

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

**Der Einfluss von Geschlecht und
myokardialer ischämischer
Präkonditionierung auf das Verhalten von
immunhistochemischen Markern des akuten
Myokardinfarktes**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kassra Lisa Scholl

2020

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

gez.: Kassra Lisa Scholl

Dekan: Herr Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Stefanie Ritz-Timme

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Christian Jung

Gewidmet Angelika Scholl

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

K. Scholl, R. Huhn, S. Ritz-Timme, F. Mayer (2018) The impact of sex and myocardial ischemic preconditioning on immunohistochemical markers of acute myocardial infarction, *International Journal of Legal Medicine*, 133(2), 529-538

Zusammenfassung

Für die postmortale immunhistochemische Detektion von Myokardinfarkten mit kurzer Überlebensdauer haben vorausgegangene Studien Dityrosin, Connexin 43 sowie die Troponine I und T als geeignete bzw. potentielle immunhistologische Marker identifizieren können. Ergebnisse von sowohl klinischen als auch experimentellen Studien zeigen, dass Geschlecht, aber auch eine ischämische Präkonditionierung des Herzens einen Einfluss auf die Schwere und Ausprägung eines Myokardinfarktes haben können. Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob die oben genannten Marker durch Geschlecht oder ischämische Präkonditionierung beeinflusst werden. Dies wurde in dieser Studie durch Experimente mit Rattenherzen und der Langendorff Technik getestet. An Herzen von 12 männlichen und 12 weiblichen Wistar Ratten wurde durch die Ligatur der linken Koronararterie (LAD) eine lokale Ischämie induziert. Bei weiteren 12 Herzen männlicher Ratten wurde eine globale ischämische Präkonditionierung vorgenommen, indem die Perfusion des Herzens für 30 Minuten unterbrochen und dann für weitere 60 Minuten wiederhergestellt wurde, bevor auch an diesen Herzen eine lokale Ischämie herbeigeführt wurde. Die Zeiten nach der Ligatur bzw. Dauer bis zur Fixierung variierten dabei von 10 bis 60 Minuten. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 männlichen und 4 weiblichen Rattenherzen. Diese wurden für 60 Minuten an die Langendorff Anlage angeschlossen ohne weitere Manipulation, oder es wurde lediglich eine ischämische Präkonditionierung vorgenommen, oder aber die Herzen wurden entnommen ohne überhaupt an die Anlage angeschlossen zu werden. Einige Herzen wurden Elektroschocks von 26V ausgesetzt um Arrhythmien herbei zu führen. Alle Herzen wurden anschließend in Formalin fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Es zeigten sich bei Dityrosin und Cx43 keine Unterschiede der Färbungen im Vergleich der Geschlechter, der Troponinverlust war jedoch in weiblichen Herzen geringer. Herzen mit ischämischer Präkonditionierung zeigten Unterschiede im Vergleich zu nicht präkonditionierten Herzen bei den Markern Cx43, cTnT und cTnI. Diese Befunde müssen künftig bei der postmortalen Diagnostik des frühen Myokardinfarktes mit den untersuchten Markern berücksichtigt werden.

Summary

To detect myocardial infarctions with short survival times on an immunohistochemical basis, studies have identified the possible markers dityrosin, connexin 43 and troponin T and I. Experimental as well as clinical studies show, that gender as well as ischemic preconditioning of the heart have an effect on the severity and impact of myocardial infarction. Based on these findings, it is important to find out if the markers mentioned above can be influenced by gender or ischemic preconditioning, especially in the context of postmortem diagnostics of myocardial infarction. This study tested these potential effects on isolated rat hearts, implementing the Langendorff technique. Using the hearts of 12 male and 12 female Wistar rats, a local ischemia was achieved through occlusion of the left anterior descending artery (LAD). Another 12 hearts of male rats were subjected to global ischemic preconditioning, by stopping perfusion of the hearts for 30 minutes and reperfusing them for another 60 minutes, before also inducing a local ischemia. Time of perfusion after local ischemic events varied from 10 to 60 minutes. The control group was comprised out of 10 male and 4 female rat hearts. These were attached to the Langendorff system for 60 minutes without further manipulation, or they just received ischemic preconditioning, or they were excised without being attached to the Langendorff system at all. Some hearts were subjected to electric shocks of 26V, to generate arrhythmias. All hearts were subsequently fixed in formalin and stained immunohistochemically. No differences were seen when comparing results of both genders with the markers dityrosine and Cx43, whereas both troponins were less depleted in female hearts. Also, the markers Cx43, cTnT and cTnI showed differences in hearts with ischemic preconditioning when compared to hearts without preconditioning. These findings have to be taken into account when using the tested markers for postmortal diagnostics of early myocardial infarction.

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl₂	Calciumchlorid
cTnI	Cardiac Troponin I
cTnT	Cardiac Troponin T
Cx43	Connexin 43
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EKG	Elektrokardiographie
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LAD	Left Anterior Descending Artery
MgSO₂ + 7 H₂O	Magnesiumsulfat Heptahydrat
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumbikarbonat
ROS	Reactive Oxygen Species
TBS	Tris-buffered Saline
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung1

1.1 Marker des frühen Myokardinfarktes2

1.2 Geschlecht6

1.3 Ischämische Präkonditionierung7

1.4 Das Langendorff-Modell10

1.5 Ziele der Arbeit11

2 Publikation12

3 Orientierend erhobene Daten zu den Effekten einer Arrhythmie auf die untersuchten Marker22

3.1 Methode23

3.2 Resultate24

4 Diskussion26

4.1 Geschlecht26

4.1.1 Dityrosin27

4.1.2 Connexin 4328

4.1.3 Troponine I und T29

4.2 Ischämische Präkonditionierung30

4.2.1 Dityrosin30

4.2.2 Connexin 4331

4.2.3 Troponine I und T32

4.3 Effekte einer provozierten Arrhythmie auf die untersuchten Marker32

4.4 Schlussfolgerungen34

5 Limitationen37

Literaturverzeichnis38

1 Einleitung

Der akute Myokardinfarkt ist Thema intensiver Forschung in verschiedensten Feldern der Medizin. Im Kontext der Rechtsmedizin wird häufig auf eine histologische Analyse zurückgegriffen, um postmortal die Diagnose eines tödlichen Myokardinfarktes zu stellen. Jedoch kann es abhängig vom Alter des Infarktes bzw. der Überlebenszeit nach dem akuten Infarktgeschehen durchaus schwierig sein, den Nachweis allein durch konventionelle Histologie zu erbringen. Frühe histopathologische Veränderungen im Myokard in Form von beispielsweise zellulärer Hypereosinophilie oder Kontraktionsbandnekrosen sind frühestens nach wenigen Stunden abgrenzbar. Um die Möglichkeit der Detektion von Myokardinfarkten mit einer geringeren Überlebenszeit zu verbessern wurden bestimmte immunhistochemische Marker identifiziert, welche im betroffenen Herzmuskelgewebe nachweislich entweder pathologisch verstärkt oder vermindert auftreten (Madea, 2015). Dennoch ist die Zuverlässigkeit solcher Marker im Hinblick auf verschiedenste Faktoren und Umstände, welche das Potential haben die Ausprägung einer myokardialen Schädigung bei Ischämie zu beeinflussen, noch weitestgehend unbekannt. So ist der Einfluss des Geschlechts auf kardiale Erkrankungen ein intensiv diskutiertes Gebiet und Gegenstand der Forschung, ebenso wie die sogenannte ischämische Präkonditionierung von myokardialem Gewebe bei Patienten mit einer bereits vorbekannten koronaren Herzkrankheit. Beide Umstände müssen als potentielle Einflussfaktoren auch auf die postmortale immunhistochemische Detektion von Myokardinfarkten diskutiert werden und werden in dieser Studie adressiert.

1.1 Marker des frühen Myokardinfarktes

Zu den getesteten Markern zur Erkennung von ischämischen Schäden in myokardialem Gewebe gehört Dityrosin, ein Proteinprodukt welches auf oxidativen Stress und darauffolgende Proteolyse hinweist (Giulivi und Davies, 1994; Giulivi et al., 2003). Bei oxidativem Stress handelt es sich um einen Zustand, der hervorgerufen wird durch das übermäßige Vorhandensein von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Diese entstehen als physiologisches Beiprodukt durch die Verstoffwechslung von Sauerstoff im Organismus und können im Normalfall durch Antioxidantien gut kompensiert werden. Im Falle einer körperlichen Stresssituation wie beispielsweise einer Erkrankung kann sich die Produktion von ROS jedoch so stark erhöhen, dass diese nicht mehr durch Antioxidantien aufgefangen werden können und dann zu Zellschäden und sogar Zelluntergang beitragen. Dieser Mechanismus spielt eine Rolle bei der Entstehung von Endorganschäden wie beispielsweise den kardiovaskulären Erkrankungen (Kander et al, 2017). Die Aminosäure Dityrosin ist einerseits ein Produkt physiologischer posttranslationaler Prozesse bestimmter Proteine, entsteht aber auch durch verschiedene Arten der Strahlung, im Rahmen von Alterungsprozessen und durch freie Sauerstoffradikale oder Peroxidasen (Giulivi und Davies, 1994; Giulivi et al., 2003). Besonders das Auftreten von Dityrosin nach oxidativem Stress im Zusammenhang mit nachfolgender Proteolyse (Giulivi et al., 2003) macht es als Marker für durch oxidativen Stress hervorgerufene, pathologische Prozesse interessant. Im oxidativen Umfeld wird aus der Aminosäure Tyrosin das Radikal Tyrosyl generiert. Zwei dieser Tyrosylradikale zusammen können durch intermolekulares *cross-linking* das Dimer Dityrosin formen (Giulivi und Davies, 1994; Giulivi et al., 2003; Davies, 2005).

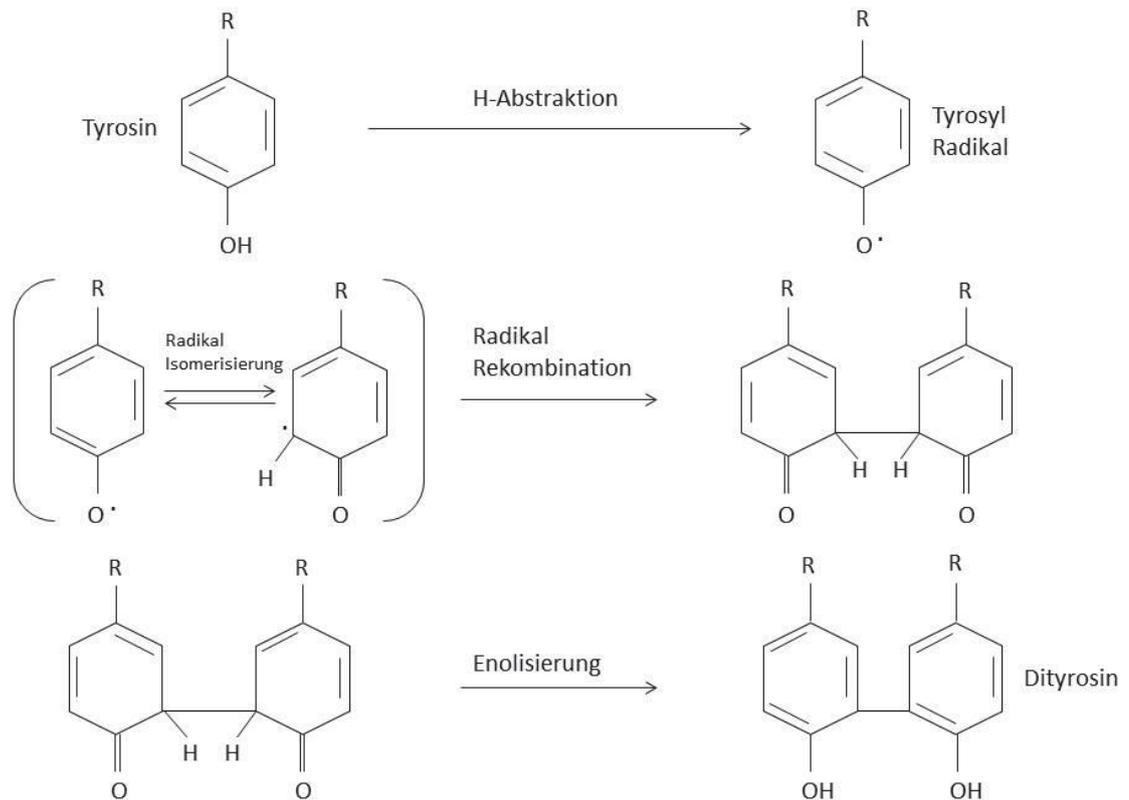


Bild 1: Bildung von Dityrosin: Durch H-Abstraktion wird aus Tyrosin ein Tyrosyl Radikal gebildet. Durch Rekombination und Enolisierung zweier Tyrosyl Radikale kommt es zur Entstehung von Dityrosin (modifiziert nach Giulivi et al., 2003).

Im Falle einer Ischämie des Herzens kommt es binnen weniger Minuten bereits zu Schädigungen innerhalb der Zellen, so werden die Mitochondrien in ihrer Funktion beeinflusst und setzen Radikale in den Myozyten frei (Lesnefsky et al, 2001). Diese wiederum können zur Formation von Dityrosin beitragen. Mayer et al. (2014, 2016) konnten sowohl in Obduktions-Fällen als auch im experimentellen Tiermodell Dityrosin in Fällen von frühen Myokardinfarkten immunhistologisch nachweisen.

