

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Benedikt Pannen

Geschlechtsspezifische Effekte von humanem Plasma nach  
Ischämischer Fernpräkonditionierung des älteren Menschen auf  
Infarktgröße und Hämodynamik des isolierten Langendorffherzens

Dissertation

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

vorgelegt von  
Ahmet Aykut Aytulun  
2018

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Hug Aubin

**Für meine Eltern**



# Zusammenfassung

**Fragestellung:** Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Kardiomyozyten besitzen endogene Mechanismen, die einen protektiven Effekt bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden vermitteln. Der protektive Stimulus kann an der oberen Extremität mittels Blutdruckmanschette erfolgen. Hierdurch freigesetzte humorale Faktoren transportieren das protektive Signal über den Blutkreislauf zum Herzen. Ziel dieser Studie war zu überprüfen, ob freigesetzte humorale Faktoren des älteren Menschen bei Transfer auf ein *in vitro* Langendorffherz kardioprotektiv wirken und ob geschlechtsspezifische Unterschiede auftreten.

**Methodik:** Für diese Studie lagen Genehmigungen der Ethikkommission (Studie 3911) und des Tierschutzbeauftragten (Nr. O 27/12) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf vor. An zehn männlichen und zehn weiblichen, gesunden Probanden über 60 Jahren wurde am linken Oberarm durch Aufblasen einer Blutdruckmanschette (200 mmHg) eine Ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) für drei Zyklen mit fünfminütiger Ischämie gefolgt von jeweils fünfminütiger Reperfusion durchgeführt. Blut wurde vor (Kontrolle, CON) und nach RIPC entnommen. Die kardioprotektive Wirksamkeit des Blutplasmas wurde an 40 männlichen WISTAR-Ratten im Alter von 2-3 Monaten randomisiert in vier Gruppen *in vitro* getestet [CON-Plasma(♂), RIPC-Plasma(♂); CON-Plasma(♀), RIPC-Plasma(♀)]. Die isolierten Herzen wurden an einer Langendorff-Apparatur mit modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer bei einem konstanten mittleren, arteriellen Druck von 80 mmHg perfundiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 20 Minuten wurde das jeweilige Blutplasma für 10 Minuten mit 0,5% des Koronarflusses verabreicht. Im Anschluss erfolgte eine globale Ischämie von 33 Minuten. Nach 60 Minuten Reperfusion wurden die Herzen mit einer 0,75% Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung gefärbt und die Infarktgrößen planimetrisch ermittelt. Die hämodynamischen Parameter wurden während des Versuchs aufgezeichnet und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Student's t-Test ( $p < 0,05$ ), die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

**Ergebnisse:** Das RIPC-Plasma der männlichen Probanden zeigte keine Infarktgrößenreduktion im Vergleich mit dem Kontrollplasma (Infarktgröße CON-Plasma(♂):  $43 \pm 9$  %, Infarktgröße RIPC-Plasma(♂):  $46 \pm 12$  %). Das RIPC-Plasma der weiblichen Probanden zeigte keine Infarktgrößenreduktion im Vergleich mit dem Kontrollplasma (Infarktgröße CON-Plasma(♀):  $43 \pm 12$  %, Infarktgröße RIPC-Plasma(♀):  $45 \pm 10$  %). Die hämodynamischen Parameter zeigten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

**Diskussion:** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das RIPC-Plasma älterer Probanden über 60 Jahren bei Transfer auf das *in vitro* Herz keine kardioprotektive Wirkung besitzt. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Freisetzung humoraler Faktoren lagen nicht vor. Die fehlende kardioprotektive Wirkung könnte durch eine Veränderung der Menge und/oder der Zusammensetzung der freigesetzten humoralen Faktoren bedingt sein.

# Summary

**Background:** Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the western industrialized countries. Cardiac muscle cells possess endogenous mechanisms to protect themselves from ischemia/reperfusion-induced damage. The protective stimulus can be applied on the upper extremity with a blood pressure cuff. The released humoral factors transport the protective signal to the heart through the blood system. Goal of this study was to discover whether the released humoral factors of older men and women exert cardioprotective effects and if gender specific effects exist when transferred to an isolated heart.

**Methods:** The study was conducted in accordance with the ethics committee (study 3911) and the animal protection commissioner (no. O 27/12) of the Heinrich-Heine University of Düsseldorf. Ten male and female healthy subjects older than 60 years of age were remote ischemic preconditioned (RIPC) at the left upper extremity via a blood pressure cuff (200 mmHg) with three cycles of five minutes ischemia and five minutes reperfusion. Blood was withdrawn before (Control, CON) and after RIPC. The cardioprotective effect of the blood plasma was tested on 40 isolated hearts from male Wistar-rats with an age of 2-3 months in four groups *in vitro* [CON-plasma(♂), RIPC-plasma(♂); CON-plasma(♀), RIPC-plasma(♀)]. Hearts were perfused by a Langendorff system with a modified Krebs-Henseleit puffer at a constant mean arterial pressure of 80 mmHg. After a stabilization period of 20 minutes the blood plasma was administered at a coronary flow rate of 0.5% for 10 minutes. Hearts underwent 33 minutes of global ischemia. After 60 minutes of reperfusion the hearts were stained with a 0.75% triphenyltetrazolium chloride solution and infarct sizes were determined planimetrically. The hemodynamic parameters were recorded during the experiments. All data (mean  $\pm$  standard deviation) were analysed with a Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** RIPC-plasma of male test subjects did not reduce infarct size compared to the CON-plasma (infarct size CON-plasma(♂):  $43 \pm 9$  %, infarct size RIPC-plasma(♂):  $46 \pm 12$  %). RIPC-plasma of female test subjects did not reduce infarct size compared to the CON-plasma (infarct size CON-plasma(♀):  $43 \pm 12$  %, infarct size RIPC-plasma(♀):  $45 \pm 10$  %). Hemodynamic parameters did not differ between the groups.

**Discussion:** The results show that RIPC of test subjects over 60 years of age is not capable of conveying protective effects on an *in vitro* isolated rat heart. There are no gender specific differences regarding the release of humoral factors. The missing cardioprotective effects could be the result of a reduced concentration or a change of the composition of humoral factors.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AAR</b>	<i>area at risk</i>
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AOP</b>	<i>Aortic Pressure</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMI</b>	<i>Body Mass Index</i>
<b>CF</b>	<i>Coronary Flow</i>
<b>CON</b>	Kontrolle
<b>dP/dt<sub>Max</sub></b>	Linksventrikuläre Kontraktionsgeschwindigkeit
<b>dP/dt<sub>Min</sub></b>	Linksventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit
<b>DPZ</b>	Dekapitations-Perfusionszeit
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>G</b>	<i>Gauge</i>
<b>HR</b>	<i>Heart Rate</i>
<b>I.E.</b>	Internationale Einheit
<b>i.p.</b>	<i>intraperitoneal</i>
<b>I/R</b>	Ischämie und Reperfusion
<b>IPC</b>	<i>Ischemic PreConditioning</i>
<b>IPost</b>	<i>Ischemic Postconditioning</i>
<b>IS</b>	<i>Infarct Size</i>
<b>KHK</b>	<i>Koronare Herzerkrankung</i>
<b>LVDP</b>	<i>Left Ventricular Developed Pressure</i>
<b>LVP<sub>dia</sub></b>	<i>Left Ventricular End Diastolic Pressure</i>
<b>LVP<sub>sys</sub></b>	<i>Left Ventricular Systolic Pressure</i>
<b>MAD</b>	Mittlerer Arterieller Druck
<b>MPTP</b>	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
<b>Na<sup>+</sup>-Pumpe</b>	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase
<b>NCA</b>	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Antiport
<b>NHA</b>	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Antiport
<b>NYHA</b>	<i>New York Heart Association</i>
<b>RCF</b>	<i>Relative Centrifugal Force</i>
<b>RIPC</b>	<i>Remote Ischemic PreConditioning</i>

<b>RIPer</b>	<i>Remote Ischemic Perconditioning</i>
<b>RIPost</b>	<i>Remote Ischemic Postconditioning</i>
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RPP</b>	<i>Rate Pressure Product</i>
<b>RR</b>	Riva Rocci
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>
<b>TTC</b>	Triphenyltetrazoliumchlorid
<b>UKD</b>	Universitätsklinikum Düsseldorf

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Kardiovaskuläre Erkrankungen</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathophysiologie der Myokardischämie</b>	<b>3</b>
1.2.1	Auswirkungen einer Myokardischämie	3
1.2.2	Myokardialer Reperfusionsschaden	5
<b>1.3</b>	<b>Modelle der Kardioprotektion</b>	<b>7</b>
1.3.1	Ischämische Präkonditionierung	7
1.3.2	Nicht-ischämische Konditionierungsformen	8
1.3.3	Ischämische Fernpräkonditionierung	8
1.3.4	Wirkmechanismen der Ischämischen Fernpräkonditionierung	11
1.3.5	Geschlechtsspezifische Unterschiede und der Einfluss des Alterns auf die Ischämische Fernpräkonditionierung	14
<b>1.4</b>	<b>Das isolierte Herz nach Langendorff</b>	<b>15</b>
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>17</b>
2.1.1	Ischämische Fernpräkonditionierung und Blutentnahme	17
2.1.2	Langendorff-Anlage	17
2.1.3	Laborgeräte	18
2.1.4	Pharmaka	18
2.1.5	Chemikalien	19
2.1.6	Gase	20
2.1.7	Computer und Software	20
<b>2.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Ischämische Fernpräkonditionierung</b>	<b>20</b>
2.3.1	Ethikvotum und Rekrutierung der Studienteilnehmer	20
2.3.2	Screening der Studienteilnehmer	21
2.3.3	Ein- und Ausschlusskriterien	21
2.3.4	Datenmanagement	22
2.3.5	Aufklärung und Versicherung	22
2.3.6	Durchführung der Ischämischen Fernpräkonditionierung und Versuchsgruppen	22
2.3.7	Gewinnung von humanem Blutplasma	25
2.3.8	Nachsorge der Studienteilnehmer	25
<b>2.4</b>	<b>Untersuchungen des kardioprotektiven Effekts</b>	<b>25</b>
2.4.1	Versuchstiere	25
2.4.2	Präparation und isolierte Perfusion des Rattenherzens	26
2.4.3	Nachweis des protektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung	28
2.4.4	Untersuchung des protektiven Effekts des Plasmas gesunder Probanden	29

2.4.5	Färbung der Rattenherzen .....	31
2.4.6	Statistische Auswertung .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Ischämische Präkonditionierung .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt der IPC auf Herzgewichte und Ischämieparameter .....	34
3.1.2	Effekt der IPC auf die Infarktgröße .....	35
3.1.3	Effekt der IPC auf die Hämodynamik .....	36
<b>3.2</b>	<b>Ischämische Fernpräkonditionierung .....</b>	<b>39</b>
3.2.1	Demografie der Probanden .....	39
3.2.2	Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf Herzgewichte und Ischämieparameter .....	40
3.2.3	Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf die Infarktgröße.....	41
3.2.4	Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf die Hämodynamik .....	43
3.2.5	Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf Herzgewichte und Ischämieparameter .....	44
3.2.6	Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf die Infarktgröße .....	45
3.2.7	Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf die Hämodynamik.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Beantwortung der Fragestellung .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Ischämische Präkonditionierung.....	51
4.2.2	Ischämische Fernpräkonditionierung .....	53
4.2.3	Übertragbarkeit humoraler Faktoren durch die Ischämische Fernpräkonditionierung.....	54
4.2.4	Fehlender Einfluss des Geschlechts auf die Ischämische Fernpräkonditionierung älterer Menschen .....	55
4.2.5	Einfluss des Alterns auf die Ischämische Fernpräkonditionierung.....	56
<b>4.3</b>	<b>Stärken, Standardisierung, Limitationen und Ausblick .....</b>	<b>59</b>
4.3.1	Stärken der Studie .....	59
4.3.2	Standardisierung der Methodik.....	60
4.3.3	Limitationen der Studie und klinischer Ausblick.....	61
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

*“The heart, consequently, is the beginning of life; the sun of the microcosm, even as the sun in his turn might well be designated the heart of the world; for it is the heart by whose virtue and pulse the blood is moved, perfected, and made nutrient, and is preserved from corruption and coagulation; it is the household divinity which, discharging its function, nourishes, cherishes, quickens the whole body, and is indeed the foundation of life, the source of all action.”* William Harvey, 1628 [1]

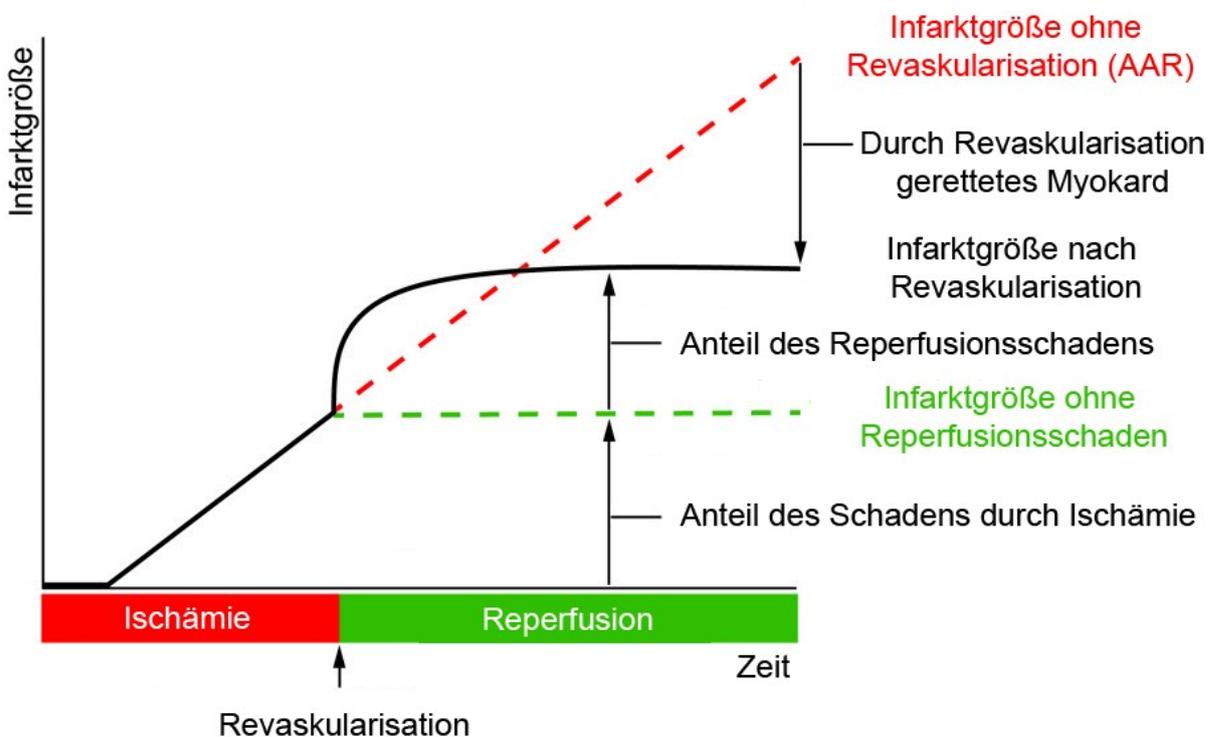
Der englische Arzt und Anatom William Harvey beschrieb als einer der ersten Wissenschaftler vor 389 Jahren den Blutkreislauf und erkannte die wichtige, zentrale Funktion des Herzens. Die Bedeutsamkeit des kardiovaskulären Systems wird dadurch gestützt, dass Erkrankungen des Herzens weltweit die häufigste Todesursache darstellen. Im Jahr 2015 verstarben in Deutschland 925 200 Menschen, wovon ca. 40% an kardiovaskulären Erkrankungen litten. Die kardiovaskulären Todesfälle wurden am häufigsten durch Ischämie verursacht [2]. Eine Ischämie bezeichnet pathophysiologisch eine Minderdurchblutung des Myokards, in der das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot gestört ist [3]. Die Atherosklerose der Arterien ist häufig die Ursache von Durchblutungsstörungen von Organen. Die Manifestation dieses chronisch-inflammatorischen Prozesses an den Koronararterien führt zur Koronaren Herzerkrankung (KHK) [4].

Eine plötzliche Ruptur von instabilen, atherosklerotischen Läsionen ruft eine Thrombose der betroffenen Koronararterie hervor, was eine akute Myokardischämie nach sich zieht [5]. Wird die Ischämietoleranz überschritten, tritt eine Nekrose des Myokards ein, welche als Myokardinfarkt bezeichnet wird [6]. Gemäß Leitlinien ist eine schnellstmögliche Revaskularisation des ischämischen Myokards anzustreben, um den größtmöglichen Anteil ischämischen Myokardgewebes vor einer Nekrose zu bewahren [7, 8]. Die Revaskularisation der Koronararterien kann über eine perkutane

## Einleitung

Koronarangioplastie und Stentimplantation oder einen koronararteriellen Bypass erfolgen [9].

Als unerwünschte Nebenwirkung tritt bei einer therapeutischen Reperfusion ein Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) auf, der - paradox - mit einem erheblichen Eigenanteil zur finalen Infarktgröße beiträgt. Es bedarf der Erforschung von Gegenmaßnahmen, um das Myokard vor einem I/R-Schaden zu schützen [10]. Unter Einsatz von Kardioprotektion wird das Myokard konditioniert, was die Toleranz gegenüber einem I/R-Schaden erhöht. Dadurch wird die Infarktgröße effektiv reduziert [11]. Diese endogene, physiologische Konditionierung des Myokards bietet Potenzial für eine Translation in die Klinik (Abb. 1).



**Abb. 1: Beitrag des Ischämie-Reperfusionsschadens zur Infarktgröße**

Die Grafik zeigt im zeitlichen Verlauf, wie sich die finale myokardiale Infarktgröße aus den Anteilen des ischämischen Schadens und des Reperfusionsschadens zusammensetzt. Die rot-gestrichelte Linie zeigt die theoretische Infarktgröße bei Verzicht auf eine Revaskularisation. Durch eine Revaskularisation werden Anteile des ischämischen Myokards vor dem Zelltod gerettet und die Infarktgröße reduziert (kontinuierlich-schwarze Linie). Die tatsächliche Infarktgröße nach Revaskularisation setzt sich zusammen aus dem Anteil des Schadens durch eine Ischämie und dem Anteil des Schadens durch eine Reperfusion. Eine kardioprotektive Maßnahme begrenzt den Ischämie- und Reperfusionsschaden und reduziert die theoretische Infarktgröße um den entsprechenden Anteil (grün-gestrichelte Linie). Modifiziert nach Hausenloy et al. 2013 [12]

Ischämische Herzerkrankungen des Menschen weisen einige Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern auf. Obwohl nicht vollständig entschlüsselt, haben Östrogene einen positiven Einfluss auf die kardiovaskuläre Gesundheit [13-15]. Bei Eintritt in die Menopause fallen die endogenen Östrogenspiegel um 90% ab. Während bis zum 50. Lebensjahr vorwiegend das männliche Geschlecht betroffen ist, steigt die Prävalenz ischämischer Herzerkrankungen bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr an und gleicht in der 7. Dekade dem Geschlecht der Männer [16]. Zudem leiden Frauen häufiger an atypischen Symptomen einer Myokardischämie und erhalten daher eine zeitlich verzögerte Diagnostik als Männer [17]. Darüber hinaus erfolgen bei Frauen insgesamt weniger Koronarinterventionen [18]. Trotz dieser diagnostischen und therapierelevanten Unterschiede ist das weibliche Geschlecht in kardiovaskulären Studien oft unterrepräsentiert. Eine Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Forschung ist notwendig, damit Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen eine optimale Therapie erhalten [19]. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Pathophysiologie des Myokards unter Ischämie und Reperfusion näher erläutert.

## 1.2 Pathophysiologie der Myokardischämie

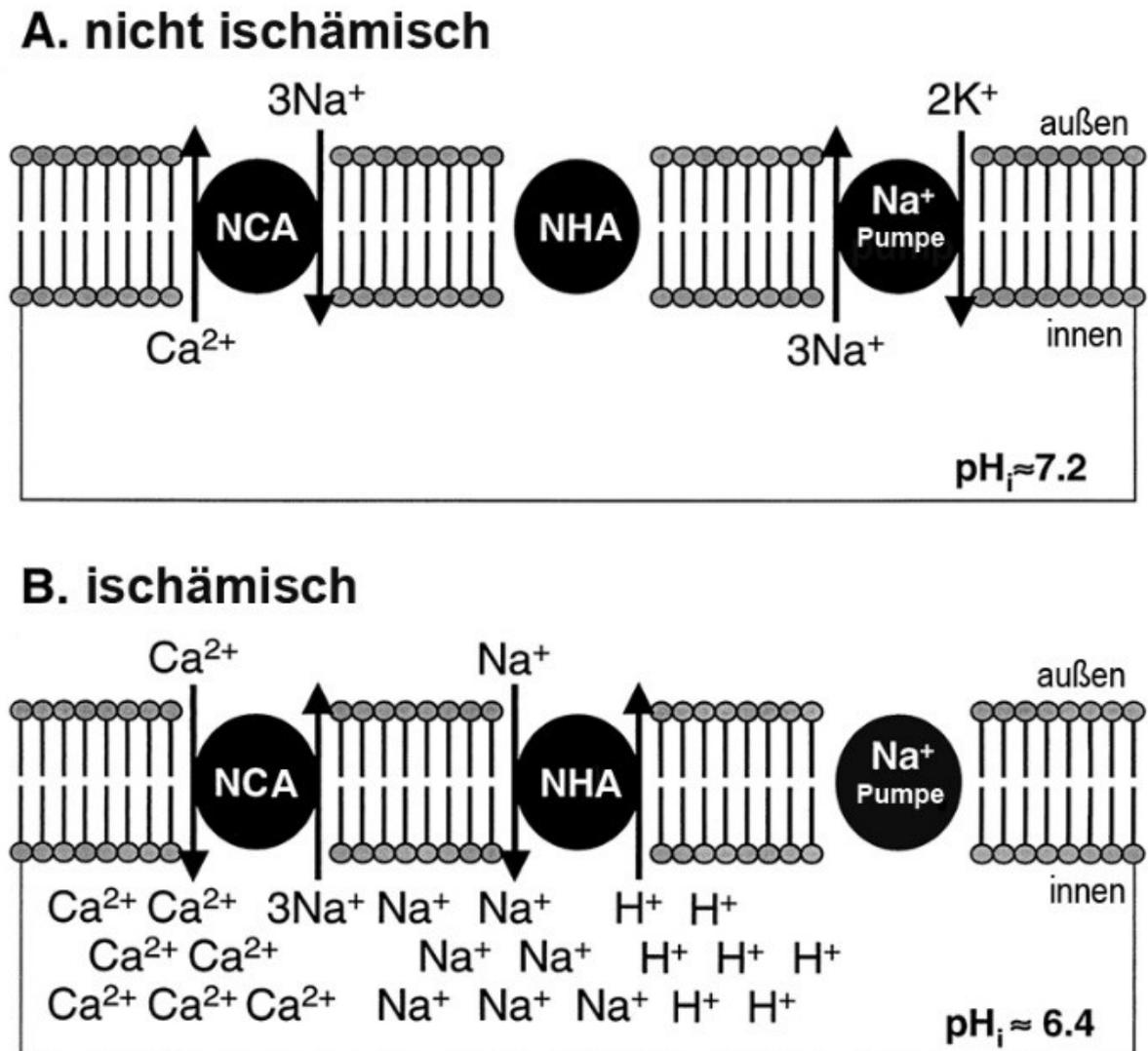
### 1.2.1 Auswirkungen einer Myokardischämie

Die Thrombose einer Koronararterie verursacht eine Ischämie des versorgten Myokards (*area at risk*, AAR). Wenn das Perfusionsdefizit nicht rasch beglichen wird, entsteht, wie in tierexperimentellen Studien gezeigt, ab einer Zeitspanne von 20-40 Minuten eine nekrotische Infarktregion (*infarct size*, IS) innerhalb der AAR. Die Nekrosefront breitet sich wellenartig von subendokardial nach subepikardial aus [20].

Auf zellulärer Ebene treten aufgrund der Myokardischämie biochemische und metabolische Veränderungen auf. Aufgrund des Sauerstoffmangels wird die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) über oxidative Phosphorylierung gestoppt. Die anaerobe Glykolyse liefert nicht die notwendige Menge an ATP, sodass ein ATP-Mangel auftritt. Kumulierende Stoffwechselprodukte wie Adenosindiphosphat (ADP), Phosphat und Laktat tragen zu einer metabolischen

## Einleitung

Azidose bei. Überschüssige Protonen ( $H^+$ ) werden gegen Natriumionen (über den  $Na^+$ - $H^+$ -Antiport) aus der Zelle zu befördert, wodurch Natrium ( $Na^+$ ) kumuliert. Durch den Transport überschüssiger Natriumionen aus der Zelle (über den  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Antiport) resultiert eine Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-Überladung (Abb. 2) [21].



