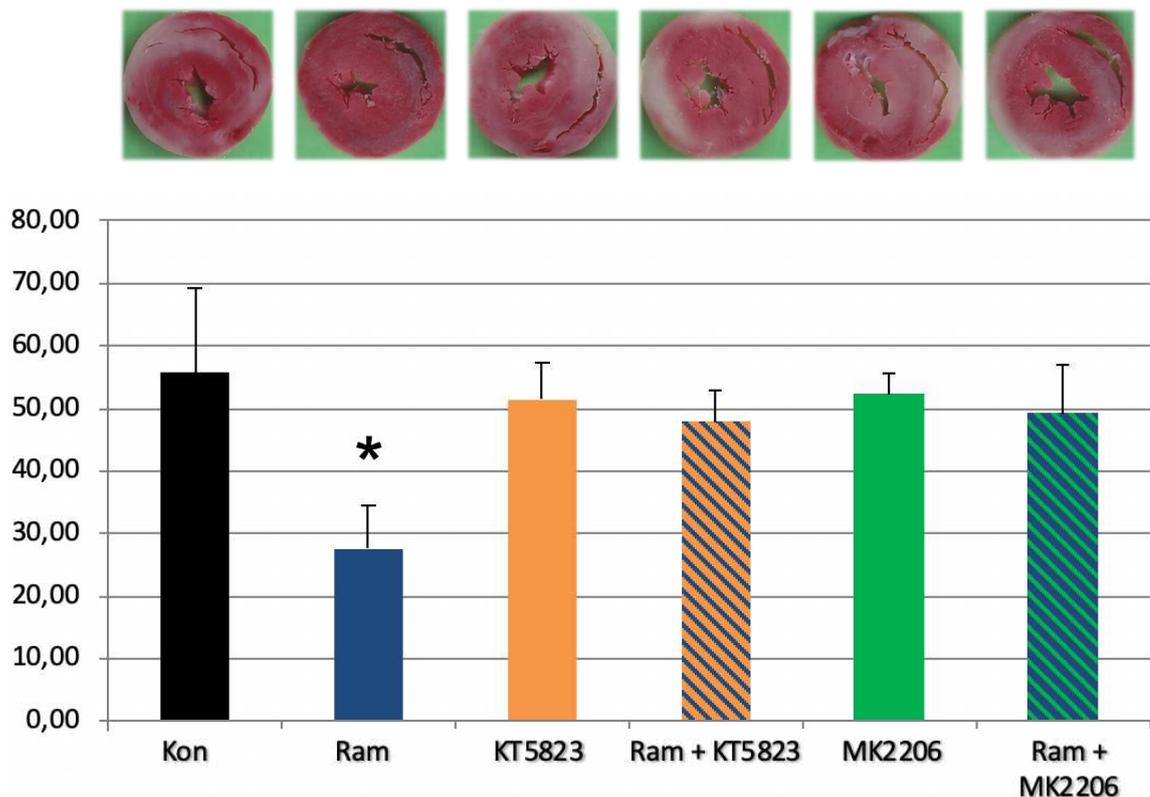


Abb. 6: Infarktgrößen in der ersten Kohorte

In der Abbildung sind die Infarktgrößen in den sechs Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) aus der ersten Kohorte zu sehen. Die y-Achse zeigt demnach die Infarktgröße in Prozent. Auf der x-Achse wiederum sieht man die einzelnen Gruppen mit den jeweiligen Interventionen. Repräsentative Herzscheiben aus den jeweiligen Gruppen finden sich jeweils über den entsprechenden Balken. Die Infarktgrößen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. * $P < 0,05$ vs. Kon

Kon = Kontrolle; Ram = Ramelteon; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; MK2206 = Akt Inhibitor

In der zweiten Versuchsreihe reduzierte der sGC-Aktivator BAY60-2770 die Infarktgröße von $48 \pm 5\%$ (Kontrollgruppe Kon) auf $33 \pm 6\%$ (BAY60-2770: $P < 0,05$ vs. Kon). Die Kombination von BAY60-2770 mit Ram und Akt-Inhibitor (MK2206+Ram+BAY60-2770) zeigte eine Infarktgröße von $31 \pm 11\%$ ($P < 0,05$ vs. Kon). Sowohl die Kombination von NS1619 mit MK2206 und Ram reduzierte die Infarktgröße signifikant (MK2206+Ram+NS1619: $29 \pm 5\%$, $P < 0,05$ vs. Kon), als auch NS1619 mit Ram und KT5823 (KT5823+Ram+NS1619: $33 \pm 6\%$, $P < 0,05$ vs. Kon). Die Infarktgrößen sind in Abbildung 7 veranschaulicht.

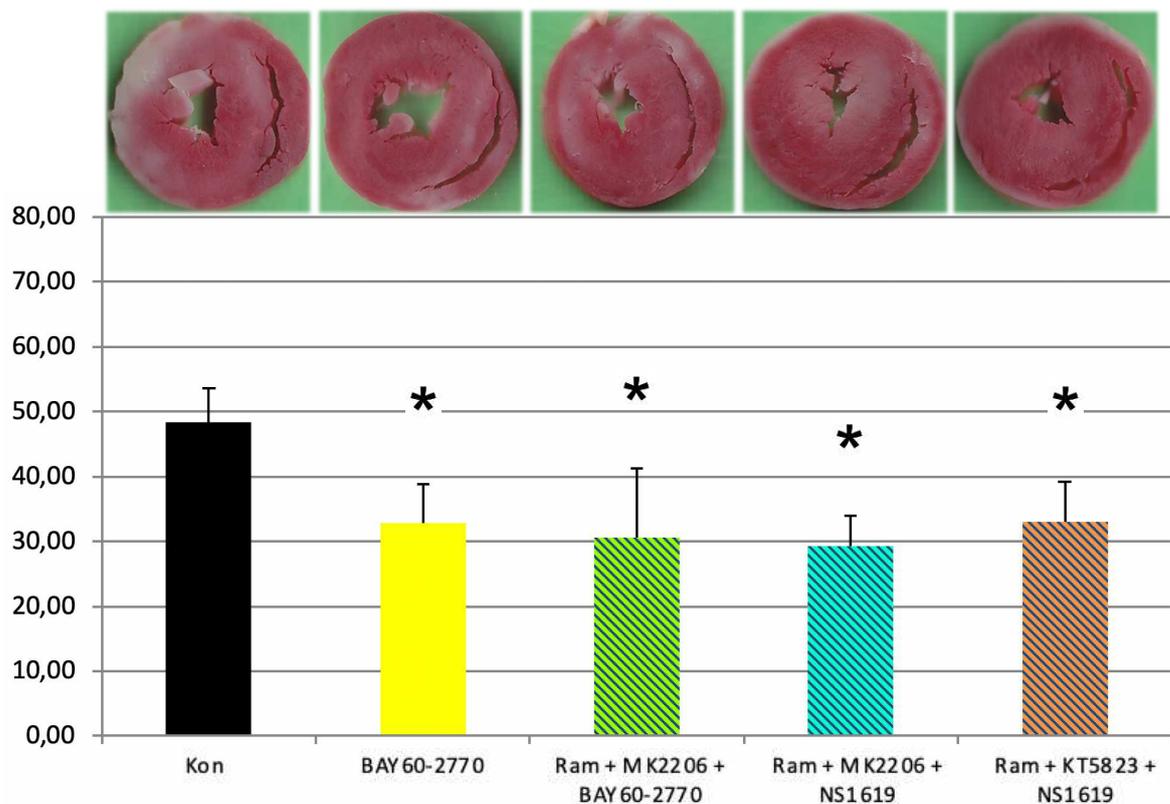


Abb. 7: Infarktgrößen in der zweiten Kohorte

In der Abbildung sind die Infarktgrößen in den fünf Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) aus der zweiten Kohorte zu sehen. Die y-Achse zeigt demnach die Infarktgrößen in Prozent. Auf der x-Achse wiederum sieht man die einzelnen Gruppen mit den jeweiligen Interventionen. Repräsentative Herzscheiben aus den jeweiligen Gruppen finden sich jeweils über den entsprechenden Balken. Die Infarktgrößen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. *P < 0,05 vs. Kon

Kon = Kontrolle; MK2206 = Akt Inhibitor; Ram = Ramelteon, BAY60-2770 = Indirekter PKG Aktivator; KT5823. = Proteinkinase G Inhibitor; NS1619 = Aktivator des mK_{Ca}-Kanals.

3.2 Hämodynamische Parameter

Erfasst wurden die Herzfrequenz, der linksventrikuläre Druck und der Koronarfluss. Der Koronarfluss wurde jeweils zu den entsprechenden Zeitpunkten manuell gemessen. Zwischen den Gruppen gab es bezüglich der Hämodynamik in den beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede. Nach der globalen Ischämiephase zeigte sich in allen Gruppen im Vergleich zur *baseline* ein signifikanter Abfall des Koronarflusses und des LVDP (Differenz aus systolischem und enddiastolischem linksventrikulärem Druck). Der *baseline* Wert spiegelt jeweils den Ausgangswert wider. Der PC-Wert ist der sogenannte Präkonditionierungs-Wert und wurde nach Ablauf der ersten Hälfte der Substanzgabe bestimmt (ab der 5. Minute der Intervention), um einen möglichen direkt einsetzenden Effekt des Pharmakons auf die Hämodynamik detektieren zu können. Isch 63 beschreibt die letzte Minute der Ischämie. Jeweils 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämie, in der Reperfusionphase, flossen die Messwerte ebenso in die Auswertung ein (Rep30 und Rep60). Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer ANOVA mit Tukey's post-hoc-test. Die hämodynamischen Parameter aus den folgenden Tabellen und Abbildungen zu entnehmen. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Das Signifikanzniveau beträgt $<0,05$.

