

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

**Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach  
ischämischer Fernpräkonditionierung beim Menschen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Maximilian Dierkes**

2021

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen

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

Für meine Eltern, Cornelia und Martin, und meine Großeltern, Gertrud und Otto, die mich in jeder Lebenslage bedingungslos unterstützen und ohne die ich nicht in der Lage wäre, meinen Weg unbeirrt zu gehen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112. [1]

## Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung ist für 1,8 Millionen Todesfälle in Europa pro Jahr verantwortlich. Die Ischämische Fernpräkonditionierung (Remote Ischemic Preconditioning, RIPC) scheint eine effektive Methode zu sein einen Ischämie- / Reperfusionsschaden am Myokard, durch kurze Ischämie- und Reperusionsphasen an einem herzfernen Organ (z.B. Oberarm), zu reduzieren. Der Effekt der ischämischen Präkonditionierung (IPC) ist geschlechtsspezifisch. Unklar ist, ob dies auch für die RIPC gilt. Das Ziel dieser Studie war es zu überprüfen, ob die Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC am Menschen geschlechtsspezifischen Veränderungen unterliegt.

Bei freiwilligen jungen (18-30 Jahre) männlichen und weiblichen Probanden wurde Blut vor und nach RIPC (Oberarmischämie mittels Blutdruckmanschette) entnommen und das Blutplasma zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Blutplasma wurde an männlichen Wistar Ratten (je n=10/Gruppe) in vitro untersucht. Die Herzen wurden an der Langendorff-Anlage mit Krebs-Henseleit Puffer mit 80 mmHg perfundiert. Das Blutplasma wurde über 10 Minuten, vor einer 33-minütigen Globalischämie und gefolgt von einer Stunde Reperfusion, appliziert. Die Infarktgröße wurde mittels TTC-Färbung bestimmt und in Prozent des linken Ventrikels angegeben.

Bei Signifikanzen wurde der Tukey Post-hoc-Test verwendet. Hämodynamische Parameter wurden in einer zweifachen ANOVA, gefolgt vom Tukey's Post-hoc-Test verglichen. Die Daten werden beschrieben als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Als Signifikanzniveau wurden 5% angenommen ( $p < 0,05$ ).

RIPC Plasma von jungen Männern ( $\sigma$ RIPC) reduzierte die Infarktgröße signifikant von  $47 \pm 5\%$  auf  $31 \pm 10\%$  ( $P < 0,05$  vs.  $\sigma$ Kon.). Nach Applikation von Kontrollplasma junger Frauen betrug die Infarktgröße  $33 \pm 10\%$  ( $\phi$ Kon.) und konnte durch die Applikation von weiblichem RIPC-Plasma nicht signifikant weiter reduziert werden ( $\phi$ RIPC:  $29 \pm 10\%$ ; nicht signifikant vs.  $\phi$ Kon.).

Diese Ergebnisse zeigen, dass RIPC bei jungen Männern zur Freisetzung eines humoralen Faktors mit kardioprotektiver Wirkung führt. Dieser Effekt ist bei jungen Frauen nicht nachweisbar [1].

## Abstract

Coronary artery disease accounts for 1,8 million deaths in Europe per year. Remote ischemic preconditioning (RIPC) appears to be an effective method to reduce myocardial ischemic- and reperfusion-damage via phases of ischemia and reperfusion at an organ remote to the heart (e.g. the upper limbs). The effect to ischemic preconditioning (IPC) is sex dependent. If this applies to RIPC as well, remains unknown. The objective of this study was therefore to test if the release of humoral factors through RIPC in humans is subject to sex dependent changes.

Blood was drawn from young female and male volunteers (18-30 years of age) before and after an RIPC-intervention (ischemia of the upper limb via bloodpressurecuff) and the plasma was stored at -80°C for further use. The plasma was then tested in vitro on male Wistar Rats (each group n=10). Their hearts were externally perfused with Krebs-Henseleit Puffer at 80 mmHg at the Langendorff-apparature. The blood plasma was added over 10 minutes before the hearts underwent a 33-minute global ischemia followed by one hour of reperfusion. Infarct size was measured via TTC-staining and expressed as percentage of left ventricle).

To test the statistical significance the Tukey post hoc test was used. Haemodynamics were compared in a to-way ANOVA followed again by Tukey's post hoc test. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). P-values  $< 0,05$  were considered significant.

RIPC-Plasma from young males ( $\sigma$ RIPC) reduced infarct size significantly from  $47 \pm 5\%$  to  $31 \pm 10\%$  ( $P < 0,05$  vs.  $\sigma$ Kon.). Whereas the infarct size after application of control group plasma from young females was  $33 \pm 10\%$  ( $\phi$ Kon.) and could not be reduced further through application of female RIPC-plasma (RIPC:  $29 \pm 10\%$ ; not significant vs.  $\phi$ Kon.).

These results show that RIPC in young males releases a humoral factor with cardioprotective qualities. Whereas this effect could not be observed with young females [1].

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |                                                                          |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| ♀ <i>RIPC</i>      | <i>RIPC-Plasma junge Frauen</i>                                          |
| ♀ <i>Kon.</i>      | <i>Kontrollplasma junge Frauen</i>                                       |
| ♂ <i>Kon.</i>      | <i>Kontrollplasma junge Männer</i>                                       |
| ♂ <i>RIPC</i>      | <i>RIPC-Plasma junge Männer</i>                                          |
| <i>AAA</i>         | <i>abdominales Aortenaneurysma</i>                                       |
| <i>AAR</i>         | <i>Area at Risk, Risikogebiet</i>                                        |
| <i>ACS</i>         | <i>acute coronary syndrome</i>                                           |
| <i>ALDH2</i>       | <i>Aldehyddehydrogenase 2</i>                                            |
| <i>AOP</i>         | <i>aortic pressure</i>                                                   |
| <i>ATP</i>         | <i>Adenosintriphosphat</i>                                               |
| <i>BMI</i>         | <i>Body Mass Index</i>                                                   |
| <i>CF</i>          | <i>coronary flow</i>                                                     |
| <i>CGRP</i>        | <i>Calcitonin gene-related peptide, calcitonine gene related peptide</i> |
| <i>COX-2</i>       | <i>Cyclooxygenase-2</i>                                                  |
| <i>DNA</i>         | <i>desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>                    |
| <i>dP/dt max</i>   | <i>Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit</i>                             |
| <i>dP/dt min</i>   | <i>maximale Relaxationsgeschwindigkeit</i>                               |
| <i>EKG</i>         | <i>Elektrokardiogramm</i>                                                |
| <i>ERK</i>         | <i>Extrazellulär-Regulierte-Kinase</i>                                   |
| <i>GPCR</i>        | <i>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren</i>                                   |
| <i>HLM</i>         | <i>Herz-Lungen-Maschine</i>                                              |
| <i>HR</i>          | <i>Heartrate</i>                                                         |
| <i>I/R-Schaden</i> | <i>Ischämie-/ Reperfusionsschaden</i>                                    |
| <i>iNOS</i>        | <i>inducible nitric oxide synthase</i>                                   |
| <i>IPC</i>         | <i>ischämische Fernpräkonditionierung</i>                                |
| <i>KHK</i>         | <i>koronare Herzkrankheit</i>                                            |
| <i>LVDP</i>        | <i>left ventricular developed pressure</i>                               |
| <i>LVP</i>         | <i>Left ventricular pressure</i>                                         |
| <i>LVP min</i>     | <i>minimal left ventricular pressure</i>                                 |
| <i>LVPmax</i>      | <i>maximum left ventricular pressure</i>                                 |
| <i>Mb</i>          | <i>Myoglobin</i>                                                         |
| <i>MPTP</i>        | <i>mitochondrial permeability transition pore</i>                        |
| <i>NADPH</i>       | <i>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>                      |

|                                 |                                                                |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>NYHA</i>                     | <i>.....New York Heart Association</i>                         |
| <i>PI3K</i>                     | <i>..... Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>                     |
| <i>PKC<math>\epsilon</math></i> | <i>.....<math>\epsilon</math>-Isoform der Protein-Kinase C</i> |
| <i>PKG</i>                      | <i>..... Protein-Kinase G</i>                                  |
| <i>PTCA</i>                     | <i>.....perkutane transluminale Koronarangioplastie</i>        |
| <i>RCF</i>                      | <i>..... relative centrifugal force</i>                        |
| <i>RIPC</i>                     | <i>.....remote ischemic preconditioning</i>                    |
| <i>RISK-Pathway</i>             | <i>..... reperfusion injury salvage kinase pathway</i>         |
| <i>ROS</i>                      | <i>.....Reaktive Sauerstoffspezies</i>                         |
| <i>RPP</i>                      | <i>..... rate pressure product</i>                             |
| <i>TTC</i>                      | <i>..... 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid</i>                 |
| <i>WM</i>                       | <i>..... Wortmannin</i>                                        |



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG .....</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1 Mechanismen des Ischämie-/ Reperfusionsschadens .....                                                 | 1         |
| 1.2 Ischämische Präkonditionierung als Möglichkeit der Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens ..... | 4         |
| 1.3 Weiterentwicklung der IPC zum Konzept der RIPC .....                                                  | 6         |
| 1.4 Frühe und späte Phase der Präkonditionierung .....                                                    | 12        |
| 1.5 Unterschiedliche Effekte der RIPC bei Männern und Frauen .....                                        | 13        |
| 1.6 Das Langendorff-Modell .....                                                                          | 16        |
| 1.7 Ziele der Arbeit .....                                                                                | 16        |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>                                                                      | <b>17</b> |
| 2.1 Verwendete Materialien .....                                                                          | 18        |
| 2.2 Studienaufbau .....                                                                                   | 20        |
| 2.3 Gewinnung von humanem Kontroll- bzw. RIPC-Blutplasma .....                                            | 20        |
| 2.3.1 Rekrutierung der Studienteilnehmer.....                                                             | 21        |
| 2.3.2 Information, Aufklärung und Screening potentieller Studienteilnehmer .....                          | 22        |
| 2.3.3 Datenmanagement.....                                                                                | 23        |
| 2.3.4 Durchführung der RIPC.....                                                                          | 23        |
| 2.3.5 Aufbereitung der Blutproben .....                                                                   | 23        |
| 2.4 Versuchsaufbau .....                                                                                  | 24        |
| 2.4.1 Die Langendorff Anlage .....                                                                        | 24        |
| 2.4.2 Induktion der Organischämie.....                                                                    | 26        |
| 2.4.3 Messung der Organfunktion.....                                                                      | 27        |
| 2.4.4 Applikation des Plasmas.....                                                                        | 28        |
| 2.5 Untersuchungen zum Effekt der IPC.....                                                                | 28        |
| 2.6 Untersuchungen zum Effekt der RIPC .....                                                              | 29        |
| 2.7 Messung der Infarktgröße.....                                                                         | 30        |
| 2.8 Statistische Auswertung .....                                                                         | 31        |
| <b>3. ERGEBNISSE .....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| 3.1 Testung der kardioprotektiven Potenz der IPC.....                                                     | 32        |
| 3.1.1 Die Infarktgrößen der IPC- und Kontrollversuche im Vergleich .....                                  | 32        |
| 3.2 Testung der kardioprotektiven Potenz der RIPC .....                                                   | 33        |
| 3.2.1 Die hämodynamischen Parameter .....                                                                 | 34        |
| 3.2.2 Die Infarktgrößen der Verschiedenen RIPC-Gruppen im Vergleich .....                                 | 38        |
| <b>4. DISKUSSION .....</b>                                                                                | <b>39</b> |
| 4.1 Diskussion der Methodik.....                                                                          | 40        |
| 4.1.1 Verwendung des Langendorff-Modells .....                                                            | 40        |
| 4.2 Diskussion der Ergebnisse.....                                                                        | 42        |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Kardioprotektion ..... | 44        |
| 4.2.2 Hämodynamik.....                                               | 47        |
| <b>4.3 Die RIPC in der klinischen Praxis .....</b>                   | <b>48</b> |
| <b>4.4 Fazit.....</b>                                                | <b>49</b> |
| <b>4.5 Die Zukunft der Kardioprotektion .....</b>                    | <b>49</b> |
| <b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                 | <b>51</b> |
| <b>6. DANKSAGUNG .....</b>                                           | <b>57</b> |

## 1. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die führende Todesursache in Europa. Sie ist für 1,8 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich, sowie für einen wirtschaftlichen Schaden von 60 Milliarden Euro [2]. Die KHK ist außerdem Ursache für ca. die Hälfte aller akuten Koronarsyndrome, also Myokardinfarkte, instabile Angina pectoris und plötzlicher Herztod [3].

In Deutschland war alleine der akute Myokardinfarkt 2015 für 60 Todesfälle pro 100.000 Einwohnern verantwortlich [4].

Nach einem akuten Myokardinfarkt ist die zurzeit effektivste Methode zur Infarktgrößenreduzierung und Verbesserung des klinischen Outcomes die rasche Wiederherstellung der Durchblutung durch thrombolytische Therapie oder eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) [2]. Allerdings sind dem Erfolg dieser Interventionen anscheinend Grenzen gesetzt, denn die Mortalitätsrate liegt trotz PTCA immer noch zwischen 6 und 14 % [5]. Hierbei spielt, paradoxerweise, die rettende Reperfusion des ischämischen Gewebes eine entscheidende Rolle, da sie in Abhängigkeit von der Ischämiedauer zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes führen kann [6, 7].

Dieser Aspekt des Ischämie-/ Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) limitiert den Erfolg der PTCA entscheidend, weswegen es elementar ist, die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und sie letztendlich beeinflussen zu können.

### *1.1 Mechanismen des Ischämie-/ Reperfusionsschadens*

Ein I/R-Schaden entsteht durch eine Kombination von Gewebsuntergang während der Ischämiezeit, sowie der Reperfusion von ischämischem Gewebe und damit verbundener Ausschwemmung entstandener Schadstoffe. Das Resultat ist eine irreversible Schädigung von Myozyten, die kurz vor der Reperfusion noch nicht zwingend irreversibel geschädigt waren. Studien legen eine Beteiligung der Reperfusion an der gesamten Infarktgröße von bis zu 50 % nahe [7]. Dies könnte unter anderem ein Grund für die immer noch hohen Mortalitätsraten, trotz optimaler Wiederherstellung der Durchblutung, nach einem akuten

Myokardinfarkt sein. Man unterscheidet vier Arten der kardialen Dysfunktion, die durch die Reperfusion ausgelöst werden.

Zunächst ist die mechanische Dysfunktion des Myokards zu nennen, die, obwohl kein irreversibler Schaden vorliegt, bestehen bleibt und von der sich die Myozyten nach einiger Zeit erholen [7].

Die zweite Dysfunktion wird als „*no-reflow-phenomenon*“ bezeichnet [7], und bezieht sich auf die verminderte oder gar nicht vorhandene Perfusion des ehemals ischämischen Gewebes nach Reperfusion, aufgrund einer zu hohen Impedanz.

Reperfusions-Arrhythmien können die dritte Art der Dysfunktion darstellen und die vierte wird als „*Lethal-Reperfusion-Injury*“ (=tödlicher Reperfusionsschaden) bezeichnet [7]. Hierbei handelt es sich vermutlich um Reaktionen, die, aufbauend auf Veränderungen des ischämischen Myokards, durch die Reperfusion angestoßen werden und zum Zelltod führen (Abb. 1).

Als Mediatoren für den tödlichen Reperfusionsschaden werden Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), mitochondriale Regeneration, intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss, die schnelle Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes und Entzündungsreaktionen vermutet. Diese interagieren miteinander und lösen über die MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) und die Hyperkontraktion der Kardiomyozyten den Zelltod aus [7].

Bei der MPTP handelt es sich um einen nicht-selektiven Kanal der inneren Mitochondrienmembran. Öffnet er sich, fällt das Membranpotential zusammen, so dass die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen kommt und kein ATP mehr hergestellt wird, was wiederum im Zelltod endet. In der myokardialen Ischämie bleibt dieser Kanal geschlossen. Eine Öffnung der MPTP kann induziert werden über oxidativen Stress, mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss, Wiederherstellung eines physiologischen pH und ATP-Mangel.

Während der Reperfusion entstehen ROS über die Xanthin-Oxidase und den wiederhergestellten Elektronentransport der Mitochondrien, später kommen weitere ROS hinzu, vor allem durch die NADPH-Oxidase von eingewanderten Neutrophilen. ROS schädigen die Kardiomyozyten, indem sie die MPTP öffnen, chemotaktisch wirken, über Dysfunktion der sarkolemmalen Membranen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung beitragen, die Zellmembran schädigen, Enzyme denaturieren und die Desoxyribonukleinsäure (DNA) direkt oxidativ schädigen (Abb. 1).

Zu den schädigenden Einflüssen der ROS kommt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle hinzu, die in der Ischämie beginnt und in der Reperfusion durch geschädigte sarkolemmale Membranen und den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher noch verstärkt wird. Auf Grund der wiederhergestellten Mitochondrienfunktion und der damit verbundenen ATP-Generierung, führt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuss nun zur Hyperkontraktion der Kardiomyozyten und somit zur Schädigung der Zelle [7] (Abb. 1).

Außerdem sorgt das normalisierte mitochondriale Membranpotential in diesem Zusammenhang für einen starken/erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Mitochondrien. Zusammen mit den ROS und dem Wegfall des inhibitorischen Effektes eines sauren pH führt dies zu einer Öffnung der MPTP [7] (Abb. 1).

Die schnelle Normalisierung des pH erfolgt über das Auswaschen von Laktat und durch  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -, sowie  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Transporter. Wie oben erwähnt, trägt auch dies zur MPTP-Öffnung bei.

Einige Zeit nach Beginn der Reperfusion akkumulieren Neutrophile, als Antwort auf chemotaktische Signale (ROS, Zytokine, aktiviertes Komplement), im infarzierten Areal und migrieren über Zelladhäsions-Moleküle in das myokardiale Gewebe. Sie tragen zur Gewebeschädigung bei über die Freisetzung von ROS, über die Verstopfung von Blutgefäßen und abbauende Enzyme [7] (Abb. 1).

