

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Benedikt Pannen

**Altersabhängige Effekte von humanem Plasma nach
ischämischer Fernpräkonditionierung auf intrakardiale
Signaltransduktionswege im isolierten Rattenherzen
– eine proteinbiochemische Analyse –**

Dissertation

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

vorgelegt von
Susanne M. Feit
2019

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

gez.:

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

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen A., Behmenburg F., Aytulun A., Dierkes M., Zerbin L., Kaisers W., Schaefer M., Meyer-Treschan T., Feit S., Bauer I., Hollmann M.W., Huhn R., The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent

Journal of Translational Medicine 27. April 2018;**16**:112

doi: [10.1186/s12967-018-1480-0](https://doi.org/10.1186/s12967-018-1480-0)

Zusammenfassung

Kardioprotektive Strategien haben als Ziel, das Myokard vor einem Ischämie- und Reperfusionsschaden zu schützen und die Infarktgröße zu reduzieren. Die ischämische, herzfjerne Präkonditionierung (engl. *Remote Ischemic PreConditioning*, RIPC) ist ein vielversprechender, physiologischer endogener Mechanismus, der eine Kardioprotektion u.a. über humorale Faktoren vermittelt. Es gibt Hinweise, dass die Wirksamkeit der RIPC durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise höheres Lebensalter, beeinflusst werden kann. Untersuchungen zeigten bereits, dass eine Infarktgrößenreduktion an isoliert perfundierten Rattenherzen durch RIPC-Plasma jüngerer Probanden induziert wurde, jedoch nicht durch RIPC-Plasma älterer Probanden. In dieser Arbeit wurden die intrakardialen Signalwege untersucht, die durch humorale Faktoren aus dem RIPC-Plasma der Probanden eine Protektion der Myozyten bewirken könnten. Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob freigesetzte humorale Faktoren von jüngeren und älteren Probanden bei dem Transfer auf ein *in vitro* Langendorffherz potentiell protektive intramyokardiale Proteine aktivieren und ob altersspezifische Unterschiede bestehen.

Bei jeweils zehn männlichen Probanden im Alter zwischen 18 bis 30 Jahren bzw. 60 bis 80 Jahren wurde eine RIPC durchgeführt. Blut wurde den Probanden vor (Kontrolle, CON) und nach dem RIPC-Manöver entnommen. Das Blutplasma von jedem Probanden wurde dann in einer Langendorff-Apparatur an einem isoliert perfundierten Herzen einer jungen männlichen Wistar-Ratte getestet. Dazu wurde nach einer Stabilisierungsphase jeweils das Kontroll- und RIPC-Plasma für 10 Minuten in den Koronarblutfluss appliziert. Anschließend wurden die Herzen mittels Western Blot auf bekannte intrakardiale Signalproteine und deren Phosphorylierung untersucht. Die Schwerpunkte waren der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) Signalweg mit den beteiligten Proteinen Proteinkinase B (AKT), extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) und Glykogensynthasekinase-3- β (GSK3 β), der Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G (NO/PKG) Signalweg mit der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die Signalkaskade über die Proteinkinase A mit dem Protein Phospholamban (PLB). Es wurde die relative Expression der phosphorylierten Form der Proteine zum Gesamtprotein berechnet und auf die Expression der Positivkontrolle (Forskolin-behandeltes Herz) bezogen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem abhängigen t-Test (*paired Student's t-test*) ($p < 0,05$).

Verglichen mit dem Kontroll-Plasma induzierte RIPC-Plasma von jungen Probanden im isolierten Rattenherz die Phosphorylierung von GSK3 β ($0,56 \pm 0,36$ vs. CON: $0,41 \pm 0,29$). Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,05$). Für die anderen untersuchten Proteine zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsstatus: pAKT ($0,28 \pm 0,21$ vs. CON $0,38 \pm 0,43$), pERK1/2 ($1,71 \pm 0,87$ vs. CON $1,80 \pm 0,62$), peNOS ($0,76 \pm 0,28$ vs. CON $0,78 \pm 0,33$) oder pPLB ($0,24 \pm 0,14$ vs. CON $0,22 \pm 0,14$). Nach Behandlung der Herzen mit RIPC-Plasma der älteren Probanden zeigte sich bei keinem der untersuchten Proteine eine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus: pAKT ($0,26 \pm 0,10$ vs. CON: $0,23 \pm 0,09$), pERK1/2 ($3,42 \pm 1,89$ vs. CON: $2,92 \pm 1,33$), peNOS ($0,82 \pm 0,53$ vs. CON: $0,71 \pm 0,44$), pGSK3 β ($0,45 \pm 0,26$ vs. CON: $0,36 \pm 0,13$) oder pPLB ($0,34 \pm 0,18$ vs. CON: $0,37 \pm 0,18$).

Humorale Faktoren, die durch RIPC freigesetzt werden, können intramyokardiale Proteine aktivieren und kardioprotektive Wirkung zeigen. Durch RIPC-Plasma der jungen Probanden kann eine vermehrte Phosphorylierung von GSK3 β beschrieben werden. GSK3 β ist ein Konvergenzpunkt des intrakardialen RISK-Signalweges und durch eine Phosphorylierung kann die Hemmung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore induziert werden, mit der die Kardioprotektion eng verbunden ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das RIPC-Plasma der älteren Probanden über 60 Jahre bei dem Transfer auf das *in vitro* Herz keine vermehrte Phosphorylierung der untersuchten intrakardialen Proteine induziert. Ursachen für ein Fehlen dieser Wirkung könnten eine fehlende, verzögerte oder auch unzureichende Freisetzung der humoralen Faktoren nach RIPC sein.

Abstract

Cardioprotective strategies aim to protect the myocardium from ischemia and reperfusion injury and to reduce infarct size. Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a promising physiological endogenous mechanism that mediates cardioprotection through, among others, humoral factors. There is evidence that the effectiveness of RIPC can be influenced by several factors, such as older age. Studies have shown that an infarct size reduction was induced in isolated perfused rat hearts by application of RIPC plasma of younger healthy human volunteers, but not by RIPC plasma of older subjects. In this work, the intracardiac signaling pathways were investigated, which could cause protection of the myocytes induced by humoral factors from the RIPC plasma of the subjects. The aim of this study was to investigate whether released humoral factors of younger and older subjects activate potentially protective intramyocardial proteins when transferred to an *in vitro* Langendorff heart and whether age-specific differences exist.

RIPC was performed in male subjects aged from 18 to 30 years and 60 to 80 years, each group n=10. Blood was taken from the subjects before (control, CON) and after the RIPC maneuver. Plasma of each subject was transferred to an isolated perfused heart of a young male Wistar rat (Langendorff preparation). Hearts were perfused for 10 minutes with control or RIPC plasma. Subsequently, the hearts were examined by Western Blot analysis to assess the expression of intracardiac signal proteins and their phosphorylation status. The focus was on the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway with the protein kinase B (AKT), extracellularly regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and glycogen synthase kinase-3- β (GSK3 β), the nitric oxide / Protein kinase G (NO/PKG) pathway with endothelial NO synthase (eNOS) and the signal cascade via protein kinase A with the protein phospholamban (PLB). The relative expression of the phosphorylated form of the proteins to the total protein was calculated and related to the expression of the positive control (forskolin-treated heart). Data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical evaluation was performed with a paired student's t-test ($p < 0.05$).

Compared with the control plasma, RIPC plasma from young subjects in the isolated rat heart induced the phosphorylation of GSK3 β (0.56 ± 0.36 vs. CON: 0.41 ± 0.29 , $p < 0.05$). For all other proteins examined, there was no significant difference in the phosphorylation status: pAKT (0.28 ± 0.21 vs. CON 0.38 ± 0.43), pERK1/2 (1.71 ± 0.87 vs. CON 1.80 ± 0.62), peNOS (0.76 ± 0.28 vs. CON 0.78 ± 0.33) or pPLB (0.24 ± 0.14 vs. CON 0.22 ± 0.14). After treatment of the hearts with RIPC plasma of the older volunteers, none of the examined proteins showed a significant change in the phosphorylation status: pAKT (0.26 ± 0.10 vs. CON: 0.23 ± 0.09), pERK1 / 2 (3.42 ± 1.89 vs. CON: 2.92 ± 1.33), peNOS (0.82 ± 0.53 vs. CON: 0.71 ± 0.44), pGSK3 β (0.45 ± 0.26 vs. CON: 0.36 ± 0.13) or pPLB (0.34 ± 0.18 vs. CON: 0.37 ± 0.18).

Humoral factors released by RIPC can activate intramyocardial proteins and have cardioprotective effects on target structures. RIPC plasma of young subjects increased phosphorylation of GSK3 β . GSK3 β serves as a point of convergence of the intracardiac RISK signaling pathway and its phosphorylation results in inhibition of the mitochondrial permeability transition pore, which is associated with cardioprotection. These results indicate that the RIPC plasma of older subjects over the age of 60 does not induce increased phosphorylation of the intracardiac proteins studied during transfer to the *in vitro* heart. Reasons for the lack of this effect by the plasma from the older subjects may be the lack, delayed or inadequate release of the humoral factors after RIPC.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>anatomic area at risk</i>
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Blocker
BSA	Rinderserumalbumin
CON	Kontrolle
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase - 3 - β
IC	<i>Ischemic Conditioning</i>
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
I/R	Ischämie und Reperfusion
IPC	<i>Ischemic PreConditioning</i>
IPost	<i>Ischemic Postconditioning</i>
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
mK_{Ca}-Kanal	mitochondrialer kalziumabhängiger Kaliumkanal
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association

pH	<i>pondus Hydrogenii</i> oder <i>potentia Hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RIC	Herzferne Ischämische Konditionierung (<i>Remote Ischemic Conditioning</i>)
RIPC	Herzferne Ischämische Präkonditionierung (<i>Remote Ischemic PreConditioning</i>)
RIPer	<i>Remote Ischemic Perconditioning</i>
RIPost	<i>Remote Ischemic Postconditioning</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinische Relevanz des Myokardinfarktes und des Ischämie/Reperfusionsschadens	1
1.2	Konditionierung.....	3
1.3	Mechanismen der ischämischen Fernpräkonditionierung.....	6
1.3.1	Induktion der ischämischen Fernpräkonditionierung	6
1.3.2	Inter-Organ-Kommunikation und Mediatoren der ischämischen Fernpräkonditionierung.....	6
1.3.3	Das Langendorff-Modell	8
1.3.4	Interkardiale Signaltransduktion und Endeffektoren der ischämischen Fernpräkonditionierung.....	9
1.4	Klinische Anwendung von ischämischer Fernpräkonditionierung und möglicher Störfaktor Alter.....	12
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemikalien.....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
2.1.3	Puffer und Lösungen	17
2.1.4	Verwendete Antikörper	20
2.2	Methode	21
2.2.1	Ischämische Fernpräkonditionierung und Gewinnung des humanen Plasmas 22	
2.2.2	Versuchstiere und Applikation des Plasmas an der Langendorff-Anlage	23
2.2.3	Proteinbiochemische Analyse.....	24
2.2.3.1	Probenaufarbeitung.....	24
2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung und Probeneinstellung	24
2.2.3.3	Gelelektrophorese.....	24

2.2.3.4	Transfer	26
2.2.3.5	Nachkontrolle der Gele	26
2.2.3.6	Blocken	27
2.2.3.7	Immunfärbung	27
2.2.3.8	Entwicklung und Auswertung	27
2.2.4	Statistische Datenanalyse	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Effekte auf die Proteinphosphorylierung durch das Kontroll- und das RICP-Plasmas der jungen Probanden	30
3.2	Effekte auf die Proteinphosphorylierung durch das Kontroll- und das RICP-Plasmas der älteren Probanden	37
4	Diskussion	42
4.1	Beantwortung der Fragestellung	42
4.2	Veränderungen in den Signalkaskaden nach Ischämischer Fernpräkonditionierung	43
4.2.1	Reperfusion Injury Salvage Kinase Signalweg	45
4.2.2	Der Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G - Signalweg	47
4.2.3	Signalkaskade mK _{Ca} -Kanal und Proteinkinase A	48
4.3	Diskussion der Methode	48
4.3.1	Probanden	48
4.3.2	Stimulus der ischämischen Fernpräkonditionierung	49
4.3.3	Übertragung des humoralen Faktors	49
4.3.4	Intrakardiale Proteinaktivierung	51
4.4	Ausblick	52
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	53
6	Danksagung	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mögliche Kaskade des Zelluntergangs durch den Ischämie-/Reperfusion-(I/R)-Schaden am Herzen.	3
Abb. 2: Schematische Skizze der Langendorff Apparatur	9
Abb. 3: Myokardiale Signaltransduktion	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Materialien in der Transferkassette	26
Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der <i>enhanced chemoluminescence</i> -Reaktion.....	28
Abb. 6: Exemplarische Darstellung eines Western Blots	31
Abb. 7: Relative Expression von phosphoryliertem AKT zu gesamten AKT im Verhältnis zum Standard	32
Abb. 8: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten ERK1/2 und dem gesamten ERK 1/2.....	33
Abb. 9: Relative Expression von phosphoryliertem ERK1/2 zu gesamten ERK1/2 im Verhältnis zum Standard.....	33
Abb. 10: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten eNOS und dem gesamten eNOS	34
Abb. 11: Relative Expression von phosphoryliertem eNOS zu gesamten eNOS im Verhältnis zum Standard.....	34
Abb. 12: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten GSK3 β und dem gesamten GSK3 β	35
Abb. 13: Relative Expression von phosphoryliertem GSK3 β zu gesamten GSK3 β im Verhältnis zum Standard.....	35
Abb. 14: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten PLB und dem gesamten PLB	36
Abb. 15: Relative Expression von phosphoryliertem PLB zu gesamten PLB im Verhältnis zum Standard	36
Abb. 16: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten AKT und dem gesamten AKT	37
Abb. 17: Relative Expression von phosphoryliertem AKT zu gesamten AKT im Verhältnis zum Standard	37

Abb. 18: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten ERK1/2 und dem gesamten ERK 1/2.....	38
Abb. 19: Relative Expression von phosphoryliertem ERK1/2 zu gesamten ERK1/2 im Verhältnis zum Standard.....	38
Abb. 20: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten eNOS und dem gesamten eNOS	39
Abb. 21: Relative Expression von phosphoryliertem eNOS zu gesamten eNOS im Verhältnis zum Standard.....	39
Abb. 22: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten GSK3 β und dem gesamten GSK3 β	40
Abb. 23: Relative Expression von phosphoryliertem GSK3 β zu gesamten GSK3 β im Verhältnis zum Standard.....	40
Abb. 24: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten PLB und dem gesamten PLB	41
Abb. 25: Relative Expression von phosphoryliertem PLB zu gesamten PLB im Verhältnis zum Standard	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper bei der Western Blot Analyse	20
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper bei der Western Blot Analyse	21
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Gele	25

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz des Myokardinfarktes und des Ischämie/Reperfusionsschadens

Durch die demographischen Veränderungen in der Altersstruktur unserer Gesellschaft spielen kardiovaskuläre Erkrankungen eine immer größere Rolle. Insbesondere Herzerkrankungen aufgrund einer Myokardischämie, wie der Myokardinfarkt oder die ischämische Herzinsuffizienz, sind in einem hohen Maße mit dem Lebensalter vergesellschaftet. Der Myokardinfarkt zum Beispiel zeigt einen Anstieg der Prävalenz im Alter von 1,5% bei den 40 bis 49-Jährigen auf 10,2% bei den 70 bis 79-Jährigen (1). Vor allem bei älteren Menschen führen die Herzerkrankungen zum Tod. Zahlen des statistischen Bundesamtes belegen, dass 92% der an kardiovaskulären Erkrankungen Verstorbenen 65 Jahre oder älter waren (2).

Der demographische Wandel mit steigendem Anteil alter Menschen in der Gesellschaft bildet sich zwangsläufig auch in den chirurgischen Disziplinen ab. Die Häufigkeit notwendiger Operationen bei älteren, multimorbiden Menschen steigt. Im Jahr 2012 wurden in Deutschland 15,7 Millionen Operationen durchgeführt. Der Anteil der Patienten, die über 65 Jahre alt waren, lag bei über 41% (3). Es kommt insbesondere bei den älteren, multimorbiden Patienten zu erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten, wobei hier kardiovaskuläre Komplikationen eine führende Rolle einnehmen (4–6). Insbesondere der perioperative Myokardinfarkt ist mit einer schlechten Überlebensprognose verbunden (7).

Der Myokardinfarkt in perioperativen Situationen entsteht entweder aufgrund einer Koronarplaqueverletzung mit resultierendem intraluminalen Thrombus oder aufgrund eines Missverhältnisses zwischen myokardialen Sauerstoffbedarf und -angebot (8). Dadurch kommt es zu einer fehlenden Versorgung mit Sauerstoff und Substraten in den Kardiomyozyten. Dies führt zunächst dazu, dass sich die Zellen adaptieren und ihre Energieproduktion vorübergehend über die anaerobe Glykolyse sichern. Ohne Therapie kommt es aber durch eine Akkumulation von Metaboliten und dem Versagen der Kompensationsmechanismen im ischämischen Gewebe zum Zelltod. Eine erfolgreiche Reperfusion des Gewebes durch Wiedereröffnung der Koronararterie kann daher die Infarktgröße und das Outcome des Patienten verbessern (9,10). Jedoch kann auch die Reperfusion einen weiteren Zellschaden induzieren. Daher ist, selbst bei einer begrenzten ischämischen Periode, die funktionelle Erholung des reperfundierten Herzens oft weniger erfolgreich als erwartet (11). Der Grund hierfür ist der sogenannte Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R) Schaden (12). Zelluläre und subzelluläre Prozesse in den Kardiomyozyten führen zu

einer lokalen Entzündungsreaktion, Stoffwechselstörungen und Zelltod als Hauptursachen für I/R-Schäden.

Mögliche intrazelluläre Zusammenhänge zwischen Ischämie und Reperfusion sind in Abbildung 1 dargestellt. In den ischämischen Kardiomyozyten wird durch die anaerobe Glykolyse der Energiestoffwechsel zu Beginn aufrechterhalten. Dies verursacht eine Kumulation von Laktat, und der pH-Wert sinkt. Einerseits kommt es daher zu einer veränderten Sensitivität des Troponin C, und eine kontraktile Dysfunktion der Myozyten wird induziert. Andererseits kommt es zu einer Veränderung des transmembranen Ionentransportes. Dies führt letztlich zu einer Azidose und Ca^{2+} -Überladung.

Die Reperfusion versorgt das Gewebe wieder mit Sauerstoff und Substraten, wodurch überschüssiges Laktat und Protonen aus den Myokardzellen herausgewaschen werden und ein physiologischer pH-Wert wiederhergestellt wird. Dies wird als pH-Paradoxon bezeichnet, da der physiologische pH-Wert einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom bis zur Ca^{2+} -Überladung bewirkt (Calciumparadoxon) und durch den wieder zugeführten Sauerstoff werden in den Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert (Sauerstoffparadoxon). ROS können die DNA, Proteine oder Lipide schädigen und entzündliche thrombogene Kaskaden aktivieren. Zusammen bewirken die Ca^{2+} -Überladung, die ROS-Freisetzung und der renormalisierte pH-Wert eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Pore (engl. *mitochondrial permeability transition pore*; mPTP) und damit eine Apoptose der Kardiomyozyten und auch eine Zerstörung der Zellstruktur (13,14).

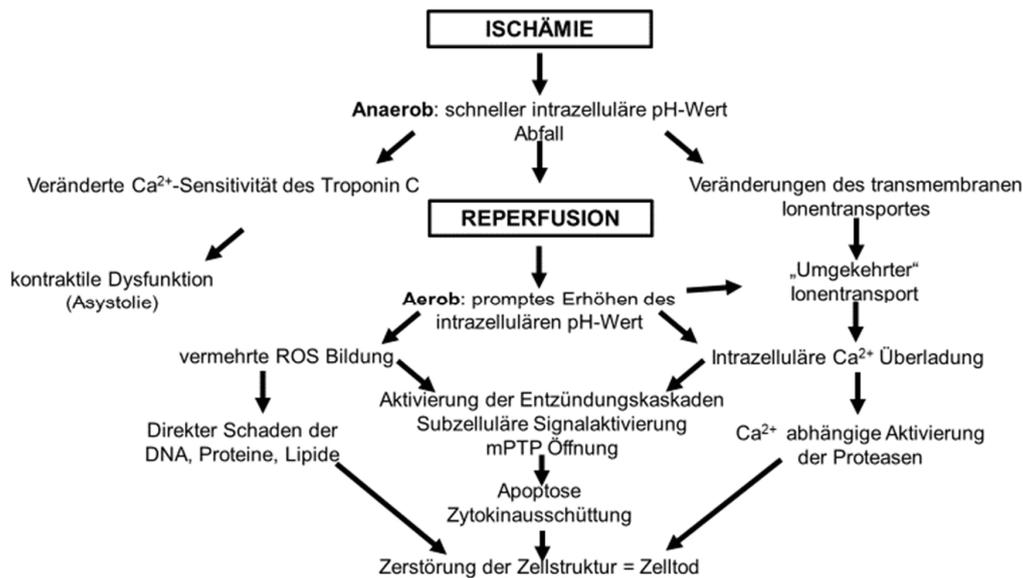


Abb. 1: Mögliche Kaskade des Zelluntergangs durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden am Herzen (15). Es ist ein Verlauf möglicher intrazellulärer Vorgänge in den Kardiomyozyten durch Ischämie und Reperfusion skizziert. Erläuterung im Text. mPTP: mitochondriale Permeabilitäts Pore. Ca²⁺: Calcium. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. Modifiziert nach Sanada et al. 2011.

