

Aus der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Morphin**  
**präkonditioniert das Myokard**  
**durch Aktivierung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle**  
**mBKCa-Kanäle**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Corinna Niersmann**

**2025**

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

gez.:

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

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

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott

Drittgutachter: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

**Für meine Eltern und meinen Mann, die mit mir auf meinem Weg durch das Leben so manche Stolpersteine beiseite rollten und die grauen Tage für mich zum Leuchten gebracht haben.**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht :

Originalarbeit:

Jan Fräßdorf, Ragnar Huhn, Corinna Niersmann, Nina C. Weber, Wolfgang Schlack,  
Benedikt Preckel, Markus W. Hollmann

Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial  $K_{Ca}$  channels  
Can J Anaesth. 2010; 57(8): 767–773.

## 1 Zusammenfassung

### **Morphin präkonditioniert das Myokard durch Aktivierung von mBK<sub>Ca</sub>-Kanälen**

Maßnahmen, die den Ischämie-Reperfusionsschaden positiv beeinflussen können, spielen eine wichtige Rolle bei der Reduzierung tödlicher Herz-Kreislaufkrankungen. Mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanäle (mBK<sub>Ca</sub>) sind bekanntermaßen an der Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Morphin-induzierte Präkonditionierung über mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle vermittelt wird [1]. Die Herzen von 48 männlichen Wistar-Ratten wurden entnommen, an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen und retrograd über die Aorta mit einem konstantem Druck von 80 mmHg mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Die Tiere wurden in 6 Gruppen (je n=8) randomisiert. In der Kontrolle (Kon) erfolgte vor einer 30 minütigen Ischämie und anschließender Reperfusion keine Vorbehandlung. In der Morphin Gruppe (MPC) wurden die Herzen mit Morphin vorbehandelt, während in der dritten Gruppe als Positivkontrolle eine Ischämische Präkonditionierung (IPC) durchgeführt wurde. Alle drei Protokolle wurden zusätzlich in Anwesenheit eines Blockers der mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle, Paxillin, durchgeführt, um die Beteiligung der mBK<sub>Ca</sub>-Kanäle an den Ergebnissen zu untersuchen (PAX, MPC+PAX, IPC+PAX). Anschließend wurden die Herzen mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung zur Infarktgrößenbestimmung gefärbt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Infarktgrößen in den Ischämisch- und Morphin-induzierten Präkonditionierungsgruppen (IPC 20±5%, MPC 23±8%; jede p < 0,05 vs Kontrollgruppe) signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Mittelwert±SD) waren. Die Infarktgrößenreduktion wurde durch Paxillin aufgehoben (MPC-Pax: 37±7%, p < 0,05 gegenüber MPC und IPC-Pax: 36±6%, p < 0,05 gegenüber IPC), während Paxillin allein keinen Einfluss auf die Infarktgröße hatte (Pax: 46±7 %, nicht signifikant verschieden versus Kontrolle). Die mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle sind ein wichtiger Teilschritt in dem Vermittlungsweg der Morphin-induzierten Präkonditionierung [1].

## **Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channels**

Interventions to ameliorate ischemia-reperfusion injury are crucial to prevent fatal outcome of cardiovascular disease. The role of mitochondrial calcium-dependent potassium channels (mBK<sub>Ca</sub>) in the signaling cascade of ischemic preconditioning is well established. The current study was conducted to investigate whether mitochondrial calcium-dependent potassium channels (mBK<sub>Ca</sub>) mediate morphine-induced preconditioning likewise [1].

Hearts were harvested from 48 male Wistar rats and connected to a Langendorff apparatus. Retrograde perfusion through the aorta was established with constant pressure of 80 mmHg using Krebs-Henseleit buffer. Hearts were randomized into 6 groups (n=8 each). All hearts were subjected to 30 minutes of global ischemia followed by 60 minutes of reperfusion (I/R). In a control group no pretreatment was applied. In contrast hearts of the morphine group (MPC) received morphine pretreatment while a third group serving as positive control underwent ischemic preconditioning. Subsequently, the hearts were stained with Triphenyltetrazoliumchloride solution to determine the infarct size [1]. All three protocols were performed again in the presence of Paxillin, a calcium-dependent potassium channel blocker, to investigate the involvement of these channels in the respective observations (PAX, MPC+PAX, IPC+PAX).

Infarct sizes in the ischemic and morphine-induced preconditioning groups (I-PC 20±5%, MPC 23±8%; each p < 0,05 vs control group) were significantly smaller than in the control group (mean±SD). The infarct size reduction was abolished by Paxillin (MPC-Pax: 37±7%, p < 0,05 compared to MPC and I-PC-Pax: 36±6%, p < 0,05 vs. I-PC), while Paxillin alone did not affect infarct size (PAX: 46±7%, p>0,05 vs Control). Thus, mitochondrial calcium-dependent potassium channels appear to be an important component in the pathway of morphine-induced preconditioning [1].

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAR</b>	<i>area at risk</i> , Infarkt-gefährdetes Gebiet
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Aqua dest</b>	destilliertes Wasser
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>bpm</b>	beats per minutes
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Con</b>	Kontrollgruppe
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>eNOS</b>	(endotheliale) Stickstoffmonoxidsynthetase
<b>FWOP</b>	<i>first window of protection</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunde
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>IPC</b>	ischämische Präkonditionierung
<b>i.v</b>	intravenös
<b>K</b>	Kalium
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min.</b>	Minute
<b>mK<sub>ATP</sub></b>	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
<b>mBK<sub>Ca</sub></b>	mitochondrialer calciumabhängiger Kaliumkanal
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MPC</b>	Morphin-induzierte Präkonditionierung
<b>mPTP</b>	mitochondriale Permeabilitäts-Transpositions-Pore
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>M</b>	Molar
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>Na</b>	Natrium
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>ns</b>	nicht signifikant
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>SWOP</b>	<i>second window of protection</i>

**TTC**  
**vs.**

**2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid**  
versus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 HERZINFARKT	1
1.2 PATHOPHYSIOLOGIE HERZINFARKT	1
1.3 KARDIOPROTEKTION DURCH PRÄKONDITIONIERUNG	2
1.3.1 ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	2
1.3.2 DIE PHARMAKOLOGISCHE PRÄKONDITIONIERUNG	3
1.3.2.1 DAS OPIOID MORPHIN	3
1.3.2.2 MORPHIN-INDUZIERTER PRÄKONDITIONIERUNG	4
1.3.2.3 KALIUMKANÄLE	5
1.4 ZIEL DER ARBEIT	6
<b>2 METHODEN</b>	<b>7</b>
2.1 MATERIAL	8
2.2 CHIRURGISCHE PRÄPARATION	8
2.3 STUDIENPROTOKOLL	11
2.4 INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	13
2.5 DATENVERARBEITUNG	14
2.6 HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN	14
2.7 STATISTISCHE ANALYSEN	14
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>15</b>
3.1 RISIKOGEBIET UND INFARKTGRÖßE	15
3.2 HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN	16
3.2.1 HERZFREQUENZ	16

3.2.2	LINKSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DRUCK (LVEDP)/ LINKSVENTRIKULÄRE DRUCKANSTIEGSGESCHWINDIGKEIT= KONTRAKTILITÄT (dP/dT max.)	17
3.2.3	KORONARFLUSS (KF)	18
3.2.4	KÖRPER- UND HERZGEWICHT	18
3.2.5	ISCHÄMISCHE KONTRAKTUR	19
4	DISKUSSION	20
4.1	DISKUSSION MATERIAL METHODEN	20
4.2	DISKUSSION ERGEBNISSE	23
4.3	FAZIT UND LIMITATIONEN	27
5	LITERATURVERZEICHNIS	30
	DANKSAGUNG	
	<u>TABELLEN UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	
	ABBILDUNGEN	
	ABBILDUNG 1: INSTRUMENTIERUNG DER RATTENHERZEN	11
	ABBILDUNG 2: VERSUCHSPROTOKOLL	12
	ABBILDUNG 3: INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	16
	TABELLEN	
	TABELLE 1 : HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN	17
	TABELLE 2 : GEWICHTE UND ISCHÄMISCHE KONTRAKTUR	19

# 1 Einleitung

## 1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Im Jahr 2021 wurden in Deutschland alarmierend hohe Todeszahlen im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen verzeichnet. Insgesamt verstarben 340.619 Menschen an diesen Erkrankungen, wobei 159.846 Männer und 180.773 Frauen betroffen waren. Herz-Kreislauf-Erkrankungen blieben somit die häufigste Todesursache und waren für 33,3% aller Sterbefälle verantwortlich. Innerhalb der Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt die koronare Herzerkrankung (KHK) den Hauptanteil dar. Dabei handelt es sich um eine Störung der Herzkranzgefäße, die das Herz mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und somit seine Funktion aufrechterhalten. Von den 121.172 Menschen, die an einer KHK verstarben, waren 68.900 Männer (56,9%) und 52.272 Frauen (43,1%) [2]. Angesichts dieser besorgniserregenden Statistiken wird deutlich, wie dringend Maßnahmen zum Schutz des Herzens erforderlich sind. Der Schutz des Herzens und die Reduzierung der kardial bedingten Todesfälle sollten daher zu den prioritären Zielen der medizinischen Forschung und Gesundheitsversorgung gehören.

## 1.2 Pathophysiologie des Herzinfarktes

Der Herzmuskel wird über die Koronargefäße mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Jedes Herzkranzgefäß ist für die Versorgung spezifischer Abschnitte des Herzmuskels zuständig. Lagern sich an den Innenwänden der Herzkranzgefäße Fett und Kalk (sogenannte Plaques) oder Blutgerinnsel (Thromben) ab, kommt es zu einer Einengung des Gefäßlumens. Im schlimmsten Fall kann es zu einem vollständigen Verschluss des Gefäßes kommen. Die daraus resultierende unzureichende oder fehlende Versorgung der Herzmuskelzellen wird als Ischämie bezeichnet. Dadurch entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch in den betroffenen Bereichen des Herzgewebes [3-5]. Wenn sich diese Myokardischämie chronisch entwickelt, spricht man von einer ischämischen Herzkrankheit. Tritt eine akute Schädigung auf, bei der die Perfusion einer Koronararterie aufgrund einer weiteren Einengung des Lumens oder eines erhöhten, poststenotischen Bedarfs den Bedarf nicht mehr decken kann, wird dies als Herz- oder Myokardinfarkt bezeichnet. Es wurde auch festgestellt, dass der Prozess der

myokardialen Reperfusion paradoxerweise zum Absterben von Herzmuskelzellen führen kann. Dieses Phänomen wird als ‚myokardialer Reperfusionsschaden‘ bezeichnet und kann zu irreversiblen Folgen wie mikrovaskulärer Obstruktion und einer Verstärkung des Myokardschadens führen. Die Myokardischämie führt in der Herzmuskelzelle aufgrund des Sauerstoffmangels zu einem anaeroben Stoffwechsel mit einem Anstieg von Laktat und einem Abfall des pH-Werts. In der Folge kommt es zur Funktionsumkehr des Natrium-Calcium-Austauschers, sodass Calcium in die Zelle und Natrium aus der Zelle transportiert wird. Die erhöhte Calciumkonzentration aktiviert die kontraktilen Filamente in den Myozyten und steigert die Wandspannung. Dies stört insbesondere die diastolische Entspannung des Myokards. Da die mikrovaskuläre Perfusion des Myokards vor allem in der Diastole stattfindet, verstärkt die erhöhte diastolische Wandspannung durch die Kompression der kleinen intramyokardialen Gefäße die Ischämie zusätzlich [4, 6-14].