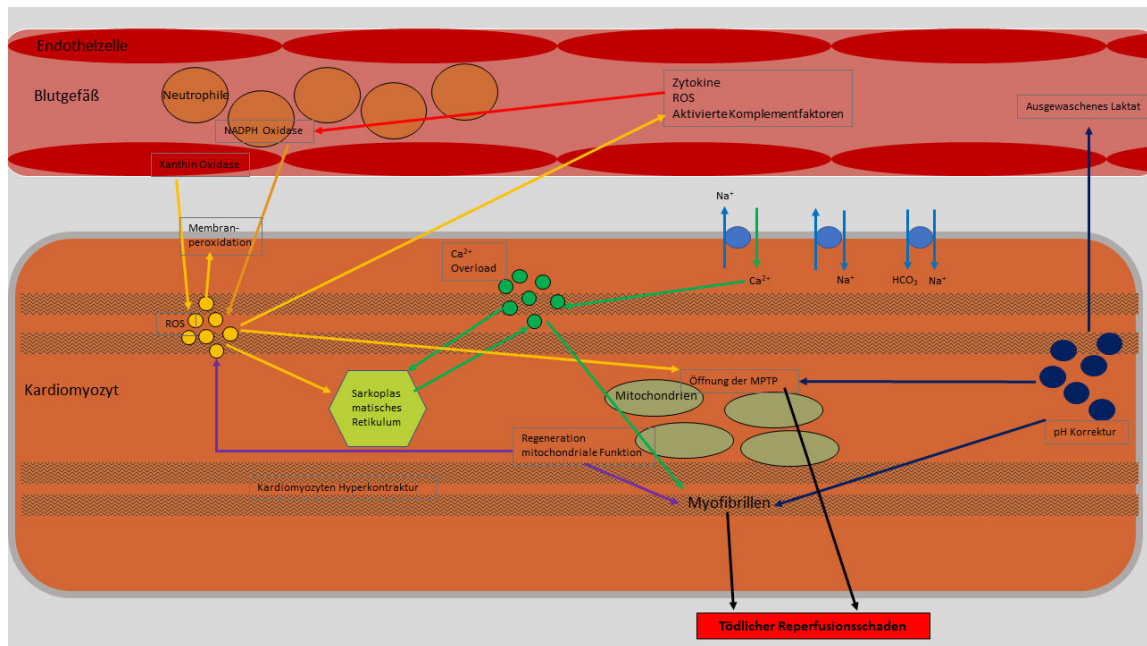


Abb. 1 **Mediatoren des Reperfusionsschadens.** Veränderungen während der Ischämie des Myokards können, in Verbindung mit den abrupten biochemischen und metabolischen Veränderungen der Reperfusion, zum Zelltod führen. Dazu gehören die Regeneration der mitochondrialen Funktion, die Generierung von ROS (*reactive oxygen species*, gelb), eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung ( $\text{Ca}^{2+}$ -Overload, grün), die schnelle Wiederherstellung eines physiologischen pH (*pH-Korrektur*, dunkelblau) und Entzündungsreaktionen, die alle zusammen zur Öffnung der MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) und der Hyperkontraktion der Kardiomyozyten beitragen. [7].

Auf Basis dieser vermuteten Zusammenhänge wurde versucht, verschiedene Mediatoren des Reperfusionsschadens gezielt auszuschalten, was allerdings nur unbefriedigende oder kontroverse Ergebnisse hervorbrachte [7].

Vielversprechender könnten hier Ansätze sein, die nicht nur einen Mediator zum Ziel haben. Hierzu zählt beispielsweise das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC).

## 1.2 Ischämische Präkonditionierung als Möglichkeit der Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens

1986 beschrieben Murry *et al.* [8] eine Form der Kardioprotektion, durch die der I/R-induzierte Gewebeschaden signifikant reduziert werden konnte. In dieser Studie wurden anästhesierte Hunde vier Zyklen 5-minütiger Myokardischämie, unterbrochen von jeweils fünf Minuten Reperfusion, unterzogen. Gefolgt wurde diese Präkonditionierung von einer einzelnen, 40-minütigen Ischämie. Die Infarktgrößen wurden mit einer

Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung verglichen und es zeigte sich, dass die Infarktgrößen in der präkonditionierten Gruppe um 75 % in Relation zur Kontrollgruppe reduziert waren. Des Weiteren wurde die kardiale Dysfunktion, gekennzeichnet durch z.B. Rhythmusstörungen oder reduzierte Kontraktionskraft, wesentlich verbessert. Dieses Phänomen wurde als *ischemic preconditioning* (IPC) bezeichnet [8].

In der Folge wurde dieses Phänomen intensiv untersucht und in einer Vielzahl von Studien bestätigt.

Trotz mehr als 30-jähriger Forschung seit der Erstbeschreibung der IPC sind die komplexen, zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt.

Allerdings existiert eine akzeptierte Theorie zu den Abläufen nach einem IPC-Stimulus [9-11]. Demnach sind Faktoren beteiligt, die sich in drei Gruppen aufteilen lassen: Trigger-Faktoren, intrazelluläre Mediatoren und Effektoren.

Durch den IPC-Stimulus werden u. a. Adenosin, Bradykinin und Opiode als Trigger ausgeschüttet und binden an die entsprechenden G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren auf den Kardiomyozyten, wodurch komplexe Signalkaskaden aktiviert werden. Dabei spielt, zu Beginn der Ischämie, die Aktivierung von Kinasen eine wichtige Rolle (z. B.  $\epsilon$ -Isoform der Protein-Kinase C, Stickstoffmonoxid-vermittelte Aktivierung der Protein-Kinase G). Während der frühen Reperfusion spielt der so genannte „*RISK-Pathway*“ (*reperfusion injury salvage kinase pathway*) eine entscheidende Rolle. Daran beteiligt sind unter anderem die Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt und die Extrazellulär-Regulierte-Kinase ERK.

Es gibt Hinweise darauf, dass diese Konstellation von Signalen letztendlich die Mitochondrien der Kardiomyozyten erreicht und die Öffnung der MPTP inhibiert. Dadurch werden die mitochondrialen Membranen stabilisiert und ihre Schwellung und Ruptur verhindert [12].

Nachdem der protektive Effekt einer IPC durch eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen ausreichend belegt war, übertrugen *Yellon et al. 1993* als erste die IPC auf ein klinisches Setting [13]. In einer randomisierten, kontrollierten Studie wurde bei Patienten, die sich einer Bypass-Operation, mit Anwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM), unterziehen mussten, ein IPC-Protokoll angewendet. Dabei wurde die ascendierende Aorta zweimal für drei Minuten abgebunden, jeweils unterbrochen von einer 2-minütigen Reperfusion. Als Endpunkt der Studie wurden ATP-Level in Myokardbiopsien der verschiedenen Versuchsgruppen gemessen. Es zeigten sich postoperativ erhöhte ATP-Level im Myokard der präkonditionierten Gruppe im

Vergleich zu der nicht präkonditionierten Kontrollgruppe im Sinne eines verlangsamten ATP-Abbaus [13].

Eine Metaanalyse von 2008 analysierte 22 randomisierte, kontrollierte klinische Studien aus über 10 Jahren IPC-Forschung. Die eingeschlossenen 933 Patienten wurden einer Bypass-Operation, angeschlossen an die HLM, unterzogen und erhielten außerdem eine kardioplege Lösung. Im Ergebnis zeigte sich eine signifikante Reduktion postoperativer ventrikulärer Arrhythmien, der nötigen inotropen Unterstützung, sowie der intensivmedizinischen Betreuung [14].

Die eingeschlossenen Studien analysierten allerdings nicht den Effekt auf die Prognose der Patienten.

Der praktische Nutzen der IPC ist sehr limitiert und umstritten, da es sich um eine sehr invasive Maßnahme handelt. Weiterhin ist ihr Einsatz elektiven Eingriffen vorbehalten. Eine weitere Einschränkung der Anwendung besteht darin, dass es durch die Manipulation an der Aorta oder anderen Gefäßen zur Mobilisation von Thromben kommen kann und in der Folge zu Komplikationen durch Embolien. So wurde eine hohe Rate an neurologischen Komplikationen auf eine IPC-Intervention folgend festgestellt [15].

Es zeigt sich also, dass der klinische Einsatz der IPC, trotz des deutlich protektiven Effektes, nur sehr limitiert möglich ist. Um die positiven Effekte der IPC also nutzen zu können, bedarf es anderer Strategien, die auf demselben Konzept beruhen, aber weniger invasiv und einfacher durchzuführen sind. Einen möglichen Ansatz stellt hier die Fernpräkonditionierung (RIPC) dar, die im Folgenden näher beschrieben werden soll.

### ***1.3 Weiterentwicklung der IPC zum Konzept der RIPC***

Eine andere Variante der Präkonditionierung wurde 1993 von Przyklenk und Mitarbeitern beschrieben [16]. In dieser Studie an anästhesierten Hunden wurde das linke, anteriore, descendierende Koronarzugsflussgebiet viermal kurzen Phasen Ischämie mit Reperfusion (I/R-Phasen) ausgesetzt. Nach der darauffolgenden, einstündigen Ischämie zeigte sich eine signifikant reduzierte Infarktgröße im Stromgebiet der *Arteria Circumflexa*.

Dieses Prinzip wurde später zum Konzept des „remote ischemic preconditioning“ (RIPC, ischämische Fernpräkonditionierung) ausgeweitet. Dabei zeigte sich, dass eine



Präkonditionierung auch an einem herzfernen Organ angewendet werden kann und sich der schützende Effekt am Erfolgsorgan trotzdem einstellt [17, 18].

Die eigentliche Translation der RIPC in die Klinik wurde jedoch erst dadurch möglich, dass der beschriebene Effekt auch nicht-invasiv durch I/R-Phasen an einer Extremität, mit Hilfe eines Tourniquets, auslösbar ist [19, 20].

Des Weiteren wurde dieser Effekt zwischen den verschiedensten Organen nachgewiesen und beschränkt sich keineswegs nur auf die kardiale Protektion [21] (Abb. 2).

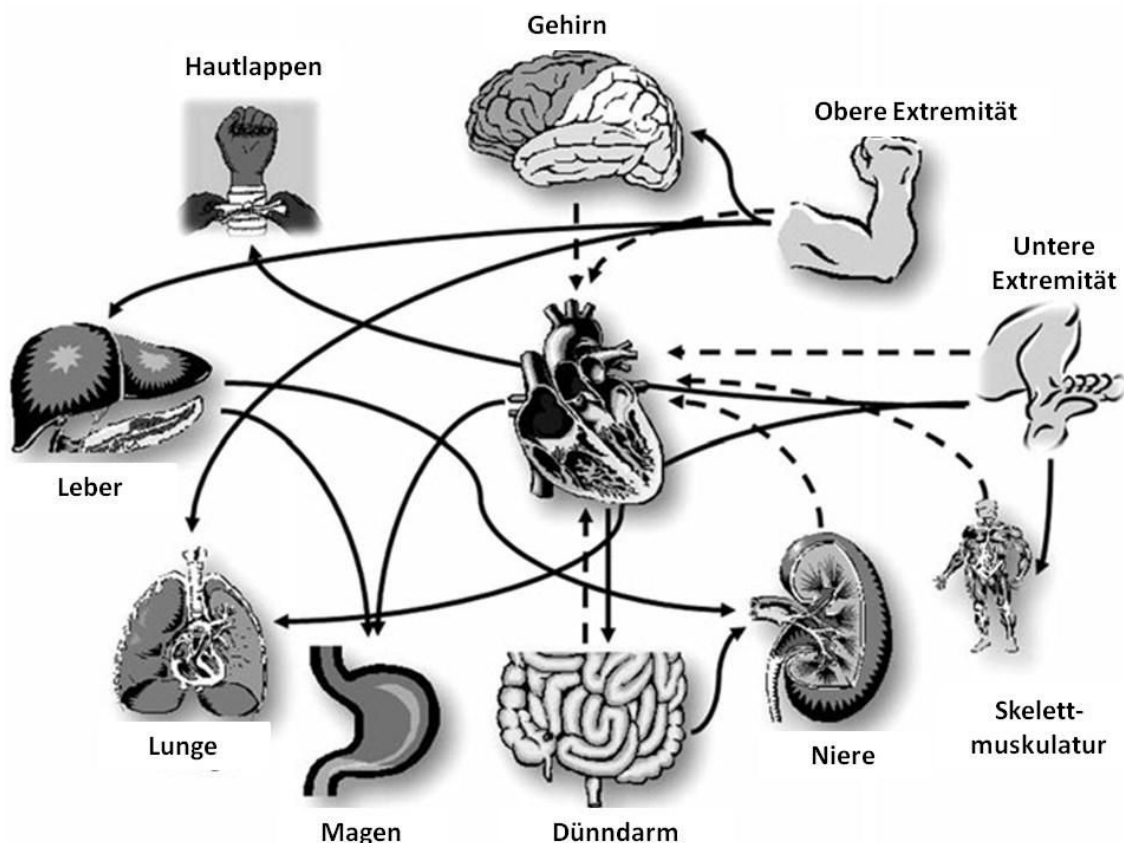


Abb. 2 **Kommunikation des RIPC-Stimulus zwischen den verschiedenen Erfolgsorganen.** Nach der Entdeckung, dass kurze I/R-Situationen eines distalen Organs zu einer myokardialen Infarktgrößenreduzierung führen (gestrichelt schwarze Pfeile entspringen am distalen Organ, welches zur kardialen Fernpräkonditionierung benutzt wurde), machte man diese Beobachtung auch bei anderen nicht-kardialen Organen (die durchgängig schwarzen Pfeile zeigen von dem Organ, an dem die Fernpräkonditionierung angewandt wurde, zu dem Organ, an welchem sich der protektive Effekt einstellte) [21]. Es zeigte sich, dass es sich um einen Effekt handelt, der zwischen verschiedensten Organen vermittelt werden kann. Abbildung modifiziert nach [21].

Die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen, was die Reaktionen am Myokard angeht, mit denen der IPC vergleichbar zu sein [22, 23].

Die spannende und bisher weitgehend ungeklärte Frage jedoch ist: Wie wird der Stimulus von dem Organ bzw. der Extremität, an dem die Präkonditionierung durchgeführt wird, zum Erfolgsorgan (z.B. das Herz) weitergeleitet?

Dazu existieren drei Theorien zu möglichen Signalwegen [21] (Abb. 3).

Die erste geht von einem afferenten neuronalen Signalweg aus, aktiviert über endogene Substanzen (wie beispielsweise Adenosin, Bradykinin oder *Calcitonin gene-related peptide* [CGRP]), die aus dem präkonditionierten Organ ausgeschüttet werden. Diese Afferenzen stimulieren Efferenzen, die wiederum am Herzen enden und die Kardioprotektion vermitteln. Unterstützt wird diese Theorie durch die Erkenntnis, dass Hexamethonium (ein Ganglion-Blocker) den kardioprotektiven Effekt einer RIPC aufheben kann [17].

Eine weitere Theorie postuliert eine systemische Antwort auf die transiente I/R-Situation, die Entzündungsreaktionen und Apoptose durch veränderte Gentranskription unterdrückt [24].

Die dritte Möglichkeit geht von humoralen Faktoren aus, die aus dem präkonditionierten Organ, während der sich an die kurze Ischämie anschließenden Reperfusionsphase, ausgewaschen werden, über das Blut transportiert werden und entsprechende Signalkaskaden am Erfolgsorgan auslösen. Unterstützt wird dies unter anderem durch eine Studie, die zeigte, dass Blut von einem präkonditionierten Kaninchenherz, wenn es auf ein unbehandeltes Kaninchenherz übertragen wird, ebenfalls eine Infarktgrößenreduzierung zur Folge hatte [25]. Die endogenen Substanzen, die dabei mit dem Blut transportiert werden, bleiben jedoch weitgehend unbekannt. In Frage kommen unter anderem Adenosin, Bradykinin, CGRP, Endocannabinoide, Angiotensin I oder andere, bis jetzt unbekannte Faktoren [21] (Abb. 3).

Eine Studie von Rassaf und Mitarbeitern [26] deutet auf eine zentrale Rolle von Stickstoffmonoxid/Nitrit bei der Signaltransduktion und Vermittlung des kardioprotektiven Effektes einer RIPC hin. In dieser Versuchsreihe wurden Mäuse *in vivo* vier Zyklen kurzer, femoraler Ischämie/Reperfusion mit anschließender, länger andauernder Ischämiephase unterzogen. Während der reaktiven Hyperämie der Reperfusion wurde eine deutlich erhöhte Ausschüttung von Stickstoffmonoxid festgestellt, ausgelöst durch die Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase. Anschließend wird das Stickstoffmonoxid zu Nitrit oxidiert, auf humoralem Wege zum Myokard transportiert und dort durch das myokardiale Myoglobin, sowie durch S-Nitrosation in der mitochondrialen Membran, wieder zu Stickstoffmonoxid

reduziert. Dies führte zu einer Reduktion der mitochondrialen Atmungskette, erniedrigter ROS-Produktion und letztendlich zu geringerer Infarktgröße.

Pharmakologische und genetische Inhibierung der Stickstoffmonoxid/Nitrit-Produktion führte zur Aufhebung des kardioprotektiven Effektes.

In einem zweiten Teil der Studie wurden gesunde Probanden einer RIPC unterzogen und das Plasma in einem Langendorff-Aufbau auf Mäuseherzen übertragen. Auch hier konnte Nitrit als kardioprotektiver Faktor identifiziert werden [26].

Auch wenn dieser Weg nur einer von vielen zu sein scheint, spielt er, nach diesen Ergebnissen zu urteilen, eine entscheidende Rolle. Außerdem ließe sich über diesen Mechanismus auch erklären, warum der RIPC-Effekt im Menschen teilweise nicht so ausgeprägt ausfällt, wie im Tiermodell, nimmt doch die endotheliale Funktion mit zunehmender Arteriosklerose und KHK ab [26].

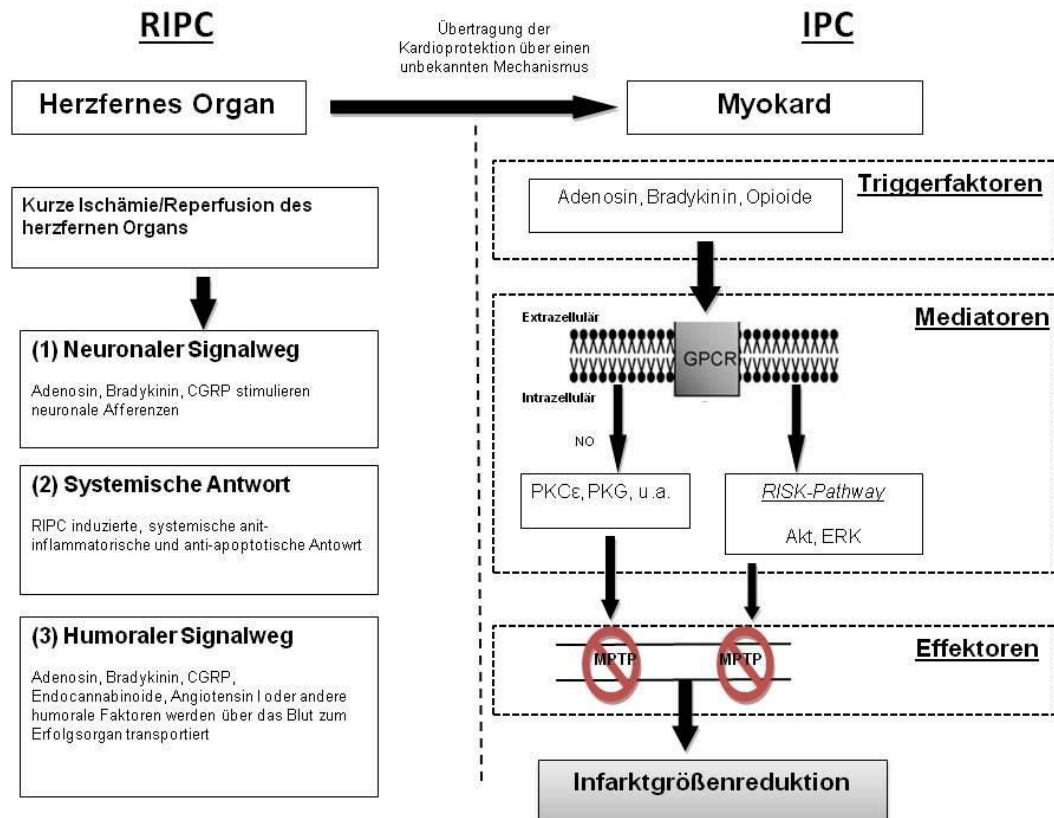


Abb. 3 **Mögliche Signalkaskaden für die RIPC und IPC.** Hier sind allgemein anerkannte Hypothesen gezeigt. Die Übertragung des kardioprotektiven Effektes vom präkonditionierten Organ könnte entweder durch (1) eine neuronale Übertragung geschehen, durch (2) eine systemische Antwort vermittelt werden oder auf (3) humoralen Wege zum Herz fortgeleitet werden. Eine Kombination der drei Signalwege wäre auch denkbar. Am Myokard werden, durch den fortgeleiteten Reiz, ähnliche Signalkaskaden angestoßen wie bei der einfachen IPC: Über ausgeschüttete Triggerfaktoren werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert, die intrazelluläre Mediatoren freisetzen. Diese Mediatoren inhibieren unter anderem die Öffnung mitochondrialer Poren (MPTP) und verhindern so ihre Schwellung und Ruptur. CGRP = Calcitonin gene-related peptide; GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PKCε = ε-Isoform der Protein-Kinase C ; PKG = Protein-Kinase G; RISK-Pathway = reperfusion injury salvage kinase pathway; Akt. = Phosphatidylinositol 3 Kinase; ERK = Extrazellulär-Regulierte-Kinase; MPTP = mitochondrial permeability transition pore. Modifiziert nach [21]

Die RIPC ist eine Methode der Kardioprotektion, die durch ihre geringe Invasivität und einfache Anwendung für den klinischen Gebrauch sehr vielversprechend ist.

