

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

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

Die Beteiligung des Melatonin-2-Rezeptors und
Reaktiver Sauerstoffspezies an der Ramelteon-
induzierten Kardioprotektion

Dissertation

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

vorgelegt von
Lukas Thomas Götze
2025

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

gez.: Lukas Thomas Götze

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

Erstgutachter: PD Dr. med. Martin Ströthoff

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

Widmung

Für meine Familie

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

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

Abkürzungsverzeichnis

4P-PDOT	4-Phenyl-2-propionamidotetralin
Abb.	Abbildung
ACD	versehentlicher Zelltod (engl. = <i>accidental cell death</i>)
ACS	akutes Koronarsyndrom (engl. = <i>acute coronary syndrome</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CsA	Cyclosporin A
CVD	<i>cardiovascular disease</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i> = Schadens
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EMA	European medicine agency
<i>et al.</i>	Und andere
etc.	<i>et cetera</i> (lat. = und die übrigen/ und weitere)
I.E.	internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IPC	ischämische Präkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
KHK	Koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KI	Konvidenzintervall
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LVP	linksventrikulärer Druck

LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
mK_{ATP}	mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanal
mK_{Ca}	mitochondriale Kalzium-abhängige-Kaliumkanal
MPG	N-2-Mercaptopropionylglycin
mPTP	mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore
Mrd.	Milliarden
MT	Melatonin-Rezeptor
MW	Molekulargewicht (engl. = <i>molecular weight</i>)
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NSTEMI	nicht ST-Hebungs-Infarkt (engl. = <i>non ST-elevation myocardial infarction</i>)
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	perkutane Koronarintervention (engl. = <i>percutaneous coronary intervention</i>)
PDE5-I	Phosphodiesterase-5-Hemmer
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Serin/Threonin-Kinase
PKG	Proteinkinase G
Ram	Ramelteon
RCD	Regulierter Zelltod (engl. = <i>regulated cell death</i>)
RPC	Ischämische Fern-Präkonditionierung (engl. = <i>remote ischemic preconditioning</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. = <i>reactive oxygen species</i>)
SAFE	<i>survival-activating-factor-enhancement-pathway</i>
SD	Standardabweichung
STAT 3	<i>signal-transducer-and-activator-of-transcription 3</i>
STEMI	ST-Hebungs-Infarkt (engl. = <i>ST elevation myocardial infarction</i>)
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
u.a.	unter anderem
UFH	Unfraktioniertes Heparin

UK	Vereinigtes Königreich (engl. = <i>United Kingdom</i>)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. = <i>United States of America</i>)
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation (engl. = <i>world health organisation</i>)
z.B.	zum Beispiel
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
dpi	<i>dots per inch</i>
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
s	Sekunde

Zusammenfassung:

Der Melatonin-Rezeptor (MT)-Agonist Ramelteon weist eine höhere Affinität zum MT1- als zum MT2-Rezeptor auf und vermittelt kardioprotektive Effekte durch die Aktivierung mitochondrialer Kaliumkanäle. In dieser Arbeit wird zum einen untersucht, ob die Ramelteon-induzierte Kardioprotektion über den MT2-Rezeptor vermittelt wird und zum anderen ob Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) an diesem Mechanismus beteiligt sind.

Hierzu wurden Herzen männlicher, junger Wistar-Ratten in ein Langendorff-System überführt und unter konstantem Perfusionsdruck von 80 mmHg mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Alle Herzen durchliefen eine 33-minütige globale Ischämie mit anschließender einstündiger Reperfusion. Die Infarktgrößen des linken Ventrikels wurden nach Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung planimetrisch bestimmt. Die Tiere wurden in insgesamt 9 Gruppen aufgeteilt. Vor der Ischämie wurde je nach Gruppenzuteilung eine andere Substanz verabreicht. Im ersten Teil der Arbeit wurde Ramelteon (Ram), entweder allein oder in Kombination mit dem selektiven MT2-Rezeptor-Antagonisten 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT + Ram) verabreicht. Des Weiteren erfolgte die alleinige Perfusion der Herzen mit 4P-PDOT. Im zweiten Teil wurde Ramelteon zusammen mit dem ROS-Scavenger N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG+Ram) appliziert. Um zu untersuchen, ob die Blockade der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion aufgehoben werden kann, kombinierten wir Ramelteon und MPG mit dem Inhibitor der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP) Cyclosporin A (CsA) einmal vor Induktion der Ischämie und einmal direkt nach Beendigung derselbigen.

Die durch Ramelteon induzierte Reduktion der Infarktgröße wurde durch die gleichzeitige Applikation von 4P-PDOT sowie MPG vollständig aufgehoben. Während die Kombination von Ramelteon und MPG mit CsA vor der Ischämie keinen kardioprotektiven Effekt zeigte, konnte die Applikation von CsA zum Zeitpunkt der Reperfusion die Infarktgrößenreduktion wiederherstellen.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die kardioprotektive Wirkung des Melatonin Rezeptor-Agonisten Ramelteon eine Aktivierung des MT2-Rezeptors voraussetzt. Darüber hinaus wird gezeigt, dass die Freisetzung von ROS eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade der durch Ramelteon induzierten

Kardioprotektion spielt. Des Weiteren stellt die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) während der Reperfusion die Infarktgrößenreduktion von Ramelteon wieder her.

Abstract:

The melatonin receptor-agonist Ramelteon shows a higher affinity for the MT1 receptor than for the MT2 receptor and exerts cardioprotective effects via the activation of mitochondrial potassium channels, leading to the release of reactive oxygen species (ROS). This study investigates whether Ramelteon-induced cardioprotection is mediated through the MT2 receptor and whether reactive oxygen species (ROS) play a crucial role in this process. Male Wistar rat hearts were isolated, transferred to a Langendorff system, and perfused with Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure of 80 mmHg. All hearts underwent 33 minutes of global ischemia followed by 60 minutes of reperfusion. Infarct size in the left ventricle was determined by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The animals were divided into nine experimental groups, each receiving different pharmacological treatments prior to ischemia induction.

In the first part of the study, hearts were perfused with Ramelteon (Ram) alone or in combination with the selective MT2 receptor antagonist 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT+Ram). Additional groups received 4P-PDOT alone (4P-PDOT). In the second part of the study, Ramelteon was administered together with the ROS scavenger N-2-mercaptopropionylglycine (MPG+Ram). To assess whether the blockage of Ramelteon-induced cardioprotection could be reversed, Ramelteon and MPG were co-administered with the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor Cyclosporin A (CsA) either before ischemia or at the onset of reperfusion.

The infarct size reduction induced by Ramelteon was completely abolished by 4P-PDOT and MPG. While the combination of Ramelteon and MPG with CsA before ischemia did not confer cardioprotection, CsA administration at reperfusion successfully restored infarct size reduction.

These findings demonstrate that the cardioprotective effect of Ramelteon requires activation of the MT2 receptor. Additionally, ROS release plays an essential role in the underlying signaling cascade. Furthermore, inhibition of the mPTP during reperfusion restores Ramelteon-mediated infarct size reduction.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Ischämische Herzkrankheiten.....	2
1.1.1	Definition und Klassifikation	2
1.1.2	Epidemiologie	2
1.2	Pathophysiologische Grundlagen	3
1.2.1	Ischämie.....	4
1.2.2	Reperfusionsschaden	5
1.3	Kardioprotektion.....	7
1.3.1	Einführung.....	7
1.3.2	Strategien der Kardioprotektion	7
1.3.3	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore.....	10
1.3.4	Mitochondriale Kaliumkanäle	11
1.3.5	Melatonin	12
1.3.6	Ramelteon.....	13
1.3.7	ROS	13
1.4	Ziele der Arbeit:	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Versuchstiere	15
2.2	Chirurgisches Protokoll	15
2.3	Versuchsablauf	15
2.4	Hämodynamische Aufzeichnung	17
2.5	Studiendesign	18
2.6	Verwendete Produkte	21
2.6.1	Chemikalien und Substanzen:	21
2.6.2	Geräte	22
2.7	Auswertung.....	23
2.7.1	Infarktgrößenbestimmung mit Tetrazoliumchlorid-Färbung.....	23
2.7.2	Hämodynamik	24
2.7.3	Koronarfluss	24
2.8	Statistik	24
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Infarktgröße	26
3.2	Hämodynamik.....	28

4	Diskussion	31
4.1	Infarktgröße	31
4.2	Hämodynamik.....	34
4.3	Methodenkritik	35
4.4	Bench to Bedside.....	37
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick:	40
5	Literaturverzeichnis:	41
6	Tabellenverzeichnis.....	48
7	Abbildungsverzeichnis	49
8	Danksagung	50

1 Einleitung

Laut Statistischem Bundesamt (Destatis) sind Herz-Kreislauferkrankungen, mit 33,9%, 2023 die häufigste Todesursache in Deutschland [1]. Auch bei den Kosten, die von den deutschen Krankenkassen übernommen wurden, standen 2016 die Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems mit 13,7% (46,4 Mrd. Euro) von insgesamt 338,2 Mrd. Euro an der Spitze [2]. Laut Gößwald *et.al.* gehört die KHK mit einer Lebenszeitprävalenz von 9,3% (95% KI 8,4-10,3%) bei 40-79-jährigen Personen (n=5901), im Jahre 2013 zu den häufigsten Volkserkrankungen in Deutschland [3]. Auch weltweit zählen die kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Laut der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) sind im Jahr 2016 weltweit rund 17,9 Mrd. Menschen an einer kardiovaskulären Erkrankung verstorben [4]. Das sind in etwa 31% der gesamten Sterbefälle in diesem Jahr. Risikofaktoren sind unter anderem die arterielle Hypertonie, Adipositas oder Diabetes mellitus [5]. Die vollstationäre Hospitalisierungsrate der Männer erreichte 2017 bei den koronaren Herzerkrankungen den höchsten Wert bei den 75-80-Jährigen. Durch den demographischen Wandel, in dem sich unsere Gesellschaft gerade befindet, wird die Gruppe der Bevölkerung mit über 65 Jahren immer größer. Dadurch steigt auch die Anzahl der kardiovaskulär erkrankten Personen und mit ihnen auch der Bedarf an medizinischer, pflegerischer und finanzieller Leistung [6].

Weiterhin ist die Herzkreislauf-Erkrankung und somit die ischämische Schädigung der Kardiomyozyten die wichtigste, vermeidbare Todesursache der westlichen Welt. Umso wichtiger ist es neue Therapiestrategien zu entwickeln, um die Schädigung der Kardiomyozyten, und damit der des Herzens, durch eine Ischämie zu minimieren.

1.1 Ischämische Herzkrankheiten

1.1.1 Definition und Klassifikation

Man spricht von einer ischämischen Herzkrankheit, wenn die herzversorgenden Gefäße nicht mehr in der Lage sind den Herzmuskel mit ausreichend sauerstoff- und nährstoffreichem Blut zu versorgen. Die häufigste Ursache hierfür ist die Arteriosklerose. Diese führt zu einer Stenosierung der Arterien und somit zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot. Dieser Zustand kann von einer relativen, nur unter Belastung auftretenden Sauerstoffminderversorgung, bis zur relevanten und absoluten myokardialen Ischämie und folgender irreversibler Herzmuskelschädigung reichen. Der Akutzustand, welcher eine lebensbedrohliche Situation für die Patientinnen und Patienten darstellt, wird als akutes Koronarsyndrom (ACS) bezeichnet [7].

1.1.2 Epidemiologie

Die ischämische Herzerkrankung zählt zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland [8]. Die meisten Deutschen sterben an den Folgen einer Herzerkrankung (z.B. Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz) oder Kreislauferkrankungen (z.B. Schlaganfall, arterielle Hypertonie). Im Jahr 2017 machten Herzkrankheiten in Deutschland einen Anteil von 8,6% der gesamten vollstationären Fälle aus. Die vollständige Hospitalisierungsrate aufgrund einer ischämischen Herzerkrankung lag 2017 bei Frauen und Männern zusammen bei 782,6 pro 100.000 Einwohner. Es wurden 2017, mit 1.079,7, mehr als doppelt so viele Männer wie Frauen mit 493,2 auf 100.000 Einwohner stationär behandelt [6].

Todesursache	Anzahl Gestorbene	Anteil in %
Chronische ischämische Herzkrankheit	77.062	7,9
Akuter Myokardinfarkt (Herzinfarkt)	48.669	5,3
Bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lungen	45.776	5,0
Herzinsuffizienz	40.334	4,4
Nicht näher bezeichnete Demenz	33.710	3,7

Tabelle 1 : Tabelle modifiziert nach „Die zehn häufigsten Todesursachen -2016“ aus Herzbericht 2018 – Deutsche Herzstiftung nach Angaben des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden 2018 gezeigt sind die 5 häufigsten Todesursachen; wobei die, den Herzkrankheiten zuzuordnenden Diagnosen blau hervorgehoben sind. [6]

1.2 Pathophysiologische Grundlagen

Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es zu einer akuten Perfusionseinschränkung des Herzmuskels. Betroffen ist das Areal, welches durch die verschlossene Koronararterie versorgt wird. Das Leitsymptom ist die Angina pectoris. Der Begriff der Angina pectoris beschreibt dabei nur einen Brustschmerz oder eine Brustenge. Durch eine Flussbehinderung im koronaren Stromgebiet kommt es zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot. Aufgeteilt ist der Herzinfarkt in einen ST-Strecken-Hebungs-Infarkt (STEMI), welcher per definitionem im EKG zur Darstellung kommt und einen nicht ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI), welcher mittels EKG nicht diagnostiziert werden kann, sondern über die Erhöhung kardialer Enzyme im Blut erkannt wird [9].