Mit bis zu 50% hat der Reperfusionsschaden einen großen Beitrag am Gesamtinfarkt (16,17). Bisher existieren keine evidenzbasierten Interventionen, um reperfusioninduzierte Myokardschäden zu therapieren (14). Es ist bekannt, dass durch kurze Zyklen von Ischämie und Reperfusion, die vor, während oder nach einem länger andauernden Koronarverschluss mit anschließender Reperfusion appliziert werden, eine protektive Wirkung erzielt werden kann. Durch diese kardioprotektive Maßnahme wird der Myokardschaden und somit die finale Infarktgröße reduziert (18–20).

Zukünftige präventive Strategien zielen darauf ab, diesen natürlichen myokardeigenen protektiven Mechanismus zu nutzen. Die Aufklärung der beteiligten Signalwege, der molekularen Mechanismen dieser Signalwege und der Ursachen von alterungsbedingten Wirkveränderungen könnten zur Entwicklung spezifischer pharmakologischer Interventionen führen, die die Mortalitäts- und Morbiditätsrisiken von Patienten mit Herzerkrankungen minimieren können. Einen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen des kardioprotektiven Effektes soll diese Arbeit leisten. Bekannte Mechanismen der Kardioprotektion werden im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

1.2 Konditionierung

Unter dem Begriff Konditionierung werden verschiedene endogene Phänomene zusammengefasst, die eine Reduktion von Schäden durch Ischämie/Reperfusion am Herzen bewirken. Dazu zählen unter anderem die ischämische Präkonditionierung (13,18),

die ischämische Postkonditionierung (21,22) und die Fernkonditionierung (20,23) sowie pharmakologische Interventionen (14).

Eine Strategie zur Reduktion des I/R-Schadens und damit auch der finalen Infarktgröße des Herzens ist die ischämische Konditionierung (engl. *Ischemic Conditioning*, IC). Dabei werden Organe durch kurze, nicht schädigende Ischämie-Zyklen auf eine anschließende, länger andauernde Ischämie vorbereitet. Diese Form der Konditionierung wird ischämische Präkonditionierung (engl. *ischemic PreConditioning*, IPC) genannt. Dadurch werden endogene Schutzmechanismen aktiviert, die die Toleranz der Zellen gegen Auswirkungen einer konsekutiven Index-Ischämie erhöhen.

Erstmals beschrieben wurde die IPC des Herzens von Murry et al. 1986. In einer experimentellen Studie zeigten die Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung eine deutliche Reduktion der Infarktgröße in dem anatomischen Risikogebiet (engl. *Anatomic Area at Risk*, AAR) bei den präkonditionierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (24). Seit der Erstbeschreibung dieses Phänomens sind enorme Fortschritte im Verständnis dieses hochpotenten Schutzmechanismus am Herzen erzielt worden. Am Menschen wurde der Schutz durch ischämische Konditionierung erstmals von Yellon et al. beobachtet. Sie konnten bei Patienten, die sich einer Herz-Bypass-Operation unterzogen, zeigen, dass eine vorübergehende Ischämie vor einem Absinken des ventrikulären ATP-Spiegels bewahrt (25).

Es gibt zwei zeitliche Fenster der ischämischen Präkonditionierung (13). Der initiale protektive Effekt tritt unmittelbar nach dem präkonditionierenden ischämischen Stimulus auf und schützt das Herz für etwa zwei Stunden (18). Es wird angenommen, dass der sofortige Schutz auf einer Rekrutierung von akut verfügbaren Signalmolekülen beruht (26). Nach der initialen präkonditionierenden Ischämie setzt nach etwa 24 Stunden ein zweites Fenster der Protektion ein (27). Die verzögerte Form wird durch eine erhöhte Expression protektiver Proteine als Reaktion auf ein akutes Signal verursacht (28).

Die IPC kann nur bei elektiven Eingriffen wie PTCA oder einer koronaren Bypass-Operation eingesetzt werden (29). Bei Patienten mit bereits bestehendem akutem Koronarsyndrom oder Herzinfarkt kann keine Präkonditionierung mehr erfolgen. Hier wurde der Effekt einer Postkonditionierung (engl. *Ischemic Postconditioning*, IPost) untersucht. Eine der ersten Arbeiten zeigte an einem Tiermodell nach einer sechzigminütigen Okklusion des *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie, dass unmittelbar mit Einsetzen der Reperfusion durch 3 Zyklen von je 30 Sekunden Reperfusion und Reokklusion das betroffene kardiale Areal eine signifikant bessere morphologische Funktion zeigte (30). Damit wurde auch durch die IPost eine Infarktgrößenreduktion ähnlich wie bei einer IPC

induziert (21) und indirekt bestätigt, dass durch die Reperfusion selber ein Schaden induziert wird (31), der zur ultimativen Infarktgröße beiträgt.

Beide Interventionen, IPC und IPost, die eine entsprechende Infarktgrößenreduktion bewirken, haben Nachteile. Eine invasive (Vor-)behandlung am Herzen ist notwendig, da eine lokale Manipulation an dem beteiligten Blutgefäß erfolgt. Durch diese zusätzliche Manipulation an einem möglicherweise atherosklerotisch veränderten Koronargefäß bestehen durch die IPC und IPost Risiken, wie z. B. embolische Einschwemmungen aus rupturierten atherosklerotischen Plaques (32,33). Eine mögliche nicht-invasive Methode zur Reduktion des Reperfusionsschadens ist die ischämische Fernpräkonditionierung (engl. *Remote Ischemic Conditioning*, RIC). Bei dieser Methode wird die Konditionierung des Herzens durch ischämische Vorbehandlung eines herzfernen Organs oder Gewebes ausgelöst.

Pryzklenk und ihre Mitarbeiter waren 1993 die Ersten, die Hinweise untersuchten, dass die Konditionierungszyklen möglicherweise auch Gewebeareale schützen können, die weiter entfernt liegen als das durch das Gefäß versorgte Gewebe, an dem die Zyklen durchgeführt wurden (19). Sie zeigten, dass durch die ischämische Konditionierung nicht nur das von dem Gefäß versorgte Myokardgebiet, sondern auch entfernt liegendes, von anderen Gefäßen versorgtes Myokardgewebe geschützt wird und eine Infarktgrößenreduktion zeigt (19). In den folgenden Jahren konnte durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass RIC nach ischämischer Vorbehandlung herzferner Gewebe oder Organe ausgelöst werden kann (34). Außerdem war es möglich, die anfangs hauptsächlich invasiv durchgeführte RIC, z. B. durch chirurgisch freigelegte und temporär abgeklemmte *A. mesenterica superior* (34) oder *A. femoralis* (35), auch nicht invasiv zu induzieren. Hier wurde mit kurzen Episoden von Ischämie/Reperfusion durch ein Tourniquet an einer Extremität u. a. eine verbesserte Organfunktion erreicht und eine Infarktgrößenreduktion beschrieben (36,37). Diese RIC Intervention, die einfach und nahezu ohne Nebenwirkungen und Komplikationen durchzuführen sowie kostengünstig ist, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, Patienten einen Schutz wichtiger Organe zu ermöglichen.

Je nach dem Zeitpunkt des ischämischen Ereignisses im Myokard kann auch die Fern-Konditionierung vor (engl. *Remote Ischemic PreConditioning*, RIPC), während (engl. *Remote Ischemic PerConditioning*, RIPerC) oder nach (engl. *Remote Ischemic PostConditioning*, RIPOC) der Index-Ischämie eingesetzt werden (38). Eine Reduktion der Infarktgröße konnte nach Anwendung von RIC zu den unterschiedlichen Zeitpunkten beschrieben werden (39,40). Wie bei den lokalen Formen der Konditionierung sind auch für die RIC ein frühes und ein spätes Zeitfenster der Protektion beschrieben (41,42).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem frühen Fenster der Kardioprotektion durch RIPC. Daher wird im folgenden Abschnitt auf die bisher bekannten Wirkmechanismen näher eingegangen.

1.3 Mechanismen der ischämischen Fernpräkonditionierung

Die zugrundeliegenden Mechanismen und die beteiligten Signalwege der RIPC sind komplex und in ihren Details unklar. Somit sind sie Gegenstand aktueller Forschung. Es wird angenommen, dass RIPC eine komplexe Kaskade umfasst. Ausgelöst wird diese durch einen Stimulus, der im peripheren Organ oder Gewebe initiale Trigger aktiviert oder erzeugt. Durch Mediatoren erfolgt die Kommunikation zwischen dem peripheren Organ/Gewebe und dem zu schützenden Zielorgan. Dadurch wird schließlich der protektive Reiz auf die Endeffektoren, die für die Induktion der schützenden Eigenschaften im Myokard verantwortlich sind, übertragen (43).

1.3.1 Induktion der ischämischen Fernpräkonditionierung

RIPC kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Beschrieben sind u.a. elektrische Stimuli, chemisch/pharmakologische Stimuli wie Capsaicin oder Autakoide (Adenosin und Bradykinin), mechanische Stimuli durch z.B. einen Hautschnitt und Zyklen der Ischämie und Reperfusion an einer entfernten Extremität, Gewebe oder Organ (Übersicht in (44)). Alle Stimuli führen zu einer Aktivierung der peripheren sensorischen Nerven (44). Da in dieser Arbeit die RIPC durch Ischämie- und Reperusions-Zyklen am Oberarm induziert wurde, möchte ich mich im Weiteren auf diesen Stimulus fokussieren. Durch das Aufpumpen und Deflation einer Blutdruckmanschette werden Ischämie- und Reperusions-Zyklen induziert (37,45). Bei diesem Vorgehen können daher sowohl die periphere sensorische Nervenaktivierung als auch zusätzliche Mechanismen wie Hypoxie/Azidose oder vaskuläre Schubspannung zur Konditionierung beitragen (23,46).

1.3.2 Inter-Organ-Kommunikation und Mediatoren der ischämischen Fernpräkonditionierung

Wie der im Fernorgan aktivierte oder ausgelöste Trigger zum Zielorgan übertragen wird, ist ebenfalls nur unvollständig bekannt. Verschiedene Übertragungswege werden angenommen, die den Transfer von Mediatoren zum Zielorgan beschreiben. Neben einem neuronalen Signalweg und einer systemischen Reaktion wird auch ein humoraler Signalweg beschrieben (47,48).

Die neuronale Hypothese wird durch Untersuchungen belegt, die zeigen konnten, dass durch verschiedene Interventionen, die efferente oder afferente Signalwege beeinflussen

(49), u.a. Ganglienblockade (34,50) oder Vagotomie (49,51,52), eine Protektion vermindert oder gar verhindert werden kann.

Für die systemische Reaktion spricht die Beobachtung, dass der Organismus auf RIPC mit einer Veränderung des Genprofils, wie Hochregulierung antiinflammatorischer und Suppression proinflammatorischer Gene, reagiert (53,54). Untersuchungen zeigten eine Suppression der Entzündungsreaktion- und Apoptose-Kaskade (20). Für eine systemische Reaktion spricht auch, dass in allen bisher getesteten Organen nach RIPC eine Zellschädigung als Folge des I/R-Schadens reduziert werden kann (55).

Nach der humoralen Hypothese werden endogene Faktoren, die aus dem konditionierten Organ oder Gewebe freigesetzt werden, in das Blut aufgenommen und über die Blutzirkulation auf das Zielorgan übertragen, wo sie über bestimmte Rezeptoren oder auch rezeptorunabhängig intrazelluläre Signalkaskaden induzieren (23,56). Eine Reperfusion des Fernorgans wird daher als notwendig beschrieben, um die protektiven Faktoren im Blut zum Zielorgan zu transportieren (49). Unklar ist, ob diese humoralen Faktoren als Reaktion auf den Stimulus lokal freigesetzt oder von anderen neuronal aktivierten Organen freigesetzt werden (57,58). Experimentelle Studien konnten zeigen, dass eine Übertragung der kardioprotektiven Faktoren durch den Transfer von Blut, Plasma oder Plasmadialysat, das von einem Individuum nach RIPC-Manöver entnommen wurde, auf ein anderes Individuum (59) oder auf isolierte, perfundierte Herzpräparate (60), auch über Spezies hinweg (61), möglich ist. Als mögliche Faktoren wurden Stromazellen-abgeleiteter Faktor 1 (SDF-1) (62), Nitrit (63) und micro-RNA-144 (64) vorgeschlagen. Aber keiner dieser Kandidaten stellte sich als alleiniger Mechanismus heraus. Die schützenden Faktoren werden als hydrophob, thermolabil und mit einem Molekulargewicht von unter 15 kDa beschrieben (61,65).

Gegenwärtig wird angenommen, dass die Übertragung des RIPC-Signals an das Zielorgan multifaktoriell ist und daher eine Kombination der beschriebenen Mechanismen, die sich auch untereinander beeinflussen können, darstellt (49,66).

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der humoralen Übertragung eines kardioprotektiven Triggers. Humanes Plasma, das vor und nach einem RIPC-Manöver gewonnen wurde, wurde auf ein isoliertes Rattenherz transferiert. Dieser experimentelle Ansatz, bei dem ein *in vitro* isoliertes Säugetierherz zur Untersuchung der Effekte der kardioprotektiven Maßnahme eingesetzt wird, ist ein etabliertes Modell, das in vielen Studien, auch unserer Arbeitsgruppe, beschrieben ist (67–72). Ursprünglich geht die Methode auf Oscar Langendorff zurück (73). Da die in dieser Arbeit untersuchten Rattenherzgewebe in einer Studie an einer solchen Langendorff-Apparatur generiert

wurden, wird diese Methode im folgenden Abschnitt erläutert. Anschließend werde ich ausführlicher auf die intrakardiale Signaltransduktion eingehen.

1.3.3 Das Langendorff-Modell

Das Langendorff-Modell ermöglicht die isolierte Untersuchung am schlagenden Säugetierherz ohne Einfluss des Organismus. Die Erstbeschreibung des isoliert perfundierten Herzens durch den Physiologen Oscar Langendorff war im Jahre 1895. Erkenntnisse aus diesen außerhalb des Körpers schlagenden Herzen haben das heutige Wissen über die Funktion des gesunden und kranken Herzen maßgeblich geprägt (74). Das entwickelte Modell ist gut standardisierbar und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Daher findet es auch heute in der Grundlagenforschung Verwendung. In Abbildung 2 ist eine schematische Skizze der Langendorff Apparatur dargestellt.

Nach einer Sedierung wird den Säugetieren, z.B. einer Ratte, das Herz aus dem Organismus entfernt. Die Herzen unterliegen damit nicht mehr der neurohumoralen Regulation des Organismus. Sie werden retrograd über die Aorta mit oxygenierter Pufferlösung perfundiert. Durch den Perfusionsdruck schließt sich die Aortenklappe und die Koronararterien werden perfundiert. Das verwendete Perfusat (Krebs-Henseleit-Puffer) ist in Elektrolytzusammensetzung, Temperatur, pH-Wert und Gassättigung so optimiert, dass die Herzen mehrere Stunden ohne wesentliche Funktionsbeeinträchtigung schlagen können (75). Durch die Verwendung des Perfusates wird der Einfluss humoraler und zellulärer Faktoren aus dem Vollblut ausgeschaltet bzw. können, wie in dieser Arbeit, zusätzlich kontrolliert appliziert werden. Die Herzen können so zusätzlich zu der Erhebung hämodynamischer Parameter während des Experimentes nach Versuchsende z.B. biochemisch oder histologisch untersucht werden.

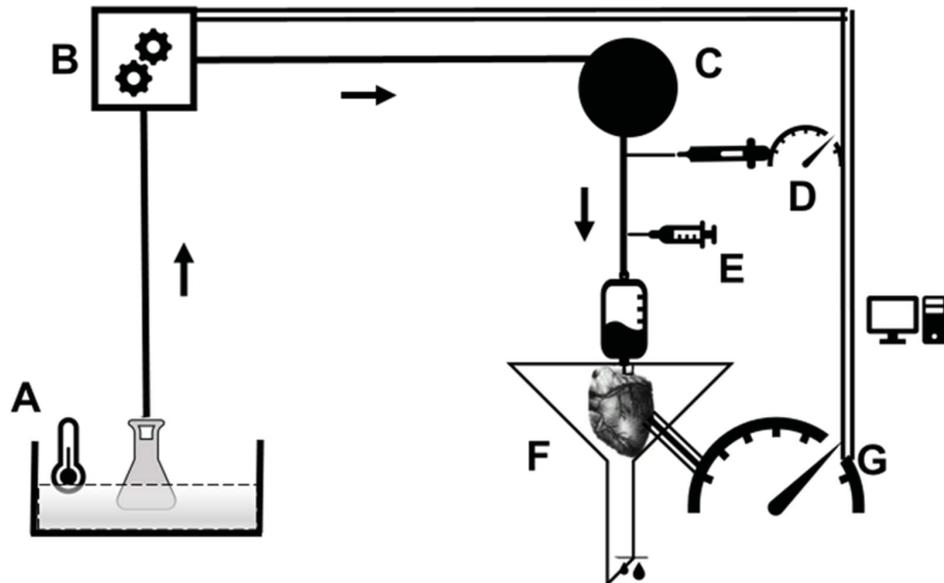


Abb. 2: Schematische Skizze der Langendorff Apparatur (76): Ein Puffergefäß mit Krebs-Henseleit-Puffer wird im Wasserbad erhitzt. Die Temperatur wird durch ein Einhängethermostat kontrolliert (A). Über eine Schlauchpumpe (B) wird das Perfusat angesaugt. Eine Luftfalle (C) entfernt mögliche Luftblasen. Der Druckaufnehmer (D) gewährleistet eine konstante Perfusion. Ein Perfusor ist über einen Dreiwegehahn zur kontinuierlichen Gabe des Blutplasmas angeschlossen (E). Das Herz wird über eine Kanüle in der Aorta perfundiert. Die Temperatur des Herzens wird durch eine Wärmekammer (F) konstant gehalten. Aus dem Koronarvenensinus des Herzens herausfließendes Krebs-Henseleit-Puffer wird gesammelt und nicht erneut zur Perfusion des Herzens verwendet (non circulating, constant pressure Langendorff-System). Ein weiterer Druckaufnehmer (G) dient der Aufzeichnung hämodynamischer Parameter des Herzens. Die beiden Druckaufnehmer (D, G) und die Pumpe (B) sind mit einer PowerLab-Station verbunden, um die Perfusionsparameter einzustellen. Modifiziert nach Aytulun (76).

1.3.4 Interkardiale Signaltransduktion und Endeffektoren der ischämischen Fernpräkonditionierung

Die neuronalen und humoralen Signale aktivieren am Zielorgan Herz kardioprotektive Signalkaskaden, die entweder durch sarkolemmale Rezeptoren oder auch durch rezeptorunabhängige Prozesse (46) initiiert werden. Die Signalkaskaden münden in intrazellulären Zielstrukturen, insbesondere den Mitochondrien. Die Beteiligung von drei Signalwegen an der Kardioprotektion wird diskutiert:

Der Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G (NO/PKG)-Signalweg kann über G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden (77). Intrazellulär wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) die NO-Bildung gesteigert und es kommt zu einer Aktivierung der Proteinkinasen G (PKG) und C (PKC) (78). Eine Wirkung erfolgt über die ATP-abhängigen Kaliumkanäle an den Mitochondrien.

Der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg, der ebenfalls durch GPCR und Wachstumsfaktorrezeptoren (GFR) aktiviert wird, umfasst zwei parallele Kaskaden. Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT B) und mitogen - aktivierte Kinase / extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (MEK 1/2 - ERK 1/2) werden parallel aktiviert (79). Diese münden in die P70 - ribosomale - S6 - Proteinkinase (P70S6K), die die Glykogensynthase-Kinase - 3 - β (GSK3 β) phosphoryliert. Die Phosphorylierung der GSK3 β reduziert die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP (80) und verhindert so den mPTP-induzierten Zelltod (81,82).