**Abb. 2: Kalziumüberladung des Kardiomyozyten bedingt durch ischämische Azidose**

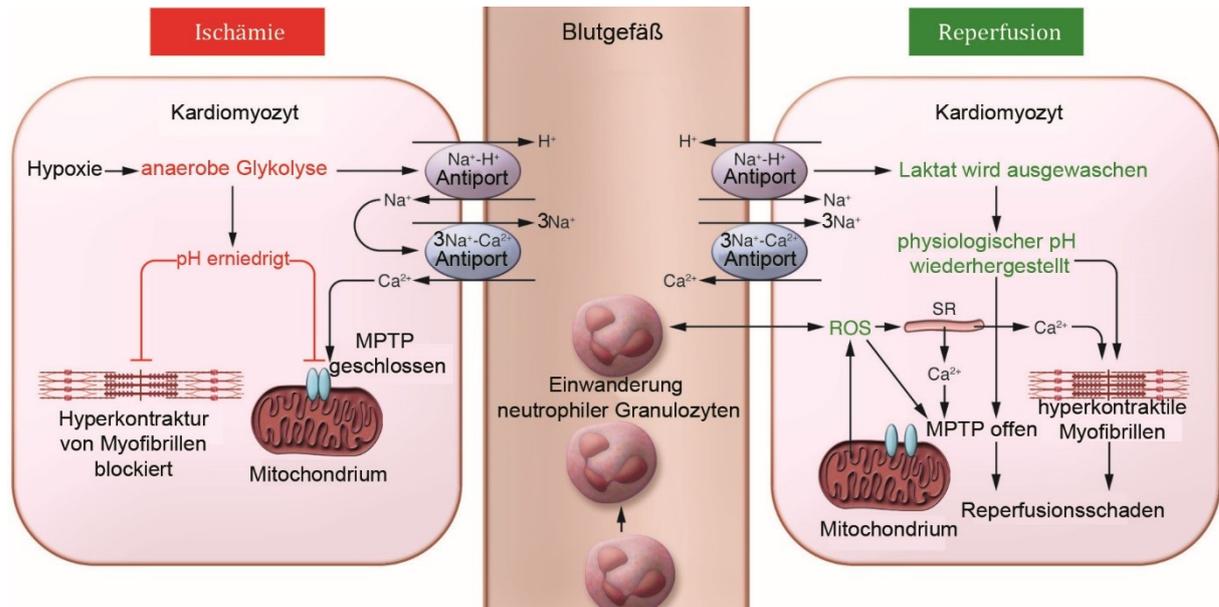
Eine Myokardischämie führt durch Ionentransporte zur Kalziumüberladung. Bei nicht ischämischen Bedingungen (A) ist der  $Na^+$ - $H^+$ -Antiport (NHA) kaum aktiv. Durch Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) werden Natriumionen ( $Na^+$ ) über die  $Na^+$ / $K^+$ -ATPase ( $Na^+$ -Pumpe) aus der Zelle befördert und der bidirektionale  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -Antiport (NCA) befördert Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ ) überwiegend nach außen. Unter einer Ischämie (B) entwickelt sich eine metabolische Azidose. Überschüssige Protonen ( $H^+$ ) werden mittels des  $Na^+$ - $H^+$ -Antiports (NHA) aus der Zelle befördert, wodurch  $Na^+$  im Gegenzug in die Zelle strömt. Da die  $Na^+$ / $K^+$ -ATPase aufgrund des ATP-Mangels inaktiv ist, kumuliert  $Na^+$  intrazellulär. Der bidirektionale  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -Antiport (NCA) befördert überschüssiges  $Na^+$  heraus, jedoch führt dies zu einer  $Ca^{2+}$ -Überladung. Modifiziert nach Avkiran et al. 2002 [22]

### 1.2.2 Myokardialer Reperfusionsschaden

Durch eine Reperfusion des ischämischen Myokards werden Sauerstoff und Nährstoffe in das ischämische Gewebe transportiert, wodurch die oxidative Phosphorylierung und ATP-Produktion wiederhergestellt wird. Zudem werden saure Stoffwechselprodukte aus dem Gewebe gewaschen, sodass der pH-Wert normalisiert wird [23]. Obwohl eine Reperfusion die Infarktgröße effektiv reduziert, trägt sie paradoxerweise zu einer charakteristischen Schädigung des betroffenen Myokards bei, die bis zu 50% der finalen Infarktgröße beträgt [24].

Es werden vier Formen des I/R-Schadens unterschieden. Zunächst induziert die Reperfusion reversible Funktionsstörungen wie Arrhythmien (ventrikuläre Tachykardien) oder ein *stunning* (reversible, kontraktile Dysfunktion des Myokards) [25, 26]. Im Verlauf treten irreversible Schäden wie die mikrovaskuläre Obstruktion (Unfähigkeit, ein ischämisches Areal zu reperfundieren) [27] oder der letale Reperfusionsschaden des Kardiomyozyten auf [28].

Die komplexen, pathophysiologischen Vorgänge, die zum irreversiblen Zelltod des Kardiomyozyten beitragen, werden im Nachfolgenden erörtert (Abb. 3). Die Reperfusion generiert mittels der Mitochondrien reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [29, 30]. Es wird eine inflammatorische Immunantwort eingeleitet, sodass neutrophile Granulozyten einwandern. Neutrophile Granulozyten tragen durch abbauende Enzyme zum I/R-Schaden bei und können eine Bildung von ROS verstärken [31]. Durch ROS wird eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums herbeigeführt. Hierdurch wird der intrazelluläre Kalziumüberschuss verstärkt und eine mechanische Kontraktur der Kardiomyozyten verursacht [32, 33]. In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich nicht-spezifische Poren, welche als mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) bezeichnet werden [34]. Bei Beginn der Reperfusion werden aufgrund eines Kalzium- und Phosphatüberschusses, eines ATP-Mangels und renormalisiertem pH [35] die MPTP geöffnet [36]. Dadurch strömen Wasser und Elektrolyte ein, was zur Schwellung der Mitochondrien und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt. Aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C führt zur Apoptose des Kardiomyozyten [37]. Gegenmaßnahmen, um diesen deletären I/R-Schaden zu verhindern, werden im nachfolgenden Abschnitt vorgestellt.



**Abb. 3: Pathophysiologie des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens**

Die intrazellulären Vorgänge eines Kardiomyozyten sind jeweils unter Ischämie und Reperfusion abgebildet. In einem ischämischen Kardiomyozyten wechselt der Energiestoffwechsel unter Hypoxie zur anaeroben Glykolyse. Dadurch kumuliert Laktat und der pH sinkt, was eine Kontraktur der Myofibrillen verhindert. Überschüssige Protonen ( $H^+$ ) werden durch den  $Na^+-H^+$ -Antiport aus der Zelle befördert. Natrium ( $Na^+$ ) strömt im Gegenzug in die Zelle und kumuliert. Der bidirektionale  $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiport befördert überschüssiges  $Na^+$  heraus, was jedoch zu einer Kalzium( $Ca^{2+}$ )-Überladung führt. Die Azidose und die  $Ca^{2+}$ -Überladung verhindern eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP). Die Reperfusion versorgt die Mitochondrien erneut mit Sauerstoff, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden. Die Bildung von ROS wird durch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten verstärkt. ROS verursachen eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), was die  $Ca^{2+}$ -Überladung verstärkt. Überschüssiges Laktat und Protonen werden aus der Zelle herausgewaschen, wodurch der physiologische pH wiederhergestellt wird. Sowohl die  $Ca^{2+}$ -Überladung, die ROS, als auch der renormalisierte pH öffnen die MPTP, was eine Apoptose des Kardiomyozyten bewirkt. Der physiologische pH und die  $Ca^{2+}$ -Überladung bedingen eine Hyperkontraktivität der Myofibrillen, welche zum Reperfusionsschaden beiträgt. Modifiziert nach Hausenloy et al. 2013 [12]

## 1.3 Modelle der Kardioprotektion

### 1.3.1 Ischämische Präkonditionierung

Eine Kardioprotektion bezeichnet alle Maßnahmen und Mechanismen, durch welche ein Myokardschaden reduziert oder verhindert wird. Dieser breit gefasste Terminus umgreift leitliniengerechte Diagnostik, pharmakologische Therapien, Interventionen, Operationen und präventive Strategien. Diese Arbeit konzentriert sich jedoch auf die endogenen, kardioprotektiven Mechanismen, welche gezielt den I/R-Schaden reduzieren [38].

Einer der ersten Pioniere der experimentellen Kardioprotektion ist Charles E. Murry. 1986 zeigte er, dass man die Größe des Herzinfarkts im Tiermodell reduzieren kann. Ein ausreichend lange Ischämie löst einen Infarkt im Bereich des betroffenen Myokards aus (Indexischämie). Wenn der Indexischämie vorangestellt, kurze Zyklen von Ischämie und Reperfusion an der gleichen Koronararterie durchgeführt wurden, so reduzierte sich die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON) ohne vorgeschaltete Zyklen signifikant um etwa 75 %. Dieses Phänomen wird ischämische Präkonditionierung (IPC) genannt [11]. Die IPC beinhaltet zwei unterschiedliche Zeitphasen. Die frühe Phase der klassischen IPC umfasst etwa 3 Stunden zwischen IPC und Indexischämie [39]. Die späte Phase bietet eine Protektion für den Zeitraum von etwa 24 Stunden bis 72 Stunden zwischen IPC und Indexischämie [40]. Zwischen diesen beiden Phasen besteht kein Schutz. Als klinisches Korrelat beim Menschen beobachteten Iglesias-Garriz et al. im Jahre 2001, dass Herzinfarktpatienten, die vorher an Symptomen einer *Angina pectoris* (Brustenge) litten, im Vergleich eine deutlich bessere myokardiale Pumpfunktion hatten, als jene, die plötzlich ohne *prä-Infarkt-Angina* einen Herzinfarkt erlitten [41]. Solomon et al. zeigten 2004, dass die *prä-Infarkt-Angina* als physiologischer Mechanismus ähnlich wie die IPC das Herz vor einem I/R-Schaden schützt [42].

Zhao et al. beschrieben 2003 eine weitere Form der Präkonditionierung – die Ischämische Postkonditionierung (IPost): Die Infarktgröße reduzierte sich auch, wenn die kurzen Zyklen von Ischämie und Reperfusion der Indexischämie nachgestellt erfolgten [43]. Sowohl die IPC als auch die IPost haben jedoch im klinischen Setting einen entscheidenden Nachteil: Es wird ein invasiver Zugang zu den Koronararterien benötigt. Zudem können durch Manipulation an den Koronararterien relevante

## Einleitung

Myokardinfarkte, Herzrhythmusstörungen und Verletzungen des Myokards mit letalem Ausgang resultieren.

### 1.3.2 Nicht-ischämische Konditionierungsformen

Nach Entdeckung der IPC im Jahre 1986 haben zahlreiche Studien zur Identifikation der Signalwege beigetragen. Aus diesen Erkenntnissen heraus wurden kardioprotektive Wirksubstanzen entdeckt. Da ein ischämischer Stimulus nicht zwingend erforderlich war, wurde eine pharmakologische Konditionierung ermöglicht. Im Tiermodell konnte der Nachweis bei intravenöser Applikation von Agonisten von Adenosinrezeptoren ( $A_1$ ,  $A_3$ ) und  $\delta$ -Opioidrezeptoren gezeigt werden [44, 45]. Auch topisch appliziertes Capsaicin zeigte eine Infarktgrößenreduktion im Mausmodell [46]. Bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung (KHK) wurde eine kardioprotektive Wirkung des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanal-Agonisten Nicorandil gezeigt [47]. Interessanterweise induzieren die volatilen Anästhetika Isofluran, Sevofluran und Desfluran eine Kardioprotektion [48]. Ebenso können Edelgase wie das anästhetisch wirksame Xenon [49], sowie das nicht-anästhetisch wirksame Helium [50] eine Kardioprotektion auslösen. Einen innovativen Therapieansatz stellt die Gentherapie dar. Da bereits bekannt ist, dass durch IPC die Expression von Hitzeschockproteinen in Kardiomyozyten hochreguliert wird, kann durch Implantation eines spezifischen Gens durch einen (viralen) Vektor in das Myokard das gewünschte Protein gezielt exprimiert werden [51]. So führt im Tiermodell der Gentransfer des Hitzeschockproteins 70 in Kardiomyozyten über ein Adenovirus *in vivo* zu einer Reduktion der Infarktgröße [52]. Durch Entschlüsselung weiterer kardioprotektiver Signalwege des Myokards könnten neue pharmakologische Zielstrukturen entdeckt werden. Neue pharmakologische Zielstrukturen könnten zur Entwicklung weiterer Wirksubstanzen führen. Im nachfolgenden Abschnitt wird eine vielversprechende und praktikable Präkonditionierungsform erläutert, die eine Variante der IPC darstellt.

### 1.3.3 Ischämische Fernpräkonditionierung

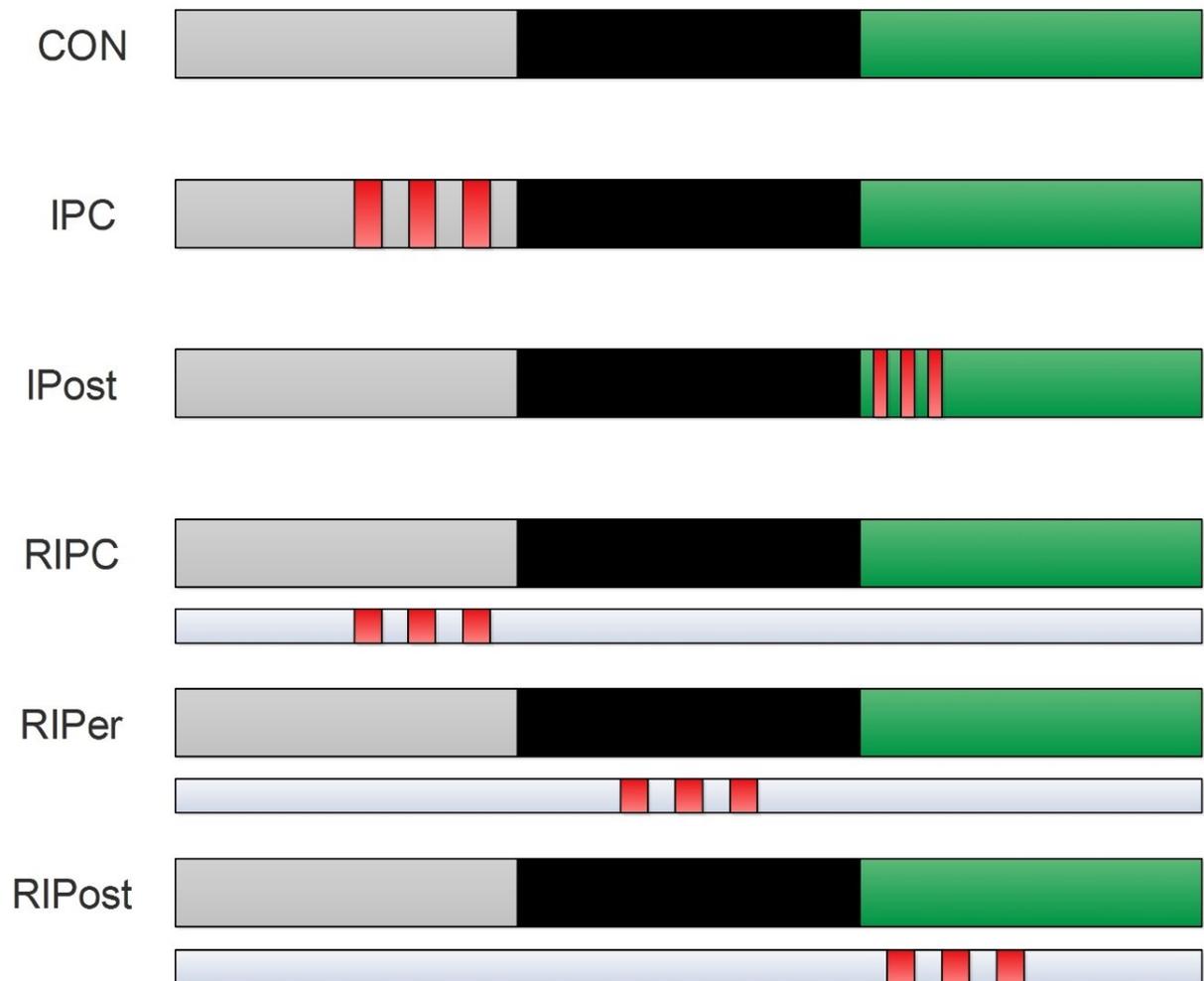
Przyklenk et al. entdeckten 1993 eine aus der Distanz vermittelte *intramyokardiale* Präkonditionierung. Eine IPC muss nicht unmittelbar im Myokardgebiet selbst erfolgen, welches geschützt werden soll. Im Tiermodell wurde die Infarktgröße auch

## Einleitung

in benachbartem Myokard reduziert, welches durch andere Koronararterien versorgt wird [53]. Diese intramyokardiale Präkonditionierung führte zur Frage, ob durch eine Präkonditionierung auch die myokardiale Organgrenze überschritten werden kann. Zweifelsfrei wurden in den folgenden Jahren Nachweise für viele Organe erbracht, die untereinander protektiv wirken. Gho et al. kamen 1996 im Rattenmodell zum Resultat, dass die Präkonditionierung von Niere und Dünndarm das Herz schützt [54]; Birnbaum et al. stellten 1997 im Kaninchenmodell fest, dass eine Präkonditionierung der Skelettmuskulatur einer Extremität das Herz schützt [55]. Diese extramyokardiale Präkonditionierung wird als Ischämische Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic PreConditioning*; RIPC) bezeichnet.

Fokus dieser Arbeit stellt die protektive Wirkung einer RIPC der oberen Extremität für das Myokard dar. Die RIPC kann – wie die IPC – invasiv durchgeführt werden. In einer tierexperimentellen Studie wurde beispielsweise die A. femoralis der unteren Extremität chirurgisch freigelegt und temporär abgeklemmt, um eine RIPC zu generieren [55]. Innovativ ist jedoch, dass die RIPC auch nicht-invasiv z. B. mit einer Blutdruckmanschette durchgeführt werden kann. Da die Skelettmuskulatur eine hohe Ischämietoleranz besitzt, stellt die nicht-invasive RIPC der oberen Extremität eine risikoarme Intervention dar [56]. Die RIPC ist eine schnell durchführbare, kostenneutrale Intervention und sogar in präklinischen Schauplätzen (Rettungstransport bei akutem Myokardinfarkt [57]) effektiv. Auch der Zeitpunkt der ischämischen Fernkonditionierung in Relation zur Indexischämie kann beliebig angepasst werden (Abb. 4). So kann eine Fernischämie vor (RIPC, Ischämische Fernpräkonditionierung), während (RIPer, Ischämische Fernperkonditionierung) oder nach der Indexischämie (RIPost, Ischämische Fernpostkonditionierung) durchgeführt werden [58, 59].

## Einleitung



**Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Konditionierungsformen des Myokards**

In diesem Diagramm sind die zeitlichen Abläufe von experimentellen Konditionierungsformen skizziert. Das Myokard wird zunächst perfundiert (grau), dann unterbrochen von einer Indexischämie (schwarz), gefolgt von einer Reperfusion (grün). Die konditionierenden Stimuli (rot) sind in zeitlicher Relation zur Indexischämie dargestellt. Bei den drei Fernkonditionierungsformen erfolgen die konditionierenden Stimuli in einem peripheren Organ, beispielsweise an der Skelettmuskulatur der oberen Extremität (schmaler Balken). CON = Kontrolle; IPC = Ischämische Präkonditionierung; IPost = Ischämische Postkonditionierung; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung; RIPer = Ischämische Fernperkonditionierung; RIPOst = Ischämische Fernpostkonditionierung.

Der protektive Effekt der nicht-invasiven RIPC konnte durch eine Vielzahl laborexperimenteller Studien gezeigt werden [60-63]. Bereits im Jahr 2006 wurde eine klinische Studie zur RIPC durchgeführt, welche einen protektiven Effekt der präoperativen RIPC bei Kindern untersuchte [64]. Es folgten weitere „*proof-of-concept*“-Studien. Zwei randomisierte, kontrollierte Studien belegen bereits eine kardioprotektive Wirkung der RIPC mit Verbesserung der Prognose [65, 66]. Zwei aktuelle größere Studien zeigen im Gegensatz hierzu keine Verbesserung: RIPHeart ist eine multizentrische Phase III-Studie aus Deutschland, welche den Effekt der

## Einleitung

RIPC an 1385 Patienten, die eine kardiochirurgische Operation durchlaufen haben, untersuchte [67]. Die RIPHeart-Studie konnte keine signifikanten Unterschiede in den primären Endpunkten (Mortalität, Rate an Myokardinfarkten oder ischämischem Schlaganfall) zwischen der RIPC-Gruppe und der CON-Gruppe nachweisen. ERRICA ist eine multizentrische Phase-III Studie aus England, welche den Effekt der RIPC an 1612 Patienten, die eine kardiochirurgische Operation durchlaufen haben, untersuchte [68]. Auch in der ERICCA-Studie wurden keine signifikanten Unterschiede in primären Endpunkten nachgewiesen. Hieraus folgt, dass zum jetzigen Zeitpunkt die Studienlage zur Effektivität der RIPC unklar ist. Der Fokus nachfolgender Untersuchungen ist auf die Wirkmechanismen der RIPC zu legen, um Patientengruppen zu identifizieren, die von einer RIPC profitieren. Im zweiten Schritt können mögliche *Confounder* ermittelt werden, welche die Wirksamkeit der RIPC reduzieren. Durch Elimination der *Confounder* könnte im letzten Schritt die Effektivität der RIPC optimiert werden.

### 1.3.4 Wirkmechanismen der Ischämischen Fernpräkonditionierung

Die Wirkmechanismen der RIPC können in zwei Abschnitte unterteilt werden. Die Freisetzung eines Signals vom peripheren Organ zum Myokard stellt den ersten Abschnitt dar. Der zweite Abschnitt besteht aus der Signaltransduktion an der Zellmembran des Kardiomyozyten bis zu den intrazellulären Zielstrukturen (Abb. 5).

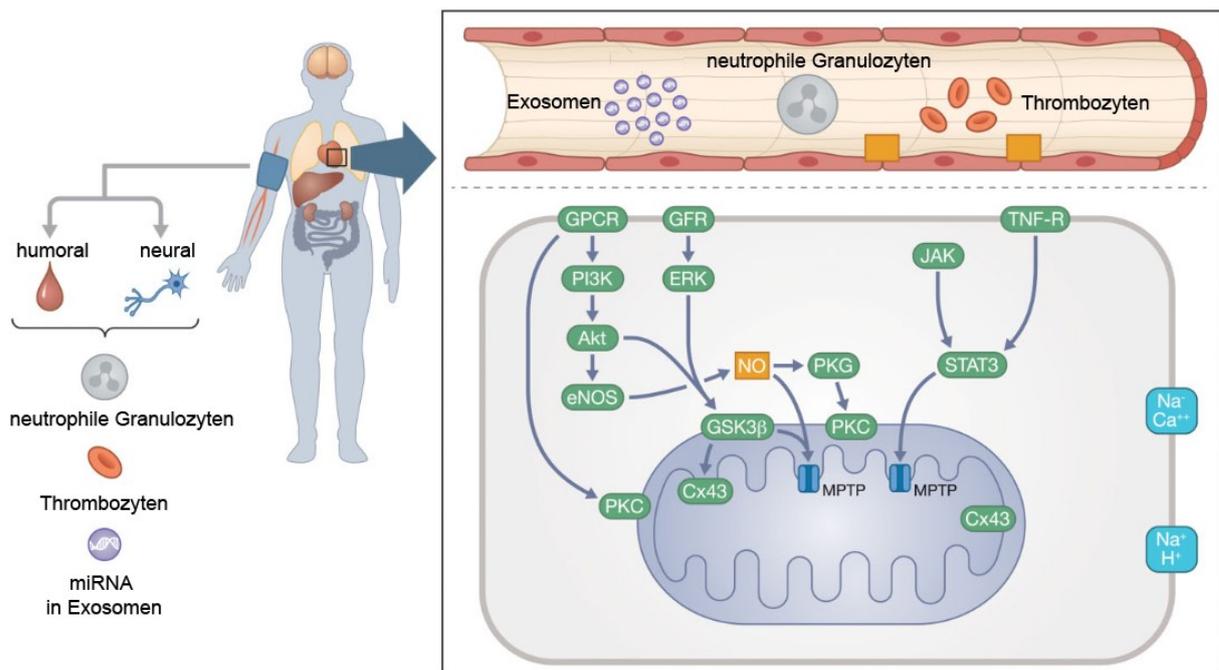
Für die Übertragung des Signals vom peripheren Organ zum Myokard werden drei Mechanismen diskutiert. Erstens beteiligen sich neuronale Verbindungen wie das vegetative Nervensystem und Stimulation afferenter Nerven an der Signalübermittlung [69, 70]. Zweitens treten systemische Reaktionen auf, wie die Modifikation neutrophiler Granulozyten in ihrer Zytokinexpression, Adhäsion und Phagozytose [71] oder die Inhibition einer Thrombozytenaktivierung nach I/R-Schaden [72]. Drittens setzt die RIPC humorale Faktoren frei, die über das Venensystem zum Herzen gelangen [73]. Fokus dieser Arbeit stellen die freigesetzten, humoralen Faktoren nach RIPC dar. Die RIPC modifiziert das Plasmaproteom (Gesamtheit der Plasmaproteine im peripheren Blut) des Menschen und führt zu einer Hoch- oder Herunterregulation von zahlreichen Proteinen [74]. Subanalysen lassen vermuten, dass die beteiligten Faktoren von hydrophober und temperaturlabiler Natur und zwischen 3,5 kDa und 8 kDa groß sind [75, 76]. So sind

## Einleitung

beispielsweise zirkulierendes Nitrit [77] und der *stromal cell-derived factor 1* beteiligt [78]. Auch nanometergroße Exosomen (extrazelluläre Vesikel), die microRNA (miRNA-144) oder Proteine transportieren, können Signale der RIPC zum Myokard übertragen [79].