### **1.3 Kardioprotektion durch Präkonditionierung**

#### **1.3.1 Ischämische Präkonditionierung**

Die Ischämische Präkonditionierung (IPC) wurde erstmals von Murry et al. beschrieben [15]. Diese besagt, dass das Herz durch kurze subletale Myokardischämien vor längeren Myokardischämien (Index-Ischämie) geschützt wird. Dadurch wird eine Myokardprotektion erreicht, die sich unter anderem in einer Verringerung der Infarktgröße und einer Reduktion von Herzrhythmusstörungen äußert. Die Wirksamkeit der Präkonditionierung konnte in nachfolgenden Studien bestätigt werden. Die ischämische Präkonditionierung konnte bei verschiedenen Lebewesen sowie an Organen wie Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Gastrointestinaltrakt, Skelettmuskulatur sowie Niere nachgewiesen werden [16, 17-22].

Nach einer vorübergehenden Ischämie ergeben sich zwei Zeitfenster, in denen das so präkonditionierte Gewebe vor weiteren ischämiebedingten Schäden geschützt ist. Ein frühes Präkonditionierungsfenster (*first window of preconditioning, FWOP*) erstreckt sich über die ersten drei Stunden nach der Ischämischen Präkonditionierung. Demgegenüber entwickelt sich ein weiteres, spätes Präkonditionierungsfenster (*second window of preconditioning, SWOP*) etwa 12-24 Stunden nach ischämischer Präkonditionierung. Diese Phase hält etwa 48 bis 72

Stunden an. Dazwischen liegt eine Periode, in der die ischämische Präkonditionierung keinen Schutz bewirkt [23-25].

Ein zentraler Signalweg der ischämischen Präkonditionierung ist die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen im Herzmuskel. Untersuchungen, wie die von Bentzen et al. (2014) und Soltysinska et al. (2014), deuten darauf hin, dass die  $mBK_{Ca}$ -Kanäle eine wesentliche Rolle für den schützenden Effekt der IPC im Herzen spielen können [26, 27].

### **1.3.2 Pharmakologische Präkonditionierung**

#### **1.3.2.1 Das Opioid Morphin**

Opioide sind Arzneimittel, die Schmerzen lindern und gehören damit zu den Analgetika. Im Stufenschema der WHO für Schmerzmittel gehören Opioide zur WHO-Stufe 3. Das heißt, Opioide werden als Analgetika bei starken akuten und chronischen Schmerzen eingesetzt. Sie können mit Analgetika niedrigerer Stufen und Co-Analgetika kombiniert werden.

Opioide können in endogene und exogene Opioide eingeteilt werden. Die exogenen Opioide lassen sich weiter in natürliche und synthetische sowie halbsynthetische Opioide differenzieren. Opioide entfalten ihre Wirkung über verschiedene Rezeptortypen. Die wichtigsten sind  $\mu$ -(mü)-,  $\kappa$ -(kappa)- und  $\delta$ -(delta)-Rezeptoren. Sie haben schmerzlindernde, psychotrope und beruhigende Effekte. Ein Missbrauch als Rauschmittel kann zu einer Abhängigkeit und Sucht führen. Es können unerwünschte Wirkungen wie Obstipation, Übelkeit, Erbrechen, Mundtrockenheit, Appetitmangel, Schwitzen, Schwindel, Kopfschmerzen, Dämpfung und Müdigkeit auftreten. Bei einer Überdosierung kann es zur Atemdepression und niedrigem Blutdruck bis hin zum Kreislaufversagen kommen. Aus der getrockneten Milch des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) wurde ein Gemisch namens Opium gewonnen. Aus diesem Vielstoffgemisch konnten im letzten Jahrhundert einzelne Wirkstoffe isoliert werden. Opiate sind natürliche Einzelstoffe aus dem Vielstoffgemisch Opium. Der Paderborner Apothekergehilfe Friedrich Wilhelm Adam Sertürner konnte als Erster das Opiat Morphin isolieren. Erst Jahre später konnte die genaue Summenformel des Morphins beschrieben werden ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ,  $M_r = 285,3 \text{ g/mol}$ ). Es ist also ein

pflanzliches Alkaloid. Bei oraler Einnahme unterliegt Morphin einem hohen „First-pass“-Effekt. Hierdurch erklärt sich die Notwendigkeit einer dreifach höheren Dosis bei der enteralen Applikation. Morphin wird in der Leber metabolisiert, wobei unter anderem der aktive Metabolit Morphin-6-Glucuronid entsteht. Morphin vermittelt als reiner Agonist seine Wirkung vor allem über den  $\mu$ -(mü)- aber auch über den  $\kappa$ -(kappa)-Rezeptor. Der  $\mu$ -(mü)-Rezeptor bewirkt eine spinale und supraspinale Analgesie, Atemdepression, Euphorie, Sedation, psychische Abhängigkeit, Miosis sowie Obstipation. Opioidrezeptoren befinden sich überwiegend im zentralen Nervensystem sowie im Gastrointestinaltrakt und Blasenbereich [28]

### **1.3.2.2 Morphin-induzierte Präkonditionierung**

Kardioprotektion durch Präkonditionierung kann auch durch verschiedene Pharmaka, dazu zählen z. B. volatile Anästhetika, Edelgase und das Opioid Morphin, ausgelöst werden [29-32]. Sowohl die Morphin-induzierte als auch die ischämische Präkonditionierung (MPC/IPC) nutzen den selben zellulären Signaltransduktionsweg. Die Öffnung mitochondrialer ATP-Kalium-Kanäle ( $mK_{ATP}$ ) trägt zur Regulation mitochondrialer Funktionen bei und stellt einen zentralen Schritt im Signaltransduktionsweg der Morphin-induzierten und ischämischen Präkonditionierung dar, möglicherweise durch eine Hemmung der Öffnung mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren ( $mPTP$ ) [33-37]. Neben der Öffnung von  $mK_{ATP}$ -Kanälen ist auch die Aktivierung der mitochondrialen calciumabhängigen Kalium-Kanäle ( $mBK_{Ca}$ ) an der Präkonditionierung beteiligt [38-41]. Cao et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle eine äußerst wichtige Rolle in der Präkonditionierung und der Kardioprotektion spielt. Die Aktivierung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle ist unabhängig von den  $mK_{ATP}$ -Kanälen [42].

In einer weiteren Studie konnten Cao et al. zeigen, dass die durch  $\kappa$ -Opioid Rezeptoren getriggerte Präkonditionierung durch  $mBK_{Ca}$ -Kanäle vermittelt wird [43]. Das Opioid Morphin hat überwiegend eine Affinität zu den  $\mu$ -Opioidrezeptoren und nur eine geringe Affinität zu den  $\kappa$ -Opioidrezeptoren [44, 45]. Außerdem gibt es keine  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten, welche einen klinischen Einsatz finden. Es bleibt unklar, ob  $mBK_{Ca}$ -Kanäle an der MPC beteiligt sind.

### 1.3.2.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind wichtige transmembrane Proteine, die den Fluss von Kaliumionen über biologische Membranen regulieren und eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und zahlreicher zellulärer Funktionen spielen. In verschiedenen Geweben und Zellen des Körpers sind verschiedene Formen von Kaliumkanälen vorhanden, die jeweils spezifische Funktionen und Regulationsmechanismen aufweisen. Mitochondriale Kaliumkanäle sind in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert [38, 46]. In verschiedenen Studien konnte die Schlüsselfunktion der mitochondrialen Kaliumkanäle für die Kardioprotektion nachgewiesen werden [38, 41, 47]. Es werden mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle sowie calciumabhängige Kaliumkanäle unter anderem mit hoher Leitgeschwindigkeit ( $mBK_{Ca}$ ) und mit kleiner Leitgeschwindigkeit ( $mSK_{Ca}$ ) unterschieden.

Während einer Ischämie öffnen sich die mitochondrialen Kaliumkanäle, was zu einer wichtigen Schutzfunktion, der Regulation der Mitochondrienfunktion und des Energiestoffwechsels, beiträgt und letztlich die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) verhindert. Durch diese Mechanismen wird die Zelle während der Ischämie vor Schäden geschützt [41, 48].

Der  $mBK_{Ca}$ -Kanal ist ein Ionenkanal der inneren Mitochondrienmembran, dessen Öffnung durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sowie durch Änderungen des Membranpotenzials reguliert wird. Seine Aktivierung führt zu einem Kaliumstrom in die mitochondriale Matrix, wodurch das mitochondriale Membranpotenzial moderat depolarisiert wird. Diese Depolarisation verringert die Triebkraft für die Calciumaufnahme über den mitochondrialen Calciumuniporter (MCU) und schützt die Mitochondrien vor übermäßiger Calciumakkumulation, die zu mitochondrialer Dysfunktion und oxidativem Stress führen kann [49, 50]. Darüber hinaus spielt der  $mBK_{Ca}$ -Kanal eine wichtige Rolle in der kardioprotektiven Präkonditionierung. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Interventionen wie Levosimendan oder Sildenafil die Aktivität dieser Kanäle gezielt modulieren und dadurch kardioprotektive Effekte vermitteln [51, 52]. Die Regulation des mitochondrialen Calciumhaushalts durch den  $mBK_{Ca}$ -Kanal stellt somit einen bedeutenden Mechanismus der zellulären Homöostase dar [49, 50].

Der  $mBK_{Ca}$ -Kanal wird durch das **Kcnma1-Gen** kodiert [26, 46, 47]. Die Relevanz dieses Kanaltyps für die Kardioprotektion wurde durch Untersuchungen an **knockout-Mäusen**, in welchen dieses Gen ausgeschaltet ist, bestätigt: Bentzen et al. konnten durch *knockout*-Mäuse, in welchen dieses Gen ausgeschaltet ist, die Beteiligung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle an der Kardioprotektion bestätigen [26]. Bunte et al. 2018 konnten zeigen, dass die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen eine zentrale Rolle bei der Levosimendan-induzierten Präkonditionierung spielt [52]. Ebenso konnten Behmenburg et al. (2015) die Beteiligung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle an der Infarktgrößenverringering im Kontext der Sildenafil-induzierten Präkonditionierung nachweisen [51]. Torregroza et al. (2021) betonen, dass die Schutzfunktionen der Kaliumkanäle nicht nur im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung, sondern auch durch pharmakologische und perioperative Interventionen gezielt moduliert werden können. Dies eröffnet vielversprechende Ansätze, um kardioprotektive Strategien beispielsweise, bei chirurgischen Eingriffen zu optimieren [53]. Folglich scheinen die  $mBK_{Ca}$ -Kanäle eine überaus bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der pharmakologischen Präkonditionierung zu spielen.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Es ist bekannt, dass die ischämische Präkonditionierung sowie die pharmakologische Präkonditionierung, beispielsweise durch Morphin, effektive Strategien darstellen, um myokardiale Schäden infolge von Ischämie-Reperfusion zu reduzieren. Der Einsatz des preiswerten Morphins ist klinisch unter anderem auch in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms etabliert. Spannend ist daher die Frage, ob die Morphin-induzierte Präkonditionierung von klinischer Relevanz ist. Hierfür ist es wichtig, mehr über die beteiligten Signalwege zu wissen [1, 53]. Schon Cao et al. zeigten, dass die  $mBK_{Ca}$ -Kanäle ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung sind [42]. Die experimentell gut etablierte Methode der ischämischen Präkonditionierung wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt, mit deren Ausmaß die Effekte der Morphin-induzierten Präkonditionierung verglichen wurden. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die pharmakologische Modulation der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle gelegt, um ihre Aktivierung oder Inhibition gezielt zu untersuchen.

Daher galt es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Wird die Morphin-induzierte Präkonditionierung über  $mBK_{Ca}$ -Kanäle vermittelt?
2. Hat die alleinige Blockade der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle mit Paxillin einen Effekt auf die Infarktgröße?

Der potenzielle Signalweg lässt sich wie folgt beschreiben: Die Verabreichung von Morphin könnte die Öffnung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle bewirken und dadurch letztlich zur Kardioprotektion beitragen.