Tabelle 7: Durchschnittliche Herzfrequenzen in *bpm* in der ersten Kohorte

Herzfrequenz (<i>bpm</i>)	baseline	PC	Isch63	Rep30	Rep60
Kontrolle	281 ±34	283 ±35	0 ±0	287 ±21	265 ±37
Ramelteon	291 ±62	293 ±74	0 ±0	217 ±98	206 ±54
MK2206	258 ±32	236 ±42	0 ±0	200 ±72	232 ±61
Ram + MK2206	288 ±60	262 ±74	0 ±0	262 ±87	247 ±43
KT5823	298 ±48	275 ±27	0 ±0	228 ±75	201 ±50
Ram + KT5823	303 ±30	274 ±37	0 ±0	211 ±40	214 ±54

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; MK2206 = Akt Inhibitor; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase

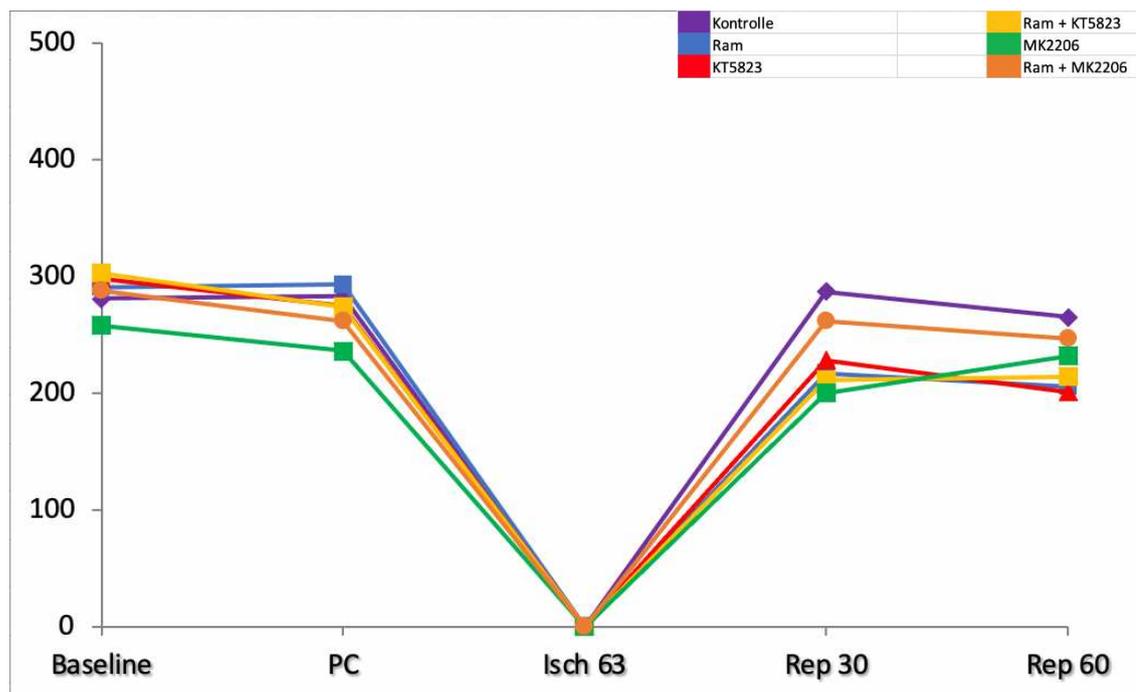


Abb. 8: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Herzfrequenz in *bpm* in der ersten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist die Herzfrequenz in *beats per minute* (*bpm*).

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase; Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer

Tabelle 8: Durchschnittlicher linksventrikulär entwickelter Druck in mmHg in der ersten Kohorte

LVDP	baseline	PC	Isch63	Rep30	Rep60
<i>Kontrolle</i>	138±14	135 ±21	0 ±0	29±14*	39 ±14*
<i>Ramelteon</i>	155 ±36	150 ±26	0 ±0	23 ±11*	35 ±15*
<i>MK2206</i>	147 ±24	138 ±24	0 ±0	31 ±10*	30 ±11*
<i>Ram + MK2206</i>	149 ±37	133 ±42	0 ±0	25 ±15*	34 ±14*
<i>KT5823</i>	145 ±20	148 ±34	0 ±0	26 ±13*	33 ±15*
<i>Ram + KT5823</i>	155 ±15	148 ±45	0 ±0	27 ±19*	33 ±8*

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; MK2206 = Akt Inhibitor; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase

* p<0,05 vs. *baseline*

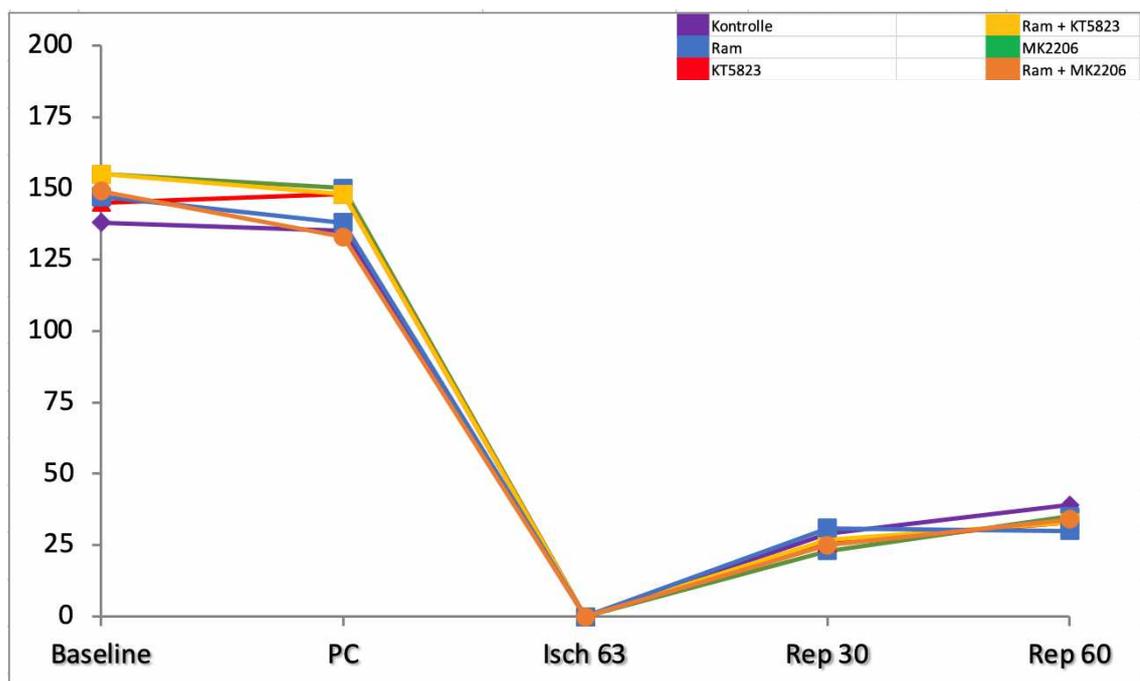


Abb. 9: Graphische Darstellung des durchschnittlichen linksventrikulär entwickelten Druckes in mmHg in der ersten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist der linksventrikulär entwickelte Druck in mmHg.

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase; Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer

Tabelle 9: Durchschnittlicher Koronarfluss in ml in der ersten Kohorte

Koronarfluss	baseline	PC	Isch63	Rep30	Rep60
Kontrolle	16 ±3	17 ±4	0 ±0	7 ±2*	6 ±1*
Ramelteon	17 ±2	16 ±4	0 ±0	7 ±2*	6 ±2*
MK2206	15 ±6	13 ±7	0 ±0	6 ±2*	5 ±2*
Ram + MK2206	16 ±4	14 ±6	0 ±0	7 ±2*	6 ±2*
KT5823	16 ±1	14 ±2	0 ±0	7 ±1*	5 ±1*
Ram + KT5823	16 ±2	14 ±2	0 ±0	6 ±1*	5 ±1*

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; MK2206 = Akt Inhibitor; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase

* $p < 0,05$ vs. *baseline*

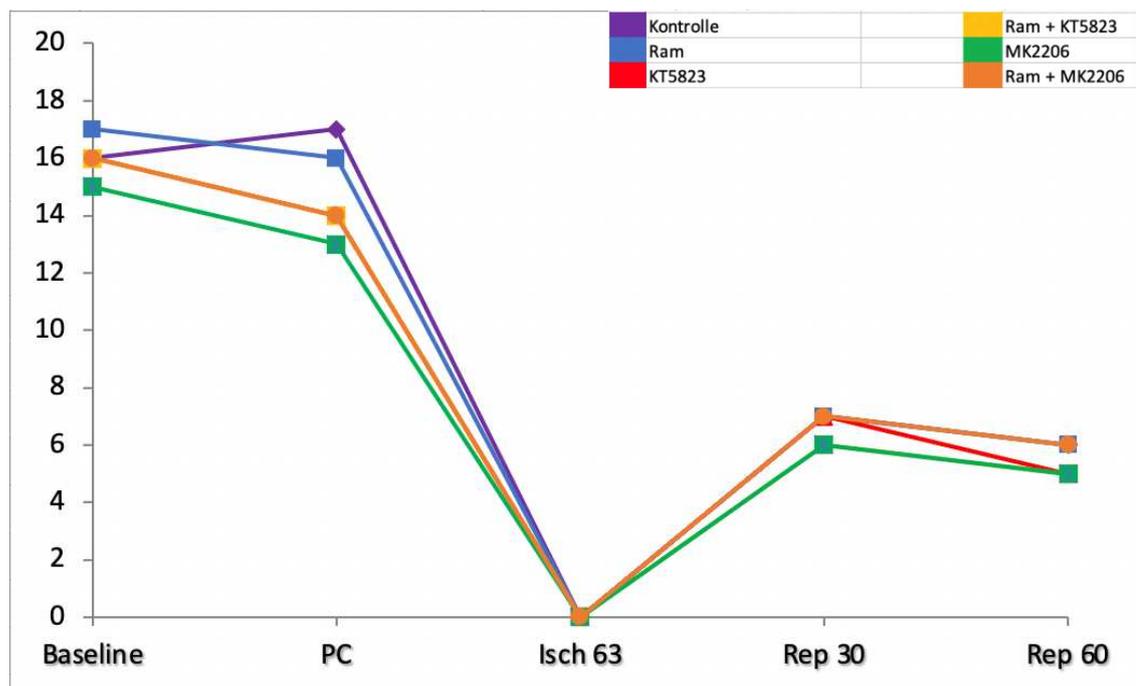


Abb. 10: Graphische Darstellung des Koronarflusses in ml in der ersten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist der Koronarfluss in ml pro Minute.

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase, Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer.