1.2.1 Ischämie

Die akute Unterbrechung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im myokardialen Gewebe führt zu einer abrupten Änderung der biochemischen und metabolischen Situation. Die Abwesenheit von Sauerstoff beendet die oxidative Phosphorylierung, was zu einer Depolarisation der mitochondrialen Membran führt. Es kommt ferner zu einer ATP-Depletion, was am Ende zur Einschränkung der Kontraktionsfähigkeit des Myokardes führt [10]. Unter Sauerstoffmangel wird die Energiegewinnung in der Zelle auf die anaerobe Glykolyse umgestellt, was zu einer Anhäufung von Laktat führt und ein saures Milieu innerhalb der Zelle erzeugt. Der daraus resultierende Anstieg an Wasserstoffionen aktiviert den Natrium-Wasserstoff-Austauscher, um der Azidose entgegenzuwirken. Dabei werden Protonen aus der Zelle transportiert, während Natrium in die Zelle einströmt. Gleichzeitig beeinträchtigt der durch die Ischämie bedingte Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) die Funktion der $3\text{Na}^+ \text{-} 2\text{K}^+$ -ATPase, was die intrazelluläre Natriumkonzentration weiter erhöht. Als Reaktion darauf wird der $2\text{Na}^+ \text{-} \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher umgekehrt aktiviert: Beim Versuch, überschüssiges Natrium aus der Zelle zu entfernen, wird Kalzium im Übermaß in die Zelle transportiert. Dies führt zu einem intrazellulären Kalziumüberschuss [11]. Was ferner in der sogenannten ischämischen Kontraktur mündet. Durch die Elektrolytverschiebungen und die Veränderung des pH-Wertes kann es ohne eine zeitnahe Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zum irreversiblen Zelluntergang kommen, wobei hier zwischen akzidentiellem (ACD) und geplantem (RCD) Zelluntergang unterschieden wird [12]. ACD tritt infolge schwerer, irreversibler Zellschädigungen auf, die beispielsweise durch extreme Temperaturen, mechanische Belastung, chemische Substanzen oder osmotischen Stress verursacht werden. Dabei kommt es zum unkontrollierten Zerfall der Zellen, wodurch zelluläre Bestandteile freigesetzt werden. Diese sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) können eine Immunantwort auslösen und zur lokalen Entzündungsreaktion beitragen [13].

Im Gegensatz zum ACD ist der geplante Zelluntergang (RCD) ein gezielt regulierter Prozess, der durch spezifische Signalwege und molekulare Mechanismen gesteuert wird. Die dabei freigesetzten molekularen Substanzen können oxidativen Stress verstärken und so einen negativen Kreislauf in Gang

setzen, der die Zellschädigung weiter vorantreibt. Zu den verschiedenen Formen des geplanten/kontrollierten Zelluntergangs gehören Apoptose, Nekroptose, Pyroptose, Parthanatose, autophagischer Zelltod, Ferroptose, Cuproptose und NETose. Jede dieser Formen folgt eigenen Mechanismen des Zelluntergangs und kann unterschiedliche physiologische Reaktionen hervorrufen [13].

1.2.2 Reperfusionsschaden

Ein Teil des myokardialen Schadens entsteht nicht durch primäre Sauerstoffdeprivation bzw. das Ausbleiben einer suffizienten Nährstoffversorgung selbst, sondern erst durch die Reperfusion. Erstmals beschrieben wurde diese Beobachtung 1973 von Hearse *et. al.* [14]. Es wurde gezeigt, dass die direkte Reapplikation von Sauerstoff, vor allem in hoher Konzentration, eine Exazerbation der Freisetzung von intrazellulären Enzymen im isolierten Rattenherz hervorruft. Daraus wurde damals abgeleitet, dass die Reperfusion nach einer längeren Ischämiephase ein weiterer myokardschädigender Prozess sein muss.

Es gibt mehrere Faktoren, die in der Reperfusionsphase nach einer ischämischen Phase eine wichtige Rolle spielen. Der wichtigste davon ist der oxidative Stress [15]. Sauerstoffradikale sind in geringer Konzentration im Körper als Signalmoleküle zu finden, in höheren Konzentrationen, wie sie durch die Ischämie vorkommen, schädigen sie Proteine, Lipide und auch die DNA [16]. Während der Ischämie und Reperfusion entwickeln sich erhebliche Mengen an ROS, die zum oxidativen Stress und zur Gewebeschädigung beitragen [17]. Diese ROS werden größtenteils von der NADPH-Oxidase gebildet, die in vielen myokardialen Zellen vorkommt. Sobald es zu einer Überproduktion von ROS kommt, entsteht oxidativer Stress und es folgt eine Zellschädigung [18]. Diese Schädigung erfolgt über eine Abnahme der Membranfluidität sowie einer Erhöhung der Kalzium-Permeabilität und einer daraus resultierenden Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration. Auch kommt es zu mitochondrialem Schaden und einer Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie zum Beispiel Cytochrom C [19].

In den ersten Minuten der Reperfusion tritt ein starker Anstieg von ROS auf, hauptsächlich durch die Oxidation des während der Ischämie angesammelten Succinat [20]. Dieser Prozess führt zu einer Rückwärtsübertragung von Elektronen und zur teilweisen Reduktion von O_2 zu Hyperoxid-Anionen am Komplex I. Aktivierte NOX2/4 [21], unterbrochene oxidative Phosphorylierung [22] und entkoppelte eNOS [23] tragen ebenfalls zur ROS-Produktion während der Reperfusion bei. Die resultierenden ROS bereiten die mitochondriale Permeabilitäts-Übergangspore (mPTP) für die Öffnung vor, was zum Zelltod führt. Sowohl während der Ischämie als auch in der Reperfusion, kommt es aufgrund von Oxidation durch ROS und nitrativen Stresses zur Schädigung mehrerer Proteine, was ihre Funktion beeinträchtigt und zum Ischämie-Reperfusions-Schaden weiter beiträgt.

Des Weiteren bewirkt die schnelle Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes eine verstärkte Aktivität des Natrium-Wasserstoff-Antiporters, was zu einer weiteren intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung führt. Der Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} ist ein weiterer zentraler Mediator des I/R-Schadens, der die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Übergangsporen (mPTP) und die Aktivierung von Calpain und Caspisen induziert, was schließlich zu Zellschwellung, -ruptur und Untergang der Zelle führt [24].

1.3 Kardioprotektion

1.3.1 Einführung

Um den oben erwähnten Ischämie-Reperfusions-Schaden bei einer myokardialen Durchblutungsstörung zu minimieren, gibt es einen sehr potenten endogenen Mechanismus. Durch verschiedene Interventionen, vor (Präkonditionierung) oder nach (Postkonditionierung) dem ischämischen Ereignis, kann die Größe und das Ausmaß des irreversibel geschädigten Areals einer Ischämie beeinflusst werden. Diese Konditionierung kann durch einen ischämischen oder einen pharmakologischen Reiz erfolgen. Die ischämische Prä- und Postkonditionierung kann entweder direkt am Herzen oder an anderen Organen peripher (ischämischer Fernpräkonditionierung, *Remote ischemic preconditioning*, RIPC) erfolgen.

1.3.2 Strategien der Kardioprotektion

Durch die Alternation zwischen kurzen ischämischen Phasen und folgender Reperfusion am Organ selbst, kann eine Organprotektion vor einer länger andauernden Ischämie erreicht werden. Dieser Prozess ist als ischämische Präkonditionierung (IPC) bekannt. Durch die kurzen subletalen ischämischen Phasen und die nachfolgenden kurzen Reperfusionsen werden Signalschritte aktiviert, die im Falle einer kompletten und länger andauernden Minderperfusion protektiv wirken. Die Erstbeschreibung der IPC erfolgte 1986 durch Murry *et al.* [25]. Die Autoren zeigten, dass sie bei Hunden mit jeweils vier Zyklen von fünf Minuten Ischämie und fünf Minuten Reperfusion die Infarktgröße um 22,1% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduzieren konnten.

Die Arbeitsgruppe um Przyklenk konnte 1993 beweisen, dass im Hundemodell ein ischämischer Reiz in einem Gefäßbett des Myokards auch auf unbehandeltes myokardiales Gewebe in einem anderen Gefäßbett protektiv wirken kann [26], was den Grundstein für die Erforschung der ischämische Fern-Präkonditionierung (RIPC) legte. Ein weiterer wichtiger Meilenstein war die Entdeckung, dass der ischämische Reiz auch nicht invasiv, durch z.B. die Induktion einer kurzfristigen Ischämie mit einer Blutdruckmanschette oder einem

Tourniquet an einer Extremität erfolgen kann [27]. Es wird heute vermutet, dass RIPC über neurogene Signalwege [28], humorale Mediatoren oder Veränderungen in den zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten wirkt [29] [27].

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Methoden mit ischämisch induziertem Stimulus, wird bei der pharmakologischen Präkonditionierung durch die Applikation eines Pharmakons eine Reduktion der Infarktgröße erreicht [30]. Nicht nur über einen ischämischen, sondern auch über pharmakologische Reize, können Herzen in der Reperfusionsphase postkonditioniert werden [31, 32]. Zhao *et. al.* konnte 2003 zeigen, dass die Postkonditionierung der Präkonditionierung in ihrer Potenz vergleichbar sind [33].

Man konnte in der Vergangenheit für viele verschiedene Substanzen eine kardioprotektive Wirkung nachweisen, die zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber Ischämie-Reperfusions-Schäden führen [34]. Darunter sind Substanzen wie beispielsweise volatile Anästhetika, wie Isofluran [35], Desfluran [36] und Sevofluran [36] aber auch Medikamente wie Milrinon [37], Ramelteon [38], Melatonin [39] und Opioide [40]. Trotz der vielen verschiedenen angewandten Protokolle der Prä- und Postkonditionierung, der unterschiedlichen Endpunkte und der mannigfaltigen Methoden zum Nachweis der an der Signalkaskade beteiligten Mediatoren, sind die kompletten Signalkaskaden bisher nicht vollständig nachvollziehbar. Als Trigger wurden bisher Moleküle wie zum Beispiel Adenosin, Bradykinin oder Opioide identifiziert. Diese Trigger aktivieren Rezeptoren der Zellmembranen der Muskelzellen. Diese Aktivierung führt wiederum zu einer intrazellulären Kaskade an Enzymaktivierungen, wie Proteinkinasen [34], welche wiederum auf die Effektoren wie z.B. Mitochondrien und ihren Kanäle (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, etc.) wirken, was schlussendlich die geschädigte Zelle vor dem Untergang bewahren kann [41].

Es sind bisher drei mögliche Signalwege identifiziert. Der Erste kann durch zwei Effektoren ausgelöst werden. Einerseits über einen Rezeptor für ein natriureisches Peptid und andererseits über eine g-Protein-gekoppelte Rezeptorschleife. In beiden Fällen kommt es zu einer Aktivierung des zyklischen

Guanosinmonophosphats (cGMP) und der Proteinkinase G. Dieser Weg mündet in der Beeinflussung der Mitochondrien der Herzmuskelzellen.

Ein weiterer möglicher Start eines Signalweges läuft ebenfalls über einen g-Protein-gekoppelten Rezeptor an der Zelloberfläche der Herzmuskelzelle oder alternativ über einen Wachstums-Faktor-Rezeptor. Beide Möglichkeiten führen schlussendlich zu einer Modulation der mitochondrialen Funktion über den Phosphoinositid-3-Kinase/Serin/Threonin-Kinase-Signalweg (PI3K/Akt).

Der letzte Pfad ist bekannt als *der survival-activating-factor-enhancement-pathway* (SAFE). Er funktioniert über den Effektor Tumor-Nekrosefaktor-alpha beziehungsweise über den gp130/Janus-Kinase-Rezeptor und die konsekutive Aktivierung des *signal-transducer-and-activator-of-transcription 3* (STAT3). Die Aktivierung von STAT3 führt zur Transkription von wichtigen Proteinen, wie zum Beispiel der Cyclooxygenase, der intrazellulären Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) oder von anderen Enzymen, im Zellkern oder im Mitochondrium [42].

Für diese Arbeit in besonderen Maßen relevant erscheint die Endstrecke des oben zuerst genannten Signalweges. Hier sind die Reaktiven Sauerstoffspezies hervorzuheben. ROS spielen eine ambivalente Rolle im Kontext konditionierender Phänomene: Während eine übermäßige ROS-Bildung zu irreversiblen Gewebeschäden beiträgt, können geringe Mengen an ROS, beispielsweise als Reaktion auf die Aktivierung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle oder die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP), protektive Effekte vermitteln. Dieser Schutzmechanismus könnte möglicherweise durch die Oxidation zytosolischer, protektiver Kinasen erfolgen [43]. Melatonin wirkt über den Melatonin-Rezeptor auf cGMP und die Proteinkinase G (PKG), wodurch es zu einer Reduktion von oxidativem Stress und Apoptose von Kardiomyozyten kommt [44]. Einen zentralen Anteil an der mitochondrialen Endstrecke der Signalkaskade der Kardioprotektion übernimmt auch die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird. Sie ist insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion ausschlaggebend. Die oben erwähnten ROS sind bei der Beeinflussung der Pore ebenfalls signifikant wichtig [45]. Über die Beeinflussung von Cyclophilin D vermittelt Cyclosporin A eine Inhibition der mPTP [46, 47], was die Öffnung der mPTP beeinflusst und somit zu einer Reduktion des

ischämischen Schadens im Rattenmodell geführt hat [48]. Auch konnte in einer kleinen klinischen Studie von Piot *et. al.* 2008 ein positiver Effekt von Cyclosporin A auf die Infarktgröße beim Menschen nach Reperfusion bei akutem Herzinfarkt gezeigt werden [49].

1.3.3 Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore

Die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), wie sie im Abschnitt 1.3.2 bereits erwähnt wurde, ist eine unspezifische Pore der inneren und äußeren mitochondrialen Membran, bei der man davon ausgeht, dass sie aus drei Hauptbestandteilen besteht. Zum einen, aus einem spannungsabhängigen Anionen-Kanal in der äußeren mitochondrialen Membran. Zum anderen, aus der ATP/ADP-Translokase an der inneren Membran; sowie auch aus Cyclophilin-D in der Mitochondrien-Matrix [50].

Beim Ischämie-Reperfusions-Schaden ist der initiale Moment [51] ausschlaggebend, da in der ersten Phase der Reperfusion die mPTP als unspezifischer Kanal, durch eine Überladung des Mitochondriums mit Kalzium, geöffnet wird und Moleküle mit einer Größe von bis zu 1,5 kDa passieren können. Dadurch kommt es zu einer Schwellung des Mitochondriums und zu einem Abfall des Membranpotentials, welches für die ATP-Produktion essenziell ist [52]. In der initialen Phase ist die Öffnung der mPTP kardioprotektiv [53]. Kommt es jedoch zu einer andauernden Öffnung der Pore, schwollt das Mitochondrium so an, dass es zur Ruptur der äußeren mitochondrialen Matrix kommt und das dadurch freigesetzte Cytochrom C führt wiederum zur Aktivierung von Kaspasen, was schlussendlich im Zelluntergang endet [54].

Eine gewaltige Ausschüttung von freien Radikalen spielt eine wichtige Rolle in der postischämischen Phase. Die mPTP kann durch diese geöffnet werden was zu einer weiteren Bildung von ROS führen kann [55].