Zum ersten Mal erfolgreich am Menschen nachgewiesen wurde der protektive Effekt der RIPC 2006 von *Cheung et al.* [27]. Dabei wurden 17 Kinder mit kongenitalem Herzfehler, die sich einer Korrekturoperation unterzogen, mit vier 5-minütigen Zyklen einer Beinischämie präkonditioniert, während 20 Kontrollpatienten nur der Operation unterzogen wurden. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten, protektiven Effekt der Präkonditionierung, bezogen auf die Endpunkte Troponin-I-Spiegel, Atemwegswiderstand und postoperativ benötigte inotrope Unterstützung [27].

Auch am erwachsenen Patienten wurden die protektiven Effekte der RIPC nach elektiver Herzchirurgie nachgewiesen. So zeigte *Hausenloy und Kollegen 2007* eine signifikante Reduktion der Troponin-T-Ausschüttung bei 27 präkonditionierten Patienten nach einer elektiven Bypass-Operation, im Vergleich zu 30 Kontrollpatienten [28]. Diese Ergebnisse wurden in verschiedenen Studien bei Bypass-Operationen mit Einsatz der HLM bestätigt [29, 30].

Andererseits zeigte eine große Studie dieses Thema betreffend (162 Patienten, randomisiert auf eine RIPC- und eine Kontroll-Gruppe) keine Vorteile einer RIPC bei Bypass-Operationen, bezüglich des Auftretens eines Myokardschadens, EKG-Veränderungen, inotroper Unterstützung, Nieren- oder Lungenschäden [31].

Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass einige Patienten durch vorangegangene *Angina pectoris* Episoden bereits präkonditioniert wurden [32].

Des Weiteren könnte es sich um einen inadäquaten RIPC-Stimulus gehandelt haben, d.h. ein Stimulus unzureichender Dauer oder Intensität. Es ist zudem denkbar, dass die Gabe von intravenösen Nitraten mit den Ergebnissen interferierte [33].

Ein ähnlich inhomogenes Bild ergibt sich aus Studien, die eine Kardioprotektion durch RIPC bei Operationen zur Ausschaltung eines abdominellen Aorten-Aneurysmas (AAA) und bei PTCA-Interventionen untersuchten.

In beiden Fällen existieren Studien, die einen protektiven Effekt nachwiesen [34-36], als auch solche, die keine Protektion zeigten [37-40]. Die erste Studie, die die Auswirkungen der RIPC bei PTCA-Interventionen untersuchte, postulierte sogar einen schädigenden Effekt der RIPC [41].

Eine erschienene große prospektive, randomisierte, kontrollierte, multizentrische Doppelblindstudie von Meybohm und Kollegen konnte ebenfalls keinen Effekt einer RIPC-Intervention bei kardiochirurgischen Patienten nachweisen. 1385 Patienten, die einem elektiven, kardiochirurgischen Eingriff mit kardiopulmonalem Bypass unter totaler intravenöser Anästhesie mittels Propofol unterzogen wurden, wurden entweder einer RIPC-Gruppe oder einer Kontrollgruppe randomisiert zugeteilt. Während der Anästhesie erhielt eine Gruppe eine RIPC der oberen Extremitäten, während bei der anderen eine Scheinintervention an einem Dummy-Arm durchgeführt wurde. Als primäre Endpunkte dienten unter anderem die Ereignisse Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und akutes Nierenversagen bis zum Zeitpunkt der Entlassung. Sekundäre Endpunkte stellten das Eintreffen eines dieser Ereignisse nach 90 Tagen dar. Im Ergebnis zeigte sich kein Unterschied im Outcome der RIPC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [42]. Auch

Healy et.al. konnten in einer Meta-Analyse von 23 Studien mit 2200 eingeschlossenen Patienten keinen klinischen Nutzen der RIPC zeigen [43].

Die großen Studien RIPHeart und ERICCA [44, 45] mit jeweils 1403 respektive 1612 Patienten konnten ebenfalls keinen Benefit, jedoch auch keine schädlichen Effekte, bezüglich einer RIPC, die vor einer Herzoperation durchgeführt wurde, feststellen.

Die insgesamt sehr inhomogene Studienlage lässt sich auf verschiedene Faktoren zurückführen: So könnten beispielsweise unterschiedliche RIPC-Protokolle für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein, da noch kein Konsensus für das wirksamste Protokoll gefunden wurde.

Aber auch andere Störfaktoren, die alle sowohl die Ausmaße des I/R-Schadens, als auch die Stärke der Kardioprotektion verändern können, beeinflussen die Ergebnisse wahrscheinlich erheblich. Darunter sind vor allem Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und Medikation der Patienten zu zählen[46].

Zusammenfassend stellt die RIPC ein vielversprechendes Konzept der Kardioprotektion dar, dessen zugrundeliegenden Mechanismen jedoch noch nicht ausreichend verstanden sind, um inhomogene Ergebnisse in verschiedenen klinischen Studien erklären zu können. Hierzu zählt auch die Tatsache, dass es sich bei der IPC, so wie auch bei der RIPC, um ein biphasisches Phänomen zu handeln scheint, mit einer frühen und einer späten Phase der Protektion[47].

### ***1.4 Frühe und späte Phase der Präkonditionierung***

Die erste Phase einer Präkonditionierung zeigt sich direkt nach dem Stimulus und hält etwa 1-2 Stunden an. Danach ist ein protektiver Effekt nicht mehr nachweisbar. Diese Phase wird als frühes oder erstes Fenster der Präkonditionierung bezeichnet.

1993 machten sowohl Yellons Forschungsgruppe [48], als auch Kuzuya und Mitarbeiter [49] die Beobachtung, dass der protektive Effekt einer Präkonditionierung nach 24 Stunden wieder einsetzte. Dies wird als spätes oder zweites Fenster der Präkonditionierung bezeichnet.

Dabei scheint es so zu sein, dass die späte Präkonditionierung zwar robust und nachweisbar ist, aber weniger stark infarktlimitierend wirkt als die frühe.

Was die zugrunde liegenden Mechanismen angeht, findet die späte Präkonditionierung vor allem auf dem Boden einer *de novo* Proteinsynthese von distalen Mediatoren, wie

beispielsweise iNOS und COX-2, statt, die durch verschiedene Faktoren in der frühen Phase angeregt wird [47]. Auch hier gibt es noch viele Faktoren, die unbekannt sind.

Der klinische Nutzen der späten Präkonditionierung ist ebenfalls noch unklar und beschränkt sich vor allem auf planbare klinische Anwendungsgebiete, wie beispielsweise die Herzchirurgie. Hier könnte sie jedoch nützlich sein, da die Intervention nicht zwingend 1-2 Stunden vor dem Eingriff erfolgen müsste, sondern eben auch 12-24 Stunden vorher angewandt werden könnte. Dies wäre weniger anfällig für Änderungen in der Operationsplanung im Krankenhausalltag [47].

Auch die späte Präkonditionierung betreffend, ist die RPC die, in der klinischen Praxis, relevantere Methode, da sie weniger invasiv und somit einfacher anwendbar ist. Für die klinische Praxis im Besonderen relevant sind jedoch zunächst die geschlechtsspezifischen Unterschiede einer Präkonditionierung und die Gründe für diese, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

### ***1.5 Unterschiedliche Effekte der RPC bei Männern und Frauen***

Schon das gesunde Herz zeigt deutliche Geschlechterunterschiede. So ist das männliche Herz 15 % - 30 % schwerer [50], zeigt eine deutlich höhere, altersunabhängige Apoptose-Rate [51], schlägt 3-5 Schläge langsamer [52] und zeigt einen höheren systolischen und diastolischen Blutdruck als das weibliche prämenopausale Herz. Außerdem lässt sich bei postmenopausalen Frauen, im Vergleich mit prämenopausalen, ein höherer Blutdruck feststellen [53].

Auch in Bezug auf pathologische Prozesse des Herzens zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern. So lässt sich generell sagen, dass Männer ein höheres Risiko haben an einer kardiovaskulären Erkrankung (u.a. KHK, Bluthochdruck, Arrhythmien, Herzinsuffizienz) zu erkranken, als gleichaltrige prämenopausale Frauen. Nach der Menopause steigen die Inzidenzen allerdings bei Frauen ebenfalls an [50].

Auf molekularer Ebene gibt es sowohl deutliche Unterschiede im Calcium-Metabolismus des Herzmuskels [54], als auch in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme der kardialen Mitochondrien [55]. Bei Frauen sind die kardiomyozytären Mitochondrien bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in der Lage ihr Membranpotential aufrechtzuerhalten als bei Männern. Zusätzlich zeigten Colom et al. [56], dass Mitochondrien bei Frauen effizienter arbeiten und weniger freie

Radikale generieren. Diese Beobachtungen könnten Erklärungen liefern, warum das weibliche Myokard von einer I/R weniger geschädigt wird [57, 58].

Prämenopausale Frauen sind, im Vergleich zu gleichaltrigen Männern, erst 10 Jahre später von einer KHK und 20 Jahre später von einem Myokardinfarkt betroffen [50]. Das KHK-Risiko von postmenopausalen Frauen verzehnfacht sich im Vergleich zu Frauen vor der Menopause. Stellt man dieselben Altersgruppen bei Männern gegenüber zeigt sich nur ein Risikoanstieg um das 4- bis 6-fache [59].

Durch die Veränderungen im weiblichen Risikoprofil nach der Menopause, liegt die Vermutung nahe, dass der sinkende Östrogenspiegel bei Frauen ursächlich für diesen Effekt sein könnte. Allerdings ergaben Studien zur postmenopausalen Östrogensubstitution sogar eine erhöhte Inzidenz der koronaren Herzkrankheit (KHK) [60, 61].

Hale et al. zeigten in einer Studie den protektiven Effekt des 17- $\beta$ -Estradiols im Tierversuch. Kaninchen wurde ein i.v. Bolus 17- $\beta$ -Estradiol verabreicht und anschließend eine 30minütige Ischämie eingeleitet mit anschließender 4-stündiger Reperfusion. Die Kontrollgruppe erhielt 17- $\alpha$ -Estradiol, eine natürliche Estradiol-Form ohne biologische Effekte. Kaninchen, die 17- $\beta$ -Estradiol erhielten, entwickelten eine signifikant geringere Nekroserate als die Kontrollgruppe [62].

Um die Rolle von Östradiol in der Kardioprotektion zu zeigen, verglichen Lagranha et al. in einem Langendorff-Experiment die postischämische Infarktgröße und Herzfunktion von ovariectomierten weiblichen Ratten mit intakten weiblichen Ratten. Außerdem verglichen sie diese Parameter bei normalen männlichen Ratten mit männlichen Ratten, die zwei Wochen lang mit Östradiol behandelt worden waren. Es zeigte sich, dass bei ovariectomierten Weibchen im Vergleich zu intakten Weibchen sowohl die Nekroserate signifikant größer war als auch die Herzfunktion signifikant schlechter. Ebenso zeigten Estradiol behandelte Männchen eine geringere Nekroserate und bessere postischämische Herzfunktion als nicht behandelte Männchen [63]. Östrogen scheint also tatsächlich ein Grund für die Unterschiede in der Kardioprotektion von Männern und Frauen zu sein. Es konnte außerdem dargestellt werden, dass Östrogen ein Aktivator der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist und diese wiederum scheint eine wichtige Rolle in der Kardioprotektion zu spielen [64]. So aktiviert PI3K beispielsweise die Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2), welche ihrerseits kardioprotektiv wirkt, indem sie Aldehyd-Addukte abfängt, die von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden [65].



Lagranha et al. zeigten, dass Wortmannin (WM), ein Inhibitor der PIK3, die Protektion und die erhöhte Phosphorylierung von ALDH2 bei weiblichen Ratten aufhob, bei Männchen jedoch keinen Effekt hatte [63]. Damit zeigten sie die Beteiligung des PIK3-ALDH2-Signalwegs an der östrogenvermittelten Protektion in weiblichen Ratten.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Kardioprotektion sind bisher wenig untersucht. Allerdings geben experimentelle Studien Hinweise darauf, dass eine Präkonditionierung prinzipiell sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Versuchstieren möglich ist [66, 67].

*Song und Kollegen* [68] zeigten in einer Studie, dass die Herzen von gesunden, weiblichen Mäusen mit zwei Zyklen 2-minütiger Ischämie und fünf Minuten Reperfusion nicht präkonditioniert werden konnten, während dies bei männlichen Mäusen durchaus der Fall war. Allerdings wies die weibliche Kontrollgruppe, auch ohne Präkonditionierung, vergleichbare Infarktgrößen, wie die präkonditionierten, männlichen Mäuse auf.

Im Gegensatz zu dieser Studie kamen *Humphreys et al.* [69] zu dem Schluss, dass weibliche Ratten sehr wohl präkonditioniert werden können. Sie zeigten in einem *in vivo* Modell, dass ein 3-minütiger Verschluss einer Koronararterie mit anschließender Reperfusion das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ratten signifikant reduzierte.

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Kardioprotektion betreffend ist die Datenlage also noch immer unklar. Sicher scheint nur, dass Östrogen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Kardioprotektion spielt und somit unter anderem verantwortlich ist für die Geschlechterunterschiede, sowie altersabhängige Effekte einer Präkonditionierung bei Frauen. Zu diesem Thema lieferten Heinen et al. in einer kürzlich veröffentlichten Studie, zu der auch die vorliegende Arbeit beigetragen hat, weitere Hinweise [1]. So wurde der potenzielle Einfluss von Östrogen auf eine humoral vermittelte Kardioprotektion untersucht, indem isoliert perfundierte Rattenherzen mit Kontroll- und RIPC-Plasma junger, weiblicher Probanden behandelt wurden. Im Anschluss wurden dieselben Versuche an Rattenherzen durchgeführt, die vorher mit dem nicht-selektiven Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant behandelt wurden. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Infarktgrößen [1]. Dies deutet daraufhin, dass Östrogen keinen modulierenden Effekt auf den humoralen vermittelten Effekt der RIPC hat.

Zur Gewinnung detaillierterer Erkenntnisse sind auch hier weitere, umfassendere Studien nötig. Unter anderem sind Grundsatzstudien, wie die vorliegende, sinnvoll, um zu Grunde

liegende Mechanismen zu verstehen. Ein wertvoller Ansatz für diese Art von Grundlagenforschung ist schon seit über 100 Jahren das Langendorff-Modell.

### ***1.6 Das Langendorff-Modell***

Seit Oscar Langendorff 1895 das Modell des isoliert perfundierten Herzens etablierte, stellte diese Methode die Grundlage für viele Erkenntnisse die Herzphysiologie betreffend, sowie pathologische Prozesse, pharmakologische Einflussmöglichkeiten und genetische Modifizierungen [70].

Das Langendorff-Modell besteht aus einem isolierten Herzen, welches über die Aorta retrograd kanüliert und mit einem blutähnlichen Puffer perfundiert wird. Die retrograde Perfusion sorgt für den Schluss der Aortenklappe und das Perfusat gelangt so in die Koronarien und unterhält die Vitalität des Herzens. Durch diesen Ansatz kann die Herzfunktion losgelöst von systemischen Einflüssen untersucht werden.

Das Langendorff-Modell wurde auch für die vorliegende Studie als Versuchsaufbau gewählt.

### ***1.7 Ziele der Arbeit***

Der oben beschriebene Forschungsstand auf dem Gebiet der Präkonditionierung lässt viele Fragen unbeantwortet. Diese Arbeit hatte zum Ziel einen Beitrag zur Klärung von einigen davon zu leisten:

So konnten zwar Hinweise auf die Beteiligung humoraler Faktoren gefunden werden und es gibt verschiedene, die in Frage kämen, unklar ist jedoch welche dies genau sind und ob sie eine entscheidende Rolle spielen. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage gestellt:

**-Sind humorale Faktoren bei der Übertragung der Protektion einer RIPC beteiligt und ist es möglich diesen protektiven Effekt vom Menschen auf ein Rattenherz mittels Plasma zu übertragen?**

Zudem gibt es oben erwähnte Studien, die einen Geschlechterunterschied bei der RIPC postulieren und als ein Hauptmediator wird Östrogen vermutet. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Frage gestellt:

**-Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede im Ausmaß der Protektion bei jungen, gesunden Probanden?**

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine in vivo RIPC bei jungen (18-30 Jahre), männlichen und weiblichen Probanden durchgeführt und Blut vor, sowie nach der Intervention entnommen. Zur Untersuchung des protektiven Effektes von humoralen Faktoren im Probandenblut wurde aus dem entnommenen Blut Plasma gewonnen und dieses auf isolierte, perfundierte Rattenherzen übertragen. Anschließend wurden die Herzen einer I/R Situation unterzogen. Zur Quantifizierung der Protektion wurde die Infarktgröße bestimmt. Die vorliegende Studie beschränkte sich dabei auf junge Probanden, um einen Alterseffekt auszuschließen.

Die durchgeführte Studie soll einen Beitrag zur Klärung der Mechanismen der Fernpräkonditionierung leisten. Es ist wichtig diese zu verstehen, damit diese einfache und kostengünstige Methode klinisch besser eingesetzt werden kann. Sie birgt das Potential, vielen Patienten in kardiovaskulären Risikosituation zu helfen. Aber bis jetzt werfen die kontroversen Ergebnisse in klinischen Settings und bezüglich der Geschlechterunterschiede zu viele Fragen auf, als dass Fernpräkonditionierung Einzug in den klinischen Alltag halten könnte.

## **2. Material und Methoden**

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden gemäß dem vorliegenden Votum der Ethikkommission vom 27.02.2013 (Referenznummer: 3911) durchgeführt.