Da bereits einige Mechanismen der intramyokardialen Signaltransduktion bei der IPC beschrieben wurden, hat sich die Erforschung der Mechanismen der RIPC hieran orientiert [80]. Es wurden multiple Liganden identifiziert, welche an membranständige Rezeptoren der Kardiomyozyten binden: Der Nachweis ist bei Adenosin ( $A_1$ -Rezeptor) [81], Interleukin-10 (späte Phase der RIPC) [82] und *stromal-derived-factor 1* (SDF-1-Rezeptor) [78] erbracht worden. Die RIPC aktiviert den *reperfusion salvage kinase* (RISK)-Signalweg. Der RISK-Signalweg besteht aus mehreren Enzymen, wie *Phosphatidylinositol-3-Kinase* [83], *Akt* (Proteinkinase B) [84], *Extracellular-Regulated Kinase* [85] und *Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$*  [86]. Eine pharmakologische Blockade des RISK-Signalwegs hebt die kardioprotektive Wirkung der RIPC auf [83]. Die Aktivierung der Proteinkinase C $\epsilon$  spielt eine Schlüsselrolle in der RIPC-vermittelten Kardioprotektion [87]. Das Transmembranprotein *Connexin 43*, welches *gap junctions* zwischen Kardiomyozyten bildet, wird beim I/R-Schaden dephosphoryliert. *In vivo* wurde gezeigt, dass die RIPC des Rattenherzens durch Erhalt des *Connexin 43* im phosphorylierten Zustand kardioprotektiv wirkt [88]. Die Rolle des *Survivor Activator Factor Enhancement* (SAFE)-Signalwegs im Fokus der RIPC ist nicht hinreichend untersucht [89]. Gemeinsame Endstrecke der Signalwege stellen eine Aktivierung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle [90] und die Schließung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) dar [91].

## Einleitung



**Abb. 5: Mögliche Wirkmechanismen der Ischämischen Fernpräkonditionierung**

Die kardioprotektiven Signalwege der Ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) verhindern die Öffnung mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP). Eine RIPC der oberen Extremität setzt über humorale Faktoren, neuronale Verbindungen und systemische Reaktionen ein kardioprotektives Signal zum Myokard frei. Die systemischen Effekte beinhalten eine Inhibition der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Zusätzlich werden Exosomen mit microRNA freigesetzt. Hierdurch werden mehrere Signalwege des Kardiomyozyten aktiviert: eNOS/PKG: der Stickstoffmonoxid-abhängige Signalweg besteht aus einem G-Protein gekoppeltem Rezeptor (GPCR), der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und der Proteinkinase G (PKG). Der *Reperfusion-Injury Salvage Kinase* (RISK)- Signalweg besteht aus der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt), und Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β). Der *Survivor Activator Factor Enhancement* (SAFE)- Signalweg besteht aus dem Tumornekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R) und dem *Januskinase - Signal Transducers and Activators of Transcription*-(JAK-STAT)-System. Connexin 43 (Cx43); Proteinkinase C (PKC); *Growth Factor Receptors* (GFR); *Extracellular-Signal Regulated Kinase* (ERK); Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiport; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiport. Modifiziert nach Schmidt et al., 2015 [92]

Die kardioprotektive Wirkung von humoralen Faktoren ist zwischen Herzen einer Spezies übertragbar. Dies zeigte eine Arbeit von Dickson et al. im Jahre 1999, in welcher durch Transfer des koronaren Effluats eines IPC-Herzens zum unbehandelten Herzen eine kardioprotektive Wirkung übertragen wurde [93]. Die kardioprotektive Wirkung von humoralen Faktoren ist auch zwischen verschiedenen Spezies übertragbar. Shimizu et al. haben 2009 gezeigt, dass die nach RIPC beim Menschen entnommenen, humoralen Faktoren am isolierten Kaninchenherz eine kardioprotektive Wirkung entfalten [94].

Die RIPC wurde später als andere Formen der Kardioprotektion entdeckt. Daraus folgt, dass noch viele Forschungsfragen bezüglich der RIPC ungeklärt sind. Um eine

## Einleitung

Translation der RIPC in den klinischen Alltag zu ermöglichen, ist es notwendig, Patientenkollektive zu ermitteln, welche von der Intervention profitieren. Fokus dieser Arbeit stellen geschlechtsspezifische Unterschiede und der Einfluss des Alterns auf die RIPC dar.

### 1.3.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede und der Einfluss des Alterns auf die Ischämische Fernpräkonditionierung

Der Einfluss von geschlechtsspezifischen Unterschieden auf Präkonditionierungsverfahren wird kontrovers diskutiert [95]. Das Myokard prämenopausaler Frauen weist eine erhöhte Toleranz gegenüber einem I/R-Schaden auf, welche nach der Menopause geringer wird [96]. Inwiefern das Geschlecht des älteren Menschen eine Rolle bei der RIPC spielt und ob Unterschiede in der Wirksamkeit dieser Intervention bestehen, ist aktuell noch nicht untersucht worden.

Ein Wirkungsverlust der IPC [97] und IPost [98, 99] durch Altern wurde bereits gezeigt, jedoch ist der Einfluss des Alterns auf die Effektivität der RIPC zum aktuellen Zeitpunkt nicht fokussiert untersucht worden [100].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teilaspekt aus einer größeren Studie zu alters- und geschlechtsspezifischen Unterschieden der RIPC untersucht. In einer anderen Dissertation des Gesamtprojekts aus der Klinik für Anästhesiologie an dem Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) wurde bereits beschrieben, dass das RIPC-Plasma von jungen, männlichen Probanden eine signifikante Infarktgrößenreduktion beim jungen, männlichen Tierherzen hervorruft (Infarktgröße [CON-Plasma, ♂]:  $47 \pm 5\%$ , Infarktgröße [RIPC-Plasma, ♂]:  $31 \pm 10\%$ ). Es traten bei jungen Menschen zusätzlich geschlechtsspezifische Unterschiede auf, denn bei jungen, weiblichen Probanden zeigte sich sowohl beim RIPC-Plasma, als auch beim CON-Plasma eine geringere Infarktgröße als beim jungen, männlichen Probanden (Infarktgröße [CON-Plasma, ♀]:  $33 \pm 10\%$ , Infarktgröße [RIPC-Plasma, ♀]:  $29 \pm 10\%$ ).

Ob die RIPC des älteren Menschen humorale, protektive Faktoren freisetzt, ist aktuell unbekannt. Ob die Freisetzung der humoralen Faktoren geschlechtsspezifischen Änderungen unterliegt, ist bis dato auch unbekannt. Um eine kardioprotektive Wirkung nachzuweisen, wird häufig das isolierte Herz nach Langendorff angewandt, dessen Grundlagen im nachfolgenden Abschnitt erläutert werden.

## 1.4 Das isolierte Herz nach Langendorff

Ein Langendorffherz bezeichnet ein *in vitro* isoliertes Säugetierherz, welches die Myokardphysiologie ohne Einfluss des Gesamtorganismus studierbar macht [101]. Als Grundlage des Langendorffherzens diente das isoliert präparierte Amphibienherz eines Frosches durch Elias von Cyon im Jahre 1866. Die Methodik wurde durch Carl Ludwig und seine Mitarbeiter am Institut für Physiologie in Leipzig weiterentwickelt und eine Translation auf Säugetierherzen versucht [102]. Oscar Langendorff führte als einer der ersten Pioniere 1895-1897 erfolgreich Versuche mit isolierten Säugetierherzen durch [103, 104]. Auch nach 120 Jahren bleibt das isolierte Herz nach Langendorff eine der meist zitierten experimentellen Methoden, um vielfältige Fragestellungen der Myokardphysiologie zu beantworten [105].

Die Vorgehensweise der Langendorffpräparation soll hier kurz erläutert werden: Ein Säugetier wird sediert, das Herz aus dem Organismus entfernt und über die Aorta an eine Kanüle geknotet. Über diese Kanüle fließt eine sauerstoffhaltige Ernährungslösung in die Aorta. Durch den Perfusionsdruck schließt sich die Aortenklappe und die seitlich der Aortenwurzel entspringenden Koronararterien werden retrograd perfundiert. Hierdurch schlägt das Säugetierherz *in vitro* weiter und wird experimentell untersucht. Das Langendorffherz ist die zentrale Methodik dieser vorliegenden Dissertation, mit welcher die Wirkung einer kardioprotektiven Maßnahme auf den I/R-Schaden studiert wird. Im nachfolgenden Abschnitt werden die zentralen Fragen und Ziele dieser Dissertation erläutert.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die IPC, seit mehr als 30 Jahren als einer der stärksten konditionierenden Stimuli bekannt, ist bereits intensiv untersucht worden. Eine kardioprotektive Wirkung durch IPC am isolierten Rattenherzmodell soll durch den Untersucher gezeigt werden. Die Methodik des isolierten Herzens wird hierbei für die Hauptversuche optimiert.

Die RIPC ist ein vielversprechender, physiologischer Mechanismus, der eine Kardioprotektion über kardioprotektive humorale Faktoren beim Menschen vermittelt. Es existieren Hinweise, dass die Wirksamkeit der RIPC im höheren Lebensalter

## Einleitung

abgeschwächt wird. Das Vorliegen von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Freisetzung kardioprotektiver humoraler Faktoren nach RIPC des älteren Menschen ist bisher nicht untersucht worden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Fragen:

1. Führt die IPC des jungen, männlichen Tierherzens *in vitro* zu einer Reduktion der Infarktgröße beim myokardialen I/R-Schaden?
2. Wird durch eine Behandlung des jungen, männlichen Rattenherzens mit RIPC-Plasma des älteren, männlichen Probanden die Infarktgröße beim myokardialen I/R-Schaden *in vitro* reduziert? Führt die Behandlung zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion oder der hämodynamischen Parameter?
3. Wird durch eine Behandlung des jungen, männlichen Rattenherzens mit RIPC-Plasma des älteren, weiblichen Probanden die Infarktgröße beim myokardialen I/R-Schaden *in vitro* reduziert? Führt die Behandlung zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion oder der hämodynamischen Parameter?
4. Beeinflusst das Geschlecht des älteren Probanden den Effekt des RIPC-Plasmas?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde folgender methodischer Ansatz gewählt:

Im ersten Versuchsabschnitt erfahren isolierte Tierherzen an der Langendorff-Anlage randomisiert entweder eine IPC oder keine Intervention (Kontrolle, CON). Hiernach erfolgt ein standardisiertes I/R-Protokoll. Die Infarktgröße der Herzen wird ermittelt und die hämodynamischen Parameter ausgewertet.

Im zweiten Versuchsabschnitt wird zunächst je zehn männlichen und zehn weiblichen Studienprobanden über 60 Jahren Blutplasma vor und nach Durchführung einer RIPC entnommen. Das aufbereitete Blutplasma wird isolierten Tierherzen appliziert. Hiernach erfolgt ein standardisiertes I/R-Protokoll. Die Infarktgröße der Herzen wird ermittelt und die hämodynamischen Parameter ausgewertet.

Um die Infarktgrößen zu ermitteln, werden die Tierherzen mit einer Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Lösung gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch gemessen. Die hämodynamischen Parameter werden mit der Software LabChart aufgezeichnet und ausgewertet.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Ischämische Fernpräkonditionierung und Blutentnahme

Blutdruckmanschette	Manuelles Blutdruckmessgerät R1, Fa. Riester, Jungingen, Deutschland
Blutentnahmeröhrchen	Vacutainer, Zusatz: Lithium-Heparin, Ref-Nr. 366567, PST II, Fa. Becton and Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Zentrifuge	Rotina 420 Zentrifuge, Fa. Hettich, Mülheim an der Ruhr, Deutschland
Venenverweilkanüle	18 G; 1,3 mm x 33 mm; Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Venenstauer	Venenstauer, G2 902, Fa. Prämeta, Seevetal, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Conical Falcon Tube Nr. 352907, 15 ml, Fa. BD Sciences, Bedford, Massachusetts, USA

#### 2.1.2 Langendorff-Anlage

Spezialschlauch für Schlauchpumpe	Tygon Tube R 3607 (3,18 mm Innendurchmesser), Fa. Saint-Gobain, Akron, Ohio, USA
Perfusatschlauch	Tygon Tube 2375 (3,20 mm Innendurchmesser), Fa. Saint-Gobain, Akron, Ohio, USA
Druckaufnehmer	P23XL, Fa. Gould Electronics, Bilthoven, Niederlande
Brückenverstärker	Bridge Amp, 2 Stück, FE221, Fa. AD Instruments, Oxford, England
Schlauchpumpe	Minipuls 3 Peristaltic Pump ML172, Fa. AD Instruments, Oxford, England
Pump-Controller	STH Pump Controller IN175, Fa. AD Instruments, Oxford, England

## Material und Methodik

USB-Datenerfassung	PowerLab 8/35, Fa. AD Instruments, Oxford, England
Offener Wasserbaderhitzer	Julabo EC-5, Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Einhängethermostat	Julabo MW-4, Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Perfusor	Perfusor® Space, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Perfusatflasche	ISO SIMAX 5000 ml, Fa. BDL, Turnov Tschechische Republik
Injektionskanüle	Sterican Gr. 20, 0,4 mm x 20 mm, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Guillotine	Kleintierdekapitator, Modell 7950, Fa. Ugo Basile, Comero, Italien

### 2.1.3 Laborgeräte

Laborwaage	BP 1200, Fa. Sartorius, Göttingen Deutschland
Präzisionswaage	SECURA 224-1S, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646 #4498, Fa. Knick, Berlin-Zehlendorf, Deutschland
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1150 C, Fa. Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Blutgasanalyseautomat	ABL 700, Fa. Radiometer, Willich, Deutschland

### 2.1.4 Pharmaka

Pentobarbital-Injektionslösung	CAS-Nr. 76-74-4 Narcoren® für Tiere, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Heparin-Natrium Injektionslösung	CAS-Nr. 9041-08-1 25.000 I.E., Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland

## Material und Methodik

### 2.1.5 Chemikalien

Natriumchlorid (NaCl)	CAS-Nr.7647-14-5, Reinheit $\geq 99,5\%$ , Fa. Prolabo , Leuven, Belgien
Kaliumchlorid (KCl)	CAS-Nr. 7447-40-7, Reinheit $\geq 99\%$ , Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat ( $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ )	CAS-Nr. 10034-99-8, Reinheit $\geq 99\%$ , Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	CAS-Nr. 7778-77-0, Reinheit $\geq 99\%$ , Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	CAS-Nr. 144-55-8, Reinheit $\geq 99,5\%$ , Fa. Fluka-Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	CAS-Nr. 60-00-4, Reinheit $\geq 98,5\%$ , Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	CAS-Nr. 10043-52-4, Reinheit $\geq 98\%$ , Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glucose (D-Glucose)	CAS-Nr. 14431-43-7, Reinheit $\geq 99,5\%$ , Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laktat (L-Laktat-Natriumsalz)	CAS-Nr. 867-56-1, Reinheit $\geq 99\%$ , Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	CAS-Nr. 298-96-4, Reinheit $\geq 99\%$ , Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	CAS-Nr. 77-86-1, Reinheit $\geq 99,9\%$ , Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37%	CAS-Nr. 50-00-0, Reinheit $\geq 37\%$ , Fa. Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure rauchend 37%	CAS-Nr. 7647-01-0, Reinheit $\geq 37\%$ , Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland

## Material und Methodik

### 2.1.6 Gase

Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>)  
Stickstoff 5.0 (N<sub>2</sub>)

Fa. Linde AG, München, Deutschland  
Fa. Linde AG, München, Deutschland

### 2.1.7 Computer und Software

Aufzeichnungssoftware

LabChart© Pro v. 8.0.5 ADInstruments  
Pty Ltd, Castle Hill, Sydney, Australia

Statistiksoftware

GraphPad© PrismR 6.01 für Windows,  
Graph Pad Software Inc., La Jolla,  
California, USA

Grafiksoftware

Edraw© Max v 7.9.4 EdrawSoft, Sheung  
Wan, HongKong

Planimetriesoftware

SigmaScan© v. 5 SPSS Inc., San Jose,  
California, USA

Flachbettscanner

CanoScan© LIDE 700F,  
Fa. Canon, Krefeld, Deutschland

## 2.2 Methodik

Diese klinisch-experimentelle Studie bestand aus 2 Untersuchungsabschnitten. Im ersten, klinischen Untersuchungsabschnitt wurde bei gesunden Probanden humanes Blutplasma vor und nach Ischämischer Fernpräkonditionierung (*Remote Ischemic PreConditioning*, RIPC) gewonnen. Im zweiten, experimentellen Untersuchungsabschnitt wurde der kardioprotektive Effekt des humanen Blutplasmas am isolierten Rattenherz untersucht.

## 2.3 Ischämische Fernpräkonditionierung

### 2.3.1 Ethikvotum und Rekrutierung der Studienteilnehmer

Ein positives Ethikvotum wurde vor Beginn der Studie eingeholt (Referenznr. 3911). Die Studienteilnehmer wurden über Aushänge angeworben. Die Teilnahme erfolgte freiwillig. Die Studienteilnehmer standen in keinem Abhängigkeitsverhältnis zu den Studienorganisatoren.

### 2.3.2 Screening der Studienteilnehmer

Das Screening der Studienteilnehmer wurde von der Studienärztin Frau Priv.-Doz. Dr. Tanja Meyer-Treschan (Fachärztin, Klinik für Anästhesiologie, UKD) durchgeführt. Freiwillige, die sich als potenzielle Teilnehmer meldeten, wurden zunächst ausführlich über die Art der Studie und die hiermit verbundene Intervention informiert. Es erfolgte eine sorgfältige Anamnese und allgemeine körperliche Untersuchung mit Auskultation, Palpation von Herz, Lungen und Abdomen und eine beidseitige Blutdruckmessung der oberen Extremität. Bei Erklärung des Einverständnisses zur Teilnahme an der Studie, erfolgte ein Screening auf Ein- und Ausschlusskriterien.

### 2.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studienteilnehmer wurden hinsichtlich der unten aufgeführten Einschluss- und Ausschlusskriterien untersucht. Wenn alle Einschlusskriterien zutrafen und kein Ausschlusskriterium vorlag, wurde der entsprechende Teilnehmer zur Studie zugelassen.

#### **Einschlusskriterien:**

- Schriftliches Einverständnis zur Teilnahme
- Alter zwischen 60-80 Jahren
- Altersgerechte körperliche Belastbarkeit
- Voll funktionsfähige obere Extremitäten

#### **Ausschlusskriterien:**

- Fehlendes Einverständnis
- Psychiatrische oder neurologische Störungen
- Schwangerschaft
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit

## Material und Methodik

- Diabetes mellitus
- Hypertonus
- NYHA  $\geq$  II
- Vorbestehende Nervenschäden der oberen Extremitäten
- Vorbestehende thromboembolische Ereignisse
- Raucher (innerhalb der letzten 5 Jahre, > 10 *pack years*)
- Einnahme von Dauermedikation (Ausnahme: L-Thyroxin)
- Einnahme von Akutmedikation innerhalb der letzten 14 Tage
- Chronische Schmerzerkrankungen

### 2.3.4 Datenmanagement

Nur im Falle des schriftlichen Einverständnisses wurden alle im Rahmen der personenbezogenen Screening-Untersuchung erhobenen Daten anonymisiert erfasst und in elektronischer Form gespeichert. Aus den Daten wurde die Demografie der Studienteilnehmer erhoben. Bei Nichtteilnahme an der Studie oder fehlendem Einverständnis wurden keine Daten gespeichert.

### 2.3.5 Aufklärung und Versicherung

Die Studienteilnehmer wurden vor der Intervention ausführlich aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Zum Zeitpunkt der Intervention war für die Probanden eine Wegeversicherung und Haftpflichtversicherung abgeschlossen.

### 2.3.6 Durchführung der Ischämischen Fernpräkonditionierung und Versuchsgruppen

Die Ischämische Fernpräkonditionierung / *Remote Ischemic Preconditioning* (RIPC) wurde ambulant in der Klinik für Anästhesiologie durchgeführt. Der zur Verfügung stehende Untersuchungsraum beinhaltete eine Liege für den Probanden und

## Material und Methodik

Sitzgelegenheiten für das Personal. Sämtliche Geräte zur Überwachung der Herz-Kreislauffunktion (Blutdruck, pulsoxymetrische Sauerstoffsättigung, EKG) sowie ein kompletter Notfallwagen waren vorhanden.

Vor Beginn der Intervention wurden die Studienteilnehmer erneut ausführlich über ihren derzeitigen Gesundheitszustand befragt. Es folgte eine allgemeine körperliche Untersuchung mit orientierender neurologischer Untersuchung, Auskultation von Lungen, Palpation der peripheren Pulse und Blutdruckmessung an beiden Extremitäten.

Die Studienteilnehmer wurden erneut erinnert, die Studie jederzeit, ohne Angabe von Gründen beenden zu können.

Nur wenn der aktuelle Gesundheitszustand unbeeinträchtigt und die orientierende körperliche Untersuchung mitsamt Vitalparametern unauffällig waren, wurde die Intervention durchgeführt.

Die Studienteilnehmer wurden auf einer Liege in 30° Oberkörperhochlagerung positioniert.

Das Protokoll zur Durchführung der Ischämischen Fernpräkonditionierung ist in Abb. 6 zusammengefasst.

Zunächst wurde das *prä*-ischämische Blut entnommen. Hierzu wurde am rechten Arm eine Kubitalvene aufgesucht. Die Haut wurde für 30 Sekunden desinfiziert und unter venöser Stauung mittels 18 G Venenverweilkanüle 50 ml Blut entnommen. Danach wurde am linken Arm eine Blutdruckmanschette angelegt und konstant auf 200 mmHg für fünf Minuten aufgepumpt, um die Ischämie einzuleiten. Zur Reperfusion des Armes wurde die Blutdruckmanschette entlüftet und die Blutzufuhr für fünf Minuten vollständig freigegeben. Dieser Ischämie-Reperfuzyklus wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

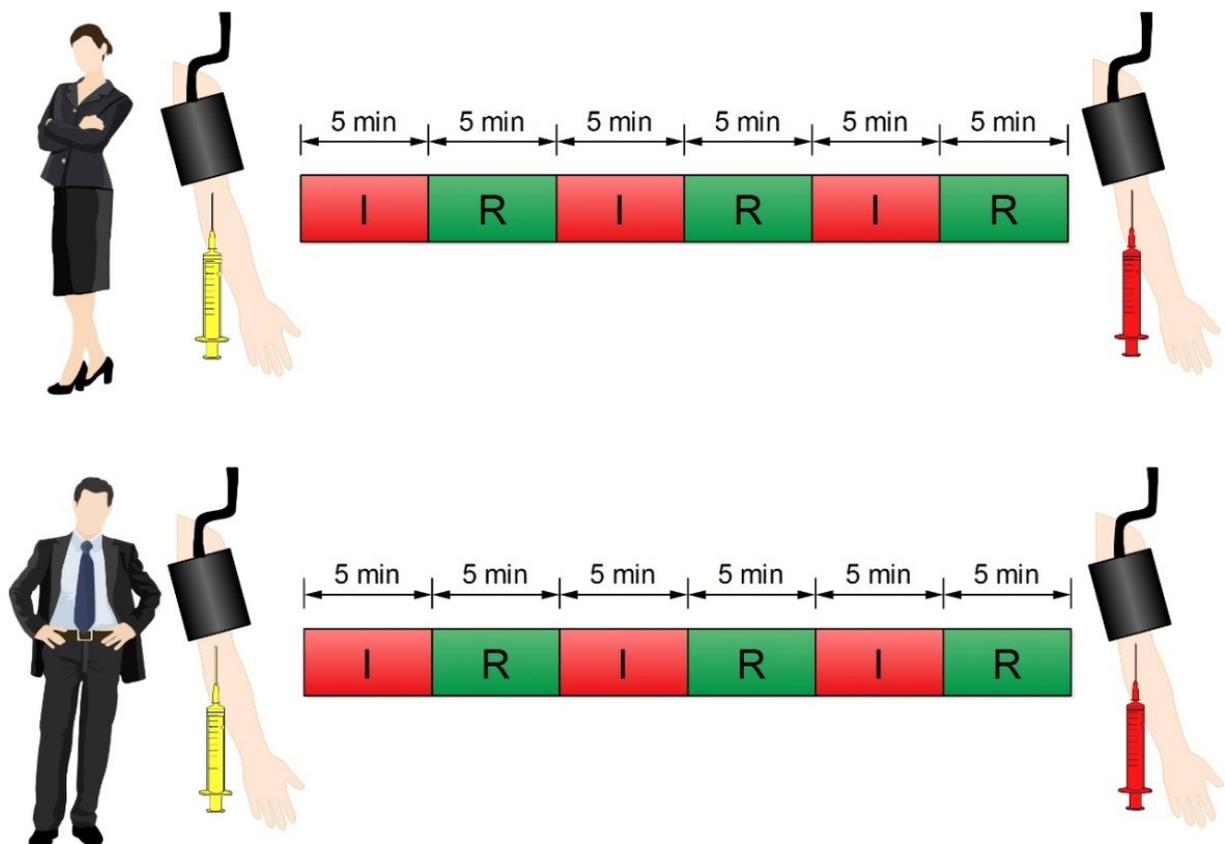
Im Anschluss wurde 50 ml *post*-ischämisches Blut am rechten Arm entnommen. Während der gesamten Intervention war ein Facharzt für Anästhesiologie anwesend. Nach Abschluss der zweiten Blutentnahme wurden erneut Puls und Blutdruck gemessen und die erfassten Werte protokolliert. Bei Wohlbefinden wurde die Venenverweilkanüle entfernt und die Studienteilnehmer aus der Klinik entlassen.