Die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP) gilt als ein zentraler Faktor in der Pathogenese des Reperfusionsschadens und stellt daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die ischämische und pharmakologische Kardioprotektion dar. [54].

1.3.4 Mitochondriale Kaliumkanäle

1.3.4.1 mK_{Ca}

Der mitochondriale Kalzium-abhängige-Kaliumkanal (mK_{Ca}) scheint neben dem mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanal (mK_{ATP}) ebenfalls eine Rolle bei der Kardioprotektion zu spielen [56]. Der mK_{Ca} -Kanal sitzt an der inneren Membran der Mitochondrien und macht einen großen Teil der Kalium-Uniporter-Aktivität der Mitochondrien aus [57]. Dieser Kalium-Influx ist notwendig, um die optimale Funktion der oxidativen Phosphorylierung und somit die ATP-Produktion zu gewährleisten [58]. Es ist auch möglich, dass dieser Einstrom von Kalium andere Funktionen der Mitochondrien, wie die Produktion von Reaktiver Sauerstoffspezies, beeinflusst [57].

Die mK_{Ca} -Kanäle sind in drei Untergruppen aufgeteilt: große, intermediäre und kleine Kanäle. Jeder dieser Kanäle hat eine bestimmte Aufgabe im Rahmen der physiologischen oder pathologischen kardialen Funktion [56]. So führt die Aktivierung von großen mK_{Ca} -Kanälen zu einer Vasodilatation und zu einer Protektion gegen ischämische Reize. Die intermediären mK_{Ca} -Kanäle sind beteiligt an der Proliferation der vaskulären glatten Muskulatur, an der Gefäßdilatation sowie an der Entwicklung der kardialen Fibrose. Die Aktivierung der kleinen mK_{Ca} -Kanäle trägt zu einer Membran-Hyperpolarisation bei [56].

1.3.4.2 mK_{ATP}

Der mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanal (mK_{ATP}) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des zellulären Metabolismus, indem er die Kaliumaufnahme in das Mitochondrium steuert. Durch seine Aktivität vermittelt er den metabolischen Zustand der Zelle und überführt ihn in eine entsprechende physiologische Reaktion [59]. Die Aktivierung von mK_{ATP} verbessert die ATP-Produktion [60] und verringert die Kalzium-Akkumulation während der Ischämie [61], welche zur Öffnung der mPTP führt und den Reperfusionsschaden begünstigt.

Der Kanal besteht aus zwei Teilen. Zum einen aus dem porenbildenden Teil (MITOK) und zum anderen aus dem ATP-bindenden Teil (MITOSUR). Eine

Überexpression von MITOK führt zu einem Anschwellen der Zellorganellen. Eine Minderexpression von MITOK wiederum endet in Instabilität des mitochondrialen Membranpotenzials, sowie einer Weitung des intercristalen Raumes und einer Minderung der oxidativen Phosphorylierung [62].

Es sind Inhibitoren des Kanals bekannt, wie z.B. Sulphonylurease und 5-Hydroxydecanoat, sowie öffnende Agens wie z.B. Diazoxid. So wurde beschrieben, dass durch die Anwendung von Diazoxid und die sukzessive Öffnung des Kanals ein gewisser Schutz vor ischämischem Reperfusionsschaden erreicht werden kann [63]. Ein Verlust von MITOK hebt die durch Diazoxid hervorgerufene Kardioprotektion auf [62].

Zusammen führen der mK_{ATP}- und der mK_{Ca}-Kanal durch eine Öffnung zum Influx von Kalium und zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials. Hierdurch wird der Einstrom von Kalzium und die Menge der Reaktiven Sauerstoffspezies im Mitochondrium verringert [64], was im weiteren Verlauf zu einer kardioprotektiven Wirkung führt.

1.3.5 Melatonin

Melatonin ist ein Hormon der Epiphyse und reguliert im menschlichen Körper die zirkadiane Rhythmisik [65]. Es wurde 1958 erstmals isoliert [66] und wirkt auf die G-Protein gekoppelten Melatonin-Rezeptoren MT1 und MT2, die vor allem im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus hoch exprimiert sind [65]. Auch sind MT1-Rezeptoren im kardiovaskulären System (peripherie Blutgefäße, Aorta und Herz), im Immunsystem, sowie in vielen anderen Organen des menschlichen Körpers exprimiert. MT2 ist ebenfalls im Immunsystem, dem Gehirn, in der Retina, sowie in anderen Organen zu finden [67]. Melatonin wirkt nicht nur durch Bindung an die oben beschriebenen Melatonin-Rezeptoren. Es dient zum Beispiel als Radikalfänger für Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies [67] [39]. Zusätzlich zur antioxidativen Wirkung, kann Melatonin auch zytoprotektive Mechanismen aktivieren [68]. Die Melatonin-vermittelten kardioprotektiven Eigenschaften konnten bereits bewiesen werden und es wurde gezeigt, dass Melatonin die Infarktgrößen im Rattenmodell verringern und hämodynamische

Parameter nach Infarkten, verglichen mit unbehandelten Kontrollen, verbessern kann [69].

1.3.6 Ramelteon

Ramelteon ist ein selektiver Melatonin-Rezeptor-Agonist [70] und wird bei Schlafstörungen und bei Unregelmäßigkeiten der zirkadianen Rhythmik eingesetzt [71]. Es ist eine stärkere Affinität zu MT-1 als zu MT-2 beschrieben. Eine Interaktion mit MT-3 und anderen Rezeptoren ist von vernachlässigbarem Ausmaß [72]. Die kardioprotektive Wirkung konnte durch Stroethoff *et. al.* im Rattenmodell bereits bewiesen werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die niedrigste Konzentration, die einen kardioprotektiven Effekt erzielt, bei $0,03\mu\text{M}$ liegt. Die Applikation einer höheren Konzentration zeigte keinen stärkeren protektiven Effekt und niedrigere Konzentrationen keinen Effekt [38]. Verglichen mit Melatonin hat Ramelteon selbst keine antioxidativen Eigenschaften [73]. Die kardioprotektive Wirkung wird somit über die Aktivierung des Melatonin-Rezeptors vermittelt.

1.3.7 ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind stark reaktionsfreudige Moleküle, die Sauerstoff enthalten. Diese entstehen bei zusätzlicher Elektronen-Aufnahme an Sauerstoff. Als Beispiele für ROS gelten Hyperoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikale (HO^{\cdot}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ozon (O_3) [74]. Diese Moleküle können zu Schäden an Proteinen und Membran-Lipiden führen. ROS entstehen in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung und werden physiologisch vom Körper zur Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Parasiten verwendet. Im Organismus sind einige Mechanismen bekannt, die Sauerstoffradikale unschädlich machen können. Beispielsweise Enzyme, wie die Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase oder die Katalase sowie Moleküle wie Glutathion, Ascorbinsäure, Tocopherol oder Flavonoide.

Die ROS werden in vielen Zusammenhängen mit dem Ischämie/Reperfusions-Schaden gesehen. Diese Behauptung wird von den Tatsachen unterstützt, dass Interventionen oder Mutationen, die einen Abbau der Reaktiven

Sauerstoffspezies begünstigen, vor einem I/R-Schaden schützen können [75, 76]. Zusätzlich kann eine artifizielle Generierung von ROS in gesunden Geweben die Schäden, welche durch eine Reperfusion verursacht werden, reproduzieren [77]. Des Weiteren kann in postischämischen Geweben eine erhöhte Konzentration von ROS nachgewiesen werden [78].

Als Quellen der ROS kommen mehrere enzymatische Prozesse im Organismus in Frage, wie zum Beispiel die Xanthin-Oxidase [79], die NADPH-Oxidase [80], die entkoppelte NO-Synthase [81] oder die Mitochondrien selbst [82] [83].

1.4 Ziele der Arbeit:

Der Melatonin-Rezeptor-Agonist Ramelteon hat eine höhere Affinität zu MT1- als MT2-Rezeptoren [70] und induziert eine Kardioprotektion, durch die Beteiligung von mitochondrialen Kalium-Kanälen [38]. Ramelteon besitzt im Gegensatz zu Melatonin selbst keine antioxidativen Eigenschaften. Die Aktivierung der mitochondrialen Kalium-Kanäle führt zur Freisetzung von freien Radikalen [84]. In dieser Arbeit soll daher untersucht werden ob 1.) eine Ramelteon-induzierte Kardioprotektion spezifisch über den Melatonin-2-Rezeptor (MT2) vermittelt wird und 2.) ob freie Radikale in der Ramelteon-induzierten-Kardioprotektion eine entscheidende Rolle spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die *in vitro* Versuche waren durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Projektnummer: O27/12 vom 10.05.2012).

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche, zwei bis drei Monate alte Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350 Gramm verwendet.

2.2 Chirurgisches Protokoll

Die Ratten wurden mit 90mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht durch eine intraperitoneale Injektion anästhesiert. Zusätzlich wurden 1000 I.E. unfraktioniertes Heparin (UFH) injiziert. Die suffizient anästhesierten Ratten wurden mittels Guillotine tierschutzgerecht dekapitiert. Das Herz wurde nach kompletter Thorakotomie aus dem Brustkorb der Ratte entnommen und direkt in 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Die Zeit von Dekapitation bis zur Perfusion an der Langendorff-Anlage wurde auf 3 Minuten begrenzt. Innerhalb von fünf Minuten ab dem Zeitpunkt der Dekapitation wurde das linke Herzohr identifiziert und entfernt, um einen Druckabnahme-Ballon über die Mitralklappe hinweg im linken Ventrikel zu platzieren.

2.3 Versuchsablauf

Die Herzen wurden an einer druckkonstanten Langendorff-Anlage (Abbildung 1) bei einem Druck von 80 mmHg mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Die Perfusion der Herzen erfolgte über die Kanülierung der Aorta ascendens. Bei geschlossener Aortenklappe erfolgte eine physiologische Perfusion der Koronararterien. Der Abfluss des Perfusates erfolgte über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof und weiter in den rechten Ventrikel wonach der Auswurf über die Pulmonalarterien als Koronarfluss erfolgte. Der nach Heinen *et al.* [85]

modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,38 – 7,43) wurde mit 95% Sauerstoff (O_2) und 5% Kohlendioxid (CO_2) begast und enthält (in mM) 118 NaCl (MW 58,44), 4,7 KCl (MW 74,55), 1,2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (MW 246,48), 1,2 KH_2PO_4 (MW 136,09), 25 $NaHCO_3$ (MW 84,01), EDTA (MW 292,2), 2,25 $CaCl_2$ (MW 110,99), 11 Glukose (MW 180,16) und 1 Laktat (MW 112,1). Die verwendete Konzentration an Glukose ist höher als die physiologische Konzentration *in vivo*. Diese wurde so gewählt, um eine ausreichende insulin-unabhängige Glukose-Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten [86]. Um die konstante Qualität des Puffers zu gewährleisten, wurde vor Beginn des Versuches eine Blutgasanalyse gemacht. Der Puffer wurde in einem Wasserbad mit einem Heizelement erhitzt und durch eine Rollerpumpe in die Anlage gepumpt. Um zu gewährleisten, dass der Puffer eine konstante Temperatur von 37°C beim Durchfließen des Herzens hatte, wurde ein Aufbau aus doppelwandigen Glaselementen verwendet. Dieser Wärmemantel wurde genutzt um ein konstantes, warmes Milieu, um das Herz zu schaffen und somit eine Auskühlung so gut wie möglich zu verhindern.

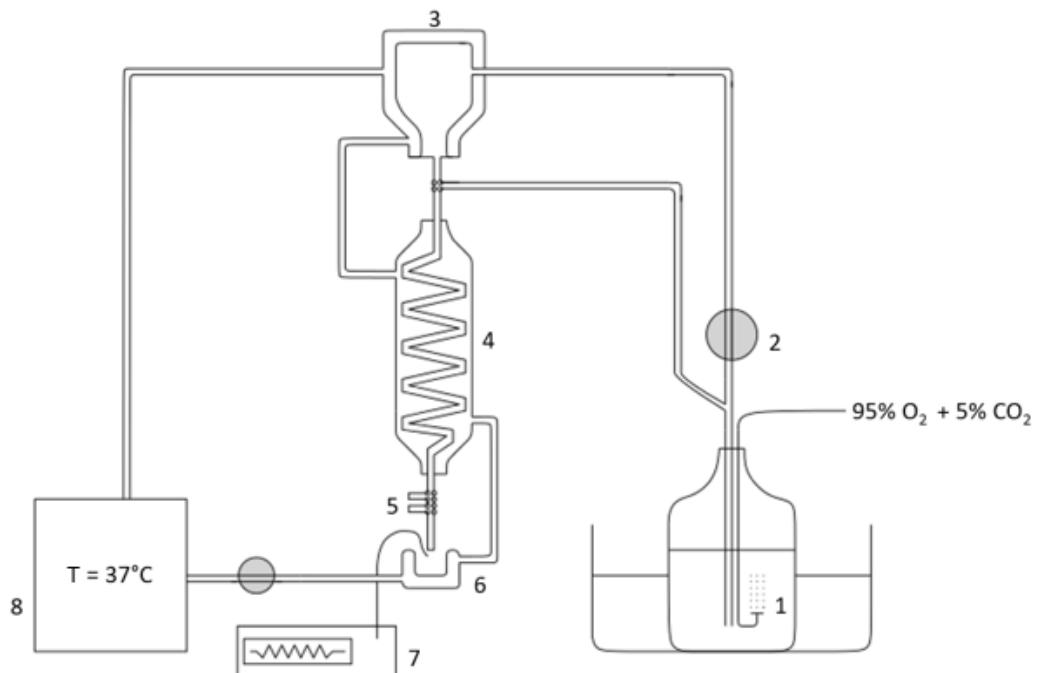


Abbildung 1 **Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus nach Langendorff.** 1) mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) begaster und im Wasserbad erwärmter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP); 2) Rollerpumpe; 3) Luftfalle; 4) Wärmetauscherspirale; 5) Drei-Wege-Hähne für Zugabe von Substanzen mittels Perfusoren; 6) Wärmemantel; 7) Transducer, der über $NaCl$ -gefüllten Ballon im linken Ventrikel des Herzen den Druck (LVP) ableitet; 8) Wärmepumpe, die den Wärmemantel (6), die Wärmetauscherspirale (4) und die Luftfalle (3) mit 37°C warmem Wasser umspült um ein Auskühlen des Puffers zu verhindern.