**2.1 Verwendete Materialien**

| <b>Substanzen</b>                                                                                | <b>Hersteller</b>                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| NaCl                                                                                             | Prolabo; Leuven, Belgium                                          |
| KCl                                                                                              | MERCK Eurolab GmbH; Darmstadt                                     |
| MgSO <sub>2</sub> + 7H <sub>2</sub> O                                                            | MERCK Eurolab GmbH; Darmstadt                                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                                                  | MERCK Eurolab GmbH; Darmstadt                                     |
| NaHCO <sub>3</sub>                                                                               | FLUKA Chemie GmbH; Buchs, Schweiz                                 |
| EDTA                                                                                             | SIGMA-Aldrich Chemie GmbH; München                                |
| CaCl <sub>2</sub>                                                                                | MERCK Eurolab GmbH; Darmstadt                                     |
| D-Glucose                                                                                        | ROTH; Karlsruhe                                                   |
| Laktat (L-Lactic acid-Na-salt)                                                                   | SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg                            |
| Pentobarbital (Narcoren®)<br>Ch.B.86073                                                          | Merial GmbH, Hallbergmoos                                         |
| Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml,<br>Ch.B.010242                                                   | ratiopharm GmbH, Ulm                                              |
| TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)<br>Lot.:111722                                           | SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg                            |
| Carbogen (5% CO <sub>2</sub> ; 95% O <sub>2</sub> )                                              | Linde-AG; 82049 Pullach                                           |
| Stickstoff                                                                                       | Linde-AG; 82049 Pullach                                           |
|                                                                                                  |                                                                   |
| <b>Verbrauchsmaterialien</b>                                                                     | <b>Hersteller</b>                                                 |
| Schwangerschaftstest DiaView hCG;<br>Artikel-Nr. 50150                                           | DIAGONAL GmbH & Co.KG;<br>Münster                                 |
| Guillotine: Biological Research<br>Applikationsaratus; Modell: 7950, Serien-<br>Nr.:045017 12070 | UGO BASILE S.R.L.; Gemonio VA,<br>Italien                         |
| Tygon Schlauch R 3630, Innendurchmesser:<br>3,2mm, Außendurchmesser:6,4mm                        | Saint-Gobain Performance Plastics<br>Verneret; Charny, Frankreich |

|                                                         |                                                                                    |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Schlauch F11794, Innendurchmesser:<br>3,16mm            | Gilson; Villiers le Bel, Frankreich                                                |
| Schlauch F117943 , Innendurchmesser:<br>1,65mm          | Gilson; Villiers le Bel, Frankreich                                                |
|                                                         |                                                                                    |
| <b>Geräte</b>                                           | <b>Hersteller</b>                                                                  |
| Zentrifuge Rotina 420R; Typ: 4706; Werk<br>Nr.: 0010238 | Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich<br>GmbH & Co. KG, Tuttlingen,<br>Deutschland; |
| Peristaltic Pump 250V, 100/120V-0,5A;<br>610C2271       | Made in France                                                                     |
| Wasserbad, Modell EC                                    | Julabo; Seelbach                                                                   |
| Wasserbad, Modell MW-6                                  | Julabo; Seelbach                                                                   |
| Pacer, Typ TG2/8                                        | ifd, Ingenieur Büro für<br>Datenverarbeitung; Berlin                               |
| Perfusors, Perfusor®Space, Typ 8713030                  | B Braun, Carl-Braun-Straße 1, 34212<br>Melsungen                                   |
| Scanner – CanoScan Live 700F 5238714                    | Canon Solutions; USA                                                               |
|                                                         |                                                                                    |
| <b>Computerprogramme</b>                                | <b>Hersteller</b>                                                                  |
| SigmaScan Pro Version 5                                 | Systat Software GmbH;<br>Schimmelbuschstrasse 25; D-40699<br>Erkrath               |
| LabChart 7, v7.3.7                                      | AD Instruments Ltd., Bishop Mews<br>Transport Way, Oxford OX4 GHD, UK              |
| GraphPad PRISM 6 ®                                      | GraphPad Software Inc., La Jolla,<br>Kalifornien, USA                              |
| SPSS Science Software, Version 12.0.1                   | SPSS Science Software GmbH. Erkrath,<br>Deutschland                                |

Tabelle 1: **Verwendete Materialien.** Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Computerprogramme, die in der Arbeit verwendet wurden und auf die im Text eingegangen wird.

### **2.2 Studienaufbau**

Den Versuchen zur Fernpräkonditionierung ging eine Versuchsreihe am isolierten Rattenherz voraus, in der die klassische ischämische Präkonditionierung einer Kontrollgruppe ohne Präkonditionierung (Kontrolle) gegenübergestellt wurde. Die Gruppengröße betrug dabei jeweils  $n=5$ .

Da der protektive Effekt der IPC schon vielfach belegt worden ist, diente diese Versuchsreihe der Bestätigung, dass das verwendete Modell dazu geeignet war, eine eventuelle Infarktgrößenreduzierung zu detektieren.

Der Teil der Studie, der sich mit ischämischer Fernpräkonditionierung beschäftigte, bestand aus mehreren Untersuchungsabschnitten. Zunächst wurden 10 männliche und 10 weibliche Probanden einer Fernpräkonditionierung (RIPC) unterzogen, um Kontroll-, sowie präkonditioniertes Blutplasma (*RIPC*-Plasma) zu gewinnen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Testung der kardioprotektiven Potenz des *RIPC*-Plasmas im Vergleich zum Kontrollplasma am isoliert perfundierten Rattenherzen (Langendorff-Apparatur). Die Ergebnisse wurden ebenfalls im Hinblick auf Geschlechterunterschiede ausgewertet.

Die für die Auswertung relevante Größe ist das infarzierte Areal in Relation zum intakten Herzgewebe, sowie die hämodynamischen Parameter.

### **2.3 Gewinnung von humanem Kontroll- bzw. *RIPC*-Blutplasma**

Das Plasma, das im Verlauf der Versuche in die isoliert perfundierten Herzen infundiert wurde, wurde von 10 männlichen und 10 weiblichen Probanden, deren Alter zwischen 18 und 30 Jahren liegen musste, gewonnen (Mittelwert mit Standardabweichung sowohl männlicher als auch weiblicher Probanden  $23 \pm 1$  Jahr). Der mittlere Body Mass Index ( $BMI = \text{Körpergewicht in [kg]} / \text{Körpergröße zum Quadrat in [m}^2\text{]}$ ) der männlichen Teilnehmer betrug  $22,5 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ , der der weiblichen Probanden  $22 \pm 2 \text{ kg/m}^2$  (Tabelle 2).

| Studiennummer | Geschlecht | Alter | Größe [m] | Gewicht [kg] | BMI [kg/m <sup>2</sup> ] |
|---------------|------------|-------|-----------|--------------|--------------------------|
| 1             | Männlich   | 24    | 1,85      | 87           | 25,4                     |
| 2             | Weiblich   | 22    | 1,62      | 58           | 22,1                     |
| 3             | Weiblich   | 22    | 1,70      | 58           | 20,1                     |
| 4             | Weiblich   | 23    | 1,71      | 59           | 20,2                     |
| 5             | Männlich   | 24    | 1,75      | 68           | 22,2                     |
| 6             | Männlich   | 23    | 1,80      | 72           | 22,2                     |
| 7             | Männlich   | 22    | 1,80      | 70           | 21,6                     |
| 8             | Männlich   | 20    | 1,87      | 71           | 20,3                     |
| 9             | Männlich   | 24    | 1,89      | 83           | 23,2                     |
| 10            | Weiblich   | 23    | 1,68      | 62           | 22,0                     |
| 11            | Weiblich   | 23    | 1,72      | 72           | 24,3                     |
| 12            | Weiblich   | 23    | 1,72      | 62           | 21,0                     |
| 13            | Männlich   | 23    | 1,76      | 70           | 22,6                     |
| 14            | Männlich   | 23    | 1,83      | 85           | 25,4                     |
| 15            | Weiblich   | 21    | 1,56      | 50           | 20,5                     |
| 16            | Weiblich   | 23    | 1,68      | 66           | 23,4                     |
| 17            | Weiblich   | 22    | 1,68      | 56           | 19,8                     |
| 18            | Männlich   | 25    | 1,73      | 55           | 18,4                     |
| 19            | Weiblich   | 23    | 1,69      | 73           | 25,6                     |
| 20            | Männlich   | 24    | 1,80      | 76           | 23,5                     |

Tabelle 2: **Probandenliste**. Auflistung der Probanden, die an der Studie teilgenommen haben mit Alter, Geschlecht, Körpergröße [m], Gewicht [kg] und BMI [kg/m<sup>2</sup>]

Da jedem Studienteilnehmer Blut vor (Kontrollblut) und nach (RIPC-Blut) der Intervention entnommen wurde, ergeben sich insgesamt vier Versuchsgruppen mit jeweils n=10.

1. Kontrollplasma junge Männer (♂Kon.)
2. RIPC-Plasma junge Männer (♂RIPC)
3. Kontrollplasma junge Frauen (♀Kon.)
4. RIPC-Plasma junge Frauen (♀ RIPC)

### 2.3.1 Rekrutierung der Studienteilnehmer

Die Studienteilnehmer wurden über Aushänge geworben, die Teilnahme erfolgte freiwillig. Die Studienteilnehmer standen in keinem Abhängigkeitsverhältnis zu den Organisatoren der Studie.

### *Einschlusskriterien:*

- Schriftliches Einverständnis zur Teilnahme
- Alter zwischen 18 und 30 Jahren
- Altersgerechte körperliche Belastbarkeit
- voll funktionsfähige obere Extremität beidseits

### *Ausschlusskriterien:*

- Fehlendes Einverständnis
- Psychiatrische oder neurologische Störungen mit mangelnder Geschäftsfähigkeit
- Schwangerschaft
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit
- Diabetes mellitus
- Hypertonus
- Herzinsuffizienz NYHA > Stufe II
- Vorbestehende Nervenschäden an einem der Arme
- Z.n. thrombembolischen Ereignissen
- Raucher (innerhalb der letzten 5 Jahre, >10 pack years)
- Einnahme von Dauermedikation (exklusive Hormonpräparate zur Verhütung)
- Einnahme von Akutmedikamenten innerhalb der letzten 14 Tage
- Chronische Schmerzerkrankungen

### *2.3.2 Information, Aufklärung und Screening potentieller Studienteilnehmer*

Um das Vorliegen der Einschlusskriterien und etwaiger Ausschlusskriterien zu evaluieren, wurden Freiwillige, die sich als potentielle Studienteilnehmer meldeten, zunächst von einem Studienarzt über die Art der Studie und die damit verbundenen Interventionen in einem ausführlichen Gespräch informiert. Im Falle ihres grundsätzlichen Einverständnisses zur Studienteilnahme, wurden die Freiwilligen einer gründlichen Anamnese und einer allgemeinen körperlichen Untersuchung mit Auskultation, Palpation von Herz, Lungen und Abdomen und einer Messung des Blutdruckes an beiden Armen unterzogen. Bei den jungen Frauen wurde das Vorliegen einer Schwangerschaft durch einen Urin-Test (Tabelle 1) ausgeschlossen.

Lagen keine Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie vor, wurden die Freiwilligen um Ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme gebeten.



### 2.3.3 Datenmanagement

Die im Rahmen der Screening-Untersuchung erhobenen Daten wurden nur im Falle des schriftlichen Einverständnisses pseudonymisiert erfasst und in elektronischer Form gespeichert. Die Daten wurden in anonymer Form ausgewertet und veröffentlicht. Im Falle, dass ein Freiwilliger nicht an der Studie teilnahm, wurden keine Daten gespeichert.

### 2.3.4 Durchführung der RIPC

Die so ausgewählten Probanden wurden einer RIPC unterzogen. Dabei wurde die Blutzufuhr zum linken Arm durch Druck einer Blutdruckmanschette (Tabelle 1) (200 mmHg) dreimal für fünf Minuten unterbrochen, jeweils gefolgt von einer fünfminütigen Reperfusionphase.

Vor und nach der Präkonditionierung wurde den Probanden jeweils 50 ml Vollblut über eine Venenverweilkanüle (24 G) in der rechten Kubitalvene in Lithium-Heparin Probenbehältnisse entnommen (Kontroll- und RIPC-Blut). Die Venenverweilkanüle verblieb über die Dauer des Versuchs in der Vene.

Während des ganzen Ablaufs war, zusätzlich zu dem Untersucher, ständig ein Facharzt für Anästhesie anwesend.

Vor der Intervention wurden die Probanden nochmals befragt, ob ihr Gesundheitszustand seit der Screening-Untersuchung unverändert geblieben sei. Nur wenn dies der Fall war, wurde die RIPC durchgeführt.

### 2.3.5 Aufbereitung der Blutproben

Nach der Blutabnahme wurde das Blutplasma durch Zentrifugation gewonnen und bis zur späteren Verwendung bei -70 °C tiefgefroren gelagert.

Hierzu wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 *RCF* (*relative centrifugal force*) zentrifugiert.

### **2.4 Versuchsaufbau**

Die Testung der kardioprotektiven Potenz des RIPC-Plasmas und die Feststellung eventueller Geschlechterunterschiede erfolgten am isoliert perfundierten Rattenherzen (Langendorff-Herz).

Hierfür wurden, bei vorliegender Genehmigung vom 10.05.2012 (Referenznummer: O27/12; Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wiss. Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf), männliche WISTAR-Ratten (250-300 g) mit 100 mg/kg Pentobarbital gemischt mit 0,2 ml Heparin (Tabelle 1) intraperitoneal injiziert, um die Tiere zu anästhesieren und eine Blutkoagulation während der Organentnahme zu verhindern.

Nachdem eine tiefe Narkose eintrat (fehlender Zwischenzehenreflex), wurde das Versuchstier mittels einer Guillotine dekapitiert.

Anschließend wurde zügig mittels medianer Thorakotomie zuerst der Brustkorb und anschließend das Perikard eröffnet. Das nun freiliegende Herz wurde an seinem Gefäßstamm abgesetzt und unmittelbar in einen Behälter mit 0,9 % NaCl-Lösung gegeben.

In einem nächsten Schritt erfolgte der Anschluss des Herzens an eine Langendorff Anlage, indem die Aorta über eine Kanüle gezogen und mittels chirurgischer Knoten befestigt wurde. Im Anschluss an die Versuche wurden die Herzen in Scheiben geschnitten und luftgetrocknet. Das Herzgewicht wurde durch Wiegen der getrockneten Herzscheiben ermittelt.

#### **2.4.1 Die Langendorff Anlage**

An der Langendorff Anlage wurde das Herz retrograd über die aortale Kanüle perfundiert. Als Perfusat wurde ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer verwendet (Tabelle 3).

| Substanz                              | mM   |
|---------------------------------------|------|
| NaCl                                  | 118  |
| KCl                                   | 4,7  |
| MgSO <sub>2</sub> + 7H <sub>2</sub> O | 1,2  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 1,2  |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 25   |
| EDTA                                  | 0,5  |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 2,25 |
| D-Glucose                             | 11   |
| Laktat (L-Lactic acid-Na-salt)        | 1    |

Tabelle 3: **Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers.** Die aufgelisteten Chemikalien wurden in destilliertem Wasser zusammengeführt und mittels einer Rührplatte vermischt.

Dieser wurde mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>) während des gesamten Versuchs begast. Der Puffer wurde über ein Schlauchsystem (Innendurchmesser: 3,2 mm; zwei in die Pumpe eingespannte Schläuche: Innendurchmesser: 3,16 mm und Innendurchmesser: 1,65 mm, und wieder Innendurchmesser: 3,2 mm) durch eine Pumpe in das Herz gepumpt und anschließend verworfen (Abb. 4).

Damit das Perfusat bei Erreichen des Herzens eine Temperatur von ca. 37 °C hatte, wurde es in einem Wasserbad auf 45 °C permanent erwärmt und floss vor dem Herz durch zwei Wärmekammern (Abb. 4).

Um zusätzlich ein Auskühlen des hängenden Herzens zu verhindern, befand sich um dieses herum ebenfalls eine Wärmekammer.

Alle Kammern wurden durch ein separates Schlauchsystem permanent mit auf 38,5 °C erwärmtem Wasser aus einem anderen Wasserbad durchspült (Abb. 4).

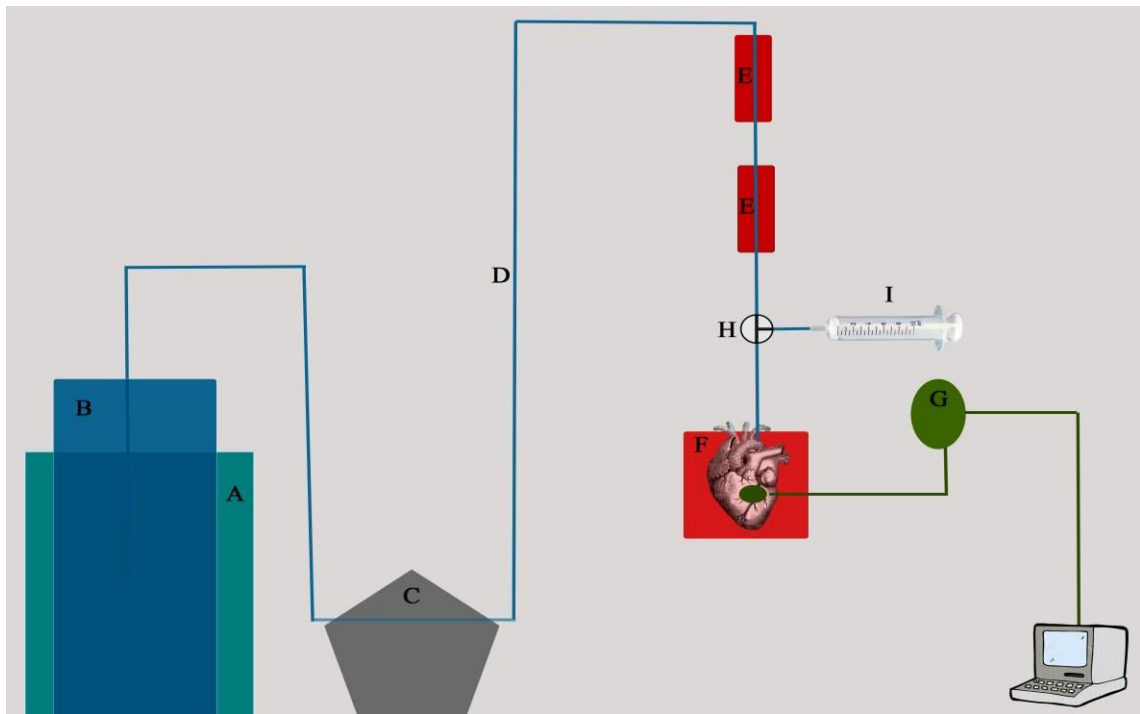


Abb. 4: **Aufbau der Langendorff-Anlage.** Das im Wärmebecken (A) angewärmte Perfusat (B) wird durch eine Pumpe (C) über Schlauchsysteme (D) zum Organ geleitet. Dabei durchläuft es zwei Wärmekammern (E), um die Temperatur aufrechtzuerhalten. Das Herz wird durch eine weitere Wärmekammer (F) vor dem Auskühlen bewahrt. Der AOP (aortic pressure) und LVP (left ventricular pressure), sowie die HR (heart rate) werden über Druckaufnehmer (G) aufgezeichnet und mit Hilfe eines Computerprogramms digitalisiert. Über einen Dreiwegehahn (H) ist es möglich die Plasmazufuhr einzustellen sowie die Perfusatzufuhr zum Herzen abzuschalten. Über einen Perfusor (I) konnte ein konstanter Zufluss des Plasmas zum Herzen gesteuert werden.

Der aortale Perfusionsdruck (*AOP*) wurde während des gesamten Versuches konstant bei 80 mmHg gehalten.