Tabelle 10: Durchschnittliche Herzfrequenz in bpm in der zweiten Kohorte

Herzfrequenz (bpm)	baseline	PC	Isch 63	Rep30	Rep60
<i>Kontrolle</i>	302 ±34	299 ±35	0 ±0	248 ±65	228 ±49
<i>BAY60-2770</i>	284 ±24	262 ±15	0 ±0	256 ±67	260 ±39
<i>Ram +MK2206 + BAY60-2770</i>	276 ±22	258 ±32	0 ±0	282 ±77	235 ±58
<i>Ram + MK2206 + NS1619</i>	309 ±13	285 ±15	0 ±0	260 ±62	246 ±47
<i>Ram + KT5823 + NS1619</i>	288 ±38	246 ±29	0 ±0	213 ±76	212 ±93

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

BAY60-2770 = indirekter Proteinkinase G Aktivator; MK2206 = Akt Inhibitor; Ram = Ramelteon; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; NS1619= mK_{Ca}-Kanal Aktivator; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase

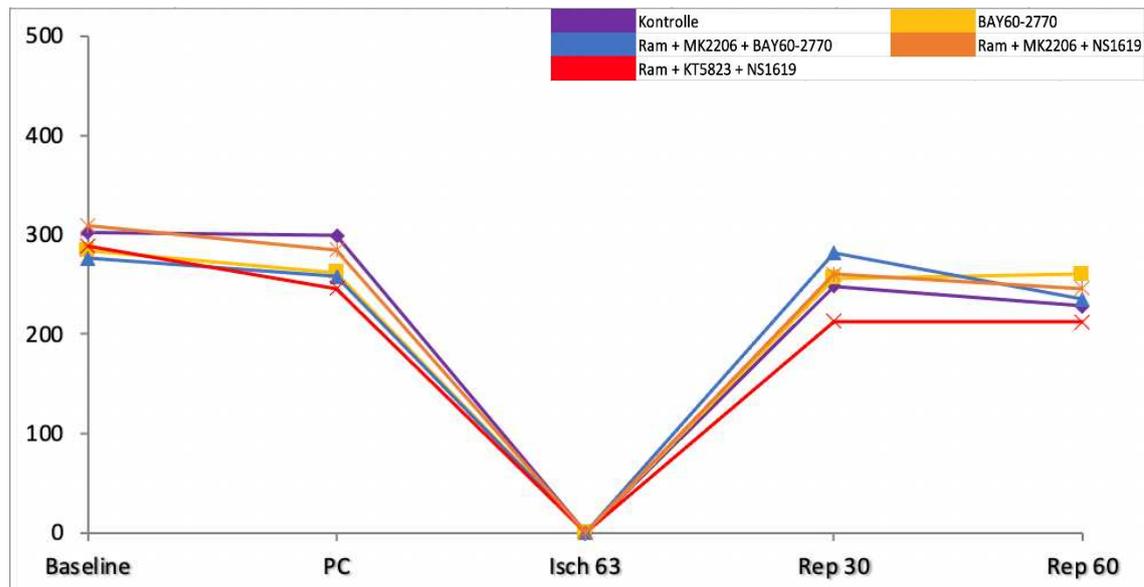


Abb. 11: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Herzfrequenz in bpm in der zweiten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist die Herzfrequenz in *beats per minute* (bpm).

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase; Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; BAY60-2770 = indirekter PKG Aktivator; NS1619 = Aktivator des mK_{Ca}-Kanals.

Tabelle 11: Durchschnittlicher linksventrikulär entwickelter Druck in mmHg in der zweiten Kohorte

LVDP	baseline	PC	Isch63	Rep30	Rep60
Kontrolle	132 ±20	135 ±18	0 ±0	29 ±15*	40 ±12*
BAY60-2770	147 ±18	153 ±18	0 ±0	28 ±10*	31 ±17*
Ram +MK2206 + BAY60-2770	152 ±30	149 ±33	0 ±0	22 ±12*	31 ±9*
Ram + MK2206 + NS1619	147 ±23	148 ±25	0 ±0	16 ±10*	28 ±16*
Ram + KT5823 + NS1619	153 ±26	152 ±21	0 ±0	19 ±9*	24 ±16*

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

BAY60-2770 = indirekter Proteinkinase G Aktivator; MK2206 = Akt Inhibitor; Ram = Ramelteon; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; NS1619= mK_{Ca}-Kanal Aktivator; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase

* p<0,05 vs. *baseline*

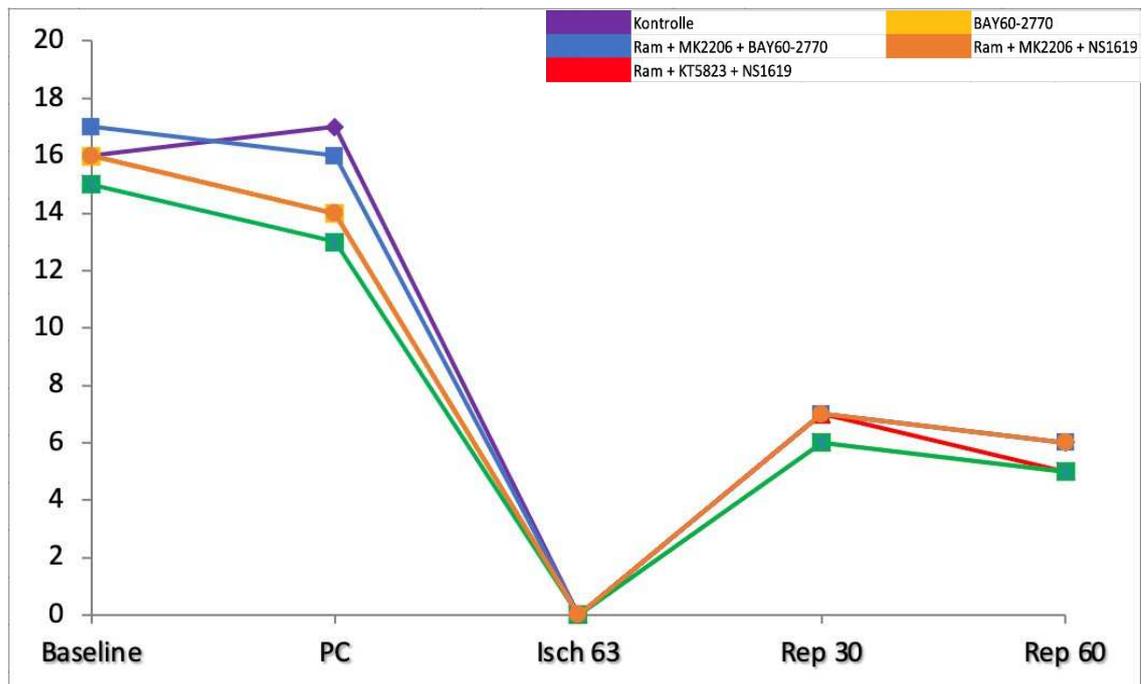


Abb. 12: Graphische Darstellung des durchschnittlichen linksventrikulär entwickelten Druckes in mmHg in der zweiten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist der durchschnittliche linksventrikulär entwickelte Druck in mmHg.

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase; Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; BAY60-2770 = indirekter PKG Aktivator; NS1619 = Aktivator des mK_{Ca}-Kanals.

Tabelle 12: Durchschnittlicher Koronarfluss in ml in der zweiten Kohorte

Koronarfluss	baseline	PC	Isch63	Rep30	Rep60
<i>Kontrolle</i>	16 ±4	16 ±4	0 ±0	9 ±1*	8 ±1*
<i>BAY60-2770</i>	16 ±3	16 ±3	0 ±0	9 ±1*	8 ±1*
<i>Ram +MK2206 + BAY60-2770</i>	15 ±3	14 ±3	0 ±0	9 ±2*	6 ±1*
<i>Ram + MK2206 + NS1619</i>	17 ±4	17 ±3	0 ±0	7 ±1*	7 ±1*
<i>Ram + KT5823 + NS1619</i>	17 ±4	15 ±2	0 ±0	6 ±1*	6 ±1*

Daten als Mittelwerte ±Standardabweichung

BAY60-2770 = indirekter Proteinkinase G Aktivator; MK2206 = Akt Inhibitor; Ram = Ramelteon; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; NS1619= mK_{Ca}-Kanal Aktivator; PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase;

* p<0,05 vs. *baseline*

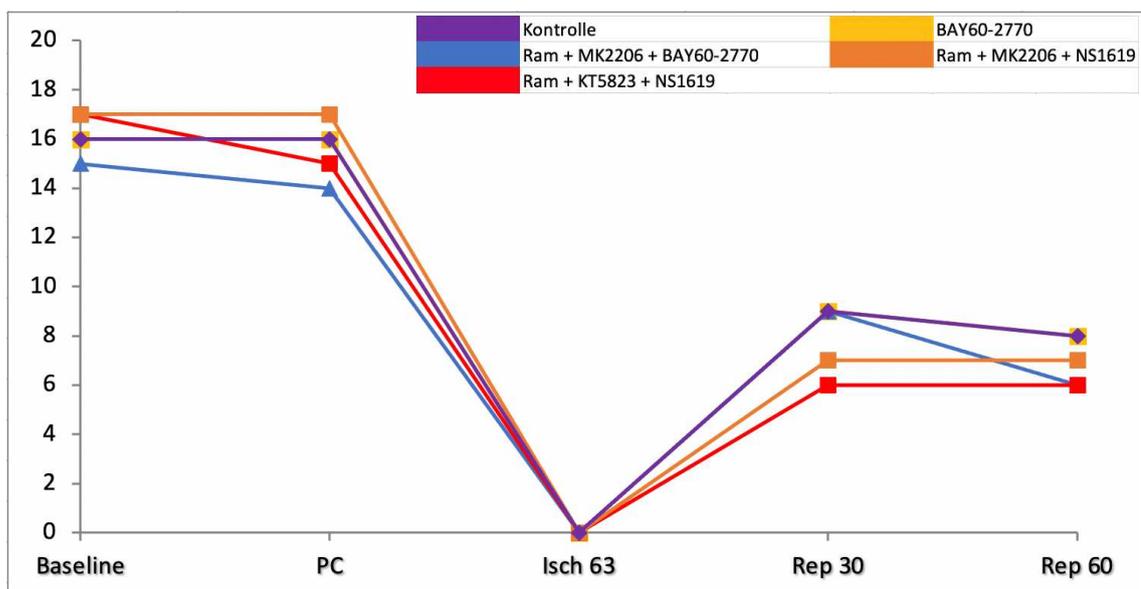


Abb. 13: Graphische Darstellung des durchschnittlichen Koronarflusses in ml in der zweiten Kohorte

Der Graph zeigt auf der x-Achse die verschiedenen Zeitpunkte im Verlauf des Versuchs. Auf der y-Achse abgebildet, ist der Koronarfluss in ml pro Minute.

PC = Präkonditionierung; Isch 63 = Bis zur Minute 63 andauernde Globalischämie; Rep 30/60 = Reperfusion 30 bzw. 60 Minuten nach der Ischämiephase, Ram = Ramelteon; MK2206 = Akt Kinase Inhibitor; KT5823 = Proteinkinase G Inhibitor; Kontrolle = Krebs-Henseleit-Puffer; BAY60-2770 = indirekter PKG Aktivator; NS1619 = Aktivator des mK_{Ca}-Kanals.