Die Experimente wurden in einem *ex vivo* Versuchsaufbau mithilfe der Langendorff-Apparatur am isolierten Rattenherz durchgeführt. Die Rolle der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle bei der Morphin-induzierten Präkonditionierung wurde analysiert. Paxillin wurde als Blocker der  $mBK_{Ca}$  Kanäle eingesetzt. Weiterhin wurde der alleinige Effekt von Paxillin untersucht. Es wurde eine zusätzliche Versuchsgruppe eingeführt, die einer ischämischen Präkonditionierung (IPC) unterzogen wurde und als positive Kontrolle diente. Nach der Perfusion der Herzen an der Langendorff-Apparatur erfolgte eine Färbung mit TTC-Lösung. Die Infarktgröße wurde planimetrisch bestimmt als prozentualer Anteil des Risikogebiets [1].

## **2 Methoden**

Die Beteiligung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle an der Morphin-induzierten Präkonditionierung wurde an isoliert perfundierten Rattenherzen untersucht.

In einer randomisierten Versuchsreihe mit 48 isolierten Rattenherzen wurden neben einer Kontrollgruppe, die ischämische und Morphin-induzierte Präkonditionierung sowie die Auswirkung des  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Blockers Paxillin in einer Langendorff-Apparatur untersucht.

Anschließend wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung planimetrisch bestimmt. Die Experimente der vorliegenden Studie wurden nach Erwerb der entsprechenden Qualifikation an der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) Düsseldorf durchgeführt. Das interne Aktenzeichen der ZETT für die Genehmigung der Organentnahmen lautet O43/05 [1].

## 2.1 Material

**Im Experiment wurden folgende Chemikalien, Medikamente und Geräte verwendet (der Hersteller steht jeweils in Klammern)**

- Aqua destillata (B.Braun Melsungen AG, Melsungen)
- CanonScan (Canon, Krefeld)
- Calciumchlorid  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Glukose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Heparin-Natrium 25000 IE (Ratiopharm )
- Kaliumchlorid KCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Kaliumphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Langendorff-Apparatur (Eigenbau der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf)
- Latex-Ballon (Größe Nr. 4, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland)
- Morphinsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Natriumchlorid NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Natriumbicarbonat  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Pyruvat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Paxillin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Peristaltische Pumpe (Hersteller: Gilson Inc., Modell Abimed minipuls 3, Modell 312)
- Pacer (Hersteller: ifs, Typ TG2/8, Düsseldorf)
- Schläuche für peristaltische Pumpe (Saint-Gobain, Tygon R 3603)
- Schläuche für Langendorff-Apparatur (Gilson Inc. F 11794)
- Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland)
- Wasserbad Perfusat (Hersteller: Julabo, Modell EC)
- Wasserbad Wärmekreislauf (Hersteller: Julabo, Modell MW-6)

## 2.2 Chirurgische Präparation

Für die vorliegende Arbeit wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 285 g bis 335 g aus der Tierversuchsanlage Düsseldorf (ZETT Zentralen Einrichtung

für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) verwendet. Wistar-Ratten werden häufig für isolierte, perfundierte Herzen verwendet, da sie eine gängige Tiermodellart sind, die in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet ist. Diese Rattenart ist gut charakterisiert, hat eine moderate Größe und ist relativ leicht zu handhaben. Darüber hinaus weisen Wistar-Ratten eine genetische Homogenität auf, was bedeutet, dass sie ähnliche genetische Merkmale und Reaktionen auf Experimente aufweisen. Dies erleichtert die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Experimenten und Forschungsgruppen. In Bezug auf die isolierte Perfusion von Herzen ermöglichen Wistar-Ratten eine effiziente Durchführung der Experimente und damit die Untersuchung spezifischer Fragestellungen im Bereich der Grundlagenforschung.

Die Wistar-Ratten waren zum Zeitpunkt der Experimente ca. 3 Monate alt. Die Tiere lebten in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus (ab 06.00 Uhr Licht) und erhielten Futter und Wasser ad libitum.

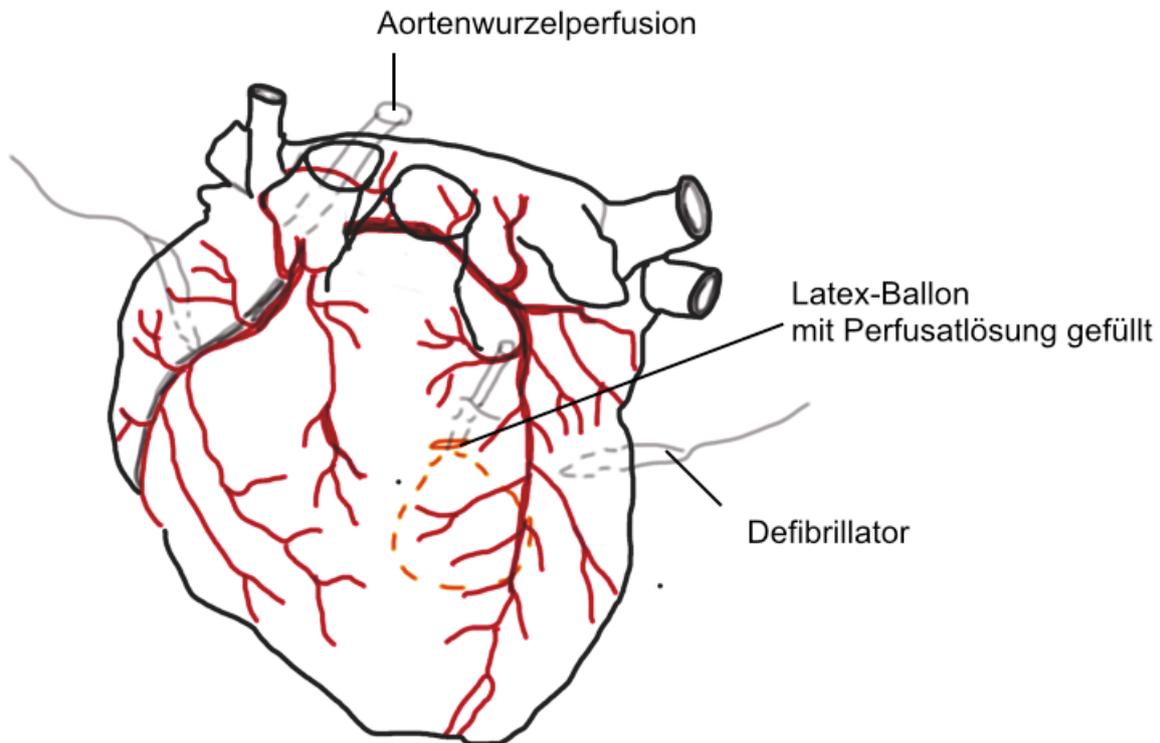
Nach intraperitonealer Anästhesie mit Thiopental (90mg/kgKG) und Überprüfung der Schmerzfreiheit wurde der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet und das Herz auf Höhe des Aortenbogens vor den Abgängen der supraaortalen Gefäße abgetrennt und entnommen. Das isolierte Herz wurde in die druckkonstante Langendorff-Apparatur (80mmHg) eingebunden [54]. Die isolierten Herzen wurden mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Pufferlösung bei 37 °C perfundiert. Diese wurde für jeden Versuchstag neu angesetzt. Die Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Pufferlösung bestand aus NaCl 116 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, MgSO<sub>4</sub> 1,1 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 24,9 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 2,52 mmol/l, Glukose 8,3 mmol/l und Pyruvat 2,2 mmol/l gelöst in H<sub>2</sub>O.

Die Krebs-Henseleit-Pufferlösung wurde mit einem konstanten Druck von 80 mmHg retrograd über die Aorta verabreicht, sodass die aus der Aortenwurzel entspringenden Koronararterien anterograd perfundiert wurden.

Zur Messung der hämodynamischen Parameter wurde ein Latex-Ballon (Größe Nr. 4, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) an einer Stahlkanüle fixiert. Der Latex-Ballon wurde von außen durch einen Stichkanal in den linken Herzvorhof eingebracht und bis in die linke Herzkammer vorgeschoben (siehe Abbildung 1). Anschließend wurde der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDD) auf 1-4 mmHg eingestellt. Dies wurde erreicht, indem der Latex-Ballon luftblasen-frei mit entsprechender Menge an Perfusatlösung befüllt wurde, sodass ein entsprechender

Druck erzeugt wurde. Ein an die Stahlkanüle angeschlossener Druckaufnehmer (Gould P23, Cleveland, OH, USA) leitete nun kontinuierlich den linksventrikulären entwickelten Druck (LVED), die Herzfrequenz, die Myokardfunktion (isovolumetrischer linksventrikulärer enddiastolischer Druck) sowie die Geschwindigkeit der linksventrikulären Druckentwicklung ( $dp/dt_{max}$ ) ab. Ebenso kontinuierlich gemessen wurde der Koronarfluss mit einem Ultraschall-Doppler-Flussmesskopf (In-Line-Flowprobe 2N, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). Die Datenerfassung erfolgte über einen Analog-Digital-Umsetzer (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) mit einer Aufnahmezeit von 500 Hz. Die Signalspeicherung erfolgte mithilfe des PC-Programms Chart für Windows v5.0 (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien). Des Weiteren wurden von außen in das Myokard Defibrillations-Elektroden platziert und an einen Defibrillator angeschlossen. Ein auftretendes Kammerflimmern wurde durch sofortige interne elektrische Defibrillation mit 1 – 2 Joule behandelt.

Nach der Instrumentierung wurden die Herzen in ein auf 37 °C erwärmtes Behältnis gebracht. Für alle Herzen folgte eine *Baseline*-Phase von 20 Minuten. Zur Induktion der globalen Ischämie wurde die Perfusion der Herzen gestoppt. Um eine Sauerstoffdiffusion von außen in das ischämische Myokard zu verhindern, wurde die Kammer mit Stickstoff begast [1].



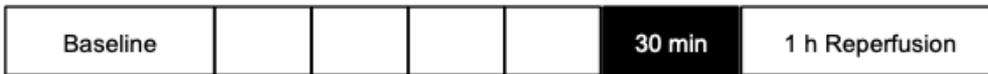
**Abbildung 1:** Instrumentierung Rattenherz

*Durch die retrograde Aortenwurzelperfusion erfolgte eine antegrade Perfusion der Koronarien. Zur Messung der hämodynamischen Variablen wurde ein Latex-Ballon in den linken Ventrikel eingeführt. Zur Behandlung von Arrhythmien wurden Defibrillator-Elektroden von außen am Myokard fixiert und an einen Defibrillator angeschlossen.*

**2.3 Studienprotokoll**

Vor dem Start des Experiments wurden die 48 Tiere per Computer in eine von sechs Gruppen randomisiert. Eine notwendige Gruppengröße von jeweils acht Tieren wurde mithilfe GraphPad StatMate™ Version 1.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ermittelt, um eine Infarktgrößenreduktion von 25 % (80 % Power,  $\alpha < 0,05$ ) statistisch signifikant nachweisen zu können (siehe Abbildung 2) [1].