Zur Applikation von Substanzen wurden Spritzenpumpen verwendet. Die Perfusor-Leitungen mündeten in Dreiwege-Hähnen direkt vor der Kanüle, an der das Herz aufgehängen war. Die Substanz wurde mit einer Laufrate gegeben, die 1% des *Baseline*-Koronarflusses entsprach. Es wurde der für den MT-2-Rezeptor relativ selektiven Melatonin-Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT verwendet. Er ist 300-fach selektiver für den Melatonin-2-Rezeptor als für Melatonin-1-Rezeptor. Durch diesen Selektivitätseigenschaften kann eruiert werden, inwieweit eine Beteiligung des MT2 an der Ramelteon-induzierten-Kardioprotektion notwendig ist.

Wurde ein Inhibitor (zum Beispiel 4P-PDOT) zusammen mit einer aktivierenden Substanz (zum Beispiel Ramelteon) gegeben, so wurde der Perfusor mit dem Inhibitor eine Minute eher gestartet, um zu gewährleisten, dass keine vorhergehende Präkonditionierung durch den Agonisten hervorgerufen wurde.

Zur Induktion der globalen Ischämie wurde der Fluss zum gesamten Herzen unterbrochen. Zusätzlich wurde das Herz in ein Pufferbad eingetaucht, welches zuvor und während der Ischämie mit Stickstoffmonoxid (NO) begast wurde. Durch Wiederherstellung der Versorgung des Herzens mit oxygeniertem Puffer, erfolgte die Reperfusion.

Zum Ende des Versuchs wurde die Dokumentation der hämodynamischen Parameter beendet und der Ballon aus dem linken Ventrikel entfernt. Das Herz wurde von der Kanüle abgenommen. Darauffolgend wurde das Herznassgewicht bestimmt. Anschließend wurde das Herz bei -20°C eingefroren.

2.4 Hämodynamische Aufzeichnung

Während des gesamten Versuches befand sich im linken Ventrikel ein mit Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl 0,9%) gefüllter Ballon, der den linksventrikulären Druck gemessen hat und diesen über *PowerLab 4/26* von *ADInstruments* (Oxford; UK) und einen Verstärker (*Bridge Amp* von *ADInstruments*, Oxford; UK) an *LabChart Pro 8 Version 8.0.02.09.2013* von *ADInstruments* weitergab. Eine konstante Ableitung des linksventrikulären Drucks (LVP) ist wichtig, um den enddiastolischen Druck auf 4 – 8 mmHg einzustellen. Aus dem LVP konnten die

hämodynamischen Parameter wie Herzfrequenz und endsystolischer Druck konstant ermittelt werden.

Zu den Ausschlusskriterien zählte ein linksventrikulärer, systolischer Druck kleiner 80mmHg sowie eine Herzfrequenz geringer als 250 Schläge pro Minute.

2.5 Studiendesign

Die Studie bestand aus zwei Teilen mit jeweils 4 Gruppen (n=6, Abbildung 2 und Abbildung 3). Die Herzen aller Gruppen durchliefen eine 20 minütige Eingewöhnungsphase und 33 Minuten globaler Ischämie gefolgt von 60 Minuten Reperfusion.

In den Kontrollgruppen (**Con**) wurde das Herz nach der Eingewöhnungsphase (20 Minuten) über 10 Minuten mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) perfundiert. Es erfolgte die Induktion der 33 minütigen globalen Ischämie und die 60 minütige Reperfusionsphase.

Im ersten Teil der Versuchsreihe sollte die Beteiligung des MT2-Rezeptors an der Ramelteon induzierten Kardioprotektion untersucht werden. Hierfür wurde in der ersten Gruppe 0,03 μ M Ramelteon (**Ram**) für 10 Minuten vor Induktion der globalen Ischämie appliziert. Eine weitere Interventionsgruppe wurde mit 1 μ M 4-Phenyl-2-propionamidotetralin (**4P-P-DOT**) vor Induktion der Ischämie behandelt. In der letzten Gruppe wurde Ramelteon und 4-P-PDOT (**Ram + 4P-PDOT**) gleichzeitig verabreicht. Wurde nur eine Substanz verabreicht, so lief ein zweiter Perfusor mit äquivalenter Flussrate mit Krebs-Henseleit-Puffer nebenher.

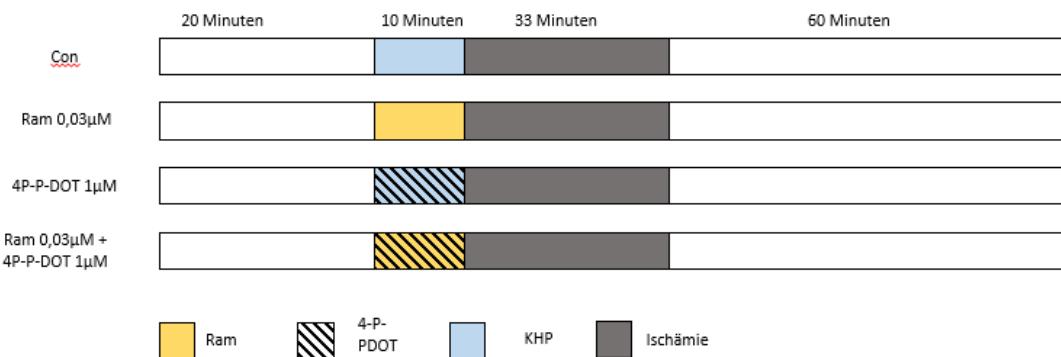


Abbildung 2 Studiendesign der Versuchsgruppen Teil 1. Jede Gruppe durchlief eine Eingewöhnungsphase von 20 Minuten, eine Ischämie-Phase von 33 Minuten und eine 60-minütige Reperfusion. Die Substanz- oder KHP-Applikation für 10 Minuten direkt vor der Ischämie. Ram = 0,03µM Ramelteon, 4P-P-DOT = 1µM 4-Phenyl-2-propionamidotetralin, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer

Der zweite Teil der Studie bestand ebenfalls aus 4 Gruppen (n=6). Hierbei war das Ziel, die Rolle der freien Sauerstoffradikale an der Ramelteon vermittelten Kardioprotektion zu untersuchen. Wie bereits im ersten Teil, gab es auch eine Gruppe, in der 0,03µM Ramelteon (**Ram**) alleine verabreicht wurde. Daneben wurde in einer weiteren Gruppe 0,03 µM Ramelteon und der ROS-Scavanger N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (MPG) (1 mM) (**Ram + MPG**) appliziert, wobei der Perfusion mit MPG eine Minute vor dem mit Ramelteon gestartet wurde. In einer weiteren Gruppe wurden wieder Ramelteon und MPG gemeinsam verabreicht, zusätzlich wurde noch der mPTP-Inhibitor CSA (0,2µM) (**Ram + MPG + CsA**) verabreicht.

Cyclosporin A ist eine immunsuppressiv wirkende Substanz, die zu den Calcineurin-Inhibitoren gezählt wird [87].

In diversen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Cyclosporin A sowohl *in vitro* [88] als auch *in vivo* [49, 89, 90] kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Dieser Effekt wird durch die Inhibition der mPTP und einen dadurch behinderten mitochondrialen Kalzium Efflux vermittelt [91]. Durch diesen Effekt kommt es zu einer geringeren Rate des Zelltodes, wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben.

Bereits im Jahr 1995 beschrieben Griffiths *et. al.*, dass die mPTP erst mit Beginn der Reperfusion ihr kardioprotektives Potenzial entfalten kann und somit auch eine Behandlung mit Cyclosporin A zur Infarktgrößenreduktion erst mit der

Beendigung der Ischämie Sinn ergibt [92]. Darauf folgten einige Studien, welche die Signifikanz dieses Effektes weiter festigen konnten [93-96].

N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (MPG) ist eine antioxidativ wirkende Substanz. Sie wird zur Behandlung von Schwermetallvergiftungen eingesetzt und ist ein Chelatbildner [97].

Die antioxidativen Eigenschaften wurden durch Raupach *et. al.* [37] erfolgreich im Rattenmodell gezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass MPG, wenn man es vor einem regionalen Ischämieriz einsetzt, zu einer Aufhebung, der durch ischämische Präkonditionierung ausgelösten Infarktgrößenreduktion, führt [98].

Cyclosporin A hat, wie oben beschrieben bewiesen, dass es eigenständig in der Lage ist eine signifikante kardioprotektive Wirkung zu induzieren [99]. Um eine Interaktion zwischen Ramelteon und CsA auszuschließen wurde bei der 9. Gruppe, zusätzlich zu der Gabe von Ramelteon und MPG vor der Ischämie, Cyclosporin A für 10 Minuten mit Beginn der Reperfusion appliziert.

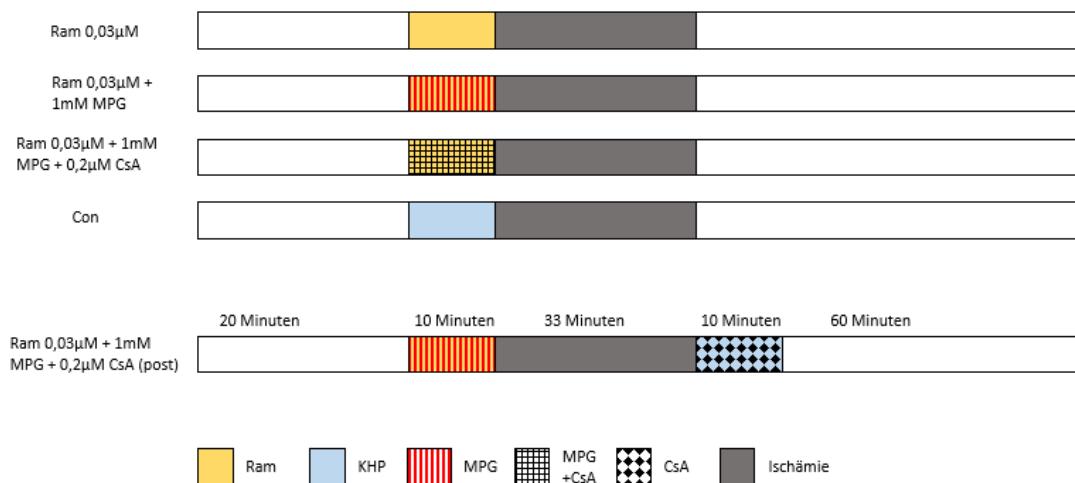


Abbildung 3: Studiendesign der Versuchsgruppen Teil 2. Jede Gruppe durchlief eine Eingewöhnungsphase von 20 Minuten, eine Ischämie-Phase von 33 Minuten und eine 60-minütige Reperfusion. Die Substanz- oder KHP-Applikation für 10 Minuten direkt vor oder nach der Ischämie. Ram = 0,03μM Ramelteon, KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, MPG = 1mM N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin, CsA = 0,2μM Cyclosporin A

2.6 Verwendete Produkte

2.6.1 Chemikalien und Substanzen:

Name und Produktnummern	Summenformel	Hersteller	MW in g/mol
Natrium-Laktat – EG: 10040100	C ₃ H ₅ NaO ₃	PanReac Quimica SLU (Barcelona, Spanien)	112,06
4-P-PDOT (4-Phenyl-2-propionamidotetralin) – CAS: 134865-74-0	C ₁₉ H ₂₁ NO	Sigma Aldrich (Steinheim)	279,38
Carbogen (5% Kohlenstoffdioxid – EG: 204-696-9; 95% Sauerstoff – EG: 231-956-9)		LINDE AG (München)	
Cyclosporin A – CAS: 59865-13-3	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	Sigma Aldrich (Steinheim)	1202,61
D-Glukose (wasserfrei) – EG: 2000751	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	180,16
Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) – EG: 102079947	(CH ₃) ₂ SO	Sigma Aldrich (Steinheim)	78,13
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) – EG: 2004494	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	292,25
Formaldehyd – EG: 1040022500	CH ₂ O	Merck KGaA (Darmstadt)	
Kaliumchlorid – EG: 1049360500	KCl	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	74,56
Kaliumdihydrogenphosphat – EG: 1.04873.1000	KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	136,09
Kalziumchlorid – EG: 1.02378.0500	CaCl ₂	Merck KGaA (Darmstadt)	110,98
Magnesiumsulfat-Heptahydrat – EG: 2312982	MgSO ₄ + 7H ₂ O	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	246,48
N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (MPG) – CAS: 1953-02-2	C ₅ H ₉ NO ₃ S	Sigma Aldrich (Steinheim)	163,19

NaCl 0,9% - PZN: 00809090	NaCl	B. Braun (Melsungen, Deutschland)	
Natriumchlorid – EG: 231-598-3	NaCl	VWR International bvba (Leuven, Belgien)	58,44
Natriumhydrogencarbonat – EG: 2056338	NaHCO ₃	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	84,01
Pentobarbital 16g/100ml – (Narcoren) – PZN: 11336163		Merial GmbH, Hallbergmoos	
Ramelteon 1,0mg/ml Acetonitril – CAS: 196597-26-9; CAS: 75-05-8	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	Sigma Aldrich (Steinheim)	259.34
Stickstoff – EG: 2317839		LINDE AG (München)	
Triphenyltetrazoliumchlorid – EG: 2060716	C ₁₉ H ₁₅ CIN ₄	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)	334,79
TRIS Pufferan – EG: 2010644	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe)	121,14

Tabelle 2 Tabellarische Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Namen, Summenformel, Hersteller und Sitz des Herstellers sowie Molekulargewicht.