#### 2.4.2 Induktion der Organischämie

Zur Induktion der Ischämie des Organs wurde der Perfusatzufluss über einen Dreiwegehahn abgestellt, sodass das Herz aus dem Perfusatkreislauf ausgeschlossen wurde.

Während der Ischämie wurde die, das Herz umgebende, Wärmekammer mit angewärmtem Perfusat aufgefüllt, das zuvor mindestens 20 Minuten mit Stickstoff begast worden war. Diese Stickstoffzufuhr wurde in der Wärmekammer weiter fortgeführt, um eine O<sub>2</sub>-Diffusion in das ischämische Organ zu verhindern.

Zur Wiederherstellung der Organperfusion wurde die Perfusatzufuhr wieder angestellt und die Wärmekammer entleert.

Waren 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion keine Herzaktionen zu verzeichnen, wurde das Herz mittels eines Pacers mit 28 Volt defibrilliert (Pulsbreite 2 ms; Pulspause 200 ms).

Die Defibrillation wurde alle 5 Minuten wiederholt bis zum Einsetzen einer Herzaktion. Es wurden lediglich Herzen in die Auswertung eingeschlossen, bei denen über mindestens 10 Minuten ein stabiler Rhythmus bestand.

### 2.4.3 Messung der Organfunktion

Die hämodynamischen Parameter wurden zu definierten Zeitpunkten (**1.** Fünf Minuten vor Ende der Einpendlungsphase; **2.** Kurz vor Ende der Applikationsphase.; **3.** Alle 15 Minuten während der Reperfusionsphase) aufgezeichnet.

Der Koronarfluss (*coronary flow* = *CF*) wurde manuell gemessen, alle anderen Werte wurden mit dem Computerprogramm LabChart 7 aufgezeichnet und während des gesamten Versuches überwacht.

Zur Messung der Druckentwicklung des linken Ventrikels (*left ventricular pressure* = *LVP*) und der Herzfrequenz (*heart rate* = *HR*) wurde ein Ballon über eine Inzisur im linken Herzhorn in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser war über einen Schlauch mit einem Druckaufnehmer verbunden (Abb. 4), der die gemessenen Werte an das o.g. Computerprogramm weiterleitete.

Über einen Dreiwegehahn wurde der Ballon luftblasenfrei mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllt. Hierüber erfolgte zu Beginn des Versuches die Einstellung des enddiastolischen Druckes im linken Ventrikel (*LVP min.* = minimaler linksventrikulärer Druck) auf ca. 3-8 mmHg.

Über die Formel

$$LVDP = LVP_{max} - LVP_{min}$$

wurde der linksventrikulär entwickelte Druck (*LVDP* = *left ventricular developed pressure*) zu bestimmten Zeitpunkten im Versuch ermittelt, der ein Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels darstellt. *LVP<sub>max</sub>* und *LVP<sub>min</sub>* (minimaler und maximaler linksventrikulärer Druck) wurden vom Programm automatisch als Durchschnittswerte für den entsprechenden Zeitraum angegeben.

Ebenfalls von dem Programm automatisch bestimmt wurden die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dP/dt \max$  und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit  $dP/dt \min$  des linken Ventrikels.

Das Rate-Pressure-Product (RPP), als Maß für die vom Herzen zu leistende Arbeit, wurde über folgende Formel berechnet.

$$RPP = LVDP * HR$$

### *2.4.4 Applikation des Plasmas*

Zur Applikation des Probandenplasmas wurde dieses zunächst im 45 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend mittels eines Perfusors (Tabelle 1) an den Dreiwegehahn des Herzzuflusses angeschlossen. Hierüber wurde das Probandenplasma über zehn Minuten, mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 % des zuvor bestimmten CF, infundiert.

### *2.5 Untersuchungen zum Effekt der IPC*

Die Untersuchungen mit IPC zur Verifizierung der Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus wurden an der gleichen Anlage durchgeführt, wie die Hauptversuche. Zur Durchführung der IPC folgten auf die 20-minütige Einpendlungsphase drei Zyklen der Präkonditionierung. Diese bestanden aus jeweils einer 3-minütigen Ischämie und einer darauffolgenden 3-minütigen Reperfusion. Anschließend an die letzte Reperfusion startete die Ischämiephase, die 33 Minuten dauerte, gefolgt von der 60-minütigen Reperusionsphase (Abb. 5).

Bei diesem Versuchsaufbau betrug die Zeitspanne von Beginn des Versuchs bis zum Start der Ischämiephase 38 Minuten (20 min. Einpendlungsphase + 3\*3 min. Ischämie + 3\*3 min. Reperfusion).

Aus diesem Grund wurde die Einpendlungsphasen-Dauer der Kontrollgruppe, in der vor der Ischämie keine Interventionen durchgeführt wurden, auch auf 38 min. festgelegt (Abb. 5).

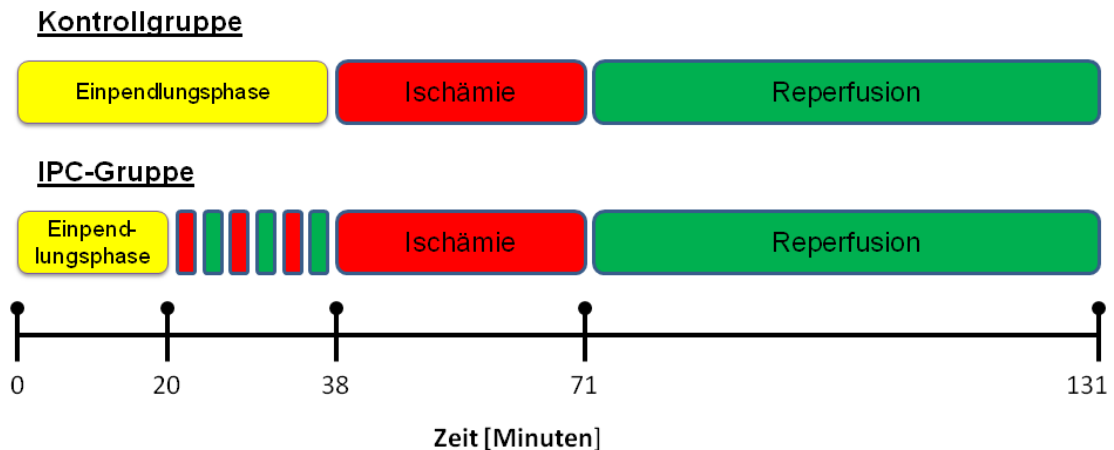


Abb. 5: **Versuchsprotokoll Kontrolle vs. IPC.** Jeweils  $n=5$ . In der Kontrollgruppe, die keine Intervention erfuhr, betrug die Länge der Einpendlungsphase 38 Minuten, gefolgt von 33 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion. In der IPC-Gruppe war die Einpendlungsphase 20 Minuten lang, als nächstes folgten drei Zyklen ischämischer Präkonditionierung, mit jeweils 3-minütiger Ischämie (rote Felder) gefolgt von 3 Minuten Reperfusion (grüne Felder). Die 33-minütige Ischämie und Reperfusion (60 min.) hatten dieselbe Länge wie in den Kontrollversuchen. Die Gesamtdauer beider Versuchsreihen betrug 131 Minuten.

## 2.6 Untersuchungen zum Effekt der RIPC

Die RIPC-Versuche wurden an der gleichen Anlage und unter gleichen Bedingungen, wie die IPC-Versuche durchgeführt. Das Versuchsprotokoll unterschied sich hingegen. So schloss sich, nach dem Anschluss der Herzen an die Langendorff-Anlage, zunächst eine 20-minütige Einpendlungsphase an. In dieser Zeit wurde dem Herz Zeit gegeben sich von der Entnahme zu erholen und einen stabilen Rhythmus aufzubauen. Es fanden keine Interventionen statt (Abb. 6).

Es folgte eine 10-minütige Applikationsphase, in der das entsprechende Probandenplasma in das Herz infundiert wurde.

Am Ende der Applikation wurde, durch Unterbrechung der Perfusat-, sowie der Plasmazufuhr zum Herz, eine Ischämiephase induziert, die für 33 Minuten aufrechterhalten wurde (Abb. 6). Insgesamt betrug die Zeitspanne von Beginn des Versuches bis zur Organischämie also 30 min (20 min. Einpendlungsphase + 10 min. Applikation).

Im Folgenden wurde die Ischämie beendet und die 60-minütige Reperfusionsphase eingeleitet (Abb. 6), in der die Perfusatzufuhr wiederhergestellt und die wiederkehrende Herzfunktion gemessen wurde. Weitere Interventionen erfolgten in dieser Zeit nicht.

Aus dem Versuchsaufbau ergaben sich die vier o.g. Versuchsgruppen (jeweils n=10), das Versuchsprotokoll war identisch (Abb. 6).

Der Untersucher war bezüglich des verwendeten Plasmas verblindet. Ebenso war die Reihenfolge der Experimente zufällig, um eine ausreichende Randomisierung zu erreichen.

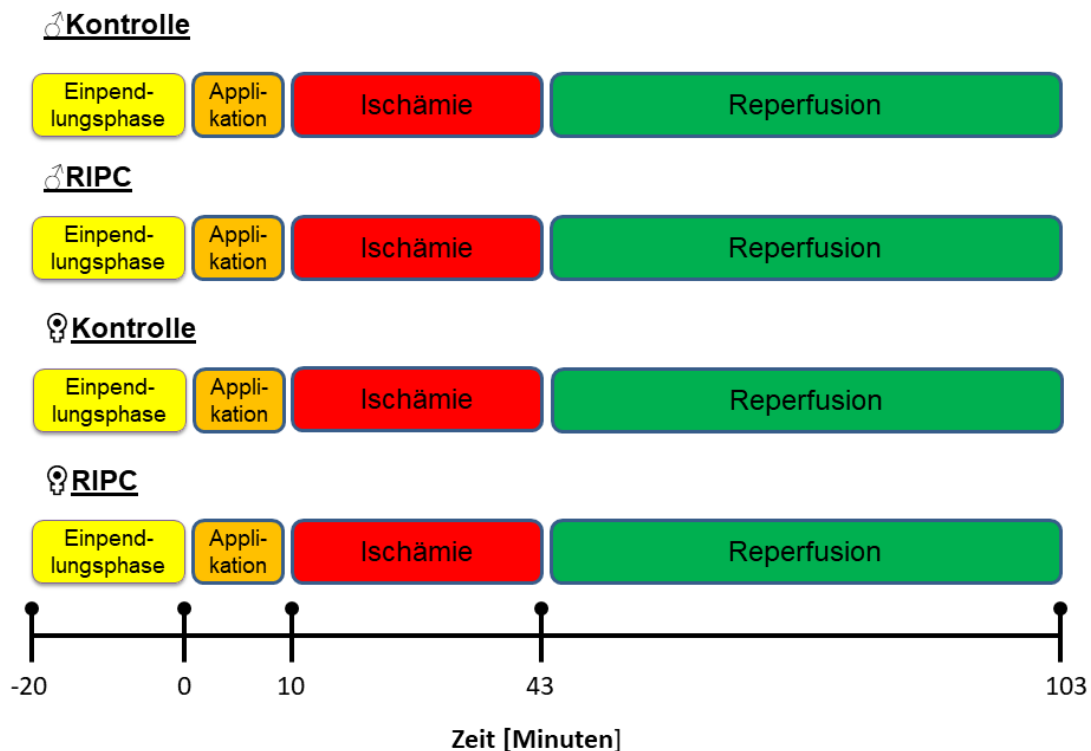


Abb. 6: **Versuchsprotokoll der RIPK**. Jeweils n=10. Nach einer 20-minütigen Einpendlungsphase, wurde über 10 Minuten das Plasma aus einer der vier Versuchsgruppen appliziert. Anschließend folgte die Ischämiephase, in der die Ischämie erzeugt und für 33 Minuten aufrechterhalten wurde. Die letzte Phase war die 60-minütige Reperfusionsphase. Die Gesamtdauer betrug für alle Gruppen 123 Minuten, der Ablauf war, bis auf die Art des applizierten Plasmas, immer identisch.

### 2.7 Messung der Infarktgröße

Die Herzen wurden nach Ablauf des Versuchsprotokolls an der Herzbasis abgeschnitten, bei ca. -70 °C eingefroren und schließlich in gefrorenem Zustand in 1-2 mm dicke Scheiben geschnitten.



Diese Scheiben wurden anschließend mit TTC-Lösung (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) eingefärbt. Diese Lösung besteht aus 0,75 g TTC, gelöst in 1,41 g Sigma 7-9 Puffer und 100ml NaCl 0,9 % (Tabelle 1).

Bei dieser Färbe-Methode handelt es sich um eine etablierte und die am häufigsten benutzte biologische Färbung zur Abgrenzung von Infarktarealen.

Der Redox-Farbstoff TTC durchdringt die Zellmembran und bindet an intrazelluläre Dehydrogenasen, diese reduzieren TTC zu Formazan (1,3,5-Triphenylformazan), einem wasserunlöslichen, roten Farbstoff. Vitale Zellen mit erhaltenem Reduktionspotential (enthalten noch NADPH) werden rot eingefärbt, während nicht vitale Zellen, deren Sarkolemm-Membranen geplatzt und deren Enzyme ausgewaschen sind, blass erscheinen[70] (Abb. 7)

Die auf diese Weise gefärbten Herzscheiben wurden eingescannt, die infarzierten Bereiche in Relation zu dem vitalen Gewebe mit Hilfe des Programms SigmaScan Pro 5 (Tabelle 1) gemessen und in Prozent des Risikogebietes (AAR, *Area at Risk*) angegeben. Als AAR wurde der gesamte Herzmuskel definiert. Bei der Auswertung des Infarktgebietes war ebenfalls die Reihenfolge zufällig gewählt und der Untersucher verblindet bezüglich der zugehörigen Versuchsreihe.



Abb. 7: **Beispiel TTC-Färbung von Herzscheiben.** Die weißen Areale markieren nicht vitales Gewebe, während vitale Areale in rot dargestellt sind.

### 2.8 Statistische Auswertung

Mittels GraphPad PRISM 6 ® wurde eine Gruppengröße von  $n = 10$  bestimmt, um einen Unterschied der Infarktgrößen von 25% mit 80%iger Sicherheit bei einem  $\alpha < 0,05$  zu erkennen. Die Schätzung des mittleren Unterschiedes von 25% bei einer Standardabweichung von 15% basiert auf vorangegangenen, eigenen Versuchen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS Science Software, Version 12.0.1. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) erfolgte zum Vergleich der Infarktgrößen. Der hierbei untersuchte Faktor unterschied zwischen RIPC Gruppe vs. Kontrollgruppe, jeweils innerhalb der männlichen und innerhalb der weiblichen Testgruppen. Bei Signifikanzen wurde der Tukey Post- hoc Test verwendet.

Hämodynamische Parameter wurden in einer zweifachen ANOVA, gefolgt vom Tukey's Post-hoc Test verglichen.

Die Daten werden beschrieben als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD). Als Signifikanzniveau wurden 5% angenommen ( $p < 0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Testung der kardioprotektiven Potenz der IPC

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 10 Herzen untersucht (IPC-Gruppe vs. Kontrollgruppe, jeweils  $n = 5$ ). Das Trockengewicht der Herzen der Kontrollgruppe betrug im Mittel  $0,14 \pm 0,02$  g bei einem mittleren Tiergewicht von  $272 \pm 20,4$  g. In der IPC-Gruppe betrug das mittlere Herzgewicht  $0,14 \pm 0,05$  g bei einem mittleren Tiergewicht von  $285 \pm 19,6$  g (Tabelle 4). Das Tiergewicht unterschied sich nicht signifikant.

|                       | <b>Herzgewicht [g]</b> | <b>Tiergewicht [g]</b> |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Kontrollgruppe</b> | $0,14 \pm 0,02$        | $272 \pm 20$           |
| <b>IPC-Gruppe</b>     | $0,14 \pm 0,05$        | $285 \pm 20$           |

Tabelle 4 **Herzgewichte und Tiergewicht der IPC-Versuchsreihe**. Mittelwerte  $\pm$  SD in Gramm bei  $n=5$  pro Gruppe.

##### 3.1.1 Die Infarktgrößen der IPC- und Kontrollversuche im Vergleich

Bei der Auswertung der Infarktgröße in Prozent der AAR lässt sich eine signifikant niedrigere ( $*p < 0,05$  vs. Kontrolle) Größe des infarzierten Areals bei den

präkonditionierten Herzen ( $20 \pm 14$  %) im Vergleich zu den Kontrollen ( $44 \pm 9$  %) feststellen (Abb. 8).

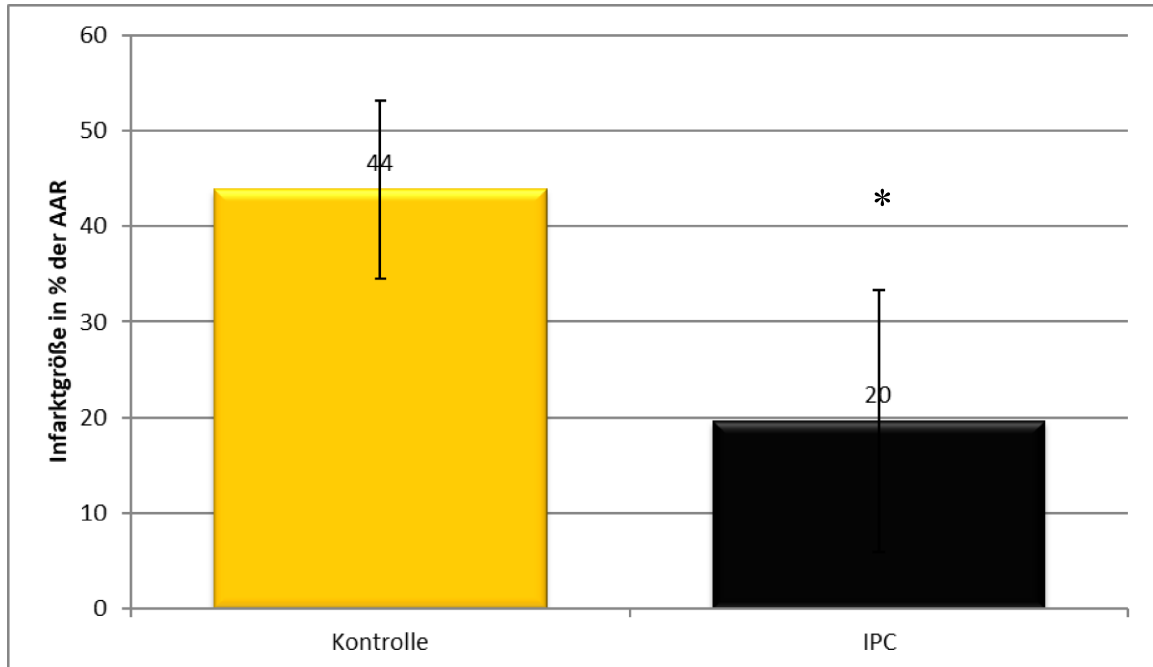


Abb. 8 **Infarktgröße Kontrollen vs. IPC**. Mittelwerte  $\pm$  SD bei  $n=5$ . Die Infarktgrößen sind in % der AAR (*area at risk*) angegeben. Die *area at risk* beschreibt die Größe des gesamten Herzgewebes, welches theoretisch von einer Ischämie betroffen sein könnte. Aufgezeigt sind die Infarktgrößen der Kontrollgruppe (gelber Balken) im Vergleich mit der IPC-Reihe (schwarzer Balken). \* $P < 0,05$  vs. Kontrolle

### 3.2 Testung der kardioprotektiven Potenz der RIPC

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 40 Herzen untersucht (4 Gruppen, jeweils  $n = 10$ ). Das mittlere Trockengewicht der Herzen differierte in den vier Versuchsgruppen insgesamt nicht signifikant. Ebenso verhielt es sich mit dem mittleren Tiergewicht (Tabelle 5).

|               | <b>Herzgewicht [g]</b> | <b>Tiergewicht [g]</b> |
|---------------|------------------------|------------------------|
| ♂ <b>Kon</b>  | 0,16 ± 0,02            | 291 ± 15               |
| ♂ <b>RIPC</b> | 0,15 ± 0,02            | 285 ± 15               |
| ♀ <b>Kon</b>  | 0,16 ± 0,01            | 291 ± 18               |
| ♀ <b>RIPC</b> | 0,16 ± 0,02            | 284 ± 13               |

Tabelle 5 **Herzgewichte und Tiergewicht der RIPC-Versuchsreihe**. Mittelwerte ± SD in Gramm bei n=10 pro Gruppe.