3.3 Weitere Messdaten

Nach den Versuchen wurden neben den oben genannten hämodynamischen Parametern auch das Kontrakturmaximum des linken Ventrikels (in mmHg) während der Ischämie bestimmt. Dafür wurde aus der LabChart Aufzeichnung der linksventrikuläre Druck zum Zeitpunkt der größten Amplitude (sogenannter *IS Peak*) bestimmt. Der Zeitpunkt des Kontrakturmaximums ist in Klammern der Tabelle zu entnehmen. Außerdem erfasste Messdaten waren das Rattengewicht, das Herznassgewicht (direkt nach Versuchsende) und das Herztrockengewicht (nach Scannen der Herzscheiben 7 Tage unter dem Abzug getrocknet), jeweils alle in Gramm angegeben. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung zu verstehen. Hier zeigten sich in beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 13: Weitere Messdaten aus der ersten Kohorte

Versuchsgruppe	IS (mmHg)	Peak (g)	Rattengewicht (g)	Nassgewicht (g)	Trockengewicht (g)
<i>Kontrolle</i>	69 \pm 11 \pm 0,60 min)	(15,5	293 \pm 15	1,29 \pm 0,06	0,14 \pm 0,01
<i>Ramelteon</i>	64 \pm 13 \pm 1,6 min)	(16,9	289 \pm 15	1,30 \pm 0,05	0,12 \pm 0,02
<i>MK2206</i>	61 \pm 10 \pm 1,84)	(18,1	284 \pm 32	1,28 \pm 0,10	0,13 \pm 0,01
<i>Ram + MK2206</i>	71 \pm 17 \pm 1,8 min)	(16,4	301 \pm 20	1,28 \pm 0,11	0,14 \pm 0,01
<i>KT5823</i>	63 \pm 9 \pm 1,6 min)	(17,1	288 \pm 10	1,31 \pm 0,03	0,13 \pm 0,01
<i>Ram + KT5823</i>	73 \pm 15 \pm 1,21 min)	(17,6	282 \pm 13	1,31 \pm 0,04	0,14 \pm 0,01

Tabelle 14: Weitere Messdaten aus der zweiten Kohorte

Versuchsgruppe	IS Peak (mmHg)	Rattengewicht (g)	Nassgewicht (g)	Trockengewicht (g)
<i>Kontrolle</i>	56 ±11 (15,8 ±1,5 min)	301 ±24	1,31 ±0,1	0,13 ±0,02
<i>BAY60-2770</i>	68 ±15 (14,7 ±1,3 min)	308 ±13	1,32 ±0,04	0,12 ±0,01
<i>Ram + MK2206 + BAY602770</i>	60 ± 6 (14,8 ±1,5)	287 ±31	1,27 ±0,09	0,14 ±0,02
<i>Ram + MK2206 + NS1619</i>	59 ±9 (16,3 ± 2,1 min)	286 ±11	1,29 ±0,03	0,13 ±0,01
<i>Ram + KT5823 + NS1619</i>	61 ±9 (16,7 ±1,3)	290 ±12	1,29 ±0,06	0,13 ±0,02

4 Diskussion

Trotz neuer Therapiemöglichkeiten ist eine myokardiale Ischämie immer noch mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden [91]. Umso wichtiger sind somit neue therapeutische sowie pharmakologische Ansätze, um das Herz vor dem Ischämie- und Reperfusionsschaden zu schützen.

Die vorliegende Arbeit hat sich mit Ramelteon beschäftigt, das in der Lage ist eine Kardioprotektion im Rahmen einer myokardialen Ischämie auszulösen. Die genauen Signalmechanismen sind dabei noch unklar und werden mit der vorliegenden Arbeit weiter aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass PKG und Akt einen entscheidenden Schritt in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion darstellen. In dieser Signalkaskade scheint Akt vor PKG aktiviert zu werden, bevor eine Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals stattfindet.

Der genaue kardioprotektive Signalweg der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion ist nicht bekannt [92], dennoch konnte in der Vergangenheit bereits aufgezeigt werden, dass Ramelteon über eine Aktivierung von Melatonin-Rezeptoren kardioprotektiv wirkt [67]. Bei gleichzeitiger Gabe von Ramelteon und dem Melatonin-Rezeptor Antagonisten Luzindol wird der kardioprotektive Effekt von Ramelteon vollständig aufgehoben [67]. Zum Ausschluss von möglichen unerwünschten Wirkungen oder einer zu starken Stimulation durch Ramelteon, wurde eine niedrigste protektive Konzentration von Ramelteon ermittelt [67]. Eine niedrigste protektive Konzentration von $0,03 \mu\text{M}$ löst eine signifikante Infarktgrößenreduktion aus. Höhere Konzentrationen führen nicht zu einem noch stärkeren Effekt und niedrigere Konzentrationen lösen demnach keinerlei protektiven Effekt aus [67]. Diese niedrigste protektive Konzentration von $0,03 \mu\text{M}$ wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

In der ersten Kohorte dieser Arbeit zeigt sich, dass eine alleinige Ramelteon Gabe, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Intervention, signifikant geringere Infarktgrößen bewirkt. Zusätzlich wird durch gleichzeitige Gabe von Ramelteon mit jeweils einem PKG Inhibitor (KT5823) und einem Akt Inhibitor (MK2206) der kardioprotektive Effekt von Ramelteon vollständig aufgehoben. Eine alleinige Akt- bzw. PKG-Inhibitor Gabe hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Zur Ein-

ordnung der Ergebnisse ist relevant, dass KT5823 ein hochspezifischer Inhibitor der Proteinkinase G ist. Nur in deutlich höheren Konzentrationen, als in dieser Arbeit verwendet, kann eine Wirkung auf andere Kinasen wie die Proteinkinase A oder C beobachtet werden [76, 77].

MK-2206 ist ebenso hochselektiv und inhibiert lediglich alle drei menschlichen Isoformen der Akt Kinase und keine anderen Kinasen [74]. Aufgrund der jeweils hochspezifischen Wirkung von KT5823 und MK-2206 an der PKG bzw. Akt zeigt sich, dass beide Kinasen eine essenzielle Rolle in der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion spielen, da eine Inhibition jener Kinasen den kardioprotektiven Effekt des Ramelteons vollständig aufhebt.

Sowohl PKG als auch Akt sind Bestandteile vieler untersuchter kardioprotektiver Signalwege. Zum einen wird der sogenannte cGMP-PKG-Signalweg über NO und natriuretische Peptide (NPs) initiiert und hierbei die GC aktiviert [51]. Dadurch kommt es zum Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration, was gleichzeitig die PKG aktiviert [51]. Durch die Aktivierung der PKG werden u.a. mitochondriale Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Kaliumkanäle (mK_{ATP} -Kanäle) auf der inneren Mitochondrienmembran aktiviert [51]. Durch den Kaliumeinstrom kommt es zur vermehrten Wasserstoffperoxid-(H_2O_2) Bildung [51]. Diese aktiviert die Proteinkinase C (PKC) [51]. Am Ende dieses Signalweges bewahrt die Inhibition der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Pore (mPTP) so die Kardiomyozyten vor dem Zelltod [51].

Zum anderen ist Akt Teil des PI3K-Akt Signalweg. Die Aktivierung dieses Signalweges phosphoryliert dabei diverse Substrate wie Glycogen-Synthase-Kinase-3 β oder apoptotisch wirkende Proteine [52]. Durch die Phosphorylierung der apoptotischen Proteine und der Caspasen werden diese inaktiviert und damit der Zelltod verhindert [56]. Außerdem aktiviert dieser Signalweg die endotheliale NO-Synthase (eNOS), was zu einer Akkumulation von NO und einer Inhibition der mPTP führt. NO wirkt auch als Trigger des cGMP/PKG-Signalweg. Somit scheint Akt auch mit dem cGMP-PKG Signalweg in Verbindung zu stehen [56].

Dass die PKG- und Akt-Signalwege eng miteinander verknüpft sind, zeigt das Ergebnis der zweiten Kohorte dieser Studie, wodurch vor allem neue Erkenntnisse über die Abfolge der Signalkaskade gewonnen werden konnten.

Eine indirekte PKG-Aktivierung durch Aktivierung der GC hat einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt wie eine Ramelteon Applikation.

Inhibiert man Akt bei gleichzeitiger PKG Aktivierung und Ramelteon Gabe, zeigt sich eine signifikante Infarktreaktion. Das heißt, dass eine vollständige Aufhebung der Ramelteon-induzierten kardioprotektiven Wirkung mittels Gabe eines Akt Inhibitors durch zusätzliche Aktivierung der PKG wiederum vollständig wiederhergestellt wird und eine Kardioprotektion messbar ist. Folglich muss Akt der PKG im untersuchten Signalweg vorangeschaltet sein, da sonst eine PKG Aktivierung keinen protektiven Effekt haben könnte.

Außerdem ging es in der zweiten Kohorte um die Rolle bzw. Abfolge der Aktivierung der mitochondrialen Kaliumkanäle. Insbesondere der mK_{Ca} -Kanal als Wirkziel von NS1619 spielt in dieser Arbeit eine zentrale Rolle.

Es ist durch vorherige Studien bekannt, dass eine Beteiligung der mK_{Ca} - und mK_{ATP} -Kanäle an der Ramelteon induzierten Kardioprotektion existiert [67]. Um herauszufinden, ob der mK_{Ca} -Kanal proximal oder distal der PKG und Akt Kinase aktiv werden, erfolgte in der zweiten Kohorte eine gleichzeitige Gabe von Ramelteon, einem PKG- oder Akt-Inhibitor und dem mK_{Ca} -Kanal Aktivator NS1619.

Bei dieser gleichzeitigen Applikation von PKG- oder Akt-Inhibition mit Ramelteon löst NS1619 als mK_{Ca} -Kanal-Aktivator einen kardioprotektiven Effekt aus. Das lässt schlussfolgern, dass der mK_{Ca} -Kanal am Ende dieser Signalkaskade steht [92], da eine signifikante Kardioprotektion wiederhergestellt wird.

Mitochondriale Kaliumkanäle, und damit der Kaliumstrom und Kaliumausstrom, spielen eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Homöostase [93]. Wichtige Effekte einer Öffnung der mitochondrialen Kaliumkanäle sind unter anderem eine Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials, die Regulation des Ionenhaushaltes in der mitochondrialen Matrix und der Einfluss auf die mitochondriale Degeneration [93]. Mittlerweile sind fünf verschiedene mitochondriale Kaliumkanäle in Kardiomyozyten identifiziert worden: Neben den mK_{ATP} - und den für diese Arbeit wichtigen mK_{Ca} -Kanälen, die wiederum in welche mit geringer Leitfähigkeit (*small conductance calcium-activated potassium channels*, mSK_{Ca}) und hoher Leitfähigkeit (*mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channel*, $mitoBK_{Ca}$) unterschieden werden, sind

der mitochondriale natriumabhängige Kalium Kanal (*mitochondrial sodium-activated potassium channel*, mitoSlo2) und mitochondriale spannungsabhängige Kalium Kanal (*mitochondrial voltage-regulated potassium channel*, mitoKv7.4) zu nennen [93].