Connexin 43 ist ein strukturelles Protein, welches die sogenannten *Gap junctions* zwischen Myozyten bildet, welche eine wichtige Rolle im Ionenaustausch zwischen einzelnen Zellen spielen. Eine *Gap junction* ist dabei aus 12 einzelnen Cx43 Einheiten aufgebaut, welche wiederum jeweils zwei

Hemikanäle bilden um zwei Zellen miteinander zu verbinden (Schulz und Heusch, 2004).

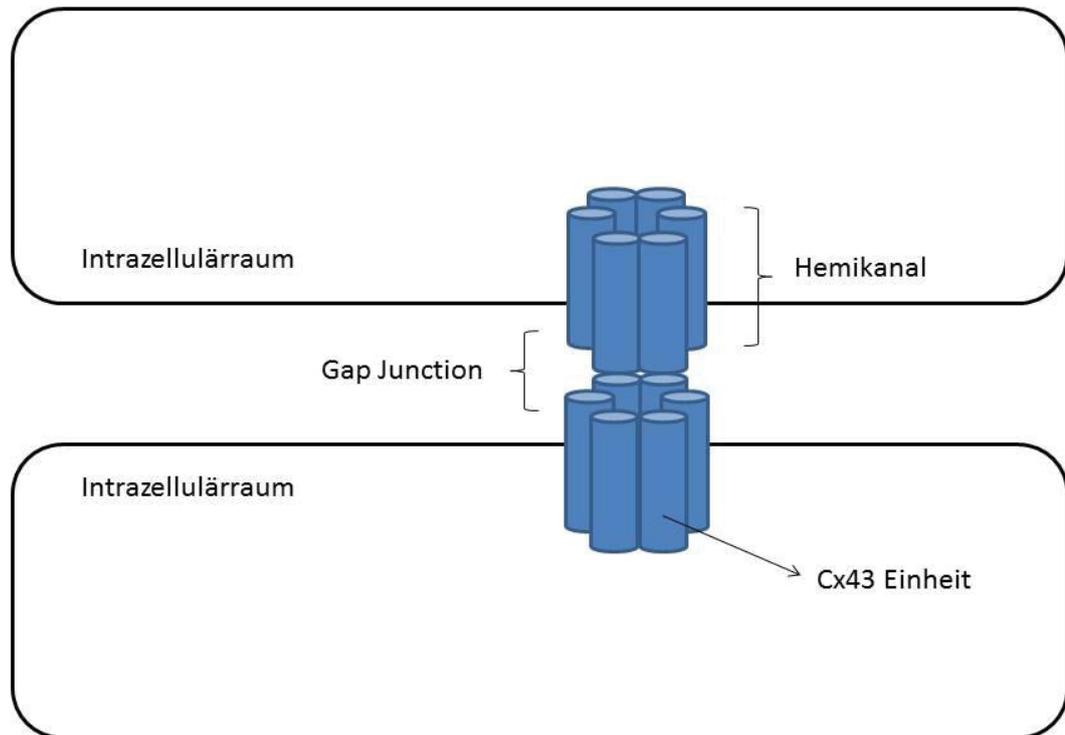


Bild 2: Bildung von zwei Hemikanälen durch je 6 Cx43 Einheiten und Entstehung einer *Gap junction* zweier Zellen.

Cx43 unterläuft im Falle einer myokardialen Ischämie eine progressive Dephosphorylierung als Resultat des Zellunterganges, welcher die Enzymaktivitäten innerhalb der Myozyten aus dem Gleichgewicht bringt (Schulz und Heusch, 2004). Das dephosphorylierte Cx43 sammelt sich an und verlagert sich in sogenannte intrazelluläre *Pools* (Beardslee et al., 2000; Vetterlein et al., 2006) und kann als Marker angefärbt werden. Sabatasso et al. (2016) zeigten eine Akkumulation von dephosphoryliertem Cx43 in Herzgewebe nach 15-minütiger Ischämie, wobei sich die Anhäufung von Cx43 mit gesteigerter Dauer

der Ischämie ebenfalls verstärkte. Dieser Marker tritt demnach nachweislich in einem charakteristischen Muster und einer pathologischen Menge in myokardialem Gewebe auf, kurz nachdem dieses einen ischämischen Insult erfahren hat (Mayer et al., 2014; Mayer et al., 2016; Sabatasso et al., 2016).

Die Marker Troponin T und I werden bereits weitläufig in der klinischen Medizin für die Diagnose von Myokardinfarkten verwendet. Troponin als solches ist ein Bestandteil des Aktinfilaments und somit in die Funktion der Muskelkontraktion involviert. Troponin besteht aus 3 Untereinheiten (I, T und C), von den Untereinheiten I und T existieren wiederum 3 verschiedene Isoformen, unter anderem die des kardialen Troponins, cTnT und cTnI (Campobasso et al., 2008). Bei kardialer Schädigung wie beispielsweise im Rahmen einer Ischämie wird Troponin aus den geschädigten Zellen ins Blut freigesetzt. Die Troponine T und I haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität in der serologischen Diagnostik des Myokardinfarktes, besonders cTnI hat dabei eine beinahe absolute Spezifität für kardiales Gewebe. Die Troponinkonzentrationen im Blut steigen 3 Stunden nach Beginn eines Myokardinfarktes an, erreichen ihr Maximum nach 20 Stunden und können für einen Zeitraum von bis zu 2 Wochen nach dem Infarktgeschehen nachgewiesen werden (Silbernagel und Lang, 2013). Die Erhöhung dieser Marker im Serum ist das direkte Ergebnis der Depletion von Troponin in den Myozyten nach einem ischämischen Insult, was suggeriert, dass die Verringerung des Vorkommens von Troponin im myokardialen Gewebe durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen und auch als Werkzeug für die Identifikation frischer Myokardinfarkte genutzt werden kann. Sowohl Fallstudien, als auch Experimente am Tiermodell haben gezeigt dass die Depletion der Troponine im Gewebe tatsächlich immunhistochemisch in Fällen von frühen Myokardinfarkten nachgewiesen werden kann (Ortmann et al., 2000; Campobasso et al., 2008), Sabatasso et al., 2016).

Eine Übersicht über die einzelnen Marker, ihre Entstehung, ihr Vorkommen und ihr Verhalten bei kardialer Ischämie zeigt Tabelle 1.

Marker	Entstehung/Vorkommen	Verhalten bei kardialer Ischämie
Dityrosin	Produkt physiologischer posttranslationaler Prozesse, pathologisch gebildet bei oxidativem Stress	Bildung und Anreicherung von Dityrosin in betroffenem Gewebe ➤ Positivmarker
Connexin 43	Physiologisches Strukturprotein der Zellmembran	Dephosphorylierung und Verlagerung/Anreicherung im Zellinneren ➤ Positivmarker
Troponin I und T	Teile der Aktinfilamente im Herzmuskelgewebe	Durch Zellschädigung Freisetzung aus Myozyten ins Blut ➤ Negativmarker

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Marker und ihre Eigenschaften.

1.2 Geschlecht

Obwohl die zuvor genannten Marker bereits in verschiedenen Studien getestet wurden, ist es bis dato dennoch unklar, inwiefern ihr Nachweis in der Praxis durch bestimmte Faktoren beeinflusst werden könnte. Es konnte klinisch bereits gezeigt werden, dass das Auftreten und die Schwere eines

Myokardinfarktes von Faktoren wie unter anderem Geschlecht, oder einer bereits vorbestehenden, kardialen Erkrankung abhängen. So zeigt sich die Inzidenz von kardialen Erkrankungen im Allgemeinen geringer bei Frauen im Vergleich zu Männern (Isles et al., 1992). Das weibliche Herz scheint weniger anfällig für Apoptose, und auch im *remodeling* nach Infarktgeschehen scheint die Herzfunktion bei Frauen deutlich besser erhalten zu bleiben. Dies führt auch zu einer besseren Überlebensrate von Frauen im Vergleich zu Männern bei ischämischem Herzversagen (Dunlay und Roger, 2012). Guerra et al. (1999) zeigten ebenfalls, dass Nekrose sowie auch Apoptose in Fällen von Herzversagen im weiblichen Geschlecht deutlich reduziert waren. In mehreren Studien am Tiermodell demonstrierten Wang et al. (2010) und ebenso Patten et al. (2004), dass Herzen von weiblichen Mäusen weniger anfällig für Zelltod als Resultat von oxidativem Stress waren, welches einen kardioprotektiven Effekt des weiblichen Geschlechts suggeriert. Eine hormonelle Grundlage der Unterschiede der Geschlechter wird durch die Erkenntnis nahegelegt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen wesentlich weniger häufig vor der Menopause bei Frauen entstehen, dieser protektive Effekt aber nach Erreichen der Menopause verloren geht (Mendelsohn und Karas, 2010; Luczak und Leinwand, 2009). Eine besondere Rolle spielt hierbei das Hormon Östrogen, welches eine kardioprotektive Funktion zu übernehmen scheint, auch wenn ein genauer Mechanismus hier noch unklar ist (Wang et al., 2010; Patten et al., 2004; Luczak und Leinwand, 2009). Weiterhin wird postuliert, dass Testosteron sich ebenso auf die Herzfunktion auswirkt, hier jedoch negativ (Luczak und Leinwand, 2009).

1.3 Ischämische Präkonditionierung

Obgleich bekannt ist, dass es durch transiente Ischämien mit anschließender Reperfusion zu sogenannten Reperfusionsschäden kommen kann, existiert auch das Phänomen der sogenannten ischämischen

Präkonditionierung. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass die ischämische Präkonditionierung, also kurze Episoden von Ischämien und anschließender Reperfusion, einen schützenden Effekt vor darauffolgenden, längeren Perioden von Ischämien haben. Reperfusionsschäden kommen zustande durch mikrovaskuläre Schäden des Endothels, die initial durch die Ischämie entstehen, und bei darauffolgender Reoxygenierung verstärkt werden können (Carden und Granger, 2000). Die Studienlage weist darauf hin, dass durch kurze Episoden von Ischämien mit anschließender Reperfusion das Gewebe weniger anfällig für oxidativen Stress wird (Carden und Granger, 2000; Korthuis et al., 1998). Als ein wesentlicher Trigger des der ischämischen Präkonditionierung zugrundeliegenden Mechanismus wurde dabei schon sehr früh die Freisetzung von Adenosin und die darauffolgende kardiale A1-Rezeptorstimulation identifiziert (Liu et al., 1991; Downey et al., 1994). Weitere Mediatoren von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang außerdem Sympathikus Neurotransmitter, welche zu alpha 1-adrenerger Rezeptorstimulation führen (Banerjee et al., 1993), sowie Stickstoffmonoxid als Trigger (Lochner et al., 2002). Des Weiteren wurden auch freie Sauerstoffradikale als zusätzliche Auslöser der Präkonditionierungskaskade identifiziert (Tritto et al., 1997; Baines et al., 1997). Eine wichtige Rolle in der darauffolgenden Signalkaskade spielt die G-Protein-aktivierte Proteinkinase C, sowie die Tyrosinkinase, wie experimentelle Studien in der Vergangenheit zeigen konnten (Downey et al., 1994; Ytrehus et al., 1994; Maulik et al., 1998). Als End-Effektoren der ischämischen Präkonditionierung wurden schließlich vor allem mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle identifiziert, diese konnten in einer Studie von Gosh et al. (2000) selektiv antagonisiert bzw agonisiert werden und dadurch den Effekt einer ischämischen Präkonditionierung entweder aufheben oder herbeiführen. Der genau zugrundeliegende Mechanismus der Kardioprotektion ist letztlich aber noch unklar. Jedoch zeigen sich mitochondriale Schäden nach erfolgter ischämischer Präkonditionierung deutlich geringer als ohne (Lesnefsky et al., 2001).

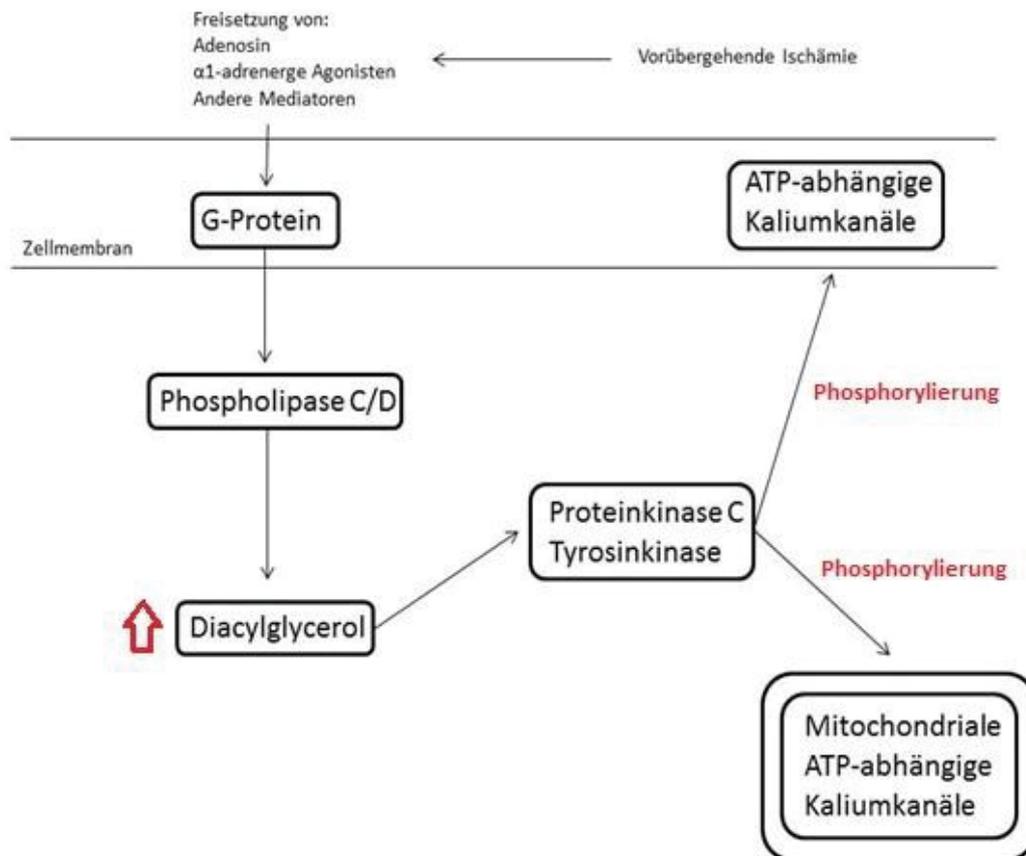


Bild 3: Schematische Darstellung der Mechanismen die vermutlich der akuten ischämischen Prädiktionierung unterliegen. Durch kurzzeitige Ischämie werden Mediatoren freigesetzt, die zur Aktivierung der G-Proteine führen. Diese aktivieren die Phospholipase C oder D, welche wiederum die intrazellulären Konzentrationen von Diacylglycerol (DAG) erhöhen. DAG aktiviert die Proteinkinase C und Tyrosinkinase. Dies führt zur Phosphorylierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen in der Zell- und Mitochondrialen Membran (modifiziert nach Carden und Granger, 2000).