2.6.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
Waage	Kern 440-45N, Balingen, Deutschland	Rattengewicht
Feinwaage	Sartorius LA230S, Göttingen, Deutschland	Herstellung Puffer
Waage	OHaus Scout Pro SPU 202, Parsippany, NJ USA	Koronarfluss- Bestimmung
Blutgasanalyse-Gerät	Radiometer ABL 800 Flex, Brønshøj, Denmark	Überprüfung Puffer
Heizelement für Wasserbad	Julabo EC, Seelbach; Deutschland	Erwärmung Puffer
Rollerpumpe	Minipuls 3 Gilson Middleton, WI, USA	Beförderung Puffer

Umwälzthermostat	MW 6 Julabo Seelbach; Deutschland	Beheizung Glaselemente
Perfusor	Braun Perfusor Space (Melsungen; Deutschland)	Applikation Substanzen
pH-Meter	Knick Digital pH-Meter 646, Berlin Deutschland	Einstellung pH von TTC-Lösung
Wärmebad	Klees GFL Hannover, Deutschland	Färbung der Herzscheiben
Scanner	Canon Scan Lide 700F, Ōta, Japan	Scannen der Herzscheiben

Tabelle 3: Tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte mit Namen, Art, Hersteller und kurzer Beschreibung des Verwendungszwecks

2.7 Auswertung

2.7.1 Infarktgrößenbestimmung mit Tetrazoliumchlorid-Färbung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurde eine Tetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die eingefrorenen Herzen, im noch gefrorenen Zustand, in 8 gleich dicke Scheiben geschnitten und für 15 Minuten in einer auf 37°C erhitzten, 0,75%igen TTC -Lösung (0,75g Tetrazoliumchlorid und 1,41g Sigma 7-9 Puffer gelöst in 100ml 0,9%ige NaCl) inkubiert. Die TTC-Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,42 eingestellt. TTC wird in stoffwechselaktiven, vitalen Zellen zu einem ziegelroten Formazanfarbstoff reduziert. In avitalen Zellen hingegen fehlen die notwendigen Reduktionsäquivalente, weshalb diese ungefärbt bleiben. Folglich erscheint das infarzierte Gewebe bei der TTC-Färbung farblos [100]. Die Herzscheiben wurden einzeln in eine 24-Loch-Platte platziert und jeweils mit 1ml TTC-Lösung bedeckt. Anschließend wurden die Platten in ein Wasserbad gelegt und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Herzscheiben aus der Lösung genommen und in eine frische 24 Well-Platte überführt und für 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert. Die fixierten Herzscheiben wurden mittels eines Scanners mit 1200 dpi eingescannt. Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte mittels Planimetrie mit Hilfe des Programms Sigma Scan Pro Version 5.0. Es wurden hierfür von einem unabhängigen und verblindeten Untersucher die Fläche des linken Ventrikels und

dessen Infarktareal bestimmt. Der prozentuale Anteil des Infarkts am gesamten Anteil des linken Ventrikels stellte den primären Endpunkt dar.

2.7.2 Hämodynamik

Aus den Aufzeichnungen des linksventrikulären Drucks während des Versuches wurden der minimale und maximale linksventrikuläre Druck, die Druckamplitude und die Herzfrequenz abgeleitet. Zusätzlich wurden die Höhe und der Zeitpunkt des sog. Ischämie-Peaks (ischämische Kontraktur) bestimmt.

Abkürzung	BL	PC	Isch	Rep15	Rep30	Rep 45	Rep60
Zeitpunkt im Versuch (min)	15	29	63	78	92	108	123

Tabelle 4: **Auflistung der Zeitpunkte zu denen eine hämodynamische Auswertung vorgenommen wurde.** BL = baseline; PC = Präkonditionierung; Isch32 = Minute 32 der Ischämie; Rep = Reperfusion

2.7.3 Koronarfluss

Der Koronarfluss wurde in einem Becherglas aufgefangen und auf einer Waage auf zwei Nachkommastellen bestimmt.

2.8 Statistik

Die analysierten Daten werden in dieser Arbeit durchgehend als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mithilfe der Software *GraphPad StatMate* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Auswertung von Teil 1 und Teil 2 der Studie erfolgte jeweils separat. Die anteilige Infarktgröße, bestimmt mittels Planimetrie, wurde einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA) unterzogen, gefolgt von einem Tukey-Post-hoc-Test zur paarweisen Analyse signifikanter Unterschiede.

Die hämodynamischen Parameter wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten innerhalb der Gruppen ebenfalls einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Zur Untersuchung von Gruppeneffekten wurde ein Tukey-Post-hoc-Test verwendet,

während Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten mithilfe eines Dunnett-Post-hoc-Tests analysiert wurden.

Unterschiede zwischen Gruppen oder Zeitpunkten wurden als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert $< 0,05$ war.

Vor Beginn der Experimente wurde eine Power-Analyse durchgeführt, um die erforderliche Gruppengröße für die Detektion eines mittleren Unterschieds von 25 % in der Infarktgröße zu bestimmen. Diese Analyse ergab eine erforderliche Gruppengröße von 6–7 Tieren pro Gruppe (Power: 80 %, $\alpha = 0,05$, zweiseitiger Test).

3 Ergebnisse

3.1 Infarktgröße

In dieser Untersuchung wurde die planimetrisch bestimmte Infarktgröße des linken Ventrikels analysiert. Im ersten Abschnitt der Studie zeigte die Kontrollgruppe (Con) eine durchschnittliche Infarktgröße von 53 ± 13 % (Abbildung 4). Die Behandlung mit Ramelteon (Ram) in einer Konzentration von $0,03 \mu\text{M}$ führte zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße auf 34 ± 7 % ($P = 0,0082$ im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Die kardioprotektive Wirkung von Ramelteon wurde durch den MT2-Rezeptor-Antagonisten 4P-PDOT aufgehoben, sodass die Infarktgröße in der Kombination 4P-PDOT + Ram wieder auf 53 ± 8 % anstieg ($P = 0,0074$ vs. Ram). Dabei zeigte 4P-PDOT alleine keine signifikante Veränderung der Infarktgröße (55 ± 7 %; $P = 0,9821$ vs. Con).

Ein spezifischer Antagonist für den Melatonin-1-Rezeptor (MT1) ist derzeit nicht verfügbar. Allerdings konnte in einer früheren Arbeit von Stroethoff *et al.* [38] nachgewiesen werden, dass der unspezifische Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol ebenfalls die kardioprotektiven Effekte von Ramelteon aufhebt.

Im zweiten Teil der Versuchsreihe konnte Ramelteon die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe erneut signifikant reduzieren (Con: 53 ± 8 %; Ram: 29 ± 7 %; $P < 0,0001$ vs. Con, Abbildung 5). Diese kardioprotektive Wirkung wurde jedoch vollständig durch den Radikalfänger MPG aufgehoben (MPG + Ram: 48 ± 5 %; $P = 0,0004$ vs. Ram). Dies deutet darauf hin, dass ROS eine zentrale Rolle im Signalweg der Ramelteon-abhängigen Kardioprotektion spielen.

Die Kombination von MPG und Ramelteon mit dem mPTP-Inhibitor Cyclosporin A, appliziert als präventives Agens vor der Induktion einer 33-minütigen

Ischämie, zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Infarktgrößenreduktion (MPG + Ram + CsApre: $47 \pm 9\%$; $P = 0,5328$ vs. Con).

Angesichts der in der Literatur beschriebenen Interaktion zwischen Cyclosporin A und Ramelteon [101] wurde eine zusätzliche Untersuchungsgruppe gebildet, in der Cyclosporin A erst bei der Reperfusion nach der Ischämie verabreicht wurde. In dieser Konstellation trug Cyclosporin A signifikant zur Reduktion der Infarktgröße bei (MPG + Ram + CsApost: $34 \pm 5\%$; $P = 0,0161$ vs. MPG + Ram).

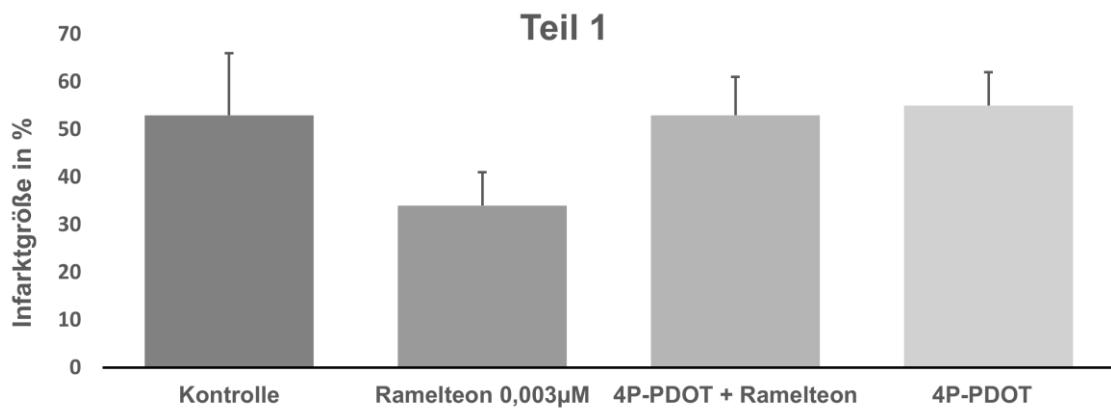


Abbildung 4 **Infarktgrößen Teil 1 als Säulendiagramm mit Standardabweichung:** Gezeigt sind die Gruppen Kontrolle (Con), Ramelteon 0,003µM (Ram), 4P-PDOT + Ramelteon und 4P-PDOT

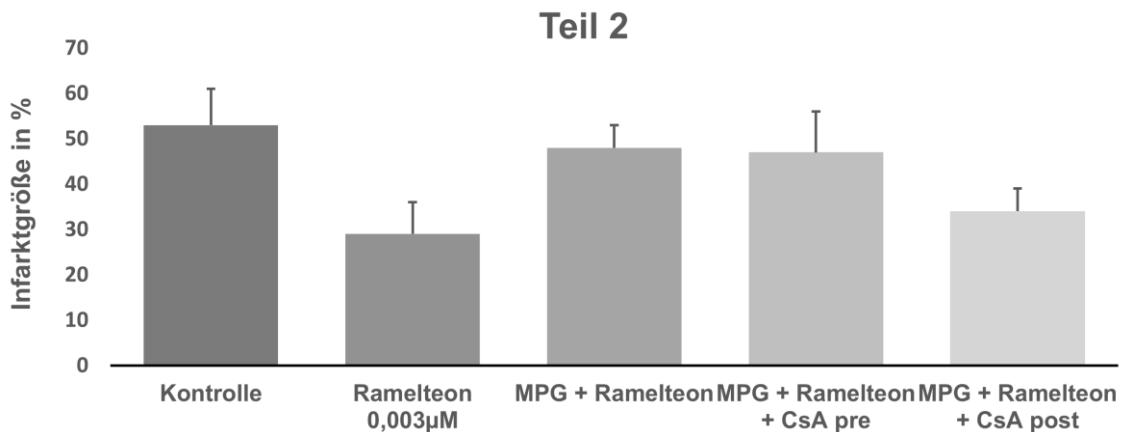


Abbildung 5 **Infarktgrößen Teil 2 als Säulendiagramm mit Standardabweichung:** Gezeigt sind die Gruppen Kontrolle (Con), Ramelteon 0,003µM (Ram), MPG+Ramelteon, MPG+Ramelteon+CyclosporinA prekonditioniert und MPG+Ramelteon+CyclosporinA postkonditioniert.

3.2 *Hämodynamik*

Ausgewertet wurden die Herzfrequenz der linksventrikuläre Druck (LVP) in mmHG sowie der Koronarfluss in ml/min. Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigen die oben beschriebenen hämodynamischen Variablen der beiden Versuchsteile zu bestimmten Zeitpunkten im Versuchsablauf.

In Teil 1 gab es keine signifikante Beeinflussung der Herzfrequenzen durch die Applikation der Substanzen in den verschiedenen Gruppen. (Tabelle 5). Der erzeugte linksventrikuläre Druck (LVP) und Koronarfluss (ml/min) waren in allen Gruppen im Vergleich zum Wert in der Eingewöhnungsphase (Baseline) signifikant niedriger. (Tabelle 5). Dies war in allen Versuchsgruppen gleich.

In Teil 2 der Versuchsreihe war die Herzfrequenz am Ende der Reperfusionsphase in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Eingewöhnungsphase (Baseline) (Tabelle 6). Während der Reperfusionsphase waren der linksventrikuläre Druck (LVP), sowie der Koronarfluss (ml/min) verringert. (alle $P < 0.05$ vs. Baseline, Tabelle 6). Die MPG + Ramelteon und die MPG + Ramelteon + Cyclosporin A post zeigten signifikante Unterschiede vor der Ischämie im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. (Tabelle 6)

Hämodynamische Parameter Teil 1				
	Baseline	Präkonditionierung	Reperfusi on 30	Reperfusio n 60
Herzfrequen z (Schläge/mi n)				
Kontrolle	341 ± 51	333 ± 50	281 ± 54	255 ± 75
Ramelteon	311 ± 32	304 ± 28	257 ± 44	251 ± 33
4P-PDOT + Ram	296 ± 39	276 ± 10	213 ± 55	247 ± 32
4P-PDOT	301 ± 32	270 ± 22	211 ± 71	220 ± 44
Phasischer LVP (mmHg)				
Kontrolle	134 ± 7	146 ± 6	24 ± 13 *	30 ± 11 *
Ramelteon	130 ± 19	136 ± 18	18 ± 12 *	29 ± 15 *
4P-PDOT + Ram	146 ± 23	153 ± 24	23 ± 10 *	30 ± 10 *
4P-PDOT	134 ± 21	148 ± 19	35 ± 18 *	40 ± 11 *
Koronarflus s (ml/min)				
Kontrolle	15 ± 3	15 ± 4	8 ± 2 *	7 ± 2 *
Ramelteon	15 ± 2	15 ± 2	7 ± 1 *	6 ± 1 *
4P-PDOT + Ram	15 ± 3	13 ± 3	6 ± 1 *	5 ± 1 *
4P-PDOT	14 ± 3	14 ± 3	7 ± 2 *	6 ± 2 *

*Tabelle 5 Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Parameter Teil 1 Messungen zu 4 Zeitpunkten: Baseline, Präkonditionierung, Reperfusion 30 und Reperfusion 60, Ram = Ramelteon; 4P-PDOT = 4-Phenyl-2-propionamidotetralin; LVP = Links-Ventrikulärer-Druck; * = P < 0,05 vs. Baseline die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung*

Hämodynamische Parameter Teil 2				
	Baseline	Präkonditionierung	Reperfusion 30	Reperfusion 60
Herzfrequenz (Schläge/min)				
Kontrolle	291 ± 27	278 ± 18	205 ± 56	181 ± 55 *
Ramelteon	287 ± 30	266 ± 32	239 ± 46	216 ± 34
MPG + Ram	299 ± 32	301 ± 59	229 ± 74	236 ± 34
MPG + Ram + CsA pre	296 ± 26	278 ± 24	227 ± 57	216 ± 34
MPG + Ram + CsA post	273 ± 20	248 ± 26	224 ± 53	181 ± 25
LVP (mmHg)				
Kontrolle	112 ± 24	108 ± 30	15 ± 8 *	28 ± 9 *
Ramelteon	119 ± 33	113 ± 38	13 ± 4 *	19 ± 5 *
MPG + Ram	139 ± 18 #	137 ± 14 #	10 ± 5 *	17 ± 7 *
MPG + Ram + CsA pre	120 ± 18	121 ± 26	17 ± 8 *	20 ± 12 *
MPG + Ram + CsA post	143 ± 13 #	137 ± 8 #	20 ± 19 *	27 ± 14 *
Koronarflusss (ml/min)				
Kontrolle	13 ± 2	12 ± 2	6 ± 2 *	5 ± 2 *
Ramelteon	14 ± 2	13 ± 3	6 ± 2 *	5 ± 2 *
MPG + Ram	16 ± 3	18 ± 2 #	7 ± 2 *	6 ± 2 *
MPG + Ram + CsA pre	15 ± 2	15 ± 3	6 ± 1 *	5 ± 1 *
MPG + Ram + CsA post	13 ± 2	14 ± 2	5 ± 1 *	4 ± 1 *

Tabelle 6 Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Parameter Teil 2 Messungen zu 4 Zeitpunkten: Baseline, Präkonditionierung, Reperfusion 30 und Reperfusion 60, Ram = Ramelteon; 4P-PDOT = 4-Phenyl-2-propionamidotetralin; MPG = N-2-mercaptopropionylglycin; CsA = Cyclosporin A; pre = vor Ischämie, post = nach Ischämie; LVP = Links-Ventrikulärer-Druck; * = P < 0,05 vs Baseline; # = P < 0,05 vs Kontrolle die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die kardioprotektive Wirkung des Melatonin-Rezeptor-Agonisten Ramelteon eine Aktivierung des MT2-Rezeptors voraussetzt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Freisetzung Reaktiver Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade der durch Ramelteon induzierten Kardioprotektion spielt.