## Material und Methodik

Zur Untersuchung der geschlechtsspezifischen Unterschiede wurde die RIPC an zwei verschiedenen Gruppen mit jeweils 10 Studienteilnehmern durchgeführt:

1. ältere Männer (Einschlussalter 60 – 80 Jahre)
2. ältere Frauen (Einschlussalter 60 – 80 Jahre)

Da bei jedem Studienteilnehmer Plasma vor (d.h. CON-Plasma) und nach RIPC (d.h. RIPC-Plasma) gewonnen wurde, entstanden insgesamt vier Versuchsgruppen (Abb. 6).



**Abb. 6: Ischämische Fernpräkonditionierung an der oberen Extremität**

Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) an jeweils 10 gesunden Frauen (♀) und Männern (♂) über 60 Jahren. Initial erfolgte die Blutabnahme des prä-ischämischen Blutes als Kontrolle (CON-Plasma) am rechten Arm. Danach wurden mittels Blutdruckmanschette 3 Zyklen mit je 5 Minuten Ischämie und Reperfusion am linken Arm durchgeführt (I/R). Hiernach erfolgte die Abnahme des post-ischämischen Blutes (RIPC-Plasma). Es entstanden insgesamt 4 verschiedene Gruppen von Blutplasmen (2 Untersuchungsgruppen (♀, ♂) mit 2 Untersuchungszeitpunkten (CON-Plasma, RIPC- Plasma); n=10 pro Gruppe).

### 2.3.7 Gewinnung von humanem Blutplasma

Die Lithium-Heparin-Blut Röhrchen wurden unmittelbar nach Abschluss der RIPC-Intervention bei 4°C und 4000 RCF für 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Blutplasma wurde in Falcon-Röhrchen pipettiert und bis zur weiteren Verwendung im Versuch bei -80°C eingefroren. Bei drei Studienteilnehmern zeigten zwei der insgesamt neun Plasmaproben nach Zentrifugation Zeichen der Hämolyse. Die hämolytischen Blutproben wurden verworfen. Für die Versuche wurde ausschließlich nicht-hämolysiertes Blutplasma verwendet. Die Probanden mussten nicht wiedereinbestellt werden.

### 2.3.8 Nachsorge der Studienteilnehmer

Für Fragen oder im Falle des Auftretens von Komplikationen stand Frau Priv.-Doz. Dr. Meyer-Treschan den Studienteilnehmern tagsüber zur Verfügung. An Abenden sowie an Wochenenden und Feiertagen war der diensthabende Anästhesist jederzeit erreichbar. Während der Durchführung der Studie traten keine Komplikationen auf.

## 2.4 Untersuchungen des kardioprotektiven Effekts

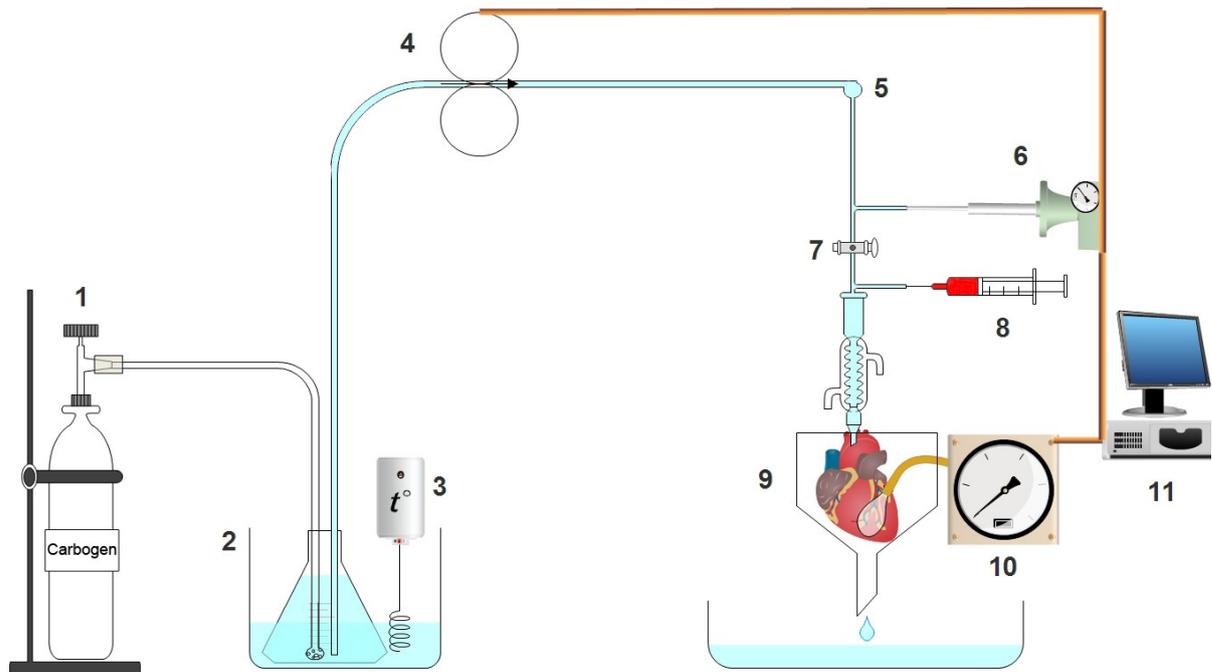
### 2.4.1 Versuchstiere

Für die Organentnahmen dieser experimentellen Studie (internes Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf: O 27/12) wurden insgesamt 60 männliche WISTAR-Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich) verwendet. Die Ratten waren durchschnittlich 2 Monate alt und das Körpergewicht betrug  $275 \pm 25$  g. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens 7 Tage in der ZETT unter standardisierten Bedingungen gehalten und es erfolgten regelmäßige, tierärztliche Kontrollen. In den spezifisch-pathogen-freien (SPF) Haltungsräumen herrschte eine Raumtemperatur von 22 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$ . Die Tiere wurden in Käfigen gehalten, welche mit dem entkeimten und entstaubten Weichholzgranulat Lignocel® 3-4 (J. Rettenmaier und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) eingestreut waren. Den Ratten stand *ad libitum* Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (R/M-H V1534-0 10 mm Pellets, ssniff

Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und keimfreies, mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 angesäuertes Wasser zur Verfügung.

### 2.4.2 Präparation und isolierte Perfusion des Rattenherzens

Vor Beginn der Untersuchungen hatte ich bereits einen Fachkundenachweis der Versuchstierkunde erbracht. Die Versuche habe ich selbstständig durchgeführt. Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen und mit 60 mg/kg Pentobarbital i.p. sediert. Zur Antikoagulation wurden 1000 I.E. Heparin i.p. injiziert. Bei tiefer Sedierung und erloschenen Schutzreflexen wurde das Tier in einer Guillotine dekapitiert und das Herz über eine mediane Thorakotomie an der Herzbasis exziiert. Das Herz wurde über die Aorta an die Kanüle der Langendorff-Anlage festgeknotet (Abb. 7). Die Koronararterien wurden druckkontrolliert (MAD = 80 mmHg) mit einem modifizierten Krebs-Henseleit Puffer (enthält in *Aqua destillata* (in mM): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,25 NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 EDTA, 2,25 CaCl<sub>2</sub>, 11 Glucose, 1 Laktat) bei 37,8 ± 0,2°C perfundiert. Die Temperatur des Herzens wurde durch externe Wärmekreisläufe und eine Wärmekammer konstant gehalten. Der Puffer wurde kontinuierlich über eine Fritte mit Carbogen (200 mL/min) begast, wodurch der Puffer oxygeniert und der pH auf 7,4 ± 0,05 angeglichen wurde. Über einen Schnitt am linken Vorhofsohr des Herzens wurde ein Ballon über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Der Ballon wurde mit isotoner (0,9%) Kochsalzlösung befüllt, bis der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVP<sub>dia</sub>) auf 4 ± 2 mmHg eingestellt war. Über den intraventrikulären Ballon und die Aortenkanüle an jeweils einem Druckaufnehmer wurde die mechanische Herzaktion mit PowerLab mit einer Abtastrate von 2000 Hz in LabChart® aufgezeichnet. Anhand der Rotationsgeschwindigkeit der Schlauchpumpe konnte orientierend der *Coronary Flow* (CF) errechnet werden. Aus dem Koronarvenensinus des Herzens herausgeflossener Krebs-Henseleit-Puffer (koronares Effluat) wurde gesammelt und gewogen, um den exakten Koronarfluss zu bestimmen. Das koronare Effluat wurde nicht erneut zur Perfusion des Herzens verwendet (*non circulating, constant pressure* Langendorff-System).



**Abb. 7: Langendorff-Anlage**

Aufbau der Langendorff-Anlage: Krebs-Henseleit-Puffer wurde mit Carbogen begast und pH-äquilibriert (1). Der Puffer wurde durch ein Wasserbad (2) mit Einhängethermostat (3) erhitzt und über eine Schlauchpumpe (4) angesaugt. Luftbläschen wurden mittels Luftfalle entfernt (5). Über einen Druckaufnehmer wurde eine konstante Perfusion erreicht (6). Die Temperatur des Puffers wurde über einen zweiten Wärmekreislauf konstant gehalten, die Perfusion konnte über einen Hahn abgestellt werden (7). Über Dreiwegehähne war ein Perfusor zur kontinuierlichen Gabe des Blutplasmas angeschlossen (8). Das Herz wurde an die Kanüle geknotet und perfundiert, während die Umgebungstemperatur des Herzens mit einer Wärmekammer konstant gehalten wurde (9). Die Hämodynamik des Versuchsherzens wurde mit einem linksventrikulären Ballon mit angeschlossenem Druckaufnehmer kontinuierlich aufgezeichnet (10). Die Druckaufnehmer und die Pumpe waren mit einer PowerLab-Station verbunden (11), um die Perfusionsparameter einzustellen.

Über einen Perfusor war die Applikation von Blutplasma in den Koronarkreislauf möglich. Für die statistische Auswertung der Hämodynamik wurden jeweils alle im Intervall von 30 s stattfindenden Herzaktionen zu fest definierten Zeitpunkten arithmetisch gemittelt. Die hämodynamischen Parameter der myokardialen, isovolumetrischen Herzfunktion HR (Herzfrequenz),  $LVP_{\text{sys}}$  (linksventrikulärer systolischer Druck),  $LVP_{\text{dia}}$  (linksventrikulärer enddiastolischer Druck), LVDP (linksventrikuläre Druckdifferenz),  $dP/dt_{\text{Max}}$  (maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit),  $dP/dt_{\text{Min}}$  (minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit), CF (Koronarfluss) und RPP (*rate pressure product*) wurden extrahiert. Arrhythmische Herzaktionen und Artefakte wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. In der Ischämie entwickelte das Herz aufgrund eines Myokardschadens mit Versteifung des

## Material und Methodik

linken Ventrikels eine ischämische Kontraktur. Das Kontrakturmaximum (in mmHg) und der zugehörige Zeitpunkt (in Minuten ab Ischämiebeginn) wurden erhoben und ausgewertet.

### 2.4.3 Nachweis des protektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung

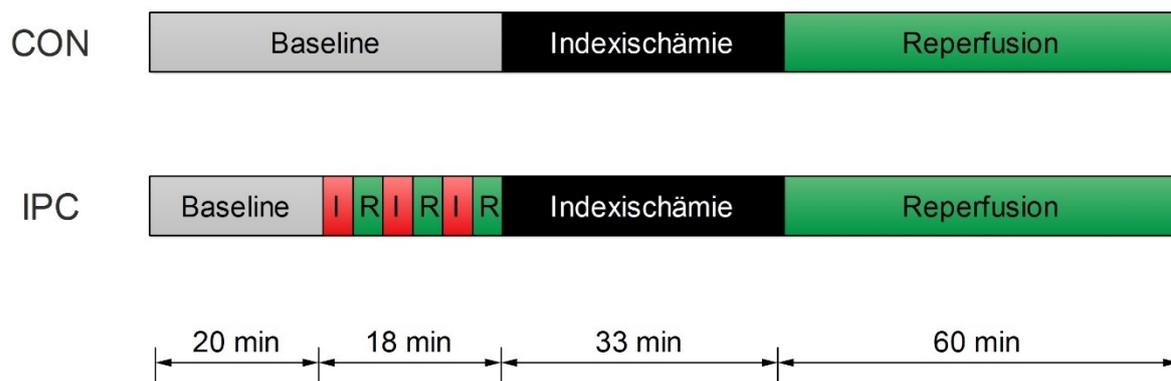
Vor Untersuchung des kardioprotektiven Effekts des Probandenplasmas erfolgte die Durchführung von separaten Experimenten. Diese umfassten zwei randomisierte Gruppen mit je zehn Herzen (n=10). Untersucht wurde der Nachweis des kardioprotektiven Effekts der Ischämischen Präkonditionierung (IPC) bei einer Ischämie am isolierten Rattenherz. Bei der zugehörigen Kontrollgruppe (CON) wurde keine Intervention durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten der Wirksamkeitsprüfung einer kardioprotektiven Intervention am isolierten Rattenherzen und der Optimierung der Methodik für die Hauptversuche.

Die Herzen durchliefen an der Langendorff-Anlage eine 20-minütige Einpendelungsphase (Baseline), in der sich das Herz an die *in vitro* Bedingungen anpassen konnte (Abb. 8).

Bei den CON-Herzen fand für weitere 18 Minuten keine Intervention statt.

Für die Ischämische Präkonditionierung (IPC) wurde die Perfusion des Herzens für 3 Minuten gestoppt (*no flow*-Ischämie) und anschließend 3 Minuten Reperfusion eingeleitet. Dieser Zyklus von I/R wurde insgesamt dreimal wiederholt. Als nächstes durchliefen alle Herzen eine 33-minütige *no flow*-Ischämie. Um eine Diffusion von Sauerstoff der Raumluft in das isolierte Rattenherz zu verhindern, wurde die Wärmekammer mit auf  $37,8^{\circ} \pm 0,2$  °C gewärmtem und mit Stickstoff begasten Krebs-Henseleit-Puffer aufgefüllt.

## Material und Methodik



**Abb. 8 : Versuchsablauf der Gruppen CON und IPC**

Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Gruppen Ischämische Prädiktionierung (IPC) und Kontrolle (CON) (je n=10). Nach 20 Minuten Baseline fand in der IPC-Gruppe 3x3 Minuten globale *no flow*-Ischämie und Reperfusion statt. Bei der CON-Gruppe wurde 18 Minuten keine Intervention durchgeführt. Hiernach durchliefen beide Gruppen 33 Minuten globale *no flow*-Ischämie und 60 Minuten Reperfusion.

Nach der Ischämie durchliefen alle Herzen eine 60-minütige Reperfusion. Hierfür wurde der Ischämie-Puffer aus der Wärmekammer abgelassen und die Koronarperfusion wieder freigegeben. Das Herz musste spätestens ab der 45. Minute für 15 Minuten ununterbrochen schlagen. Schlug das Herz innerhalb dieses Zeitraums nicht, wurde es nachträglich von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Nach Versuchsende wurden die Herzen unmittelbar bei -20°C bis zur späteren Färbung eingefroren.

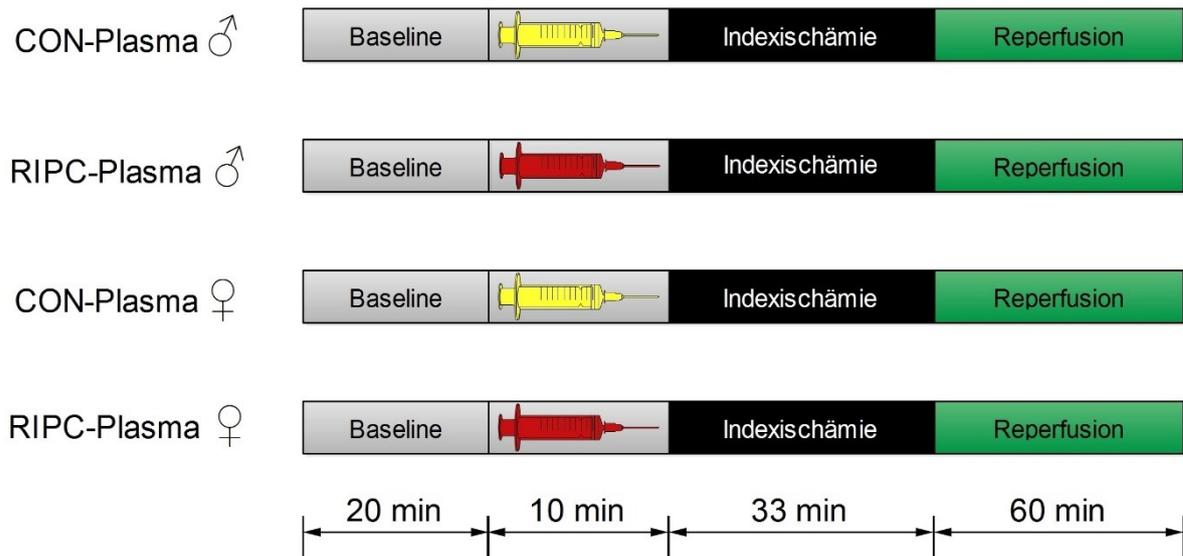
### 2.4.4 Untersuchung des protektiven Effekts des Plasmas gesunder Probanden

In der Hauptversuchsreihe wurden die Plasmaproben der Studienteilnehmer am Rattenherz vor der Ischämie appliziert, um einen möglichen kardioprotektiven Effekt nachzuweisen. Es wurden jeweils das CON- und RIPC-Plasma der weiblichen und männlichen Studienteilnehmer untersucht, wodurch sich vier Gruppen (n=10) ergaben. Diese Versuche wurden randomisiert und verblindet durchgeführt (Abb. 9).

Nach 20 Minuten Baseline erfolgte die Gabe des CON-Plasmas oder RIPC-Plasmas eines weiblichen oder männlichen Studienteilnehmers für 10 Minuten über einen Perfusor. Die Flussrate des Blutplasmas über den Perfusor war abhängig vom CF

## Material und Methodik

des Herzens. In der letzten Minute der Baselinephase wurde der CF bestimmt und die Flussrate des Perfusors auf 0,5% des CF festgelegt.



**Abb. 9: Versuchsablauf der RIPC-Gruppen**

Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der RIPC-Versuchsgruppen (je n=10). Alle Herzen durchliefen eine Baseline von 20 min, dann fand die Gabe des jeweiligen Plasmas mit 0,5% des Koronarflusses für 10 Minuten statt. Hiernach durchliefen alle Herzen 33 min globale *no flow*-Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. ♂ = Männer; ♀ = Frauen; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung; CON = Kontrolle.

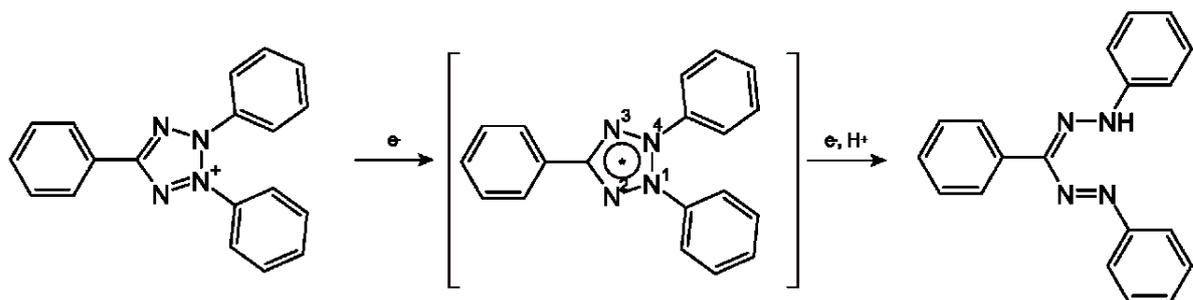
Alle Herzen durchliefen nach Baseline und Plasmagabe eine 33-minütige *no flow*-Ischämie. Um eine Diffusion von Sauerstoff der Raumluft in das isolierte Rattenherz zu verhindern wurde die Wärmekammer mit auf  $37,8^\circ \pm 0,2^\circ \text{C}$  gewärmtem und mit Stickstoff begastem Krebs-Henseleit-Puffer aufgefüllt.

Nach der Ischämie durchliefen alle Herzen eine 60-minütige Reperfusion. Der Ischämie-Puffer wurde hierfür aus der Wärmekammer abgelassen und die Koronarperfusion wieder freigegeben. Das Herz musste spätestens ab der 45. Minute für 15 Minuten ununterbrochen schlagen. Schlug das Herz innerhalb dieses Zeitraums nicht, wurde es nachträglich von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Das Herznassgewicht wurde nach Versuchsende bestimmt und die Herzen unmittelbar bei  $-20^\circ \text{C}$  bis zur späteren Färbung eingefroren.

### 2.4.5 Färbung der Rattenherzen

Die Herzen wurden mit einem Skalpell in gleichmäßig große, etwa 2 mm dicke, axiale Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden mit einer 0,75%igen Triphenyltetrazoliumchlorid-(TTC)-Lösung in 115 mM Trishydroxymethylamino-methan-(TRIS)-Puffer für 15 min bei pH 7,42 und 37°C gefärbt. Direkt im Anschluss folgte die Fixierung in 4%iger Formaldehyd-Lösung bei pH 7,4 und 20°C für 4 Stunden. Anschließend wurden die Herzscheiben als hochauflösende Bilddatei eingescannt. Die Herzscheiben wurden 7 Tage lang unter einem Abzug getrocknet und anschließend das Herztrockengewicht bestimmt.

Bei dem Redox-Farbstoff TTC handelt es sich um eine quartäre Ammoniumverbindung. Die farblose TTC-Lösung enthält Tetrazolium-Kationen, welche durch vitale Zellen des Myokards mittels Dehydrogenasen zu rotem Formazan reduziert werden (Abb. 10). So wurde vitales Myokard rot gefärbt, während infarziertes Gewebe nicht gefärbt wurde und weiß blieb.

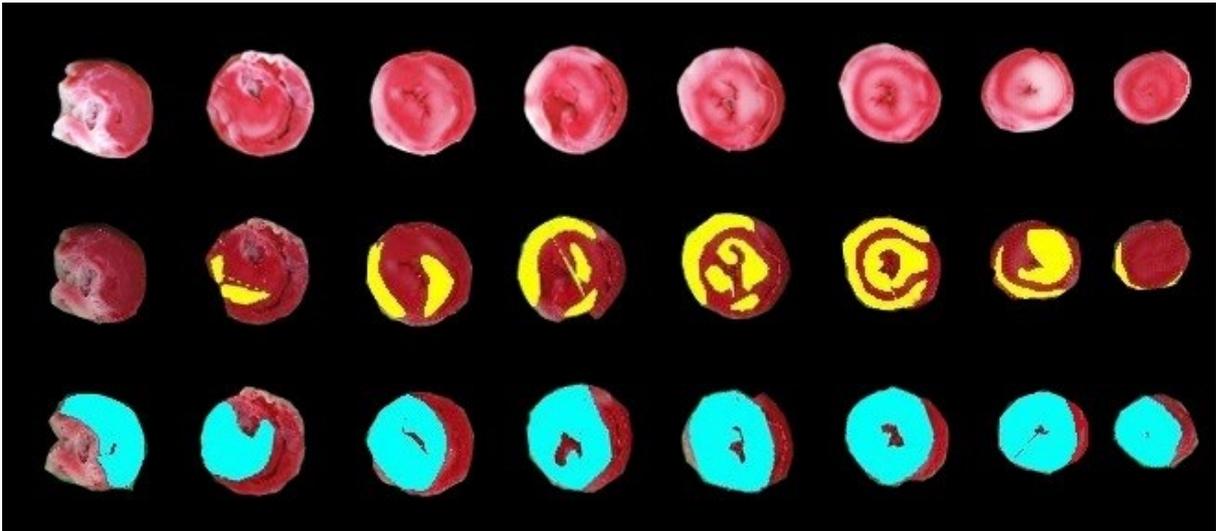


**Abb. 10: Reduktion des Triphenyltetrazoliumchlorid durch Dehydrogenasen zu Formazan**

Das farblose Tetrazolium-Kation (links) wird durch zelluläre Dehydrogenasen des Myokards über ein Tetrazolium-Radikal (mittig) zu rotem Formazan (rechts) reduziert.