Der *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) Signalweg (83) aktiviert durch Zytokine wie den Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interleukine unter Mitwirkung der Januskinase (JAK) verschiedene Isoformen des *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) (84,85). STAT-Proteine translozieren dann in den Nukleus und nehmen Einfluss auf die Genexpression oder gelangen in die Mitochondrien und regulieren dort den Elektronentransport (83,86,87). Außerdem bewirkt die STAT-3 die Phosphorylierung der GSK3 β als Effektor des RISK-Signalwegs mit konsekutivem Verschluss der mPTP (88).

Einen Überblick und eine Zusammenfassung der beschriebenen Signalwege gibt die Abbildung 3 (44).

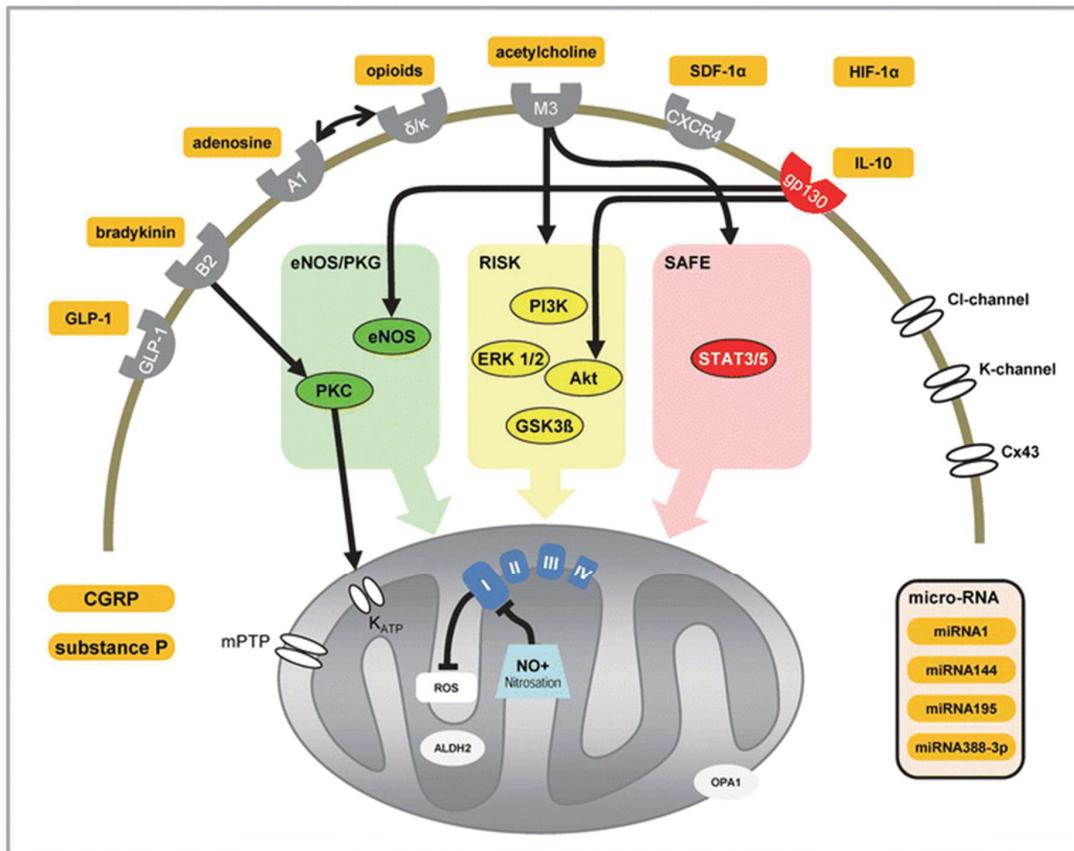


Abb. 3: Myokardiale Signaltransduktion (44) - eNOS/PKG-Signalweg in grün, RISK-Signalweg in gelb und SAFE-Signalweg in rot. I, II, III, IV Komplexe der mitochondrialen Atmungskette I, II, III, IV; δ/κ δ - und κ -Opioidrezeptor; Adenosin Rezeptor A1 (A1); Aldehydedehydrogenase 2 (ALDH2); Proteinkinase B (Akt); Bradykininrezeptor B2 (B2); Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP); Connexin43 (CX43); Chemokine 4 Rezeptor (CXCR4); endotheliale NO-Synthase (eNOS); extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2); Glukagon-like peptide-1 und der Rezeptor (GLP-1); Glycoprotein130 (gp130); Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β); HIF-1 α Hypoxie-induzierte Factor-1 α (HIF-1 α); Interleukin-10 (IL-10); ATP-abhängiger Kaliumkanal (K_{ATP}); Muskarinrezeptor M3 (M3); microRNA (miRNA); mitochondrialen Permeabilitäts-Pore (mPTP); Stickstoffmonoxid (NO); OPA1 dynamin-like 120 kDa protein; Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase (PI3K); Proteinkinase C (PKC); Proteinkinase G (PKG); reperfusion injury salvage kinases (RISK); reaktive Sauerstoffspezies (ROS); survivor activating factor enhancement (SAFE); Stromazellen-abgeleiteter Faktor 1- α (SDF-1 α); signal transducer and activator of transcription (STAT).

Es wird vermutet, dass die Endeffektoren der RIPK die Mitochondrien sind. Verschiedene mitochondriale Proteine ohne oder mit Kanalstruktur wurden als zentrale Elemente in der Kardioprotektion identifiziert (89). Insbesondere wird eine Aktivierung mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle (mK_{ATP}-Kanäle) und ein Verhindern der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP) angenommen (90). Die Mitochondrien sind einerseits für das Überleben der Zellen essentiell, da sie durch die Atmungskette ATP synthetisieren. Sie sind aber auch wichtig für die Regulation des Zelltodes durch Apoptose, Nekrose oder Autophagie. Die Modulation der mitochondrialen Funktion nach einem I/R-Schaden ist durch Veränderungen der Öffnung der mPTP und der

Freisetzung von Cytochrom C verbunden, womit eine Aktivierung oder Inhibierung von pro-apoptotischen Kaskaden im Zytosol erfolgt (91). Die Hemmung der mPTP-Öffnung wird als ein gemeinsamer Endeffektor vorgeschlagen, über den die Signalwege die Zelle vor Nekrose und Apoptose schützen können (89,92). Neben den beschriebenen ATP-abhängigen Kanälen wurden aber auch mitochondriale kalziumabhängige Kalium- (mK_{Ca}) – Kanäle beschrieben, die eine Wirkung auf die mPTP-Öffnung haben und damit eine kardioprotektive Potenz zeigen (93,94). Auch bei der Kardioprotektion durch RIPC bestätigen Untersuchungen eine Beteiligung dieser Kanäle (95). Es wurde gezeigt, dass mK_{Ca} -Kanäle durch Proteinkinase A (PKA) aktiviert werden können (96). Phospholamban (PLB) wird durch eine aktivierte PKA phosphoryliert (97), daher dient phosphoryliertes PLB (pPLB) als Marker für die Aktivität der PKA. Ein funktioneller Zusammenhang von mK_{Ca} – Kanälen und PKA wird beschrieben (98).

1.4 Klinische Anwendung von ischämischer Fernpräkonditionierung und möglicher Störfaktor Alter

Es gibt derzeit keine etablierte wirksame therapeutische Intervention zum Schutz des Myokards vor den negativen Auswirkungen eines I/R-Schadens (14). Einen vielversprechenden Ansatz zur Anwendung in der klinischen Praxis könnte aufgrund der nebenwirkungsarmen, kostengünstigen und einfachen Durchführbarkeit RIPC sein. Dennoch kann aktuell keine Empfehlung für die klinische Anwendung dieser Maßnahme gegeben werden.

Einige Studien haben zwar positive Effekte von RIPC bei Patienten vor herzchirurgischen Operationen (99–101), primärer PCI (102–104) oder bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (38) gezeigt. Aber ebenso konnte in anderen Studien kein Nutzen bei diesen Patienten gefunden werden (105–108). Zwei große randomisierte, multizentrische, klinische Studien mit 1403 Patienten (109) und 1612 Patienten (110) widersprachen sogar der Wirksamkeit von RIPC in der Klinik und zeigten, dass sich, durch RIPC mittels Aufblasen einer Blutdruckmanschette am Oberarm, kein klinisch relevanter Vorteil bei den behandelten herzchirurgischen Patienten ergab. Die genaue Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist unklar. Diskutiert werden verschiedene Störfaktoren einschließlich Medikamente, Anästhesieregime und individuelle Charakteristika der Patienten wie Alter oder Geschlecht (57,111–113).

Die veröffentlichten Studien konzentrierten sich meist auf klinische Ergebnisse und untersuchten keine molekularen Mechanismen von RIPC beim Menschen. Um die Unstimmigkeiten in den Ergebnissen besser zu verstehen, ist es notwendig, die zellulären

und molekularen Mechanismen, die durch RIPC beim Menschen und auch bei Tieren zugrunde liegen, zu untersuchen (114). Zudem würde es dadurch möglich werden, gezielt aktivierend oder hemmend in die Signalwege einzugreifen und damit die Effektivität der Kardioprotektion zu beeinflussen. Störungen, die den endogenen Mechanismus in seiner Entstehung, in der Übertragung oder in seiner Wirkung beeinflussen, könnten identifiziert werden (112,115).

Ob eine Konditionierung von Organen auch bei älteren Versuchstieren oder Patienten noch wirksam ist, wird kontrovers diskutiert. Studien deuten auf einen Verlust des Schutzes im alten Herzen hin. Beobachtungen zeigen, dass die Kardiomyozyten durch das Alter eine verminderte Funktion der Mitochondrien (116), verminderte Stresstoleranz, verminderte kontraktile Funktion (117) und auch eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose und Nekrose zeigen (118). Damit wird durch das fortschreitende Alter die Toleranz des Herzens gegenüber einer Ischämie/Reperfusion vermindert (111). In welcher Form die endogenen Mechanismen der Konditionierung durch das fortschreitende Alter eine veränderte Wirkung oder einen Wirkverlust erfahren, ist nicht bekannt.

Es existieren Hinweise, dass IPC und IPostC über altersinduzierte kardiale Veränderungen der Proteinexpression und Signalwege des Myokards an Wirkung verlieren (111). Ergebnisse einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass kardioprotektive Effekte, die durch RIPC induziert wurden, im Herzen älterer Ratten blockiert waren (119). Auch klinische Studien, z.B. von Lee et al. zeigten einen Verlust des Schutzes bei älteren Patienten (älter als 65 Jahre), die sich einer Koronarangioplastie unterzogen, im Vergleich zu Patienten, die jünger als 55 Jahre alt waren (120). Weitere Studien, die vor allem die IPC untersuchen, beschreiben einen altersbedingten Verlust der Kardioprotektion (121–123). Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind aber nicht klar. Überlegungen bestehen, dass ein alterungsabhängiger Wirkverlust der RIPC im mK_{Ca} -Kanal und/oder im vorgeschalteten Signalweg zu vermuten ist. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stützen diese Vermutung. So wurde gezeigt, dass eine Präkonditionierung mittels Helium in jungen Ratten (2-4 Monate) zu einer mK_{Ca} -Kanal-vermittelten Infarktgrößenreduktion führte, diese aber bei älteren Ratten (20–24 Monate) nicht nachzuweisen war (124). Zudem konnten weitere Untersuchungen, die dieser Arbeit vorausgingen, zeigen, dass durch das RIPC-Plasma von jungen, männlichen Probanden eine signifikante Infarktgrößenreduktion bei jungen männlichen Tierherzen induziert werden konnte (125). Der gleiche Versuch mit Plasma von älteren Probanden zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Kontroll-Plasma und dem RIPC-Plasma (125). Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC bei den älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren hin.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die RIPC ist ein vielversprechender, physiologischer endogener Mechanismus, der eine Kardioprotektion über humorale Faktoren beim Menschen vermittelt. Es existieren Hinweise, dass die Wirksamkeit der RIPC im höheren Lebensalter vermindert bzw. nicht mehr vorhanden ist. Das Vorliegen von altersspezifischen Unterschieden konnte u.a. in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt werden. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Behandlung von isoliert perfundierten Rattenherzen mit RIPC-Plasma jüngerer männlicher Probanden die Infarktgröße reduzierte. Eine Behandlung von isolierten Herzen mit RIPC-Plasma der älteren, männlichen Probanden reduzierte die Infarktgröße dagegen nicht (125). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Untersuchung der differentiellen Aktivierung kardioprotektiver intrakardialer Signalwege durch humorale Faktoren aus RIPC-Plasma jüngerer und älterer Probanden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Fragen:

- Führt die Behandlung des jungen, männlichen Rattenherzens mit RIPC-Plasma der jüngeren, männlichen Probanden zu einer verstärkten Phosphorylierung kardialer Proteine (Proteinkinase B (AKT), extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), Glykogensynthasekinase - 3 - Beta (GSK3 β), endotheliale NO - Synthase (eNOS), Phospholamban (PLB)) im Vergleich mit Kontrollplasma?
- Führt die Behandlung des jungen, männlichen Rattenherzens mit RIPC-Plasma der älteren, männlichen Probanden zu einer verstärkten Phosphorylierung kardialer Proteine (Proteinkinase B (AKT), extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), Glykogensynthasekinase - 3 - Beta (GSK3 β), endotheliale NO - Synthase (eNOS), Phospholamban (PLB)) im Vergleich mit Kontrollplasma?
- Besteht ein altersabhängiger Unterschied in der intrakardialen Proteinaktivierung?

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

Es wurden im Rahmen der größeren Gesamtstudie jeweils zehn männliche Probanden aus zwei Altersgruppen (jüngere Probanden zwischen 18 und 30 Jahre; ältere Probanden zwischen 65 und 80 Jahre) rekrutiert. Diesen wurde vor und nach einem erfolgreichem RIPC-Manöver Plasma entnommen. Anschließend wurde das aufbereitete Plasma einem isoliert perfundierten jungen Rattenherzen (Langendorff-Anlage) nach einem standardisierten Protokoll appliziert. Im Anschluss wurden die Herzen proteinbiochemisch analysiert. Mittels Western Blot Analyse wurde die Phosphorylierung ausgewählter Proteine aus beschriebenen kardioprotektiven Signalwegen (RISK- und NO/PKG-Signalweg) und Phospholamban (PLB) als Zielprotein der PKA analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Aqua destillata (Aqua dest.)</i>	Braun, Melsungen
β- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay	ThermoScientific, Waltham, Arizons/USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
<i>cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)</i>	Roche, Mannheim
<i>Coomassie Blue</i>	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Enhanced chemoluminescence (ECL)-Reagenz	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas/USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (unvergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Folins Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris base	Roth, Karlsruhe
Tris hydrochloride (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween	Merck, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Abzug	Vinitrex, Coswig
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
<i>Charge-coupled device</i> (CCD)-Kamera (CoolSNAP HQ2)	Photometrics, Tuscon (Arizona, USA)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
<i>Fiber Pads</i>	Bio-Rad, München
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Glasplatten	Bio-Rad, München
Magnetrührstab	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten (Synergy2)	BioTek, Bad Friedrichshall
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Schüttler	IKA, Staufen

Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt
Transferkammer	Bio-Rad, München
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Puffer und Lösungen

STAMM-Lösung	5 mM	Sigma 7-9 pH 8
	50 mM	NaF
	2 mM	Na ₃ VO ₄
	2 mM	EGTA
	100 ml	Aqua dest.
Lysepuffer	10 ml	STAMM-Lösung
	40 µl/ml	Complete™
	5mM	DTT
1,5 M Tris base	54,51 g	Tris base
	ad 300 ml Aqua dest.	
	pH 8,8	
1,25 M Tris base	15,14 g	Tris base
	ad 100 ml Aqua dest.	
	pH 6,8	
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10%	5g	SDS
	ad 50 ml Aqua dest.	
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	1g	APS
	ad 10 ml Aqua dest.	

500 mM Tris-HCl	15,8 g	Tris-HCl
	ad 200 ml	Aqua dest.
	pH 6,8	
SDS-Stoppuffer	7 ml	Aqua dest.
	1 ml	500 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	2 ml	Glycerol
	1 g	SDS
	30 mg Bromphenolblau (0,5%)	
Ladepuffer	30mg	Bromphenolblau (0,5%)
	1g	SDS
	2 ml	Glycerol
	1 ml	500 mM Tris-HCl, pH 6,8
	7 ml	Aqua dest.
Laufpuffer (10x)	30 g	Tris base
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l Aqua dest.	
Transferpuffer (1x)	1,453 g	Tris base
	7,206 g	Glycin
	ad 1l Aqua dest.	
Coomassie-Färbelösung	750 mg	Coomassie Blue
	25 ml	Eisessig
	112,5 ml	Ethanol
	112,5 ml	Aqua dest.

Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBS-T)		6 g Tris base 22,2 g NaCl 2 ml Tween ad 2l <i>Aqua dest.</i> pH 8,0
Blotto 5%	(5% Magermilchlösung)	50 g Milchpulver ad 1l TBS-T
Blotto 1%	(1% Magermilchlösung)	Blotto 5% 1:5 mit TBS-T verdünnen 50g bovines Serumalbumin (BSA) 1000ml Waschpuffer (TPBS)

2.1.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper bei der Western Blot Analyse

Antikörper	Phosphorylierungs- stelle	Quelle	Hersteller #Produktnummer	Verdünnung
AKT	-	Kaninchen	Cell Signaling #9272	1:5000
p-AKT	Thr308	Kaninchen	Cell Signaling #4056	1:1000
ERK 1/2	-	Kaninchen	Cell Signaling #9102	1:1000
p-ERK1/2	Thr204	Kaninchen	Cell Signaling #9101	1:1000
GSK3β	-	Kaninchen	Cell Signaling #9315	1:10000
p-GSK3β	Ser9	Kaninchen	Cell Signaling #9336	1:10000
eNOS	-	Maus	BD Biosciences #610297	1:1000
p-eNOS	Ser1177	Kaninchen	Merck Millipore #07-428	1:2000
PLB	-	Kaninchen	Abcam #ab86930	1:5000
p-PBL	Ser16	Kaninchen	Merck Millipore #07-052	1:5000
GAPDH	-	Maus	Abcam #ab8245	1:50000

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper bei der Western Blot Analyse

Antikörper	Quelle	Hersteller #Produktnummer	Verdünnung
Peroxidasekonjugierter anti-Kaninchen IgG	Esel	Jackson ImmunoResearch Suffolk (UK) #711-035-152	1:10000
Peroxidasekonjugierter anti-Maus IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch Suffolk (UK) #115-035-003	1:10000

2.2 Methode

Diese klinisch-experimentelle Gesamtstudie besteht aus mehreren Untersuchungsabschnitten, die den von mir durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungen vorangestellt waren. Alle Untersuchungen und Vorgehensweisen wurden bereits von der Arbeitsgruppe publiziert (125).

Im ersten klinischen Untersuchungsabschnitt wurde bei gesunden Probanden humanes Blutplasma vor und nach ischämischer Fernpräkonditionierung (engl. *Remote Ischemic PreConditioning*, RIPC) gewonnen.

Im zweiten experimentellen Untersuchungsabschnitt wurde der kardioprotektive Effekt des humanen Blutplasmas am isoliert perfundierten Rattenherzen (Langendorff-Anlage) untersucht. Hier konnte durch Infarktgrößenbestimmung gezeigt werden, das RIPC-Plasma der jungen männlichen Probanden eine Infarktgrößenreduktion bei den Wistar-Rattenherzen im Vergleich mit dem Kontrollplasma (Infarktgröße CON-Plasma (jung): $47 \pm 5\%$, Infarktgröße RIPC-Plasma (jung): $31 \pm 10\%$) induziert. Dies konnte nach Applikation des RIPC-Plasmas der älteren männlichen Probanden im Vergleich mit dem Kontrollplasma (Infarktgröße CON-Plasma (alt) $43 \pm 9\%$, Infarktgröße RIPC-Plasma (alt) $46 \pm 12\%$) nicht beobachtet werden. Die Infarktgröße der Wistar-Rattenherzen zeigte keine Infarktgrößenreduktion (125).

Im Rahmen der vorbeschriebenen Arbeiten sind weitere junge männliche Wistar-Rattenherzen, die mit Kontroll- oder RIPC-Plasma perfundiert wurden, an der Langendorff-Anlage generiert worden. Diese wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung möglicher Signaltransduktionswege, die durch humorale Faktoren im Herzen vermittelt werden, genutzt. Eine besondere Berücksichtigung möglicher altersbedingter Unterschiede nach RIPC bei männlichen Probanden stand dabei im Vordergrund. Die Untersuchung der Herzgewebe mittels Western Blot Analyse stellt meine Tätigkeit bei dieser Arbeit dar. Die vorangestellten Schritte werden im Folgenden zur besseren Verständlichkeit der Arbeit beschrieben.