4.1 Infarktgröße

Dass Melatonin vor I/R-Schäden schützen kann ist beschrieben [102] und durch Stroethoff et. al konnte diese kardioprotektive Wirkung auch bei Ramelteon nachgewiesen werden [38]. Gleichzeitig bewies die Arbeitsgruppe die Vermittlung dieses Effektes über den Melatonin-Rezeptor durch die Anwendung des selektiven Melatonin-Rezeptor-Antagonist Luzindol, welcher den kardioprotektiven Effekt von Ramelteon aufheben konnte [38].

Ramelteon hat eine 8-mal höhere Affinität zum Melatonin-1-Rezeptor (MT1), als zum Melatonin-2-Rezeptor (MT2) [70]. Die kardioprotektive Wirkung von Ramelteon suggeriert somit eine gewisse Signifikanz des MT1-Rezeptors. In dieser Arbeit konnte jedoch durch die Anwendung des selektiven Melatonin-2-Rezeptor-Antagonist 4P-PDOT die Infarktgrößenreduktion von Ramelteon komplett aufgehoben werden. Dies deutet auf eine unabdingbare Beteiligung des Melatonin-2-Rezeptors an der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion hin. Im Jahr 2020 konnte durch Legros et. al. gezeigt werden, dass 4P-PDOT zwar eine höhere Affinität zum Melatonin-2-Rezeptor hat aber auch eine partielle agonistische Aktivität am Melatonin-1-Rezeptor (MT1) aufweist [103]. Somit kann man im Versuchsaufbau dieser Arbeit zwar eine mögliche, geringe Affinität von 4P-PDOT zum MT1 nicht ausschließen, jedoch ist die antagonistische Affinität zum Melatonin-2-Rezeptor ausschlaggebend, sodass wir weiterhin von einer Aufhebung des kardioprotektiven Effektes durch die Blockade vom MT2 ausgehen. Des Weiteren ist in der alleinigen Anwendung von 4P-PDOT kein kardioprotektiver Effekt aufgetreten. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine

selektiveren MT1-Rezeptor-Antagonist und auch keinen alternativen MT2-Antagonisten.

Basierend auf der bereits erwähnten höheren Affinität zum Melatonin-1-Rezeptor (MT1) von Ramelteon und der zuvor durch Stroethoff *et al.* [38] gezeigten kompletten Blockade der Infarktgrößenreduktion durch den nichtselektiven Melatonin-Rezeptor-Antagonisten Luzindol kann angenommen werden, dass der kardioprotektive Effekt von Ramelteon auf die Beteiligung beider Melatonin-Rezeptoren (MT1 und MT2) angewiesen ist.

Die Aktivierung von mitochondrialen Kalium-Kanälen wie zum Beispiel dem mitochondrialen ATP-sensitiven-Kalium-Kanal (mK_{ATP}) oder dem mitochondrialen Kalzium-Sensitiven-Kalium-Kanal (mK_{Ca}), spielen bei der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion eine entscheidende Rolle. Eine Beteiligung dieser beiden oben genannten mitochondrialen Kalium-Kanäle konnten ebenfalls von Stroethoff *et al.* gezeigt werden [38]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen die Öffnung der mPTP hemmen. Dies scheint ein wichtiger Bestandteil im Mechanismus der Kardioprotektion zu sein [104]. Dieser Effekt wird höchstwahrscheinlich durch die Regulation von ROS-Konzentrationen im Mitochondrium beeinflusst [105, 106]. Es ist bekannt, dass die Infarktgrößenreduktion, welche durch die Aktivierung von mK_{Ca} -Kanälen induziert wird, auf der Aktivierung der Reaktiven Sauerstoffspezies beruht, die während der Kanal-Öffnung generiert werden [105]. In einer Arbeit konnte von Heinen *et. al.* bereits 2007 gezeigt werden, dass eine pharmakologische Aktivierung des mK_{Ca} -Kanals zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration führt [84]. Das wiederum lässt darauf schließen, dass eine geringe Erhöhung in der mitochondrialen ROS-Produktion das Potenzial hat ein Trigger-Signal zu sein, um in der frühen Reperfusionsphase einen ROS-Ausbruch zu verhindern [107]. Das heißt, dass ROS einerseits Stimulus für die Kardioprotektion sind, aber andererseits in höherer Konzentration einen wichtigen Teil des I/R-Schadens auslösen. Die hier gewonnenen Daten unterstützen diese These. Nachdem die Applikation des Radikalfängers MPG als präkonditionierendes Agens zu einer Auflösung des Ramelteon-induzierten kardioprotektiven Effekts führte, kann man mutmaßen, dass Sauerstoffradikale als Trigger-Signal für die Kardioprotektion über den mK_{Ca} -Kanal führen.

Die genaue Rolle von ROS bleibt weiterhin unklar. Es sollten zur Klärung weitere Untersuchungen angestrebt werden, wie beispielsweise eine mögliche Quantifizierung der ROS.

Auch der genaue Mechanismus, der für die Regulation des mK_{Ca}-Kanals durch Ramelteon verantwortlich ist, bleibt bis dato unklar. Bisher konnte von der Arbeitsgruppe um Huhn *et al.* gezeigt werden, dass zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) und die Proteinkinase A (PKA) eine dem mK_{Ca}-Kanal vorgesetzte Rolle in der Signalkaskade spielen [108]. Auch ist bekannt, dass die Phospholipase C und Guanylatzyklase durch den MT2-Rezeptor reguliert werden [109, 110]. In weiteren zukünftigen Untersuchungen sollte die Beteiligung dieser *upstream* Ziele untersucht werden.

Die Öffnung der mPTP ist mit einem Zelluntergang und somit der Größe des Infarktes assoziiert [54]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht die kardioprotektiven Eigenschaften bei der gleichzeitigen Applikation von Ramelteon und MPG durch Cyclosporin A (CsA) wiederherzustellen. Cyclosporin A ist dafür bekannt die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) zu inhibieren, beziehungsweise eine Öffnung zu vermeiden [91] und somit kardioprotektiv zu wirken. Über diesen Weg sollte die durch den Radikalfänger MPG verursachte Inhibition der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion wiederherzustellen sein. Eine kombinierte Applikation von MPG, Ramelteon und Cyclosporin A vor der induzierten Ischämie konnte die kardioprotektive Eigenschaft von Ramelteon nicht wiederherstellen. Dies lässt sich eventuell durch eine beschriebene Interaktion zwischen Ramelteon und Cyclosporin A erklären [101], oder dadurch, dass die mPTP ihre Wirkung erst zu Beginn der Reperfusion ausübt, und somit eine Inhibition dieser vor der Induktion der Ischämie wenig Effekt aufweist [92]. Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Gruppe eingeführt, welche sich durch die Präkonditionierung mit MPG und Ramelteon, sowie durch die Postkonditionierung mit Cyclosporin A auszeichnete. Diese Applikation von CsA zu Beginn der Reperfusion führte zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße im Sinne einer potenten Kardioprotektion. Es ist also davon auszugehen, dass die Öffnung der mPTP in der frühen Reperfusionsphase ein wichtiger Effektor in der Infarktgröße und somit für den I/R-Schaden ist.

Man kann davon ausgehen, dass Ramelteon durch die Melatonin-Rezeptoren über die Aktivierung von mitochondrialen Kalium-Kanälen zur Freisetzung von ROS führt. Darauffolgend kommt es zu einer Inhibition der mPTP und folglich zu der kardioprotektiven Wirkung von Ramelteon. (Abbildung 6).

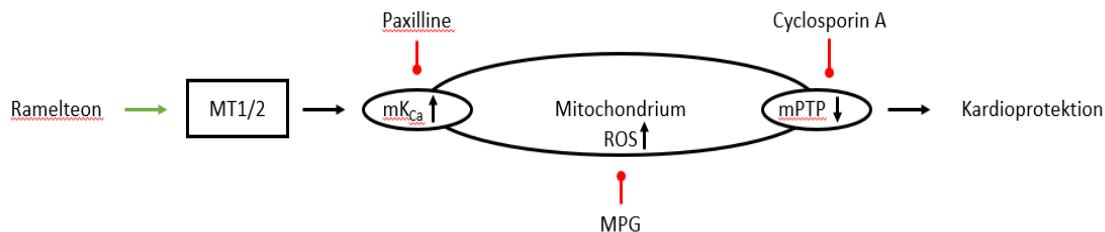


Abbildung 6 Mögliche Signalkaskade der Ramelteon induzierten Kardioprotektion gegen myokardiale-Ischämie-Reperfusions-Schaden in Ratten. MT = Melatonin Rezeptor; mK_{Ca}-Kanal =, mitochondrial large-conductance Ca²⁺-sensitive potassium (mK_{Ca}) channel; Paxilline = mK_{Ca}-channel Inhibitor; ROS = radical oxygen species; MPG = N-2-mercaptopropionylglycine, ROS Scavenger; mPTP = mitochondrial permeability transition pore, Cyclosporine A = mPTP inhibitor

4.2 Hämodynamik

Wenn die applizierten Substanzen auch zu einer Verringerung der Infarktgröße führten, wäre auch zu erwarten gewesen, dass sie zu einer Verbesserung der Hämodynamik während der Reperfusionsphase beitragen könnten. Es zeigte sich in der Versuchsreihe jedoch ein im Vergleich zur Eingewöhnungsphase deutlich verringelter linksventrikulärer Druck sowie eine signifikant niedrigere Herzfrequenz, welche sich zwischen der Kontrollgruppe (Con) und den Interventions-Gruppen nicht signifikant unterschied. Nichtsdestotrotz scheint die Infarktgröße aktuell der sensitivste Parameter zur Quantifizierung der Kardioprotektion im Modell des isolierten Herzens zu sein [111]. Der genaue Grund für die Beeinträchtigung der Hämodynamik ist unklar. Ein „myokardiales Stunning“ wird insbesondere nach globaler Ischämie oft als Ursache hierfür diskutiert [112]. Nach einer Phase der Ischämie mit konsekutiver Reperfusion kann es zu einer transienten Dysfunktion des Myokards kommen. Dies wird als myokardiales *stunning* beschrieben [113]. Ist die Länge und Intensität des ischämischen Reizes nicht ausreichend, um eine Zerstörung von Gewebe zu verursachen, kommt es nach der Reperfusion nicht direkt zu einer Restitution der myokardialen Funktion. Es bleibt erstmal eine temporäre Dysfunktion des Herzmuskelgewebes zurück, welche sich in Arrhythmien und/oder Einschränkungen der Pumpfunktion zeigen kann [113].

4.3 Methodenkritik

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche, zwei bis drei Monate alte Wistar Ratten mit einem Gewicht von 250 – 350 g genutzt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Ratten voll ausgewachsen und geschlechtsreif [114]. Es wurden nur männliche Ratten verwendet, da es Evidenz gibt, dass Östrogene kardioprotektive Eigenschaften aufweisen [115-117]. Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede aufzudecken, sollten weitere Untersuchungen auch mit weiblichen Ratten durchgeführt werden [118].

Die Tiere wurden mit intraperitonealer Pentobarbital Injektion betäubt. Es gibt keine Evidenz, dass dieses als Anästhetikum verwendete Barbiturat selbst kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Einzig ein Einfluss auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären, systolischen Druck (LVSP) sowie die Rate um die der LVSP maximal zunehmen konnte ist beschrieben [119]. Dennoch hat sich das Anästhetikum in vielen Jahren als sicheres und probates Mittel bei Langendorff-Versuchen etabliert und wird aktuell auch empfohlen, da es keine besseren Alternativen gibt [120]. Insbesondere Volatile Anästhetika und Propofol scheinen selbst einen Einfluss auf die Infarktgröße zu haben [121] weshalb diese als Alternative ausscheiden.

Zusätzlich zum Pentobarbital wurden 1000 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht verabreicht [114]. Obwohl es Daten gibt, die einen durch Heparin vermittelten kardioprotektiven Effekt suggerieren [122], wurde zur Verhinderung der Thrombogenese während der Betäubung dennoch UFH verwendet. Da der eben genannte kardioprotektive Effekt sich in den Studien erst nach zwei Stunden zeigt, ist die maximal fünfminütige Einwirkzeit zu vernachlässigen.

Um das Herz vor dem Auskühlen zu schützen, wurde die Zeit zwischen Entnahme und Perfusion an der Langendorff-Anlage auf drei Minuten begrenzt. Hypothermie ist ein Faktor, der zur Kardioprotektion beitragen kann und somit muss ein 37°C warmes Milieu um das Herz aufrechterhalten werden [123]. Die Temperatur wurde regelmäßig bei aus der Versuchsreihe ausgeschiedenen Herzen überprüft und war stets bei 37°C. Da insbesondere auch während der Ischämie, und somit bei Versiegen der Perfusion, eine Auskühlung verhindert werden sollte und um eine vollständige Hypoxie und Ischämie zu erreichen, wurden die Herzen während dieser Phase in konstant mit Stickstoff-versetztem, 37°C warmem Puffer gebadet [114].

Um ein konstantes Ergebnis zu erhalten, wurde die Langendorff-Anlage jeden Tag nach der Benutzung mit kochendem Wasser gespült. Des Weiteren wurden verdreckte oder poröse Schlauchstücke regelmäßig ersetzt [114].

