

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

**Einfluss von Alter auf die Kardioprotektion durch
ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) in der
Ratte *in vivo***

Dissertation

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

vorgelegt von

Lilli vom Bruch

2021

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. Hug Aubin

Für Florian

Ergebnisse und Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Behmenburg, F., Heinen, A., vom Bruch, L., Hollmann, M.W., Huhn, R., (2017),
Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is blocked in the aged rat
heart *in vivo*. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, (31)
1223-1226

Zusammenfassung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die wiederholte ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC, *remote ischemic preconditioning*) eine wirksame Methode ist, um das Herz vor Schäden durch Ischämie und Reperfusion zu schützen. Dieser Effekt konnte in großen klinischen Studien nicht bestätigt werden. Die kardioprotektiven Effekte der RIPC könnten durch verschiedene Einflussfaktoren, wie zum Beispiel das Alter, beeinflusst worden sein. Der alleinige Einfluss des Alters auf die RIPC und die damit verbundene fehlende Übertragbarkeit in den klinischen Alltag ist noch unbekannt.

Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob die Effekte der RIPC im Alter aufgehoben sind.

Die Versuche wurden in einem *in vivo* Modell an jungen (J, 2-3 Monate) und alten (A, 22-24 Monate) männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Die Randomisierung erfolgte in vier Gruppen (n=6). Die Kontrollgruppen (J-Con und A-Con) wurden nicht behandelt. Die RIPC Gruppen (J-RIPC und A-RIPC) unterliefen vier Zyklen einer fünfminütigen, beidseitigen Hinterbeinischämie mit fünfminütigen Reperfusionsphasen. Alle Tiere erhielten eine 25-minütige regionale Myokardischämie, mit darauffolgender 120 Minuten andauernder Reperfusionsphase. Im Anschluss an die Reperfusion wurden die Herzen entnommen und die Infarktgröße in Prozent des Risikogebiets mittels TTC-Färbung gemessen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Es wurde eine benötigte Gruppengröße von n=6 berechnet, um eine Differenz von 20% in der Infarktgröße mit einer Teststärke von 80% und einem α -Fehler $<0,05$ detektieren zu können. Die Infarktgrößen wurden mittels t-Test analysiert. Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war.

Es zeigte sich, dass RIPC die Infarktgröße in den jungen Ratten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (J-RIPC: $31 \pm 9\%$ vs. J-Con: $56 \pm 9\%$; $p < 0,05$). In den gealterten Ratten waren die kardioprotektiven Effekte von RIPC ganz aufgehoben (A-RIPC: $62 \pm 8\%$, A-Con: $63 \pm 4\%$; n.s.).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt der Kardioprotektion durch RIPC in gealterten Rattenherzen ganz aufgehoben ist. Das Alter scheint ein unabhängiger Einflussfaktor der RIPC zu sein. Das Ergebnis trägt somit zu der Erklärung der fehlenden Übertragbarkeit der RIPC in klinischen Studien bei.

Die Ursache für den fehlenden kardioprotektiven Effekt der RIPC im Alter könnte in einer Beeinflussung der Signalübertragung liegen. Weitere Studien zu den genauen Mechanismen der RIPC und den Veränderungen im Alter sind notwendig. Ziel sollte es sein, RIPC für den Einsatz im Risikokollektiv zu modulieren, um dann von Vorzügen wie der einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit in einem immer größer werdenden Kollektiv an älteren Patienten im klinischen Alltag zu profitieren.

Abstract

Various studies have shown that remote ischemic preconditioning (RIPC) is a potent mechanism to protect the heart from injury caused by ischemia and reperfusion. This cardioprotective effect could not be confirmed by large clinical trials. Effectiveness of RIPC may have been influenced by different confounding factors, for example age. The sole influence of age on RIPC and the corresponding reason for the lack of transferability in clinical daily routine is unknown.

The aim of the study was to investigate whether the effectiveness of RIPC is canceled out by advancing age.

We used an *in vivo* rat model including young (Y, 2-3 months) and aged (A, 22-24 months) male Wistar rats. Animals were randomized to four groups (n=6). Animals of control groups did not receive RIPC treatment. RIPC groups (Y-RIPC; A-RIPC) underwent four cycles of five minutes of bilateral hindlimb ischemia, each followed by five minutes of reperfusion. After that, all animals received 25 minutes of regional myocardial ischemia (ligation of a main branch of the left coronary artery), followed by 120 minutes reperfusion time. At the end of reperfusion, hearts were excised, and infarct size, presented as percentage of area at risk, was determined by TTC-staining. Data are represented as mean $\pm$ standard deviation. Sample size was calculated with a group size of n=6 to detect a difference in infarct size of 20% with a power of 80% and an $\alpha < 0.05$. Analysis of infarct size was performed by t-Test. Differences between the groups were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RIPC caused a significant infarct size reduction in young rats treated by RIPC-protocol compared to control group (Y-RIPC: $31 \pm 9\%$ vs. Y-Con: $56 \pm 9\%$; $p < 0.05$). The cardioprotective effect of RIPC was completely canceled out in aged rats (A-RIPC: $62 \pm 8\%$, A-Con: $63 \pm 4\%$; ns).

These data show that cardioprotection by RIPC is absent in aged rat hearts.

In conclusion, age seems to be an independent confounding factor. The results of this study could help to explain difficulties regarding clinical implementation of RIPC. The underlying reason for the absent cardioprotective effect in senescent hearts could possibly be caused by changes in signal transduction.

More studies are needed to determine the underlying mechanism of RIPC and age-dependent changes.