In klinischen Studien an Patienten mit vorbekannter Prä-Infarkt Angina pectoris wurde festgestellt, dass dadurch entstandene ischämische Prädiktionierung für eine signifikante Reduktion der Infarktgröße verantwortlich sein kann, sowie einen protektiven Effekt auf die Funktion des linken Ventrikels hat (Reiter et al., 2013; Iwasaka et al., 1994). Eine Reihe von experimentellen Studien an verschiedensten Tiermodellen zur Überprüfung des Effektes von regionaler ischämischer Prädiktionierung konnten ebenfalls zeigen, dass Episoden von Ischämien mit anschließender Reperfusion einen protektiven Effekt auf das Myokard haben in Bezug auf die Schwere eines

darauffolgenden Myokardinfarktes (Ovize et al., 1992; Liu und Downey, 1992; Schott et al., 1990; Murry et al., 1986). Verschiedene Techniken der Induzierung von experimenteller regionaler Ischämie, sowie auch verschiedene Zeitrahmen die in diesen Tierstudien genutzt wurden, machen es schwierig, ein allgemeingültiges Protokoll für den protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung zu etablieren. Forschung zur globalen Ischämie deutet darauf hin, dass eine Periode globaler ischämischer Präkonditionierung von 15 bis 45 Minuten für eine erkennbare Reduktion der Infarktgröße verantwortlich sein kann (Jenkins et al., 1995).

1.4 Das Langendorff-Modell

Die Überprüfung möglicher Einflüsse auf Marker des akuten myokardialen Infarktgeschehens gestaltete sich in der forensischen Forschung bislang schwierig. Zu Forschungszwecken wurde in aller Regel postmortal entnommenes Gewebe genutzt. Damit einher geht häufig ein Mangel an Informationen betreffend Zeitpunkt und Dauer eines Infarktgeschehens, sowie möglicher anderer Einfluss- und Umgebungsfaktoren. Ein experimentelles Modell mit der Möglichkeit der Definition und Kontrolle potentieller Einflussparameter erscheint für die Gewinnung basaler grundlagenwissenschaftlicher Erkenntnisse deutlich geeigneter.

Das Langendorff-Modell bietet die Möglichkeit, ein direkt postmortal entnommenes Rattenherz für einen längeren Zeitraum, über Stunden, weiterhin überlebensfähig zu halten. Dadurch ist es im Rahmen dieser Arbeit möglich gewesen, bei der Induzierung eines Myokardinfarktes sowohl den Zeitpunkt, als auch die „Überlebensdauer“ genau zu dokumentieren und zu steuern. Ebenso konnten mögliche Einflüsse wie die ischämische Präkonditionierung kontrolliert herbeigeführt und so ihr Effekt untersucht werden (Bell et al., 2011).

1.5 Ziele der Arbeit

In Anbetracht der bisherigen Studienlage ist es von größter Bedeutung für die postmortale Diagnostik von Myokardinfarkten, ob das Verhalten von bereits etablierten bzw. aktuell in der Forschung getesteten, immunhistochemischen Markern durch Geschlecht und/oder ischämischer Präkonditionierung beeinflusst wird. Sollte dies der Fall sein, würde sowohl die Wahl der Marker, als auch die Interpretation der diagnostischen Befunde unter Berücksichtigung dieser möglichen Einflussgrößen, also in jedem Einzelfall mit Blick auf die einschlägigen, wichtigen Anknüpfungspunkte erfolgen müssen. Durch Experimente an Rattenherzen (ZETT Projekt Nummer O 27/12) unter Anwendung der Langendorff Technik wurden in dieser Arbeit der Einfluss von Geschlecht und einer myokardialen ischämischen Präkonditionierung auf das Auftreten bzw. die Depletion von immunhistochemischen Markern des Myokardinfarktes getestet. Die Ziele dieser Arbeit sind wie folgt formuliert:

- Hat das Geschlecht einen Einfluss auf das Auftreten bzw. die Depletion von immunhistochemischen Markern des akuten Myokardinfarktes?
- Hat die myokardiale ischämische Präkonditionierung einen Effekt auf das Auftreten bzw. die Depletion von immunhistochemischen Markern des akuten Myokardinfarktes?

2 Publikation

The impact of sex and myocardial ischemic preconditioning on immunohistochemical markers of acute myocardial infarction

Kassra Scholl, Ragnar Huhn, Stefanie Ritz-Timme, Felix Mayer, Institute of Legal Medicine, University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

International Journal of Legal Medicine, 133(2), 529-538

DOI: 10.1007/s00414-018-1948-8



The impact of sex and myocardial ischemic preconditioning on immunohistochemical markers of acute myocardial infarction

K. Scholl^{1,2} · R. Huhn³ · St. Ritz-Timme¹ · F. Mayer¹ Received: 4 May 2018 / Accepted: 10 October 2018 / Published online: 23 October 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The immunohistochemical detection of dityrosine, troponins I (cTnI) and T (cTnT), and connexin 43 has been proposed as a tool for the diagnosis of myocardial infarction with short survival times. Results of clinical and experimental studies reveal that gender and/or ischemic preconditioning of the heart may have an influence on severity and magnitude of myocardial infarction. To clarify the question, if the above-mentioned markers are influenced by sex or ischemic preconditioning, experiments on isolated rat hearts using the Langendorff technique were performed. Using the hearts of 12 male and 12 female Wistar rats a local ischemia was induced through ligation of the left coronary artery. Furthermore, 12 male rat hearts underwent ischemic preconditioning of the heart by stopping the perfusion of the whole heart for 30 min and subsequently reperfusing the heart for another 60 min, before inducing local ischemia. The perfusion time after ligation varied from 10 to 60 min. A control group was comprised out of 6 male and 2 female rat hearts. These were placed in the Langendorff system for 60 min without further manipulation or received ischemic preconditioning without subsequent local ischemia or were excised without being mounted on the Langendorff system at all. All hearts were fixed in formalin and stained immunohistochemically. Depletion of the marker cTnT appeared to be less in females when compared to male hearts, for all other markers tested, no apparent difference in staining results were seen when comparing male and female rat hearts. Male rat hearts with ischemic preconditioning showed no difference compared to male rat hearts without ischemic preconditioning when stained for dityrosine. Connexin 43 staining was less pronounced in hearts with ischemic preconditioning, whereas cTnI as well as cTnT depletion was more pronounced in preconditioned hearts. The presented findings indicate to some extent the vulnerability of the investigated markers for the influencing factors tested.

Keywords Myocardial infarction · Sex · Ischemic preconditioning · Immunohistochemistry · Animal model

Introduction

The post-mortem diagnosis of an acute myocardial ischemia with only a short survival time may be difficult since morphological findings might not be detectable by autopsy and conventional histological methods in the early interval after ischemia. Certain immunohistochemical markers have been established that have been shown to either appear or be depleted within the affected area. One marker recently tested for the post-

mortem detection of early myocardial ischemia is dityrosine [1, 2]. Immunohistochemical staining of dityrosine has been shown to be positive in nearly all examined cases of myocardial infarction aged 4 h to 2 weeks [1]. In an experimental model using rat hearts, dityrosine appeared only minutes after ischemia [2]. Troponins T (cTnT) and I (cTnI) are widely used as diagnostic markers of myocardial infarction in clinical medicine, therefore suggesting their validity as immunohistochemical markers of early cardiac ischemia [3]. The gap junctional protein connexin 43 (Cx43) in its dephosphorylated form has also recently been tested as a marker for early ischemia [4].

Sex and ischemic preconditioning are known to have an impact on severity and development of an acute myocardial infarction. The incidence of cardiac diseases in general is lower in women when compared to men [5]. Guerra et al. [6] found that necrosis as well as apoptosis in cases of heart failure were markedly reduced in females. In a study using a model of mice, Wang et al. [7] have demonstrated that female

✉ F. Mayer
felix.mayer@med.uni-duesseldorf.de

¹ Institute for Legal Medicine, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

² Hospital Emmental, Dorfbergstr. 10, 3550 Langnau i.E., Switzerland

³ Department of Anaesthesiology, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

hearts are less susceptible to cell death as a result of oxidative stress, which suggests a cardioprotective effect of the female sex. A study by Bae and Zhang [8] using the Langendorff technique found that female rat hearts regained a better left ventricular function and had a reduced infarction size when compared to male rat hearts.

Ischemic preconditioning consists of short episodes of transient ischemia, applied to the heart either locally or globally, which may protect the heart from subsequent ischemic insults. According to the results of clinical studies involving patients with known pre-infarction angina, ischemic preconditioning may account for significant reduction of infarction size and protection of left ventricular function [9, 10]. A number of experimental studies on various animal models testing the effect of regionally applied ischemia (i.e. the occlusion of single coronary arteries) revealed that these episodes tend to have a protective effect on the myocardium in relation to the severity of myocardial infarction [11–14]. Global ischemia, meaning a depletion of oxygen applied to the whole heart rather than a single region, showed to be effective for protection from myocardial infarction when applied for 15 to 45 min [15, 16]. It has been shown that preconditioning only provides protection for myocardial tissue within a certain window of time. Initially, the heart is protected for 2 h, then followed by a so-called second window of protection 24 h after preconditioning [17, 18].

Considering these findings, it is of utmost interest for post-mortem diagnostics to know whether the detectability of immunohistochemical markers is influenced by sex or ischemic preconditioning. If this would be the case, the choice of markers, as well as the interpretation of diagnostic findings would have to ensue with due consideration of the respective indications in each individual case. This means that the sex of the deceased person and a possible history of angina pectoris would have to be taken into account when performing immunohistochemical examinations with a view to a possibly lethal myocardial infarction.

On the basis of experiments on rat hearts with the Langendorff technique [19], we therefore addressed the following questions:

1. Does sex have an impact on the detectability of immunohistochemical markers of early myocardial ischemia?
2. Does global ischemic preconditioning of the myocardium have an effect on the appearance of immunohistochemical markers of early myocardial ischemia?

Materials and methods

The experiments in this study were conducted in accordance with the German legislation on protection of animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published

by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol for the Langendorff experiments was approved by the local Animal Ethics Committee (Project No. O 27/11). The project was designed as an observational study and its results are mainly meant as a proof of principle regarding the key questions.

Isolated Langendorff heart

Hearts from male and female Wistar rats were used in this study, ranging from 226 to 308 g in weight. The same protocol for isolated Langendorff hearts as described in the study by Mayer et al. [2] was used for this experiment.

Study group

Impact of sex

In 12 male and 12 female rat hearts, local ischemia without reperfusion was induced by ligation of the left coronary artery (LAD). Electrocardiogram-alterations (ECG) as well as changes in colour of the myocardium (pallor) and a decrease in coronary flow (CF) were documented as an indicator of infarction/ischemia. The defined times after ligation varied from 10 to 60 min, after which the heart was removed from the Langendorff system and fixed in formalin.

Impact of preconditioning

In 12 male rat hearts, myocardial infarction after ischemic preconditioning was induced. Ischemic preconditioning was achieved by stopping the perfusion of the whole heart for 30 min, then reperusing the heart for another 60 min, before ligation of the LAD was performed. The time after ligation varied from 10 to 60 min.

Control group

Six male rat hearts and two female rat hearts served as a control group. Two male rat hearts and one female rat heart were mounted on the Langendorff system without any manipulation and removed after 60 min and subsequently fixed in formalin. Two male rat hearts and one female rat heart were excised and directly fixed in formalin. Two male rat hearts received ischemic preconditioning without subsequent ligation of the LAD.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed tissue sample sections were deparaffinised and washed first in distilled water three times for 5 min, then in Tris-buffered saline (TBS) buffer with 0.5% Tween 20 twice for 5 min.

Dityrosine The primary monoclonal antibody against dityrosine (Acris, mouse, AM20243PU-S) was applied in a 1:600 dilution to the sections and the slides left to incubate over night at 4 °C. The slides were then washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 twice for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked using 0.03% H₂O₂ for 10–15 min, the slides were subsequently washed in distilled water twice for 5 min and TBS buffer with 0.5% Tween 20, also twice for 5 minutes. Afterwards, the slides were left to incubate with peroxidase-marked polymer (Medac, Histofine Simple Stain MAX PO against mouse, 414 132) for 30 min.