### 3.2.1 Die hämodynamischen Parameter

Die hämodynamischen Parameter, die RIPC-Versuchsreihe betreffend, sind in Tabelle 6 dargestellt.

Die Ausgangswerte aller relevanten Parameter unterschieden sich zu Beginn des Versuchs nicht signifikant.

Die Infusion des Probanden-Plasmas ab Minute 21 schlug sich in einer Veränderung der Werte der linksventrikulären Funktion nieder (Abb. 9; Tabelle 6). So reduzierte sich beispielsweise der LVDP in jeder Versuchsgruppe signifikant (\*p<0,05 im Bezug zum Ausgangswert).

Der LVDP betrug nach 60 Minuten Reperfusion noch 25-26% des Ausgangswertes in der Einpendlungsphase.

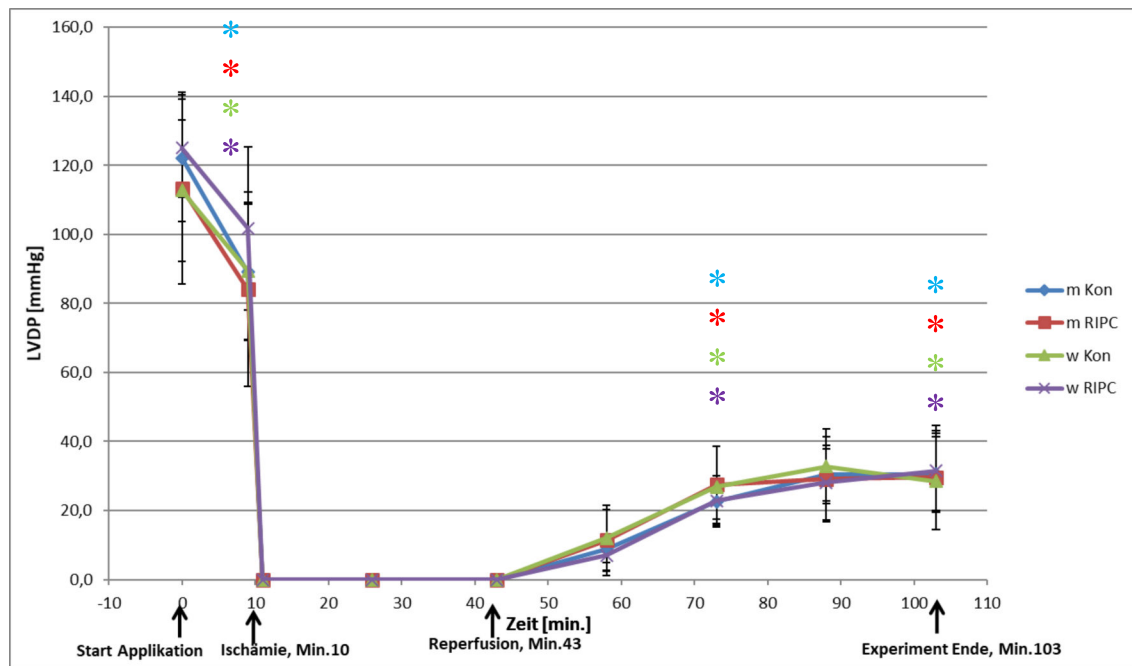


Abb. 9 Verlauf des LVDP (left ventricular diastolic pressure) der RIPC-Versuchsreihe. Mittelwerte  $\pm$  SD. n=10/Gruppe. Hier ist der LVDP als Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels dargestellt. \*P<0,05 bezogen auf den Ausgangswert.

Als Variable des koronaren Gefäßwiderstandes fungierte in diesem Experiment der CF, da der AOP (Aortaler-Perfusionsdruck) konstant bei 80 mmHg gehalten wurde.

Der CF lag am Versuchsende in ♂Kon. bei 47 % des Startwertes; in ♂RIPC bei 50%; in ♀Kon. bei 43 % und in ♀RIPC bei 52 %. In jeder Gruppe war der CF am Versuchsende signifikant (\*p < 0,05) kleiner als zu Beginn. Er zeigte insgesamt einen gleichförmigen Verlauf (Abb. 10; Tabelle 6).

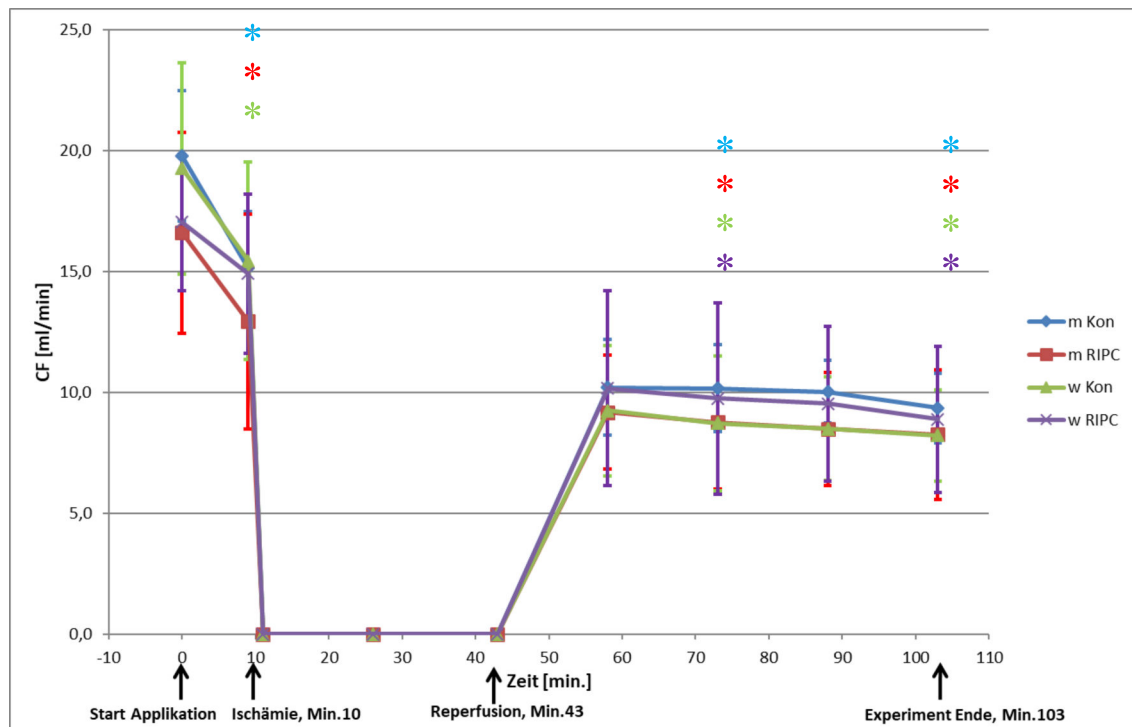


Abb. 10 Verlauf des CF (*coronary flow*) der RIPC-Versuchsreihe. Mittelwerte  $\pm$  SD. n=10/Gruppe. Der CF dient als Variable des koronaren Gefäßwiderstands, da der AOP (Aortaler-Perfusionsdruck) konstant bei 80 mmHg gehalten wurde. \*P<0,05 bezogen auf den Ausgangswert.

Die HR (*Heart Rate*) variierte, im Unterschied zu den anderen Parametern nur selten signifikant (\*p<0,05) im Vergleich zum Ausgangswert.

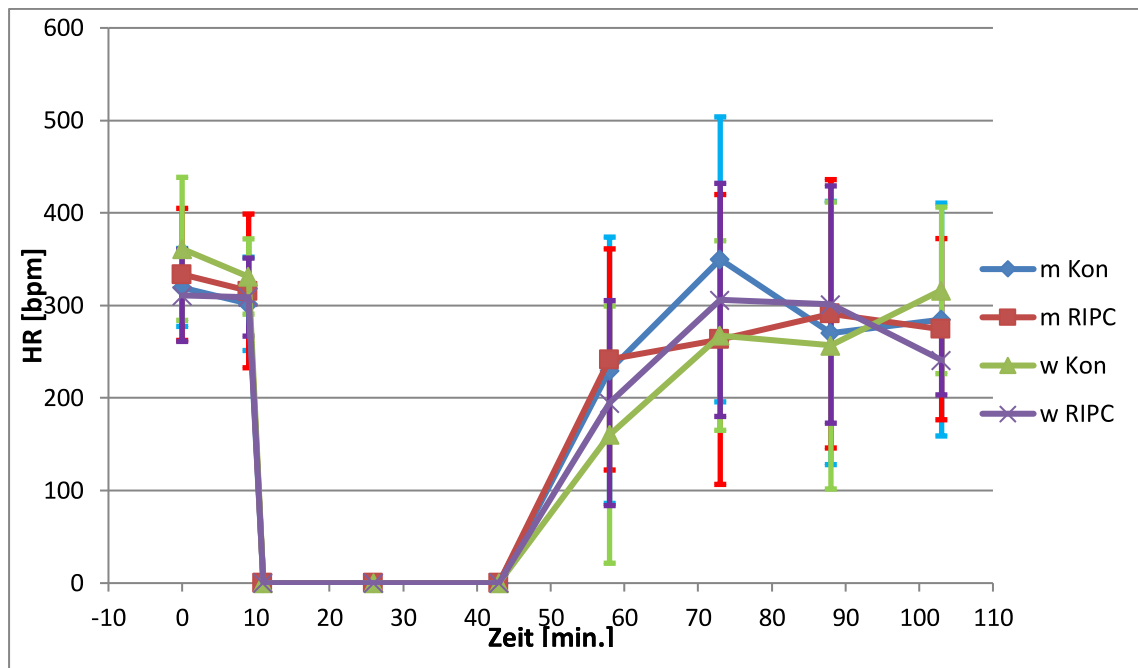


Abb. 11 **Verlauf der HR (Heart Rate) der RIPC-Versuchsreihe.** Mittelwerte  $\pm$  SD.  $n=10$ /Gruppe  
Es zeigten sich nur wenige, oben eingezeichnete, signifikante Unterschiede bezüglich der HR. \* $P<0,05$  bezogen auf den Ausgangswert.

|                |             | Einpendlungs-<br>phase | Prä-<br>Ischämisch<br>er Wert | Reperfusions-<br>phase 30.<br>Minute | Reperfusions-<br>phase 60. Minute |
|----------------|-------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| HR [bpm]       | ♂ Kontrolle | 320 $\pm$ 42           | 302 $\pm$ 50                  | 350 $\pm$ 126                        | 285 $\pm$ 58                      |
|                | ♂ RIPC      | 334 $\pm$ 71           | 316 $\pm$ 83                  | 263 $\pm$ 98                         | 274 $\pm$ 79                      |
|                | ♀ Kontrolle | 361 $\pm$ 77           | 331 $\pm$ 41                  | 268 $\pm$ 90*                        | 316 $\pm$ 133*                    |
|                | ♀ RIPC      | 311 $\pm$ 50           | 309 $\pm$ 42                  | 306 $\pm$ 38                         | 241 $\pm$ 73                      |
| LVDP<br>[mmHg] | ♂ Kontrolle | 122 $\pm$ 18           | 89 $\pm$ 20*                  | 23 $\pm$ 11*                         | 31 $\pm$ 8*                       |
|                | ♂ RIPC      | 113 $\pm$ 28           | 84 $\pm$ 28*                  | 27 $\pm$ 15*                         | 30 $\pm$ 8*                       |
|                | ♀ Kontrolle | 113 $\pm$ 21           | 90 $\pm$ 20*                  | 27 $\pm$ 14*                         | 29 $\pm$ 9*                       |
|                | ♀ RIPC      | 125 $\pm$ 14           | 102 $\pm$ 24*                 | 23 $\pm$ 12*                         | 32 $\pm$ 9*                       |
| CF [ml/min]    | ♂ Kontrolle | 20 $\pm$ 3             | 15 $\pm$ 2*                   | 10 $\pm$ 1*                          | 9 $\pm$ 2*                        |
|                | ♂ RIPC      | 17 $\pm$ 4             | 13 $\pm$ 4*                   | 9 $\pm$ 3*                           | 8 $\pm$ 3*                        |
|                | ♀ Kontrolle | 19 $\pm$ 4             | 15 $\pm$ 4*                   | 9 $\pm$ 2*                           | 8 $\pm$ 2*                        |
|                | ♀ RIPC      | 17 $\pm$ 3             | 15 $\pm$ 3                    | 10 $\pm$ 3*                          | 9 $\pm$ 2*                        |

Tabelle 6 **Hämodynamische Parameter der RIPC-Versuche.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD bei  $n=10$ /Gruppe. Gemessen wurden diese jeweils in der Einpendlungsphase, kurz vor der Ischämie (Prä-Ischämischer Wert) und nach 30 sowie 60 Minuten in der Reperfusion. Der Prä-Ischämische Wert wurde in der Kontrollgruppe am Ende der Einpendlungsphase bestimmt, in der RIPC-Gruppe wurde er während der letzten Reperfusion der Präkonditionierung gemessen. HR=Herzfrequenz [bpm] (Schläge pro Minute); LVDP = linksventrikulär entwickelter Druck [mmHg]; CF = Koronarfluss [ml/min.]. Signifikanzen \* $p<0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert.

### 3.2.2 Die Infarktgrößen der Verschiedenen RIPC-Gruppen im Vergleich

Die Infarktgrößen wurden als Anteil der AAR bestimmt und sind in Abb. 12 dargestellt. Durch die Gabe des ♂RIPC-Plasmas wurde die Infarktgröße im Vergleich mit der ♂Kon.-Gruppe signifikant (\* $p < 0,05$  vs. ♂Kontrolle) von  $47 \pm 5$  % auf  $31 \pm 10$  % gesenkt (Abb. 12).

Bei den Herzen, die mit weiblichem Plasma behandelt wurden, hingegen, konnte kein signifikanter ( $p > 0,05$  vs. ♀Kontrolle) Unterschied festgestellt werden. Die Infarktgröße wurde durch das ♀RIPC-Plasma von  $33 \pm 10$  % in der ♀Kon.-Gruppe auf  $29 \pm 10$  % reduziert (Abb. 12).

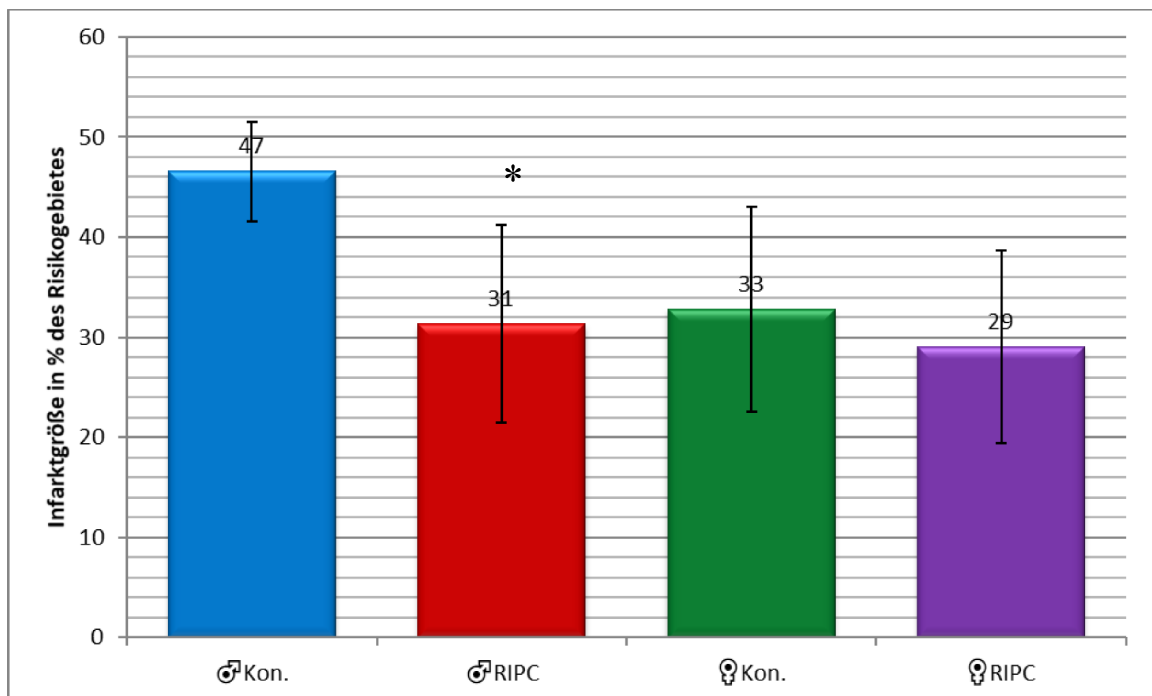


Abb. 12 **Infarktgrößen der RIPC-Versuchsreihe.** Mittelwerte  $\pm$  SD bei  $n=10$ /Gruppe. Die Herzen in ♂Kon. und ♀Kon. wurden mit Plasma von männlichen (♂) bzw. weiblichen (♀) Probanden behandelt, das vor der Fernpräkonditionierung (RIPC) abgenommen wurde. Herzen in ♂RIPC und ♀RIPC wurden mit nach der RIPC gewonnenem Plasma infundiert. Gruppenvergleiche wurden jeweils zwischen der Gruppe des ♂Kon. und ♂RIPC (\* $P < 0,05$  vs. ♂Kon.) sowie zwischen ♀Kon. und ♀RIPC (\* $P < 0,05$  vs. ♀Kon.) durchgeführt. Die Auswertung der Daten und Durchführung der Versuchsreihen erfolgte durch einen verblindeten Untersucher in randomisierter Reihenfolge.



## 4. Diskussion

Die RIPC ist, auf Grund ihrer geringen Invasivität und einfachen Anwendbarkeit, ein vielversprechendes Konzept der Organprotektion in verschiedensten klinischen Situationen. Jedoch ergibt sich ein inhomogenes Bild, die Sicherheit und Wirksamkeit einer solchen Intervention betreffend.

So gab es mehrere Studien, in denen ein protektiver Effekt der RIPC bei Patienten, die sich einer Ausschaltung eines abdominellen Aorten-Aneurysmas oder einer PTCA-Intervention unterzogen, nachzuweisen war [34-36].

Andererseits existieren Untersuchungen, bei denen dieser Nachweis nicht gelang [37-40], so beispielsweise auch in einer neueren Studie zu diesem Thema von Meybohm et.al. [42]. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass eine RIPC unter bestimmten Bedingungen einen schädlichen Effekt haben könnte [41, 71, 72].