Die Planimetrie erfolgte mit der Software SigmaScan®. Die Farbsättigung und Kontrastierung der Bilddateien wurde digital um 30% erhöht, um die visuelle Differenzierung zwischen infarziertem und vitalem Gewebe zu erleichtern.

Anschließend wurden alle infarzierten Flächen (IS = *infarct size*) des linken Ventrikels umfahren und zur Gesamtfläche des linken Ventrikels (AAR) in Relation gesetzt (Abb. 11). Der hieraus resultierende Quotient wurde für alle Herzscheiben arithmetisch gemittelt und somit die durchschnittliche Infarktgröße jedes Herzens bestimmt. Jedes Herz wurde von zwei verblindeten, voneinander unabhängigen Untersuchern gegengezeichnet.



**Abb. 11: Planimetrie eines Rattenherzens nach Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung**

Acht Herzscheiben wurden von Basis (links) nach Apex (rechts) sortiert. Im ersten Schritt wurde die Fläche der Infarktareale gelb gekennzeichnet (mittlere Reihe). Im zweiten Schritt wurde die Fläche des gesamten linken Ventrikels blau gekennzeichnet (untere Reihe). Das Verhältnis der Summe der Infarktflächen zur Gesamtfläche des linken Ventrikels ergab die Infarktgröße in %.

#### 2.4.6 Statistische Auswertung

Der primäre Endpunkt der *in vitro* Versuche am isolierten Rattenherz ist die Infarktgröße. Die erforderliche Gruppengröße, um einen Unterschied zwischen zwei Gruppen zu detektieren, wurde mittels der Software SigmaStat© berechnet.

Ergebnisse aus vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ließen eine minimale Differenz des myokardialen Zellschadens von 15% und eine Standardabweichung von 10% erwarten. Bei einer gewünschten Power von 0,8 mit insgesamt vier Versuchsgruppen wurde eine Gruppengröße von zehn Tieren pro Gruppe berechnet. Diese Gruppengröße war notwendig, um Veränderungen der Infarktgröße statistisch absichern zu können. Somit wurden für diese Dissertation 20 Studienteilnehmer (je zehn ältere Männer und zehn ältere Frauen) eingeschlossen. Von jedem Studienteilnehmer wurde CON- (= Zeitpunkt vor RIPC) sowie RIPC-Plasma (= Zeitpunkt nach RIPC) gewonnen.

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism Version 6 (Firma GraphPad Software Inc.) durchgeführt.

Alle Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD).

Die Parameter der Versuchstiere (Körpergewichte, Herzgewichte, ischämische Kontrakturmaxima, Zeitpunkte der ischämischen Kontraktur und Dekapitations-

## Material und Methodik

Perfusionszeiten) wurden mittels zweiseitigem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft.

Die Infarktgrößenunterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einem zweiseitigen Student's t-Test ausgewertet. Die hämodynamischen Parameter wurden mit einem zweiseitigen Student's t-Test ausgewertet und bei multiplen Vergleichen nach Sidak-Bonferroni korrigiert. Für alle Testverfahren galt: Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ischämische Präkonditionierung

#### 3.1.1 Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt der IPC auf Herzgewichte und Ischämieparameter

Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Körpergewichte und Herzgewichte zwischen beiden Gruppen Kontrolle (CON) und IPC (Tabelle 1). Die Dekapitations-Perfusionszeiten (DPZ) wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Während der globalen Ischämie hingegen zeigte sich eine signifikante Reduktion des ischämischen Kontrakturmaximums der IPC-Gruppe im Vergleich zur CON-Gruppe ( $p < 0,05$ ), jedoch kein signifikanter Unterschied der Kontrakturzeiten (Tabelle 2).

**Tabelle 1: Körpergewichte und Herztrockengewichte der CON- und IPC-Gruppe**

Gruppe	Körpergewicht [g]	Herztrockengewicht [mg]
CON	258 ± 18	153 ± 19
IPC	254 ± 12	150 ± 10

Angegeben sind die Körpergewichte der Tiere und das isolierte Herzgewicht nach Trocknung für 7 Tage. Das Herznassgewicht wurde hier nicht erhoben. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD.  $n=10$  pro Gruppe. CON = Kontrolle; IPC = Ischämische Präkonditionierung. Es gab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Tier- und Herzgewichte.

**Tabelle 2: Ischämieparameter der CON- und IPC-Gruppe**

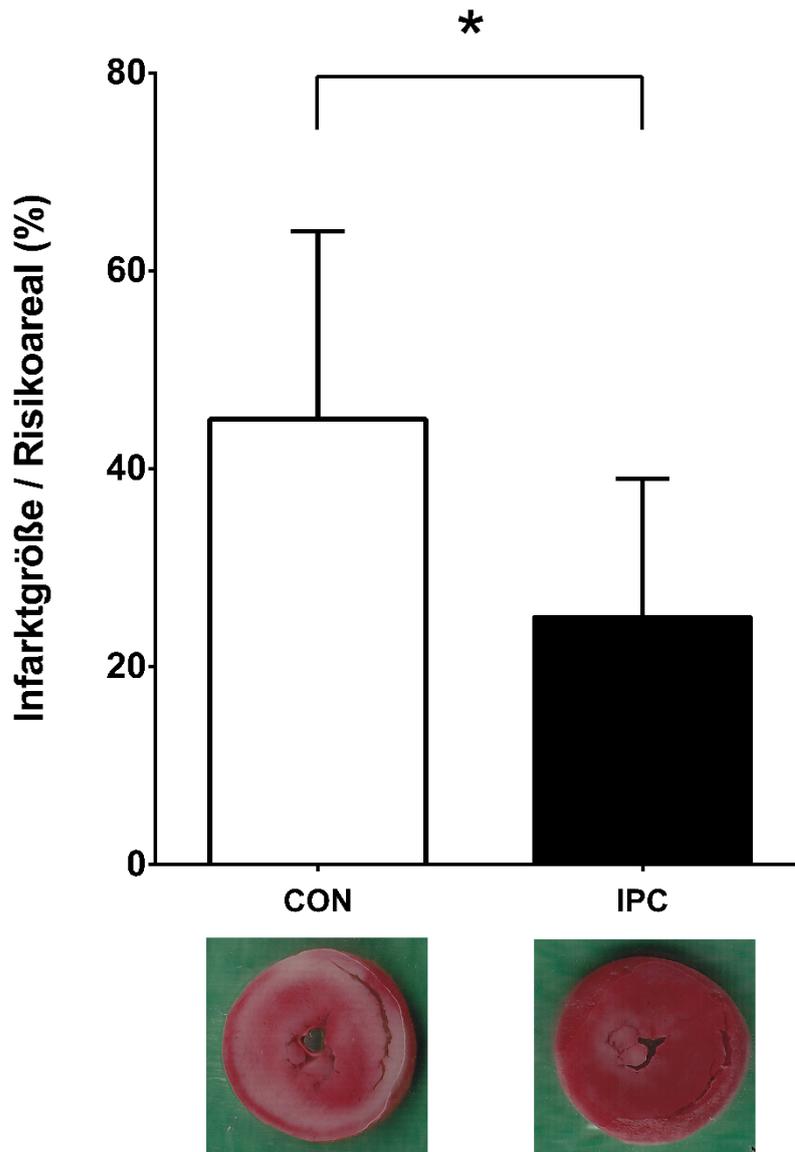
Gruppe	DPZ [min]	Kontraktur [mmHg]	Kontrakturzeit [min]
CON	3 ± 0,3	59 ± 8	14 ± 1
IPC	3 ± 0,3	42 ± 9 *	15 ± 2

Die Zeit von Dekapitation des Tieres bis zur isolierten Perfusion des Herzens an der Langendorff-Anlage wurde bestimmt. Während der globalen Ischämie des Herzens wurden maximale Kontraktur und der zugehörige Zeitpunkt durch einen im linken Ventrikel einliegenden Ballon bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD.  $n=10$  pro Gruppe. CON = Kontrolle; IPC = Ischämische Präkonditionierung. Bezüglich der Dekapitations-Perfusions-Zeiten (DPZ) gab es keine signifikanten Unterschiede. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem ischämischen Kontrakturmaximum von CON und IPC im t-Test ( $*p < 0,05$  vs. CON). Die Kontrakturzeiten waren nicht signifikant unterschiedlich.

## Ergebnisse

### 3.1.2 Effekt der IPC auf die Infarktgröße

Die Infarktgröße der Kontrollgruppe (CON) betrug  $45 \pm 19$  %, die Infarktgröße der IPC-Gruppe hingegen  $25 \pm 14$  %. So führte die IPC zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 12).



**Abb. 12: Infarktgrößen der CON- und IPC-Gruppe**

Isolierte Tierherzen wurden randomisiert einer Kontrolle (CON) oder IPC (3 Zyklen x 3 min Ischämie/Reperfusion) zugeordnet. Hiernach erfolgten 33 min globale Ischämie und 60 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit 0,75% TTC gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch berechnet (angegeben als Infarktgröße zu Risikoareal in %). Je eine repräsentative Herzscheibe der Gruppe wurde zum optischen Vergleich angegeben. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.  $n=10$  pro Gruppe. IPC = Ischämische Präkonditionierung. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Infarktgröße zwischen CON und IPC (\* $p<0,05$  vs. CON) im t-Test.

## Ergebnisse

### 3.1.3 Effekt der IPC auf die Hämodynamik

Die hämodynamischen Parameter sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst. In beiden Gruppen zeigten sich während der Baseline keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären systolischen und diastolischen Druck, die Druckdifferenz und die Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeiten. Auch der Koronarfluss und das *Rate Pressure Product* zeigten keine signifikanten Unterschiede während der Baseline.

In der IPC-Gruppe kam es nach Abschluss des IPC-Protokolls zu einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären systolischen Druckes, der linksventrikulären Druckdifferenz, den Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten im Vergleich zur CON-Gruppe. Nach Intervention wurde in der IPC-Gruppe ein tendenziell höherer Koronarfluss beobachtet, welcher jedoch nicht statistisch signifikant abgesichert werden konnte ( $p=0,06$ ).

Sowohl 45 als auch 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion zeigten sich deutlich verbesserte hämodynamische Parameter in der IPC-Gruppe. So konnten eine signifikant höhere Druckdifferenz und größere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten festgestellt werden. Der linksventrikuläre, diastolische Druck war während der Reperfusionsphase signifikant reduziert. Während der Reperfusionsphase wurden bezüglich des Koronarflusses und des *Rate Pressure Products* keine signifikanten Unterschiede registriert.

Zusätzlich konnten innerhalb der einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede zwischen der Baseline und den anderen Messzeitpunkten nachgewiesen werden. So war innerhalb beider Gruppen in der Reperfusionsphase der linksventrikuläre systolische Druck signifikant erniedrigt und der linksventrikuläre diastolische Druck signifikant erhöht. Hierdurch reduzierte sich die linksventrikuläre Druckdifferenz signifikant während der Reperfusionsphase. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten und das *Rate Pressure Product* waren während der Reperfusionsphase in beiden Gruppen signifikant erniedrigt, während Herzfrequenz und Koronarfluss nicht signifikant verändert waren. Zusätzlich konnten nach Intervention in der IPC-Gruppe eine signifikante Reduktion der linksventrikulären Funktion (LVP<sub>sys</sub>, LVDP, dP/dt<sub>Max</sub>, dP/dt<sub>Min</sub>) und eine signifikante Erhöhung des Koronarflusses gezeigt werden, die in der CON-Gruppe nicht auftraten.

## Ergebnisse

**Tabelle 3: Hämodynamische Daten der CON- und IPC-Gruppe**

Messparameter	Baseline	Nach Intervention	Reperfusion 45	Reperfusion 60
<b>Herzfrequenz (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>				
CON	322 ± 36	323 ± 48	307 ± 28	311 ± 29
IPC	325 ± 48	341 ± 37	297 ± 50	301 ± 47
<b>LVPsys (mmHg)</b>				
CON	119 ± 10	117 ± 12	95 ± 4 §	94 ± 4 §
IPC	126 ± 16	97 ± 17 * §	108 ± 13 *	105 ± 12 §
<b>LVPdia (mmHg)</b>				
CON	3 ± 1	3 ± 1	77 ± 6 §	75 ± 6 §
IPC	4 ± 1	5 ± 2	54 ± 10 * §	53 ± 10 * §
<b>LVDP(mmHg)</b>				
CON	117 ± 10	114 ± 11	19 ± 6 §	19 ± 7 §
IPC	122 ± 16	92 ± 16 * §	54 ± 14 * §	51 ± 10 * §
<b>dP/dtMax (mmHg/s)</b>				
CON	3951 ± 600	4139 ± 522	684 ± 174 §	719 ± 202 §
IPC	4425 ± 743	2993 ± 518 * §	2136 ± 672 * §	2127 ± 499 * §
<b>dP/dtMin (mmHg/s)</b>				
CON	-3032 ± 314	-3029 ± 350	-551 ± 100 §	-564 ± 98 §
IPC	-3043 ± 545	-2015 ± 290 * §	-1324 ± 293 * §	-1230 ± 200 * §

Isolierte Tierherzen durchliefen an einer Langendorff-Anlage eine Stabilisierungsphase von 20 min (Baseline). Es wurden randomisiert 3 Zyklen x 3 min Ischämie/Reperfusion als Ischämische Präkonditionierung (IPC) oder Kontrolle (CON) durchgeführt, hiernach erfolgten 33 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Zu definierten Zeitpunkten wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz, linksventrikuläre Drücke (LVPsys, LVPdia, LVDP), Kontraktions (dP/dtMax) - und Relaxationsgeschwindigkeiten (dP/dtMin) gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. IPC= Ischämische Präkonditionierung. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test. \*p<0,05 vs. CON; §p<0,05 vs. Baseline.

## Ergebnisse

**Tabelle 4: Koronarflüsse und *Rate Pressure Products* der CON- und IPC-Gruppe**

Messparameter	Baseline	Nach Intervention	Reperfusion 45	Reperfusion 60
<b>CF (mL/min)</b>				
CON	16 ± 5	17 ± 7	13 ± 4	13 ± 5
IPC	16 ± 6	22 ± 4 §	11 ± 3	11 ± 3
<b>RPP (mmHg/min)</b>				
CON	38511 ± 5778	37752 ± 7062	29216 ± 2505 §	29148 ± 2322 §
IPC	40752 ± 7241	32913 ± 5205	31920 ± 4754 §	31396 ± 4991 §

Isolierte Tierherzen durchliefen an einer Langendorff-Anlage eine Stabilisierungsphase von 20 min (Baseline). Es wurden randomisiert 3 Zyklen x 3 min Ischämie/Reperfusion als Ischämische Präkonditionierung (IPC) oder Kontrolle (CON) durchgeführt, hiernach erfolgten 33 min Ischämie und 60 min Reperfusion. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Koronarflüsse und die *Rate Pressure Products* gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. IPC= Ischämische Präkonditionierung. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test.; §p<0,05 vs. Baseline.

## 3.2 Ischämische Fernpräkonditionierung

### 3.2.1 Demografie der Probanden

Die Demografie der Probanden der RIPC-Plasmastudie ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Hinsichtlich Alter und Blutdruck zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Jedoch wiesen die weiblichen Probanden signifikant geringere Körpergrößen und Körpergewichte auf. Zusätzlich wurde ein signifikant höherer BMI der weiblichen Probanden nachgewiesen.

**Tabelle 5: Demografie der 20 RIPC-Studienprobanden**

Gruppe	Alter [a]	Größe [m]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	RRsys [mmHg]	RRdia [mmHg]
♂	69 ± 7	1,78 ± 0,06	84 ± 11	23 ± 3	136 ± 13	77 ± 7
♀	67 ± 4	1,63 ± 0,04*	61 ± 8*	26 ± 3*	140 ± 22	77 ± 9

Dargestellt sind das Alter, die Körpergröße, das Körpergewicht, der Body Mass Index (BMI) und der nicht-invasiv gemessene systolische und diastolische Blutdruck (RRsys, RRdia) am Tag der Durchführung der Ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) zur Gewinnung von Blutplasmen. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben (n=10 pro Gruppe). ♂ = Männer; ♀ = Frauen. Der angegebene Blutdruck wurde vor Durchführung der RIPC gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test. (\*p<0,05 vs. männliche Studienteilnehmer).

## Ergebnisse

### 3.2.2 Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf Herzgewichte und Ischämieparameter

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpergewichte sowie Herznass- und trockengewichte zwischen den Gruppen, die mit CON- oder RIPC-Plasma der männlichen Probanden behandelt wurden (Tabelle 6). Bezüglich der Dekapitations-Perfusionszeiten (DPZ) sowie den Zeitpunkten und Maxima der ischämischen Kontrakturen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 7).

**Tabelle 6: Körpergewichte, Herznass- und trockengewichte der Versuchstiere der CON- und RIPC-Gruppe von männlichem Probandenplasma**

Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Herznassgewicht [g]	Herztrockengewicht [mg]
CON ♂	276 ± 28	1,4 ± 0,1	159 ± 22
RIPC ♂	277 ± 24	1,4 ± 0,2	154 ± 15

WISTAR-Ratten wurden vor Versuchsbeginn gewogen (=Körpergewicht), das isolierte Herz wurde nach Versuchsende (= Herznassgewicht) und nach 7 Tagen Trocknung gewogen (= Herztrockengewicht). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Körpergewichte, Herznass- und trockengewichte.

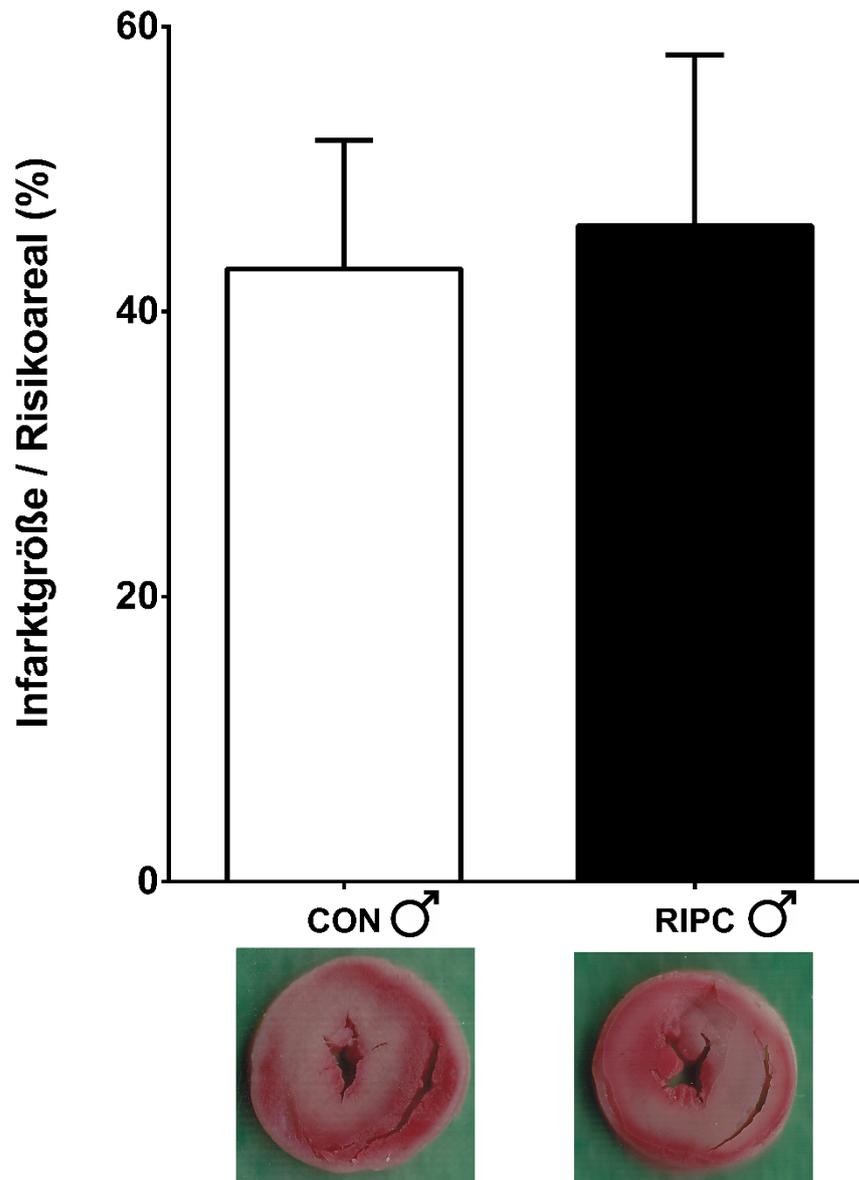
**Tabelle 7: Ischämieparameter der Versuchstiere der CON- und RIPC-Gruppe von männlichem Probandenplasma**

Gruppe	DPZ [min]	Kontraktur [mmHg]	Kontrakturzeit [min]
CON ♂	3 ± 0,9	59 ± 9	14 ± 2
RIPC ♂	3 ± 0,7	59 ± 16	15 ± 2

Die Zeit von Dekapitation des Tieres bis zur isolierten Perfusion des Herzens an der Langendorff-Anlage wurde bestimmt. Während der globalen Ischämie des Herzens wurden die maximale Kontraktur und der zugehörige Zeitpunkt durch einen im linken Ventrikel einliegenden Ballon bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. Es gab zwischen den Gruppen RIPC-Plasma vs. CON-Plasma der männlichen Probanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Dekapitations-Perfusionszeiten (DPZ), der ischämischen Kontrakturmaxima und der Zeitpunkte der Kontrakturmaxima.

### 3.2.3 Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf die Infarktgröße

Die Infarktgröße (Abb. 13) betrug in der CON-Gruppe des männlichen Probandenplasmas  $43 \pm 9 \%$ , in der RIPC-Gruppe  $46 \pm 12 \%$  ( $p = 0,58$ ).

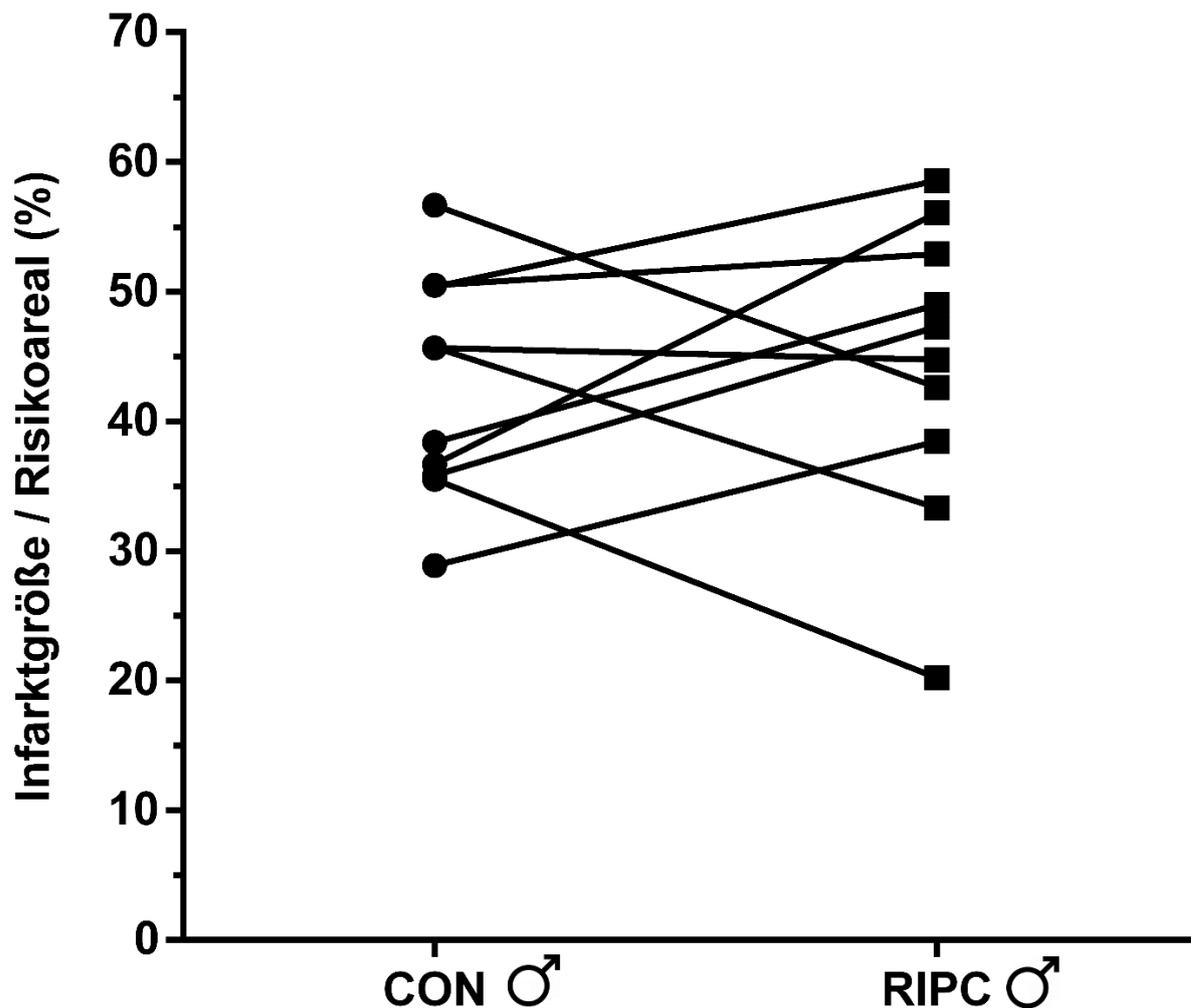


**Abb. 13: Infarktgrößen der CON- und RIPC-Gruppe der männlichen Probandenplasmen**

Isolierte Tierherzen wurden randomisiert vor Ischämie entweder mit Plasma männlicher Probanden vor (CON-Plasma) oder nach RIPC (RIPC-Plasma) mit einer 0,5%-Lafrate des Koronarflusses für 10 Minuten behandelt. Hiernach erfolgte eine 33-minütige globale Ischämie mit 60 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit 0,75% Triphenyltetrazolium-(TTC)-Lösung gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch ausgewertet (angegeben als Infarktgröße zu Risikoareal in %). Je eine repräsentative Herzscheibe der Gruppe wurde zum optischen Vergleich angegeben. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.  $n=10$  pro Gruppe. CON = Kontrolle. RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Infarktgröße ( $p=0,58$ ).