Bereits 1991 zeigte Inoue *et. al.*, dass in der inneren Mitochondrienmembran einer Rattenleber ATP-abhängige Kaliumkanäle nachweisbar waren [94]. Seitdem wurden diese Kanäle in vielen weiteren Studien untersucht. In den folgenden Jahren konnten mK_{ATP} -Kanäle in verschiedenen Geweben wie Skelettmuskel, Gehirn, Niere, Herz und sogar in Nicht-Säugetieren nachgewiesen werden [93]. Spätestens 1996 konnte die Bedeutung der mK_{ATP} -Kanäle in der Kardioprotektion herausgestellt werden. Garlid *et al.* zeigten, dass durch Diazoxid eine Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen erfolgte und so ein kardioprotektiver Effekt an Rattenherzen beobachtet wurde [93, 95]. Das Besondere hier war, dass Diazoxid eine höhere Spezifität zu mK_{ATP} -Kanälen als zu K_{ATP} -Kanälen der Plasmamembran hat und hier eine Dosis von Diazoxid gewählt wurde bei der K_{ATP} -Kanälen der Plasmamembran nicht aktiviert wurden [95]. Demnach war der kardioprotektive Effekt vollständig den mK_{ATP} Kanälen zuzuschreiben [93, 95]. Ein wichtiger physiologischer Aktivator des mK_{ATP} -Kanals ist außerdem zum Beispiel die PKC und ein wichtiger Inhibitor ATP [93]. Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) spielen eine Rolle in der Aktivierung von mK_{ATP} Kanälen [93]. Umgekehrt scheint eine Inhibierung der ROS-Synthese den protektiven Effekt durch Aktivierung der mK_{ATP} -Kanäle mittels Diazoxid umzukehren [93]. Insgesamt sind die genannten Modulatoren der mK_{ATP} Kanäle nur Beispiele eines insgesamt komplexen Vorgangs im Rahmen der kardioprotektiven Signalwege.

Gleiches gilt für mitochondriale Calcium-abhängige Kaliumkanäle (mK_{Ca} -Kanäle). Sie tragen eine wichtige Rolle in vielen kardioprotektiven Signalwegen [93]. Auch in dieser Arbeit zeigt sich der wichtige kardioprotektive Effekt der mK_{Ca} -Kanäle, da durch Aktivierung der mK_{Ca} -Kanäle mittels NS1619, trotz Inhibition der Proteinkinase G und Akt, eine signifikante Infarktgrößenreduktion hervorgerufen wird.

Die mK_{Ca} -Kanäle werden unterschieden in mSK_{Ca} und $mitoBK_{Ca}$.

Im Gegensatz zu mK_{ATP} -Kanälen sind $mitoBK_{Ca}$ bisher in Kardiomyozyten lediglich in der Mitochondrien-Membran und nicht in der Plasmamembran nachge-

wiesen worden [93]. Die genaue Signalkaskade ist zwar noch Gegenstand aktueller Forschung, jedoch sorgen mK_{Ca} -Kanäle bei Öffnung für einen Kaliumeinstrom in die mitochondriale Matrix, wodurch der mitochondriale Calciumeinstrom inhibiert und schlussendlich die mPTP Öffnung verhindert wird und dadurch kardioprotektiv wirkt [69]. Der $mitoBK_{Ca}$ -Kanal ist außerdem Teil des physiologischen cGMP/PKG Signalweges [93]. Das in dieser Arbeit verwendete NS1619 ist ein $mitoBK_{Ca}$ -Kanal Aktivator [93] und sorgt bei Applikation am isolierten Rattenherz für eine signifikante Infarktgrößenreduktion [96].

Der mK_{Ca} -Kanal spielt eine zentrale Rolle in kardioprotektiven Signalwegen. Darüber hinaus ist hervorzuheben, dass bei direkter Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals, im Gegensatz zu vielen anderen kardioprotektiven Mechanismen, eine Kardioprotektion auch im höheren Alter ausgelöst werden kann [97]. Das ist insbesondere in Hinblick auf die klinische Übertragbarkeit eines therapeutischen Ansatzes relevant, da kardioprotektive Ansätze vor allem im Alter eine zunehmende Rolle spielen, bei deutlich höherer Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen im höheren Alter.

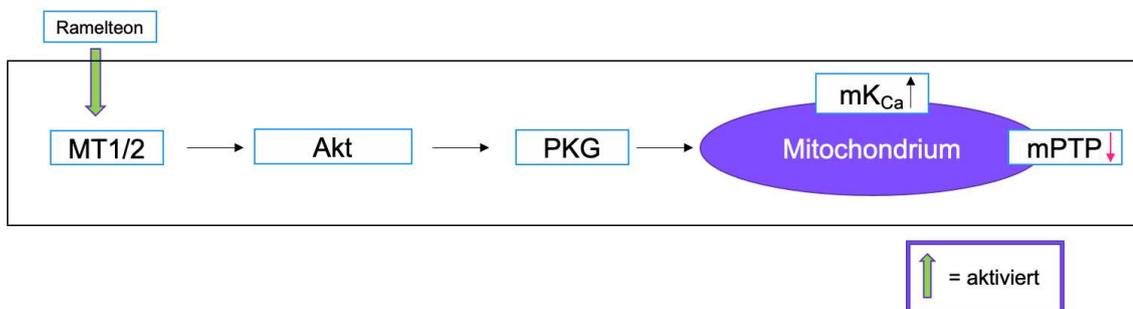


Abb. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Studie

(1) PKG und Akt sind an der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion beteiligt

(2) Akt liegt proximal von PKG und beide Kinasen proximal des mK_{Ca} -Kanals

MT1/2 = Melatoninrezeptor 1/2; PKG = Proteinkinase G; mK_{Ca} -Kanal = mitochondrialer Calciumabhängiger Kaliumkanal; mPTP = mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore

4.1 Klinische Bedeutung der pharmakologischen Konditionierung und Einordnung der Ergebnisse

In der klinischen Praxis erscheint die Postkonditionierung praktikabler als eine Präkonditionierung, da eine myokardiale Ischämie in der Regel nicht vorhersehbar ist. Lediglich besondere klinische Situationen wie die Herzkatheteruntersuchung oder die koronare Bypass-Chirurgie bilden hierbei eine Ausnahme [91].

Die klinische Studienlage und deren Ergebnisse zur ischämischen Fernkonditionierung sind bisher ernüchternd. ERICCA und RIPHeart, zwei größere Studien mit klinischen Endpunkten konnten keine positiven kardioprotektiven Effekte durch eine RIPC nachweisen [91], obwohl RIPC in experimentellen Studien reproduzierbar eine signifikante Kardioprotektion auslösen kann [98]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese fehlende klinische Übertragbarkeit in den beiden großen klinischen Studien könnte die Verwendung von Propofol als Anästhetikum bei den untersuchten Patienten sein. Propofol steht im Verdacht den kardioprotektiven Effekt von RIPC aufzuheben [91]. Aber auch andere klinische Studien konnten in der Vergangenheit die vielversprechenden experimentellen Daten der Kardioprotektion nicht in die klinische Anwendung übertragen.

Dass generell eine ischämische Präkonditionierung beim Menschen möglich ist, konnte erstmals 1990 von Deutsch *et al.* gezeigt werden. Bei Patienten wurde in einer elektiven Herzkatheteruntersuchung eine Koronararterie zweimal mittels Ballondilatation für eine kurze Zeit verschlossen. Es zeigten sich signifikant geringere Surrogatparameter wie niedrigere Laktat-Werte, elektrokardiographisch geringere Anzahl von Ischämien und geringere Pulmonalarteriendrucke als möglichen Ausdruck einer Kardioprotektion [99].

Dennoch ist die Studienlage nicht eindeutig [91]. Die Translation von teilweise sehr guten experimentellen Daten scheint aus diversen Gründen in der klinischen Praxis nicht zu funktionieren. Kleine Kohorten, die Beurteilung von Surrogat-Markern statt klinischer Endpunkte und eine Publikations-*bias* könnten Ursachen einer schlechten klinischen Übertragbarkeit der Studienlage sein [91].

Außerdem ist selbst unter Säugetieren die Anatomie des Herzens unterschiedlich. Nicht nur kardiale Parameter wie die Herzfrequenz, sondern auch potenziell kardioprotektive Signalwege unterscheiden sich zwischen den Tierarten [91]. Eine weitere Ursache für die erschwerte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Labor in die Klinik könnte sein, dass kardioprotektive Studiendesigns häufig reduktionistisch sind [91]. In Bezug auf die Konditionierung an der Langendorff-Anlage ergibt sich der Vorteil, dass das Herz isoliert ohne systemische neuro-humorale oder hämodynamische Einflüsse betrachtet werden kann. Dieser Vorteil kann aber auch ein Nachteil sein, denn *in vivo* kommt man nicht um diese systemischen Einflüsse herum. Sie spiegeln also de facto nicht die Realität wider.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass Versuchstiere in der Regel jung und gesund sind. Das Alter der Ratten, die in dieser Studie verwendet wurden, ist mit 2-3 Monaten jung und entspräche, übertragen auf Menschen, jungen Erwachsenen. Auch dieser Faktor erklärt, warum die Translation guter Studienergebnisse in die Klinik schwerfällt, da Patienten in der Regel höheren Alters sind. Im Gegensatz dazu sind Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) normalerweise im fortgeschrittenen Alter, haben Komorbiditäten und nehmen verschiedene Medikamente ein [91].

Komorbiditäten wie ein Diabetes mellitus, eine arterielle Hypertension oder auch die Einnahme von Medikamenten wie Beta-Blocker oder Glibenclamid könnten die Wirksamkeit der Kardioprotektion durch Konditionierungsmechanismen in der Klinik verringern [100, 101].

Insbesondere ein Diabetes mellitus ist nicht nur ein Risikofaktor selbst, an einer Herzerkrankung oder einem Myokardinfarkt zu erkranken, sondern vermindert ebenso den kardioprotektiven Effekt einer ischämischen Präkonditionierung [102]. Dies ist unter anderem dadurch erklärbar, dass es im Rahmen einer Hyperglykämie bzw. eines Diabetes mellitus zu einer vermehrten Aktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK3 β) kommt, was wiederum verhindert, dass die mPTP inhibiert und es zu einem Zelltod kommt [98]. Ebenso wird die in dieser Studie ausschlaggebende Akt durch eine Hyperglykämie inhibiert und somit der kardioprotektive Effekt aufgehoben [98]. Schließlich bewirkt eine Hyperglykämie erhöhte ATP-Spiegel, wodurch es zu einer Störung der Funktion

der mK_{ATP} -Kanäle, somit die mPTP wiederum nicht inhibiert werden kann und es ebenso zum Zelltod der Kardiomyozyten kommt [98]. Interessanterweise konnten Torregroza *et al.* 2021 zeigen, dass das Blutplasma von hyperglykämischen Ratten in gesunden Rattenherzen wiederum einen kardioprotektiven und somit infarkt-reduzierenden Effekt bewirkt [98]. Dieser Effekt war unabhängig von einer ischämischen Präkonditionierung mittels RIPC, sodass andere humorale Einflüsse wie eine erhöhte Insulinkonzentration im Blutplasma bei Hyperglykämie hier eine Rolle zu spielen scheinen [98]. Maroko *et al.* konnte bereits vor über 50 Jahren an Hunde Herzen zeigen, dass eine Glukose-Insulin-Kalium-Infusion (GIK-Infusion) im Rahmen eines künstlichen Koronararterienverschlusses einen kardioprotektiven Effekt ausübt [103]. Dies erklärt sich unter anderem durch einen positiven metabolischen Effekt einer verstärkten Glykolyse, welche den myokardialen Schaden verlangsamt [104]. Außerdem sorgt eine geringere Konzentration an freien Fettsäuren für weniger Arrhythmien [104]. Auch hier zeigt sich jedoch eine schlechte klinische Übertragbarkeit von experimentellen Studienergebnissen, was vor allem durch eine zu späte Gabe der GIK-Infusion nach Beginn der pectanginösen Beschwerden im Rahmen eines Myokardinfarktes, erklärt werden könnte [105].