Diese Arbeit hat das Ziel zur weiteren Klärung dieser inhomogenen Studienlage beizutragen.

Im Speziellen wurde untersucht, ob humorale Faktoren bei der Übertragung der RIPC-Protektion beteiligt sind und ob geschlechtsspezifische Unterschiede im Ausmaß der Protektion bestehen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Übertragung des protektiven Effekts einer RIPC mittels menschlichem, präkonditioniertem Blutplasma auf isoliert perfundierte Rattenherzen untersucht.

Die Übertragung des protektiven Effektes auf humoralem Wege wurde bereits in verschiedenen Studien erfolgreich vorgenommen, [21, 25, 73].

Dennoch ist die vorliegende Studie die erste, die den Versuch unternommen hat, diesen Effekt via menschlichen Blutplasmas auf Rattenherzen zu übertragen und eventuell vorhandene Geschlechterunterschiede herauszuarbeiten.

Es zeigte sich, dass männliches RIPC-Plasma (♂RIPC) im Vergleich zu männlichem Kontroll-Plasma (♂Kon.) die Infarktgröße eines ischämischen Herzes signifikant reduzierte (Abb. 12).

Bei der Übertragung des weiblichen RIPC-Plasmas (♀RIPC) hingegen war kein signifikanter Unterschied zu weiblichem Kontroll-Plasma (♀Kon.) festzustellen (Abb. 12).

Es ließ sich also in dieser Versuchsanordnung kein protektiver Effekt durch weibliches RIPC-Plasma nachweisen.

In Bezug auf das angewandte Modell lässt sich konstatieren, dass eine Übertragung des protektiven Effektes der RIPC auf humoralem Wege via menschliches Blutplasma auf Rattenherzen möglich ist und einen validen Versuchsansatz darstellt.

### ***4.1 Diskussion der Methodik***

Da der Schwerpunkt der Studie auf den humoralen Effekten der RIPC lag, war es wichtig, den Einfluss weiterer Faktoren der RIPC, wie beispielsweise neuronale oder systemische Signalwege, auszuschalten. Erreicht wurde dies durch die Verwendung eines Langendorff-Modells des isoliert perfundierten Herzens.

Für diese Art der Grundlagenforschung ist ein tierexperimenteller Ansatz prädestiniert. Durch die Verwendung von merkmalsgleichen Versuchstieren, einschließlich des Geschlechts, wurde eine Verminderung der Varianzen, wie Alter, Nebenerkrankungen, körperlicher Zustand, Medikamenteneinnahmen u.a., erreicht [74]. Des Weiteren war eine organisierte Betrachtung ebenfalls gut möglich [75]. Dies ermöglichte die Durchführung der Untersuchung unter standardisierten Bedingungen.

#### *4.1.1 Verwendung des Langendorff-Modells*

Das Langendorff-Modell, wie es von Oscar Langendorff entwickelt wurde, erlaubt die retrograde, isolierte Perfusion eines Herzens und somit die Untersuchung physiologischer Vorgänge des Myokards, unabhängig von neuronalen, humoralen oder systemischen Signalen [70]. Auf Grund dieser Eigenschaften hat es sich als essentiell in der Erforschung der Herzphysiologie erwiesen und wird auch heute noch häufig angewandt [70]. Der beschriebene Aufbau hat außerdem den Vorteil, dass er unabhängig von vorher applizierten Medikamenten ist, in der vorliegenden Studie Heparin und Pentobarbital, da die nach der Entnahme des Organs darin verbleibenden Substanzen, während der Einpendlungsphase, durch das Perfusat aus dem Herzen ausgewaschen wurden.

Des Weiteren können Interventionen durchgeführt werden, die ansonsten für das Tier tödlich wären, wie beispielsweise lange Ischämiephasen.

Weitere Vorteile stellen der einfache und kostengünstige Aufbau und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar.

Auf der anderen Seite entfernt sich das Modell durch die Organisolierung ein großes Stück von einer klinischen Anwendbarkeit, da viele Einflussfaktoren, die in der Klinik eine Rolle spielen, eliminiert werden [70].

Mit Hilfe eines konstanten Druckes von 80 mmHg ist es jedoch möglich, physiologische Kreislaufbedingungen des Herzens herzustellen und somit die Autoregulation der Koronarien zu erhalten. So wurde die Herzfunktion mehrere Stunden aufrechterhalten [70]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es sich trotz Allem um ein Organ handelt, welches pro Stunde ca. 5-10 % seiner chronotropischen und kontraktilen Funktion einbüßt [76]. Aus diesem Grunde wurde der Untersuchungszeitraum auf 123 Minuten beschränkt, da sich dieser Zeitraum als lang genug erwies, um einen Effekt der Präkonditionierung zu zeigen, jedoch gleichzeitig nicht so lang, dass ein Funktionsverlust der Chronotropie oder Kontraktilität durch den Versuchsaufbau an sich die Ergebnisse zu stark beeinflussen würde.

Von besonderer Bedeutung beim Aufbau der Apparatur und ihrer Bedienung ist die genaue Einstellung und Einhaltung der Temperatur des Organs. Da Herzen von kleinen Säugetieren ein großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen haben, ist ein hohes Potential für Wärmeverluste über Wärmestrahlung gegeben und damit für eine resultierende Hypothermie [70]. Sowohl Hypo- als auch Hyperthermie haben einen Einfluss auf Herzfrequenz und Myokardkontraktilität [70, 76, 77], können kardioprotektiv wirken im Sinne einer Präkonditionierung und bergen somit das Risiko Ergebnisse zu verfälschen [78, 79].

Zur Minimierung dieses Störfaktors wurde in der vorliegenden Studie durch Erwärmen des Perfusats und durch Wärmekammern die Temperatur im Versuchsorgan auf 37 – 38°C eingestellt und konstant gehalten.

Eine kritische Phase, den Temperaturerhalt betreffend, stellte die 33-minütige Ischämiephase dar, weil hier das Organ komplett von der Perfusatzufuhr abgeschnitten wird und so ein Temperaturerhalt durch die oben beschriebenen Maßnahmen nicht mehr gewährleistet ist. Gelöst wurde dieses Problem über extern angewärmtes Perfusat, welches zum Zeitpunkt der Ischämie in die, das Herz umgebende, Wärmekammer gefüllt wurde und dort bis zum Beginn der Reperfusion verblieb. Es zeigte sich, dass die Konstanthaltung der Temperatur auf diese Weise möglich war.

Weiterhin wurde die Zeit zwischen Explantation und Perfusion so gering wie möglich gehalten. Diese Zeit sollte unter fünf Minuten liegen, da sonst entweder das Herz durch die Ischämie geschädigt wird oder eine vorzeitige Präkonditionierung die Ergebnisse verfälschen könnte [80, 81]. In der vorliegenden Studie kann ein solcher Effekt weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Explantations-Perfusions-Zeit konstant bei ca. 1 Minute lag.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Obwohl die Mechanismen der RPC immer noch weitgehend unbekannt sind, gibt es Hinweise, dass drei verschiedene Signalwege an der Übertragung des protektiven Effektes beteiligt sein könnten: Ein afferent neuronaler, ein humoraler und ein systemischer Effekt [82].

Die Hypothese, dass humorale Faktoren an der Protektion durch RPC beteiligt sind, wird gestützt durch verschiedene Studien, die zeigen konnten, dass der protektive Effekt interindividuell übertragbar ist.

So gelang es *Dickson et. al.*, durch den kompletten Blutaustausch von einem präkonditionierten Kaninchen mit einem unbehandelten, eine Infarktgrößenreduktion bei dem unbehandelten Kaninchen zu erreichen [83].

Ebenfalls erfolgreich verwendet werden Modelle, bei denen Blut, bzw. Blutbestandteile, von menschlichen, präkonditionierten Probanden auf Versuchstiere übertragen werden. So Übertrugen *Shimizu et al.* menschliches RPC-Dialysat von präkonditionierten Probanden auf isoliert perfundierte Kaninchenherzen und wiesen eine signifikante Reduktion der Infarktgrößen nach [73].

Die beteiligten humoralen Signalwege sind bisher nur unvollständig erfasst und verstanden worden. Eine wichtige Rolle scheinen Adenosin, Bradykinin, CGRP, Endocannabinoide, Angiotensin I und andere, bis jetzt unbekannte Faktoren zu spielen [21]. Erst kürzlich identifizierten *Rassaf et.al.* Nitrit als elementaren Teil dieser Signaltransduktion, welches im Myokard durch Myoglobin (Mb) zum bioaktiven NO<sup>•</sup> reduziert wird. In dieser Studie wurden Mäuse vier Zyklen Ischämie und anschließender Reperfusion der Femoralregion unterzogen und anschließend einer myokardialen Ischämie zugeführt. Durch pharmakologische und genetische Inhibition der NO<sup>•</sup>- bzw. Nitrit-Herstellung zeigte sich eine vollständige Aufhebung des kardioprotektiven

Effektes durch RIPC [26]. In der vorliegenden Studie wurde, aufbauend auf den Erkenntnissen über die humorale Übertragung des RIPC-Effektes, erfolgreich der Versuch unternommen, einen protektiven Effekt mittels menschlichen RIPC-Blutplasmas auf isoliert perfundierte Rattenherzen zu übertragen. Auch hier zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der Infarktgrößen bei den männlichen Probanden. Bei den weiblichen Probanden war kein protektiver Effekt nachzuweisen.

Somit konnte gezeigt werden, dass humorale Faktoren an der Protektion beteiligt sein müssen und via Blutplasma übertragen werden können. Zum einen untermauert dieses Ergebnis die vorhandenen Theorien zu den Mechanismen der Vermittlung von Kardioprotektion durch RIPC, zum anderen könnten sich daraus interessante, neuartige Therapieansätze ergeben. Da der kardioprotektive Effekt der RIPC von verschiedensten Einflussfaktoren, darunter vor allem Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und Medikation, gemindert werden kann [46], wäre es denkbar, präkonditioniertes Plasma von jungen Probanden auf Patienten mit kardialen Risikofaktoren zu übertragen und diese so zu schützen.

So konnte bereits in einer Studie von Heinen et al. gezeigt werden, dass die Übertragung von RIPC-Plasma junger Probanden auf ein gealtertes Rattenherz ebenfalls einen signifikant schützenden Effekt ausübte, während dies durch die Übertragung von RIPC-Plasma gealterter Probanden nicht möglich war [1]. Es konnte somit gezeigt werden, dass ein kardioprotektiver Effekt an gealterten Herzen ausgelöst werden kann. Zudem scheinen diese Daten jedoch auch zu zeigen, dass der schützende Effekt durch Blutplasma von gealterten Probanden nicht übertragen werden kann oder die schützenden Faktoren gar nicht erst erzeugt werden [1].

Diese Vermutung wird von weiteren Ergebnissen aus der gleichen Studie unterstützt. So konnte eine Untersuchung der humoralen Faktoren zeigen, dass RIPC-Plasma von gealterten männlichen Probanden zu keiner Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  in Rattenmyozyten führt, während dies bei Versuchen mit RIPC-Plasma von jungen männlichen Probanden der Fall war [1]. GSK3 $\beta$  ist ein Zielfaktor des *RISK-Pathways* und führt zu Inhibition der MPTP und diese ist eng mit Kardioprotektion verbunden. Diese Ergebnisse erklären die fehlende Kardioprotektion durch Plasma von gealterten Probanden, die zuvor beschrieben wurde.

#### 4.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Kardioprotektion

Zwischen Männern und Frauen scheint es in vielerlei Hinsicht ebenfalls Unterschiede im kardiovaskulären System zu geben, unter anderem auch bei den beschriebenen protektiven Effekten. Die klinische Relevanz dieser Differenzen lässt sich schon daran erkennen, dass die Anzahl der Studien zu diesem Thema in den letzten 20 Jahren deutlich angestiegen ist [3].

Schon auf physiologischer Ebene gibt es Unterschiede in Bezug auf Herzfrequenz, Herzmasse, Blutdruck usw. [3], aber vor allem auf pathologischer Ebene sind die Differenzen von klinischer Bedeutung [50, 59]. Ein Umstand, der anscheinend vor allem mit den postmenopausal sinkenden Östrogenspiegeln der Frau zusammenzuhängen scheint.

Diese Hypothese untermauerten *Lagranha et al.*, indem sie in einem in vivo Modell zeigten, dass die Infarktgröße in weiblichen Rattenherzen nach Ovariectomie deutlich zunahm, während sie durch Östrogenapplikation bei männlichen Versuchstieren reduziert wurde [63].

Das jedoch noch andere Faktoren bezüglich der Geschlechterunterschiede eine Rolle spielen müssen, zeigte eine große Studie von Heinen et al. [1] von der auch die vorliegende Studie Teil ist. Hier wurde unter anderem getestet, ob Östrogen einen Einfluss auf die Kardioprotektion durch weibliches RIPC Plasma haben könnte. Zu diesem Zweck wurde der nicht-selektive Östrogenrezeptor-Inhibitor Fulvestrant 15 Minuten vor einer Ischämie von isoliert perfundierten Rattenherzen infundiert. Es wurde der Effekt des Plasmas von jungen Frauen ohne RIPC Intervention mit dem Plasma von jungen Frauen mit RIPC-Intervention verglichen und getestet ob Fulvestrant auf die genannten Gruppen einen Einfluss hat. Es zeigte sich, wie in der vorliegenden Studie, kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der RIPC-Gruppe, jedoch interessanterweise auch kein Effekt von Fulvestrant auf die Infarktgröße. Somit schließen die Autoren darauf, dass Östrogen keinen verschleiernenden Effekt auf eine RIPC-Intervention hat und das somit der kardioprotektive Effekt von RIPC-Plasma oder weiblichem Plasma per se nicht allein östrogenvermittelt sein kann. [1].

Das weibliche Herz scheint, unabhängig von altersabhängigen Effekten, generell unempfindlicher gegenüber einer I/R-Situation zu sein, wie in verschiedenen Spezies gezeigt werden konnte [3, 57, 84]. So zeigten *Besik et al.*, dass die postischämische

Erholung bei Ratten mit spontaner Hypertension bei weiblichen Versuchstieren signifikant besser war, als bei männlichen mit vergleichbarer Hypertension [85].

Diese geschlechtsspezifische Protektion scheint in Verbindung mit niedrigeren Calciumspiegeln in weiblichen Herzen während I/R-Situationen zu stehen. Hohe Calciumlevel vergrößern den I/R-Schaden [84, 86, 87]. Der Calciumspiegel seinerseits wird wiederum über komplexe Mechanismen durch Östrogen moduliert [84].

Ein Grund, warum die Forschung dieses Thema betreffend nicht weiter vorangeschritten ist, ist das in vielen Untersuchungen ausschließlich männliche Versuchstiere benutzt werden [88]. Männliche Versuchstiere unterliegen keinem fluktuierenden hormonellen Einfluss und ein Vergleich einer männlichen gegenüber einer weiblichen Versuchsgruppe stellt immer auch das Problem, dass das Gewicht der Versuchstiere in der Regel nicht vergleichbar ist [3].

Dennoch ist die Benutzung ausschließlich männlicher Versuchstiere ein Ansatz, der sich vielfach als nützlich erwiesen hat und reichlich erprobt ist, weswegen er auch in der vorliegenden Studie gewählt wurde. Des Weiteren sollte nur der afferente Schenkel, also Unterschiede in Effekten des menschlichen Plasmas auf ein ischämisches Herz untersucht werden. Durch die Benutzung ausschließlich männlicher Versuchstiere wurde eine beeinflussende Variable, nämlich das Geschlecht des Organdonators, eliminiert.

Es ist naheliegend zu vermuten, dass es bei geschlechtsspezifischen Unterschieden in physiologischen und pathologischen Prozessen am Herzen, auch Unterschiede bei kardioprotektiven Strategien und deren Auswirkungen geben könnte.

So zeigt die vorliegende Studie diesen Unterschied deutlich, durch einen schützenden Effekt des männlichen, präkonditionierten Plasmas, der jedoch durch weibliches nicht ausgelöst werden konnte.

Grundsätzlich ist es möglich, beide Geschlechter zu präkonditionieren [66, 67]. Die Studienlage ist jedoch auch hier nicht eindeutig. So konnten *Song und Kollegen* weibliche Mäuse mittels zwei Zyklen zweiminütiger Ischämie und anschließend fünfminütiger Reperfusion nicht präkonditionieren, während dies bei männlichen Mäusen durchaus möglich war [68].

Andere Forschungsgruppen um *Humphreys et al.* [69] bzw. *Lee et al.* [89] konnten wiederum die Präkonditionierung von weiblichen Ratten bzw. Hunden zeigen.

*Cao und Kollegen* zeigten zwar keinen Unterschied im Ausmaß der Protektion, dafür aber einen unterschiedlichen Signalweg dorthin. Es zeigte sich, dass Protektion durch Met<sup>5</sup>-

enkephalin bei Männern über einen PI3K/Akt1/2-Signalweg vermittelt wird, während dies bei Frauen über PI3K/Akt/3-Signalweg geschieht [90].

Turcato et al zeigten, neben der Tatsache dass Präkonditionierung von weiblichen Mäusen altersabhängig ist, vor allem die von Grund auf höhere Toleranz weiblicher Herzen gegenüber I/R-Situationen [91].

Es scheint, dass die schon hohe Toleranz des jungen weiblichen Herzens durch Präkonditionierung nicht ohne weiteres gesteigert werden kann und somit eine höhere Schwelle für die Präkonditionierung vorliegt als bei Männern. In der vorliegenden Studie scheint diese Schwelle nicht überschritten worden zu sein und somit ist der Präkonditionierungseffekt ausgeblieben. Dass eine solche Schwelle existiert zeigten verschiedene Studien [80, 92]. So könnte, vor dem Hintergrund der Studie von *Awan et al.* [80], überlegt werden, ob eine längere Arm-Ischämiezeit bei den Probanden, zu einem deutlicheren protektiven Effekt des weiblichen RIPC-Plasmas geführt hätte. *Awan et al.* unterzogen Rattenherzen einer Ischämie von 1, 2, 3, 5, 10 bis 15 Minuten bevor sie retrograd perfundiert wurden und anschließend einer erneuten 30-minütigen Ischämie und 30-minütigen Reperfusion unterzogen wurden. Ab einer Dauer der vorgeschalteten Ischämie von 3 Minuten zeigte sich eine deutliche Protektion. Das höchste Ausmaß wurde bei 10 Minuten beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine existierende Schwelle der IPC hin [80].

Die vorliegende Studie deutet daraufhin, dass weibliches, nicht präkonditioniertes Plasma per se schon einen schützenden Effekt auf das untersuchte Organ haben könnte. Ausgedrückt wird dies in einer ähnlichen Infarktgröße des weiblichen Kontroll-Plasmas (32,8% der AAR) im Vergleich zum männlichen RIPC-Plasma (31,3% der AAR) (Abb. 12). Zudem könnte dies erklären, warum ein additiver Effekt durch eine Präkonditionierung bei weiblichem Plasma einer höheren Schwelle unterliegt, als dies bei männlichem Plasma der Fall ist.

Es konnte in der vorliegenden Studie ein deutlicher Geschlechterunterschied bei der Fernpräkonditionierung gezeigt werden. Dies deutet daraufhin, dass eine höhere Schwelle der Präkonditionierung bei weiblichem Plasma existieren könnte. Unter den hier genutzten Bedingungen der Fernpräkonditionierung hatte präkonditioniertes, weibliches Plasma keinen zusätzlichen, schützenden Effekt auf die Herzen im Vergleich zum weiblichen Kontrollplasma. Bei männlichem Plasma war dieser Effekt hingegen sehr deutlich zu sehen.