Kontrolle



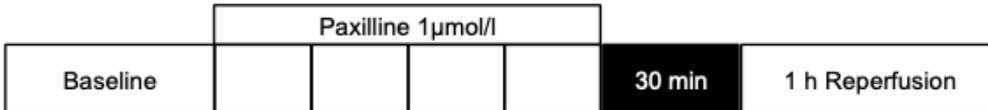
Ischämische Präkonditionierung



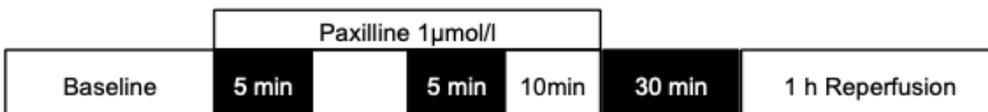
Morphin-Präkonditionierung



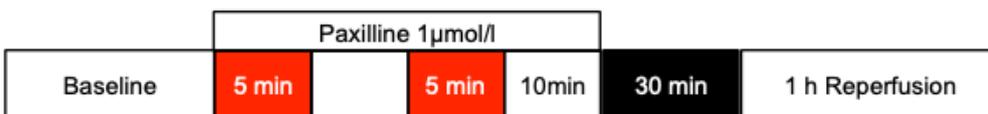
Paxilline alleine



Paxilline - Ischämische Präkonditionierung



Paxilline - Morphin Präkonditionierung



**Abbildung 2:** Versuchsprotokoll; modifiziert nach Fräßdorf et al. (2010) [1]

Die Herzen wurden randomisiert sechs Versuchsgruppen mit jeweils  $n = 8$  Tieren zugeteilt: Kontrollgruppe, ischämische Präkonditionierung und Morphin-Präkonditionierung – jeweils ohne und mit zusätzlicher Gabe von Paxillin als Kaliumkanalinhibitor.

Alle Herzen wurden einer 20-minütigen Stabilisierungsphase (*Baseline*) und einer 30-minütigen globalen Ischämie, gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusion unterzogen (I/R). Die Herzen der Kontrollgruppe (Con) wurden nicht weiter behandelt. Als Positivkontrolle diente die ischämische Präkonditionierung (IPC). Hierzu wurden die Herzen zweimal für jeweils fünf Minuten einer globalen Ischämie ausgesetzt,

unterbrochen von einer ebenfalls fünfminütigen Reperfusionphase, gefolgt von einer zehnminütigen Auswaschphase vor der 30-minütigen Ischämie. Für die Morphin-induzierte Präkonditionierung wurde eine Morphinlösung mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  verwendet. Diese Konzentration wurde gewählt, da Liang et al. (1999) den größten präkonditionierenden Effekt von Morphin bei diesem Wert nachgewiesen haben [55]. Das Morphin wurde in NaCl 0,9% gelöst. Die Morphinlösung wurde über einen separaten Tank der Langendorff-Apparatur der Perfusionslösung zugesetzt. Die Morphin-Präkonditionierung (MPC, n=8) erfolgte durch die Perfusion mit 1- $\mu\text{molarer}$  Morphinlösung ebenfalls für zwei mal fünf Minuten unterbrochen von einer fünfminütigen Auswaschphase, gefolgt von einer zehnminütigen Auswaschphase vor der 30-minütigen Ischämie. Um die Bedeutung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle in diesem Zusammenhang zu klären, wurden die zwei Protokolle (IPC und MPC) zusätzlich jeweils in Anwesenheit des spezifischen Blockers Paxillin durchgeführt (IPC + Pax und MPC + Pax) [42, 43, 56, 57]. Das Protokoll der alleinigen Gabe des spezifischen Kaliumkanalblockers Paxillin (Pax) wurde erstellt, um einen Einfluss des Blockers per se ausschließen zu können [1].

## **2.4 Infarktgrößenbestimmung**

Nach einer 60-minütigen Reperfusion wurden die Herzen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, um später Transversalschnitte von etwa 1 mm Dicke anzufertigen. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die Transversalschnitte mit einer Vitalfärbung, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) über einen Zeitraum von 15 Minuten bei  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  angefärbt. Im oxidierten Zustand (Tetrazolium) ist der Redox-Indikator farblos. Wenn Tetrazolium durch die Dehydrogenasen der intakten mitochondrialen Atmungskette unter Bildung eines Tetrazoliumradikals zu Formazan reduziert wird, verändert sich die optische Eigenschaft, sodass es rot erscheint [13, 14]. Anschließend wurden die TTC-gefärbten Transversalschnitte verwendet, um die Infarktgröße zu bestimmen. Das nekrotische Gewebe des Infarktgebiets wurde als farblose Bereiche identifiziert, während das umliegende vitale Myokard eine rötliche Färbung aufwies. Die Infarktgrößen wurden mittels planimetrischer Analyse mit der Software SigmaScan Pro (Version 5, Chicago, IL, USA) bestimmt. Das Risikogebiet umfasst den Myokardbereich, der einer No-Flow-Ischämie unterzogen wurde, im vorliegenden Modell mit einer globalen Ischämie also das gesamte Myokard. [1].

## **2.5 Datenverarbeitung**

Der koronare Perfusionsdruck (KPD), der linksventrikuläre Druck (LVD), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDD), die ischämische Kontraktur (IK) (definiert als Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) um mehr als 5 mmHg bezogen auf den initialen Wert zu Beginn der Ischämie) und der Koronarfluss wurden mit einer Abtastfrequenz von 500 Hz über einen Analog/Digitalwandler (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) digitalisiert und mit dem Programm Chart für Windows v5.0 (ADInstruments) aufgezeichnet [1].

## **2.6 Hämodynamische Variablen**

Als Maß der linksventrikulären Kontraktionskraft und damit der globalen linksventrikulären systolischen Funktion wurde der linksventrikulär entwickelte Druck (LVED) aus der Differenz des linksventrikulären Drucks (LVD) und des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDD) (voreingestellt auf 1 bis 4 mmHg) bestimmt. Als Maß für die Kontraktionskraft (Inotropie ( $dp/dt_{max}$ )) des Herzmuskels wurde aus der linksventrikulären Druckkurve während der Systole, die maximal messbare Druckerhöhungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel bestimmt. Um das Ausmaß der erschwerten Reperfusion durch Verschluss des koronaren Gefäßsystems und die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion zu erfassen, wurde die ischämische Kontraktur (IK) bestimmt [58]. Auch die Herzfrequenz (HF) und der Koronarfluss (KF) wurden gemessen [1].

## **2.7 Statistische Analysen**

Zur Bestimmung der Stichprobengröße wurde GraphPad StatMate Version 1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Die Analyse ergab, dass eine Fallzahl von 8 Tieren pro Gruppe nötig ist, um eine Infarktgrößenänderung von 25% mit einer Teststärke von 80% und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha < 0,05$  zu unterscheiden. Der geschätzte mittlere Unterschied der Infarktgröße von 25% und einer Standardabweichung von 15% beruht auf früheren Ergebnissen unserer

Arbeitsgruppe [31]. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) angegeben.

Die Herzfrequenz (HF, 1/min) und der mittlere Aortendruck (mmHg) wurden während der *Baseline*, Ischämie und Reperfusion gemessen.

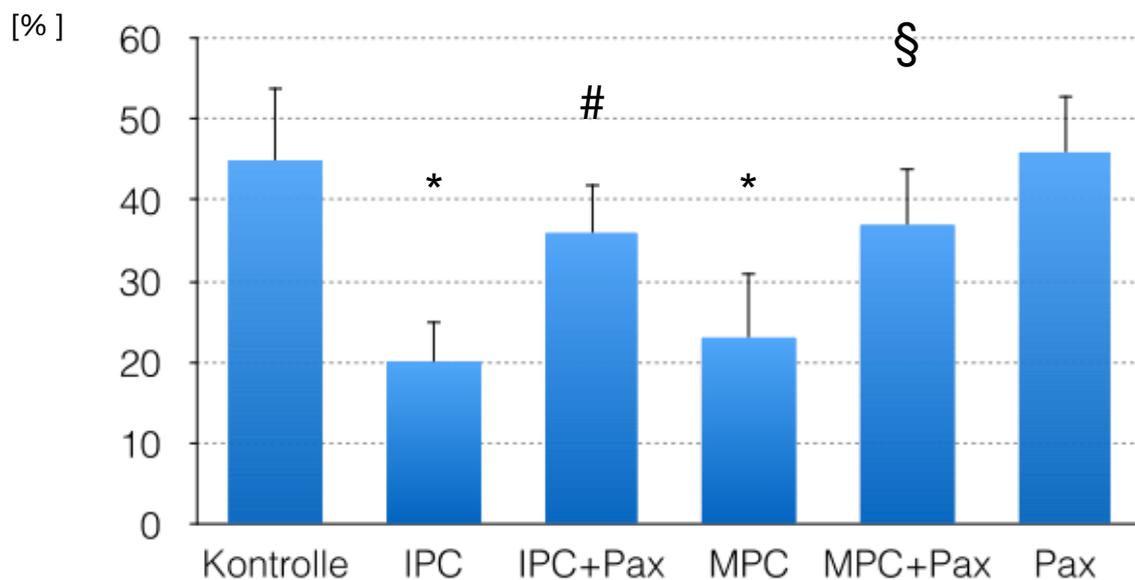
Zur Detektion von Unterschieden der hämodynamischen Größen zwischen den Gruppen und innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Dunnett's *Post-hoc* Test verwendet. Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte verblindet. Die Infarktgrößen wurden mittels *Student's t test* analysiert gefolgt von Bonferroni's Korrektur für multiple Vergleiche. Unterschiede gelten als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% liegt ( $p < 0,05$ ). Arrhythmische Phasen der Herzen wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt [1].

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Risikogebiet und Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde als prozentualer Anteil des Risikogebietes (*area at risk*, AAR) bestimmt. Die Kontrollgruppe zeigte eine Infarktgröße von  $45 \pm 9$  % (Mittelwert  $\pm$  SD (siehe Abbildung 3). Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Infarktgrößen sowohl in der ischämischen als auch in der Morphin-induzierten Präkonditionierungsgruppe signifikant reduziert und lagen unter 24 % (IPC:  $20 \pm 5$  %, MPC:  $23 \pm 8$  %; jeweils  $p < 0,05$  vs. Kontrolle) (siehe Abbildung 3); [1].

Die Gabe von Paxillin zur ischämischen und Morphin-induzierten Präkonditionierung hob den kardioprotektiven Effekt von Ischämie und Morphin auf. Paxillin ist ein spezifischer  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Blocker. Die Infarktgrößen betragen  $36 \pm 6$  % in der ischämischen Präkonditionierung + Paxillin und  $37 \pm 7$  % in der Morphin-induzierten Präkonditionierung + Paxillin, jeweils  $p < 0,05$  vs. IPC und MPC (siehe Abbildung 3). Die alleinige Gabe von Paxillin hatte keinen Effekt auf die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (Pax:  $46 \pm 7$  %;  $p > 0,05$ ) [1].



**Abbildung 3:** Infarktgrößen als prozentualer Anteil der „Area at risk“

*Daten als Mittelwerte±Standardabweichung*

*Kontrollgruppe (n = 8); IPC= ischämische Präkonditionierung (n=8); IPC+Pax= ischämische Präkonditionierung + Paxillin (n=8); MPC= Morphin-induzierte Präkonditionierung (n=8); MPC+Pax= Morphin-induzierte Präkonditionierung +Paxillin (n=8); Pax= Paxillin alleine (n=8);*

*\* p < 0,05 vs Kontrolle; # p < 0,05 vs IPC; § p < 0,05 vs MPC*

*Modifiziert nach Fräßdorf et al. (2010) [1]*

## 3.2 Hämodynamische Variablen

Die Ergebnisse der hämodynamischen Messungen sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

### 3.2.1 Herzfrequenz

Lediglich während der 10-minütigen Auswaschphase vor der globalen Ischämie kam es in der Paxillin-Gruppe zu einer Herzfrequenzsenkung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ansonsten kam es zu keiner Herzfrequenzänderung in der *Baseline*-, Auswasch- und Reperfusionsphase und zu keiner Änderung der Herzfrequenz während der ischämischen Präkonditionierung, Morphin-Präkonditionierung sowie der Kombination von Paxillin mit ischämischer Präkonditionierung oder in Kombination mit Morphin-Präkonditionierung jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe [1].