Troponin T The primary monoclonal antibody to troponin T (Biorbyt, mouse, orb-89032) was applied in a 1:75 dilution to the sections. The slides were treated equally to the staining protocol of dityrosine.

Troponin I The primary monoclonal antibody to troponin I (Novus, mouse, N3100-91537) was applied in a 1:200 dilution to the sections. The slides were treated equally to the staining protocol of dityrosine.

Connexin 43 The primary polyclonal antibody to dephosphorylated connexin 43 (Biorbyt, rabbit, orb-193245) was applied in a 1:100 dilution to the sections. The slides were treated equally to the staining protocol of dityrosine. The slides were incubated with peroxidase-marked polymer (Medac, Histofine, 414 142) for 30 min.

All slides were washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 twice for 5 min before being stained using substrate-chromogen AEC (Dako, AEC+ (3-amino-9ethylcarbazole) substrate Chromogen) and then washed with distilled water for 5 min. Subsequently, the slides were counterstained using Mayers Hematoxylin (Merck, Mayers hemalum solution, 1.09249.2500) and washed with distilled water for 5 min. Sections were ultimately covered with Aquatex® (Merck, 1.08562.0050).

Evaluation

Evaluation of immunohistochemical staining was conducted using a semi-quantitative classification system as previously established by Mayer et al. [1, 2] for the staining of *dityrosine*:

- o No positive staining
- x Positive staining of single cells
- xx Positive staining of groups of cells
- xxx Positive staining of cells in large tissue areas

For the evaluation of *connexin 43*, the classification system was adapted as follows:

- o No positive staining
- x Positive staining located in the intercalated discs only

- xx Lateralisation of staining to cell membranes and positive staining of intracellular space of single cells
- xxx Positive intracellular staining of cells in large tissue areas

For the evaluation of troponins I and T, the classification system was adapted as follows:

- o No depletion
- x Depletion of single cells
- xx Depletion of cells in large tissue areas
- xxx Depletion of the majority of tissue

Results

Study group

Positive results in this study were defined as staining/loss of staining deep in the myocardium of the left chamber as well as the septum, being the area of supply affected by ligation of the LAD. Staining in the subepicardial regions and the myocardium of the right chamber is most likely due to artefacts and not a consequence of the interruption of the blood/buffer flow, as it has been shown before [2], and was therefore not taken into account.

Table 1 summarises the staining results of male hearts with an early myocardial ischemia (nos. 1–12); Table 2 gives an overview of the staining results of female hearts with an early myocardial ischemia (nos. 13–24). Comparing the results of both sexes leads to the following findings, examples are also shown in Fig. 1:

- Positive staining results for dityrosine were detected in all cases, with no apparent difference in male or female hearts.
- Staining for Cx43 was positive in all but two cases of male rat hearts, one with a time after ligation of 10 min and one with a time after ligation of 20 min. Otherwise, no differences were seen with a view to sex. However, Cx43 showed considerable difference in occurrence and pattern depending on the times after ligation.
- Depletion of cTnI and cTnT was found in all cases, whereas the depletion of cTnT seemed more pronounced in male hearts.

Table 3 summarises the staining results of male rat hearts with global ischemic preconditioning and early myocardial ischemia (nos. 25–36). Dityrosine staining results showed no apparent difference when compared to male rat hearts without ischemic preconditioning (see Table 1). Staining of Cx43 appeared to be less pronounced in hearts with ischemic preconditioning. Overall, three cases showed negative staining for Cx43,

Table 1 Staining results of study hearts of male rats with early ischemia/myocardial infarction using the following evaluation system: Dityrosine: o, no positive staining; x, positive staining of single cells; xx, positive staining of groups of cells; xxx, positive staining of cells in large tissue areas. Connexin 43: o, no positive staining; x, positive staining located in the intercalated discs only; xx, lateralisation of staining to

cell membranes and positive staining of intracellular space of single cells; xxx, positive intracellular staining of cells in large tissue areas. Troponins I and T: o, no depletion; x, depletion of single cells; xx, depletion of cells in large tissue areas; xxx, depletion of the majority of tissue. Signs of infarction including pallor of myocardium, typical electrocardiogram (ECG)-alterations and decrease of cardiac flow (CF)

No.	Time after ligation	Signs of infarction	Dityrosine	Cx43	cTnI	cTnT
1	10	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	o	xxx	x
2	10	Pallor, decrease of CF	xx	x	xx	xxx
3	20	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	x	x	xx	xx
4	20	Pallor, decrease of CF	xxx	xx	xxx	xx
5	30	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	x	xx	xx
6	30	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	x	x	xx	x
7	40	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xx	xx	xx
8	40	Pallor, decrease of CF	xxx	xx	xxx	xx
9	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xx	xx	xx
10	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	x	o	xx	xx
11	60	Pallor, decrease of CF	xxx	xx	xx	xx
12	60	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xx	xx	xx

with times after ligation of 10 and 20 min, respectively. Both troponins showed to be more widely depleted if the hearts received ischemic preconditioning. Representative pictures of these findings are shown in Fig. 2.

Control group

Table 4 presents an overview of the staining results for the controls:

- Whereas dityrosine did not stain positive in the control hearts of male as well as female hearts that were mounted on the Langendorff system without manipulation, it showed intense positive staining when the hearts were excised and directly fixed in formalin, the very distinct pattern resembling the one already described by Mayer et al. [2]. The control hearts having received ischemic preconditioning with no other manipulation also stained positive.

Table 2 Staining results of study hearts of female rats with early ischemia/myocardial infarction using the following evaluation system: Dityrosine: o, no positive staining; x, positive staining of single cells; xx, positive staining of groups of cells; xxx, positive staining of cells in large tissue areas. Connexin 43: o, no positive staining; x, positive staining located in the intercalated discs only; xx, lateralisation of staining to

cell membranes and positive staining of intracellular space of single cells; xxx, positive intracellular staining of cells in large tissue areas. Troponins I and T: o, no depletion; x, depletion of single cells; xx, depletion of cells in large tissue areas; xxx, depletion of the majority of tissue. Signs of infarction including pallor of myocardium, typical electrocardiogram (ECG)-alterations and decrease of cardiac flow (CF).

No.	Time after ligation	Signs of infarction	Dityrosine	Cx43	cTnI	cTnT
13	10	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	x	xx	xx	x
14	10	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xx	x	xx	xxx
15	20	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	x	xxx	x
16	20	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	x	xxx	xx	x
17	30	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xxx	xx	x
18	30	Pallor, ECG-alterations	xxx	xxx	xx	x
19	40	Pallor, decrease of CF	xxx	xx	xxx	xxx
20	40	Pallor, ECG-alterations	xxx	o	xxx	xx
21	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xxx	xx	x
22	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xxx	xxx	xx
23	60	Pallor, decrease of CF	x	x	xxx	xx
24	60	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xxx	xx	xx

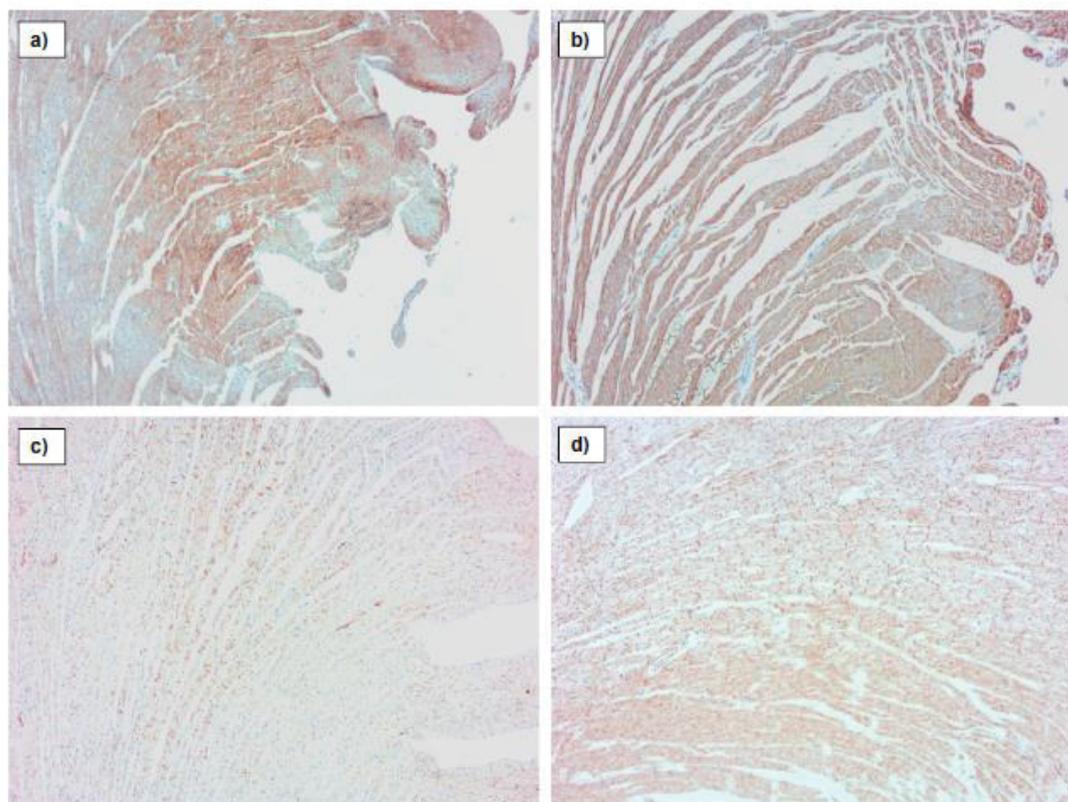


Fig. 1 Examples for staining results of study hearts from male and female rats, 100-fold magnification. Sex-related staining differences of cTnT: **a** no. 10, male, time after ligation 50 min; **b** no. 21, female, time after

ligation 50 min. Staining differences of Cx43 depending on time after ligation: **c** no. 14, female, time after ligation 10 min; **d** no. 24, female, time after ligation 60 min

- Cx43 showed positive staining in three cases, one of which being a male rat heart fixed in formalin directly after

excision, whereas a second male rat heart fixed in formalin directly after excision showed no positive staining.

Table 3 Staining results of study hearts of male rats with ischaemic preconditioning and early ischemia/myocardial infarction using the following evaluation system: Dityrosine: o, no positive staining; x, positive staining of single cells; xx, positive staining of groups of cells; xxx, positive staining of cells in large tissue areas. Connexin 43: o, no positive staining; x, positive staining located in the intercalated discs only; xx, lateralisation of staining to cell membranes and positive staining of

intracellular space of single cells; xxx, positive intracellular staining of cells in large tissue areas. Troponins I and T: o, no depletion; x, depletion of single cells; xx, depletion of cells in large tissue areas; xxx, depletion of the majority of tissue. Signs of infarction including pallor of myocardium, typical electrocardiogram (ECG)-alterations and decrease of cardiac flow (CF)

No.	Time after ligation	Signs of infarction	Dityrosine	Cx43	cTnI	cTnT
25	10	Pallor	xx	x	xxx	xx
26	10	Pallor, decrease of CF	x	o	xxx	xx
27	20	Pallor, decrease of CF	x	o	xxx	xxx
28	20	Pallor, decrease of CF	x	o	xx	xxx
29	30	Pallor, decrease of CF	xx	xx	xx	xxx
30	30	Pallor	xx	o	xxx	xxx
31	40	Pallor, decrease of CF	xxx	x	xxx	xxx
32	40	Pallor, decrease of CF	xxx	xx	xxx	xxx
33	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xxx	xx	xxx	xxx
34	50	Pallor, ECG-alterations, decrease of CF	xx	o	xxx	xxx
35	60	Pallor, decrease of CF	xxx	o	xxx	xxx
36	60	Pallor, decrease of CF	xxx	x	xxx	xxx

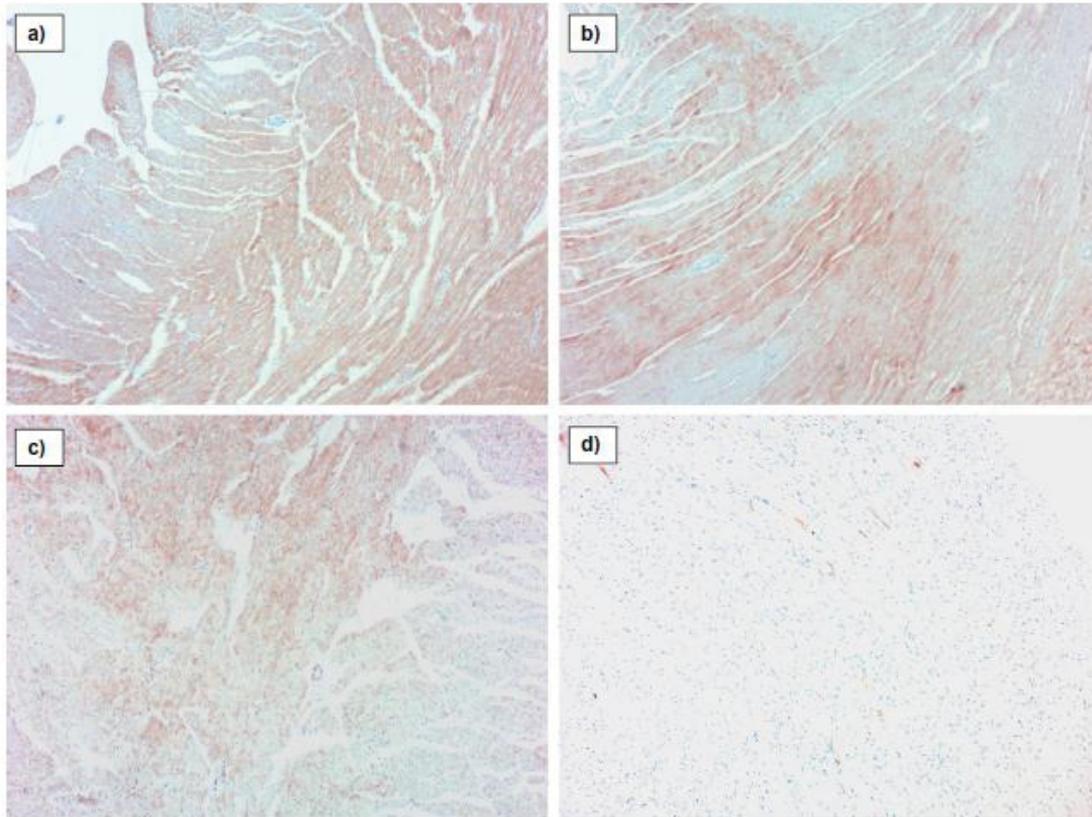


Fig. 2 Examples of staining results depending on ischemic preconditioning, 100-fold magnification: **a** no. 6, male, without ischemic preconditioning, time after ligation 30 min, cTnT; **b** no. 30, male, with

ischemic preconditioning, time after ligation 30 min, cTnT; **c** no. 9, male, without ischemic preconditioning, time after ligation 50 min, Cx43; **d** no. 34, male, with ischemic preconditioning, time after ligation 50 min, Cx43

- The staining for cTnT showed depletion in all control hearts. All but one control case showed largely no staining for cTnI. Even after a second repetition of the staining, cTnI could not be detected at all in the examined tissue.