#### 4.2.2 Hämodynamik

Weitere Parameter, die während der durchgeführten Versuche aufgezeichnet wurden, waren hämodynamische Werte wie Herzfrequenz (HR), Koronarfluss (CF), minimaler und maximaler linksventrikulärer Druck (LVP min. und max.), maximale und minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt$  max. und min.), linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP), sowie das Rate-Pressure-Product (RPP), welches als Produkt von HF und LVDP ein Maß für die Herzarbeit darstellt. Die Aufzeichnung dieser Parameter diente der Überprüfung der Organfunktion, sowie der Wirkung der Kardioprotektion auf selbige. Die vier Versuchsgruppen wiesen zu Beginn des Versuches vergleichbare hämodynamische Parameter auf, was für eine gut standardisierte Entnahme des Organs und dessen Anschluss an die Langendorff-Apparatur spricht und somit für die Vergleichbarkeit der Versuche.

Die Applikation des menschlichen Plasmas zeigte negative Effekte auf die Funktion des Rattenherzens, die in allen Versuchsgruppen ähnlich stark ausgeprägt waren. Hinweise hierauf lassen sich aus der hämodynamischen Auswertung der Versuche entnehmen. So zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verschlechterung der Herzarbeit, ausgedrückt durch das RPP, nach Infusion des Plasmas (Prä-Ischämischer Wert, Tabelle 6). Es verringerte sich um etwa 19 % bis 30 %.

Gründe hierfür könnten in Abbauprodukten liegen, die während des 30-minütigen RIPC-Protokolls aus den ischämischen Zellen ebenfalls ausgeschwemmt werden, mit dem Plasma transfundiert wurden und die Zellfunktion beeinträchtigen.

Auch in der Reperfusionsphase zeigen die verschiedenen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der erhobenen hämodynamischen Parameter. Dies könnte bedeuten, dass eine RIPC zwar Einfluss auf die Infarktgröße hat, die Herzfunktion unmittelbar nach einer Ischämie jedoch nicht beeinflusst. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die beobachtete Zeitspanne in der Reperfusion (60 Minuten) nicht ausreichend war, um positive Effekte auf die Herzfunktion zu zeigen. Des Weiteren könnte auch die Ischämiezeit von 33 Minuten zu kurz gewesen sein und der Schaden somit nicht groß genug, um einen Unterschied zwischen präkonditionierten Herzen und Kontrollherzen herauszustellen.

Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Voucharas und Kollegen zur RIPC bei gesunden und hypertrophen Rattenherzen [93]. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Herzfunktion bei gesunden Herzen nach einer Präkonditionierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem gewählten Versuchsaufbau kein positiver Effekt des präkonditionierten Plasmas auf die Herzfunktion nachzuweisen war.

### ***4.3 Die RIPC in der klinischen Praxis***

Die KHK ist, trotz effektiver Methoden, wie der PTCA, immer noch die führende Todesursache in Europa [2]. Deshalb werden neue therapeutische Strategien zur Kardioprotektion dringend gebraucht. Auf Grund der einfachen Anwendbarkeit, ist die RIPC eine der vielversprechendsten und ein intensiv untersuchter Ansatz zur Kardioprotektion. Dennoch bleiben bis jetzt viele Aspekte bezüglich der zu Grunde liegenden Mechanismen und der Einflussfaktoren fraglich und auch der endgültige Nutzen ist immer noch nicht eindeutig belegt.

Im Gegenteil zeigte die oben bereits beschriebene, kürzlich durchgeführte Multicenter-Studie von Meybohm und Kollegen, dass eine RIPC-Intervention keinen klinischen Nutzen darstellt. Es zeigte sich kein Unterschied im Outcome der RIPC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [42].

Ein ernüchterndes Ergebnis, welches durch eine von Healy et.al. durchgeführte Meta-Analyse, bestehend aus 23 RIPC-Studien mit insgesamt 2200 Patienten, gestützt wird. Auch hier zeigte sich kein Nutzen der RIPC-Interventionen auf klinische Endpunkte bezogen [43].

Andere RIPC-Protokolle, als das von Meybohm et.al. verwendete (4-mal 5-minütige Armischämie gefolgt von jeweils 5-minütiger Reperfusion), könnten jedoch trotzdem protektiv wirken. Beispielsweise durch länger dauernde Ischämiephasen. Zu überlegen wäre auch, ob die negativen Ergebnisse aus der Meybohm-Studie auf die Benutzung des Anästhetikums Propofol zurückzuführen sind. Es existieren Hinweise, dass Propofol mit dem protektiven Effekt einer RIPC interferiert [94].

Obwohl in vielen Tiermodellen ausreichend belegt, ist der protektive Effekt der RIPC beim Menschen bisher also nicht nachzuweisen. Gründe hierfür liegen vor allem in der Schwierigkeit, die komplexen Faktoren, die bei einem akuten Koronarsyndrom (ACS) eine wichtige Rolle spielen, adäquat im Tiermodell zu simulieren. Dazu gehören häufige Komorbiditäten wie Diabetes, Bluthochdruck, Hyperlipidämie und das Metabolische Syndrom. Aber auch Geschlecht und Alter des Patienten spielen, wie oben bereits beschrieben, eine wichtige Rolle. *Tsang et al.* zeigten beispielsweise, dass bei

vorhandenen Komorbiditäten ein stärkerer Stimulus von Nöten ist, um das Myokard zu präkonditionieren [95].

Für eine Annäherung des vielversprechenden Konzeptes der Präkonditionierung an eine praktische Anwendung im Klinikalltag wären Tiermodelle von Nöten, die diese Faktoren berücksichtigen.

Die deutlichen Unterschiede zwischen Männern und Frauen in Bezug auf Ischämie-Situationen des Herzens, sowie Kardioprotektion, erfordern ebenfalls einige Aufmerksamkeit, denn sie implizieren die Sinnhaftigkeit von unterschiedlichen Behandlungsstrategien in Bezug auf die Geschlechter. Auch hier gibt es einige, nicht ausreichend untersuchte Faktoren, wie die Rolle des Östrogens und dessen sowohl protektiven, aber auch schädlichen Einflusses auf das Myokard in einer I/R-Situation.

Bisher konnte keine große klinische Studie zeigen, dass eine kardioprotektive Intervention das Outcome von Patienten in einem klinischen Setting verbessert [46].

### ***4.4 Fazit***

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die vorliegende Studie zur Klärung der eingangs gestellten Fragen geführt hat.

Es wurde erfolgreich der protektive Effekt einer RIPC via Blutplasma von männlichen Probanden auf ein isoliert perfundiertes Rattenherz übertragen. Somit wurde die Hypothese, dass humorale Faktoren eine essenzielle Rolle bei der Kardioprotektion durch RIPC spielen, weiter untermauert.

Des Weiteren zeigte sich, wie in einigen anderen Studien, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der Präkonditionierung von jungen (18 – 30 Jahre) Männern im Vergleich zu jungen Frauen gibt: ein weiterer Hinweis sowohl auf die Geschlechtsabhängigkeit des protektiven Effektes, als auch auf die Altersabhängigkeit.

### ***4.5 Die Zukunft der Kardioprotektion***

In nächster Zeit wird es essenziell sein, die genauen Mechanismen dieser Abhängigkeiten zu explorieren, um wichtige Einblicke in bessere und individuellere kardioprotektive Strategien zu bekommen. Hierzu werden sowohl größere klinische Studien, als auch

weitere experimentelle Ansätze, die die verschiedenen Confounder (Alter, Geschlecht, Komorbiditäten) mit in Betracht ziehen, von Nöten sein.

Gelingt es, die Mechanismen der ischämische Präkonditionierung zu verstehen und klinisch nutzbar zu machen, könnte dies zu einem mächtigen Instrument der Kardioprotektion für Risikopatienten werden und deren Prognose deutlich verbessern.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112.
2. Frohlich, G.M., et al., *Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI*. Eur Heart J, 2013. **34**(23): p. 1714-22.
3. Ostadal, B. and P. Ostadal, *Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 541-54.
4. (Destatis), S.B., *Todesursachen in Deutschland*. 2017. **Fachserie 12 Reihe 4**.
5. Mandelzweig, L., et al., *The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: Characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004*. Eur Heart J, 2006. **27**(19): p. 2285-93.
6. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
7. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
8. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
9. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
10. Przyklenk, K. and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning: exploring the paradox*. Prog Cardiovasc Dis, 1998. **40**(6): p. 517-47.
11. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
12. Przyklenk, K., *Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations*. Anesth Analg, 2013. **117**(4): p. 891-901.
13. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
14. Walsh, S.R., et al., *Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008. **34**(5): p. 985-94.
15. Vaage, J. and G. Valen, *Preconditioning and cardiac surgery*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S709-14.
16. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
17. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. **94**(9): p. 2193-200.
18. Pell, T.J., et al., *Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. H1542-7.
19. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply*

- combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit.* Circulation, 1997. **96**(5): p. 1641-6.
20. Kharbanda, R.K., et al., *Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo.* Circulation, 2002. **106**(23): p. 2881-3.
  21. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 377-86.
  22. Lim, S.Y. and D.J. Hausenloy, *Remote ischemic conditioning: from bench to bedside.* Front Physiol, 2012. **3**: p. 27.
  23. Przyklenk, K. and P. Whittaker, *Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 255-9.
  24. Konstantinov, I.E., et al., *The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans.* Physiol Genomics, 2004. **19**(1): p. 143-50.
  25. Dickson, E.W., et al., *Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent.* Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2451-7.
  26. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning.* Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
  27. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(11): p. 2277-82.
  28. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial.* Lancet, 2007. **370**(9587): p. 575-9.
  29. Venugopal, V., et al., *Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial.* Heart, 2009. **95**(19): p. 1567-71.
  30. Ali, N., et al., *Induced remote ischemic pre-conditioning on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing coronary artery bypass.* J Coll Physicians Surg Pak, 2010. **20**(7): p. 427-31.
  31. Rahman, I.A., et al., *Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment?* Circulation, 2010. **122**(11 Suppl): p. S53-9.
  32. Reiter, R., T.D. Henry, and J.H. Traverse, *Preinfarction angina reduces infarct size in ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention.* Circ Cardiovasc Interv, 2013. **6**(1): p. 52-8.
  33. Candilio, L., D.J. Hausenloy, and D.M. Yellon, *Remote ischemic conditioning: a clinical trial's update.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 304-12.
  34. Ali, Z.A., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial.* Circulation, 2007. **116**(11 Suppl): p. I98-105.
  35. Walsh, S.R., et al., *Remote ischemic preconditioning for renal and cardiac protection during endovascular aneurysm repair: a randomized controlled trial.* J Endovasc Ther, 2009. **16**(6): p. 680-9.
  36. Hoole, S.P., et al., *Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial.* Circulation, 2009. **119**(6): p. 820-7.
  37. Hoole, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning stimulus does not reduce microvascular resistance or improve myocardial blood flow in patients*

- undergoing elective percutaneous coronary intervention*. *Angiology*, 2009. **60**(4): p. 403-11.
38. Hoole, S.P., et al., *Remote ischaemic pre-conditioning does not attenuate ischaemic left ventricular dysfunction in humans*. *Eur J Heart Fail*, 2009. **11**(5): p. 497-505.
  39. Walsh, S.R., et al., *Remote ischemic preconditioning for renal protection during elective open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: randomized controlled trial*. *Vasc Endovascular Surg*, 2010. **44**(5): p. 334-40.
  40. Walsh, S.R., et al., *Remote ischemic preconditioning for cerebral and cardiac protection during carotid endarterectomy: results from a pilot randomized clinical trial*. *Vasc Endovascular Surg*, 2010. **44**(6): p. 434-9.
  41. Iliodromitis, E.K., et al., *Increased C reactive protein and cardiac enzyme levels after coronary stent implantation. Is there protection by remote ischaemic preconditioning?* *Heart*, 2006. **92**(12): p. 1821-6.
  42. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
  43. Healy, D.A., et al., *Remote preconditioning and major clinical complications following adult cardiovascular surgery: systematic review and meta-analysis*. *Int J Cardiol*, 2014. **176**(1): p. 20-31.
  44. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (ERICCA): rationale and study design of a multi-centre randomized double-blinded controlled clinical trial*. *Clin Res Cardiol*, 2012. **101**(5): p. 339-48.
  45. Meybohm, P., et al., *RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial Dysfunction, Postoperative Neurocognitive Dysfunction, and 1 Year Follow-Up*. *J Am Heart Assoc*, 2018. **7**(7).
  46. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic*. *Lancet*, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
  47. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?* *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010. **24**(3): p. 235-54.
  48. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. *Circulation*, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
  49. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia*. *Circ Res*, 1993. **72**(6): p. 1293-9.
  50. Ostadal, B., et al., *Gender differences in cardiac ischemic injury and protection-experimental aspects*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. **234**(9): p. 1011-9.
  51. Boddaert, J., et al., *Age and gender effects on apoptosis in the human coronary arterial wall*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(6-7): p. 678-84.
  52. Liu, X.K., et al., *Female gender is a risk factor for torsades de pointes in an in vitro animal model*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999. **34**(2): p. 287-94.
  53. Dubey, R.K., et al., *Sex hormones and hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(3): p. 688-708.
  54. Chu, S.H., et al., *Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle*. *Life Sci*, 2005. **76**(23): p. 2735-49.
  55. Arieli, Y., et al., *Gender modulation of Ca(2+) uptake in cardiac mitochondria*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(2): p. 507-13.

56. Colom, B., et al., *Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 456-65.
57. Johnson, M.S., R.L. Moore, and D.A. Brown, *Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2644-47.
58. Ostadal, B. and F. Kolar, *Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects*. Respir Physiol Neurobiol, 2007. **158**(2-3): p. 224-36.
59. Duvall, W.L., *Cardiovascular disease in women*. Mt Sinai J Med, 2003. **70**(5): p. 293-305.
60. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group*. Jama, 1998. **280**(7): p. 605-13.
61. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. Jama, 2002. **288**(3): p. 321-33.
62. Hale, S.L., Y. Birnbaum, and R.A. Kloner, *beta-Estradiol, but not alpha-estradiol, reduced myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion*. Am Heart J, 1996. **132**(2 Pt 1): p. 258-62.
63. Lagranha, C.J., et al., *Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females*. Circ Res, 2010. **106**(11): p. 1681-91.
64. Simoncini, T., et al., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 538-41.
65. Chen, C.H., et al., *Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart*. Science, 2008. **321**(5895): p. 1493-5.
66. Wu, Z.K., et al., *Ischemic preconditioning protects right ventricular function in coronary artery bypass grafting patients experiencing angina within 48-72 hours*. J Cardiovasc Surg (Torino), 2002. **43**(3): p. 319-26.
67. Shinmura, K., et al., *Gender and aging do not impair opioid-induced late preconditioning in rats*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(1): p. 46-55.
68. Song, X., et al., *Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(4): p. 459-66.
69. Humphreys, R.A., K.A. Kane, and J.R. Parratt, *The influence of maturation and gender on the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning in rats*. Basic Res Cardiol, 1999. **94**(1): p. 1-8.
70. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(6): p. 940-50.
71. Lucchinetti, E., et al., *Remote ischemic preconditioning applied during isoflurane inhalation provides no benefit to the myocardium of patients undergoing on-pump coronary artery bypass graft surgery: lack of synergy or evidence of antagonism in cardioprotection?* Anesthesiology, 2012. **116**(2): p. 296-310.
72. Hong, D.M., et al., *Does remote ischaemic preconditioning with postconditioning improve clinical outcomes of patients undergoing cardiac surgery? Remote Ischaemic Preconditioning with Postconditioning Outcome Trial*. Eur Heart J, 2014. **35**(3): p. 176-83.



73. Shimizu, M., et al., *Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(5): p. 191-200.
74. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-96.
75. Poli-de-Figueiredo, L.F., et al., *Experimental models of sepsis and their clinical relevance*. Shock, 2008. **30** Suppl 1: p. 53-9.
76. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 613-27.
77. Sutherland, F.J., et al., *Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 867-78.
78. Khaliulin, I., et al., *Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 3): p. 1147-61.
79. Yellon, D.M., et al., *The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(8): p. 895-907.
80. Awan, M.M., et al., *Normothermic transfer times up to 3 min will not precondition the isolated rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 503-11.
81. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation*. Basic Res Cardiol, 1995. **90**(5): p. 418-23.
82. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. Atherosclerosis, 2009. **204**(2): p. 334-41.
83. Dickson, E.W., et al., *Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence*. J Thromb Thrombolysis, 1999. **8**(2): p. 123-9.
84. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 478-86.
85. Besik, J., et al., *Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats*. Physiol Res, 2007. **56**(3): p. 267-74.
86. Steenbergen, C., et al., *Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart*. Circ Res, 1987. **60**(5): p. 700-7.
87. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schafer, *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S644-8.
88. Leinwand, L.A., *Sex is a potent modifier of the cardiovascular system*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 302-7.
89. Lee, T.M., et al., *Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) Channels in canine hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(7): p. 1147-58.
90. Cao, Z., et al., *Sex differences in the mechanism of Met5-enkephalin-induced cardioprotection: role of PI3K/Akt*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H302-10.
91. Turcato, S., et al., *Ischemic preconditioning depends on age and gender*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(3): p. 235-43.
92. Baxter, G.F., F.M. Goma, and D.M. Yellon, *Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium*. Basic Res Cardiol, 1997. **92**(3): p. 159-67.

93. Voucharas, C., et al., *Remote preconditioning in normal and hypertrophic rat hearts*. J Cardiothorac Surg, 2011. **6**: p. 34.
94. Bautin, A.E., et al., *[Effects of remote ischemic preconditioning on perioperative period in elective aortic valve replacement]*. Anesteziol Reanimatol, 2014(3): p. 11-7.
95. Tsang, A., et al., *Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2360-4.

## 6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Inge Bauer und Herrn Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen aus der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die unkomplizierte und konstruktive Betreuung sowie, zusammen mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf (zu Beginn meiner Arbeit ebenfalls an der Klinik für Anästhesiologie tätig), für die Überlassung des Themas. Danke für die tatkräftige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit!

Außerdem danke ich Frau Claudia Dohle für die Unterstützung im Labor während der Versuche und der anschließenden Auswertung.

Anika Schmidt gebührt ein besonderer Dank für die Einarbeitung an der Langendorff-Anlage mit ihren technischen Feinheiten und der Handhabung der Versuchstiere.

Meinem Freund und Laborpartner David Mally danke ich für die interessante und stets kreative Gestaltung unserer Versuchstage und tatkräftige Unterstützung bei der Lösung jeglicher Probleme, die sich uns präsentierten.

Mein Lebensweg und beruflicher Werdegang, inklusive dieser Arbeit, wären ohne meine Familie niemals möglich gewesen. Ohne die bedingungslose Unterstützung meiner Eltern, meiner Großeltern und meiner Schwester wäre ich niemals so weit gekommen. Ich kann euch gar nicht genug danken!

Zuletzt möchte ich meiner zukünftigen Frau, Claire Schmitz-Justen, danken. Deine lebensfrohe Art und positive Einstellung inspiriert und motiviert mich jeden Tag aufs Neue. Danke, dass du an meiner Seite bist!