	Baseline	Auswaschphase	Zeit nach Reperfusion (min)			
			3	15	30	60
<b>Herzfrequenz (min<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	366 ± 37	359 ± 35	365 ± 29	378 ± 5	372 ± 15	373 ± 14
IPC	367 ± 11	360 ± 23	365 ± 22	377 ± 2	365 ± 20	361 ± 24
IPC + Pax	357 ± 31	355 ± 32	276 ± 73	323 ± 47	324 ± 47	357 ± 20
MPC	367 ± 30	349 ± 28	383 ± 28	383 ± 28	383 ± 28	382 ± 30
MPC + Pax	346 ± 28	333 ± 34	248 ± 215	283 ± 142	375 ± 24	372 ± 17
Pax	336 ± 25	280 ± 29 *	236 ± 126	342 ± 71	343 ± 69	344 ± 68
<b>LVEDP (mmHg)</b>						
Kontrolle	12 ± 32	12 ± 5	53 ± 22 †	35 ± 15 †	26 ± 10	19 ± 7
IPC	11 ± 1	4 ± 4	52 ± 22 †	24 ± 13	19 ± 8	18 ± 7
IPC + Pax	14 ± 2	11 ± 11	62 ± 22 †	56 ± 32 †	45 ± 33 †	28 ± 18
MPC	12 ± 3	15 ± 5	51 ± 6 †	36 ± 7 †	29 ± 6	24 ± 7
MPC + Pax	13 ± 2	12 ± 4	57 ± 23 †	43 ± 24 †	38 ± 31	34 ± 34
Pax	11 ± 5	8 ± 4	43 ± 17 †	23 ± 10	21 ± 8	20 ± 9
<b>dP/dt<sub>max</sub> (mmHg·sec<sup>-1</sup>·1000)</b>						
Kontrolle	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,6	0,7 ± 0,9 †	0,6 ± 0,8 †	0,6 ± 0,7 †	0,4 ± 0,5 †
IPC	3,4 ± 1,1	3,5 ± 1,1	0,7 ± 1,0 †	1,4 ± 0,7 †	1,6 ± 0,5 **†	1,5 ± 0,6 **†
IPC + Pax	3,3 ± 0,4	2,7 ± 0,2	0,1 ± 0,1 †	0,3 ± 0,2 †	0,2 ± 0,1 †	0,1 ± 0,1 †
MPC	3,0 ± 0,4	2,7 ± 0,6	0,8 ± 0,4 †	1,0 ± 0,4 †	1,0 ± 0,3 †	1,0 ± 0,1 **†
MPC + Pax	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1 †	0,3 ± 0,2 †	0,4 ± 0,3 †	0,3 ± 0,2 †
Pax	3,5 ± 1,1	3,0 ± 1,4	0,2 ± 0,1 †	0,4 ± 0,3 †	0,5 ± 0,4 †	0,5 ± 0,3 †
<b>KF (ml·min<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	16 ± 3	15 ± 2	9 ± 6 †	7 ± 6 †	7 ± 5 †	7 ± 6 †
IPC	14 ± 2	11 ± 5	7 ± 4 †	11 ± 6	8 ± 6	9 ± 6
IPC + Pax	13 ± 1	12 ± 2	11 ± 2	5 ± 2 †	4 ± 2 †	4 ± 4 †
MPC	16 ± 4	15 ± 4	9 ± 5 †	6 ± 3 †	5 ± 2 †	4 ± 2 †
MPC + Pax	15 ± 2	14 ± 2	13 ± 4	8 ± 3 †	7 ± 4 †	6 ± 4 †
Pax	14 ± 1	10 ± 2 *†	4 ± 2 †	4 ± 2 †	3 ± 1 †	2 ± 1 †

### Tabelle 1: Hämodynamische Variablen

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung

IPC= Ischämische Präkonditionierung; MPC= Morphin-induzierte Präkonditionierung;

Pax= Paxillin; dP/dt<sub>max</sub>=Druckanstieg; KF= Koronarfluss;

\*p < 0,05 vs Kontrolle;

† p < 0,05 vs Baseline

Modifiziert nach Fräßdorf et al. (2010) [1]

### 3.2.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)/linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit = Kontraktilität (dP/dt<sub>max</sub>)

Während der *Baseline* wurde kein signifikanter Unterschied im linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) zwischen den Versuchsgruppen festgestellt [1].

Auch am Ende der jeweiligen Vorbehandlung zeigten sich weder signifikante Unterschiede im Vergleich zur unvorbehandelten Kontrollgruppe (Con) noch innerhalb der Gruppen im Vergleich zur *Baseline*. Die globale Ischämie führte in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des LVEDP. Dieser Anstieg war bis zum Ende der Reperfusion in allen Gruppen reversibel. In der IPC-Gruppe bestand bereits nach 15 Minuten kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert mehr,

während in Con, MPC, MPC + Pax, und Pax erst nach 30 Minuten keine signifikante Abweichung mehr bestand. Lediglich in IPC + Pax war erst nach 60 Minuten Reperfusion kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert mehr nachweisbar (Tabelle 1). Zwar blieben die Werte in allen Gruppen in unterschiedlicher Ausprägung höher als zu Beginn des Experiments, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Während der *Baseline* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit als Ausdruck der Inotropie ( $dP/dt_{max}$ ) zwischen den Versuchsgruppen. Auch am Ende der jeweiligen Vorbehandlung zeigten sich weder signifikante Unterschiede zur unvorbehandelten Kontrollgruppe (Con) noch innerhalb der Gruppen im Vergleich zur *Baseline*. Während der Reperfusion nahm die Inotropie in allen Gruppen im Vergleich zur *Baseline* signifikant ab. Am Ende der Reperfusion nahm die Inotropie in allen Gruppen wieder zu, blieb jedoch signifikant unter dem Ausgangswert der *Baseline*. Jedoch war der Anstieg der Inotropie in den IPC- und MPC-Gruppen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe [1].

### **3.2.3 Koronarfluss (KF)**

Während der *Baseline* wurde kein signifikanter Unterschied im Koronarfluss (KF) zwischen den Versuchsgruppen beobachtet. Auch am Ende der jeweiligen Vorbehandlung gab es, bis auf die Paxillin-Gruppe, weder signifikante Unterschiede im Vergleich zur unvorbehandelten Kontrollgruppe (Con) noch innerhalb der Gruppen im Vergleich zur *Baseline*. In allen Gruppen fiel der Koronarfluss nach der Reperfusion gegenüber der *Baseline* ab ( $p < 0,05$  vs *baseline*) [1].

### **3.2.4 Körper- und Herzgewicht**

Die Körpergewichte der Wistar-Ratten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch die „nassen“ und „trockenen“ Herzgewichte der Tiere unterschieden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen (siehe Tabelle 2) [1].

	Körpergewicht [g]	Herzgewicht nass [g]	Herzgewicht trocken [mg]	Max. ischäm. Kontraktur [mmHg]	Zeit bis max. Kontraktur [min]
<b>Kontrolle</b>	310 ± 25	1,5 ± 0,2	171 ± 17	36 ± 3	14 ± 1
<b>IPC</b>	315 ± 23	1,5 ± 0,2	175 ± 18	20 ± 2*	27 ± 1*
<b>IPC + Pax</b>	315 ± 24	1,5 ± 0,2	181 ± 17	39 ± 3	15 ± 3
<b>MPC</b>	309 ± 26	1,5 ± 0,1	180 ± 20	20 ± 2*	27 ± 1*
<b>MPC + Pax</b>	313 ± 27	1,5 ± 0,1	185 ± 19	39 ± 3	13 ± 2
<b>Pax</b>	312 ± 25	1,6 ± 0,2	184 ± 19	36 ± 3	15 ± 1

**Tabelle 2:** Gewichte und ischämische Kontraktur

*Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung*

*IPC = Ischämische Präkonditionierung;*

*MPC = Morphin-induzierte Präkonditionierung;*

*Pax = Paxillin;*

*\*  $p < 0,05$  vs Kontrolle*

*Modifiziert nach Fräßdorf et al. (2010) [1]*

### 3.2.5 Ischämische Kontraktur

In der Kontrollgruppe betrug die Ausprägung der ischämischen Kontraktur  $36 \pm 3$  mmHg, in der ischämischen Präkonditionierungsgruppe  $20 \pm 2$  mmHg und in der Morphin-induzierten Präkonditionierungsgruppe  $20 \pm 2$  mmHg. Die Intensität der maximalen ischämischen Kontraktur war in den Präkonditionierungsgruppen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$  vs. Con).

In der Kontrollgruppe trat die maximale ischämische Kontraktur nach  $14 \pm 1$  Minuten auf, während sie in der ischämischen und der Morphin-induzierten Präkonditionierungsgruppe jeweils nach  $27 \pm 1$  Minuten auftrat.

Das Auftreten der maximalen ischämischen Kontraktur verzögerte sich in den Präkonditionierungsgruppen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$  vs. Con) (Tabelle 2) [ 1].

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Morphin zu einer Infarktgrößenverringering führt und ob die Morphin-induzierte Kardioprotektion über Vermittlung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle geschieht. Die Ergebnisse des Experiments zeigen, dass das Opioid Morphin ebenso wie die Ischämie die Präkonditionierung auslöst und zu einer vergleichbaren Infarktgrößenverringering führt.

Dies konnte an der Langendorff-Apparatur am isoliert perfundierten, männlichen Wistar-Rattenherz gezeigt werden. Die Rattenherzen wurden einer 30-minütigen globalen Ischämie sowie einer anschließenden 60-minütigen Reperfusionphase unterzogen und anschließend mit TTC gefärbt und die Infarktgröße bestimmt.

Paxillin ist ein selektiver Blocker mitochondrialer calciumabhängiger Kaliumkanäle [57]. Es zeigte sich eine Infarktgrößenzunahme nach der Gabe von Paxillin zur ischämischen und Morphin-induzierten Präkonditionierung. Die Gabe von Paxillin zur ischämischen und Morphin-induzierten Präkonditionierung hob den präkonditionierenden Effekt von Ischämie und Morphin auf. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass in der Signalkaskade der Kardioprotektion durch Ischämie und Morphin die Aktivierung und damit Öffnung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle eine Rolle spielt [1].

### **4.1 Diskussion Material und Methoden**

Die Langendorff-Apparatur erhielt ihren Namen von Oskar Langendorff. Im Jahr 1895 perfundierte Oskar Langendorff Säugetierherzen. Er entwickelte die Pionierarbeit von Carl Ludwig und Elias Cyon weiter, die erstmals Froschherzen perfundierten. Bereits im Jahr 1883 hatte H. Newell Martin auch schon Säugetierherzen perfundiert. Das Konzept der isoliert perfundierten Rattenherzen entwickelten Howard E. Morgan und James R. Neely in den 1960er Jahren [59-61]. Die Langendorff-Apparatur ist aktuell immer noch eine sehr beliebte Methode für isoliert perfundierte Herzen. Die Langendorff-Apparatur bietet durch ihre einfache Handhabung und ihren standardisierten Aufbau zahlreiche Vorteile für die Grundlagenforschung. Sie hat ein breites Anwendungsspektrum für isolierte Perfusion von Säugetierherzen wie zum Beispiel von Mäusen, Ratten, Kaninchen, Katzen, Primaten und Hunden [54, 62].

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich gesunde, drei Monate alte männliche Wistar-Ratten verwendet. Dadurch kann eine statistische Verzerrung der Ergebnisse durch beeinflussende Faktoren wie das Alter, Erkrankungen oder hormonelle Schwankungen bei weiblichen Tieren minimiert werden und somit wurde eine gute standardisierte Vergleichbarkeit erreicht.

Den Tieren wurde das Herz entnommen und unmittelbar in eine Schale mit kalter und heparinierter NaCl-Lösung gelegt. Anschließend wurden die Herzen direkt an die Langendorff-Apparatur angeschlossen, um ihre Unversehrtheit zu gewährleisten. Es ist wichtig, die Transferzeit des isolierten Herzens an die Langendorff-Apparatur unter 5 Minuten zu halten, um mögliche Schäden zu vermeiden und eine unbeabsichtigte ischämische Präkonditionierung zu verhindern [20, 21].