2.2.1 Ischämische Fernpräkonditionierung und Gewinnung des humanen Plasmas

Das humane Plasma wurde dankenswerterweise von Frau Priv.-Doz. Dr. Tanja Meyer-Treschan bereitgestellt. Die Studie wurde vorab vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Düsseldorf genehmigt (Referenznummer 3911). Zur Gewinnung des Plasmas wurden freiwillige Studienteilnehmer über Aushänge am Universitätsklinikum Düsseldorf angeworben. Die ausschließlich männlichen Studienteilnehmer wurden in 2 Gruppen mit jeweils 10 Probanden unterschieden. Die jüngeren Studienteilnehmer waren zwischen 18 und 30 und die älteren zwischen 60 und 80 Jahre alt. Die teilnehmenden Probanden zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Größe oder Gewicht.

Einschlusskriterien:

- Schriftliches Einverständnis zur Teilnahme
- Alter zwischen 18 bis 30 Jahre oder 60 bis 80 Jahre
- Altersgerechte körperliche Belastbarkeit
- Voll funktionsfähige obere Extremität

Ausschlusskriterien:

- Fehlendes Einverständnis
- Psychiatrische oder neurologische Störungen
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit
- Diabetes mellitus
- Hypertonus
- NYHA \geq II
- Vorbestehende Nervenschäden an einem der Arme
- Vorbestehende thrombembolische 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 Schmerzerkrankung

Die Blutentnahme und die ischämische Fernpräkonditionierung wurden ambulant in der Klinik für Anästhesiologie durchgeführt. Ein Protokoll über das Vorgehen wurde strikt eingehalten. Zunächst wurde das präischämische Blut am rechten Arm entnommen. Danach wurde am linken Arm mit einer auf 200 mmHg aufgepumpten Blutdruckmanschette eine Ischämie für 5 Minuten erzeugt. Die Reperfusion erfolgte durch vollständiges Entlüften der Blutdruckmanschette und Erhalt der Reperfusion für 5 Minuten. Dieser Ischämie-/Reperusionszyklus wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere Blutabnahme am rechten Arm. Die Blutproben wurden nach der Intervention zentrifugiert und das Plasma in Falcon-Röhrchen aliquotiert. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -80°C gelagert (125).

2.2.2 Versuchstiere und Applikation des Plasmas an der Langendorff-Anlage

Die Herzgewebeproben für die Western Blot Analysen wurden im Rahmen der Gesamtstudie durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe gewonnen (Aktenzeichen des Organentnahmeprojekts der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wiss. Tierschutzaufgaben (ZETT): O 27/12).

Die männlichen Wistar-Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich) waren durchschnittlich zwei Monate alt. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn unter standardisierten Bedingungen gehalten und es erfolgten regelmäßige, tierärztliche Untersuchungen. Die Versuchstiere wurden mit Pentobarbital (80 mg/kg i.p.) sediert und mit 1000 I. E. Heparin antikoaguliert, bevor sie in tiefer Narkose und erloschenen Schutzreflexen dekapitiert wurden. Anschließend erfolgte die rasche Entnahme der Herzen über eine mediane Thorakotomie.

Jeweils ein frisches Herz wurde an die Langendorff-Anlage angeschlossen und mit einer modifizierten gewärmten Krebs-Henseleit-Lösung (enthält in *Aqua destillata*: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 4,25 mM NaHCO₃, 0,5 mM EDTA, 2,25 mM CaCl₂, 11 mM D(+)-Glucose, 1 mM Laktat) mit einem konstanten Druck von 80 mmHg perfundiert. Durch kontinuierliche Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen (5% CO₂ und 95% O₂) wurden die Oxygenierung des Puffers und ein konstanter pH-Wert von 7,4 erreicht. Auch die Temperatur wurde durch externe Wärmekreisläufe und eine Wärmekammer konstant gehalten.

Nach einer Äquilibrationsperiode von 20 Minuten mit Krebs-Henseleit-Lösung wurde das humane Probandenplasma appliziert. Die eingefrorenen Probandenplasmen wurden dazu bei 45°C aufgetaut. Die Applikation des Plasmas erfolgte mit einem Perfusor über einen Dreiwegehahn in den Koronarkreislauf. Die Flussrate des jeweiligen Plasmas wurde auf 0,5% des koronaren Flusses festgelegt und erfolgte insgesamt über 10 Minuten. Das

verwendete Langendorff-Modell zur isolierten Perfusion des Rattenherzens ist an der Klinik für Anästhesiologie etabliert und wurde bereits mehrfach angewendet (126–128).

Es wurden pro Proband zwei Herzen perfundiert: Die Kontrolle (CON) mit dem ersten Rattenherz erfolgte mit dem Plasma, das aus der Blutentnahme vor dem Ischämie-/Reperusionszyklus stammte. Das zweite Rattenherz wurde mit dem Plasma nach der ischämischen Fernpräkonditionierung perfundiert. Anschließend wurden die Herzen geviertelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur molekularbiologischen Untersuchung bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt (125).

2.2.3 Proteinbiochemische Analyse

2.2.3.1 Probenaufarbeitung

Zur Aufbereitung wurden etwa 100 mg des tiefgefrorenen Herzgewebes abgewogen und mit einem tiefgekühlten Metall-Potter durch mehrere Hübe mechanisch zerkleinert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 1 ml frisch angesetzten Lysepuffer aufgenommen und durch Schütteln im Eisbad homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert und 20 Minuten bei 14000g zentrifugiert. Die Arbeitstemperatur wurde dazu immer unter 4°C gehalten. Der proteinenthaltende Überstand wurde in ein separates Gefäß abgetragen und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung und Probeneinstellung

Zur Bestimmung und Angleichung des Proteingehalts in den einzelnen Proben wurde eine Proteinbestimmung nach dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test durchgeführt (129). Hierbei bilden die Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Die Färbung der zu untersuchenden Proteinlösung wurde mit der Färbung von Eichlösungen bekannter Proteinkonzentration verglichen. Als Eichlösung diente bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 und 2,0 mg/ml. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Lösungen wurden 12,5 μl der Lösung bzw. des BSA-Standards mit 200 μl des BCA-Reagenz im Doppelansatz in eine 96 Well-Platte pipettiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion der Farbkomplexe bei 562 nm im Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten (Firma BioTek, Winooski, Vermont USA). Die Proteinkonzentration der Proben durch Verdünnung mit Lysepuffer angeglichen.

2.2.3.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekülgröße wurde eine Gelelektrophorese nach Laemmli angewendet (130,131). Die SDS-PAGE (Abkürzung für *sodium dodecyl sulfate*

polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ermöglicht eine gute Trennung der Proteine mit Molekülmassen zwischen 5 und 250 kDa.

Die Gele waren 1,5 mm dick, hatten eine Lauflänge von etwa 6 cm und bestanden aus einem Trenngel und ein Sammelgel. Das Trenngel und das Sammelgel unterschieden sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße. Die Proben wurden im großporigen Sammelgel zunächst fokussiert, indem sie sich anhand ihrer Größe bis zum Trenngel konzentrieren bevor sie sich im Trenngel während der Elektrophorese der Größe nach auftrennen. Je nach Molekulargewicht der Proteine wurden unterschiedliche Trenngele genutzt. Das Trenngel setzte sich zusammen aus 30% Polyacrylamid (Rotiphorese® 30% (eine gebrauchsfertige und gasstabilisierte wässrige 30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 von der Firma Carl Roth GmbH)), Reinstwasser, 1,5 M Tris (pH 8,8) und dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), das die Eigenladung der Proteine überdeckt und dadurch eine nahezu konstante Ladungsverteilung der Proteine bewirkt. Außerdem wurden der Quervernetzer und Polymerisationskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) und der Polymerisationsinitiator Ammoniumpersulfat eingesetzt. Die Zusammensetzungen der verschiedenen verwendeten Gele werden in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Gele. Es wurden für die zu untersuchenden Proteine unterschiedliche Trenngele eingesetzt: 8%: eNOS; 12%: ERK1/2, GSK3 β , AKT, PLB.

Komponente	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Rotiphorese® 30%	5,3 ml	7,92 ml	2,55 ml
Reinstwasser	9,3 ml	6,88 ml	10,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5 ml	5 ml	
1,25 M Tris (pH 6,8)			1,5 ml
SDS (10%)	200 μ l	200 μ l	150 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l	30 μ l
APS (10%)	100 μ l	100 μ l	150 μ l

Die Geltaschen wurden jeweils mit einer Proteinmenge von 25 μ g geladen. In der Probenvorbereitung wurden die Proben mit dem gleichen Volumen aus β -Mercaptoethanol und SDS-Stoppuffer (10x-Ladepuffer, 1:10 verdünnt) versetzt. Anschließend wurden diese Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Ausgenommen bei Proben, in denen

Phospholamban untersucht wurde. Diese Proben/Puffer-Gemische wurden für 45 min bei 37°C erwärmt.

Es wurde eine Elektrophoreseapparatur der Firma Bio-Rad (Hercules, Kalifornien/USA) verwendet. Die Laufzeit der Gele betrug bei 100 V ca. 80 min. Nach der Elektrophorese wurden die Trenngele separiert und bis zum Proteintransfer in Transferpuffer inkubiert.

2.2.3.4 Transfer

Beim Transfer wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen übertragen und immobilisiert. Die Membranen wurden zuerst für 3 bis 5 Minuten in Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer gewaschen. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer der Firma Bio-Rad nach Angaben des Herstellers. Bei der Schichtung der verschiedenen Materialien in der Transferrassette wurde darauf geachtet, dass zwischen Membran und Gel ein luftblasenfreier Kontakt bestand. In der Abbildung 4 wird dieses veranschaulicht.

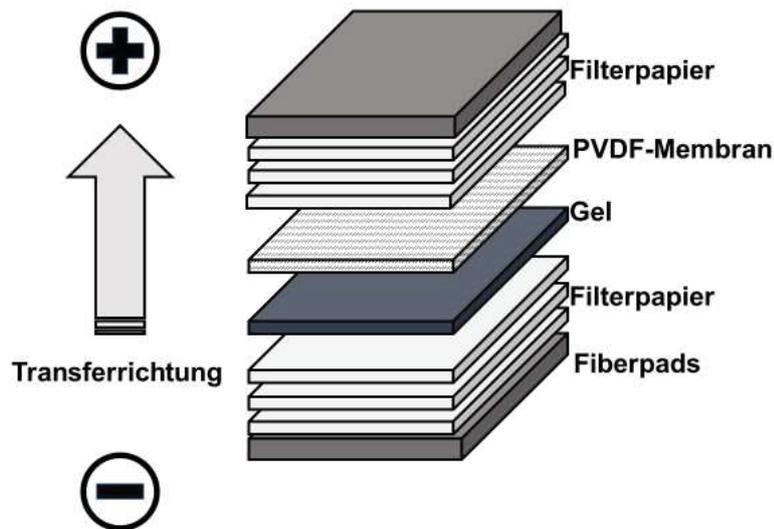


Abb. 4: Schematische Darstellung der Materialien in der Transferrassette. Anordnung nach der Transferrichtung von der Kathode (-) zur Anode (+).

Der Transfer wurde mit 200 mA und 4°C unter laufender Kühlung und unter Rühren des Puffers für 60 Minuten durchgeführt.

2.2.3.5 Nachkontrolle der Gele

Im Anschluss an den Transfer wurden die Gele zum Anfärben der Proteine mit Coomassie-Blau Färbelösung bedeckt und für 30 Minuten geschüttelt. Der Coomassie-Blau Farbstoff lagerte sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbte die

Proteine. Der in der Lösung enthaltende Eisessig fixierte die Proteine im Gel. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mit Coomassie Entfärbelösung für 60 Minuten und anschließend mit Leitungswasser entfärbt. Nach der Entfärbung des Gels waren lediglich einzelne Proteinbanden schwach sichtbar als Hinweis für einen erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran.

2.2.3.6 Blocken

Damit unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen mit Proteinen abgesättigt werden konnten, wurden die Membranen in einer Lösung aus 5% Milchpulver oder Albumin (nur bei p-AKT) in Waschpuffer über zwei Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.7 Immunfärbung

Die Membran wurde zunächst mit dem Antigen-Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Die Antikörper wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers, wie in Tabelle 1 in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, verdünnt und die Inkubation erfolgte bei +4°C über Nacht. Anschließend wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 Minuten in Wasch-Puffer gewaschen. Damit werden ungebundene Antikörper entfernt. Der zweite Antikörper war mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert und war jeweils gegen die Spezies des Erstantiköpers gerichtet. Auch diese wurden nach Angaben des Herstellers, wie in Tabelle 2 in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, verdünnt und die Membranen damit für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte auch hier ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (jeweils 10 Minuten).

2.2.3.8 Entwicklung und Auswertung

Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des *enhanced chemoluminescence* (ECL)-Reagenz nach Angaben des Herstellers. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde mithilfe des *charge-coupled device* (CCD)-Kamerasystem von Photometrics® (Tucson, Arizona/USA) im Dunkelraum nach entsprechender Belichtungszeit detektiert und die Banden mit der Software Gel-Pro Analyzer (Version 6.0, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland/USA) digital erfasst. In Abbildung 5 erfolgt eine vereinfachte Darstellung.

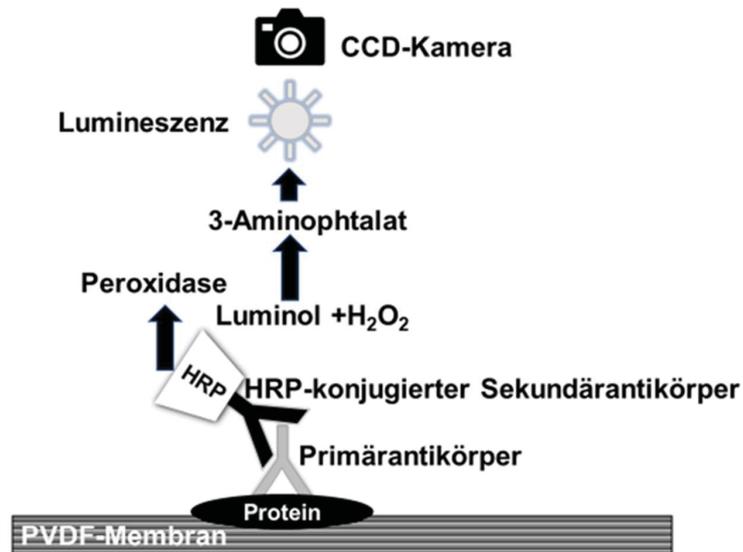


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der *enhanced chemoluminescence*-Reaktion (132). Die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP = *horseradish peroxidase*) katalysiert mithilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophtalat. Die dabei freigesetzte Lumineszenz kann mit einer *charge-coupled device* (CCD)-Kamera detektiert werden. PVDF = Polyvinylidenfluorid nach MacPhee 2010.

Die densitometrische Auswertung des Western Blots erfolgte mit der Software Gelscan (Version 6.0 der Firma Decon Science Tec, Frankfurt). Dabei wurde die mittlere Lichtintensität der relevanten Banden während der Belichtungszeit gemessen. Dieser Wert wurde jeweils in Bezug zu dem Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) vergleichsweise gegenübergestellt. GAPDH wird als *Housekeeping* Gen in Herzzellen konstitutiv exprimiert und eignet sich zur internen Kalibrierung, so dass sich die relativen Veränderungen der Proteinexpressionslevel bestimmen ließen. Ein Vergleich der Antikörperreaktion der Banden verschiedener Western Blots wurde damit möglich. In allen Fällen wurden die zu vergleichenden Proben jeweils in nebeneinanderliegenden Taschen der Gele aufgetragen. Für einen Vergleich der verschiedenen Western Blots wurde auf jedem Blot die Antikörperreaktion aus Protein von ein und demselben Herz bestimmt, das mit Forskolin behandelt wurde (Positivkontrolle: Forskolinstandard). Auch hier wurden die phosphorylierten Proteine und die Gesamtmenge der Proteine auf GAPDH normiert. In einem letzten Schritt wurden die Verhältnisse aus den beiden vorherigen Schritten ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als relative Expressionen, die nach der folgenden Formel berechnet wurden:

$$\text{relative Expression (x)} = \frac{\left[\frac{\text{Wert (a) des phosphorylierten Proteins}}{\text{Wert (b) des gesamten Proteins}} \right]}{\left[\frac{\text{Wert (c) des phosphorylierten Proteins im Forskolin Standard}}{\text{Wert (d) des gesamten Proteins im Forskolin Standard}} \right]}$$

Nach dieser Vorgehensweise wurde die Expression im Forskolinherzen gleich 1 gesetzt und alle Expressionsniveaus der anderen Interventionen auf diesen Wert bezogen (Normalisierung, *fold change*).

2.2.4 Statistische Datenanalyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Das Programm GraphPad PRISM® Version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) wurde zur Auswertung der Daten verwendet. Unterschiede wurden mit Hilfe des abhängigen t-Test („*paired Students t-test*“) berechnet. Als signifikante Unterschiede gelten Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Mit der Western Blot Analyse wurden sowohl der Grad der Phosphorylierung beteiligter Proteine des RISK-Signalwegs als auch die Phosphorylierung von Phospholamban, einem Protein, das von der PKA phosphoryliert wird, untersucht. Dazu wurde jeweils das Herzgewebe von jungen, männlichen Ratten, die entweder mit Kontroll- (CON) oder mit RIPC-Plasma (RIPC) perfundiert wurden, analysiert.

3.1 Effekte auf die Proteinphosphorylierung durch das Kontroll- und das RIPC-Plasmas der jungen Probanden

Nach Perfusion der Herzen mit RIPC-Plasmen zeigte sich bei den untersuchten Proteinen pAKT, pERK1/2 des RISK-Signalwegs kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus im Vergleich zu den Kontrollen (CON-Plasma) (pAKT: $0,28 \pm 0,21$ vs. CON: $0,38 \pm 0,43$; pERK1/2: $1,71 \pm 0,87$ vs. CON: $1,80 \pm 0,62$). Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 6 bis 9 dargestellt. In der Abbildung 6 wird nur einmal exemplarisch das phosphorylierte AKT und das Gesamtproteinprotein AKT mit dem jeweils korrespondierenden GAPDH Kontrollen dargestellt. In dieser Abbildung ist auch der beschriebene Forskolin-Standard abgebildet. In allen weiteren Abbildungen beschränkt sich die exemplarische Darstellung auf das phosphorylierte Protein und das Gesamtprotein. Die phosphorylierten Proteine wurden auf das jeweilige Gesamtprotein normalisiert.