## Ergebnisse

In Abbildung 14 sind die einzelnen Infarktgrößen mit dem jeweiligen applizierten Plasma (CON vs. RIPC) eines männlichen Probanden aufgelistet. Durch das RIPC-Plasma wurde bei drei Probanden die Infarktgröße reduziert, während bei den anderen Probanden durch das RIPC-Plasma entweder keine Infarktgrößenreduktion oder sogar höhere Infarktgrößen auftreten als beim CON-Plasma.



**Abb. 14: Einzelne Infarktgrößen der CON- und RIPC-Gruppe der männlichen Probandenplasmen**

Isolierte Tierherzen wurden randomisiert entweder mit Plasma männlicher Probanden vor (CON-Plasma) oder nach RIPC (RIPC-Plasma) mit einer 0,5%-Lafrate des Koronarflusses für 10 Minuten behandelt. Hiernach erfolgten 33 min globale Ischämie und 60 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit 0,75% TTC gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch ausgewertet (angegeben als Infarktgröße zu Risikoareal in %). n=10; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung; CON = Kontrolle.

### 3.2.4 Effekt des RIPC-Plasmas männlicher Probanden auf die Hämodynamik

Die Hämodynamik ist in den Tabellen 10 und 11 zusammengefasst. Die mit Kontroll- bzw. RIPC-Plasma behandelten Gruppen zeigten während der Baseline keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären systolischen und diastolischen Druck, die Druckdifferenz und die Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeiten. Auch der Koronarfluss und das *Rate Pressure Product* in beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede während der Baseline.

Nach der Plasmaapplikation zeigten sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Werten zwischen den beiden Gruppen.

Auch in der Reperfusionphase zeigten sich sowohl in der 45. als auch in der 60. Minute keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Werten zwischen beiden Gruppen.

Jedoch konnten innerhalb beider Gruppen signifikante Unterschiede zwischen der Baseline und den anderen Messzeitpunkten nachgewiesen werden. Die Applikation von Kontrollplasma führte zu einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären systolischen Druckes, der Druckdifferenz, der Relaxationsgeschwindigkeit, des Koronarflusses und des *Rate Pressure Products*. Die RIPC-Plasmaapplikation verursachte eine signifikante Reduktion der linksventrikulären Druckdifferenz, der Relaxationsgeschwindigkeit und des *Rate Pressure Products* im Vergleich zur Baseline. Die Mittelwerte des Koronarflusses ( $p=0,13$ ) und der linksventrikuläre systolische Druckes ( $p=0,07$ ) sind zwar im Vergleich zur Baseline gesunken, jedoch konnte diese Beobachtung nicht mit statistischer Signifikanz belegt werden.

In beiden Gruppen waren in der Reperfusionphase im Vergleich zur Baseline die linksventrikulären systolischen Drücke signifikant erniedrigt und die linksventrikulären diastolischen Drücke signifikant erhöht. Hierdurch reduzierte sich die linksventrikuläre Druckdifferenz während der Reperfusionphase signifikant. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten, der Koronarfluss und das *Rate Pressure Product* waren während der Reperfusionphase in beiden Gruppen signifikant reduziert, während die Herzfrequenz im Vergleich zur Baseline nicht signifikant verändert war.

## Ergebnisse

### 3.2.5 Körpergewichte der Versuchstiere und Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf Herzgewichte und Ischämieparameter

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpergewichte sowie Herznass- und trockengewichte zwischen den Gruppen, die mit CON- oder RIPC-Plasma der weiblichen Probanden behandelt wurden (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Körpergewichte, Herznass- und trockengewichte der Versuchstiere der CON- und RIPC-Gruppe von weiblichem Probandenplasma**

Gruppe	Körpergewicht [g]	Herznassgewicht [g]	Herztrockengewicht [mg]
CON ♀	287 ± 26	1,5 ± 0,1	153 ± 8
RIPC ♀	276 ± 28	1,4 ± 0,1	154 ± 12

WISTAR-Ratten wurden vor Versuchsbeginn gewogen (=Körpergewicht), das isolierte Herz nach Versuchsende (= Herznassgewicht) und nach 7 Tagen Trocknung gewogen (= Herztrockengewicht). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. Es gab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichte, Herznass- und trockengewichte.

Es traten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Dekapitations-Perfusionszeiten (DPZ) sowie den Zeitpunkten und Maxima der ischämischen Kontrakturen zwischen den Gruppen auf, die mit CON- oder RIPC-Plasma von weiblichen Probanden behandelt wurden (Tabelle 9).

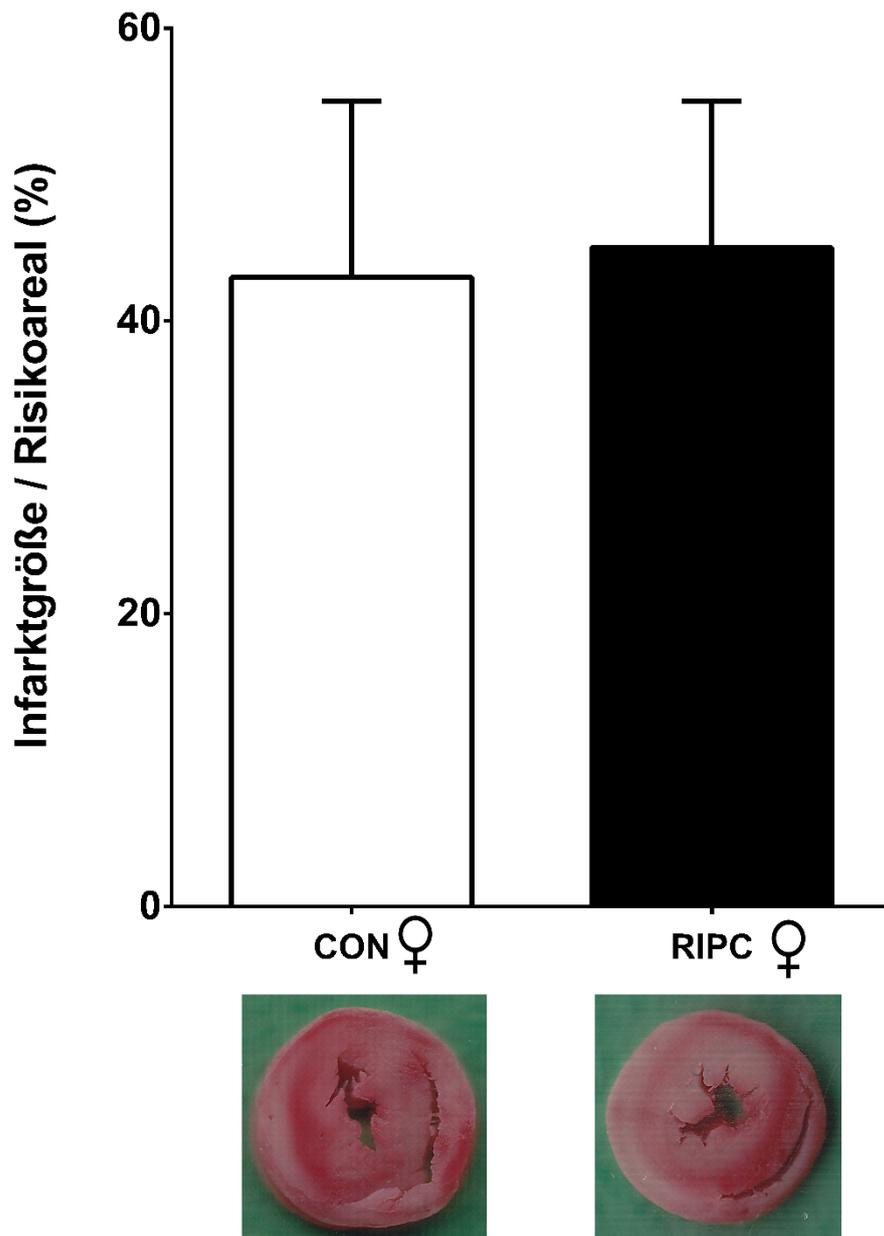
**Tabelle 9: Ischämieparameter der Versuchstiere der CON- und RIPC-Plasmagruppe von weiblichem Probandenplasma**

Gruppe	DPZ [min]	Kontraktur [mmHg]	Kontrakturzeit [min]
CON ♀	3 ± 1,1	59 ± 8	15 ± 2
RIPC ♀	3 ± 0,7	60 ± 11	15 ± 2

Die Zeit von Dekapitation des Tieres bis zur isolierten Perfusion des Herzens an der Langendorff-Anlage wurde bestimmt. Während der globalen Ischämie des Herzens wurden die maximale Kontraktur und der zugehörige Zeitpunkt durch einen im linken Ventrikel einliegenden Ballon bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. Es gab zwischen den Gruppen RIPC-Plasma und CON-Plasma der weiblichen Probanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Dekapitations-Perfusions-Zeiten (DPZ), der ischämischen Kontrakturmaxima und der Zeitpunkte der Kontrakturmaxima.

### 3.2.6 Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf die Infarktgröße

Die Infarktgröße (Abb. 15) betrug in der CON-Gruppe des weiblichen Probandenplasmas  $43 \pm 12 \%$ , in der RIPC-Gruppe  $45 \pm 10 \%$  ( $p = 0,69$ ).

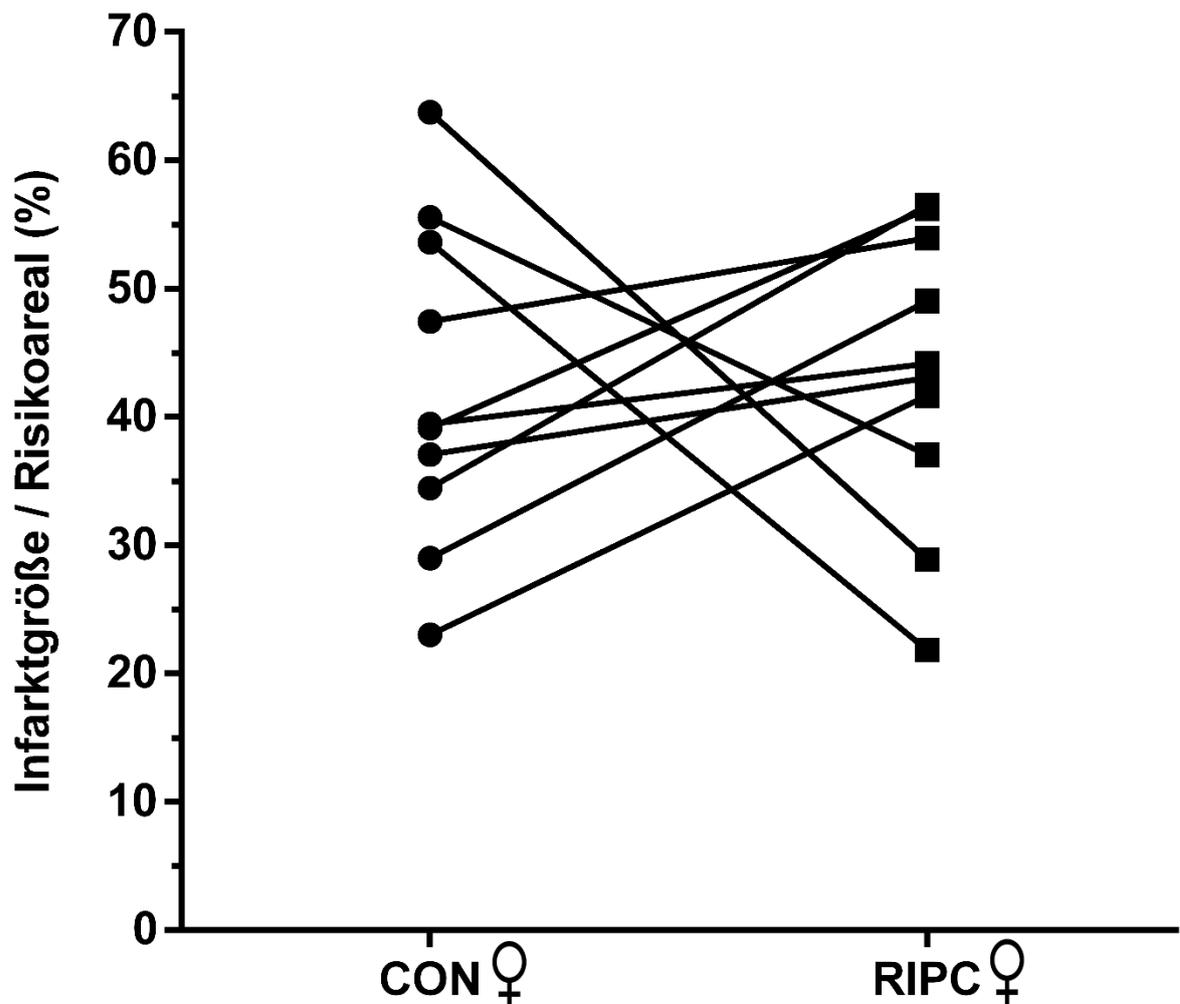


**Abb. 15: Infarktgrößen der CON- und RIPC-Gruppe der weiblichen Probandenplasmen**

Isolierte Tierherzen wurden randomisiert entweder mit Plasma weiblicher Probanden vor (CON-Plasma) oder nach RIPC mit einer 0,5%-Lauftrate des Koronarflusses für 10 Minuten behandelt. Hiernach erfolgten 33 min globale Ischämie und 60 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit 0,75% TTC gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch ausgewertet (angegeben als Infarktgröße zu Risikoareal in %). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.  $n=10$  pro Gruppe. RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. CON = Kontrolle. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Infarktgröße ( $p=0,69$ ). Je eine repräsentative Herzscheibe der Gruppe wurde zum optischen Vergleich angegeben.

## Ergebnisse

In Abbildung 16 sind die einzelnen Infarktgrößen mit dem jeweiligen applizierten Plasma (CON vs. RIPC) eines weiblichen Probanden aufgelistet. Durch die RIPC-Plasmaapplikation wurde bei drei Probanden die Infarktgröße reduziert, während bei den anderen Probanden durch das RIPC-Plasma entweder keine Infarktgrößenreduktion oder sogar höhere Infarktgrößen auftreten als beim Kontrollplasma.



**Abb. 16: Einzelne Infarktgrößen der CON- und RIPC-Gruppe der weiblichen Probandenplasmen**

Isolierte Tierherzen wurden randomisiert entweder mit Plasma weiblicher Probanden vor (CON-Plasma) oder nach RIPC (RIPC-Plasma) mit einer 0,5%-Lafrate des Koronarflusses für 10 Minuten behandelt. Hiernach erfolgten 33 min globale Ischämie und 60 min Reperfusion. Die Herzen wurden mit 0,75% TTC gefärbt und die Infarktgröße planimetrisch ausgewertet (angegeben als Infarktgröße zu Risikoareal in %). n=10; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung; CON = Kontrolle.

### 3.2.7 Effekt des RIPC-Plasmas weiblicher Probanden auf die Hämodynamik

Die Hämodynamik ist in den Tabellen 10 und 11 zusammengefasst. Die Hämodynamik beider Gruppen zeigte während der Baseline keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären systolischen und diastolischen Druck, die Druckdifferenz und die Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeiten. Auch der Koronarfluss und das *Rate Pressure Product* beider Gruppen zeigten während der Baseline keine signifikanten Unterschiede

Nach der Plasmaapplikation zeigten sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Werten zwischen beiden Gruppen.

Auch in der Reperfusionphase zeigten sich sowohl in der 45. als auch in der 60. Minute keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Werten zwischen beiden Plasmagruppen.

Jedoch konnten innerhalb beider Gruppen signifikante Unterschiede zwischen der Baseline und den anderen Messzeitpunkten nachgewiesen werden. In der CON-Plasmagruppe kam es nach Plasmaapplikation zu einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären systolischen Druckes, der Druckdifferenz, der Relaxationsgeschwindigkeit und des *Rate Pressure Products*. Nach RIPC-Plasmaapplikation zeigte sich eine signifikante Reduktion des linksventrikulären Druckes, der linksventrikulären Druckdifferenz, der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten und des *Rate Pressure Products*. Zusätzlich waren in der Reperfusionphase beider Gruppen der linksventrikuläre systolische Druck signifikant erniedrigt und der linksventrikuläre diastolische Druck signifikant erhöht. Hierdurch reduzierte sich die linksventrikuläre Druckdifferenz während der Reperusionsphasen signifikant. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten, der Koronarfluss und das *Rate Pressure Product* waren während der Reperfusionphase in beiden Gruppen signifikant erniedrigt, während die Herzfrequenz nicht signifikant verändert war.

## Ergebnisse

**Tabelle 10: Hämodynamische Daten der RIPC-Plasmagruppen: Herzfrequenz, LVPsys, LVPdia und LVDP**

Messparameter	Baseline	Nach Intervention	Reperfusion 45	Reperfusion 60
<b>Herzfrequenz (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>				
CON ♂	330 ± 38	313 ± 31	314 ± 29	297 ± 19 §
RIPC ♂	328 ± 34	318 ± 42	326 ± 33	324 ± 29
CON ♀	322 ± 41	308 ± 38	304 ± 32	299 ± 25
RIPC ♀	305 ± 32	304 ± 24	292 ± 23	320 ± 46
<b>LVPsys (mmHg)</b>				
CON ♂	133 ± 19	106 ± 25 §	93 ± 7 §	93 ± 8 §
RIPC ♂	126 ± 19	104 ± 26	89 ± 10 §	88 ± 10 §
CON ♀	135 ± 17	107 ± 22 §	93 ± 7 §	91 ± 7 §
RIPC ♀	133 ± 10	108 ± 22 §	89 ± 10 §	88 ± 9 §
<b>LVPdia (mmHg)</b>				
CON ♂	5 ± 3	4 ± 4	75 ± 10 §	71 ± 9 §
RIPC ♂	5 ± 2	3 ± 1	74 ± 10 §	71 ± 9 §
CON ♀	5 ± 2	3 ± 2	75 ± 10 §	74 ± 10 §
RIPC ♀	4 ± 1	2 ± 1	75 ± 10 §	72 ± 11 §
<b>LVDP (mmHg)</b>				
CON ♂	128 ± 17	102 ± 24 §	18 ± 8 §	21 ± 7 §
RIPC ♂	121 ± 19	102 ± 26 §	16 ± 9 §	17 ± 8 §
CON ♀	131 ± 16	104 ± 20 §	18 ± 7 §	18 ± 6 §
RIPC ♀	129 ± 9	106 ± 22 §	14 ± 6 §	16 ± 8 §

Nach einer Stabilisierungsphase von 20 min wurden isolierte Tierherzen an einer Langendorff-Anlage in vier Gruppen randomisiert (jeweils CON-Plasmagabe oder RIPC-Plasmagabe von weiblichen oder männlichen Probanden mit einer 0,5% Flussrate des Koronarflusses für 10 min). Danach erfolgten 33 min Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Zu definierten Zeitpunkten wurden die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz und die linksventrikulären Drücke (LVPsys, LVPdia, LVDP) gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. ♂ = Männer; ♀ = Frauen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test. §p<0,05 vs. Baseline.

## Ergebnisse

**Tabelle 11: Hämodynamische Daten der RIPC-Plasmagruppen: dP/dtMax, dP/dtMin, CF und RPP**

Messparameter	Baseline	Nach Intervention	Reperfusion 45	Reperfusion 60
<b>dP/dtMax (mmHg/s)</b>				
CON ♂	4461 ± 744	3640 ± 759	769 ± 333 §	809 ± 276 §
RIPC ♂	4243 ± 593	3698 ± 749	605 ± 218 §	670 ± 245 §
CON ♀	4451 ± 798	3728 ± 731	690 ± 197 §	702 ± 193 §
RIPC ♀	4458 ± 318	3679 ± 435 §	595 ± 215 §	678 ± 227 §
<b>dP/dtmin (mmHg/s)</b>				
CON ♂	-3216 ± 262	-2708 ± 517 §	-666 ± 295 §	-589 ± 178 §
RIPC ♂	-3132 ± 218	-2670 ± 453 §	-497 ± 139 §	-524 ± 136 §
CON ♀	-3404 ± 482	-2868 ± 499 §	-538 ± 106 §	-517 ± 107 §
RIPC ♀	-3196 ± 224	-2753 ± 454 §	-495 ± 159 §	-526 ± 155 §
<b>CF (mL/min)</b>				
CON ♂	15 ± 3	10 ± 3 §	7 ± 2 §	7 ± 2 §
RIPC ♂	13 ± 2	11 ± 2	7 ± 2 §	7 ± 2 §
CON ♀	15 ± 3	10 ± 2	7 ± 2 §	7 ± 2 §
RIPC ♀	14 ± 2	10 ± 2	7 ± 4 §	7 ± 4 §
<b>RPP (mmHg/min)</b>				
CON ♂	43807 ± 7245	33141 ± 8477 §	29225 ± 4449 §	27544 ± 2983 §
RIPC ♂	41025 ± 5216	32671 ± 6845 §	29160 ± 4868 §	28677 ± 4929 §
CON ♀	43522 ± 7421	32846 ± 7399 §	28257 ± 2605 §	27299 ± 2184 §
RIPC ♀	40604 ± 4715	32745 ± 6769 §	26070 ± 3257 §	28319 ± 5530 §

Nach einer Stabilisierungsphase von 20 min wurden isolierte Tierherzen an einer Langendorff-Anlage in vier Gruppen randomisiert (jeweils CON-Plasmagabe oder RIPC-Plasmagabe von weiblichen oder männlichen Probanden mit einer 0,5% Flussrate des Koronarflusses für 10 min). Danach erfolgten 33 min Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. Zu definierten Zeitpunkten wurden die hämodynamischen Parameter Kontraktions (dP/dtMax) - und Relaxationsgeschwindigkeiten (dP/dtMin), Koronarfluss (CF) und *Rate Pressure Product* (RPP) gemessen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± SD. n=10 pro Gruppe. CON = Kontrolle; RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung. ♂ = Männer; ♀ = Frauen. Die Statistik erfolgte mittels t-Test. §p<0,05 vs. Baseline.

## 4 Diskussion

### 4.1 Beantwortung der Fragestellung

Die vorliegende Studie untersuchte die Applikation von humanem Plasma nach RIPC älterer männlicher und weiblicher Probanden und die daraus folgenden Effekte auf die Infarktgröße und die Hämodynamik des isolierten Langendorffherzens. In einer Vorversuchsreihe wurde der Effekt der IPC am isolierten Langendorffherzen untersucht. Die Fragen aus Kapitel 1.5 sind somit wie folgt zu beantworten:

1. Die IPC führte zu einer starken, signifikanten Reduktion der Infarktgröße des isolierten Herzens und verbesserte die myokardiale Funktion und hämodynamischen Parameter signifikant.
2. Die Behandlung des isolierten Herzens mit RIPC-Plasma des älteren, männlichen Probanden reduzierte die Infarktgröße nicht. Die Behandlung führte auch nicht zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion oder der hämodynamischen Parameter.
3. Die Behandlung des isolierten Herzens mit RIPC-Plasma des älteren, weiblichen Probanden führte nicht zur Infarktgrößenreduktion. Die Behandlung verbesserte nicht die myokardiale Funktion oder die hämodynamischen Parameter.
4. Es sind keine geschlechtsabhängigen Effekte bei der Plasmaapplikation auf Infarktgröße, myokardiale Funktion und hämodynamische Parameter beobachtet worden.

Zusammenfassend ist das wichtigste Ergebnis, dass die Applikation von humanem RIPC-Plasma am isolierten Rattenherzen die Infarktgröße nicht reduziert. Die Ergebnisse waren unabhängig vom Geschlecht des Probandenplasmas und es konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektiert werden. Der Einfluss des Alterns auf den Wirkungsverlust und der fehlende Einfluss des Geschlechts auf die RIPC über humorale Faktoren sind zwei wichtige, neue Aspekte der RIPC bei Anwendung im höheren Lebensalter, die im folgenden Abschnitt interpretiert werden.