Only in one male heart which was subjected to ischemic preconditioning did cTnI show a staining result.

Table 4 Staining results of control hearts without early ischemia/myocardial infarction using the following evaluation system: Dityrosine: o, no positive staining; x, positive staining of single cells; xx, positive staining of groups of cells; xxx, positive staining of cells in large tissue areas. Connexin 43: o, no positive staining; x, positive

staining located in the intercalated discs only; xx, lateralisation of staining to cell membranes and positive staining of intracellular space of single cells; xxx, positive intracellular staining of cells in large tissue areas. Troponins I and T: o, no depletion; x, depletion of single cells; xx, depletion of cells in large tissue areas; xxx, depletion of the majority of tissue

No.	Description	Dityrosine	Cx43	cTnI	cTnT
c1	Male heart, mounted on Langendorff system without manipulation for 60 min.	o	o	–	xx
c2	Male heart, mounted on Langendorff system without manipulation for 60 min.	o	o	–	xxx
c3	Female heart, mounted on Langendorff system without manipulation for 60 min.	o	x	–	xx
c4	Male heart, fixed in formalin directly after excision	xxx	o	–	xx
c5	Male heart, fixed in formalin directly after excision	xxx	xx	–	xx
c6	Female heart, fixed in formalin directly after excision	xx	o	–	xx
c7	Male heart, mounted on Langendorff system and received ischaemic preconditioning protocol	xx	x	–	xx
c8	Male heart, mounted on Langendorff system and received ischaemic preconditioning protocol	xxx	o	xxx	x

Typical examples for the staining results can be found in Fig. 3.

Discussion

Previous studies revealed that dityrosine, as well as cTnI and cTnT can be used as immunohistochemical markers for early myocardial ischemia [1–4]. The use of Cx43 has not been thoroughly investigated so far, but first results are promising [4]. Though the impact of sex and ischemic preconditioning on the severity and outcome of myocardial infarction has already been described, there are no studies regarding the impact of sex and ischemic preconditioning on the immunohistochemical markers for the diagnosis of early myocardial ischemia so far. Whereas studies based on human cases will suffer from the lack of clinical information, standardised experiments are possible with the isolated Langendorff heart model.

Ischemic preconditioning in the animal model

With the Langendorff-system, global ischemia as well as localised ischemic events of a defined time can be generated

and later evaluated with regard to immunohistochemical staining of the markers mentioned above. One difficulty of establishing ischemic preconditioning in the animal model is the variety of protocols for such. Research on global ischemia suggests that periods of 15 to 45 min of global ischemic preconditioning account for a visible reduction in infarction size [15, 16]. Ischemic intervals of 2 to 15 min have been used before in canine, pig, and rabbit models to achieve the effect of myocardial preconditioning [13, 14, 20–22]. Ischemic preconditioning in rat hearts was achieved by Liu and Downey [12] by inducing three serial 5-min coronary arterial occlusions, establishing that the threshold for protection in rat hearts is above a single 5-min occlusion. However, this protocol employed left main coronary occlusion, rather than introducing a global ischemia to the heart. We decided to employ a protocol of global ischemia of one interval of 30 min to achieve a maximum effect of pre-infarction ischemia, so as to make sure that the global ischemia lasted long enough to potentially elicit the markers we tested. Considering that the first window of protection after classical ischemic preconditioning is defined as 2 h [17, 18], we decided on a reperfusion time of 60 min to allow for sufficient functional recovery before LAD occlusion took place. The duration of LAD

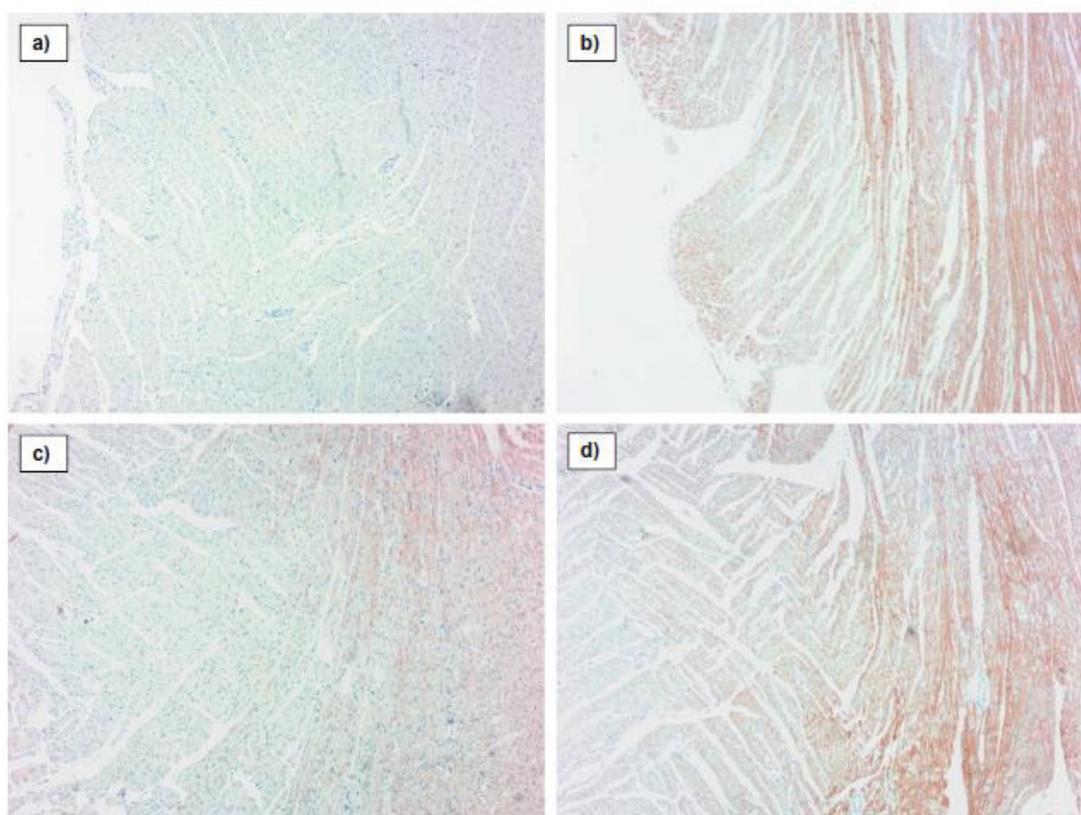


Fig. 3 Examples for staining results of control hearts compared to study hearts, 100-fold magnification: **a** no. c1, male, 60 min in Langendorff system without manipulation, cTnI; **b** no. 11, male, time after ligation

60 min, cTnI; **c** no. c2, male, 60 min in Langendorff system without manipulation, cTnT; **d** no. 12, male, time after ligation 60 min, cTnT

occlusion varied between 10 and 60 min, therefore well within the time frame of a 2-h protection period after ischemic preconditioning took place.

When considering a protective effect of ischemic preconditioning, it needs to be taken into account that a difference exists between acute preconditioning and delayed preconditioning. In terms of the classical or acute preconditioning, it is important for the preconditioning and a subsequent ischemia to take place less than approximately 2 h apart, or the effect of protection through preconditioning will be lost [17, 18]. Another, so-called second window of protection occurs 24 h after preconditioning [17, 18]. In the experimental animal model, these time frames can be easily adapted and applied to achieve a protective effect. However, the resulting implications are that in routine case work, where the time interval between transient global ischaemia and myocardial infarction cannot be safely established, markers that appear to be sensitive to the protective effect of ischemic preconditioning might only be reliable to a certain extent.

The impact of sex and ischemic preconditioning on the detection of the markers dityrosine, Cx43, and troponins T and I

As a protein product occurring only after an event of oxidative stress, previous research has established that dityrosine can be considered a selective marker for tissue damage [23]. No differences in the intensity or the staining pattern of dityrosine were detected when comparing hearts of both sexes, or hearts with ischemic preconditioning.

In myocardial ischemia, Cx43 undergoes progressive dephosphorylation with dephosphorylated Cx43 being primarily located in the intercalated discs. With ongoing ischemia, dephosphorylated Cx43 accumulates and translocates into intracellular pools [24]. Sabatasso et al. [4] described an expression of dephosphorylated Cx43 after 15 min of ischemia, with the accumulation of dephosphorylated Cx43 becoming more pronounced with increased duration of ischemia. In the current study, dephosphorylated Cx43 staining was positive as early as 10 min after the occurrence of ischemia, starting with localised staining mostly in the intercalated discs, and becoming more pronounced with longer survival times. This marker, just like dityrosine, exhibited no significant difference when comparing male and female hearts. However, the occurrence of dephosphorylated Cx43 was less pronounced when hearts had received ischemic preconditioning. One possible explanation for these findings might be a cardioprotective effect of preconditioning, which has been shown to reduce the severity of myocardial infarction in experimental settings [11–14]. Preconditioning reduces necrosis as well as apoptosis [16]. This finding suggests that the products of cell damage such as dephosphorylated Cx43 may also be reduced when infarction occurs after a preconditioning situation. An experimental

study on the rat heart *in vivo* was also able to show that remote ischemic preconditioning decreased the level of ischemia-induced dephosphorylation of Cx43 [25], supporting the assumption that ischemic preconditioning as such has an inhibiting effect on the occurrence of dephosphorylated Cx43 in myocardial tissue.

cTnT and cTnI have previously shown to be sensitive immunohistochemical markers of cardiac ischemia of several hours [3, 26]. Furthermore, cTnT and cTnI were visibly depleted after 1 h of ischemia in an experimental setting using rat hearts [4]. A study using post-mortem pericardial fluid as well as serum revealed a correlation between the presence of cTnI and previous myocardial infarction, which indicated a detectable depletion of cTnI from cardiac tissue [27]. In the current study, cTnT was depleted as early as 10 min after ligation, in both male and female hearts. When looking at hearts with ischemic preconditioning, the depletion of cTnT was more pronounced in comparison to hearts without preconditioning, whereas both troponins seemed to be somewhat less depleted in female hearts when compared to males. However, the overall depletion of both troponins was relatively pronounced, which makes it difficult to capture the described differences. All control hearts that only underwent ischemic preconditioning and no subsequent myocardial infarction also showed depletion of cTnT. A more pronounced depletion of cTnT in myocardial tissue which has been exposed to ischemic preconditioning is what might be expected, considering that serum troponin elevation is a common diagnostic marker for ischemic heart conditions. In this study, also mounting the hearts on the Langendorff system and leaving them there for 60 min without any manipulation led to a depletion of cTnT. The results of staining for cTnI in the study groups were overall similar to those obtained by cTnT. However, when looking at the controls, most of the hearts tested presented no staining at all for cTnI. Since the identical hearts showed staining results when using the other three markers, we do not suspect an underlying inadequacy of the Langendorff experiment or the staining protocol; even more, since we repeated the staining procedure with new tissue sections and new antibodies. Still the control hearts in question showed absolutely no staining at all while tissue sections from other hearts presented convincing staining results. The marker cTnI may have been affected by such circumstances as the fixation in formalin. A study by Kobayashi et al. [28] for example showed that myoglobin, which also serves for a marker of myocardial infarction, may appear depleted due to exudation of myoglobin during formalin fixation. This may also hold true for other immunohistochemical markers. However, this is just an explanation attempt because one might raise the objection that in this case similar staining results for cTnI in the study groups had to be expected as well, because all hearts we examined were fixed in formalin for a period of time before being stained. But since cTnI exhibited very promising results in the study groups and a

methodological error had been excluded, we cannot explain why a large part of the control group yielded no positive staining at all. Although these findings are puzzling, we think it is important to present them in this context because they call for further investigation and should be taken into account when using cTnI as an immunohistochemical marker for research on early myocardial ischemia. In general, considering the very pronounced depletion of both troponins even when looking at the control group, both markers appear to be too sensitive to any myocardial damage for their use as markers of early myocardial ischemia in a daily routine.