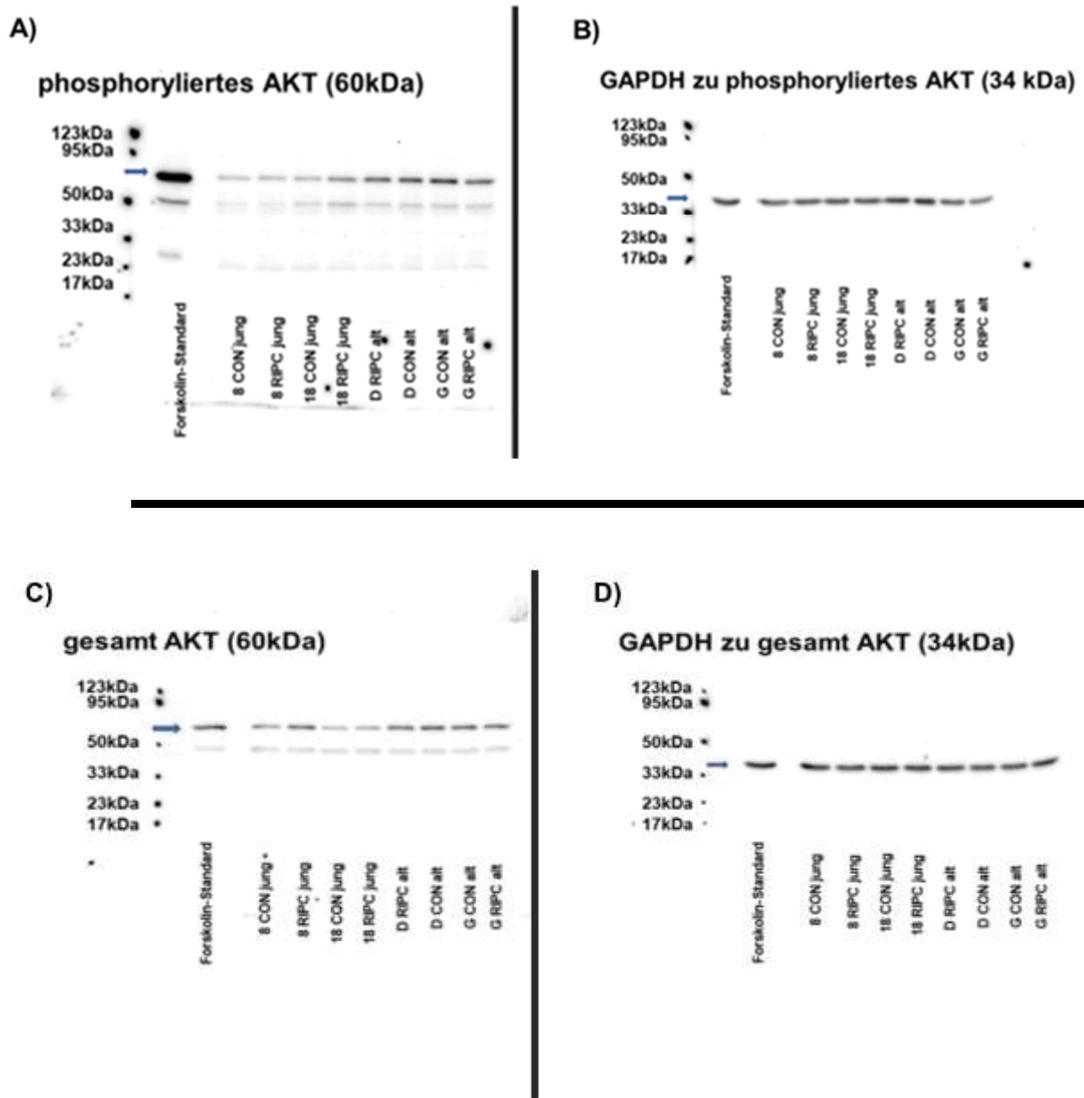


Abb. 6: Exemplarische Darstellung eines Western Blots. Repräsentativer Western Blot mit **A)** den Banden des phosphorylierten AKT sowie die **B)** der korrespondierenden GAPDH Kontrolle und **C)** gesamt AKT sowie **D)** der korrespondierenden GAPDH Kontrolle. Auf jeder Membran A-D) wurde der beschriebene Forskolin-Standard an erster Position aufgetragen. CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach Fernpräkonditionierung. Proben jeweils gepaart angeordnet. Probanden 8 und 18 aus der Gruppe der jungen Probanden und Probanden D und G aus der Gruppe der älteren Probanden.

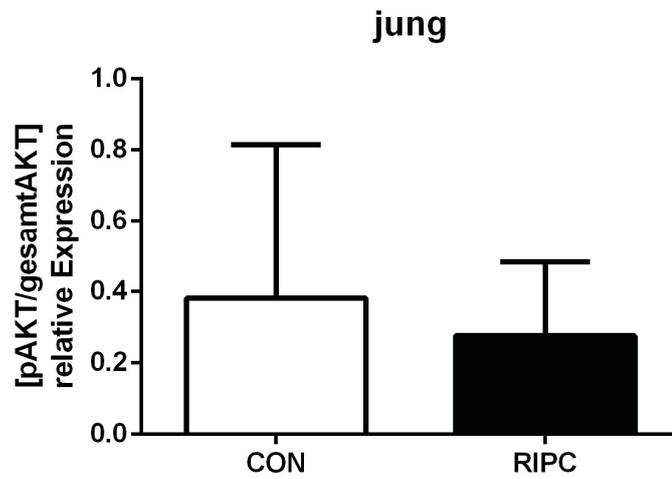


Abb. 7: Relative Expression von phosphoryliertem AKT zu gesamten AKT im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,388$. CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprouben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC)

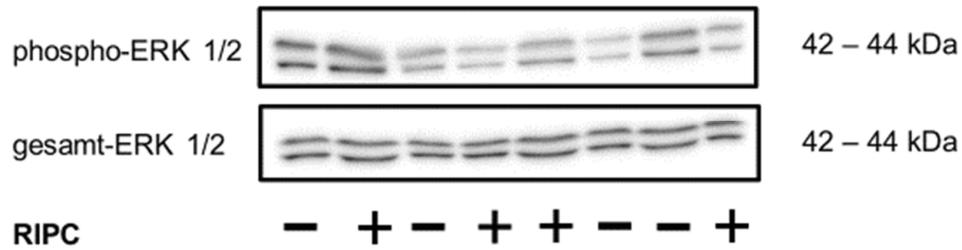


Abb. 8: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten ERK1/2 und dem gesamten ERK 1/2, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

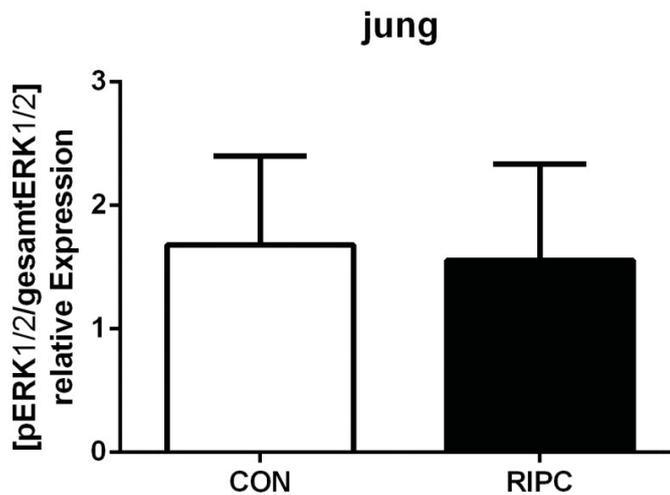


Abb. 9: Relative Expression von phosphoryliertem ERK1/2 zu gesamten ERK1/2 im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,751$. CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprouen nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC)

Das untersuchte Protein peNOS des Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G (NO/PKG)-Signalwegs zeigt keinen Unterschied im Phosphorylierungsstatus im Vergleich zu der Kontrolle (peNOS: $0,76 \pm 0,28$ vs. CON: $0,78 \pm 0,33$) (125). Dargestellt in den Abbildungen 10 und 11. Die phosphorylierten Proteine wurden auf das jeweilige Gesamtprotein normalisiert.

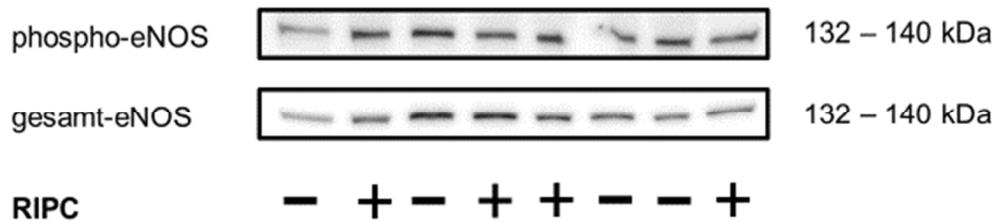


Abb. 10: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten eNOS und dem gesamten eNOS, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

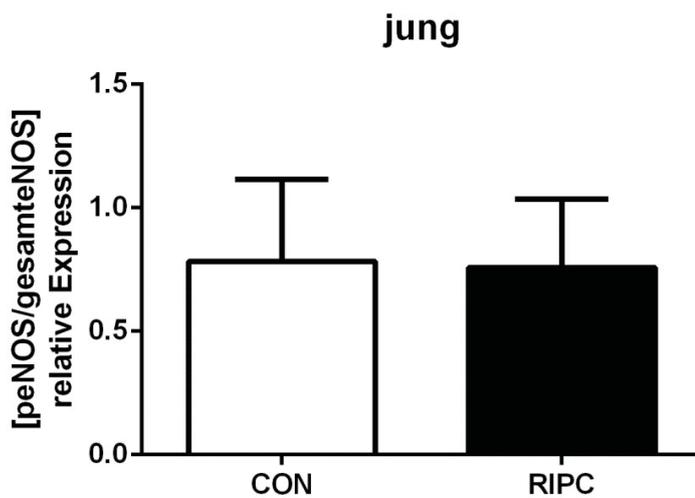


Abb. 11: Relative Expression von phosphoryliertem eNOS zu gesamten eNOS im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,753$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach Remote Ischemic PreConditioning. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprouen nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

RIPC-Plasma von jungen Probanden induzierte die Phosphorylierung von GSK3 β verglichen mit Kontroll-Plasma ($0,56 \pm 0,36$ vs. CON: $0,41 \pm 0,29$; $p < 0,05$) (125). Eine Darstellung erfolgt in den Abbildungen 12 und 13.

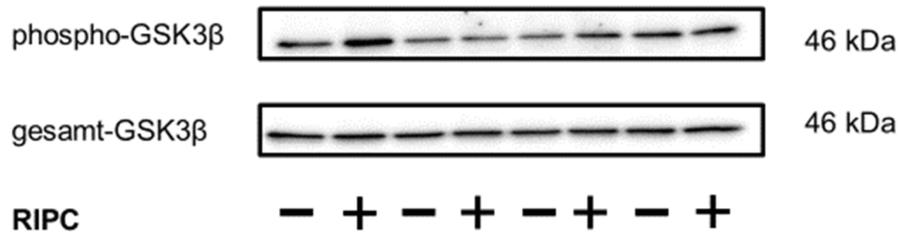


Abb. 12: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten GSK3 β und dem gesamten GSK3 β , ohne GAPDH und Forskolin Standard (125). RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

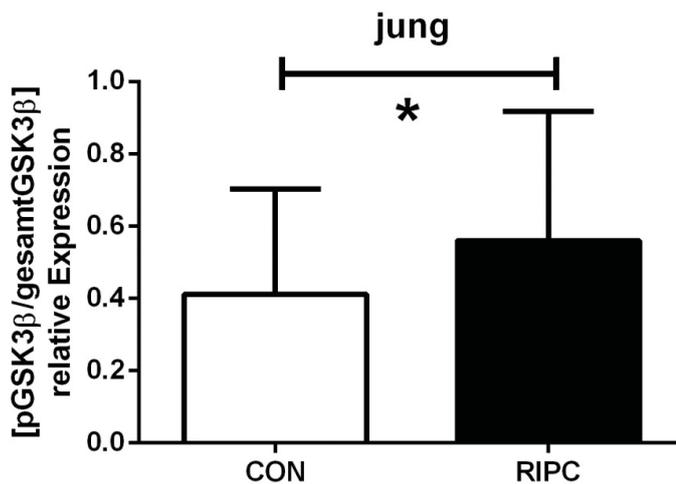


Abb. 13: Relative Expression von phosphoryliertem GSK3 β zu gesamten GSK3 β im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); * $p = 0,022$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprouben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

Das Ausmaß der Phosphorylierung von Phospholamban als Maß für die Aktivität der PKA zeigt keine relevanten Unterschiede nach Applikation von RIPC-Plasma im Vergleich zum Kontroll-Plasma ($0,24 \pm 0,14$ vs. CON: $0,22 \pm 0,14$) (125). Dargestellt in den Abbildungen 14 und 15.

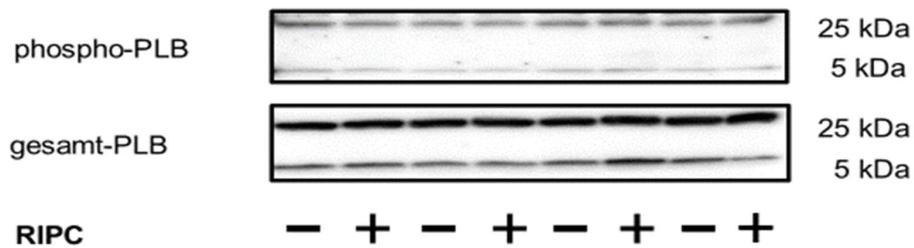


Abb. 14: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten PLB und dem gesamten PLB, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

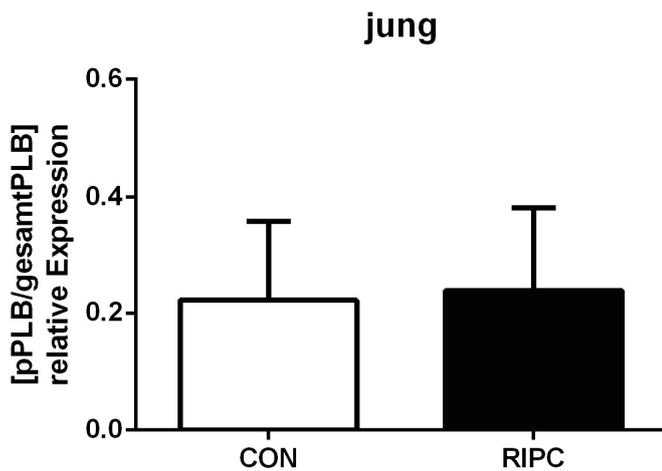


Abb. 15: Relative Expression von phosphoryliertem PLB zu gesamten PLB im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,728$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprobe nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

3.2 Effekte auf die Proteinphosphorylierung durch das Kontroll- und das RIPC-Plasmas der älteren Probanden

Nach Behandlung der Herzen mit RIPC-Plasma älterer Probanden zeigte sich bei keinem der untersuchten Proteine: pAKT ($0,26 \pm 0,10$ vs. CON: $0,23 \pm 0,09$) wie in Abbildung 16 und 17 zu sehen, pERK1/2 ($3,42 \pm 1,89$ vs. CON: $2,92 \pm 1,33$) wie in Abbildung 18 und 19 zu sehen, peNOS ($0,82 \pm 0,53$ vs. CON: $0,71 \pm 0,44$) wie in Abbildung 20 und 21 zu sehen, pGSK3 β ($0,45 \pm 0,26$ vs. CON: $0,36 \pm 0,13$) wie in Abbildung 22 und 23 zu sehen oder pPLB ($0,34 \pm 0,18$ vs. CON: $0,37 \pm 0,18$) wie in Abbildung 24 und 25 zu sehen, eine signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-Plasma (125).

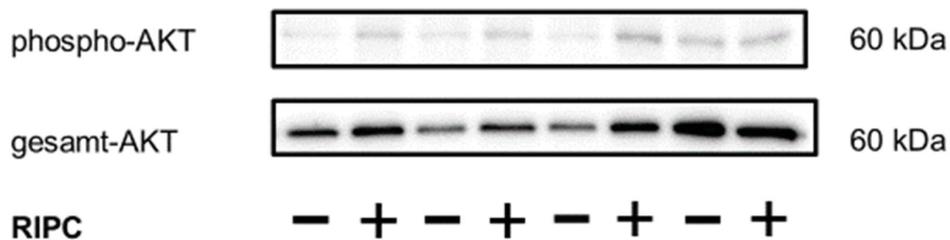


Abb. 16: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten AKT und dem gesamten AKT, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

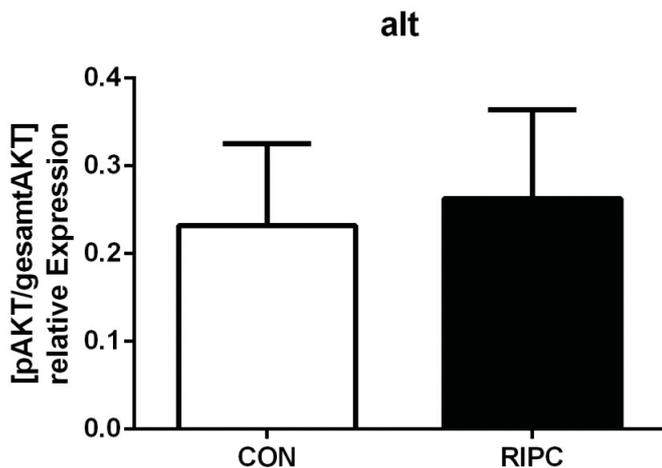


Abb. 17: Relative Expression von phosphoryliertem AKT zu gesamten AKT im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,231$. CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprobe nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC)

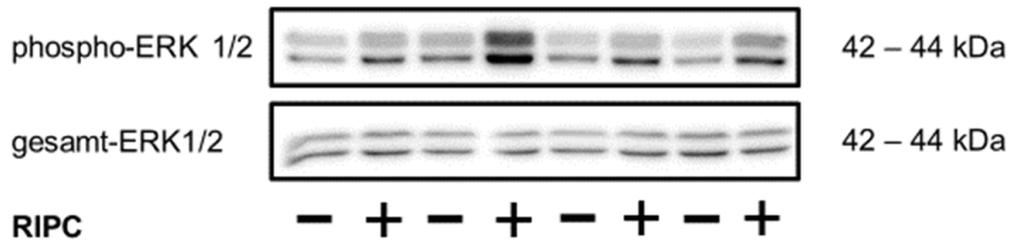


Abb. 18: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten ERK1/2 und dem gesamten ERK 1/2, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

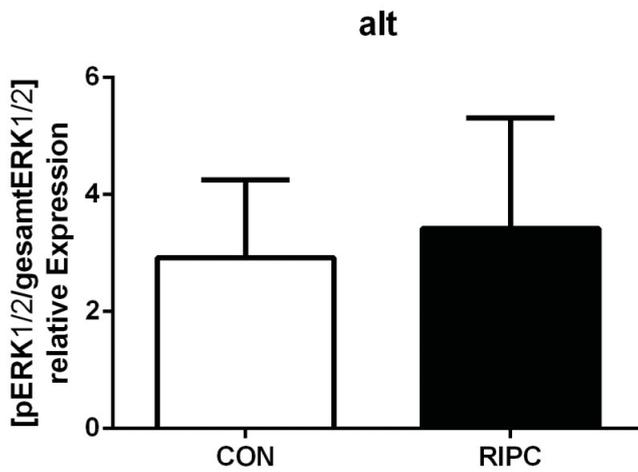


Abb. 19: Relative Expression von phosphoryliertem ERK1/2 zu gesamten ERK1/2 im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,288$. CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeproben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC)

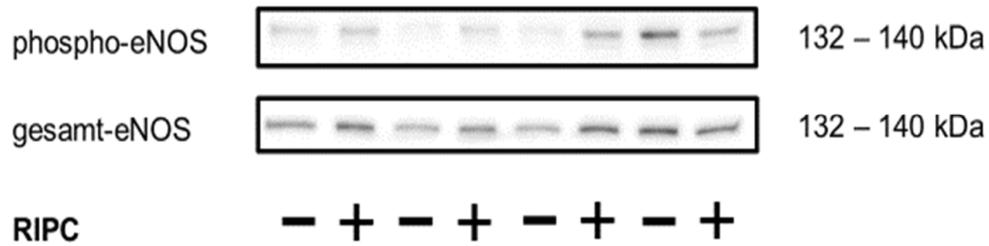


Abb. 20: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten eNOS und dem gesamten eNOS, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

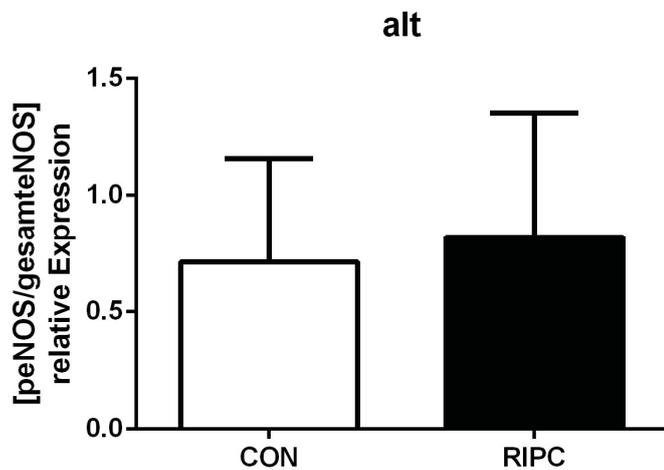


Abb. 21: Relative Expression von phosphoryliertem eNOS zu gesamten eNOS im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,302$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach Remote Ischemic PreConditioning. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeproben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

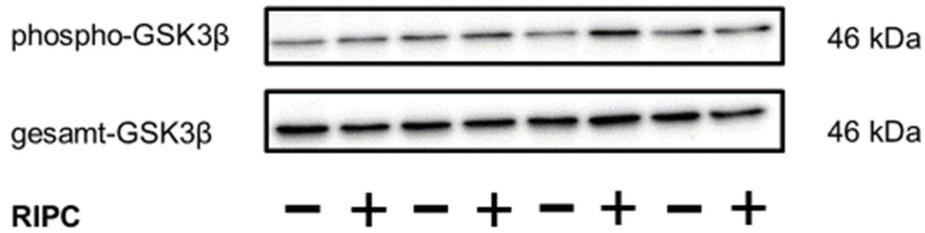


Abb. 22: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten GSK3β und dem gesamten GSK3β, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung (125).