## 4.2 Interpretation der Ergebnisse

### 4.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Die IPC ist ein starker kardioprotektiver Stimulus, durch welchen die Infarktgröße in dieser Studie um einen relativen Anteil von 44% reduziert wurde. Der protektive Effekt zeigte sich zusätzlich in einer Reduktion der ischämischen Kontraktur um einen relativen Anteil von 29%. Die linksventrikulären Drücke in der Reperfusionphase wurden durch die IPC signifikant verbessert.

Die IPC ist nach Entdeckung im Jahre 1986 [11] vielfach untersucht und charakterisiert worden. Tabelle 12 listet mehrere Publikationen auf, welche den protektiven Effekt der IPC beim isolierten Rattenherzen untersucht haben. Alle Autoren konnten eine signifikante Reduktion der myokardialen Infarktgröße zeigen. In der Reperfusionphase verbesserte sich die myokardiale Funktion der IPC-Gruppe im Vergleich mit der CON-Gruppe.

## Diskussion

**Tabelle 12: Ischämische Präkonditionierung des isolierten Tierherzens**

Autor	Protokoll	Hämodynamik	Infarktgröße	Stamm, Körpergewicht, Alter
Tani et al. 1997 [106]	3x5 min 20 min I 30 min R	LVDP ↑	Creatinkinase reduziert	Männl. Fischer 344-Ratten, 3 Monate
Fenton et al., 2000 [107]	2x5 min 45 min I 120 min R	dP/dt Max ↑	CON:53±6% S.E.M. IPC:17,5±4% (67% red.)	Männl. Fischer 344-Ratten, 3 Monate
Barthel et al, 2004 [108]	2x 5/10 min 30 min I 60 min R	LVDP ↑	CON:24,8±4,1% S.E.M. IPC:4±0,1 % (84% red.)	Männl. Wistar-Ratten, 350-400 g
Giricz et al, 2006 [109]	3x5 min 30 min I 120 min R	Keine Angabe	Signifikant reduziert	Männl. Wistar-Ratten, 4,5 Monate
Heinen et al. 2008 [110]	3x3 min 35 min I 60 min R	dP/dt Max ↑ LVDP ↑ RPP ↑	CON:26±6% S.D. IPC:6±3 % (77% red.)	Männl. Wistar-Ratten, 250-300 g
Yadav et al., 2010 [111]	4x5 min 30 min I 120 min R	Keine Angabe	Signifikant reduziert	Wistar-Ratten, 180-300 g
Andersen et al. 2012, [112]	2x5 min 40 min I 120 min R	LVDP ↑	CON:42,6±10,6% S.E.M. IPC:24,4±8,1 % (43% red.)	Männl. Wistar-Ratten, ~300 g
Wang et al., 2014 [113]	3x5 min 30 min I 120 min R	dP/dt Max ↑ LVDP ↑ LVEDP ↑	CON:35,7±4,2% S.E.M. IPC:9,6±3,7% (73% red.)	Männl. Wistar-Ratten, 3 Monate

Aufgelistet sind Publikationen, welche die Wirkung der Ischämischen Präkonditionierung (IPC) am isolierten Rattenherzen untersucht haben. Das Versuchsprotokoll beinhaltet die Anzahl der IPC-Zyklen und ihre Dauer, die Dauer der Indexischämie (I) und der Reperfusion (R). Die Ergebnisse der Hämodynamik der IPC-Gruppe in der Reperfusion im Vergleich zur Kontrolle (CON) sind dargestellt. Die Infarktgrößen der IPC-Gruppe im Vergleich zur CON sind in % (*infarct size / area at risk*) und Standardabweichung (S.D.) oder Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Zu jeder Studie sind Stamm, Alter oder Gewicht der Tiere angegeben.

Der bereits gut belegte kardioprotektive Effekt einer IPC beim isolierten Rattenherzen konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Der kardioprotektive Effekt der IPC diente in dieser Studie als Positivkontrolle, welche die Funktionalität des angewandten *in vitro* Langendorff-Modells bestätigt.

#### 4.2.2 Ischämische Fernpräkonditionierung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das RIPC-Plasma des älteren Probanden keine kardioprotektive Wirkung beim isolierten Herzen vermittelt. Zudem wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektiert.

Es existieren experimentelle Hinweise, dass Bestandteile des Plasmas wie Albumin vor einem I/R-Schaden schützen [114]. Die Infarktgrößen der Plasma-Kontrollgruppen (CON-Plasma älterer männlicher und weiblicher Probanden) zeigten ähnliche Infarktgrößen wie die CON-Gruppe der ersten Serie (IPC vs. CON). Dies kann – auch ohne statische Testung - als Hinweis darauf gewertet werden, dass die alleinige Plasmaapplikation *per se* keinen protektiven Effekt aufweist. Es erscheint zusammenfassend unwahrscheinlich, dass die alleinige Plasmaapplikation einen möglichen protektiven Effekt der RIPC-Plasmen maskiert hat.

Dieses Ergebnis der RIPC-Plasmastudie älterer Probanden ist diskrepant zu den im Rahmen der Gesamtstudie erhobenen Daten zum Effekt von RIPC-Plasma jüngerer Probanden: Die Applikation von RIPC-Plasma jüngerer Männer reduzierte die Infarktgröße signifikant (Infarktgröße [CON-Plasma, ♂]:  $47\pm 5\%$ , Infarktgröße [RIPC-Plasma, ♂]:  $31\pm 10\%$ ). Bei jüngeren Probanden traten auch geschlechtsspezifische Unterschiede auf, denn die Applikation von Plasma jüngerer Frauen führte RIPC-unabhängig zur Infarktgrößenreduktion (Infarktgröße [CON-Plasma, ♀]:  $33\pm 10\%$ , Infarktgröße [RIPC-Plasma, ♀]:  $29\pm 10\%$ ). Die erzielten Ergebnisse sind Gegenstand eines weiteren Dissertationsprojektes.

Die Übertragbarkeit von humoralen Faktoren ist bereits in zahlreichen experimentellen Studien gezeigt worden, welche im nachfolgenden Abschnitt erläutert werden.

Darauffolgend wird diskutiert, welchen Einfluss das Geschlecht im höheren Lebensalter auf die Ischämische Fernpräkonditionierung haben könnte.

Zuletzt wird diskutiert, welchen Einfluss das höhere Lebensalter auf die RIPC ausüben könnte und was dieses Resultat für die Translation in die klinische Forschung bedeuten mag.

#### 4.2.3 Übertragbarkeit humoraler Faktoren durch die Ischämische Fernpräkonditionierung

Die Übertragbarkeit von kardioprotektiven humoralen Faktoren wurde in experimentellen Studien bereits mehrfach gezeigt. Vorreiter war eine Studie von Dickson et al. im Jahre 1999, in der die Autoren zeigten, dass das koronare Effluat eines ischämisch präkonditionierten (IPC) Herzens kardioprotektive Eigenschaften bei Übertragung auf ein unbehandeltes Herz der gleichen Spezies besitzt [115]. Hiernach folgten mehrere Studien, welche die Übertragbarkeit der RIPC durch Plasma und Plasmadialysate auf Herzen anderer Spezies gezeigt haben [77, 94, 116] (siehe Tabelle 13). In der Übersicht fällt auf, dass bisher ein höheres Lebensalter der Plasmaspender und auch geschlechtsspezifische Unterschiede kaum untersucht wurden. Die Übertragung von humanem RIPC-Plasma auf humane Endothelzellkulturen reduzierte einen I/R-Schaden, was darauf hinweist, dass die Übertragbarkeit humoraler Faktoren auch innerhalb der menschlichen Spezies möglich wäre [117].

**Tabelle 13: Übertragbarkeit von humanen RIPC-Plasmen auf isolierte Herzen**

Autor	Plasmadonor	RIPC-Protokoll	Empfängerherz	Infarktgröße
Shimizu et al., 2009 [94]	Gesunde Probanden, keine Geschlechtsangabe, n= 4	Rechter Oberarm; 4x5 min I/R	Männl. weiße Neuseelandkaninchen	CON: 29±9% RIPC: 10±3% *
Rassaf et al., 2014 [77]	Gesunde männliche Probanden, n=6	Rechter Oberarm; 1x5 min I/R	Männl. C57BL/6-Mäuse (32±6g)	CON: 47±10% RIPC: 31±4% *
Huhn et al., 2015 (noch nicht publiziert)	Gesunde männliche und weibliche Probanden (22-24 Jahre), je n=10	Linker Oberarm; 3x5 min I/R	Männliche WISTAR-Ratten (250-300 g)	CON (♂): 47±5% RIPC (♂): 31±10% * CON (♀): 33 ±10% RIPC (♀): 29 ±10%
Hildebrandt et al., 2016 [116]	Gesunde männliche und weibliche Probanden (28-31 Jahre), je n=10	Linker Oberarm; 3x5 min I/R	Männl. C57BL6/J-Mäuse (25±5g)	CON: 39±3% RIPC: 28±6% * keine geschlechtsgetrennten Angaben

Aufgelistet ist eine Auswahl von Publikationen, welche die Wirkung von ischämisch fernpräkonditionierten (RIPC)-Plasmen des Menschen am isolierten Langendorffherzen untersuchten. Angegeben ist, wer das RIPC-Plasma gespendet hat und die Spezies, welche das RIPC-Plasma erhalten hat. Das Protokoll und die konditionierte Extremität sind tabellarisch aufgelistet. Die Infarktgrößen der RIPC-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (CON) sind in % (*infarct size/area at risk*) und Standardabweichung (S.D.) angegeben. \* p < 0.05 vs. CON mittels t-Test.

#### 4.2.4 Fehlender Einfluss des Geschlechts auf die Ischämische Fernpräkonditionierung älterer Menschen

Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass zwischen den Geschlechtern einer Spezies Unterschiede in der normalen Myokardfunktion und beim myokardialen I/R-Schaden bestehen. Die Mehrzahl der Studien zeigt den Trend einer erhöhten Toleranz des weiblichen Myokards gegenüber I/R-Schäden [118].

In mehreren Studien wurde der Einfluss des Geschlechts auf kardioprotektive Mechanismen wie die IPC und IPost untersucht, jedoch sind die Ergebnisse uneinheitlich. Einerseits zeigten Song et al. 2003, dass die klassische IPC die Infarktgröße des weiblichen Myokards nicht reduzierte, aber das weibliche Myokard ohne kardioprotektive Intervention *per se* eine kleinere Infarktgröße aufwies als das männliche Myokard. Andererseits wiesen Crisostomo et al. 2006 nach, dass die IPost

## Diskussion

beim weiblichen Myokard eine kardioprotektive Wirkung vermittelt [119-121]. Für die RIPC liegen jedoch zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbaren Daten vor.

Diese Studie erkennt keinen Einfluss des Geschlechts auf die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC des älteren Menschen. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im höheren Alter vorhanden sind.

Dieses Ergebnis ist diskrepant zu den Ergebnissen der im Rahmen der Gesamtstudie durchgeführten RIPC-Plasmastudie von jungen Probanden, in der das Kontrollplasma junger Frauen *per se* eine kardioprotektive Wirkung aufwies und zu einem Trend (jedoch nicht signifikanten) der stärkeren Infarktgrößenreduktion im Vergleich mit den jungen Männern führte. Die Gründe für die geschlechtsspezifischen Unterschiede beim jungen Menschen sind unbekannt. Bekannt ist, dass Östrogene kardioprotektive Effekte initiieren können [122]. In einer weiterführenden Studie im Rahmen eines Dissertationsprojektes wurde untersucht, ob der RIPC-unabhängige protektive Effekt des Plasmas junger Frauen durch die Gabe eines nicht selektiven Östrogenrezeptorantagonisten (Fulvestrant) beeinflusst wird. Durch die Gabe von Fulvestrant wurde jedoch der RIPC-unabhängige protektive Effekt nicht blockiert, sodass dieser Effekt womöglich östrogenunabhängig vermittelt wird.

Die Ursachen des hier beobachteten Verlusts des protektiven Effekts der RIPC sind zusammenfassend unklar und werden in dieser Studie nicht zu beantworten sein. Jedoch könnten spekulativ menopausale, komplexe, hormonelle Veränderungen unabhängig von einer Östrogenrezeptoraktivierung die Freisetzung von kardioprotektiven humoralen Faktoren mitbeeinflussen.

### 4.2.5 Einfluss des Alterns auf die Ischämische Fernpräkonditionierung

Die Literatur enthält nur wenige Studien zum Einfluss des Lebensalters auf kardioprotektive Maßnahmen.

Es bestehen Hinweise, dass die Wirkung der klassischen IPC im hohen Alter sowohl im Tiermodell [97], als auch beim Menschen [123] abgeschwächt wird. Kontrovers hiergegen zeigen zwei experimentelle Studien, dass die kardioprotektive Wirkung der IPC im Tiermodell durch das Altern nicht abgeschwächt wird [124, 125]. Es existiert

## Diskussion

sogar eine experimentelle Studie, die zeigt, dass die RIPC bei neonatalen Herzen eine schädigende Wirkung aufweist [126].

Zwei größere klinische Phase III-Studien haben keine protektive Wirkung der RIPC des Menschen nachgewiesen [67, 68]. Die Gründe für dieses negative Ergebnis sind unklar. Es wird vermutet, dass ein oder mehrere *Confounder* (Begleitmedikation, der Einsatz von Propofol als Anästhetikum, Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht) das Ergebnis negativ beeinflusst haben [127]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist keine klinische Studie bekannt, welche das Lebensalter als *Confounder* prospektiv untersucht hat. In einer retrospektiven Analyse einer *single-center* RIPC-Studie wurde das höhere Lebensalter nicht als *Confounder* identifiziert, wohingegen dieses Ergebnis bei fehlender Kontrollgruppe mit jüngeren Patienten möglicherweise eine geringe Aussagekraft aufweist [128].

In den Abbildungen 14 und 16 wurden die einzelnen Infarktgrößen nach Kontroll- und RIPC-Plasmaapplikation aufgelistet. Pro Gruppe fielen jeweils drei Probanden auf, bei denen die RIPC-Plasmaapplikation in der Einzelauswertung zu einer deutlichen Infarktgrößenreduktion geführt hat. Bei den restlichen sieben Probanden zeigte die RIPC-Plasmaapplikation nicht einheitliche Effekte (konstante Infarktgröße, oder höhere Infarktgrößen nach RIPC-Plasmaapplikation). Bei der geringen Probandenzahl ist eine statistische Auswertung diesbezüglich nicht möglich, jedoch wäre denkbar, dass die Probanden jeweils als „*responder*“ oder „*non-responder*“ eingestuft werden könnten. Durch weiterführende Versuche könnten Gründe für die unterschiedliche *responder*-Aktivität der jeweiligen Probandenplasmen weiter ergründet werden.

Diese Studie hingegen zeigt hiermit als neues Ergebnis, dass durch das menschliche RIPC-Plasma im höheren Alter bei Übertragung auf ein *in vitro* Herz kein kardioprotektiver Effekt erzielt wird. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung von humoralen Faktoren durch die RIPC im Alter beeinträchtigt sein könnte.

Grundsätzlich kommen zwei Orte der Signalkaskade in Frage, an denen die RIPC im höheren Alter an protektiver Wirkung verlieren könnte.

Bezüglich des ersten Ortes der Signalkaskade könnten Störungen bei der Signalentstehung und der Signalvermittlung zwischen Präkonditionierungs- und Effektororgan (z.B. eine veränderte Freisetzung der humoralen Faktoren) auftreten.

## Diskussion

Ein mögliches Präkonditionierungsorgan könnte die Skelettmuskulatur der oberen Extremität darstellen. Die Skelettmuskulatur des alternden Menschen weist multiple Veränderungen wie z.B. die Atrophie auf, die in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst sind [129]. Die mit einer Atrophie assoziierten Veränderungen der Skelettmuskulatur könnten die Freisetzung von humoralen Faktoren durch eine RIPC beeinflussen.

Ein weiteres Präkonditionierungsorgan könnten die Arterien der oberen Extremitäten darstellen. Die Arterien des alternden Menschen bilden durch Atherosklerose eine zunehmende endotheliale Dysfunktion und Kalzifikation aus [130]. Das Ausmaß einer endothelialen Dysfunktion wiederum reduziert die Freisetzung von zirkulierendem Nitrit [131]. Nitrit hingegen fungiert als Mediator der RIPC, weswegen durchaus denkbar ist, dass der Erfolg der RIPC durch eine endotheliale Dysfunktion (im höheren Lebensalter) negativ beeinflusst wird [77].

Differenziert werden muss zudem, ob die Freisetzung von humoralen Faktoren vollständig blockiert wird, oder aber eine Reduktion oder Veränderung der Zusammensetzung der freigesetzten Faktoren stattfindet. Wenn die Menge der freigesetzten humoralen Faktoren reduziert war, bedeutet dies, dass die applizierte Plasmadosis (0,5% des Koronarflusses über 10 min, entspricht kumulativ ca. 0,75 ml Plasma) möglicherweise nicht für die Auslösung eines kardioprotektiven Effektes ausgereicht hat. Im indirekten Vergleich hierzu wurde in einer vergleichenden Zellkulturstudie eine Dosisfindung mit unterschiedlich konzentriertem RIPC-Plasma (0, 1, 5 und 10%) vorgenommen und ein Dosisoptimum bei 5% ermittelt [117, 132]. Zum aktuellen Zeitpunkt liegen keine anderen Dosisfindungsstudien bezüglich einer RIPC-Plasmaapplikation am isolierten Herzen vor. Die in der Tabelle 13 aufgeführten RIPC-Studien enthalten kaum Angaben über die applizierte Plasmadosis (in % des Koronarflusses), sodass eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben ist. Im semiquantitativen Vergleich hierzu zeigt aber eine Studie von Rassaf et al. 2014, dass ein einzelner RIPC-Zyklus von 5 min bei humanen Probanden und ipsilateral der konditionierten Extremität entnommenes RIPC-Plasma die Infarktgröße nach Applikation im Langendorffmodell signifikant reduziert [77]. Spekuliert werden kann, dass das unmittelbar an den RIPC-Arm ipsilateral entnommene RIPC-Plasma womöglich eine stärkere Konzentration an humoralen Faktoren enthält. Im Vergleich wurde in unserer Studie nach drei Zyklen von fünf Minuten I/R kontralateral RIPC-Plasma entnommen, welches möglicherweise eine höhere Verdünnung durch

## Diskussion

Rezirkulation aufweist. Eine direkte Vergleichbarkeit ist jedoch nicht gegeben, da in der Studie von Rassaf et al. junge, männliche Probanden einbestellt wurden. Im Rahmen der von uns durchgeführten Gesamt-RIPC-Studie bei jüngeren Probanden wurde mit dem gleichen RIPC-Protokoll eine Infarktgrößenreduktion durch das RIPC-Plasma junger Männer erzielt, sodass prinzipiell eine ausreichende Konzentration an humoralen Faktoren durch die RIPC freigesetzt wurden. Ob durch eine Dosissteigerung des RIPC-Plasmas junger Männer ein stärkerer Effekt auslösbar ist oder durch die Dosissteigerung bei älteren Probanden eine Infarktgrößenreduktion erzielt werden kann, ist aktuell unklar.

Die applizierte Plasmadosis und der daraus kardioprotektiv erzielte Effekt könnten einer klassischen pharmakologischen Dosis-Wirkungsbeziehung entsprechen. Möglich wäre aber auch, dass es sich - wie z.B. in einer pharmakologischen Präkonditionierungsstudie mit Helium gezeigt wurde - um ein on/off-Phänomen handelt: Es könnte eine notwendige Mindestdosis existieren, deren maximaler Effekt durch Steigerung der Dosis nicht zunimmt (Plateau-Effekt) [133].

Bezüglich des zweiten Ortes der Signalkaskade könnten alterungsbedingte, intrakardiale Veränderungen zu einer Resistenz gegenüber den freigesetzten humoralen Faktoren führen. Der zweite Ort des Wirkungsverlusts wurde in diesem Studiendesign nicht untersucht, da das RIPC-Plasma an jungen, männlichen Tierherzen getestet wurde (siehe Limitationen). Jedoch konnten Behmenburg et al. zeigen, dass die RIPC *in vivo* beim alternden Herzen an Wirkung verliert [134].

## 4.3 Stärken, Standardisierung, Limitationen und Ausblick

### 4.3.1 Stärken der Studie

Eine große Stärke der Studie ist, dass jeweils bei einem einzelnen Probanden sowohl das Kontroll- als auch das RIPC-Plasma entnommen wurden. Ein alternativer Versuchsansatz könnte darin bestehen, dass in einem anderen Setting das Kontroll- und RIPC-Plasma an jeweils unterschiedlichen Probanden gewonnen wird. Dies hätte die interindividuelle Variabilität erhöhen und die Aussagekraft der Ergebnisse schmälern können.

In vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur wurde das Blutplasma vor Applikation dialysiert, wodurch Faktorenkonzentrate oder bestimmte

## Diskussion

Plasmabestandteile selektiv appliziert werden können [77, 94]. In unserer Studie wurde das Plasma ohne Vorbehandlung appliziert, was demgegenüber den Vorteil hat, dass alle kardioprotektive Faktoren ohne Verluste übertragen werden.

### 4.3.2 Standardisierung der Methodik

Das Langendorffherz bietet als *in vitro* Modell einige Vorteile. Eine Durchführung vieler Versuchsserien in kurzer Zeit ist möglich, die Ergebnisse weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf und der (mögliche) Einfluss anderer Organsysteme auf das Myokard ist ausgeschaltet. Sogar eine Durchführung von Ischämie-Reperusionsprotokollen, die zu einer schweren Schädigung des Myokards führen, ist *in vitro* möglich (großes Risikoareal, lange Ischämiezeiten). Jene Protokolle weisen bei Anwendung *in vivo* eine hohe Letalität auf [102].

Um in Langendorffstudien aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollten gewisse Standards eingehalten werden. Es handelt sich hierbei um Untersuchungsparameter, welche die Ergebnisqualität sicherstellen und deren einzelne Punkte im Folgenden erläutert werden.

Die Präparation des Tierherzens kann zu hypoxischen und mechanischen Schäden des Organs führen. Eine zeitlich verzögerte Präparation selbst vermag eine Präkonditionierung auszulösen, sodass die Studie dadurch verfälscht wäre [135]. Alle Versuche wurden vom gleichen Untersucher in stets gleichbleibend schneller Technik (siehe Dekapitations-Perfusionszeit) durchgeführt. Eine Randomisierung und Verblindung der Versuche bewirkte somit eine Gleichverteilung von *Confoundern* und verhinderte die mögliche Verzerrung von Ergebnissen. Die Effektivität der Verblindung und Randomisation zeigt sich darin, dass die Baselinewerte der Hämodynamik, die Körpergewichte der Tiere und die Dekapitations-Perfusionszeiten zwischen den Versuchsgruppen homogen verteilt waren und keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. In der Vorversuchsreihe wurden signifikante Infarktgrößenreduktionen der IPC-Gruppe gezeigt, was darauf hindeutet, dass die jeweiligen Kontrollherzen nicht durch die Methodik alleine (z.B. Hypoxie durch verlängerte Dekapitations-Perfusionszeiten) bereits präkonditioniert waren.

Während der Präparation des Herzens *in situ*, der Kanülierung und retrograden Perfusion der Aorta, können Luftembolien in die Koronargefäße fortgeleitet werden, wodurch die kardiale Funktion reduziert und die Infarktgröße erhöht wird. Die Aorta wurde sorgfältig und vorsichtig freipräpariert und so schnell wie möglich an die

## Diskussion

Kanüle geknotet. Um Embolien weitestgehend auszuschließen, wurde das Herz nach Explantation in physiologischer Kochsalzlösung eingetaucht und so an die vor Versuchsbeginn entlüftete, frei tropfende Kanüle geknotet. Zusätzlich wurde stets darauf geachtet, dass keine Luftblasenbildung in den Schlauchsystemen auftrat.

Die Temperatur des Herzens wurde während der gesamten Versuchszeit konstant bei  $37,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  gehalten. Eine Temperaturkontrolle ist von essenzieller Bedeutung, da nicht nur die Infarktgröße von der Temperatur während des Versuchs abhängig ist [136], sondern durch Hypothermie (beim Auskühlen des Herzens durch fehlende Isolation) ein zusätzlicher kardioprotektiver Effekt auftritt [137].

Die notwendige Mindestreperfusiondauer, um die genaue Infarktgröße mittels TTC-Färbung zu ermitteln, wird kontrovers diskutiert. In vielen Studien werden mindestens 120 Minuten Reperfusion durchgeführt, jedoch wurden in dieser Studie 60 Minuten Reperfusion durchgeführt. Im Jahre 2000 wurde ermittelt, dass durch eine Reperfusion von 30 Minuten bei der TTC-Färbung nicht eindeutig rot oder weiß gefärbte Areale entstehen, welche eine eindeutige Infarktgrößenauswertung erschweren [138]. Eine im Jahre 2009 publizierte Studie hingegen zeigte an isolierten Rattenherzen, dass im direkten Vergleich zwischen 60 und 120 Minuten die planimetrisch ermittelte Infarktgröße identisch ist [139]. Dies stützt die Annahme, dass die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse zur Infarktgröße valide sind.

### 4.3.3 Limitationen der Studie und klinischer Ausblick

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser experimentellen Studie in die klinische Praxis wird durch einige Kritikpunkte limitiert, die im Folgenden erläutert werden.