Conclusion

According to the presented results of experimental data, sex does not have a relevant impact on the detection of the investigated markers, only troponins seem to be (slightly) affected by it. In contrast, effects of ischemic preconditioning on pattern and occurrence of an immunohistochemical marker were evident at least for the markers Cx43, cTnI, and cTnT. Troponins were markedly depleted even in controls with ischemic preconditioning only (and no subsequent myocardial infarction). If this finding from the animal model can be transferred into human cases, it would implicate that a lethal infarction cannot be clearly separated from a non-lethal period of ischemia by the immunohistochemical detection of troponins. Dephosphorylation of Cx43, on the other hand, might be inhibited by non-lethal ischemic events and the detectability of dephosphorylated Cx43 after a following infarction markedly reduced. This is in line with clinical data revealing a protective effect of ischemic preconditioning [9, 10]. The findings of this study—though collected with a limited number of cases and in an animal model—strongly suggest that some of the markers investigated are indeed sensitive for influences such as ischemic preconditioning. This has to be taken into account when further experimentally evaluating the tested markers for a use in everyday routine.

Compliance with ethical standards

The experiments in this study were conducted in accordance with the German legislation on protection of animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol for the Langendorff experiments was approved by the local Animal Ethics Committee (Project No. O 27/11).

References

- Mayer F, Propper S, Ritz-Timme S (2014) Dityrosine, a protein product of oxidative stress, as a possible marker of acute myocardial infarctions. *Int J Legal Med* 128(5):787–794
- Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S (2016) Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. *Int J Legal Med* 130:1053–1060
- Campobasso CP, Dell'Erba AS, Addante A, Zotti F, Marzullo A, Colonna MF (2008) Sudden cardiac death and myocardial ischemia indicators: a comparative study of four immunohistochemical markers. *Am J Forensic Med Pathol* 29:154–161
- Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T, Moretti M, Docquier M, Djonov V (2016) Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. *Int J Legal Med* 130:1265–1280
- Isles CG, Hole DJ, Hawthorne VM, Lever AF (1992) Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey—comparison with men. *Lancet* 339:702–706
- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA et al (1999) Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res* 85(9):856–866
- Wang F, He Q, Sun Y, Dai X, Yang XP (2010) Female adult mouse cardiomyocytes are protected against oxidative stress. *Hypertension* 55(5):1172–1178
- Bae S, Zhang L (2005) Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 315(3):1125–1135
- Reiter R, Henry TD, Traverse JH (2013) Preinfarction angina reduces infarct size in ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Circ Cardiovasc Interv* 6(1):52–58
- Iwasaka T, Nakamura S, Karakawa M, Sugiura T, Inada M (1994) Cardioprotective effect of unstable angina prior to acute anterior myocardial infarction. *Chest* 105(1):57–61
- Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K (1992) Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation* 85(2):779–789
- Liu YG, Downey JM (1992) Ischemic preconditioning protects against infarction in rat-heart. *Am J Physiol* 263(4):H1107–H1111
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W (1990) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66(4):1133–1142
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124–1136
- Jenkins DP, Pugsley WB, Yellon DM (1995) Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: infarct size limitation, but no reduction of stunning. *J Mol Cell Cardiol* 27(8):1623–1632
- Efstathiou A, Seraskeris S, Papakonstantinou C, Aidonopoulos A, Lazou A (2001) Differential effect of preconditioning on post-ischaemic myocardial performance in the absence of substantial infarction and in extensively infarcted rat hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* 19:493–499
- Korthuis RJ, Gute DC, Cepinska G, Kvietsy PR (1998) Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 5:35–48
- Carden DL, Granger DN (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 200 190:255–266
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50:940–950
- Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR (1990) Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 82:609–619
- Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA (1991) Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 260(29):H796–H804

22. Miura T, Noto T, Adachi T, Endoh A, Goto M, Urabe K, Iimura O (1991) Does myocardial stunning contribute to infarct limitation by preconditioning? *Circulation* 84(6):2504–2512
23. Giulivi C, Traaseth NJ, Davies KJ (2003) Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids* 25(3–4):227–232
24. Beardslee MA, Lemer DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber ÁG, Schuessler RB, Saffitz JE (2000) Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by Ischaemia. *Circ Res* 87:656–662
25. Brandenburger T, Huhn R, Galas A, Pannen BH, Keitel V, Barthel F, Bauer I, Heinen A (2014) Remote ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *J Transl Med* 12(28):228
26. Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B (2000) A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med* 113:215–220
27. Osuna E, Pérez-Cárceles MD, Alvarez MV, Noguera J, Luna A (1998) Cardiac troponin I (cTn I) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Int J Legal Med* 111:173–176
28. Kobayashi C, Miura M, Miyaishi S (2017) Postmortem exudation of myoglobin from striated muscle during formalin fixation (abstract). *Rechtsmedizin* 27:311–404

Effekten einer Arrhythmie auf die untersuchten Marker

In die unter Kapitel 2 angeführte Publikation ging nur ein Teil der erhobenen Daten ein. An einigen wenigen Herzen wurde orientierend geprüft, ob provozierte Arrhythmien einen Effekt auf die untersuchten Marker haben können. Die in der Publikation nicht erwähnten Daten werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.1 Methode

Die Experimente wurden wie auch in der Publikation von Scholl et al. (2018) beschrieben entsprechend des Langendorff-Protokolls aus der Studie von Mayer et al. (2016) durchgeführt.

Um das Verhalten der in dieser Arbeit untersuchten immunhistochemischen Marker bei Auftreten einer Arrhythmie zu erfassen, wurden folgende weitere Experimente durchgeführt:

- Zwei männlichen und zwei weiblichen Rattenherzen wurden in der Langendorff-Anlage zwischen 1 und 3 Elektroschocks von 26V mit einer Frequenz von 20ms⁻¹ zugefügt
- Zwei Herzen männlicher Ratten wurden außerdem zuerst einer globalen ischämischen Präkonditionierung unterzogen und wurden anschließend 1 bis 3 Elektroschocks von 26V mit einer Frequenz von 20ms⁻¹ ausgesetzt.

Alle mit Elektroschock behandelten Herzen verblieben nach dem letzten Schock noch weitere 30 Minuten an der Langendorff-Anlage um einen normokarden Sinusrhythmus wiederherzustellen, bevor sie in Formalin fixiert wurden. Die

weitere Bearbeitung der Proben, sowie die Färbung erfolgten wie bei Scholl et al. (2018) beschrieben.

3.2 Resultate

In Tabelle 2 werden die Resultate dieser Experimente zusammengefasst.

Nr.	Beschreibung	Färbung Dityrosin	Färbung Cx43	Färbung cTnl	Färbung cTnT
c9	Herz männlicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert und mit Elektroschocks behandelt	o	o	xxx	xxx
c10	Herz männlicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert und mit Elektroschocks behandelt	xx	x	-	xx
c11	Herz weiblicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert und mit Elektroschocks behandelt	xx	x	xx	xxx
c12	Herz weiblicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert und mit Elektroschocks behandelt	xx	x	-	xxx
c13	Herz männlicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert, globaler ischämischer Präkonditionierung unterzogen und mit Elektroschocks behandelt	xx	x	xxx	xx
c14	Herz männlicher Ratte, in der Langendorff-Anlage perfundiert, globaler ischämischer Präkonditionierung unterzogen und mit Elektroschocks behandelt	xx	o	-	xx

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchung von Herzen männlicher und weiblicher Ratten, die mit Elektroschocks behandelt wurden: *Dityrosin*: o – keine positive Färbung, x – positive Färbung von einzelnen Zellen, xx – positive Färbung von Gruppen von Zellen, xxx – positive Färbung von Zellen in großflächigen Gewebefeldern. *Cx43*: o – keine positive Färbung, x – positive Färbung nur in den Glanzstreifen, xx – Lateralisierung der Färbung an Zellmembranen und positive Färbung von Intrazellulärräumen einzelner Zellen, xxx – positive Färbung von Intrazellulärräumen von Zellen in großflächigen Gewebefeldern. *Troponine I und T*: o – keine

Depletion, x – Depletion einzelner Zellen, xx – Depletion von Zellen in großflächigen Gewebefeldern, xxx – Depletion der Mehrheit des Gewebes.

Ein Herz einer männlichen Ratte welches Elektroschocks ausgesetzt wurde zeigte keine Färbung von Dityrosin. Das zweite Herz einer männlichen Ratte welches Elektroschocks ausgesetzt wurde zeigte ein positives Färbeergebnis, dieses stellte sich jedoch im Vergleich zu den Studienherzen (siehe auch Scholl et al., 2018) als eher diffuse und mit Blick auf das gesamte Herz zum Teil ringförmige Färbung der Zellen dar. Selbiges Muster wurde beobachtet in den zwei Herzen männlicher Ratten mit globaler ischämischer Präkonditionierung und anschließenden Elektroschocks. Die Kontrollherzen weiblicher Ratten, welche Elektroschocks ausgesetzt wurden, zeigten ebenfalls beide eine solche positive Färbung von Dityrosin.

Eine positive Färbung von Cx43 wurde in allen Elektroschockherzen außer zwei beobachtet, namentlich zwei männliche Herzen, jeweils mit und ohne ischämische Präkonditionierung.

Die Färbung von cTnT zeigte eine Depletion in allen mit Elektroschocks behandelten Herzen. Demgegenüber konnte in der Hälfte der mit Elektroschocks behandelten Herzen keinerlei Anfärbung von cTnI festgestellt werden, gerade so, als würde eine vollständige Depletion vorliegen. Auch nachdem die Färbung von cTnI ein zweites Mal wiederholt wurde, um einen Fehler beim Färbungsvorgang auszuschließen, blieb dieses auffällige Resultat bestehen. cTnI konnte lediglich in einem Herzen einer männlichen Ratte mit Präkonditionierung und Elektroschocks, einem Herz einer männlichen Ratte mit Elektroschocks ohne vorangehende Präkonditionierung und einem Herz einer weiblichen Ratte welches Elektroschocks erhalten hatte überhaupt nachgewiesen werden. Die Färbeergebnisse in diesen Fällen zeigen eine ausgedehnte Depletion bei allerdings weiterhin erhaltener Anfärbbarkeit in einigen Arealen.

4 Diskussion

Studien in der Vergangenheit konnten zeigen, dass sowohl Dityrosin, als auch cTnl und cTnT als immunhistochemische Marker für frühe Myokardinfarkte eingesetzt werden können (Mayer et al., 2014; Mayer et al., 2016; Campobasso et al., 2008; Sabatasso et al., 2016). Während Cx43 noch nicht als Marker in der Routine etabliert wurde, zeigen bisherige Studien jedoch vielversprechende Resultate (Sabatasso et al., 2016). Bislang gibt es keine Studien, die das Verhalten der genannten Marker unter Umständen, die nachweislich einen Einfluss auf das Auftreten eines Myokardinfarktes haben können, überprüft haben.

Das isolierte Rattenherz nach Langendorff stellt eine gute Möglichkeit dar, dieser Frage experimentell nachzugehen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage des Einflusses von Geschlecht und ischämischer Präkonditionierung auf die zuvor genannten Marker. Am Langendorff Herz können eine globale Ischämie, sowie auch lokalisierte Infarktgeschehen kontrolliert generiert werden. Durch anschließende immunhistologische Färbungen von feingeweblichen Schnitten der Herzen können die Marker nachgewiesen werden.

4.1 Geschlecht

Aus der aktuellen Studienlage geht hervor, dass das weibliche Geschlecht einen protektiven Effekt auf die Schwere von Herzerkrankungen zu haben scheint (Isles et al., 1992; Guerra et al., 1999; Wang et al., 2010; Bae und Zhang, 2005; Song et al., 2003). Ein genauer Mechanismus dieser Kardioprotektion wird noch diskutiert, es wurde jedoch Östrogen als wichtiger

Faktor für die Limitation der Apoptose in weiblichen Myokardzellen im Falle einer Ischämie identifiziert (Wang et al., 2010; Patten et al., 2004; Luczak und Leinwand 2009). In Maus-Modellen wurde gezeigt, dass ein Östrogen-Rezeptor gekoppelter Mechanismus eine Signalkaskade auslöst, welche bestimmte Effektoren aktiviert, die eine Apoptose unterdrücken können (Wang et al., 2010; Patten et al., 2004). Im Blick darauf war zu erwarten, dass die jetzt untersuchten Marker infolge eines besseren Schutzes der Zellen vor oxidativem Stress bei weiblichem Geschlecht weniger ausgeprägt auftreten bzw. weniger depletiert sind. Insbesondere für Cx43 und die Troponine, die als direktes Resultat von Zelluntergängen auftreten, waren Unterschiede zu erwarten.

Mittels Versuchen an der Langendorff-Anlage testeten Bae und Zhang (2005) Unterschiede der Geschlechter im Hinblick auf kardialen Funktionsverlust bei Ischämie. Die Ergebnisse zeigten, dass Herzen von weiblichen Ratten eine bessere Funktion des linken Ventrikels behielten und ein deutlich verringertes Infarktareal aufwiesen als Herzen von männlichen Ratten. Die Infarktgröße wurde in dieser Studie jedoch mithilfe von computerisierter Planimetrie analysiert, daraus ergibt sich demnach keine optimale Vergleichbarkeit mit einer immunhistochemischen Analyse, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde.