Im Alter scheint es ebenfalls einen Wirkverlust kardioprotektiver Mechanismen zu geben [101, 106]. Dies könnte an Veränderungen in der DNA liegen, wie zunehmender Mutationen oder einer fortschreitenden Telomerverkürzung. Andere Gründe wie ein vermehrter oxidativer Stress, Veränderungen der Gen- bzw. Protein-Expression und posttranslationaler Modifikation, sowie ein veränderter Umgang mit zellulären Abfallstoffen durch Autophagie scheinen hierbei einen starken Einfluss auf die protektive Potenz zu haben [106]. Auch diese Erkenntnisse erschweren eine Übertragbarkeit in die Klinik [97], obwohl gerade ältere Patienten aufgrund der größeren Inzidenz von Myokardinfarkten und Herz-Kreislaufkrankungen von einer Kardioprotektion profitieren würden. Ebenso der lang bekannte kardioprotektive Effekt volatiler Anästhetika scheint mit zunehmendem Alter abzunehmen [107]. Die Arbeitsgruppe um Lee *et al.* konnte feststellen, dass im Rahmen einer koronaren Angioplastie bei Menschen der kardioprotektive Effekt durch ischämische Präkonditionierung bei älteren Patienten (>65 Jahre) geringer ausfiel als bei jüngeren Patienten (<55 Jahre).

Dies wurde in Form von EKG Veränderungen und laborchemischen Parametern (z.B. Laktat) festgestellt [108].

Die Arbeitsgruppe um Huhn *et al.* fand 2012 Hinweise darauf, dass die veränderte Regulation des cAMP/Proteinkinase A-Signalweges im Alter unter anderem den Verlust der Effektivität kardioprotektiver Maßnahmen erklären könnte [97]. Proteinkinase A (PKA) gilt als ein Aktivator von mK_{Ca} -Kanälen und ist somit Teil einer wichtigen kardioprotektiven Signalkaskade [97].

Eine direkte Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals zeigte interessanterweise in beiden Gruppen, unabhängig des Alters, eine Infarktreduktion [97]. Dies lässt den Schluss zu, dass der Grund für die altersbedingte Veränderung der Kardioprotektion proximal des mK_{Ca} -Kanals liegen muss [97]. Als mögliche proximal liegende Mediatoren kommen zum Beispiel wie oben genannt cAMP oder PKA in Frage. Sowohl der cAMP-Spiegel als auch die PKA scheinen jedoch nicht der Grund für die altersbedingte Veränderung zu sein [96, 97]. Connexin43, ein Bestandteil von Kanälen, die eine Rolle bei der Signalvermittlung kardioprotektiver Mechanismen spielen [109], liegt proximal des mK_{Ca} -Kanals und könnte mitverantwortlich für den altersbedingten Unterschied in der Kardioprotektion sein [106]. Zukünftige Studien sind hier nötig, um diese altersbedingten Unterschiede zu verstehen.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die beiden Kinasen PKG und Akt an der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion beteiligt sind und dass bezüglich der Reihenfolge des Signalweges zunächst Akt, gefolgt von PKG liegen muss. Der mK_{Ca} -Kanal wird nachgeschaltet zu beiden Kinasen aktiviert. Insbesondere der mK_{Ca} -Kanal als Teil der Signalkaskade einer Ramelteon-induzierten Kardioprotektion stellt eine spannende Möglichkeit dar, da die kardioprotektive Wirkung des Kanals altersunabhängig ist [97]. Somit könnte Ramelteon bei Patienten, die gerade im höheren Alter aufgrund von Schlafstörungen medikamentöse Unterstützung brauchen und Ramelteon einnehmen würden, sinnvoll sein. Gerade im höheren Alter zeigt sich eine erhöhte Prävalenz und Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen, sodass insbesondere ältere Patienten auch myokardial geschützt werden könnten. Ein großer Vorteil des Ramelteons ist die gezielte Wirkung an Melatoninrezeptoren, sodass andere un-

erwünschte Wirkungen, die eventuell im Alter verändert sein könnten, minimiert werden.

4.2 Interpretation der weiteren Ergebnisse

4.2.1 Hämodynamik

Hämodynamisch erfasste Parameter waren Herzfrequenz und LVDP. Außerdem floss der Koronarfluss in die Auswertung ein.

Bezüglich der Herzfrequenz gab es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in beiden Teilen der Studie [92]. Da der Sinusknoten durch extrakardiale Gefäße versorgt werden, welche bei der Präparation entfernt werden, haben die Herzen an der Langendorff-Anlage eine niedrigere Herzfrequenz als *in vivo* [110]. Physiologischerweise haben Ratten eine Herzfrequenz von 350-400 Schlägen pro Minute, während *in vitro* 250 – 320 Schläge pro Minute zu erwarten sind [110]. Außerdem war auffällig, dass in der Phase der Reperfusion der linksventrikuläre Druck und der Koronarfluss in allen Gruppen der beiden Studienteile signifikant niedriger waren als die entsprechenden Werte der *baseline* [92]. Dies erklärt sich unter anderem in einem zu erwartenden Verlust der kontraktilen Funktion während des Versuchs von circa 5-10% pro Stunde [110].

Das ist erwähnenswert, da durch den kardioprotektiven Effekt und der Reduktion der Infarktgröße auch eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter zu erwarten wäre. Dies deckt sich jedoch mit Vorstudien und dem auch klinisch oft beobachteten *myocardial stunning*, also einer vorübergehenden myokardialen Betäubung nach einer Globalischämie, sodass am Ende nicht mehr unterschieden werden kann zwischen Unterschiede durch die verschiedenen Infarktgrößen oder Unterschiede durch verschiedene Grade des *myocardial stunning*.

4.3 Methodenkritik

4.3.1 Perfusion des isolierten Herzens

Die Untersuchung am perfundierten, isolierten Herzen gilt als etabliertes Modell zur Untersuchung von Ischämie- und Reperfusionsschäden, insbesondere da man aus den experimentellen Versuchen angesichts der hohen klinischen Relevanz viele Daten generieren kann [110]. Die isolierte Perfusion des Herzens

hat zum Beispiel den Vorteil der Möglichkeit einer hohen Reproduzierbarkeit [110]. Außerdem ist das Verfahren einfach und schnell zu erlernen und man kann viele Versuche einplanen, da sie sowohl zeitlich als auch kostentechnisch wenig Ressourcen in Anspruch nehmen [110]. Neben den in dieser Studie pharmakologischen bzw. biochemischen Fragestellungen, kann dieses Verfahren beispielsweise auch für physiologische Fragestellungen genutzt werden und besitzt dadurch ein weites Einsatzspektrum [110]. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass man durch die separate Betrachtung des Herzens keinerlei *confounder* durch systemische Einflüsse wie neurohormonale Faktoren beachten muss [110]. Auch sympathische und vagale Einflüsse können vermieden werden [110]. Viel mehr kann man exogene Einflüsse wie Katecholamine, falls gewünscht, kontrolliert in den Versuch miteinfließen lassen [110]. Dosisfindungsstudien eignen sich durch die mögliche kontrollierte Hinzugabe des Pharmakons oder Metaboliten zum Perfusat besonders für dieses Verfahren [110]. Nichtsdestotrotz ist diese isolierte Art der Betrachtung realitätsferner und erschwert dementsprechend die klinische Übertragbarkeit. Für die ischämische Konditionierung liefert dieses Modell vor allem den Vorteil, dass eine Hypoxie einfach und standardisiert durchgeführt werden kann [110]. Außerdem kann auch die Reperfusion wieder einfach initiiert werden, was angesichts des großen Anteils der Reperfusionsschäden (neben den Ischämieschäden selbst) als sehr wertvoll betrachtet werden muss [110]. Darüber hinaus können Experimente in denen die Ischämie *in vivo* letal wäre, fortgeführt werden und so wichtige pathophysiologische Daten gesammelt werden [110]. Neben den in dieser Studie verwendeten Ratten, können auch die Herzen anderer Tierarten wie Schweine, Schafe, Hasen, Hunde oder Affen untersucht werden [110]. Trotz dessen hat auch dieses Verfahren gewisse Limitationen, vor allem bei Anwendung an Ratten: Bei Untersuchungen zum Thema Arrhythmogenese kann es problematisch werden, zu versuchen die Daten auf Menschen zu übertragen, da Rattenherzen ein viel kürzeres Aktionspotential vorweisen [110]. Des Weiteren muss dafür gesorgt werden, dass die Durchführung der Versuche, insbesondere die Zeit von der Explantation des Herzens zur Reperfusion des Herzens, möglichst geringgehalten wird, da dies sonst einen Präkonditionierungsstimulus, der die Infarktgröße ungewollt vermindert, auslösen kann [111].

Die druckkonstante Perfusion, wie sie in dieser Studie verwendet wurde, hat gegenüber der flusskonstanten Perfusion den großen Vorteil, dass autoregulatorische Mechanismen nicht übergangen werden [110]. Wenn es beispielsweise im Rahmen des Versuches zu einer Abnahme der Herzfrequenz kommt, kommt es bei einem flusskonstanten Versuchsaufbau nicht zu einer Änderung des Perfusionsvolumen. Dies wird durch einen höheren Druck erreicht, da sonst nicht das gleiche Perfusionsvolumen bei verringerter Herzfrequenz generiert werden könnte [110].

Auch die Temperatur des Perfusats spielt eine große Rolle. Allgemein sollte eine Temperatur von 37,0 – 37,5°C gewählt werden [110]. In jedem Fall sollte eine Hyperthermie aufgrund von Gewebeschäden vermieden werden [110].