Durch die Isolation der Tierherzen wurde ein physiologischer Zustand ohne Einfluss des Organismus von neuronal-vegetativen oder metabolischen Variablen simuliert. Folglich können hämodynamische und metabolische Veränderungen durch pharmakologische oder physiologische Interventionen wie beispielsweise eine Ischämie gut reproduzierbar und standardisiert bestimmt werden [63, 64].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Herzen mit der Krebs-Henseleit-Pufferlösung druckkontrolliert perfundiert. Indem die Puffer-Lösung retrograd über die Aorta, bei geschlossener Aortenklappe in die Koronarostien und damit in das Koronargefäßbett geführt wurde, wurde das Herz selbst versorgt. Die Autoregulation der Koronarienperfusion bleibt bei der druckkontrollierten Perfusion im Gegensatz zur flusskontrollierten Perfusion erhalten. So kann das Herz selbst den Koronardruck steuern und es wird die Gefahr der Koronargefäßverletzung in der Reperfusionphase durch einen konstanten Fluss vermieden. Dies ist wichtig für die Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens. Die Gefahr der Koronargefäßverletzung ist bei regionaler Ischämie ausgeprägter als bei der globalen Ischämie [1, 65].

Neely et al. (1967) zeigten, dass das isoliert perfundierte Herz bei konstantem Perfusionsdruck und Sauerstoffversorgung für mehrere Stunden mit Nährstoffen versorgt wird, ohne einen Mangel zu erleiden [66, 67]. Aufgrund der Ergebnisse von Xu et al. 2005 wurde die globale Ischämiezeit von 30 Minuten gewählt. In dieser Studie wurde an Mäuseherzen gezeigt, dass die Infarktgröße durch den Verschluss des Ramus interventricularis anterior (RIVA), zwischen 30-45 Minuten am

schnellsten ansteigt. Folglich ist die optimale Ischämiedauer zwischen 30-45 Minuten um Auswirkungen auf die Infarktgröße zu erhalten [68].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine globale anstatt einer regionalen Ischämie angewendet. In der Arbeit von Kim et al. (2012) wurde ein Vergleich zwischen der globalen und regionalen Ischämie durchgeführt. Es zeigten sich nach der globalen Ischämie größere zusammenhängende Infarktareale als nach der regionalen Ischämie [69]. Folglich ist zur Infarktgrößenbestimmung die Differenzierung zwischen Infarkt und vitalem Gewebe erleichtert. Indem das ganze Herz einer Ischämie unterzogen wird, werden außerdem Anwender-Unterschiede reduziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reperfusionzeit von 60 Minuten gewählt. Die Wahl der Reperfusionzeit wird durch die Studie von Kim et al. (2012) gestützt. Sie zeigten, dass eine einstündige Reperfusionzeit zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens am isoliert perfundierten Rattenherz geeignet ist [69]. Die globale Ischämie hat den großen Vorteil der leichten Durchführbarkeit sowie der einfacheren Auswertung der Infarktgrößenbestimmung und ermöglicht eine bessere Reproduzierbarkeit und Standardisierung.

Die Infarktgrößenbestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Herz-Einfärbung mittels TTC-Färbung durchgeführt. In allen Studien zur Kardioprotektion steht die quantitative Bewertung der Lebensfähigkeit der Kardiomyozyten als primärer Endpunkt im Fokus. Bei isoliert perfundierten Herzen wird die Myokardinfarktgröße durch die TTC-Färbung als Goldstandard bestimmt. Diese Methode ermöglicht eine präzise und objektive Messung der Infarktgröße im Herzmuskelgewebe. Die Verwendung der TTC-Färbung als Goldstandard basiert auf ihrer weit verbreiteten Anwendung und ihrer nachgewiesenen Zuverlässigkeit bei der Bestimmung der Infarktgröße. Diese Methode hat sich als zuverlässiges Werkzeug etabliert, um die Wirksamkeit von kardioprotektiven Maßnahmen zu bewerten und Behandlungsstrategien bei Herzerkrankungen zu erforschen. Wie Lindsey et al (2018) zeigen konnten, ist die TTC-Färbung der Goldstandard zur Infarktgrößenbestimmung für die Methode der isoliert, perfundierten Herzen [70]. Die Langendorff-Apparatur ist sehr gut für die experimentelle Arbeit insbesondere in der Grundlagenforschung geeignet, um standardisiert ohne komplexe vegetative und humorale Einflüsse am isolierten Herzen Signalwege zu erforschen. Eine Übertragung direkt auf den Patienten ist jedoch nicht möglich. Der Einfluss von Faktoren wie Alter, Komorbiditäten oder Komedikationen auf den kardialen Ischämie-

Reperfusionsschaden kann zwar in speziellen experimentellen Settings an der Langendorff-Apparatur untersucht werden, jedoch ermöglicht diese Methode keine Simulation der komplexen Interaktionen, die im gesamten Organismus auftreten, wie zum Beispiel vegetative oder humorale Einflüsse. Kleinbongard et al. (2020) heben hervor, dass solche Faktoren in der klinischen Realität eine wesentliche Rolle spielen und die Effektivität kardioprotektiver Strategien signifikant beeinflussen können [71-73].

#### **4.2 Diskussion Ergebnisse**

Die vorliegende Studie zeigt, dass sowohl die ischämische als auch die Morphin-induzierte Präkonditionierung über mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanäle vermittelt wird. Die Erstbeschreibung der ischämischen Präkonditionierung erfolgte im Jahr 1986 durch Murry et al. [15]. In dieser vielbeachteten Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich das Herz durch kurze subletale Myokardischämien mit anschließender Reperfusion des Myokards in gewisser Weise an diesen Stress adaptiert. Das Myokard wird dadurch vor einer nachfolgenden, kritischen Index-Ischämie geschützt und der Ischämie- sowie Reperfusionsschaden können signifikant reduziert werden. Dieses Ergebnis konnte in einer Vielzahl nachfolgender Studien reproduziert werden [71, 74-80].

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Präkonditionierungseffekte in zwei Phasen einteilen lassen: eine frühe Phase (*first window of protection*, FWOP), die unmittelbar nach der Präkonditionierung eintritt und über ein bis zwei Stunden anhält und eine späte Phase (*second window of protection*, SWOP), die nach 12 bis 24 Stunden eintritt und etwa für 72 Stunden anhält [23, 24]. Weitere Studien haben gezeigt, dass das Prinzip der Konditionierung nicht nur auf ischämische Reize beschränkt ist, sondern dass auch bestimmte pharmakologische Stimuli eine Myokardprotektion auslösen können [41, 52, 81-83]. Beispiele dafür sind volatile Anästhetika [35, 36] und Morphin [84, 85]. Diese Substanzen haben gezeigt, dass sie ähnliche Schutzeffekte auf das Myokard ausüben wie ischämische Reize. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Therapieansätzen zur Verbesserung der kardialen Gesundheit und zur Behandlung von Herzerkrankungen.

Neuere Forschungsergebnisse legen nahe, dass Lutein, ein Flavonoid, zumindest teilweise durch die Aktivierung des mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanals

seine kardioprotektive Wirkung entfaltet. Lutein, das als natürliche kardioprotektive Substanz wirkt, aktiviert den mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanal sowohl in Kardiomyozyten als auch in vaskulären Endothelzellen [86].

Morphin ist ein Analgetikum aus der Gruppe der Opiate. Das Opiat Morphin wird zur Therapie bei starken und stärksten Schmerzen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Morphin-induzierte Präkonditionierung die Infarktgröße des Herzens nach einer globalen Ischämie reduzieren konnte. Die Morphin-induzierte Präkonditionierung wurde auch in anderen Studien nachgewiesen [84, 85, 87-90]. Folglich wäre die Morphinverabreichung als Schmerzmittel bei Patienten mit einer drohenden (Organtransplantation, kardiologische Operationen, Gefäßoperationen) oder bestehenden (Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall) Organischämie ein ideales Einsatzgebiet. Zwei Aspekte verdeutlichen die Bedeutung von Morphin für die Myokardprotektion. Zum einen besteht die potenzielle Gefahr eines Infarkts während einer drohenden oder bestehenden Organischämie. In solchen Situationen könnte Morphin als Therapieoption eingesetzt werden, da gezeigt wurde, dass Morphin schützende Effekte auf das Myokard hat. Diese Effekte könnten dazu beitragen, das Risiko eines Infarkts zu verringern oder dessen Auswirkungen abzumildern. Zum anderen bietet Morphin den Vorteil, dass es in der Akuttherapie, insbesondere auch in nicht operativen Umgebungen und durch Nicht-Anästhesiologen, eingesetzt werden kann, da Morphin im Gegensatz zu volatilen Anästhetika nur geringe sedierende Eigenschaften besitzt. Dies bedeutet, dass Morphin bei Bedarf ohne umfassende anästhesiologische Überwachung verabreicht werden kann. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, Morphin als pharmakologischen Stimulus zur Myokardkonditionierung einzusetzen und so die kardiale Gesundheit zu verbessern. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Morphin sowohl in der Prävention von Infarkten bei Ischämie als auch in der Akuttherapie eine vielversprechende Rolle spielen könnte. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um die genauen Mechanismen der Morphin-induzierten Myokardprotektion zu verstehen und die optimale Anwendung dieser Therapiestrategie zu bestimmen.

Zusätzlich zur lokalen Kardioprotektion durch Präkonditionierung wurden interessante Aspekte der Fernkonditionierung mit Morphin entdeckt, die potenziell in der klinischen Anwendung relevant sein könnten. In einer Studie von J Ling et al. aus dem Jahr 2010 wurde gezeigt, dass die pharmakologische Fernkonditionierung durch intrathekales Morphin durch die Aktivierung spinaler Opioidrezeptoren erreicht

werden kann [91]. Dies wurde auch in weiteren Studien gezeigt [92-96]. Es ist jedoch zu beachten, dass in der vorliegenden Studie die Untersuchung dieses Ansatzes nicht möglich war, da die frühe Phase der Präkonditionierung am isolierten Rattenherz untersucht wurde.

Morphin wirkt hauptsächlich als Agonist am  $\mu$ -Opioidrezeptor und in geringerem Maße an  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren. Die Opioidrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die verschiedene zelluläre Signalkaskaden modulieren. Nach Bindung eines Opioids an den  $\mu$ -Opioidrezeptor wird die Adenylatcyclase gehemmt und die Aktivität von Calciumkanälen gehemmt, während die Aktivität von Kaliumkanälen stimuliert wird. Dies führt zu einer Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung [97]. Die ischämische und die Morphin-induzierte Präkonditionierung teilen gemeinsame Signalwege: über die Aktivierung von Opioidrezeptoren sowie über die Aktivierung beider mitochondrialer Kaliumkanäle, sowohl  $mK_{ATP}$ -Kanäle als auch  $mBK_{Ca}$ -Kanäle. Schulz et al. zeigten, dass die Aktivierung von Opioidrezeptoren an der ischämischen Präkonditionierung im Myokard der Ratte beteiligt ist [98]. Später konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die ischämische Präkonditionierung und die Morphin-induzierte Kardioprotektion über den Delta-Opioid-Rezeptor im intakten Rattenherz vermittelt werden [99].