Das Modell des retrograd, *in vitro* perfundierten Herzens wird häufig und schon sehr lange erfolgreich angewandt, nichtsdestotrotz muss man die Anwendung kritisch sehen. Es fehlt die Perfusion mit Blut sowie mit anderen Metaboliten und Hormonen, weil die zur Perfusion verwendete Elektrolyt-Lösung als Blut-Ersatz zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion und der Vitalität nicht über humorale oder zelluläre Bestandteile verfügt. Zum Einsatz kommt Krebs-Henseleit-Puffer – ein den physiologischen Eigenschaften des Rattenblutes nachempfundenes Gemisch aus diversen Elektrolyten und Glukose sowie Laktat. Eine Perfusion mit Blut wäre theoretisch möglich, dafür würden aber ein oder mehrere Spendertiere benötigt und der Versuchsaufbau wäre wesentlich komplizierter und würde die Verwendung von einer Form von Antikoagulation verlangen [124]. Das Fehlen von humoralen und zellulären Faktoren im Krebs-Henseleit-Puffer sollte nicht nur als Nachteil, sondern eventuell auch als Vorteil gesehen werden. So kann im Versuchsaufbau genau kontrolliert werden welches Agens einen Effekt auf den Endpunkt der Infarktgröße hat.

Es wurden Cyclosporin A und MPG in dieser Arbeit nicht allein untersucht, da es aussagekräftige Ergebnisse in der Literatur gibt. MPG zeigte in einer Studie, dass es keinen alleinigen Effekt auf die Infarktgröße als Endpunkt besitzt [37]. Eine Infarktgrößenreduktion im Rattenmodell durch Cyclosporin ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [99].

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit eine komplette Unterbrechung der kardialen Perfusion verwendet, um einen ischämischen Reiz zu setzen. Dies ist nicht lückenlos auf den menschlichen Körper oder ein physiologisches System zu übertragen, da es dort auch den Zustand einer relativen Sauerstoffunterversorgung gibt, in welchem es eine Restperfusion des betroffenen Gewebes gibt.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das Herz während der Perfusion im Langendorff-Apparat weniger Arbeit leistet, da die Nachlast vollständig wegfällt. Diese Tatsache könnte mit dem deutlich komplexeren „*Working Heart Modell*“ umgangen werden. In diesem Versuchsaufbau würden die Herzen mit dem

Puffer in antegrade Richtung durchspült und es käme zu einem Output des Herzens in die Aorta, worüber die Koronargefäße perfundiert werden würden [125]. Dieses Modell eignet sich jedoch eher für die Bewertung der ventrikulären Pumpfunktion, der Bestimmung von metabolischen Prozessen oder Bewertung von myokardialer Antwort auf Ischämie/Reperfusions-Schäden [126]. Da in dieser Arbeit der primäre Endpunkt die linksventrikuläre Infarktgröße war, ist der zusätzliche Aufwand nicht notwendig.

Während des Versuchs arbeitet das Herz in einem Energiedefizit. Ein Großteil der benötigten Glukose wird aus myokardialen Glykogenspeichern zur Verfügung gestellt, da eine Insulin-abhängige Glukose-Aufnahme entfällt. Dadurch kommt es durch die reduzierte oxidative Phosphorylierung zu einem ebenfalls reduzierten Angebot von Adenosintriphosphat (ATP) [127]. Diese Tatsache wird etwas abgemildert, da die Herzen mit einer überphysiologischen Glukosekonzentration versorgt werden. Eine zusätzliche Gabe von Insulin wäre möglich [127], jedoch sollte berücksichtigt werden, dass Insulin selbst eine kardioprotektive Wirkung hat [128].

Die Energiegewinnung aus Fett durch Lipolyse von endogenen Triglyceriden und Beta-Oxidation ist im normalen Ratten-Herz gering und kann somit am ehesten vernachlässigt werden [127].

Die Einschlusskriterien der Rattenherzen beinhalteten unter anderem eine minimale Herzfrequenz von 250 Schlägen pro Minute nach der Eingewöhnungsphase von 15 Minuten. Wurde diese Frequenz nicht erreicht, wurden die Herzen aus den Versuchen ausgeschlossen. Auf ein externes *Pacing* wurde verzichtet, obwohl es bei der Erholung in der Reperfusion behilflich sein kann [129]. Dennoch beeinflusst dieser Effekt die Infarktgröße wenig bis gar nicht [114].

4.4 Bench to Bedside

Es gab schon mehrere Versuche, diese kardioprotektiven Methoden von der Theorie in die Praxis zu übersetzen. In der ERICCA-Studie, versuchten Hausenloy *et. al.* 2016 bei Patientinnen und Patienten, die eine Bypass Operation erhielten, durch Fern-Präkonditionierung das klinische Outcome zu verbessern. In der RIPHeart-Studie wurden Patientinnen und Patienten mit einer RIPC vor

einem elektiven kardiochirurgischen Eingriff behandelt. In beiden Studien konnte kein Vorteil von RIPC gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden [130] [131]. 2019 wurde von Hausenloy *et. al.* im Rahmen einer multizentrischen, einfach verblinden, randomisierten Kontroll-Studie die Auswirkung von RIPC vor primärer perkutaner Koronarintervention bei vermutetem ST-Hebungs-Infarkt untersucht. Es konnten die primären Endpunkte des kardiovaskulären Todes, der Hospitalisierungsrate und der Herzinsuffizienz 12 Monate nach dem Herzinfarkt nicht signifikant reduziert werden [132]. Somit zeigte sich nicht nur bei kardiochirurgischen Eingriffen, sondern auch bei kardiologischen, minimalinvasiven Eingriffen an wachen Patientinnen und Patienten bisher keine Möglichkeit die ischämische Fernpräkonditionierung einzusetzen. Bisher gibt es auch pharmakologisch keine großen randomisierten, kontrollierten Studien, welche eine kardioprotektive Wirkung in der klinischen Anwendung zeigen konnten.

Die Beteiligung der mPTP am kardioprotektiven Prozess ist *in-vitro* gut erforscht, doch bestehen im klinischen Versuch noch einige Unklarheiten. Piot *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass die Applikation von Cyclosporin A vor PCI die Kreatin-Kinase (CK) Freisetzung um 40% senken kann [49] und eine Reduktion der Infarktgröße um bis zu 20% verursacht [90]. Die CIRCUS-Studie versuchte, die vielversprechenden Ergebnisse von Piot *et al.* zu belegen und konnte keinen positiven Effekt durch Cyclosporin A in den Endpunkten Tod, Hospitalisierungsrate durch Herzinsuffizienz und myokardialen Umbau zeigen [133]. Dieses Ergebnis kann eventuell durch den Unterschied zwischen der CIRCUS-Studie und den Untersuchungen von Piot *et al.* erklärt werden, dass bei Piot *et al.* die Patientinnen und Patienten mit einem Symptombeginn <4 Stunden vor Reperfusion eingeschlossen wurden und in der CIRCUS-Studie der Symptombeginn bis zu 12 Stunden vor Intervention liegen durfte. Ob nach bis zu 12 h der Ischämie noch eine Wirkung von Cyclosporin A bei der Reperfusion auf das geschädigte Gewebe zu erwarten ist bleibt offen bzw. zu diskutieren, genauso wie der genaue Zeitpunkt der Applikation des CsA.

Ein Problem ist, dass es bisher noch keine erprobten Regime gibt, die für die klinischen Versuchsreihe geeignet sind [134]. Des Weiteren beschreiben Hausenloy *et. al.* in einem Positionspapier 2013, dass insbesondere das

fehlerhafte Studiendesign zu einer Einschränkung der Translation in den Versuch am Menschen führt [135].

Im Rahmen einer klinischen Anwendung von Ramelteon zur Kardioprotektion, sollte die in dieser Arbeit aufgezeigte, Ramelteon beeinflussende Wirkung von Cyclosporin A berücksichtigt werden. Zudem sind weitere Zustände bekannt, die die Wirkung von kardioprotektiven Substanzen beeinflussen, wie zum Beispiel Hyperglykämie bei eventuell vorliegendem Diabetes mellitus [136], Alter [137], oder anderen Medikamenten [138]. Die negative Beeinflussung durch Hyperglykämie auf die kardioprotektive Wirkung von Sevofluran, kann durch die Gabe von Cyclosporin A in der frühen Phase der Reperfusion nach Ischämie wiederhergestellt werden [139]. Diese Tatsache sollte in einer etwaigen klinischen Studie bedacht werden, auch und vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass der Diabetes mellitus bzw. die Hyperglykämie einen großen Teil der Bevölkerung betrifft.

Ramelteon, obwohl in der EU nicht durch die European Medicines Agency (EMA) zugelassen, ist ein u.a. in den USA zugelassenes Medikament zur Behandlung von Einschlaf- und Durchschlafstörungen sowie Störungen der zirkadianen Rhythmik [140], welches außer des Melatonin-Rezeptors, keine anderen Wirkpunkte anspricht [70]. Eine Zulassung durch die EMA in Europa erfolgte nicht, da der Nachweis der Wirksamkeit für zu wenig signifikant gegenüber dem Placebo-Medikament gehalten wurde und als Endpunkt lediglich die Zeit bis zum Einschlafen untersucht wurde [141].

Um die kardioprotektiven Eigenschaften von Ramelteon vor einer etwaigen klinischen Anwendung besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig, vor allem in Hinsicht auf beeinflussende Faktoren wie Vorerkrankungen und medikamentöse Interaktionen. Zusätzlich besäße Ramelteon mit seiner kardioprotektiven Potenz ein erweitertes, mögliches klinisches Einsatzgebiet.

4.5 *Schlussfolgerung und Ausblick:*

Die Daten zeigen, dass die kardioprotektive Wirkung von Ramelteon auf die Aktivierung des MT2-Rezeptors angewiesen ist. Zudem spielt die Freisetzung Reaktiver Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle in der durch Ramelteon induzierten Kardioprotektion. Die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) während der Reperfusion führt zur Reduktion der Infarktgröße. ROS scheinen in der Signalkaskade bei der Ramelteon-induzierten Kardioprotektion eine wichtige Rolle zu spielen. Offen bleibt zum aktuellen Zeitpunkt zum Beispiel wie hoch die benötigten ROS-Konzentration zur Triggerung der mPTP-vermittelten Kardioprotektion ist. Hier sollten zukünftig weitere Untersuchungen erfolgen.

5 Literaturverzeichnis:

1. Destatis, *Pressemitteilung Nr. 317 vom 30. September 2024*. 2024.
2. (Destatis), S.-B., *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten* Pressemitteilung vom 29. September 2017 – 347/17 2017.
3. Gosswald, A., et al., *[Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 650-5.
4. World-Health-Organization. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Top 10 global causes of deaths, 2016 2018 [cited 2019 24.01.2019]; Available from: www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.
5. Destatis. *Körpermaße nach Altergruppen und Geschlecht 2017*. 2019 [cited 2019 19.09.2019]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Gesundheitszustand-Relevantes-Verhalten/Tabellen/liste-koerpermasse.html>.
6. Deutsche Herzstiftung, D.G.K., Deutschen Gesellschaft Pädiatrische Kardiologie, Deutschen Gesellschaft Thorax- Herz- Gefäßchirurgie, *30. Deutscher Herzbericht 2018*.
7. Herold, G.e.a., *INNERE MEDIZIN 2018*. Unter Berücksichtigung des Gegenstandkatalogs für die Ärztliche Prüfung. Mit ICD-10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. 2018.
8. (Hrsg), R.K.-I., *Koronare Herzkrankheit. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012*. 2014.
9. e.V., D.G.f.K.-H.u.K., (2018) *ESC Pocket Guidelines*. 2018.
10. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
11. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(5): p. 747-53.
12. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
13. Zhu, L., et al., *Regulated cell death in acute myocardial infarction: Molecular mechanisms and therapeutic implications*. Ageing Research Reviews, 2025. **104**: p. 102629.
14. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
15. He, J., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review)*. Exp Ther Med, 2022. **23**(6): p. 430.
16. González-Montero, J., et al., *Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities*. World J Cardiol, 2018. **10**(9): p. 74-86.
17. Xiao, Y., et al., *The Redox Modulating Sonlicromanol Active Metabolite KH176m and the Antioxidant MPG Protect Against Short-Duration Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury*. Cardiovasc Drugs Ther, 2021. **35**(4): p. 745-758.
18. Li, H., et al., *Mechanism and Therapies of Oxidative Stress-Mediated Cell Death in Ischemia Reperfusion Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 2910643.
19. Brookes, P.S., et al., *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(4): p. C817-33.
20. Chouchani, E.T., et al., *Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 431-435.
21. Matsushima, S. and J. Sadoshima, *Yin and Yang of NADPH Oxidases in Myocardial Ischemia-Reperfusion*. Antioxidants, 2022. **11**(6): p. 1069.

22. Liepinsh, E., et al., *Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria*. Biochemical Journal, 2016. **473**(9): p. 1191-1202.
23. Raedschelders, K., D.M. Ansley, and D.D. Chen, *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. Pharmacol Ther, 2012. **133**(2): p. 230-55.
24. Wang, Q., et al., *Pharmacological Cardioprotection against Ischemia Reperfusion Injury—The Search for a Clinical Effective Therapy*. Cells, 2023. **12**(10): p. 1432.
25. 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.
26. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
27. Pickard, J.M.J., et al., *Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop*. Basic research in cardiology, 2015. **110**(1): p. 453-453.
28. Lim, S.Y., D.M. Yellon, and D.J. Hausenloy, *The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(5): p. 651-5.
29. Heusch, G., et al., *Remote Ischemic Conditioning*. Journal of the American College of Cardiology, 2015. **65**(2): p. 177-195.
30. Caricati-Neto, A., P.R. Errante, and F.S. Menezes-Rodrigues, *Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(16).
31. Stroethoff, M., et al., *Activation of Melatonin Receptors by Ramelteon Induces Cardioprotection by Postconditioning in the Rat Heart*. Anesth Analg, 2018. **126**(6): p. 2112-2115.
32. Wu, N., et al., *Blocking the mitochondrial permeability transition pore with cyclosporine-A can restore cardioprotection of ischemic postconditioning in hypercholesterolemic rat heart*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(3): p. 446-54.
33. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
34. Jovanović, A., *Cardioprotective signalling: Past, present and future*. Eur J Pharmacol, 2018. **833**: p. 314-319.
35. Müllenheim, J., et al., *Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals*. Anesthesiology, 2002. **96**(4): p. 934-40.
36. De Hert, S.G., et al., *Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients*. Anesthesiology, 2003. **99**(2): p. 314-23.
37. Raupach, A., et al., *Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms*. J Clin Med, 2019. **8**(4).
38. 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.
39. Lee, Y.M., et al., *Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo*. J Pineal Res, 2002. **33**(2): p. 72-80.
40. 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.
41. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic*. Lancet, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
42. Heusch, G., *Molecular Basis of Cardioprotection*. Circulation Research, 2015. **116**(4): p. 674-699.