4.1.1 Dityrosin

Wie bereits beschrieben, kann Dityrosin als selektiver Marker für Gewebeschäden durch oxidativen Stress verwendet werden (Giulivi und Davies, 1994). Dityrosin ist jedoch kein spezifischer Marker für durch einen Myokardinfarkt verursachte Schäden, da die Produktion von Dityrosin aus jeglicher Art von oxidativem Stress, dem das Herz ausgesetzt ist, entstehen kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Dityrosin ein differenziertes Muster in den Färbungen aufweist, anhand dessen es möglich ist, ein Infarktgeschehen von etwaigen anderen myokardialen Schädigungen im

Tiermodell sowie auch menschlichem Gewebe abzugrenzen (Mayer et al., 2014; Mayer et al., 2016). In unserer Studie (Scholl et al., 2018) zeigte Dityrosin ein ähnliches Muster der Färbung bei den männlichen Rattenherzen in der Langendorff-Anlage, wie schon zuvor durch Mayer et al. (2016) beschrieben. Im direkten Vergleich zwischen Herzen von männlichen und weiblichen Ratten ließ sich kein Unterschied in der Intensität oder dem Muster der Färbung nachweisen. Nach Literaturangaben soll es jedoch auch im Zusammenhang mit oxidativem Stress Unterschiede zwischen den Geschlechtern geben, wobei das weibliche Geschlecht weniger anfällig für diesen zu sein scheint (Davies, 2005). So konnte in einer Studie an Rattenherzen nachgewiesen werden, dass bei weiblichem Geschlecht das Gewicht zwischen ROS und Antioxidantien zugunsten letzterer ausfällt, sodass oxidativer Stress in weiblichen Ratten besser kompensiert werden kann (Barp et al., 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre zu erwarten, dass Dityrosin als Marker für den oxidativen Stress in weiblichen Rattenherzen geringer ausgeprägt zu finden wäre. Jedoch zeichneten sich in unserer Studie (Scholl et al., 2018) keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf die Anfärbung und damit das Auftreten von Dityrosin ab. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass möglicherweise vorhandene Unterschiede in den Effekten von oxidativem Stress zwischen den Geschlechtern quantitativ und/oder qualitativ so ausgeprägt sind, dass sie durch das semi-quantitative Beurteilungssystem immunhistochemischer Färbungen nicht ohne Weiteres dargestellt werden könnte.

4.1.2 Connexin 43

Connexin 43 als vielversprechender Marker des frühen Myokardinfarktes ließ sich auch in unserer Studie (Scholl et al., 2018) in Herzen mit einer Überlebenszeit ab 10 Minuten nachweisen. Das Muster der Färbung begann hierbei in Herzen mit 10-minütiger Überlebenszeit lokalisiert zumeist noch in den Glanzstreifen, mit längeren Überlebenszeiten verstärkte sich die Intensität der Färbung und die Verteilung breitete sich auch auf den Intrazellulärraum aus.

Dieser Marker zeigte, ebenso wie Dityrosin, keine deutlich zu differenzierenden Unterschieden im Vergleich von männlichen und weiblichen Rattenherzen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Ausmaß eines potentiellen Schutzes vor Apoptose in der immunhistochemischen Färbung nur eingeschränkt zu beurteilen ist, ähnlich wie bereits für Dityrosin diskutiert.

4.1.3 Troponine I und T

Die Troponine T und I haben sich bereits als sensitive immunhistochemische Marker einer mehrstündigen kardialen Ischämie des menschlichen Gewebes gezeigt (Ortmann et al., 2000; Campobasso et al., 2008) und ebenso in experimentellen Studien an Rattenherzen, in denen cTnT und cTnI in der immunhistochemischen Färbung deutlich vermindert waren nach einstündigen Ischämiezeiten (Sabatasso et al., 2016). Des Weiteren konnte eine Studie, welche postmortal perikardiale Flüssigkeit sowie Serum untersuchte, feststellen, dass es eine Korrelation gibt zwischen dem Nachweis von cTnI im untersuchten Material und zuvor stattgehabten Myokardinfarkten (Osuna et al., 1998). Dies impliziert, dass die Freisetzung von cTnI ebenfalls als Depletion dieses Markers im myokardialen Gewebe nachgewiesen werden könnte. In der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass cTnT bereits nach Überlebenszeiten von 10 Minuten verringert nachweisbar war, sowohl in männlichen, als auch in weiblichen Studienherzen. Zudem wurde ein Unterschied in der Ausprägung der Depletion von Troponin in weiblichen Rattenherzen im Vergleich zu männlichen beobachtet, wobei die Depletion in weiblichen Studienherzen deutlich geringer ausgeprägt war. Dies spricht für eine im Vergleich geringere Schädigung der Muskelzellen bei weiblichen Individuen, was unter Berücksichtigung der Literatur zur besseren Protektion weiblicher Herzen bei Ischämie (Dunlay und Roger, 2012; Guerra et al., 1999; Patten et al., 2004; Wang et al., 2010) auch zu erwarten wäre.

4.2 Ischämische Präkonditionierung

In der Diskussion um den protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung muss berücksichtigt werden, dass ein Unterschied besteht zwischen der klassischen, bzw. akuten Präkonditionierung und der verzögerten Präkonditionierung. Studien haben gezeigt, dass es für die klassische Präkonditionierung von Bedeutung ist, dass das Zeitintervall zwischen der Präkonditionierung und der darauffolgenden Ischämie nicht mehr als 2 Stunden auseinanderliegen darf, anderenfalls geht der protektive Effekt durch diese verloren. Ein weiteres, sogenanntes zweites Fenster entsteht dann jedoch 24 Stunden nach der Präkonditionierung (Carden und Granger, 2000; Korthuis et al., 1998). Im Realfall der forensischen Praxis ist aber das Zeitintervall zwischen einer transienten Ischämie und einem Myokardinfarkt in aller Regel nicht bekannt. Diese Tatsache muss in Betracht gezogen werden, sollten Marker so wie Cx43, welche laut den Ergebnissen dieser Studie (siehe Scholl et al., 2018) sensitiv auf ischämische Präkonditionierung reagieren, in der postmortalen Diagnostik angewandt werden.

4.2.1 Dityrosin

Das Verhalten von Dityrosin nach ischämischer Präkonditionierung lässt keine Unterschiede in Intensität oder Muster erkennen im Vergleich zu Herzen, die keiner Präkonditionierung unterzogen wurden. Dies lässt sich durch das Auftreten von Dityrosin als unspezifisches Produkt von oxidativem Stress (Giulivi und Davies, 1994; Giulivi et al., 2003) erklären. Bei der Präkonditionierung kommt es zu einer Anpassungsreaktion auf den initial ausgelösten oxidativen Stress, sodass Dityrosin hier vermutlich als Produkt dessen nachgewiesen wird.

4.2.2 Connexin 43

Das Auftreten von Cx43 schien generell vermindert in Herzen, die einer ischämischen Präkonditionierung unterzogen wurden (Scholl et al., 2018). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten von Cx43 könnte der kardioprotektive Effekt der Präkonditionierung sein, welcher nachweislich in experimentellen Studien die Schwere von Myokardinfarkten beeinflussen konnte (Ovize et al., 1992; Liu und Downey, 1992; Schott et al., 1990; Murry et al., 1986). Eine Präkonditionierung kann sowohl Nekrosen als auch Apoptose infolge eines Myokardinfarktes reduzieren (Efstathiou et al., 2001), was dazu führen könnte, dass auch Produkte des Zelluntergangs sowie Cx43 vermindert nachweisbar sind. Eine experimentelle Studie von Brandenburger et al. (2014) an Rattenherzen in vivo konnte nachweisen, dass die sogenannte entfernte ischämische Präkonditionierung die Menge von Infarkt-induzierter Dephosphorylierung von Cx43 reduziert. Bei dieser Art von Präkonditionierung wurde eine vorübergehende Ischämie der Extremitäten herbeigeführt, welche schließlich die gemessene Infarktgröße einer regionalen myokardialen Ischämie verringern konnte. Diese Resultate stützen die Annahme, dass auch eine globale ischämische Präkonditionierung einen verringerten Einfluss auf das Auftreten von dephosphoryliertem Cx43 in myokardialem Gewebe hat. Jedoch fanden Tansey et al. (2006) heraus, dass es zu deutlichen Veränderungen in der Struktur des Myokards und somit der Integrität des zellulären Aufbaus kommt, unter anderem auch den Gap Junctions, in direkter Korrelation mit einer bis zu 30-minütigen Ischämiezeit und anschließender Reperfusion. Die Studie konnte erhöhte Mengen dephosphoryliertes Cx43 nach erfolgter Ischämie in der immunhistochemischen Analyse feststellen. Auch diese Resultate sind vereinbar mit den Ergebnissen unserer Arbeit (Scholl et al., 2018). Es wurde zwar im direkten Vergleich von präkonditionierten und nicht präkonditionierten Herzen wesentlich weniger Cx43 in präkonditionierten Herzen gefunden, jedoch war Cx43 dennoch in einigen der präkonditionierten Herzen nachweisbar. Eine Schädigung der Myozyten entsteht demnach auch bei der Präkonditionierung und darauffolgendem Infarkt, jedoch scheint diese im Fall von Cx43 wesentlich geringer ausgeprägt zu sein als bei Infarkt-Herzen ohne Präkonditionierung.

4.2.3 Troponine I und T

Die Depletion des Markers cTnT schien verstärkt zu sein in Herzen die vor dem Herbeiführen eines Myokardinfarktes dem Protokoll der ischämischen Präkonditionierung unterzogen wurden. In allen Kontrollherzen, die lediglich einer ischämischen Präkonditionierung ohne darauffolgenden Infarkt unterzogen wurden, zeigte sich ebenfalls ein verminderter Nachweis von cTnT (Scholl et al., 2018). Eine deutliche Verringerung des Vorkommens von cTnT in myokardialem Gewebe nach ischämischer Präkonditionierung ist durchaus zu erwarten, insbesondere vor dem Hintergrund, dass der Nachweis eines erhöhten Serum-Troponins ein gängiges Mittel zur klinische Diagnostik von ischämischen Herzerkrankungen darstellt. Die Resultate der Färbung von cTnI der Studienherzen stimmte generell überein mit den Ergebnissen, welche die Färbung von cTnT erzielte (Scholl et al., 2018).

4.3 Effekte einer provozierten Arrhythmie auf die untersuchten Marker

Um zu testen, welches Verhalten die Marker unter anderen äußeren Einflüssen zeigten, die zu funktioneller und struktureller Schädigung des Myokards führen können, wurden einige der Herzen mit Elektroschocks behandelt. Der Marker Dityrosin zeigte positive Ergebnisse in 4 von 6 dieser Herzen (siehe Tabelle 2), jedoch in anderen Lokalisationen als denen, die in den Studienherzen dominierten (Infarktarealen) (Scholl et al., 2018). Diese Resultate stimmen überein mit der vorausgegangenen Studie von Mayer et al.

(2016), welche feststellte, dass Dityrosin zwar nicht nur bei Myokardinfarkten auftritt, bei diesen aber mit charakteristischem Verteilungsmuster. Demnach zeigte sich auch in der aktuellen Studie, dass das Auftreten von Dityrosin zwar nicht spezifisch an ischämische Ereignisse gekoppelt ist, Dityrosin aber dennoch ein valider Marker ist, um pathologische Veränderungen an Myokard infolge von oxidativem Stress sichtbar zu machen.

In allen außer einem der mit Elektroschocks behandelten Herzen zeigte sich eine positive Färbung einzelner Zellen für Cx43. Das Muster dieser Zellen entsprach nicht dem eher umschriebenen Muster der Färbung, welches sich in den Herzen der experimentellen Gruppen mit Myokardinfarkten zeigte (Scholl et al., 2018). Dies lässt vermuten, dass Cx43 nicht ausschließlich bei myokardialer Ischämie auftritt, sondern in anderem Verteilungsmuster ebenfalls auf andere, nicht primär-ischämische Schäden des Herzens hinweisen kann.

Der Marker cTnT war sichtbar vermindert in allen Herzen mit Elektroschockbehandlung. Im Hinblick auf die Tatsache, dass cTnT ein relativ sensibler Marker für bereits kleinste Nekrosen ist, kann die Depletion von cTnT in diesem Fall am ehesten im Rahmen von strukturellen Schäden des Herzens interpretiert werden. Diese Interpretation wird gestützt durch die Ergebnisse einer Studie, die zeigte, dass Patienten, welche einer Radiofrequenzkatheterablation unterzogen wurden, eine Erhöhung des kardialen Troponins im Serum aufwiesen, welche am ehesten durch die direkte traumatische myokardiale Verletzung ausgelöst wurde (Korff et al., 2006).