4.3.2 KHP-Lösung

Die am meisten verwendete Pufferlösung basiert auf dem nach Krebs und Henseleit zusammengestellten Puffer mit folgenden Molaritätswerten in mM: NaCl 118.5, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.0 und CaCl₂ 2.5 [110]. Jedoch kommt es bei exakter Anwendung dieses Schemas zu einer Überladung an Calcium-Ionen, da Krebs und Henseleit übersahen, dass ein großer Teil des Calciums im Blut an Proteine gebunden ist und demnach die empfohlene Plasmakonzentration des Calciums bei circa der Hälfte von 2,5 mM liegt [110]. Aus diesem Grund werden heutzutage für die Pufferlösungen Calciumkonzentrationen zwischen 1,2 – 1,8 mM verwendet [18, 110]. Deshalb handelt es sich auch bei der aktuellen Studie lediglich um einen modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer, da dies bei den Versuchen beachtet wurde. Zu beachten ist außerdem, dass beim Ansetzen der Pufferlösung das Calcium zuletzt hinzugegeben wird, wenn alles andere bereits gelöst ist, da es sonst zur Bildung von Calcium-Phosphat Partikeln kommen kann, die Koronararterien verschließen könnten [110].

Die Hauptenergiequelle des Herzens *in vivo* sind Fettsäuren [110]. Nichtsdestotrotz wird häufig eine Glukose Konzentration von circa 10 mM als Energiequelle für das Herz genutzt [110]. Dies erscheint auch unproblematisch, da das Herz sowohl Fettsäuren als auch Glukose als Energiequelle nutzen kann [110]. Diese diabetische Stoffwechsellage durch die hohen Glukose-Konzentrationen erklärt sich zum einen dadurch, dass keine weiteren Energieträger in der Puf-

ferlösung vorhanden sind und zum anderen dadurch, dass in der Regel kein Insulin verwendet wird, was die effiziente Verwertung der Glukose im Herzen erschwert [110]. Nichtsdestotrotz ist die Glukosekonzentration fast doppelt so hoch wie *in vivo* (5-6 mmol/l) und kann Auswirkungen auf physiologische und pathologische Vorgänge im Herzen haben [18]. Physiologischerweise wäre es sinnvoller Fettsäuren im Puffer zu verwenden, jedoch kommt es dann zu Löslichkeitsschwierigkeiten in der wässrigen Pufferlösung und zur nicht gewollten Bläschenbildung bei Begasung einer Fettsäurehaltigen-Pufferlösung [110]. Aus demselben Grund wird auch auf Proteine wie Albumin verzichtet. Das hat jedoch den Nachteil einer Ödembildung im Herzen, da sich der fehlende onkotische Druck in den Gefäßen bemerkbar macht [110].

Die Begasung der Perfusionslösung mit einem Carbogengemisch (95% O₂, 5% CO₂) spielt eine wichtige Rolle. Nicht blutige Perfusionslösungen haben zwar eine geringe Sauerstofftransportkapazität, weisen jedoch hohe Sauerstoffpartialdrücke (pO₂) von >500 mmHg auf [110]. Selbst eine Begasung mit einem 70% Sauerstoffgemisch führt zu keinerlei Kontraktilitätsverlusten des Herzens [110]. Weitere Punkte, die zeigen, dass diese Sauerstoffkonzentration ausreicht, sind der venöse pO₂, der relativ hoch bleibt, was wiederum eine gewisse Sauerstoffreserve anzeigt [110]. Außerdem können Versuche mit einer solchen Begasung der Perfusionslösung über einige Stunden laufen ohne, dass es zu einer Aggravation der Herzfunktion kommt [110]. Trotz all dieser Punkte muss man jedoch anmerken, dass nicht-blutige Perfusionslösung nur dann eine ausreichende Oxygenierung erlauben, wenn der Koronarfluss ein Vielfaches über der physiologischen Norm liegt [110]. Der hohe Koronarfluss erklärt sich dadurch, dass es bei dem erhöhten Sauerstoffpartialdruck im Versuch zur koronaren Vasokonstriktion kommt [112]. Diese koronare Vasokonstriktion sorgt für einen geringeren Sauerstoffgehalt, was wiederum kompensatorisch die koronare Flussrate ansteigen lässt [113] und damit die koronare Flussreserve sinken lässt [114].

Insgesamt könnte man all die Nachteile eines nicht-blutigen Puffers wie Ödembildung, eine geringere Sauerstofftransportkapazität, das Vorhandensein eines solitären Energieträgers, durch Verwendung von Blut zur Perfusion umgehen. Jedoch bräuchte man für die Perfusion eines einzelnen Rattenherzens das Blut mehrerer Ratten. Auch größere Tierarten mit mehr Blutvolumen zu verwenden,

wäre keine Alternative, da hier die Erythrozyten zu groß wären und die Herzkapillaren nicht passieren könnten. Außerdem könnte die Oxygenierung des Blutes zu einem Problem werden, da konventionelle Begasungs-Methoden zu einer Schaumbildung führen und Blutzellen beschädigen könnten [110]. Darüber hinaus ist ein Nachteil, dass eine Hämolyse durch das extrakorporale System der Langendorf Anlage stattfindet. Außerdem könnte das hormonelle System des Spendertieres Einfluss auf das isolierte Herz haben. Zum Beispiel zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Endorphin Freisetzung [115].

Wenn man also alle Punkte betrachtet, ist der modifizierte KHP daher insgesamt ein guter und etablierter Kompromiss.

4.3.3 Pharmaka dieser Arbeit

Bezüglich der verwendeten Pharmaka lässt sich sagen, dass hinsichtlich des Ramelteons eine direkte antioxidative Wirkung in Vorstudien zwar ausgeschlossen werden konnte, jedoch eine direkte Messung der reaktiven Sauerstoffspezies in Vorstudien nicht erfolgte und daher indirekte antioxidative Effekte des Ramelteons nicht ausgeschlossen werden können [67]. Somit ergeben sich im Hinblick auf die klinische Übertragbarkeit des positiven Studienergebnisses neue Aspekte, die berücksichtigt werden müssen.

Auch das verwendete NS1619 scheint seine Wirkung teilweise auch über andere Rezeptoren zu entfalten, was auch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte [87]. Park *et al.* konnte zeigen, dass bei Gabe von NS1619 trotz simultaner Gabe eines mK_{Ca} -Kanal Blockers, ein ähnlicher Effekt bezüglich der Calciumströme beobachtet wurde. Gleiches gilt für die gleichzeitige Gabe von NS1619 und eines PKC, PKA oder PKG Inhibitors [87]. Welchen Einfluss diese Nebeneffekte auf die Kardioprotektion haben, ist allerdings nicht geklärt.

MK2206 ist ein allosterischer Akt Kinase Inhibitor und inhibiert dabei alle drei menschlichen Isoformen der Akt Kinase (Akt 1-3) [73, 74]. Bemerkenswert ist, dass bei dieser Akt Kinase Inhibition keine Inhibierung von anderen Kinasen stattfindet und MK2206 somit hochselektiv auf die Akt Kinase wirkt [74].

Auch KT5823 ist als PKG Inhibitor hochspezifisch [76, 77]. Andere Kinasen wie die Proteinkinase A (PKA) oder C (PKC) werden erst bei signifikant höheren Konzentrationen, als in dieser Arbeit verwendet, beeinflusst [76, 77]. Das wird

deutlich anhand des K_i -Wertes, ein Maß zur Beurteilung der Affinität zwischen einem Enzym und einem Inhibitor. Hier zeigt sich bei KT5823 und PKG ein Wert von $0.23 \mu\text{M}$ und bei PKC und PKA ein Wert von 4 bzw. $> 10 \mu\text{M}$ zur Inhibition der jeweiligen Kinase [77]. Die in dieser Arbeit am Rattenherzen wirkende KT5823-Konzentration betrug $1 \mu\text{M}$ und daher deutlich unterhalb der Werte die zur Inhibition der PKC und PKA nötig wären.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die beiden Kinasen PKG und Akt entscheidende Signalschritte der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion darstellen und dass bezüglich der Reihenfolge des Signalweges zunächst Akt, gefolgt von PKG liegen muss. Der mK_{Ca} -Kanal wird nachgeschaltet zu beiden Kinasen aktiviert [92]. Insbesondere der genaue Signalweg vor der Aktivierung von PKG und Akt und mögliche Signalschritte zwischen den beiden Kinasen und dem mK_{Ca} -Kanal bleiben jedoch noch Gegenstand der aktuellen Forschung und sollten in weiteren Studien untersucht werden.

4.5 Ausblick

„Auch eine Enttäuschung, wenn sie nur gründlich und endgültig ist, bedeutet einen Schritt vorwärts, und die mit Resignation verbundenen Opfer würden reichlich aufgewogen werden durch den Gewinn an Schätzen neuer Erkenntnis“ [116].

Das vom berühmten Physiker und Nobelpreisträger Max Planck stammende Zitat, fasst sehr zutreffend die Forschung der letzten Jahre und Jahrzehnte im Bereich der myokardialen Konditionierung zusammen. Das Potenzial der ischämischen und vor allem der pharmakologischen Konditionierung scheint aufgrund der tierexperimentellen Studien der letzten Jahre und Jahrzehnte enorm und auch epidemiologisch erhoffte man sich viel vom Prinzip der Konditionierung. Nichtsdestotrotz bleibt das Ergebnis bei klinischen Studien überwiegend enttäuschend. Insgesamt beginnt man jedoch langsam zu verstehen, woran dies liegen könnte. Es bleibt also abzuwarten, wie sich das Feld der Kardioprotektion in Zukunft entwickeln wird oder wie Max Planck es formulierte: „welche Schätze neuer Erkenntnisse“ man gewinnen wird und diese Erkenntnisse in die klinische Praxis zu übertragen und somit Nutzen aus dem Potenzial der pharmakologischen Konditionierung zu ziehen. Hierbei gilt es viele Faktoren wie das Alter der Patienten, sowie etwaige Komorbiditäten zu berücksichtigen, um eine optimale, möglicherweise individualisierte, Therapiemöglichkeit zu entwickeln, die einen breiten klinischen Nutzen tragen könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt, S. *Todesursachen in Deutschland 2018*. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html>.
2. Christian Mewis, R.R., Ioakim Spyridopoulos, *Kardiologie compact Alles für Station und Facharztprüfung*. 2004: Georg Thieme Verlag.
3. Bundesamt, S., <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/inhalt.html#250402>.
4. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitsausgaben/inhalt.html>, *Entwicklung der Gesundheitsausgaben in Deutschland 2022*.
5. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/Tabellen/krankheitsklassen-alter.html>, *Krankheitskapitel und Alter in Euro je Einwohner/-in der jeweiligen Altersgruppe*. 2022.
6. Brinkmann, C., Schofer, J., *4. Allgemeine Definition des Myokardinfarkts*. Herz 2018. **43**: p. 681–688.
7. Hartikainen, T.S., et al., *Clinical application of the 4th Universal Definition of Myocardial Infarction*. Eur Heart J, 2020. **41**(23): p. 2209-2216.
8. Severino, P., et al., *Ischemic Heart Disease and Heart Failure: Role of Coronary Ion Channels*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
9. Boudoulas, K.D., et al., *Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management*. Prog Cardiovasc Dis, 2016. **58**(6): p. 676-92.
10. Barquera, S., et al., *Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 328-38.
11. Yeh, R.W., et al., *Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2010. **362**(23): p. 2155-65.
12. French, J.K., et al., *Mechanical complications after percutaneous coronary intervention in ST-elevation myocardial infarction (from APEX-AMI)*. Am J Cardiol, 2010. **105**(1): p. 59-63.
13. Kutty, R.S., N. Jones, and N. Moorjani, *Mechanical complications of acute myocardial infarction*. Cardiol Clin, 2013. **31**(4): p. 519-31, vii-viii.
14. Schmitt, J., et al., *Atrial fibrillation in acute myocardial infarction: a systematic review of the incidence, clinical features and prognostic implications*. Eur Heart J, 2009. **30**(9): p. 1038-45.
15. Monrief, T., et al., *Mechanical, inflammatory, and embolic complications of myocardial infarction: An emergency medicine review*. Am J Emerg Med, 2019. **37**(6): p. 1175-1183.
16. Munyombwe, T., et al., *Quality of life trajectories in survivors of acute myocardial infarction: a national longitudinal study*. Heart, 2020. **106**(1): p. 33-39.
17. Zimmer, H.G., *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. News Physiol Sci, 1998. **13**: p. 203-210.
18. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.

19. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Springer-Verlag, 1895(Vorübergehende Unregelmässigkeiten des Herzschlages und ihre Ausgleichung): p. 61(6), 291–332.
20. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
21. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(5): p. 747-53.
22. Heusch, G., K. Boengler, and R. Schulz, *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(2): p. 151-4.
23. Morciano, G., et al., *Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury*. Adv Exp Med Biol, 2017. **982**: p. 169-189.
24. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
25. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
26. Jolly, S.R., et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. Circ Res, 1984. **54**(3): p. 277-85.
27. Hearse, D.J. and A. Tosaki, *Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart*. Circ Res, 1987. **60**(3): p. 375-83.
28. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
29. Heyndrickx, G.R., et al., *Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs*. J Clin Invest, 1975. **56**(4): p. 978-85.
30. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
31. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
32. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
33. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
34. 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.
35. Schott, R.J., et al., *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium*. Circ Res, 1990. **66**(4): p. 1133-42.
36. Liu, Y. and J.M. Downey, *Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1107-12.
37. Liu, G.S., et al., *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart*. Circulation, 1991. **84**(1): p. 350-6.

38. Rischard, F. and T. McKean, *Ischemia and ischemic preconditioning in the buffer-perfused pigeon heart*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998. **119**(1): p. 59-65.
39. Yang, X.M., et al., *Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: preconditioning and postconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2010. **105**(1): p. 119-28.
40. Cope, D.K., et al., *Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(3): p. 699-709.
41. Liu, Y., et al., *Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(3): p. 883-92.
42. Sanada, S., et al., *Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C*. *Circulation*, 2004. **110**(1): p. 51-7.
43. Oldenburg, O., et al., *Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(1): p. H468-76.
44. 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.
45. Sales, A.H.A., et al., *Impact of ischemic preconditioning on surgical treatment of brain tumors: a single-center, randomized, double-blind, controlled trial*. *BMC Med*, 2017. **15**(1): p. 137.
46. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
47. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
48. Ashman, D.F., et al., *Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1963. **11**: p. 330-4.
49. Lochner, A., et al., *Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in ischemic preconditioning*. *Mol Cell Biochem*, 1998. **186**(1-2): p. 169-75.
50. Agullo, L., et al., *Effect of ischemia on soluble and particulate guanylyl cyclase-mediated cGMP synthesis in cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(6): p. H2170-6.
51. Park, M., P. Sandner, and T. Krieg, *cGMP at the centre of attention: emerging strategies for activating the cardioprotective PKG pathway*. *Basic Res Cardiol*, 2018. **113**(4): p. 24.
52. Cross, T.G., et al., *Serine/threonine protein kinases and apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 34-41.
53. Datta, K., et al., *Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(48): p. 30835-9.
54. Matsui, T., et al., *Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro*. *Circulation*, 1999. **100**(23): p. 2373-9.

55. 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.
56. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 448-60.
57. Mann, D.L., *Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 81-101.
58. Brockhaus, M., et al., *Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(8): p. 3127-31.
59. Lecour, S., et al., *Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(5): p. 509-18.
60. Monden, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(1): p. H743-53.
61. Schulz, R. and G. Heusch, *Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction?* *Circulation*, 2009. **119**(10): p. 1355-7.
62. Negoro, S., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase*. *Circulation*, 2001. **104**(9): p. 979-81.
63. Stroethoff, M., et al., *The Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Induces Cardioprotection that Requires MT2 Receptor Activation and Release of Reactive Oxygen Species*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020. **34**(3): p. 303-310.
64. Crompton, M. and L. Andreeva, *On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury*. *Basic Res Cardiol*, 1993. **88**(5): p. 513-23.
65. Bonora, M., et al., *Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(4): p. 674-83.
66. Gao, Q., et al., *The mitochondrial permeability transition pore and the Ca²⁺-activated K⁺ channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor-alpha*. *Cytokine*, 2005. **32**(5): p. 199-205.
67. 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.
68. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **312**(2): p. 644-50.
69. 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.
70. Riemann, D., et al., *European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia*. *J Sleep Res*, 2017. **26**(6): p. 675-700.
71. Kato, K., et al., *Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist*. *Neuropharmacology*, 2005. **48**(2): p. 301-10.

72. 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.
73. Pant, A., et al., *Inhibition of AKT with the orally active allosteric AKT inhibitor, MK-2206, sensitizes endometrial cancer cells to progesterin*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41593.
74. Uko, N.E., et al., *Akt Pathway Inhibitors*. *Curr Top Med Chem*, 2020. **20**(10): p. 883-900.
75. 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.
76. Smolenski, A., et al., *Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1998. **358**(1): p. 134-9.
77. Bioscience, T., *Certificate of Analysis-KT 5823*. Product Information, 2016. Branch Office: Wiesbaden, Germany: p. 2.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Ahluwalia, A., et al., *Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(5): p. 1386-91.
82. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
83. Brahmajothi, M.V. and D.L. Campbell, *Heterogeneous expression of NO-activated soluble guanylyl cyclase in mammalian heart: implications for NO- and redox-mediated indirect versus direct regulation of cardiac ion channel function*. *Channels (Austin)*, 2007. **1**(5): p. 353-65.
84. Behrends, S., et al., *The expression pattern of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in the rat heart changes during postnatal development*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(10): p. 1325-32.
85. Friebe, A. and D. Koesling, *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. 96-105.
86. Rodriguez-Pascual, F., M.T. Miras-Portugal, and M. Torres, *Effect of cyclic GMP-increasing agents nitric oxide and C-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: inhibitory role mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase*. *Mol Pharmacol*, 1996. **49**(6): p. 1058-70.
87. Park, W.S., et al., *The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca²⁺ channels in rat ventricular myocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(1): p. 31-36.

88. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. *Science*, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
89. O'Rourke, B., S. Cortassa, and M.A. Aon, *Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 303-15.
90. *TTC-Test*. Wikipedia - Die freie Enzyklopädie, 2021.
91. Heusch, G. and T. Rassaf, *Time to Give Up on Cardioprotection? A Critical Appraisal of Clinical Studies on Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning*. *Circ Res*, 2016. **119**(5): p. 676-95.
92. 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).
93. Kulawiak, B., P. Bednarczyk, and A. Szewczyk, *Multidimensional Regulation of Cardiac Mitochondrial Potassium Channels*. *Cells*, 2021. **10**(6).
94. Inoue, I., et al., *ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane*. *Nature*, 1991. **352**(6332): p. 244-7.
95. Garlid, K.D., et al., *The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(15): p. 8796-9.
96. 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.
97. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A*. *Exp Gerontol*, 2012. **47**(1): p. 116-21.
98. Torregroza, C., et al., *Influence of Hyperglycemia and Diabetes on Cardioprotection by Humoral Factors Released after Remote Ischemic Preconditioning (RIPC)*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).
99. Deutsch, E., et al., *Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features*. *Circulation*, 1990. **82**(6): p. 2044-51.
100. Xia, Z., H. Li, and M.G. Irwin, *Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans*. *Br J Anaesth*, 2016. **117** **Suppl 2**: p. ii44-ii62.
101. 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.
102. Kristiansen, S.B., et al., *Impact of hyperglycemia on myocardial ischemia-reperfusion susceptibility and ischemic preconditioning in hearts from rats with type 2 diabetes*. *Cardiovasc Diabetol*, 2019. **18**(1): p. 66.
103. Maroko, P.R., et al., *Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion*. *Circulation*, 1972. **45**(6): p. 1160-75.
104. Udelson, J.E., H.P. Selker, and E. Braunwald, *Glucose-Insulin-Potassium Therapy for Acute Myocardial Infarction: 50 Years On and Time for a Relook*. *Circulation*, 2022. **146**(7): p. 503-505.
105. Grossman, A.N., et al., *Glucose-insulin-potassium revived: current status in acute coronary syndromes and the energy-depleted heart*. *Circulation*, 2013. **127**(9): p. 1040-8.

106. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Loss of cardioprotection with ageing*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 247-61.
107. Sniecinski, R. and H. Liu, *Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium*. Anesthesiology, 2004. **100**(3): p. 589-97.
108. Lee, T.M., et al., *Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATP-sensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 334-40.
109. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Connexin 43 signalling and cardioprotection*. Heart, 2006. **92**(12): p. 1724-7.
110. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 613-27.
111. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation*. Basic Res Cardiol, 1995. **90**(5): p. 418-23.
112. Baron, J.F., et al., *Independent role of arterial O₂ tension in local control of coronary blood flow*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 2): p. H1388-94.
113. Duruble, M., et al., *Transient responses of coronary flow in the blood-perfused isolated rat heart submitted to changes in oxygen content*. J Physiol, 1985. **358**: p. 321-34.
114. Mouren, S., et al., *Crystalloid versus red blood cell-containing medium in the Langendorff-perfused isolated heart preparation*. Eur J Anaesthesiol, 2010. **27**(9): p. 780-7.
115. Pasini, E., et al., *The blood perfused isolated heart: characterization of the model*. Basic Res Cardiol, 1999. **94**(3): p. 215-22.
116. Planck, M., *Physikalische Rundblicke - Gesammelte Reden und Aufsätze*. 1922, Leipzig: Hirzel Verlag.

Danksagung

Vielen Dank an das gesamte Team der Arbeitsgruppe Kardioprotektion, insbesondere an Martin Ströthoff, Annika Raupach und Ragnar Huhn-Wientgen!

Außerdem geht ein großer Dank an Elif Karakurt, Claudia Dohle, Birgitt Berke und Inge Bauer!