43. Tullio, F., et al., *Redox balance and cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2013. **108**(6): p. 392.
44. Yu, L.-m., et al., *Melatonin protects diabetic heart against ischemia-reperfusion injury, role of membrane receptor-dependent cGMP-PKG activation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2018. **1864**(2): p. 563-578.
45. Hausenloy, D.J., M.R. Duchen, and D.M. Yellon, *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 617-25.
46. Bernardi, P. and F. Di Lisa, *The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015. **78**: p. 100-106.
47. Alam, M.R., D. Baetz, and M. Ovize, *Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015. **78**: p. 80-89.
48. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
49. Piot, C., et al., *Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction*. 2008. **359**(5): p. 473-481.
50. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochemical Journal, 1999. **341**(2): p. 233-249.
51. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochemical Journal, 1995. **307**(1): p. 93-98.
52. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Preconditioning: The Mitochondrial Connection*. Annual Review of Physiology, 2007. **69**(1): p. 51-67.
53. Hausenloy, D., et al., *Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection*. Circulation, 2004. **109**(14): p. 1714-7.
54. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
55. Ma, Z., et al., *Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017. **74**(21): p. 3989-3998.
56. 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.
57. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca^{2+} - activated K^+ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1029-33.
58. Kimmich, G.A. and H. Rasmussen, *Inhibition of mitochondrial respiration by loss of intra-mitochondrial K^+* . Biochim Biophys Acta, 1967. **131**(3): p. 413-20.
59. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K^+ channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 420-32.
60. Kowaltowski, A.J., et al., *Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H649-57.
61. Murata, M., et al., *Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection*. Circ Res, 2001. **89**(10): p. 891-8.
62. Paggio, A., et al., *Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria*. Nature, 2019. **572**(7771): p. 609-613.
63. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection*. Circ Res, 1997. **81**(6): p. 1072-82.

64. Zorova, L.D., et al., *Mitochondrial membrane potential*. Anal Biochem, 2018. **552**: p. 50-59.
65. von Gall, C., J.H. Stehle, and D.R. Weaver, *Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction*. Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 151-62.
66. Lerner, A.B., et al., *Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(10): p. 2587-2587.
67. Slominski, R.M., et al., *Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions*. Molecular and cellular endocrinology, 2012. **351**(2): p. 152-166.
68. Rodriguez, C., et al., *Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin*. Journal of Pineal Research, 2004. **36**(1): p. 1-9.
69. Lochner, A., et al., *Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery*. Journal of Pineal Research, 2006. **40**(1): p. 56-63.
70. Kato, K., et al., *Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist*. Neuropharmacology, 2005. **48**(2): p. 301-10.
71. Kuriyama, A., M. Honda, and Y. Hayashino, *Ramelteon for the treatment of insomnia in adults: a systematic review and meta-analysis*. Sleep Med, 2014. **15**(4): p. 385-92.
72. McGechan, A. and K. Wellington, *Ramelteon*. CNS Drugs, 2005. **19**(12): p. 1057-65; discussion 1066-7.
73. Mathes, A.M., B. Wolf, and H. Rensing, *Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro*. Journal of pineal research, 2008. **45**(3): p. 337-338.
74. Zhang, B., et al., *Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation*. Redox Rep, 2022. **27**(1): p. 45-52.
75. Tamura, Y., et al., *Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart*. Circ Res, 1988. **63**(5): p. 944-59.
76. Chen, E.P., et al., *Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts*. Circulation, 1996. **94**(9 Suppl): p. I1412-7.
77. Park, J.W., et al., *Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H181-7.
78. Granger, D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
79. Rieger, J.M., A.R. Shah, and J.M. Gidday, *Ischemia-reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase- and xanthine oxidase-derived superoxide*. Exp Eye Res, 2002. **74**(4): p. 493-501.
80. Nakagiri, A., M. Sunamoto, and M. Murakami, *NADPH oxidase is involved in ischaemia/reperfusion-induced damage in rat gastric mucosa via ROS production--role of NADPH oxidase in rat stomachs*. Inflammopharmacology, 2007. **15**(6): p. 278-81.
81. De Pascali, F., et al., *Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation*. Biochemistry, 2014. **53**(22): p. 3679-88.
82. Tran, T.P., et al., *Mitochondria-derived superoxide links to tourniquet-induced apoptosis in mouse skeletal muscle*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43410.
83. Granger, D.N. and P.R. Kvietys, *Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 524-551.
84. Heinen, A., et al., *Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **292**(1): p. C148-C156.
85. Heinen, A., et al., *Physiological levels of glutamine prevent morphine-induced preconditioning in the isolated rat heart*. Eur J Pharmacol, 2008. **595**(1-3): p. 58-64.

86. Taegtmeyer, H., R. Hems, and H.A. Krebs, *Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart*. Biochem J, 1980. **186**(3): p. 701-11.
87. Borel, J.F. and Z.L. Kis, *The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune)*. Transplant Proc, 1991. **23**(2): p. 1867-74.
88. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress*. Biochemical Journal, 1988. **255**(1): p. 357.
89. Hausenloy, D., et al., *The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial*. Heart, 2014. **100**(7): p. 544-9.
90. Mewton, N., et al., *Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(12): p. 1200-1205.
91. Mishra, J., et al., *Cyclosporin A Increases Mitochondrial Buffering of Calcium: An Additional Mechanism in Delaying Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening*. Cells, 2019. **8**(9).
92. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 1)(Pt 1): p. 93-8.
93. Squadrito, F., et al., *Cyclosporin-A reduces leukocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats*. Eur J Pharmacol, 1999. **364**(2-3): p. 159-68.
94. Niemann, C.U., et al., *Close association between the reduction in myocardial energy metabolism and infarct size: dose-response assessment of cyclosporine*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(3): p. 1123-8.
95. Di Lisa, F., et al., *Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD^+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2571-5.
96. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
97. Beltz, J., et al., *Protective effects of tiopronin on oxidatively challenged human lung carcinoma cells (A549)*. Free Radic Res, 2020. **54**(5): p. 319-329.
98. Baines, C.P., M. Goto, and J.M. Downey, *Oxygen Radicals Released During Ischemic Preconditioning Contribute to Cardioprotection in the Rabbit Myocardium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1997. **29**(1): p. 207-216.
99. Dorsch, M., et al., *Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151025.
100. Heusch, G., *Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(12): p. 773-789.
101. Canadian Institutes of Health Research, A.I. *DrugBank*. 2021; Available from: go.drugbank.com/drugs/DB00091.
102. Sahna, E., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin*. J Pineal Res, 2002. **33**(4): p. 234-8.
103. Legros, C., et al., *Characterization of the various functional pathways elicited by synthetic agonists or antagonists at the melatonin MT(1) and MT(2) receptors*. Pharmacol Res Perspect, 2020. **8**(1): p. e00539.
104. Cao, C.M., et al., *Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 644-50.
105. Stowe, D.F., et al., *Protection against cardiac injury by small $Ca(2+)$ -sensitive $K(+)$ channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(2): p. 427-42.

106. Cadena, S., *ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection*. Free Radic Biol Med, 2018. **117**: p. 76-89.
107. Stowe, D.F., et al., *Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2006. **290**(1): p. H434-H440.
108. Huhn, R., et al., *Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A*. Experimental gerontology, 2012. **47**(1): p. 116-121.
109. Zhao, W.J., et al., *Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 14): p. 2605-19.
110. Stumpf, I., E. Mühlbauer, and E. Peschke, *Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells*. J Pineal Res, 2008. **45**(3): p. 318-27.
111. 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.
112. Kalogeris, T., et al., *Ischemia/Reperfusion*. Compr Physiol, 2016. **7**(1): p. 113-170.
113. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
114. Bøtker, H.E., et al., *Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection*. Basic Research in Cardiology, 2018. **113**(5): p. 39.
115. Knowlton, A.A. and D.H. Korzick, *Estrogen and the female heart*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **389**(1-2): p. 31-9.
116. Ostadal, B. and P. Ostadal, *Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 541-54.
117. Zhai, P., et al., *Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2000. **279**(6): p. H2766-H2775.
118. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
119. Jiang, X., et al., *A comparison of the effects of ketamine, chloral hydrate and pentobarbital sodium anesthesia on isolated rat hearts and cardiomyocytes*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2011. **12**(10): p. 732-5.
120. Sano, Y., et al., *Effects of various types of anesthesia on hemodynamics, cardiac function, and glucose and lipid metabolism in rats*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2016. **311**(6): p. H1360-H1366.
121. Cho, Y.J., et al., *Sevoflurane, Propofol and Carvedilol Block Myocardial Protection by Limb Remote Ischemic Preconditioning*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(2): p. 269.
122. Friedrichs, G.S., et al., *Effects of heparin and N-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart*. Circ Res, 1994. **75**(4): p. 701-10.
123. Miki, T., et al., *Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction?* Basic Res Cardiol, 1998. **93**(5): p. 372-83.
124. 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.
125. Au - DeWitt, E.S., K.J. Au - Black, and J.N. Au - Kheir, *Rodent Working Heart Model for the Study of Myocardial Performance and Oxygen Consumption*. JoVE, 2016(114): p. e54149.
126. Karmazyn, M. and J.R. Neely, *Inhibition of post-ischemic ventricular recovery by low concentrations of prostacyclin in isolated working rat hearts: Dependency on*

- concentration, ischemia duration, calcium and relationship to myocardial energy metabolism.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1989. **21**(3): p. 335-346.
127. Rösén, P., et al., *Glycolysis and glucose oxidation in the rat heart under nonrecirculating perfusion conditions.* Basic Res Cardiol, 1984. **79**(3): p. 307-12.
128. Jonassen, A.K., et al., *Myocardial Protection by Insulin at Reperfusion Requires Early Administration and Is Mediated via Akt and p70s6 Kinase Cell-Survival Signaling.* Circulation Research, 2001. **89**(12): p. 1191-1198.
129. Headrick, J.P., et al., *Functional properties and responses to ischaemia-reperfusion in Langendorff perfused mouse heart.* Experimental Physiology, 2001. **86**(6): p. 703-716.
130. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery.* New England Journal of Medicine, 2015. **373**(15): p. 1397-1407.
131. Hausenloy, D.J., et al., *Efficacy and Mechanism Evaluation, in Effect of Remote Ischaemic preconditioning on Clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery bypass graft surgery (ERICCA study): a multicentre double-blind randomised controlled clinical trial.* 2016, NIHR Journals Library
132. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial.* Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1415-1424.
133. Cung, T.T., et al., *Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction.* N Engl J Med, 2015. **373**(11): p. 1021-31.
134. Roth, S., et al., *Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications.* Anesthesia & Analgesia, 2020. **131**(6).
135. Hausenloy, D.J., et al., *Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology.* Cardiovascular research, 2013. **98**(1): p. 7-27.
136. Kersten, J.R., et al., *Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1218-24.
137. 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.
138. Shim, Y.H. and J.R. Kersten, *Preconditioning, anesthetics, and perioperative medication.* Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2008. **22**(1): p. 151-165.
139. Huhn, R., et al., *Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore.* Br J Anaesth, 2008. **100**(4): p. 465-71.
140. Rawashdeh, O., et al., *Circadian periods of sensitivity for ramelteon on the onset of running-wheel activity and the peak of suprachiasmatic nucleus neuronal firing rhythms in C3H/HeN mice.* Chronobiol Int, 2011. **28**(1): p. 31-8.
141. EMA. *Ramelteon: Withdrawal of the marketing authorization application.* 2008 [cited 2021 08.09.2021]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/withdrawn-applications/ramelteon>.

6 Tabellenverzeichnis

1. **Tabelle 1:** Tabelle modifiziert nach „Die zehn häufigsten Todesursachen -2016“ aus Herzbericht 2018 – Deutsche Herzstiftung nach Angaben des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden 2018
2. **Tabelle 2:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Namen, Summenformel, Hersteller und Sitz des Herstellers sowie Molekulargewicht.
3. **Tabelle 3:** Tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte mit Namen, Art, Hersteller und kurzer Beschreibung des Verwendungszwecks.
4. **Tabelle 4:** Auflistung der Zeitpunkte zu denen eine hämodynamische Auswertung vorgenommen wurde.
5. **Tabelle 5:** Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Parameter Teil 1
6. **Tabelle 6:** Tabellarische Darstellung der hämodynamischen Parameter Teil 2

7 Abbildungsverzeichnis

1. **Abbildung 1:** Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus nach Langendorff.
2. **Abbildung 2:** Studiendesign der Versuchsgruppen Teil 1.
3. **Abbildung 3:** Studiendesign der Versuchsgruppen Teil 2.
4. **Abbildung 4:** Infarktgrößen Teil 1 als Säulendiagramm mit Standardabweichung
5. **Abbildung 5:** Infarktgrößen Teil 2 als Säulendiagramm mit Standardabweichung
6. **Abbildung 6:** Mögliche Signalkaskade der Ramelteon induzierten Kardioprotektion gegen myokardiale-Ischämie-Reperfusions-Schaden in Ratten

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Martin Ströthoff für die kurzfristige Übernahme der Betreuung sowie für seine wertvolle, präzise und vor allem schnelle Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen herzlich für die Überlassung des Themas und die damit verbundene Möglichkeit, mich diesem spannenden Thema zu widmen.

Frau Privatdozentin Dr. Annika Raupach danke ich für ihre initiale Korrektur der Arbeit sowie für ihre fachkundige Begleitung und die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen während der Versuchsdurchführung.

Mein Dank gilt zudem Frau Professorin Dr. Inge Bauer, Herrn Dr. Sebastian Bunte, Frau Claudia Dohle und Frau Birgitt Berke, die mir, während der experimentellen Arbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, Mag. Thomas und Christine Götze, meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen hat mich stets begleitet und war eine wesentliche Säule auf meinem Weg.

Meinen außerordentlichen Dank möchte ich meiner Partnerin Frau Pia Hoheisel aussprechen. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht zu Ende gebracht. Sie war für mich da, hat mich angetrieben und mir den Rücken freigehalten.