Die Herzen nach Elektroschockbehandlung zeigten zudem größtenteils gar keine Anfärbung von cTnI, auch nach Wiederholung der Färbung für die komplette Reihe. Jedoch gingen wir nicht von einer vollständigen Depletion aus, da selbst die sonst in den Kontrollherzen zu beobachtenden Färbeartefakte fehlten. Im Vergleich dazu konnte beispielsweise bei den Herzen mit lokaler Ischämie und Präkonditionierung (aus Scholl et al., 2018) zudem auch bei starker Depletion nach wie vor eine Färbung in den nicht betroffenen Arealen erkannt werden. Dieselben Herzen nach Elektroschockbehandlung zeigten

außerdem plausible Ergebnisse für die Färbungen der anderen drei untersuchten Marker, so dass hier nicht davon ausgegangen werden kann, dass das völlige Fehlen von cTnI in der Mehrzahl dieser Herzen Folge eines Fehlers im Experiment oder während des Färbens ist. Es muss an dieser Stelle in Betracht gezogen werden, dass cTnI gegebenenfalls durch noch nicht genau fassbare Einflüsse aus dem Myokard 'herausgelöst' wurde. Fraglich wäre als Ursache die Fixation der Herzen in Formalin über einen längeren Zeitraum zu diskutieren. So zeigte eine Studie durch Kobayashi et al. (2017), dass Myoglobin, ebenfalls aufgrund einer Depletion als Marker für Myokardinfarkte gebräuchlich, in der immunhistochemischen Färbung möglicherweise vermindert nachweisbar ist, da es in Formalin aus dem Gewebe freigesetzt wird. Dies könnte eventuell auch für andere immunhistochemische Marker der Fall sein. Jedoch wäre dann zu erwarten, dass auch die Herzen der Studiengruppe (aus Scholl et al., 2018) vermehrt keine Färbung von cTnI aufweisen würden, da diese Herzen ebenfalls über einen längeren Zeitraum in Formalin fixiert waren. In Anbetracht der Tatsache, dass cTnI in den Studienherzen jedoch problemlos gefärbt werden konnte (Scholl et al., 2018), kann im Rahmen dieser Studie nicht abschließend erklärt werden, warum dies in großen Teilen der Gruppe nach Elektroschockbehandlung nicht möglich war. Diese Erkenntnis sollte jedoch berücksichtigt werden, wenn cTnI als Marker in der Routine verwendet wird und geben außerdem Anlass für weitere Untersuchungen zu dieser Frage.

4.4 Schlussfolgerungen

Die hier durchgeführte Studie zeigt, dass obgleich klinische und auch experimentell nachweisbare Unterschiede zwischen den Geschlechtern im Falle eines Herzinfarktes im Hinblick auf Überlebensraten, Funktionsverlusten oder

morphologische Charakteristiken von Myokardinfarkten bestehen mögen, die immunhistochemische Analyse der Marker Dityrosin und Cx43 im Tiermodell jedoch keinen bedeutsamen Unterschied aufweist. Hingegen konnten sowohl für cTnT als auch für cTnI eine verminderte Depletion in weiblichen Studienherzen nachgewiesen werden.

Anders verhält es sich im Hinblick auf die ischämische Präkonditionierung. Während Dityrosin als einziger Marker keine deutlichen Unterschiede in präkonditionierten Herzen im Vergleich zu nicht präkonditionierten Infarkt Herzen zeigte, waren eindeutige Unterschiede in der Auswertung der Marker Cx43, cTnI und cTnT zu erkennen. Diese hier gezeigten Unterschiede in Muster und Auftreten der Marker in Herzen mit ischämischer Präkonditionierung sollten in die Auswertung einer immunhistochemischen Diagnostik zukünftig mit einbezogen werden. Sie schmälern jedoch nicht die Validität der hier getesteten Marker für die Detektion von frühen Myokardinfarkten. Das Verhalten von cTnI im Bezug auf das Ausbleiben von Färbung in einem großen Teil der Kontrollherzen bleibt in diesem Kontext jedoch insbesondere offen für weitere Evaluation.

Dityrosin als Marker zeigt sich in dieser Studie (Scholl et al., 2018) zwar unbeeinflusst von Geschlecht und ischämischer Präkonditionierung und wurde als sehr sensitiver Marker für myokardiale Schädigung bestätigt, dennoch ist es bei Dityrosin von Belang, für eine aussagekräftige Auswertung immer auch das Färbemuster genau zu beachten. Cx43 könnte als Marker des akuten Myokardinfarktes nach den Ergebnissen dieser Studie im klinischen Setting beispielsweise bei vorbestehender Angina pectoris gegebenenfalls weniger oder später nachweisbar sein. Konkrete Studien zur Nachweisbarkeit von Cx43 nach akutem Myokardinfarkt bei vorbestehender Angina pectoris fehlen bislang. Die Troponine scheinen generell sehr sensible Marker gegenüber jeder Art von schädigenden Einflüssen auf das Myokard zu sein. Zudem bleibt vor allem cTnI nicht endgültig einschätzbar und ist daher für eine Routineanwendung eher nicht geeignet.

Generell zeigen die erhobenen Daten, dass neue, potentielle Infarktmarker immer auch auf ihr Verhalten bezüglich Geschlecht und ischämischer Präkonditionierung getestet werden sollten.

5 Limitationen

Die Langendorff-Anlage bietet zwar die Möglichkeit, kontrollierte Ischämien im experimentellen Rahmen zu untersuchen, dennoch sind diese Versuche mit Limitationen verbunden. So müssen die Herzen vor dem Anbringen an der Langendorff-Anlage aus dem Tierkadaver entnommen werden, dabei lässt sich eine, wenn auch sehr kurzzeitige, Ischämie zu Beginn nicht vermeiden. Zudem wird das Gewebe auch den Einflüssen dieser mechanischen Manipulation gegenüber ausgesetzt und könnte gegebenenfalls dadurch sogar Schaden nehmen. Weiterhin sind die Bedingungen der Langendorff-Anlage zwar dem physiologischen Kreislauf nachempfunden und bestmöglich daraufhin angepasst, jedoch gilt auch hier zu erwähnen, dass die Perfusion nur durch eine Pufferlösung und nicht durch Vollblut erfolgt, vollkommen physiologische Bedingungen lassen sich bei Experimenten am Langendorff-Modell nicht darstellen.

Die hier erhobenen Befunde beziehen sich zudem lediglich auf Rattenherzen in einem kontrollierten, experimentellen Rahmen. Die Ergebnisse dieser Studie an Tieren können daher nur mit der entsprechenden Vorsicht auf Menschen übertragen werden.

Literaturverzeichnis

- Bae S, Zhang L. (2005) Gender Differences in Cardioprotection against Ischemia/Reperfusion Injury in Adult Rat Hearts: Focus on Akt and Protein Kinase C Signaling. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 315(3):1125–35.
- Baines CP, Goto M, Downey JM. (1997) Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 29(1):207–16.
- Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns, CB, Bensard, DD et al. (1993) Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circulation Research*; 73(4):656–70.
- Barp J, Araújo AS, Fernandes TR et al. (2002) Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 35:1075–81.
- Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA et al. (2000) Dephosphorylation and Intracellular Redistribution of Ventricular Connexin43 during Electrical Uncoupling Induced by Ischaemia. *Circulation Research*; 87:656–62.
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. (2011) Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 50:940–50.
- Brandenburger T, Huhn R, Galas A, Pannen BH, Keitel V, Barthel F et al. (2014) Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *Journal of Translational Medicine*; 12(28).
- Campobasso CP, Dell'Erba AS, Addante A, Zotti F, Marzullo A, Colonna MF. (2008) Sudden cardiac death and myocardial ischemia indicators: a comparative study of four immunohistochemical markers. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*; 29:154–61.
- Carden DL, Granger DN. (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*; 190:255–66.
- Davies MJ. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*; 1703(2):93–109.
- Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu YG. (1994) Cellular Mechanisms in Ischemic Preconditioning: The Role of Adenosine and Protein Kinase C. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 723:82–98.
- Dunlay SM, Roger VL. (2012) Gender Differences in the Pathophysiology, Clinical Presentation, and Outcomes of Ischemic Heart Failure. *Current Heart Failure Reports*; 9(4):267–76.

- Efstathiou A, Seraskeris S, Papakonstantinou C, Aidonopoulos A, Lazou A. (2001) Differential effect of preconditioning on post-ischaemic myocardial performance in the absence of substantial infarction and in extensively infarcted rat hearts. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*; 19:493–9.
- Giulivi C, Davies KJA. (1994) Dityrosine: A Marker for Oxidatively Modified Proteins and Selective Proteolysis. *Methods in Enzymology*; 233:363–71.
- Giulivi C, Traaseth NJ, Davies KJA. (2003) Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids*; 25(3-4):227–32.
- Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. (2000) Evidence for mitochondrial KATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovascular Research*; 45(4):934–40.
- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA et al. (1999) Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circulation Research*; 85(9):856–66.
- Isles CG, Hole DJ, Hawthorne VM, Lever AF. (1992) Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey- comparison with men. *The Lancet*; 339:702–6.
- Iwasaka T, Nakamura S, Karakawa M, Sugiura T, Inada M. (1994) Cardioprotective effect of unstable angina prior to acute anterior myocardial infarction. *Chest*; 105(1):57–61.
- Jenkins DP, Pugsley WB, Yellon DM. (1995) Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: infarct size limitation, but no reduction of stunning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 27(8):1623–32.
- Kander MC, Cui Y, Liu Z. (2017) Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases *Journal of Cellular and Molecular medicine*; 21(5):102-1032.
- Kobayashi C, Miura M, Miyaishi S. (2017) Postmortem exudation of myoglobin from striated muscle during formalin fixation (Abstract). *Rechtsmedizin*; 27:311–404.
- Korff S, Katus HA, Giannitsis E. (2006) Differential diagnosis of elevated troponins. *Heart*; 92(7):987–93.
- Korthuis RJ, Gute DC, Cepinska G, Kvietsy PR. (1998) Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology*; 5:35–48.
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. (2001) Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 33:1065–89.
- Lochner A, Marais E, Du Toit E, Moolman J. (2002) Nitric Oxide Triggers Classic Ischemic Preconditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 962:402–14.
- Luczak ED, Leinwand LA. (2009) Sex-Based Cardiac Physiology. *Annual Review of Physiology*; 71:1–18.
- Liu YG, Downey JM. (1992) Ischemic Preconditioning Protects against Infarction in Rat-Heart. *American Journal of Physiology*; 263(4):H1107-H1111.

- Liu GS, Thornton J, van Winkle DM, Stanley AW, Olsson, RA, Downey, JM. (1991) Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*; 84(1):350–6.
- Madea B, Editor. 8 (2015) *Rechtsmedizin: Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*. 3rd ed. Berlin: Springer.
- Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A, Das DK. (1998) Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *American Journal of Physiology*; 275:H1857-H1864.
- Mayer F, Propper S, Ritz-Timme S. (2014) Dityrosine, a protein product of oxidative stress, as a possible marker of acute myocardial infarctions. *International Journal of Legal Medicine*; 128(5):787–94.
- Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S. (2016) Dityrosine as a marker of acute myocardial infarction? Experiments with the isolated Langendorff heart. *International Journal of Legal Medicine*; 130:1053–60.
- Mendelsohn M, Karas RH. (2010) Molecular and Cellular Basis of Cardiovascular Gender Differences. *Science*; 308(5728):1583–7.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; 74(5):1124–36.
- Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B. (2000) A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *International Journal of Legal Medicine*; 113:215–20.
- Osuna E, Pèrez-Cárceles MD, Alvarez MV, Noguera J, Luna A. (1998) Cardiac troponin I (cTn I) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *International Journal of Legal Medicine*; 111:173–6.
- Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. (1992) Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation*; 85(2):779–89.
- Patten RD, Pourati I, Aranovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X et al. (2004) 17-Estradiol Reduces Cardiomyocyte Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circulation Research*; 95.
- Reiter R, Henry TD, Traverse JH. (2013) Preinfarction angina reduces infarct size in ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Circulation Cardiovascular Interventions*; 6(1):52–8.
- Sabatasso S, Mangin P, Fracasso T, Moretti M, Docquier M, Djonov V. (2016) Early markers for myocardial ischemia and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine*; 130:1265–80.
- Scholl K, Huhn R, Ritz-Timme S, Mayer F. (2018) The impact of sex and myocardial ischemic preconditioning on immunohistochemical markers of acute myocardial infarction. *International Journal of Legal Medicine*; 133:529-538.
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. (1990) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circulation Research*; 66(4):1133–42.
- Schulz R, Heusch G. (2004) Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research*; 62:335–44.

- Silbernagel S, Lang F. (2013) Taschenatlas Pathophysiologie. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Song X, Li G, Vaage J, Valen G. (2003) Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice. *Acta Physiologica Scandinavica*; 177:459–66.
- Tansey EE, Kwaku KF, Hammer PE, Cowan DB, Federman M, Levitsky S et al. (2006) Reduction and Redistribution of Gap and Adherens Junction Proteins After Ischemia and Reperfusion. *The Annals of Thoracic Surgery*; 82(4):1472–9.
- Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, Simone C de, Violante A et al. (1997) Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circulation Research*; 80(5):743–8.
- Vetterlein F, Mühlfeld C, Cetegen C, Volkmann R, Schrader C, Hellige G. (2006) Redistribution of connexin43 in regional acute ischemic myocardium: influence of ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*; 291(2):H813-H819.
- Wang F, He Q, Sun Y, Dai X, Yang XP. (2010) Female adult mouse cardiomyocytes are protected against oxidative stress. *Hypertension*; 55(5):1172–8.
- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. (1994) Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *American Journal of Physiology*; 266:H1145-H1152.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme für die Ermöglichung, dieses Projekt durchzuführen und für die sehr geschätzte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Felix Mayer bedanken für die viele Geduld, das stetige Feedback und die tatkräftige Unterstützung, nicht nur bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift, sondern auch bei der praktischen Forschungsarbeit dahinter.

Außerdem bedanke ich mich bei Blazenka Bosilj für ihren Einsatz.

Mein Dank gilt ebenfalls der experimentellen Anästhesie der Universitätsklinik Düsseldorf, speziell Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen, für die Ermöglichung, die Studie im Labor der experimentellen Anästhesie durchzuführen und die stets gute Zusammenarbeit.

Schließlich gehört mein Dank meinen Eltern, welche mir das Studium und damit einhergehend diese Promotion ermöglicht haben. Insbesondere die Unterstützung meiner Mutter während meiner gesamten Ausbildungszeit hat dies überhaupt erst möglich gemacht.