Die Öffnung der  $mK_{ATP}$ -Kanäle, die an der mitochondrialen Regulierung beteiligt sind, ist ein Schlüsselschritt sowohl der ischämischen wie auch der Morphin-induzierten Präkonditionierung. Neben den  $mK_{ATP}$ -Kanälen ist mit den  $mBK_{Ca}$ -Kanälen eine weitere Klasse von Kaliumkanälen von zentraler Bedeutung für die Kardioprotektion durch Präkonditionierung [26, 38, 39, 51, 100]. So beschrieben Xu et al. calciumaktivierte Kaliumkanäle in der inneren Mitochondrienmembran, die im isolierten Meerschweinchenherz die Kardioprotektion vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden vermittelten [38]. Seither konnte die Bedeutung dieser  $mBK_{Ca}$ -Kanäle für die ischämische Präkonditionierung vielfach in unterschiedlichen Modellen (isolierten Ratten- und Mäuseherzen, anästhesierten Hunden und isolierten Herzmuskelzellen) nachvollzogen werden [39, 42, 43, 101-104]. Ebenso wurde eine Kardioprotektion durch eine genetische Aktivierung der  $mBK_{Ca}$ -Kanälen nachgewiesen [27, 47]. Obwohl die Aktivierung beider mitochondrialer Kaliumkanäle, der ATP- und der calciumabhängigen Kanäle, unabhängig voneinander eine Präkonditionierung des Myokards vermittelt, ist die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) in beiden Fällen beteiligt [33, 34, 84]. Die mitochondrialen

calciumabhängigen Kaliumkanäle sind Ionenkanäle, die sich bei einem erhöhten intramitochondrialen Calciumgehalt öffnen und das mitochondriale Membranpotenzial depolarisieren, was die Funktion der Mitochondrien beeinflusst. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ -Einheit, die den Kanal bildet, und aus einer regulatorischen  $\beta$ -Einheit [105-107]. Cao et al. zeigen, dass durch Hemmung des  $mBK_{Ca}$ -Kanals mittels Paxillin die Ischämie vermittelte Präkonditionierung an isolierten Rattenherzen aufgehoben wird [42]. Paxillin ist ein Toxin, das vom Schimmelpilz *Penicillium paxilli* gebildet wird. Es hat die Fähigkeit, beide Untereinheiten des  $mBK_{Ca}$ -Kanals zu blockieren und ist ein selektiver Blocker der  $mBK_{Ca}$ -Kanal [56, 108, 109]. Paxillin wurde in der vorliegenden Arbeit in einer Konzentration von 1  $\mu$ M verwendet, wie es auch in früheren Studien üblich war [42, 43]. Bei höheren Konzentrationen kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass Paxillin unspezifische Blockierungen verursacht [57]. Der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren wie Paxillin, einem Inhibitor der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle, hat trotz Limitierungen hinsichtlich der Spezifität einen hohen Stellenwert in der Untersuchung der funktionellen Rolle von Signalwegen. Die Kontrollgruppe Paxillin alleine dient dazu, den direkten Effekt von Paxillin auf die Infarktgröße zu bestimmen. Diese Experimente zeigten, dass Paxillin selbst keinen direkten Effekt auf die Ausbildung der Infarktgröße hatte. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Infarktgrößen-normalisierende Effekt von Paxillin auf die Morphin-induzierte Präkonditionierung wahrscheinlich nicht durch eine Infarktgrößen-steigernde Wirkung von Paxillin verursacht wird. Ein vollständiger Ausschluss unspezifischer Effekte ist jedoch nicht möglich und muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen die Kardioprotektion nicht nur durch eine Ischämische Präkonditionierung sondern auch durch eine Morphin-induzierte Präkonditionierung ausgelöst wird. Während Cao et al. den  $mBK_{Ca}$ -Kanal Blocker Paxillin am Beginn der Reperfusion nach einer Ischämiephase verwendeten, wurde Paxillin in der vorliegenden Arbeit bereits in der Präkonditionierungs Periode zugegeben. Dies geschieht unter der Annahme, dass der Infarktgrößen reduzierende Effekt während der Triggerphase der Präkonditionierung entsteht [42]. In einer später durchgeführten Studie zeigte sich der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle als Mediator [51, 84].

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen nicht nur die Infarktgröße reduziert wird, sondern auch eine

signifikante Reduktion des mitochondrialen respiratorischen Kontrollindex (RCI) erreicht wird [33]. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die alleinige Gabe eines  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Blockers (Iberiotoxin, [33]) keinen Effekt auf die Infarktgröße oder den RCI hatte. Bei gleichzeitiger Anwendung des Blockers mit dem Präkonditionierungsstimulus wurde jedoch sowohl die Reduktion der Infarktgröße als auch die Abnahme des RCI, die durch den Stimulus alleine hervorgerufen wurden, aufgehoben. Dies zeigt, dass die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen eine zentrale Rolle in der Signalkaskade der Präkonditionierung spielt und zur partiellen Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette beiträgt. Eine solche Entkopplung der Atmungskette scheint ein gemeinsames Charakteristikum konditionierter Mitochondrien zu sein [1, 40, 108-110].

#### **4.3 Fazit & Limitationen**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Beteiligung des  $mBK_{Ca}$ -Kanals an der Präkonditionierung durch Morphin zu untersuchen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Ischämische Präkonditionierung und Morphin-induzierte Präkonditionierung zu einer vergleichbaren Infarktgrößenreduktion führen. Dass der  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Blocker Paxillin die präkonditionierenden Effekte beider Stimuli gleichermaßen aufhebt, bestätigt einerseits die Bedeutung der  $mBK_{Ca}$ -Kanal Aktivierung für die Ischämische Präkonditionierung. Andererseits legt es den Schluss nahe, dass die  $mBK_{Ca}$ -Kanäle eine Rolle in der frühen Phase der Morphin-induzierten Präkonditionierung spielen. Heinen et al. haben gezeigt, dass die  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Aktivierung zu einer vermehrten mitochondrialen Bildung freier Sauerstoffradikale führen kann [110]. Auch der  $mBK_{Ca}$ -Kanal Agonist NS 1619 benötigt die Bildung von Superoxidradikalen während des Präkonditionierungs-Reizes, um seinen kardioprotektiven Effekt zu entwickeln [111]. Außerdem demonstrieren diese Autoren, dass eine Kardioprotektion durch NS1619 zu einer reduzierten Calciumüberladung und zu einer verringerten Sauerstoffradikalproduktion in der anschließenden Periode der Ischämie und der frühen Phase der Reperfusion führt. Es wird vermutet, dass solch eine Verringerung der Calciumüberladung und eine Reduzierung von Sauerstoffradikalen wahrscheinlich die Öffnung der mPTP verhindert [112, 113]. Die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen scheint in der Präkonditionierungskaskade zeitlich vor der Inhibierung der mPTP-Öffnung angesiedelt zu sein, da sich die Kardioprotektion

durch eine Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen durch mPTP Öffnung aufheben lässt, während eine  $mBK_{Ca}$ -Kanal-Blockade mit Paxillin die Kardioprotektion durch mPTP Inhibition (z. B. durch Cyclosporin A) nicht beeinflusst [42]. Ungewiss war zu dem Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit, ob auch eine Morphin-induzierte Präkonditionierung über eine Regulation der mPTP durch die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen läuft. Dies konnte erst in einer nachfolgenden Arbeit gezeigt werden [1, 84]. Die Ergebnisse der Studie müssen mit gewissen Einschränkungen interpretiert werden. Erstens wurde der vorgeschaltete Signalweg der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle zum Zeitpunkt der Studie nicht untersucht. Opioidrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung die Adenylatcyclase hemmt. Es war zu diesem Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass die Morphin-induzierte Präkonditionierung über andere intrazelluläre Signalwege die Aktivierung von  $mBK_{Ca}$ -Kanälen vermittelt. Während der Durchführung der Studie war der Mechanismus, über den die Morphin-induzierte Präkonditionierung die  $mBK_{Ca}$ -Kanäle aktiviert, unbekannt. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle auch an der Desfluran Präkonditionierung beteiligt ist und dass dieser  $mBK_{Ca}$ -Aktivierung die Proteinkinase A (PKA) vorgeschaltet ist [114]. Die Aktivierung von PKA als ein möglicher Aktivator der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle ist von der zellulären Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) abhängig, da PKA eine cAMP-abhängige Proteinkinase ist. Auch weitere Enzyme, deren Beteiligung an der Morphin-induzierten Präkonditionierung beschrieben ist (Glykogen Synthase Kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) oder PKB), waren zum Zeitpunkt der Planung und Durchführung der vorliegenden Studie noch nicht untersucht [1, 115, 116].

In der Studie von Miki et al. wurde eine Morphin-induzierte Kardioprotektion nachgewiesen, allerdings würde die Morphinkonzentration (3 mg/kg KG) die klinisch übliche Dosis weit übersteigen. Einschränkend kommt hinzu, dass auch diese Studie nicht am menschlichen Herzen durchgeführt wurde, sondern am Kaninchenherzen [117].

Dennoch konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben der ischämischen Präkonditionierung auch die Morphin-induzierte Präkonditionierung die Kardioprotektion durch eine Aktivierung der  $mBK_{Ca}$ -Kanäle vermittelt [1].

Eine weitere Einschränkung dieser vorliegenden Studie besteht darin, dass nicht untersucht wurde, ob die Verabreichung von Morphin zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Auswirkungen haben könnte. Die Ergebnisse einer aktuellen Studie

von Lei et al. deuten darauf hin, dass die Morphingabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Auswirkungen auf die Pathologie der akuten Myokardischämie und Reperfusion haben kann. Es wäre interessant, zukünftige Forschung in Betracht zu ziehen, um die optimale Strategie für das Timing der Verabreichung von Morphin bei der Kardioprotektion zu untersuchen [118]. Morphin ist ein klassisches, gut bekanntes und günstiges Analgetikum. Es wird in der Klinik als Standardmedikament zur Therapie des akuten Koronarsyndroms eingesetzt. Aufgrund seiner kardioprotektiven Wirkung könnte es hervorragend für Patienten mit drohender oder bestehender Organischämie eingesetzt werden. Deshalb könnte die weitere Entschlüsselung der MPC weitreichende klinische Konsequenzen haben [1].

Nach den experimentellen Einblicken in die Morphin-induzierte Präkonditionierung ist anschließend Forschung unter Bedingungen mit systemischem Einfluss nötig. Dadurch können die modulierenden Effekte von Alter, Komorbiditäten und Komedikation auf die Infarktgröße berücksichtigt werden [119].

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Frassdorf, J., et al., *Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels*. Can J Anaesth, 2010. **57**(8): p. 767-73.
2. *Statistisches Bundesamt - Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10 (Abgerufen am 20.05.2023)*. 2022.
3. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *The cell biology of acute myocardial ischemia*. Annu Rev Med, 1991. **42**: p. 225-46.
4. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
5. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
6. Ladilov, Y., et al., *Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*. Am J Physiol, 1999. **276**(6): p. H1868-76.
7. Heinen, A., et al., *Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1400-7.
8. Piper, H.M., et al., *[Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]*. Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**(12): p. 586-90.
9. Inserte, J., V. Hernando, and D. Garcia-Dorado, *Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(1): p. 23-31.
10. Frohlich, G.M., et al., *Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI*. Eur Heart J, 2013. **34**(23): p. 1714-22.
11. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
12. 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.
13. Bulluck, H., et al., *Circadian variation in acute myocardial infarct size assessed by cardiovascular magnetic resonance in reperfused STEMI patients*. Int J Cardiol, 2017. **230**: p. 149-154.
14. Heusch, G., *Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(12): p. 773-789.
15. 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. 1124-36.
16. Pang, C.Y., et al., *Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(6): p. 782-8.
17. Barone, F.C., et al., *Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression*. Stroke, 1998. **29**(9): p. 1937-50; discussion 1950-1.
18. Soncul, H., E. Oz, and S. Kalaycioglu, *Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung*. Chest, 1999. **115**(6): p. 1672-7.
19. Pajdo, R., et al., *Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves*. Eur J Pharmacol, 2001. **427**(3): p. 263-76.
20. Bonventre, J.V., *Kidney ischemic preconditioning*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(1): p. 43-8.
21. Alchera, E., et al., *Molecular mechanisms of liver preconditioning*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(48): p. 6058-67.
22. Braun, S., et al., *Pretreatment with helium does not attenuate liver injury after warm ischemia-reperfusion*. Shock, 2014. **41**(5): p. 413-9.
23. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. Circ Res, 1993. **72**(6): p. 1293-9.