Diese Teilstudie bestand aus einer begrenzten Anzahl von 20 gesunden Probanden. Initial fand eine Fallzahlberechnung auf der Grundlage vorheriger Langendorff-Studien statt, in der bei einer Power-Analyse von 80% die Fallzahl auf 20 ältere Probanden festgelegt wurde. Bei diesem vergleichsweise geringen Stichprobenumfang ist die Übertragung auf größere Populationen nur eingeschränkt möglich.

Die Rekrutierung von Studienprobanden durch das Forschungsteam kann Bias hervorrufen, die diskutiert werden müssen. Die freiwilligen Studienprobanden wurden aus der Region Nordrhein-Westfalens einbezogen und über Aushänge angeworben.

## Diskussion

Ein Selektionseffekt ist hierdurch möglich. In der Demografie wiesen die weiblichen Probanden signifikant geringere Körpergrößen und –gewichte auf. Während der BMI der männlichen Probanden überwiegend im Normbereich ( $23 \pm 3$ ) lag, zeigten die weiblichen Probanden einen signifikant höheren BMI ( $26 \pm 3$ ). Per definitionem lag hiermit bei einigen weiblichen Probanden eine Präadipositas vor (BMI 25-30). Eine Präadipositas könnte die kardioprotektive Wirkung von Präkonditionierungsmechanismen negativ beeinflussen [140]. Komorbiditäten wie der Diabetes mellitus Typ 2, die im höheren Alter eine hohe Prävalenz aufweisen, reduzieren zusätzlich den protektiven Effekt der RIPC [141]. Die Rolle von Komorbiditäten wurde in dieser Studie nicht untersucht, jedoch weisen der überwiegende Anteil von Patienten im Rahmen von klinischen RIPC-Studien eine oder mehrere Komorbiditäten auf, deren Wechselwirkung im Bezug zur RIPC weiterführend untersucht werden sollte. Die häufig vorhandene Begleitmedikation (z.B. Statine) beeinflusst kardioprotektive Maßnahmen wie die RIPC und kann selbst mitunter kardioprotektive Effekte auslösen [140]. Ob durch die Begleitmedikation die Freisetzung kardioprotektiver humoraler Faktoren beeinflusst wird, bleibt in dieser Studie unklar und sollte weiterführend untersucht werden.

Die RIPC wurde an der linken oberen Extremität mit drei Zyklen mit jeweils fünfminütiger Ischämie und Reperfusion durchgeführt. Die Wahl des RIPC-Protokolls erfolgte auf empirischer Grundlage vorheriger klinischer RIPC-Studien, welche in einer Übersichtsarbeit von Vasdekis et al. 2013 zusammengefasst wurden [142]. Ob durch die Anzahl und jeweilige Dauer der Zyklen die maximal mögliche Dosis der kardioprotektiven humoralen Faktoren freigesetzt wird, ist aktuell unbekannt. Denkbar ist, dass durch eine optimale Dauer eines ischämischen Stimulus (in Abhängigkeit der Toleranzgrenze der ischämischen Muskulatur), durch die optimale Anzahl der I/R-Zyklen, durch den optimalen Abstand zwischen RIPC und Indexischämie und durch die Anzahl der zu konditionierenden Extremitäten der kardioprotektive Effekt im experimentellen und klinischen Setting gesteigert werden könnte. Ob bei älteren Menschen eine höhere Anzahl von Zyklen benötigt wird, um humorale Faktoren in ausreichender Menge freizusetzen, könnte weitergehend untersucht werden. Die IPC kann jedoch bei einer zu hohen Anzahl von präkonditionierenden Zyklen negative Effekte und Zellschäden des Myokards auslösen, weswegen diese Nachuntersuchung bei der RIPC jedoch mit Vorsicht erfolgen sollte [143].

## Diskussion

Die Wirksamkeit des RIPC-Plasmas wurde am isolierten Herzen (junges, männliches, gesundes Tierherz) getestet. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich auf die Freisetzung kardioprotektiver humoraler Faktoren. Es ist bekannt, dass andere Formen der Kardioprotektion (IPC und IPost) über altersinduzierte Veränderungen der Proteinexpression und Signalwege des Myokards an Wirkung verlieren [123]. Obwohl keine Daten zur Effektivität der RIPC bei altersinduzierten kardialen Veränderungen des Menschen vorliegen, kann spekuliert werden, dass durch diesen Effekt ein zusätzlicher Wirkungsverlust auftreten könnte. Diese weitergehende Fragestellung könnte durch Applikation von RIPC-Plasma jüngerer Probanden an älteren Tierherzen getestet werden. Stützend für diese Hypothese wurde in einem *in-vivo* Tiermodell bereits gezeigt, dass die ischämische Fernpräkonditionierung keine kardioprotektive Wirkung im alternden Herzen aufweist [134].

Das Blut wurde unmittelbar nach Entnahme abzentrifugiert und das gewonnene Plasma bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Applikation wurde das Blutplasma direkt vor Versuchsbeginn schonend aufgetaut. Obwohl die Verarbeitungszeiten möglichst kurz waren, könnten durch die Verarbeitung und Lagerung humorale Faktoren inaktiviert worden sein. Als Gegenargument für diese Überlegung ist jedoch anzubringen, dass in der Gesamtstudie mit RIPC-Plasma von jungen Studienteilnehmern eine kardioprotektive Wirkung gezeigt wurde. Dies spricht für einen Erhalt der kardioprotektiven, humoralen Faktoren.

Die vorliegende Studie trägt nicht zur Aufklärung des Signalweges der RIPC bei. Die molekulare Beschaffenheit der humoralen Faktoren und die extra- und intrazelluläre kardiale Signalkaskade wurden nicht untersucht. Die Ergebnisse sind deskriptiver Natur.

Durch eine Dialyse hergestelltes Konzentrat von RIPC-Plasma könnte für Folgeuntersuchungen eine stärkere Dosisapplikation ermöglichen. Hierdurch könnte die Frage beantwortet werden, ob im höheren Alter die freigesetzte Dosis der kardioprotektiven Faktoren signifikant reduziert wird oder die Freisetzung blockiert wird.

Durch z. B. Analysen des Plasmaproteoms, die Analyse von microRNAs oder die Isolierung und Aufarbeitung von Exosomen der Blutplasmen (junge Probanden vs. ältere Probanden) könnten die einzelnen freigesetzten humoralen Faktoren sowohl

## Diskussion

qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Die Entdeckung pharmakologischer Zielstrukturen könnte zur Entwicklung von kardioprotektiven Medikamenten beitragen.

Nachfolgende Studien könnten dazu beitragen, Patientenkollektive zu definieren, welche nachhaltig von einer RIPC profitieren und jene ausschließen, bei denen die RIPC keine Wirkung aufweist. Eine Optimierung des RIPC-Protokolls bei älteren Menschen könnte durch eine erhöhte Freisetzung der kardioprotektiven humoralen Faktoren möglicherweise zu einer Kardioprotektion führen. Dies könnte in Zukunft den Stellenwert der RIPC im klinischen Setting klären.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Harvey, W., *On the Motion of the Heart and Blood in Animals*, ed. R. Willis. 1628, paperback(1993): Prometheus Books.
2. Statistisches Bundesamt, *Todesursachen in Deutschland 2015*. Fachserie 12 Reihe 4, 2016.
3. Kalogeris, T., et al., *Chapter Six - Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, W.J. Kwang, Editor. 2012, Academic Press. p. 229-317.
4. Libby, P. and P. Theroux, *Pathophysiology of Coronary Artery Disease*. *Circulation*, 2005. **111**(25): p. 3481-3488.
5. Falk, E., et al., *Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view*. *European Heart Journal*, 2013. **34**(10): p. 719-728.
6. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, 2007. **28**(20): p. 2525-2538.
7. Windecker, S., et al., *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization*. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular ..., 2014. **35**(37): p. 2541-2619.
8. Thiene, G. and C. Basso, *Myocardial infarction: a paradigm of success in modern medicine*. *Cardiovascular Pathology*, 2010. **19**(1): p. 1-5.
9. Piccolo, R., et al., *Stable coronary artery disease: revascularisation and invasive strategies*. *The Lancet*, 2015. **386**(9994): p. 702-713.
10. Jennings, R.B., *Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Circ Res*, 2013. **113**(4): p. 428-38.
11. 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.
12. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013. **123**(1): p. 92-100.
13. Dubey, R.K., et al., *Vascular consequences of menopause and hormone therapy: Importance of timing of treatment and type of estrogen*. *Cardiovascular Research*, 2005. **66**(2): p. 295-306.
14. Nathan and, L. and G. Chaudhuri, *ESTROGENS AND ATHEROSCLEROSIS*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1997. **37**(1): p. 477-515.
15. Bittner, V., *Menopause, Age, and Cardiovascular Risk: A Complex Relationship*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. **54**(25): p. 2374-2375.
16. Shaw, L.J., R. Bugiardini, and C.N.B. Merz, *Women and Ischemic Heart Disease: Evolving Knowledge*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. **54**(17): p. 1561-1575.
17. Bairey Merz, N., et al., *Women's Ischemic Syndrome Evaluation: Current Status and Future Research Directions: Report of the National Heart, Lung and Blood Institute Workshop: October 2-4, 2002 : Executive Summary*. *Circulation*, 2004. **109**(6): p. 805-807.

18. Milcent, C., et al., *Gender Differences in Hospital Mortality and Use of Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction: Microsimulation Analysis of the 1999 Nationwide French Hospitals Database*. *Circulation*, 2007. **115**(7): p. 833-839.
19. Westerman, S. and N.K. Wenger, *Women and heart disease, the underrecognized burden: sex differences, biases, and unmet clinical and research challenges*. *Clin Sci (Lond)*, 2016. **130**(8): p. 551-63.
20. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**(5): p. 786-94.
21. R B Jennings, a. and K.A. Reimer, *The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia*. *Annual Review of Medicine*, 1991. **42**(1): p. 225-246.
22. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects (Reprinted with PERMISSION FROM ELSEVIER)*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002. **39**(5): p. 747-753.
23. Rodrigo, G.C. and N.B. Standen, *ATP-sensitive potassium channels*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(15): p. 1915-40.
24. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
25. Hearse, D.J. and A. Tosaki, *Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart*. *Circulation Research*, 1987. **60**(3): p. 375-83.
26. Kloner, R.A., et al., *Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1848-67.
27. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. *Circ Res*, 1966. **19**(1): p. 57-62.
28. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1998. **38**(2): p. 291-300.
29. 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.
30. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
31. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 481-97.
32. Insete, J., et al., *Effect of inhibition of Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(4): p. 739-48.
33. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schafer, *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 365-71.
34. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1979. **195**(2): p. 453-459.
35. Crompton, M. and A. Costi, *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload*. *European journal of biochemistry*, 1988. **178**(2): p. 489-501.

## Literaturverzeichnis

36. 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.
37. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annual Review of Physiology, 1998. **60**: p. 619-642.
38. Kübler, W. and M. Haass, *Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles*. Heart, 1996. **75**(4): p. 330-333.
39. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. Circulation Research, 1993. **72**(6): p. 1293-1299.
40. Bolli, R., *The late phase of preconditioning*. Circulation Research, 2000. **87**(11): p. 972-983.
41. Iglesias-Garriz, I., et al., *Pre-infarction angina elicits greater myocardial viability on reperfusion after myocardial infarction: a dobutamine stress echocardiographic study*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(7): p. 1846-50.
42. Solomon, S.D., et al., *Angina pectoris prior to myocardial infarction protects against subsequent left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(9): p. 1511-4.
43. 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.
44. Takano, H., et al., *A1 or A3 Adenosine Receptors Induce Late Preconditioning Against Infarction in Conscious Rabbits by Different Mechanisms*. Circulation Research, 2001. **88**(5): p. 520-528.
45. Fryer, R.M., et al., *Opioid-Induced Second Window of Cardioprotection: Potential Role of Mitochondrial KATP Channels*. Circulation Research, 1999. **84**(7): p. 846-851.
46. Jones, W.K., et al., *Peripheral Nociception Associated With Surgical Incision Elicits Remote Nonischemic Cardioprotection Via Neurogenic Activation of Protein Kinase C Signaling*. Circulation, 2009. **120**(11 suppl 1): p. S1-S9.
47. Ono, H., et al., *Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation*. American heart journal, 2004. **148**(4).
48. Landoni, G., et al., *Desflurane and Sevoflurane in Cardiac Surgery: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials*. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2007. **21**(4): p. 502-511.
49. Preckel, B., et al., *Molecular mechanisms transducing the anesthetic, analgesic, and organ-protective actions of xenon*. Anesthesiology, 2006. **105**(1): p. 187-97.
50. Heinen, A., et al., *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) -sensitive potassium channel activation*. Anesthesiology, 2008. **109**(5): p. 830-6.
51. Madonna, R., et al., *Cardioprotection by gene therapy: A review paper on behalf of the Working Group on Drug Cardiotoxicity and Cardioprotection of the Italian Society of Cardiology*. Int J Cardiol, 2015. **191**: p. 203-210.
52. Okubo, S., et al., *Gene Transfer of Heat-Shock Protein 70 Reduces Infarct Size In Vivo After Ischemia/Reperfusion in the Rabbit Heart*. Circulation, 2001. **103**(6): p. 877-881.

53. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. *Circulation*, 1993. **87**(3): p. 893-9.
54. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. *Circulation*, 1996. **94**(9): p. 2193-200.
55. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. *Circulation*, 1997. **96**(5): p. 1641-6.
56. Mounsey, R.A., et al., *Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning*. *J Otolaryngol*, 1992. **21**(5): p. 315-20.
57. Bøtker, H.E., et al., *Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial*. *The Lancet*, 2010. **375**(9716): p. 727-734.
58. Schmidt, M.R., et al., *Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1883-90.
59. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism*. *Circulation*, 2007. **116**(12): p. 1386-95.
60. Bauer, I., et al., *Remote ischaemic preconditioning regulates protein expression in the myocardium: 4AP5 - 8*. *European Journal of Anaesthesiology (EJA)*, 2011. **28**: p. 52-53.
61. Wirthle, N., *Remote Ischemic Preconditioning reduces myocardial infarct size and troponin T*. *Shock*, 2009. **32**(7).
62. Petrishchev, N.N., et al., *Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning?* *Pathophysiology*, 2001. **7**(4): p. 271-274.
63. Kharbanda, R.K., et al., *Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo*. *Circulation*, 2002. **106**(23): p. 2881-3.
64. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(11): p. 2277-82.
65. Sloth, A.D., et al., *Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(3): p. 168-75.
66. Thielmann, M., et al., *Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial*. *Lancet*, 2013. **382**(9892): p. 597-604.
67. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
68. Candilio, L., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing cardiac bypass surgery: a randomised controlled clinical trial*. *Heart*, 2015. **101**(3): p. 185-92.

69. Donato, M., et al., *Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning*. *Experimental Physiology*, 2013. **98**(2): p. 425-434.
70. Redington, K.L., et al., *Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors*. *Basic Research in Cardiology*, 2012. **107**(2): p. 1-10.
71. Shimizu, M., et al., *Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils*. *J Surg Res*, 2010. **158**(1): p. 155-61.
72. Pedersen, C.M., et al., *Remote ischemic preconditioning prevents systemic platelet activation associated with ischemia–reperfusion injury in humans*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2011. **9**(2): p. 404-407.
73. 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.
74. Hepponstall, M., et al., *Remote ischemic preconditioning (RIPC) modifies plasma proteome in humans*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e48284.
75. Lang, S.C., et al., *Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods?* *Basic Res Cardiol*, 2006. **101**(2): p. 149-58.
76. Serejo, F.C., et al., *Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic preconditioning*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. **49**(4): p. 214-20.
77. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. *Circ Res*, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
78. Davidson, S.M., et al., *Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1alpha/CXCR4 signalling axis*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(5): p. 377.
79. Giricz, Z., et al., *Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2014. **68**: p. 75-78.
80. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. *Circ Res*, 2015. **116**(4): p. 674-99.
81. Leung, C.H., et al., *Remote Cardioprotection by Transfer of Coronary Effluent from Ischemic Preconditioned Rabbit Heart Preserves Mitochondrial Integrity and Function via Adenosine Receptor Activation*. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2014. **28**(1): p. 7-17.
82. Cai, Z.P., et al., *Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia–reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10*. *Basic Research in Cardiology*, 2012. **107**(4): p. 1-12.
83. Hausenloy, D.J., et al., *Investigating the Signal Transduction Pathways Underlying Remote Ischemic Conditioning in the Porcine Heart*. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2012. **26**(2): p. 87-93.
84. Breivik, L., et al., *Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion*. *Basic Research in Cardiology*, 2011. **106**(1): p. 135-145.
85. Xin, P., et al., *Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic*

- preconditioning*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2010. **298**(6): p. H1819-H1831.
86. Kalakech, H., et al., *Role of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  in remote limb ischemic preconditioning*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2013. **65**: p. 98-104.
  87. Wolfrum, S., et al., *Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC $\epsilon$ -isoform*. Cardiovascular Research, 2002. **55**(3): p. 583-589.
  88. Brandenburger, T., et al., *Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 228.
  89. Heusch, G., et al., *Remote ischemic conditioning*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(2): p. 177-95.
  90. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 450-6.
  91. Zhang, S.-z., et al., *Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning*. Anesthesiology, 2006. **105**(3): p. 550-556.
  92. Schmidt, M.R., A. Redington, and H.E. Botker, *Remote conditioning the heart overview: translatability and mechanism*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(8): p. 1947-60.
  93. Dickson, E.W., et al., *Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence*. J Thromb Thrombolysis, 1999. **8**(2): p. 123-9.
  94. Shimizu, M., et al., *Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection*. Clinical Science, 2009. **117**(5): p. 191-200.
  95. Pitcher, J.M., et al., *Preconditioning: gender effects*. J Surg Res, 2005. **129**(2): p. 202-20.
  96. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovascular Research, 2007. **75**(3): p. 478-486.
  97. Schulman, D., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1630-6.
  98. Przyklenk, K., et al., *Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(14): p. 1393-8.
  99. Boengler, K., et al., *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 131-5.
  100. Przyklenk, K., *Ischaemic conditioning: pitfalls on the path to clinical translation*. British Journal of Pharmacology, 2015. **172**(8): p. 1961-1973.
  101. Zimmer, H.G., *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. News Physiol Sci, 1998. **13**: p. 203-210.
  102. 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.
  103. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1895. **61**(6): p. 291-332.

## Literaturverzeichnis

104. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1897. **66**(7-8): p. 355-400.
105. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **55**(2): p. 113-26.
106. Tani, M., et al., *Changes in Ischemic Tolerance and Effects of Ischemic Preconditioning in Middle-aged Rat Hearts*. Circulation, 1997. **95**(11): p. 2559-2566.
107. Fenton, R.A., et al., *Aging Reduces the Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning in the Rat Heart*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2000. **32**(7): p. 1371-1375.
108. Barthel, H., et al., *Effect of lidocaine on ischaemic preconditioning in isolated rat heart*. British Journal of Anaesthesia, 2004. **93**(5): p. 698-704.
109. Giricz, Z., et al., *Hyperlipidemia attenuates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning: role of matrix metalloproteinase-2 inhibition*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 154-61.
110. 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.
111. Yadav, H.N., M. Singh, and P.L. Sharma, *Modulation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidaemic rat heart*. European Journal of Pharmacology, 2010. **643**(1): p. 78-83.
112. Andersen, A., et al., *Ischemic preconditioning reduces right ventricular infarct size through opening of mitochondrial potassium channels*. Cardiology, 2012. **123**(3): p. 177-80.
113. Wang, W., et al., *Exercise Training Preserves Ischemic Preconditioning in Aged Rat Hearts by Restoring the Myocardial Polyamine Pool*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014. **2014**: p. 14.
114. Watts, J.A. and P.C. Maiorano, *Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(9): p. 1653-62.
115. Dickson, E.W., et al., *Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2451-7.
116. Hildebrandt, H.A., et al., *Kinetics and Signal Activation Properties of Circulating Factor(s) From Healthy Volunteers Undergoing Remote Ischemic Pre-Conditioning*. JACC: Basic to Translational Science, 2016. **1**(1-2): p. 3-13.
117. Weber, N.C., et al., *Plasma from human volunteers subjected to remote ischemic preconditioning protects human endothelial cells from hypoxia-induced cell damage*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(2): p. 17.
118. Ostadal, B. and P. Ostadal, *Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: Therapeutic implications*. British Journal of Pharmacology, 2014. **171**(3): p. 541-554.
119. Song, X., et al., *Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(4): p. 459-66.
120. Crisostomo, P.R., et al., *Postconditioning in females depends on injury severity*. J Surg Res, 2006. **134**(2): p. 342-7.
121. Demerouti, E., et al., *Ovariectomy reinstates the infarct size-limiting effect of postconditioning in female rabbits*. Cell Biochem Biophys, 2013. **65**(3): p. 373-80.

## Literaturverzeichnis

122. Booth, E.A., N.R. Obeid, and B.R. Lucchesi, *Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H2039-47.
123. Boengler, K., R. Schulz, and G. Heusch, *Loss of cardioprotection with ageing*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 247-61.
124. Przyklenk, K., G. Li, and P. Whittaker, *No loss in the in vivo efficacy of ischemic preconditioning in middle-aged and old rabbits*. Journal of the American College of Cardiology, 2001. **38**(6): p. 1741-1747.
125. Burns, P., et al., *Is the preconditioning response conserved in senescent myocardium?* The annals of thoracic surgery, 1996. **61**(3): p. 925-929.
126. Schmidt, M.R., et al., *Remote ischemic preconditioning impairs ventricular function and increases infarct size after prolonged ischemia in the isolated neonatal rabbit heart*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **147**(3): p. 1049-55.
127. Heusch, G. and B.J. Gersh, *ERICCA and RIPHeart: two nails in the coffin for cardioprotection by remote ischemic conditioning? Probably not!* Eur Heart J, 2016. **37**(2): p. 200-2.
128. Kleinbongard, P., et al., *Confounders of Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting*. Cardiology, 2016. **133**(2): p. 128-133.
129. Demontis, F., et al., *Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models*. Disease Models & Mechanisms, 2013. **6**(6): p. 1339-1352.
130. Tesauro, M., et al., *Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification*. J Intern Med, 2017. **281**(5): p. 471-482.
131. Seals, D.R., K.L. Jablonski, and A.J. Donato, *Aging and vascular endothelial function in humans*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(9): p. 357-75.
132. Zitta, K., et al., *Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultured human intestinal cells from hypoxia-induced damage: involvement of matrixmetalloproteinase-2 and -9*. Mol Med, 2012. **18**: p. 29-37.
133. Huhn, R., et al., *Helium-induced late preconditioning in the rat heart in vivo*‡. BJA: British Journal of Anaesthesia, 2009. **102**(5): p. 614-619.
134. Behmenburg, F., et al., *Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2016.
135. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation*. Basic Res Cardiol, 1995. **90**(5): p. 418-23.
136. Eckle, T., et al., *Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2533-40.
137. Khaliulin, I., et al., *Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 3): p. 1147-61.
138. Schwarz, E.R., et al., *What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat?* J Thromb Thrombolysis, 2000. **10**(2): p. 181-7.
139. Ferrera, R., et al., *One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(4): p. 327-31.

## Literaturverzeichnis

140. McCafferty, K., et al., *The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities*. Dis Model Mech, 2014. **7**(12): p. 1321-33.
141. Jensen, R.V., et al., *Impact of O-GlcNAc on cardioprotection by remote ischaemic preconditioning in non-diabetic and diabetic patients*. Cardiovasc Res, 2013. **97**(2): p. 369-78.
142. Vasdekis, S.N., et al., *The role of remote ischemic preconditioning in the treatment of atherosclerotic diseases*. Brain and Behavior, 2013. **3**(6): p. 606-616.
143. Whittaker, P. and K. Przyklenk, *From ischemic conditioning to 'hyperconditioning': clinical phenomenon and basic science opportunity*. Dose Response, 2014. **12**(4): p. 650-63.

Danksagung

## 6 Danksagung

**Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen** für die Möglichkeit, die Untersuchungen in seiner Klinik durchführen zu können.

**Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer** für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, die mir gebotenen Rahmenbedingungen im Institut und die hilfreiche Unterstützung, welche ich zu jedem Zeitpunkt der Arbeit erhielt.

**Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen** für das Überlassen des Themas, die experimentelle Betreuung und Supervision, Hilfe bei Problemstellungen und anregende Diskussionen.

**Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen** und **Dr. med. Friederike Behmenburg** für die experimentelle Supervision und Hilfe bei technischen Fragestellungen.

**Priv.-Doz. Dr. med. Tanja Meyer-Treschan, Dr. med. Maximilian Schäfer und Renate Babian** für die Organisation der Intervention und den Einblick in die klinische Forschung.

**Birgitt Berke, Claudia Dohle, Antje Nebert, die weiteren Mitarbeitern des Instituts, die Tierpfleger und Frau Niketta**, die im täglichen Laborbetrieb eine große Hilfe waren.

**Meryem und Halit Aytulun** für die uneingeschränkte Unterstützung meines gesamten Bildungsweges und meiner Schwester **Sema Aytulun** für die aufmunternden Worte und Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt den **freiwilligen Probanden** für die Teilnahme an dieser Studie und Ihr Vertrauen.