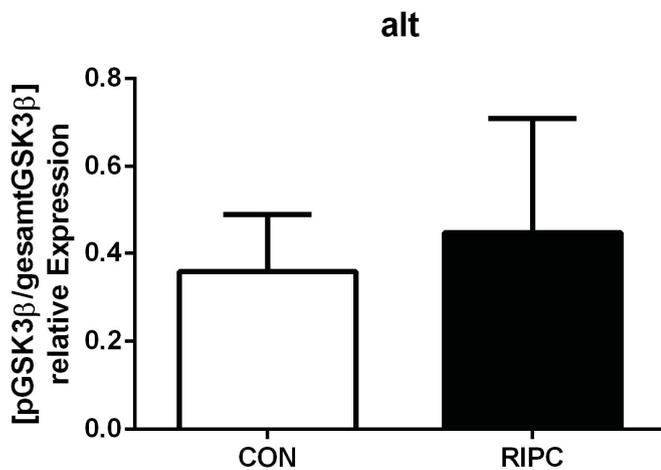


Abb. 23: Relative Expression von phosphoryliertem GSK3β zu gesamten GSK3β im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,125$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach Remote Ischemic PreConditioning. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeproben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

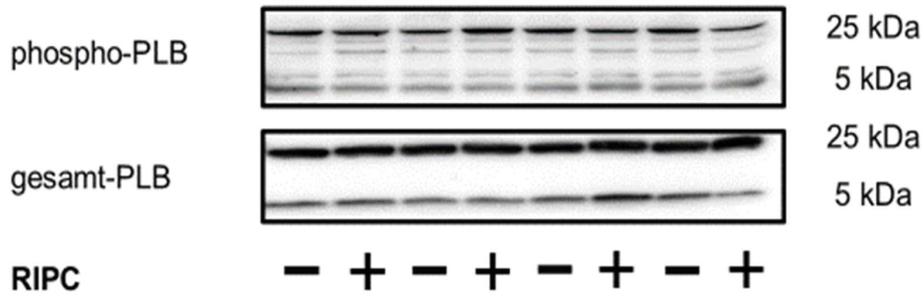


Abb. 24: Repräsentativer Western Blot mit den Banden des phosphorylierten PLB und dem gesamten PLB, ohne GAPDH und Forskolin Standard. RIPC - : Kontroll-Plasma; RIPC + : Plasma nach Fernpräkonditionierung.

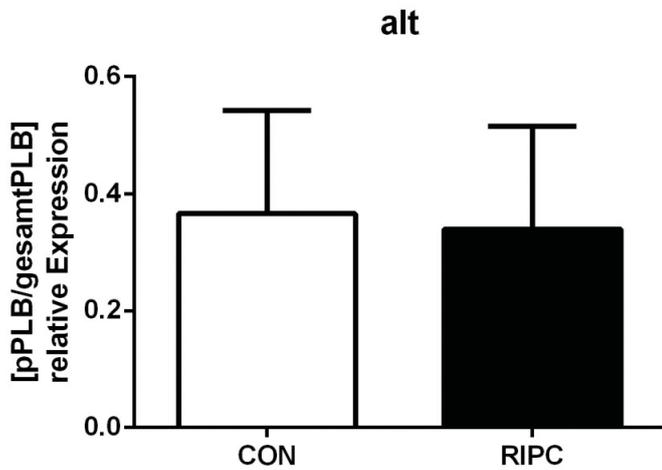


Abb. 25: Relative Expression von phosphoryliertem PLB zu gesamten PLB im Verhältnis zum Standard (Forskolin behandeltes Herz = 1,0); $p = 0,385$ (125). CON: Kontroll-Plasma; RIPC: Plasma nach *Remote Ischemic PreConditioning*. (n = 10 untersuchte Rattenherzgewebeprouben nach isolierter Perfusion mit einem humanem Probandenplasma (insgesamt 10 Probanden) jeweils vor CON oder nach RIPC).

4 Diskussion

4.1 Beantwortung der Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, welche intrakardialen Proteine im isoliert perfundierten Rattenherzen durch humane humorale Faktoren nach RIPC-Intervention aktiviert werden. Damit sollte das Verständnis der durch RIPC-induzierten Signaltransduktion und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Herz als Zielorgan erweitert werden.

Von gesunden Probanden wurde Blutplasma vor und nach einem RIPC-Manöver gewonnen und an dem etablierten Langendorff-Modell auf isoliert perfundierte Rattenherzen übertragen. Die untersuchten Rattenherzen stammten von jungen, männlichen Wistar-Ratten im Alter von durchschnittlich 2 Monaten.

Untersuchungen, die im Rahmen dieser Gesamtstudie durchgeführt wurden, konnten vorab zeigen, dass durch RIPC-Plasma junger gesunder männlicher Probanden eine signifikante Infarktgrößenreduktion induziert werden konnte. Als Vergleich diente die Applikation eines Kontrollplasmas vor dem RIPC-Manöver von den gleichen Probanden. Die Infarktgrößenreduktion nach Applikation von RIPC-Plasma älterer männlicher Probanden konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind in anderen Dissertationsprojekten der Arbeitsgruppe beschrieben und bereits veröffentlicht (125).

Aus diesen Beobachtungen wurde die Vermutung aufgestellt, dass entweder die Entstehung, Freisetzung oder die Weiterleitung des protektiven Faktors durch das Alter der Probanden beeinflusst wird. Diese Überlegungen standen bei dem für diese Arbeit entwickelten Versuchsaufbau im Vordergrund. Diesmal wurde das Plasma, das vor und nach dem RIPC-Manöver von den Probanden gewonnen wurde, an der Langendorff-Anlage auf junge männliche Rattenherzen übertragen. In einer anschließenden proteinbiochemischen Untersuchung der Herzen durch semiquantitative Western Blot Analysen wurde der Phosphorylierungsstatus bestimmter Proteine untersucht, die im Rahmen der Kardioprotektion involviert sein könnten: Proteinkinase B (AKT), extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2), Glykogensynthase-3- β (GSK3 β), Phospholamban (PLB) und endotheliale NO-Synthase (eNOS).

Die Fragen aus Kapitel 1.5 konnten wie folgt beantwortet werden:

- RIPC-Plasma der jungen männlichen Probanden erhöhte signifikant die Phosphorylierung von GSK3 β im Rattenmyokard im Vergleich zum Kontroll-Plasma. Die Phosphorylierung der anderen untersuchten Proteine AKT, ERK 1/2, PLB und eNOS blieb unverändert.

- RIPC-Plasma der älteren männlichen Probanden zeigte bei keinem der untersuchten Proteine AKT, ERK 1/2, GSK3 β , PLB und eNOS einen Unterschied in der Phosphorylierung im Vergleich zum Kontrollplasma.
- Es ist ein altersabhängiger Unterschied zu beobachten. Die vermehrte Phosphorylierung von GSK3 β wurde nur durch das RIPC-Plasma von den jungen Probanden beobachtet, während bei den älteren Probanden kein signifikanter Effekt auf die Phosphorylierung zu beobachten war.

Das neue Ergebnis dieser Studie ist, dass nur durch die Applikation von humanem RIPC-Plasma junger Probanden am isoliert perfundierten Rattenherz eine verstärkte Phosphorylierung von GSK3 β zu beobachten ist. Da nur gesunde, männliche Probanden unterschiedlicher Altersklassen an dem Versuch beteiligt waren, können störende Einflüsse durch Komorbiditäten oder Medikationen ausgeschlossen werden. Außerdem sind ausschließlich Herzen von jungen, gesunden männlichen Ratten eingesetzt worden. Damit sind durch dieses Studienprotokoll neben geschlechtsspezifischen auch mögliche Faktoren, die durch Alterungsprozesse des Herzens bedingt sind, ausgeschlossen und der Fokus liegt auf dem altersabhängigen Effekt des Plasmas der Probanden. Somit kann durch diese Arbeit ein altersabhängiger Effekt von humanem Plasma nach RIPC auf intrakardiale Signaltransduktionswege im isolierten Rattenherzen vermutet werden. Der Einfluss des Alters auf die intramyokardiale Signaltransduktion durch humorale Faktoren ist ein wichtiger neuer Aspekt bei der Anwendung von RIPC.

Da ältere Patienten eine deutlich höhere Morbidität und Mortalität durch ischämische Herzerkrankungen, u.a. dem Herzinfarkt haben, ist eine Klärung der möglichen veränderten Signaltransduktion, die eine Kardioprotektion beeinflusst, von großer Bedeutung.

4.2 Veränderungen in den Signalkaskaden nach Ischämischer Fernpräkonditionierung

Durch humorale Faktoren können rezeptorabhängig oder auch rezeptorunabhängig intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (46) und eine Kardioprotektion initiieren. Die aktivierten intrazellulären Signalkaskaden kommunizieren untereinander in komplexen Netzwerken. Eine Art der Kommunikation ist die posttranslationale Proteinmodifikation, bei der die Information über reversible kovalente Modifizierung an Transkriptionsfaktoren oder an eine intrazelluläre Zielstruktur, insbesondere an Zielstrukturen der Mitochondrien (133), weitergegeben wird, um deren Aktivität zu regulieren. Ein Mechanismus der Proteinmodifikation ist die Phosphorylierung von Serin/Threonin- oder Tyrosin-Resten der Proteine durch Proteinkinasen.

Die durch RIPC modifizierten intramyokardialen Signalkaskaden sind Gegenstand von Untersuchungen und im Detail nicht geklärt. Autoren beschreiben, dass RIPC einen Signalmechanismus ähnlich dem für IPC aktiviert (20,134). Es gibt aber auch Untersuchungen, die einen anderen Signalmechanismus der Kardioprotektion durch RIPC beschreiben (124,135). Neben den beteiligten Signalwegen ist auch die zeitliche Beschreibung der beteiligten kardioprotektiven Signalkaskaden unklar (133). Verschiedene Studien haben zwar intrazelluläre Signalwege, die bei der Kardioprotektion durch RIPC eine Rolle spielen können, untersucht (45,70,136), aber in diesen Arbeiten stand die zeitliche Abfolge der Signalaktivierung nicht im Vordergrund.

Im Rahmen dieser Gesamtstudie der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch humanes RIPC-Plasma von jungen Probanden eine Kardioprotektion induziert wurde. RIPC-Plasma konnte die Infarktgröße nach einer Index-Ischämie und Reperfusion reduzieren, während das Kontrollplasma keinen Einfluss auf die Infarktgröße zeigte. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Übertragung von humoralen humanen Faktoren die Kardioprotektion im Rattenmyokard induziert wurde. Eine Übertragung von kardioprotektiven Faktoren, auch spezieübergreifend vom Menschen auf isoliert perfundierte Herzen von Ratten, ist möglich und wurde bereits mehrfach gezeigt (61,63,137). Auch eine 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 sein kann (138). Die Identifizierung des übertragenen Faktors ist bis jetzt nicht gelungen. Als mögliche Faktoren wurden Stromazellen-abgeleiteter Faktor 1 (SDF-1) (62), Nitrit (63) und micro-RNA-144 (64) vorgeschlagen. Aber keiner dieser Kandidaten stellte sich als alleiniger Mechanismus heraus. Proteom-Analysen von humanem Plasma konnten zeigen, dass durch RIPC eine Regulation von zahlreichen Proteine induziert wird (56,139). Aus Untersuchungen, bei dem eine spezieübergreifende Protektion mit RIPC-Plasma-Dialysat erfolgte, ist bekannt, dass die humoralen Faktoren hydrophob und thermolabil sind und eine molekulare Masse zwischen 3,0 und 8,5 kDa haben (61,67).

In dieser Arbeit wurde nicht nach den humoralen Faktoren gesucht, sondern der Fokus auf intrakardiale Mechanismen gelegt, die durch humorale Faktoren nach einem RIPC Manöver beim Menschen ausgelöst werden. Es wurde gezielt Plasma von jüngeren und älteren Probanden gewonnen, um eine altersabhängige Vergleichbarkeit der Wirkung der humoralen Faktoren auf die intrakardialen Mechanismen zu untersuchen. Um andere Faktoren als den Fern-Präkonditionierungsreiz auszuschließen, wurden die intrazellulären Mechanismen, die durch den humoralen Faktor nach RIPC aktiviert werden, in Gewebeproben von ausschließlich jungen, männlichen, isoliert perfundierten Wistar-Rattenherzen untersucht. Einer Sequenz aus Ischämie und Reperfusion wurden diese

Herzen nicht ausgesetzt. Somit liegt in dieser Arbeit der Fokus auf myokardialen Proteinen, die bei der frühzeitigen Signalaktivierung eine Rolle spielen. Die im Western Blot untersuchten Proteine stellen eine Momentaufnahme nach einer zehnmütigen Perfusion mit Kontroll- oder RIPC-Plasma in den Koronarkreislauf dar. Diese Punkte erschweren eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien, die auch mögliche intrazelluläre Mechanismen des RIPC-Signalwegs zum Schwerpunkt haben, jedoch andere Protokolle und Untersuchungszeitpunkte in den Fokus stellen. Im Folgenden möchte ich genauer auf die einzelnen untersuchten Proteine eingehen und in der Literatur beschriebene übereinstimmende sowie diskrepante Ergebnisse zu meinen Versuchen erläutern.

4.2.1 *Reperfusion Injury Salvage Kinase Signalweg*

Der Effekt auf die Infarktgrößenreduktion kann bei der RIPC durch die Aktivierung der Signalkaskaden des RISK-Signalwegs getriggert werden (140–142). Verschiedene Studien legen nahe, dass es zu einer Aktivierung von PI3-AKT (143,144) und ERK1/2 (20,140) mittels Phosphorylierung kommt (70,145,146). Diese Aktivierung kann zur Beeinflussung weiterer Proteine wie zum Beispiel GSK3 β führen (147). Untersuchungen von Skyschally et al. fanden, nach Infarktgrößenreduktion durch RIPC Plasma am Rattenherzen, eine vermehrte Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) und der extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) (148). Sie zeigten zudem durch eine spezifische Signalwegsblockade mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin und dem ERK1/2 Inhibitor U0126 auch einen Verlust der Kardioprotektion (148).

In dieser vorliegenden Arbeit konnte keine vermehrte Phosphorylierung von AKT oder ERK1/2 durch das RIPC-Plasma beobachtet werden. Jedoch ist eine Vergleichbarkeit mit der benannten Studie nur eingeschränkt möglich. Die applizierte Menge an Plasma in den Koronarkreislauf der isoliert perfundierten Herzen stellt z.B. einen Unterschied dar. In der genannten Studie von Skyschally et al. wurden die Herzproben mit Plasma nach RIPC in einer Verdünnung von 1:10 perfundiert. In meiner Untersuchung ist eine Plasmaapplikation mit einem Koronarfluss von nur 0,5% erfolgt und war damit deutlich geringer. Jedoch konnte in den schon beschriebenen Vorversuchen gezeigt werden, dass auch in dieser Dosierung mit dem RIPC-Plasma der jungen Probanden eine deutliche und signifikante Infarktgrößenreduktion induziert wurde (Infarktgröße CON-Plasma (jung): 47 \pm 5%, Infarktgröße RIPC-Plasma (jung): 31 \pm 10%) (125). Hierzu wurde das Plasma in der gleichen Dosierung appliziert. Damit ist mit der verwendeten Plasmakonzentration eine Protektion induziert worden, die dabei aktivierten Signalwege bleiben in Detail unklar.

Zudem erfolgte in meinen Versuchen keine Index-Ischämie und somit auch kein Reperfusionsschaden an den untersuchten Herzproben, so dass die Induktion des RISK-Signalweges alleine durch das applizierte Plasma mit den darin enthaltenen humoralen

Faktoren erfolgen sollte. Dadurch wurde aber keine vermehrte Phosphorylierung von AKT oder ERK 1/2 induziert. Weder das Plasma der jungen, noch der älteren Probanden zeigte hier einen signifikanten Unterschied zu dem Kontrollplasma. Somit stellen die Konzentration des applizierten Plasmas und der fehlende I/R Schaden nicht auszuschließende relevante Unterschiede zu der Studie von Skyschally et al. dar.

Xin et al. zeigten, dass die Kombination von ischämischer Postkonditionierung und RIPC die Infarktgröße bei IR-Schäden im Vergleich zu alleiniger ischämischer Postkonditionierung oder nur RIPC reduziert und dass ein damit verbundener verstärkter Phosphorylierungsgrad von AKT und ERK 1/2 mit der Infarktgrößenreduktion korreliert (145). Daher könnte das Fehlen einer signifikant vermehrten Phosphorylierung der untersuchten Proteine auch in dieser Untersuchung mit einer Dosisabhängigkeit der ischämischen Konditionierung zusammenhängen.

Eine Studie von Hildebrandt et al., die ähnlich wie in dieser Untersuchung humanes Plasma auf ein isoliert perfundiertes Herz übertragen, konnten in Übereinstimmung mit dieser Arbeit auch keine vermehrte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 nachweisen (137). Sie verwendeten isoliert perfundierte Mäuseherzen und gewannen das Plasma von Probanden zu unterschiedlichen Zeiten nach dem RIPC-Manöver. Eine Angabe der Konzentration des applizierten Plasmas, welches zudem noch dialysiert wurde, ergibt sich nicht aus der Publikation. Aber auch sie führten keine Indexischämie und Reperfusion durch und sind damit eine Studie, die Parallelen zu der vorliegenden Arbeit zeigen, so dass die übereinstimmenden Ergebnisse damit eine Redundanz zeigen.

In dieser Untersuchung konnte ein signifikanter Unterschied in der vermehrten Phosphorylierung von GSK3 β bei den jungen Probanden gezeigt werden. GSK3 β kann als ein möglicher Konvergenzpunkt des RISK-Signalweges angenommen werden. Dabei wird GSK3 β durch Phosphorylierung inaktiviert und hemmt die mPTP-Öffnung (80,96,147,149). Nur nach Applikation des RIPC-Plasmas der jungen Probanden erfolgte eine Infarktgrößenreduktion (125), so dass die beobachtete vermehrte Phosphorylierung von GSK3 β als ein Mechanismus der Kardioprotektion durch RIPC angenommen werden kann. Studien, die den RIPC-Stimulus in adulten Mäusen untersuchten, zeigten eine erhöhte Phosphorylierung von PI3K/AKT und GSK3 β im Myokard und einen Schutz gegen einen nachfolgenden Reperfusionsschaden (142). Auch in der Arbeit von Li et al. wurde aber ein Ischämie-/ Reperfusionsschaden induziert und erst danach die jeweiligen Proteine untersucht.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit keine signifikante generelle Aktivierung der RISK-Proteine durch RIPC-Plasma. Eine fehlende Phosphorylierung der Proteine des RISK-Signalweges kann vielleicht durch eine veränderte Aktivierungsdynamik im Myokard durch

RIPC erklärt werden (135). Die Möglichkeit einer Aktivierung des RISK-Signalwegs durch RIPC ist damit jedoch nicht ausgeschlossen. Eine Induktion des RISK-Signalwegs auf Höhe eines möglichen Konvergenzpunktes, nämlich GSK3 β , nach der Applikation von RIPC-Plasma der jungen Probanden wurde beobachtet (125). Die vermehrte Phosphorylierung von GSK3 β ist auch in anderen Arbeiten im Rahmen einer RIPC beschrieben worden (142,146). Die Ursache für die fehlende Phosphorylierung der vorgeschalteten Proteine des RISK-Signalweges bleibt unklar. Weder nach der Applikation des RIPC-Plasmas von den jüngeren, noch von den älteren Probanden sind im isoliert perfundierten Rattenherzen AKT oder ERK1/2 vermehrt phosphoryliert im Vergleich zum Kontrollplasma. Der fehlende I/R-Schaden und auch die Dosis des applizierten Plasmas in den Koronarfluss erschweren eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien und könnten aber auch Gründe für diese fehlende Phosphorylierung sein. Ebenso ist durch den nicht induzierten I/R-Schaden nur eine frühe Proteinaktivierung durch das RIPC-Plasma möglich und kann Erklärung für die Ergebnisse sein. Die Veränderungen im Myokard alleine durch RIPC-Plasma zu charakterisieren und damit Proteine, die bei der frühzeitigen Signalaktivierung eine Rolle spielen, zu identifizieren, ist ein Ziel dieser Arbeit.