24. Guo, Y., et al., *Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. H1375-87.
25. Bolli, R., *The late phase of preconditioning*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 972-83.
26. Bentzen, B.H., et al., *BK channel activators and their therapeutic perspectives*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 389.
27. Soltysinska, E., et al., *KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103402.
28. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., *Pharmakologie und Toxikologie*. 2006: p. 271 ff.
29. Gross, G.J., *Role of opioids in acute and delayed preconditioning*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(7): p. 709-18.
30. Ferdinandy, P., R. Schulz, and G.F. Baxter, *Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(4): p. 418-58.
31. Heinen, A., et al., *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) -sensitive potassium channel activation*. Anesthesiology, 2008. **109**(5): p. 830-6.
32. Redel, A., et al., *Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(10): p. 1186-91.
33. Cohen, M.V., et al., *Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 273-8.
34. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Preconditioning: the mitochondrial connection*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 51-67.
35. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
36. Tanaka, K., J.R. Kersten, and M.L. Riess, *Opioid-induced cardioprotection*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(36): p. 5696-705.
37. Halestrap, A.P. and A.P. Richardson, *The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 129-41.
38. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
39. Shintani, Y., et al., *Opening of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(6): p. 1213-8.
40. Tano, J.Y. and M. Gollasch, *Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 381.
41. Testai, L., et al., *Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs*. Med Res Rev, 2015. **35**(3): p. 520-53.
42. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 644-50.
43. Cao, C.M., M. Chen, and T.M. Wong, *The K(Ca) channel as a trigger for the cardioprotection induced by kappa-opioid receptor stimulation -- its relationship with protein kinase C*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(7): p. 984-91.
44. Martin, W.R., *Pharmacology of opioids*. Pharmacol Rev, 1983. **35**(4): p. 283-323.
45. Trescot, A.M., et al., *Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines*. Pain Physician, 2008. **11**(2 Suppl): p. S5-S62.
46. Singh, H., et al., *MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(26): p. 10836-41.
47. Sztejn, K. and H. Singh, *BK(Ca) Channels as Targets for Cardioprotection*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(8).

48. Holmuhamedov, E.L., et al., *Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5): p. H1567-76.
49. Balderas, E., et al., *Mitochondrial BKCa channel*. *Front Physiol*, 2015. **6**: p. 104.
50. D'Angelo, D. and R. Rizzuto, *The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases*. *Biomolecules*, 2023. **13**(9).
51. Behmenburg, F., et al., *Impact of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0144737.
52. Bunte, S., et al., *Preconditioning by Levosimendan is Mediated by Activation of Mitochondrial Ca(2+)-Sensitive Potassium (mBK(Ca)) Channels*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018. **32**(5): p. 427-434.
53. Torregroza, C., et al., *[Perioperative cardioprotection - From bench to bedside : Current experimental evidence and possible reasons for the limited translation into the clinical setting]*. *Anaesthesist*, 2021. **70**(5): p. 401-412.
54. 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.
55. Liang, B.T. and G.J. Gross, *Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels*. *Circ Res*, 1999. **84**(12): p. 1396-400.
56. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. *J Gen Physiol*, 2014. **144**(5): p. 415-40.
57. Zhou, Y., X.M. Xia, and C.J. Lingle, *The functionally relevant site for paxilline inhibition of BK channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(2): p. 1021-1026.
58. Cooley, D.A., G.J. Reul, Jr., and D.C. Wukasch, *Ischemic myocardial contracture ("stone heart"). A complication of cardiac surgery*. *Isr J Med Sci*, 1975. **11**(2-3): p. 203-10.
59. Zimmer, H.G., *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. *News Physiol Sci*, 1998. **13**: p. 203-210.
60. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007. **55**(2): p. 113-26.
61. Liao, R., B.K. Podesser, and C.C. Lim, *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **303**(2): p. H156-67.
62. de Bakker, J.M., et al., *Ventricular tachycardia in the infarcted, Langendorff-perfused human heart: role of the arrangement of surviving cardiac fibers*. *J Am Coll Cardiol*, 1990. **15**(7): p. 1594-607.
63. de Leiris, J., D.P. Harding, and S. Pestre, *The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischaemia*. *Basic Res Cardiol*, 1984. **79**(3): p. 313-21.
64. Verdouw, P.D., et al., *Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes*. *Cardiovasc Res*, 1998. **39**(1): p. 121-35.
65. Assayag, P., et al., *Effects of sustained low-flow ischemia on myocardial function and calcium-regulating proteins in adult and senescent rat hearts*. *Cardiovasc Res*, 1998. **38**(1): p. 169-80.
66. Neely, J.R., et al., *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart*. *Am J Physiol*, 1967. **212**(4): p. 804-14.
67. Graf, B.M., et al., *Synthetic 8-ornithine-vasopressin, a clinically used vasoconstrictor, causes cardiac effects mainly via changes in coronary flow*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1997. **41**(3): p. 414-21.
68. Xu, Y., et al., *Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(2): p. H692-9.
69. Kim, J.H., et al., *Cardiodynamics and infarct size in regional and global ischemic isolated heart model: comparison of 1 hour and 2 hours reperfusion*. *Korean Circ J*, 2012. **42**(9): p. 600-5.
70. Lindsey, M.L., et al., *Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **314**(4): p. H812-H838.
71. Hausenloy, D.J., et al., *Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery*. *Basic Res Cardiol*, 2016. **111**(6): p. 70.

72. 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.
73. Kleinbongard, P., et al., *Co-morbidities and co-medications as confounders of cardioprotection-Does it matter in the clinical setting?* *Br J Pharmacol*, 2020. **177**(23): p. 5252-5269.
74. Schott, R.J., et al., *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium*. *Circ Res*, 1990. **66**(4): p. 1133-42.
75. 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.
76. 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.
77. Lawson, C.S. and J.M. Downey, *Preconditioning: state of the art myocardial protection*. *Cardiovasc Res*, 1993. **27**(4): p. 542-50.
78. Iliodromitis, E.K., et al., *Protection from preconditioning can be reinstated at various reperfusion intervals*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1996. **10**(3): p. 341-6.
79. Andreadou, I., et al., *The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H(2)S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection*. *J Cell Mol Med*, 2020. **24**(12): p. 6510-6522.
80. Kleinbongard, P., et al., *No sex-related differences in infarct size, no-reflow, and protection by ischaemic pre-conditioning in Gottingen minipigs*. *Cardiovasc Res*, 2023. **119**(2): p. 561-570.
81. Behmenburg, F., et al., *The Cardioprotective Effect of Dexmedetomidine in Rats Is Dose-Dependent and Mediated by BKCa Channels*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017. **69**(4): p. 228-235.
82. Stroethoff, M., et al., *Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Through Activation of Mitochondrial Potassium Channels*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018. **72**(2): p. 106-111.
83. Sampieri, R., et al., *Pharmacological Preconditioning Using Diazoxide Regulates Store-Operated Ca(2+) Channels in Adult Rat Cardiomyocytes*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 1589.
84. Dorsch, M., et al., *Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore*. *PLoS One*, 2016. **11**(3): p. e0151025.
85. Cao, L. and S. Chai, *miR-320-3p is involved in morphine pre-conditioning to protect rat cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury through targeting Akt3*. *Mol Med Rep*, 2020. **22**(2): p. 1480-1488.
86. Kampa, R.P., et al., *Luteolin-Induced Activation of Mitochondrial BK(Ca) Channels: Undisclosed Mechanism of Cytoprotection*. *Antioxidants (Basel)*, 2022. **11**(10).
87. Schultz, J.E., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart*. *Circ Res*, 1996. **78**(6): p. 1100-4.
88. Shi, E., et al., *Cardioprotective effects of morphine on rat heart suffering from ischemia and reperfusion*. *Chin Med J (Engl)*, 2003. **116**(7): p. 1059-62.
89. Okubo, S., et al., *Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(4): p. H1786-91.
90. Li, L., et al., *Involvement of adenosine monophosphate-activated protein kinase in morphine-induced cardioprotection*. *J Surg Res*, 2011. **169**(2): p. 179-87.
91. Ling Ling, J., et al., *Remote pharmacological post-conditioning by intrathecal morphine: cardiac protection from spinal opioid receptor activation*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010. **54**(9): p. 1097-104.
92. Li, R., et al., *Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(1): p. 23-9.

93. Wong, G.T., et al., *Intrathecal morphine remotely preconditions the heart via a neural pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2012. **60**(2): p. 172-8.
94. Lu, Y., et al., *Remote intrathecal morphine preconditioning confers cardioprotection via spinal cord nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G pathway*. J Surg Res, 2015. **193**(1): p. 43-51.
95. Jiang, L., et al., *Spinal Neuronal NOS Signaling Contributes to Morphine Cardioprotection in Ischemia Reperfusion Injury in Rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2016. **358**(3): p. 450-6.
96. Hausenloy, D.J., et al., *Cardiac innervation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1167-1177.
97. *Opioid-Rezeptoren*. abgerufen 17.04.2020, Pschyrembel Online.
98. Schultz, J.E., et al., *Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 2): p. H2157-61.
99. Huhn, R., et al., *Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mK(Ca) channels*. Br J Anaesth, 2010. **105**(5): p. 589-95.
100. 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).
101. Wang, X., et al., *Opening of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(5): p. H2070-7.
102. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 198-203.
103. Dong, D.L., Y.L. Bai, and B.Z. Cai, *Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2016. **104**: p. 233-261.
104. Goswami, S.K., et al., *Expression and Activation of BK(Ca) Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 194.
105. Kaczorowski, G.J., et al., *High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function*. J Bioenerg Biomembr, 1996. **28**(3): p. 255-67.
106. Wallner, M., et al., *Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium*. Receptors Channels, 1995. **3**(3): p. 185-99.
107. Munujos, P., et al., *Cross-linking of charybdotoxin to high-conductance calcium-activated potassium channels: identification of the covalently modified toxin residue*. Biochemistry, 1995. **34**(34): p. 10771-6.
108. Sanchez, M. and O.B. McManus, *Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel*. Neuropharmacology, 1996. **35**(7): p. 963-8.
109. Hu, H., et al., *Presynaptic Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release*. J Neurosci, 2001. **21**(24): p. 9585-97.
110. Heinen, A., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C148-56.
111. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H434-40.
112. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and I. Khaliulin, *The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1767**(8): p. 1007-31.
113. Lim, S.Y., et al., *Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 530-5.
114. Redel, A., et al., *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning*. Anesth Analg, 2008. **106**(2): p. 384-91, table of contents.

115. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(2): p. H827-34.
116. Xi, J., et al., *Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn<sup>2+</sup>/GSK-3beta signal pathway in cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H601-7.
117. Miki, T., M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits*. *Mol Cell Biochem*, 1998. **186**(1-2): p. 3-12.
118. Lei, Y., X.X. Li, and Z. Guo, *Impact of timing of morphine treatment on infarct size in experimental animal model of acute myocardial ischemia and reperfusion*. *Eur J Pharmacol*, 2022. **928**: p. 175094.
119. Ferdinandy, P., et al., *Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(4): p. 1142-74.

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte meinen tiefen Dank an alle Personen aussprechen, die an dieser Arbeit beteiligt waren. Ihre unschätzbare Hilfe und Unterstützung haben dazu beigetragen, dass diese Aufgabe erfolgreich gemeistert wurde. Ich bin zutiefst dankbar für Ihr Engagement, Ihre Professionalität und Ihre Hingabe. Ihre Beiträge haben einen bedeutenden Unterschied gemacht und ich bin Ihnen von ganzem Herzen dankbar.