4.2.2 Der Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G - Signalweg

Die Rolle von NO im Mechanismus von RIPC ist einerseits durch die kardioprotektive Signalübertragung an dem Gewebe oder Organ, wo der Präkonditionierungsreiz entsteht (63), und/oder auf der kardialen Ebene zu sehen. Der Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G (NO/PKG)-Signalweg kann intrazellulär durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) die NO-Bildung steigern und es kommt zu einer Aktivierung der Proteinkinasen G (PKG) und C (PKC) (78). Eine Wirkung erfolgt dann über die ATP-abhängigen Kaliumkanäle an den Mitochondrien. Sun et al. konnten zeigen, dass durch Medikamente, die die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen, das Herz in einen präkonditionierten Zustand versetzt wird (150).

In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte keine vermehrte Phosphorylierung der eNOS beschrieben werden (125). In der Literatur sind Untersuchungen zu finden, die eine vermehrte Phosphorylierung von eNOS für den späten Schutz der lokalen IPC (151) und auch bei der ischämischen Fernpräkonditionierung (152) beschreiben. Somit kann die Vermutung, dass eNOS im Rahmen der frühen Protektion nicht vermehrt phosphoryliert wird, im Rahmen der zuvor schon genannten Einschränkungen für die fehlende Aktivierung von den Proteinen auch angenommen werden.

4.2.3 Signalkaskade mK_{Ca}-Kanal und Proteinkinase A

In der inneren Mitochondrienmembran gibt es Calcium-abhängige Kaliumkanäle (mK_{Ca}), deren Öffnung mit konsekutiver Kalium-Aufnahme ins Mitochondrium ebenfalls kardioprotektiv wirken (93,153). Durch die zyklische Adenosinmonophosphat- (cAMP-) abhängige Proteinkinase A (PKA) wird eine Öffnung dieser Kanäle beeinflusst (154) und bewirkt eine Depolarisation des Membranpotentials mit Verminderung der mitochondrialen Calcium-Last (98). Cao et al. konnten zeigen, dass der mK_{Ca}-Kanal auch an der durch RIPC induzierten Kardioprotektion beteiligt ist (95). Heinen et al. und Huhn et al. untersuchten die Bedeutung des mK_{Ca}-Kanals (155) und der PKA (124) als wichtige Schritte in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte. Sie zeigten auch eine fehlende Infarktgrößenreduktion bei Herzen von älteren Ratten (22 - 24 Monate) und stellten die Vermutung auf, dass altersabhängige Veränderungen am mK_{Ca}-Kanal oder der vorgeschalteten Signalkaskade dabei eine Rolle spielen (155).

Um eine Veränderung der PKA-Aktivität nachzuweisen, wurde mit Western Blot Analyse anhand der Phosphorylierung von Phospholamban (PBL) das Zielprotein der PKA bestimmt (97). Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung nach Applikation des RIPC-Plasmas weder bei den jungen noch bei den älteren Probanden (125). Somit kann eine frühe Phosphorylierung des PBL durch die PKA nicht als altersabhängiger Unterschied beschrieben werden. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an der Kardioprotektion gibt es aber auch nicht. Da die Kardioprotektion mit dem RIPC-Plasma der jüngeren Probanden durchaus eine Infarktgrößenreduktion induziert, jedoch das untersuchte PLB nicht verändert phosphoryliert wird, bleibt eine Beteiligung fraglich (125). Nachgeschaltete weitere Proteine wurden jedoch nicht untersucht.

4.3 Diskussion der Methode

4.3.1 Probanden

Diese Studie bestand aus einer begrenzten Anzahl von jeweils 10 Probanden pro Gruppe (jüngere und ältere Männer). Dieser Stichprobenumfang ermöglicht nur eine eingeschränkte Übertragung auf größere Populationen. Ein Genderunterschied in der Kardioprotektion wurde beschrieben und zeigt Tendenzen einer erhöhten Toleranz des weiblichen Myokards gegenüber I/R-Schäden (156). In dieser Arbeit lag der Fokus allerdings auf der Untersuchung des Effekts von Plasma männlicher Probanden auf männliche Rattenherzen. Eine Besonderheit des Studienprotokolls war, dass jeweils bei einem Probanden sowohl das Kontroll- als auch das RIPC-Plasma entnommen wurden und damit interindividuelle Unterschiede ausgeschlossen wurden.

4.3.2 Stimulus der ischämischen Fernpräkonditionierung

Die optimale Dauer und Anzahl der kurzen, repetitiven Ischämie und Reperfusionen-Zyklen an der Extremität sind unklar und erfolgten in unserer Studie auf empirischer Grundlage (157) durch 3 Zyklen von jeweils fünfminütiger Ischämie und Reperfusion. Es bestehen Hinweise auf eine „U“-förmige Dosis-Wirkungsbeziehung (158). Durch eine kontinuierliche Verlängerung der Dauer der Extremitätenischämie wurde letztlich der Verlust des protektiven Effekts gezeigt (158). Der optimale Ischämie/Reperfusionen-Stimulus, der die maximal mögliche Dosis der kardioprotektiven humoralen Faktoren freisetzt, bleibt somit unklar. Aus den Voruntersuchungen ist aber bekannt, dass durch das RIPC-Plasma der jungen Probanden eine Infarktgrößenreduktion und damit Kardioprotektion erzielt wurde (125). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Freisetzung des kardioprotektiven Faktors durch dieses Studienprotokoll bei den jungen Probanden erfolgte. Ursachen für ein Fehlen dieser Wirkung durch das Plasma von den älteren Probanden kann die fehlende, verzögerte oder auch unzureichende Freisetzung der humoralen Faktoren sein. Eine Beantwortung dieser Frage lässt diese Studie nicht zu.

Weitere Ursachen, die eine altersabhängige veränderte Freisetzung oder Aktivierung der humoralen Faktoren erklären könnte, ist die Masse der Skelettmuskulatur. Hier sollte bedacht werden, dass die Skelettmuskulatur der älteren Probanden Veränderungen aufweist, wie z.B. eine Atrophie (159). Auch Veränderungen der Arterien beim alternden Menschen durch Atherosklerose, die zu einer endothelialen Dysfunktion und Kalzifikation führen, sind beschrieben (160) und könnten ebenfalls oder zusätzlich diese Freisetzung der humoralen Faktoren beeinflussen. Zudem sind Veränderungen der Nerven oder Nervenfortleitung zu bedenken. Bekannt ist, dass bei Patienten mit einer diabetischen Neuropathie die Kardioprotektion durch humorale Faktoren verloren geht (161). Es ist aber nicht klar, ob durch die diabetische Neuropathie der Stimulus oder der humorale Faktor beeinflusst werden. Durch die Ausschlusskriterien sind Probanden mit einem Diabetes mellitus nicht in diese Studie eingeschlossen worden. Die anderen Faktoren, wie eine veränderte Muskelmasse oder Atherosklerose, können als beeinflussende Faktoren bei der Freisetzung der humoralen Faktoren jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.3.3 Übertragung des humoralen Faktors

Eine Stärke dieser Studie ist, dass bei den Probanden sowohl das Kontroll-Plasma als auch das RIPC-Plasma entnommen wurde. Die Blutentnahme erfolgte am kontralateralen Arm vor und unmittelbar nach dem RIPC-Manöver. Somit wird davon ausgegangen, dass eine unmittelbare Freisetzung der humoralen Faktoren ins Blut erfolgt. Diese Überlegung steht im Einklang mit anderen Studien, die bereits nur 5 bis 10 Minuten nach dem RIPC-Stimulus eine Protektion beschreiben (135,162,163). Diese Studien untersuchten vornehmlich junge

Probanden, gesunde Versuchstiere oder wurden ohne konkrete Angaben zum Alter der Probanden und Tiere veröffentlicht, so dass ein Einfluss des Alters der Probanden hier nicht ausgeschlossen werden kann. Eine verzögerte Produktion oder Freisetzung der protektiven humoralen Faktoren bei älteren Probanden ist durchaus möglich. Untersuchungen, die Plasma von Probanden zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem RIPC-Manöver entnehmen und seine kardioprotektive Wirkung beschreiben, sind notwendig, um diese Frage zu beantworten. Auch *Proteomic*-Analysen könnten hier einen Unterschied in den Plasmen der altersunterschiedlichen Probanden untersuchen.

Die Blutproben wurden nach dem Abzentrifugieren des Plasmas bis zur Verwendung bei minus 80°C gelagert (125). Die Lagerung und das Wiederauftauen der Proben kann zu einem (partiellen) Inaktivieren der humoralen Faktoren geführt haben. Jedoch ist sowohl bei der Infarktgrößenmessung als auch bei der Untersuchung der Proteinaktivierung jeweils bei den Proben der jungen Probanden ein Effekt zu beobachten (125), so dass eine gezielte Inaktivierung bei den älteren Probanden zwar nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich ist.

Appliziert wurde das humane Probandenplasma den isoliert perfundierten Rattenherzen in der Langendorff-Apparatur. Die Applikation des Plasmas erfolgte in den Koronarkreislauf mit 0,5% des Koronarflusses über 10 Minuten. Das entspricht insgesamt 0,75 mL Plasma. Damit kann die applizierte Plasmadosis bei den älteren Probanden zu gering sein, wenn die Hypothese aufgestellt wird, dass bei den älteren Probanden eine verringerte Konzentration an humoralen protektiven Faktoren produziert wird. Durch eine erhöhte Plasmadosis könnte eventuell eine Aktivierung von Signalwegen und kardioprotektive Effekte auslösbar sein (125). Damit könnte die im Rahmen der Gesamtstudie beobachtete fehlende Infarktgrößenreduktion und auch die hier gezeigte fehlende Proteinaktivierung in dem Zielgewebe erklärt werden. In Zellkulturstudien wurde eine Dosisfindung mit unterschiedlich konzentrierten RIPC-Plasmen (0%, 1%, 5% und 10%) vorgenommen und ein Dosisoptimum bei 5% ermittelt (138,163). Damit ist die in dieser Arbeit applizierte Konzentration von 0,5% des Koronarflusses deutlich niedriger als das Dosisoptimum in Zellkulturen. Eine Erklärung für die fehlende Phosphorylierung der Proteine könnte somit die Konzentration des applizierten Plasmas in den Koronarkreislauf sein. Weitere Studien, die sich mit der Dosierung der RIPC-Plasmaapplikation am isolierten Herz befassen, gibt es aktuell nicht. Andere RIPC-Studien, die eine Übertragung von humanem RIPC-Plasma auf isoliert perfundierte Herzen untersuchen (61,63,137), geben keine konkreten Angaben über die applizierte Plasmadosis. Damit ist eine Vergleichbarkeit erschwert.

4.3.4 Intrakardiale Proteinaktivierung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Aktivierung von intrakardialen Signalproteinen. Die Phosphorylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen und spielt bei Signalwegen in Zellen eine große Rolle. Die Proteinphosphorylierung dient dabei der Signalisierung vieler verschiedener Zellprozesse, wie zum Beispiel der interzellulären Kommunikation, dem Zellwachstum, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose (164). Die Analyse der Proteine und Phosphoproteine erfolgte mit Hilfe von Antikörpern und phosphospezifischen Antikörpern in Kombination mit dem Western Blot. Es wurden jeweils bekannte Phosphorylierungsstellen der untersuchten Proteine für die Antikörper genutzt. Die Proteinkinase B (AKT), eine Serin/Threonin Kinase, deren Isoformen AKT1 und AKT2 im Herzen exprimiert werden (165), hat eine Besonderheit. Die alleinige Phosphorylierung an Ser473 reicht nicht aus, um AKT vollständig zu aktivieren. Dazu ist eine weitere Phosphorylierung an der Stelle Thr308 notwendig (166). In dieser Arbeit wurde nur die Phosphorylierung an der Stelle Thr308 untersucht. Dabei konnte keine vermehrte Phosphorylierung nachgewiesen werden. Ob damit hinreichend nachgewiesen wurde, dass die Aktivierung der Proteinkinase AKT ausbleibt, ist unklar. Weitere Untersuchungen, die auch auf die andere bekannte Phosphorylierungsstelle zielt, sind notwendig, um die Aussage zur Aktivität der AKT zu vervollständigen.

Der Verlust der Kardioprotektion durch Plasma von älteren Probanden könnte neben einer fehlenden oder verminderten Freisetzung der humoralen Faktoren auch durch eine veränderte Fähigkeit des Zielgewebes, auf diesen Faktor zu reagieren, erklärt werden. Mehrere Studien zeigen, dass Gene oder Proteine, die für die Kardioprotektion durch lokale ischämische Präkonditionierung wichtig sind, im jungen und alten Myokard unterschiedlich exprimiert werden (167–170). Neben der verminderten Genexpression im gealterten Herzen könnte auch eine verminderte Reaktion in Bezug auf die Aktivierung oder Hemmung eines Signalmoleküls durch einen kardioprotektiven Stimulus zum Verlust der Kardioprotektion im älteren Herzen beitragen. Die Wirksamkeit des RIPC-Plasmas wurde in dieser Arbeit aber am isolierten Herzen junger, gesunder männlicher Ratten getestet. Der Fokus bleibt damit auf den altersabhängigen Unterschied in den freigesetzten kardioprotektiven humoralen Faktoren. Um Daten zur Effektivität der RIPC bei altersinduzierten myokardialen Veränderungen zu untersuchen, könnte eine Applikation von RIPC-Plasma junger Probanden an älteren Tierherzen erfolgen. Eine *in-vivo* Tierstudie unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass durch RIPC keine kardioprotektive Wirkung im alternden Herz erfolgt (119). Sie zeigten bei jungen Rattenherzen nach einem RIPC-Manöver an den Hintergliedmaßen eine deutliche Infarktgrößenreduktion im Vergleich zu

einer Kontrollgruppe ohne RIPC-Manöver. Diese Beobachtung war bei den Herzen der älteren Ratten nicht mehr vorhanden (119).

Wie die meisten experimentellen Studien wurde auch diese Studie bei jungen und gesunden Tieren durchgeführt. Damit sollte ein Einblick in die Grundlagen der endogenen Kardioprotektion erfolgen. Hier wurde dafür ein Nagetier genutzt. Neben dem Artenunterschied in der Herzgröße und -geometrie sowie in der Hämodynamik, insbesondere der Herzfrequenz (171), gibt es auch Unterschiede zu anderen größeren Säugetieren. Der RISK-Signalweg wird als wichtig für die ischämische Postkonditionierung bei Nagetieren beschrieben (92,140), nicht jedoch für andere Säugetiere wie dem Schwein (172). Die intrazelluläre Signaltransduktion in Kardiomyozyten ist daher wahrscheinlich teilweise auch artspezifisch (23).

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass es eine unterschiedliche Phosphorylierung intrakardialer Enzyme im isoliert perfundierten Herzen durch humorale Faktoren älterer und jüngerer Probanden gibt. Diese sollte durch weitere Studien bestätigt werden und weitere Untersuchungen des Plasmas, wie z.B. Proteom-Analysen könnten möglicherweise auch Unterschiede zwischen dem Plasma älterer und jüngerer Probanden detektieren.

Zusätzliche Studien mit verschieden konzentriertem Plasma im Koronarfluss, ein anderes RIPC-Protokoll oder einem empfindlicheren Antikörper-Assay könnten verwendet werden, um Veränderungen in der Phosphorylierung der untersuchten Proteine näher zu charakterisieren. Auch eine Erweiterung der untersuchten Proteine und damit vor- und nachgeschaltete Proteine der einzelnen Signalwege genauer zu betrachten, würde weitere Einblicke in die Signaltransduktion ermöglichen. Es könnten dann durch spezifische Blockaden auch Interaktionen der Signalwege betrachtet werden. Daten, die auf eine Interaktion der unterschiedlichen Signalwege verweisen, gibt es bereits, z.B. dass der RISK- und der SAFE-Signalweg bei der Vermittlung von RIPC interagieren (145,146,173).

Diese Arbeit hat sich speziell auf die durch humorale Faktoren, die nach RIPC freigesetzt werden, induzierten intrakardialen Veränderungen im Myokard konzentriert. Dazu wurde ein *in-vitro*-Modell genutzt. Die durch RIPC induzierten humoralen, neuronalen und auch systemischen Effekte einschließlich des Multiorganschutzes lassen jedoch darauf schließen, dass die Kardioprotektion ein komplexes Zusammenspiel aus diesen verschiedenen Effekten ist. Untersuchungen in einem *in-vivo*-Modell zur Validierung der Ergebnisse sind wünschenswert.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 1. Mai 2013;56(5–6):650–5.
2. Pressemitteilungen(Destatis) [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2017]. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/01/PD17_022_232.html
3. Pressemitteilungen - 51 Millionen Operationen und medizinische Prozeduren bei stationären Patienten im Jahr 2012 - Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2017]. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/10/PD13_359_231.html
4. Kristensen S D, Knutti J, Saraste A. 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). Eur Heart J. 2014;35:2383–431.
5. Pearse R M, Moreno R P, Bauer P. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. Lancet. 2012;380:1059–65.
6. Landesberg G, Beattie WS, Mosseri M, Jaffe AS, Alpert JS. Perioperative Myocardial Infarction. Circulation. 9. Juni 2009;119(22):2936–44.
7. Devereaux P J, Xavier D, Pogue J. Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study. Ann Intern Med. 2011;154:523–8.
8. Duvall WL, Sealove B, Pungoti C, Katz D, Moreno P, Kim M. Angiographic investigation of the pathophysiology of perioperative myocardial infarction. Catheter Cardiovasc Interv. 1. November 2012;80(5):768–76.
9. Gersh BJ, Stone GW, White HD, Holmes DR. Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: is the slope of the curve the shape of the future? JAMA. 23. Februar 2005;293(8):979–86.
10. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. Eur Heart J. 14. März 2017;38(11):774–84.
11. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of Myocardial Necrosis During Reperfusion of Ischemic Myocardium. Circulation. 3. März 1998;97(8):795–804.
12. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. Herz Kardiovaskuläre Erkrank. 1. März 2008;33(2):88–100.
13. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology. Physiol Rev. 1. Oktober 2003;83(4):1113–51.

14. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol.* April 2016;13(4):193.
15. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 1. November 2011;301(5):H1723–41.
16. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survivor Activating Factor Enhancement Prosurvival Signaling Pathways in Ischemic Postconditioning: Two Sides of the Same Coin. *Antioxid Redox Signal.* 8. Juli 2010;14(5):893–907.
17. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med.* 13. September 2007;357(11):1121–35.
18. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1. November 1986;74(5):1124–36.
19. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic „preconditioning“ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1. März 1993;87(3):893–9.
20. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res.* 1. August 2008;79(3):377–86.
21. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, u. a. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. August 2003;285(2):H579–88.
22. Heusch G. Postconditioning: Old wine in a new bottle? **Editorials published in the *Journal of the American College of Cardiology* reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 1. September 2004;44(5):1111–2.
23. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote Ischemic Conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 20. Januar 2015;65(2):177–95.
24. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1. November 1986;74(5):1124–36.
25. Yellon D., Alkhulaifi A., Pugsley W. Preconditioning the human myocardium. *The Lancet.* 342(8866):276–7.
26. Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of Cardioprotection by Early Ischemic Preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother.* Juni 2010;24(3):225–34.
27. Hausenloy DJ, Yellon DM. The Second Window of Preconditioning (SWOP) Where Are We Now? *Cardiovasc Drugs Ther.* 1. Juni 2010;24(3):235–54.
28. Bolli R. The Late Phase of Preconditioning. *Circ Res.* 24. November 2000;87(11):972–83.
29. Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet.* 12. Januar 2013;381(9861):166–75.

30. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. Ventricular premature beat—driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J.* 1. Juli 1996;132(1):78–83.
31. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med.* 13. September 2007;357(11):1121–35.
32. Heusch G, Kleinbongard P, Böse D, Levkau B, Haude M, Schulz R, u. a. Coronary Microembolization: From Bedside to Bench and Back to Bedside. *Circulation.* 3. November 2009;120(18):1822–36.
33. Skyschally A, Walter B, Heusch G. Coronary microembolization during early reperfusion: infarct extension, but protection by ischaemic postconditioning. *Eur Heart J.* 7. November 2013;34(42):3314–21.
34. Gho BCG, Schoemaker RG, Doel MA van den, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation.* 1. November 1996;94(9):2193–200.
35. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. 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.* 2. September 1997;96(5):1641–6.
36. Günaydin B, Cakici I, Soncul H, Kalaycioglu S, Cevik C, Sancak B, u. a. Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res.* April 2000;41(4):493–6.
37. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, u. a. Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation.* 3. Dezember 2002;106(23):2881–3.
38. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Böttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, u. a. 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.* 27. Februar 2010;375(9716):727–34.
39. Przyklenk K, Maynard M, Greiner DL, Whittaker P. Cardioprotection with Postconditioning: Loss of Efficacy in Murine Models of Type-2 and Type-1 Diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 1. März 2011;14(5):781–90.
40. Jakob Vinten-Johansen, Weiwei Shi. Preconditioning and Postconditioning: Current Knowledge, Knowledge Gaps, Barriers to Adoption, and Future Directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1. September 2011;16(3–4):260–6.
41. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury—A Review. *J Surg Res.* 1. Dezember 2008;150(2):304–30.
42. Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, u. a. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: Role of heme oxygenase 1 in the second window of protection. *Liver Transpl.* 1. Januar 2015;21(1):112–22.

43. Karin Przyklenk, Peter Whittaker. Remote Ischemic Preconditioning: Current Knowledge, Unresolved Questions, and Future Priorities. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1. September 2011;16(3–4):255–9.
44. Kleinbongard P, Skyschally A, Heusch G. Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 1. Februar 2017;469(2):159–81.
45. Li S-J, Wu Y-N, Kang Y, Yin Y-Q, Gao W-Z, Liu Y-X, u. a. Noninvasive Limb Ischemic Preconditioning Protects Against Myocardial I/R Injury in Rats. *J Surg Res.* 1. November 2010;164(1):162–8.
46. Kleinbongard P, Heusch G. Extracellular signalling molecules in the ischaemic/reperfused heart – druggable and translatable for cardioprotection? *Br J Pharmacol.* April 2015;172(8):2010–25.
47. Basalay MV, Mastitskaya S, Mrochek A, Ackland GL, del Arroyo AG, Sanchez J, u. a. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning. *Cardiovasc Res.* Dezember 2016;112(3):669–76.
48. Heusch G. Remote ischemic conditioning: the enigmatic transfer of protection. *Cardiovasc Res.* 1. Januar 2017;113(1):1–2.
49. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 1. September 2010;105(5):651–5.
50. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. 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.* 2. August 2005;46(3):450–6.
51. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, Mrochek A, Pernow J, Sjöquist P-O, u. a. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Exp Physiol.* 1. August 2012;97(8):908–17.
52. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, u. a. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol.* 1. Februar 2013;98(2):425–34.
53. Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, u. a. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1. November 2005;130(5):1326–32.
54. Shimizu M, Saxena P, Konstantinov IE, Cherepanov V, Cheung MMH, Wearden P, u. a. Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. *J Surg Res.* Januar 2010;158(1):155–61.
55. Candilio L, Malik A, Hausenloy DJ. Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning. *J Cardiovasc Med.* März 2013;14(3):193.
56. Helgeland E, Breivik LE, Vaudel M, Svendsen ØS, Garberg H, Nordrehaug JE, u. a. Exploring the Human Plasma Proteome for Humoral Mediators of Remote Ischemic Preconditioning - A Word of Caution. *PLoS ONE* [Internet]. 15. Oktober 2014 [zitiert 28. Januar 2018];9(10). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4198105/>

57. Pickard JMJ, Bøtker HE, Crimi G, Davidson B, Davidson SM, Dutka D, u. a. Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. *Basic Res Cardiol.* 1. Januar 2015;110(1):453.
58. Pickard JMJ, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Co-dependence of the neural and humoral pathways in the mechanism of remote ischemic conditioning. *Basic Res Cardiol.* 1. Juli 2016;111(4):50.
59. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, u. a. Rabbit heart can be „preconditioned“ via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol.* Dezember 1999;277(6 Pt 2):H2451-2457.
60. Giricz Z, Varga ZV, Baranyai T, Sipos P, Pálóczi K, Kittel Á, u. a. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol.* 1. März 2014;68:75–8.
61. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, u. a. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 3. August 2009;117(5):191–200.
62. Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, u. a. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 α /CXCR4 signalling axis. *Basic Res Cardiol.* 1. September 2013;108(5):377.
63. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning Novelty and Significance. *Circ Res.* 9. Mai 2014;114(10):1601–10.
64. Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, u. a. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 1. September 2014;109(5):423.
65. Lang SC, Elsässer A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kübler W, u. a. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol.* März 2006;101(2):149–58.
66. Heusch G. Remote ischemic conditioning: the enigmatic transfer of protection. *Cardiovasc Res.* 1. Januar 2017;113(1):1–2.
67. Serejo FC, Rodrigues LF, Tavares KC da S, Carvalho ACC de, Nascimento JHM. Cardioprotective Properties of Humoral Factors Released From Rat Hearts Subject to Ischemic Preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1. April 2007;49(4):214–20.
68. Heinen A, Huhn R, Hollmann MW, Preckel B, Zuurbier CJ, Schlack W, u. a. Physiological levels of glutamine prevent morphine-induced preconditioning in the isolated rat heart. *Eur J Pharmacol.* 24. Oktober 2008;595(1):58–64.
69. Huffman LC, Koch SE, Butler KL. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. Januar 2008;294(1):H257–62.
70. Breivik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 1. Januar 2011;106(1):135–45.

71. Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Hollmann MW, u. a. Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. PLoS ONE [Internet]. 15. Dezember 2015 [zitiert 28. Januar 2018];10(12). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684397/>
72. Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S. Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. Int J Legal Med. 1. Juli 2016;130(4):1053–60.
73. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere. 1. August 1895;61(6):291–332.
74. Zimmer H-G. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. Physiology. 1. August 1998;13(4):203–10.
75. Sutherland FJ, Hearse DJ. THE ISOLATED BLOOD AND PERFUSION FLUID PERFUSED HEART. Pharmacol Res. 1. Juni 2000;41(6):613–27.
76. Aytulun AA. Geschlechtsspezifische Effekte von humanem Plasma nach Ischämischer Fernpräkonditionierung des älteren Menschen auf Infarktgröße und Hämodynamik des isolierten Langendorffherzens [Internet]. [zitiert 17. April 2018]. Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=45625>
77. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, u. a. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. Cardiovasc Res. 1. August 2010;87(3):406–23.
78. Cohen MV, Downey JM. Cardioprotection: spotlight on PKG. Br J Pharmacol. November 2007;152(6):833–4.
79. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. Am J Physiol-Heart Circ Physiol. 1. Oktober 2002;283(4):H1481–8.
80. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, u. a. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. J Clin Invest. 1. Juni 2004;113(11):1535–49.
81. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia–reperfusion injury. Cardiovasc Res. 1. Dezember 2003;60(3):617–25.
82. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. Am J Physiol-Heart Circ Physiol. 1. Februar 2005;288(2):H971–6.
83. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. Cardiovasc Res. 1. November 2009;84(2):201–8.
84. Heusch G, Musiolik J, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, Thielmann M. STAT5 Activation and Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Humans Novelty and Significance. Circ Res. 6. Januar 2012;110(1):111–5.

85. Davidson SM, Yellon DM. STAT5 fits the RISK profile for cardioprotection. *JAK-STAT*. 1. April 2012;1(2):73–6.
86. Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 1. Mai 2002;109(9):1143–8.
87. Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y-J, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, u. a. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science*. 6. Februar 2009;323(5915):793–7.
88. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*. 1. November 2009;84(2):201–8.
89. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. *Circulation*. 4. November 2008;118(19):1915–9.
90. Murphy E, Steenbergen C. Preconditioning: The Mitochondrial Connection. *Annu Rev Physiol*. 16. Februar 2007;69(1):51–67.
91. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. August 2007;1767(8):1007–31.
92. Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1. August 2004;287(2):H841–9.
93. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Eyk JEV, Sidor A, u. a. Cytoprotective Role of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane. *Science*. 1. November 2002;298(5595):1029–33.
94. Cao C-M, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong T-M. Calcium-Activated Potassium Channel Triggers Cardioprotection of Ischemic Preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 1. Februar 2005;312(2):644–50.
95. Cao Y, Zhang S, Zhao S, Bruce IC. The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel contributes to cardioprotection by limb remote ischemic preconditioning in rat. *Life Sci*. 6. Juni 2011;88(23):1026–30.
96. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, u. a. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3 β -mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*. 1. November 2007;43(5):564–70.
97. MacLennan DH, Kranias EG. Calcium: Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Juli 2003;4(7):566.
98. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Cardiac Myocytes: A Mechanism of the Cardioprotective Effect and Modulation by Protein Kinase A. *Circulation*. 18. Januar 2005;111(2):198–203.
99. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, u. a. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 18. August 2007;370(9587):575–9.
100. Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang K-S, Seo YH, Ahn K-R, u. a. Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: A randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1. Juli 2011;142(1):148–54.

101. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, u. a. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet*. 17. August 2013;382(9892):597–604.
102. Davies WR, Brown AJ, Watson W, McCormick LM, West NEJ, Dutka DP, u. a. Remote Ischemic Preconditioning Improves Outcome at 6 Years After Elective Percutaneous Coronary Intervention: The CRISP Stent Trial Long-term Follow-up. *Circ Cardiovasc Interv*. 1. Juni 2013;6(3):246–51.
103. Zografos TA, Katritsis GD, Tsiafoutis I, Bourboulis N, Katsivas A, Katritsis DG. Effect of One-Cycle Remote Ischemic Preconditioning to Reduce Myocardial Injury During Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol*. 15. Juni 2014;113(12):2013–7.
104. White SK, Frohlich GM, Sado DM, Maestrini V, Fontana M, Treibel TA, u. a. Remote Ischemic Conditioning Reduces Myocardial Infarct Size and Edema in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc Interv*. 1. Januar 2015;8(1, Part B):178–88.
105. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, Gosling P, u. a. Remote Ischemic Preconditioning in Human Coronary Artery Bypass Surgery: From Promise to Disappointment? *Circulation*. 14. September 2010;122(11 suppl 1):S53–9.
106. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, Desai J, u. a. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Res Cardiol*. 1. Juli 2011;106(4):511–9.
107. Lucchinetti E, Bestmann L, Feng J, Freidank H, Clanachan AS, Finegan BA, u. a. Remote Ischemic Preconditioning Applied during Isoflurane Inhalation Provides No Benefit to the Myocardium of Patients Undergoing On-pump Coronary Artery Bypass Graft SurgeryLack of Synergy or Evidence of Antagonism in Cardioprotection? *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol*. 1. Februar 2012;116(2):296–310.
108. Hong DM, Lee E-H, Kim HJ, Min JJ, Chin J-H, Choi D-K, u. a. Does remote ischaemic preconditioning with postconditioning improve clinical outcomes of patients undergoing cardiac surgery? Remote Ischaemic Preconditioning with Postconditioning Outcome Trial. *Eur Heart J*. 14. Januar 2014;35(3):176–83.
109. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, u. a. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med*. 5. Oktober 2015;373(15):1397–407.
110. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, u. a. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med*. 5. Oktober 2015;373(15):1408–17.
111. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res*. 15. Juli 2009;83(2):247–61.
112. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacol Rev*. 1. Oktober 2014;66(4):1142–74.

113. Kleinbongard P, Neuhäuser M, Thielmann M, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, u. a. Confounders of Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Cardiology*. 2016;133(2):128–33.
114. Stoppe C, Meybohm P, Benstoem C, Goetzenich A. Remote ischemic preconditioning in cardiac anesthesia: a review focusing on translation. *Minerva Anesthesiol*. Juni 2017;83(6):610–23.
115. Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A, Levkau B, Schulz R, Erbel R. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder. *Cardiovasc Res*. 1. Mai 2012;94(2):237–45.
116. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J*. 10. Januar 2005;19(3):419–21.
117. Mariani J, Ou R, Bailey M, Rowland M, Nagley P, Rosenfeldt F, u. a. Tolerance to ischemia and hypoxia is reduced in aged human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1. Oktober 2000;120(4):660–7.
118. Bernhard D, Laufer G. The Aging Cardiomyocyte: A Mini-Review. *Gerontology*. 2008;54(1):24–31.
119. Behmenburg F, Heinen A, Bruch LV, Hollmann MW, Huhn R. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. August 2017;31(4):1223–6.
120. Lee T-M, Su S-F, Chou T-F, Lee Y-T, Tsai C-H. Loss of Preconditioning by Attenuated Activation of Myocardial ATP-Sensitive Potassium Channels in Elderly Patients Undergoing Coronary Angioplasty. *Circulation*. 22. Januar 2002;105(3):334–40.
121. Fenton RA, Dickson EW, Meyer TE, Dobson JG. Aging Reduces the Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning in the Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1. Juli 2000;32(7):1371–5.
122. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1. Oktober 2001;281(4):H1630–6.
123. Snieciński R, Liu H. Reduced Efficacy of Volatile Anesthetic Preconditioning with Advanced Age in Isolated Rat Myocardium. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol*. 1. März 2004;100(3):589–97.
124. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, u. a. Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A. *Exp Gerontol*. Januar 2012;47(1):116–21.
125. Heinen A, Behmenburg F, Aytulun A, Dierkes M, Zerbin L, Kaisers W, u. a. The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent. *J Transl Med*. 27. April 2018;16:112.

126. Behmenburg F, Dorsch M, Huhn R, Mally D, Heinen A, Hollmann MW, u. a. Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats. *PLoS ONE* [Internet]. 15. Dezember 2015 [zitiert 13. Dezember 2017];10(12). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684397/>
127. Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S. Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. *Int J Legal Med*. 1. Juli 2016;130(4):1053–60.
128. Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S, Mayer F. Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers? *Int J Legal Med* [Internet]. 18. November 2017; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1726-z>
129. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1. Oktober 1985;150(1):76–85.
130. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15. August 1970;227(5259):680–5.
131. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Proteins* [Internet]. Humana Press; 1984 [zitiert 31. März 2018]. S. 41–55. (Methods in Molecular Biology™). Verfügbar unter: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-062-8:41>
132. MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. April 2010;61(2):171–7.
133. Heusch G. Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circ Res*. 13. Februar 2015;116(4):674–99.
134. Lim SY, Hausenloy DJ. Remote Ischemic Conditioning: From Bench to Bedside. *Front Physiol* [Internet]. 20. Februar 2012 [zitiert 17. März 2018];3. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3282534/>
135. Heinen NM, Pütz VE, Görgens JI, Huhn R, Grüber Y, Barthuber C, u. a. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock Augusta Ga*. Juli 2011;36(1):45–53.
136. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCε-isoform. *Cardiovasc Res*. 15. August 2002;55(3):583–9.
137. Hildebrandt HA, Kreienkamp V, Gent S, Kahlert P, Heusch G, Kleinbongard P. Kinetics and Signal Activation Properties of Circulating Factor(s) From Healthy Volunteers Undergoing Remote Ischemic Pre-Conditioning. *Jacc Basic Transl Sci*. 13. Februar 2016;1(1–2):3–13.
138. Weber NC, Riedemann I, Smit KF, Zitta K, van de Vondervoort D, Zuurbier CJ, u. a. Plasma from human volunteers subjected to remote ischemic preconditioning protects human endothelial cells from hypoxia-induced cell damage. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2015 [zitiert 3. Februar 2018];110(2). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4341024/>

139. Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, Cheung MHH, u. a. Remote Ischemic Preconditioning (RIPC) Modifies Plasma Proteome in Humans. *PLoS ONE* [Internet]. 5. November 2012 [zitiert 12. Januar 2018];7(11). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3489679/>
140. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 15. Februar 2004;61(3):448–60.
141. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 1. Dezember 2007;12(3–4):217–34.
142. Li J, Xuan W, Yan R, Tropak MB, Jean-St-Michel E, Liang W, u. a. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of β -catenin. *Clin Sci Lond Engl* 1979. Mai 2011;120(10):451–62.
143. Kunuthur SP, Mocanu MM, Hemmings BA, Hausenloy DJ, Yellon DM. The Akt1 isoform is an essential mediator of ischaemic preconditioning. *J Cell Mol Med.* 1. August 2012;16(8):1739–49.
144. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol.* 1. März 2006;38(3):414–9.
145. Xin P, Zhu W, Li J, Ma S, Wang L, Liu M, u. a. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 5. März 2010;298(6):H1819–31.
146. Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, u. a. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 1. November 2011;106(6):1329–39.
147. Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Cardioprotection. *Circ Res.* 5. Juni 2009;104(11):1240–52.
148. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways Novelty and Significance. *Circ Res.* 17. Juli 2015;117(3):279–88.
149. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3 β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion. *Circulation.* 27. Mai 2008;117(21):2761–8.
150. Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E. Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-Nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free Radic Biol Med.* Januar 2013;54:105–12.

151. Xuan Y-T, Guo Y, Zhu Y, Wang O-L, Rokosh G, Bolli R. Endothelial Nitric Oxide Synthase Plays an Obligatory Role in the Late Phase of Ischemic Preconditioning by Activating the Protein Kinase C ϵ -p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase-pSer-Signal Transducers and Activators of Transcription1/3 Pathway. *Circulation*. 31. Juli 2007;116(5):535–44.
152. Cai ZP, Parajuli N, Zheng X, Becker L. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res Cardiol*. Juli 2012;107(4):277.
153. Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H. Infarct size limitation by adrenomedullin: protein kinase A but not PI3-kinase is linked to mitochondrial K_{Ca} channels. *Cardiovasc Res*. 15. Januar 2008;77(2):398–405.
154. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, Lotz C, Smul TM, Roewer N, u. a. Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg*. Februar 2008;106(2):384–91, table of contents.
155. Heinen A, Huhn R, Smeele KMA, Zuurbier CJ, Schlack W, Preckel B, u. a. Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca²⁺-sensitive potassium channel activation. *Anesthesiology*. November 2008;109(5):830–6.
156. Ostadal B, Ostadal P. Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications. *Br J Pharmacol*. 1. Februar 2014;171(3):541–54.
157. Randhawa PK, Bali A, Jaggi AS. RIPc for multiorgan salvage in clinical settings: Evolution of concept, evidences and mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 5. Januar 2015;746:317–32.
158. Johnsen J, Pryds K, Salman R, Løfgren B, Kristiansen SB, Bøtker HE. The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res Cardiol*. 1. März 2016;111(2):10.
159. Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL, Perrimon N. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis Model Mech*. 1. November 2013;6(6):1339–52.
160. Tesauro M, Mauriello A, Rovella V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Cardillo C, Melino G, u. a. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J Intern Med*. 1. Mai 2017;281(5):471–82.
161. Jensen RV, Støttrup NB, Kristiansen SB, Bøtker HE. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol*. 1. September 2012;107(5):285.
162. Konstantinov IE, Arab S, Kharbada RK, Li J, Cheung MMH, Cherepanov V, u. a. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 16. September 2004;19(1):143–50.
163. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Heinrich C, Renner J, Cremer J, u. a. Serum from Patients Undergoing Remote Ischemic Preconditioning Protects Cultured Human Intestinal Cells from Hypoxia-Induced Damage: Involvement of Matrixmetalloproteinase-2 and -9. *Mol Med*. 14. Oktober 2011;18(1):29–37.

164. Hunter T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell*. 7. Januar 2000;100(1):113–27.
165. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. August 2006;7(8):589–600.
166. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, u. a. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 2. Dezember 1996;15(23):6541–51.
167. Aoyagi T, Izumo S. Hemodynamic Overload-Induced Activation of Myocardial Mitogen-Activated Protein Kinases In Vivo: Augmented Responses in Young Spontaneously Hypertensive Rats and Diminished Responses in Aged Fischer 344 Rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Januar 2001;37(1):52–7.
168. Llorens S, Salazar FJ, Nava E. Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. August 2005;23(8):1507–14.
169. Fang CX, Doser TA, Yang X, Sreejayan N, Ren J. Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt. *Aging Cell*. 1. April 2006;5(2):177–85.
170. Hunter JC, Kostyak JC, Novotny JL, Simpson AM, Korzick DH. Estrogen deficiency decreases ischemic tolerance in the aged rat heart: roles of PKC δ , PKC ϵ , Akt, and GSK3 β . *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1. Februar 2007;292(2):R800–9.
171. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. *Circulation*. 4. November 2008;118(19):1915–9.
172. Skyschally A, Caster P van, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, u. a. Ischemic Postconditioning in Pigs: No Causal Role for RISK Activation. *Circ Res*. 2. Januar 2009;104(1):15–8.
173. Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovasc Res*. 1. April 2008;78(1):108–15.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Benedikt Pannen für die Möglichkeit in seiner Klinik experimentell zu forschen.

Ich möchte mich bei Frau Professorin Dr. Inge Bauer und Privatdozent Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, Supervision und Hilfe bei Problemstellungen während der Erstellung dieser Arbeit herzlichst bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Claudia Dohle und Frau Nadine Lottmann bedanken, die mich im Laboralltag und bei der Western Blot Methode unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen Kollegen der Arbeitsgruppe, den Mitdoktoranden Dr. Aykut Aytulun und Max Dierkes sowie Dr. Friederike Behmenburg für die stets hohe Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit. Für die konstruktiven Gespräche danke ich Herrn Dr. Daniel Schlieper.

Allen Kollegen und meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern.

Mein Dank gilt allen freiwilligen Probanden für die Teilnahme an dieser Studie.