In the future, RIPC should be modulated for efficient use in high-risk groups, so it is possible to benefit from advantages such as easy and reasonable execution in an ever-increasing group of older people in the clinical setting.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>area at risk</i>
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP PKA	zyklische Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase A
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CKMB	Myokardiale Kreatin-Kinase
CON	Kontrollgruppe
CX43	<i>Connexin 43</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPO	Erythropoetin
ERK 1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
FiO₂	<i>fraction of inspired oxygen</i>
g	Gramm
GLP 1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3β
HIF-1α	Hypoxie induzierbarer Faktor 1α
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IPC	<i>Ischemic Preconditioning</i>
I/R	Ischämie und Reperfusion
IS	<i>infarct size</i>
JAK	Januskinase
KGW	Körpergewicht in Gramm (g)
KHK	Koronare Herzerkrankung
MACCE	<i>Major Adverse Cardiac and Cerebral Event</i>
min⁻¹	Herzfrequenz; Herzschläge pro Minute
miRNA	<i>micro Ribonucleic acid</i>
mK_{ATP}	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal

mK_{Ca}	mitochondrialer calciumabhängiger Kaliumkanal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
NSTEMI	<i>Non ST-segment elevation myocardial infarction</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDF-1α	<i>Stromal cell derived factor-1α</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TLR-4	Toll-Like-Rezeptor 4
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.2	Pathophysiologie des Myokardinfarktes	2
1.2.1	Ischämiephase	4
1.2.2	Reperusionsphase	5
1.3	Präkonditionierung.....	7
1.3.1	Ischämische Fernpräkonditionierung	8
1.3.2	Signaltransduktion RIPC	10
1.4	Einflussfaktoren der RIPC	15
1.5	Einflussfaktor Alter.....	15
1.5.1	Einfluss des Alters auf IPC.....	16
1.5.2	Einfluss des Alters auf RIPC	17
1.6	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material.....	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Versuchsaufbau	21
2.2.2	Darstellung des Infarktareals	22
2.2.3	Versuchsprotokoll.....	23
2.2.4	Statistik	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Effekt der RIPC auf die Infarktgröße.....	25
3.2	Effekt der RIPC auf die Hämodynamik	26
4	Diskussion.....	28
4.1	Beantwortung der Fragestellung.....	29

4.2 Einfluss des Alters auf die Präkonditionierung.....	29
4.3 Altersbedingte Veränderungen der Signaltransduktion der RIPC.....	30
4.3.1 Stimulus	31
4.3.2 Neuronale Übertragung.....	33
4.3.3 Humorale Übertragung.....	33
4.3.4 Mitochondrium	37
4.4 Diskussion der Methode	39
4.4.1 Versuchstiere	39
4.4.2 Versuchsaufbau	40
4.5 Limitation	41
4.5 Schlussfolgerung	42
5 Literaturverzeichnis.....	44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verlauf Ischämie-und Reperfusionsschaden.....	3
Abb. 2: Ischämiephase des Kardiomyozyten.....	4
Abb. 3: Reperusionsphase des Kardiomyozyten.....	6
Abb. 4: Exemplarisches Versuchsprotokoll IPC	7
Abb. 5: Signaltransduktionswege RIPC.....	11
Abb. 6: Mögliche intrazelluläre Signaltransduktion RIPC.....	13
Abb. 7: Mögliche mitochondriale Signaltransduktion RIPC.....	14
Abb. 8: Infarktgrößenbestimmung	23
Abb. 9: Versuchsprotokoll RIPC	24
Abb. 10: Effekt der RIPC auf die Infarktgröße	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Material/Laborgeräte/Software.....	20
Tabelle 2: Hämodynamische Parameter	27

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

1.1.1 Definition

Die Koronare Herzerkrankung (KHK; Synonym: Ischämische Herzkrankheit) wird als Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien definiert.¹ Aufgrund der Koronarstenose kommt es zu einem reduzierten Blutfluss und somit zu einer verringerten Koronardurchblutung. Dies wiederum führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf.^{1,2}

Die durch diesen Zustand hervorgerufene Myokardischämie kann sich verschieden manifestieren.¹ Es wird die symptomatische KHK vom chronischen Geschehen, das symptomlos verläuft (stumme Ischämie), abgegrenzt.^{1,2} Bei der symptomatischen KHK werden vor allem die stabile *Angina pectoris* und das akute Koronarsyndrom, mit den drei klinischen Erscheinungsformen instabile *Angina pectoris* ohne Troponinanstieg, NSTEMI und STEMI, unterschieden.¹

Die chronische Form der KHK kann zu jedem Zeitpunkt in ein akutes, lebensbedrohliches Ereignis übergehen.² Wesentliche Ziele der Behandlung der KHK sind eine sinkende Mortalität und Morbidität sowie eine verbesserte Lebensqualität der Patienten.²

1.1.2 Epidemiologie

Im Rahmen des demographischen Wandels verändern sich Todesursachen und die durch Krankheiten verursachten Gesundheitskosten in der Bevölkerung zunehmend. Neben den psychischen Erkrankungen verursachen Herz-Kreislauferkrankungen momentan die höchsten Krankheitskosten pro Einwohner.³ Im Jahr 2018 waren Todesfälle durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 36,2% die häufigste Ursache.⁴ Hierbei betraf der tödliche Ausgang besonders Personen älter als 65 Jahre.⁴ In der Altersgruppe der

40-49-Jährigen liegt die Lebenszeitprävalenz bei insgesamt 2,6%, bei Personen zwischen 70 und 79 Jahren steigt sie auf 24,9%.⁵

Soziale Faktoren scheinen im Rahmen der Entwicklung von Herz-Kreislaufkrankungen eine Rolle zu spielen. So zeigte sich in der INTERHEART Studie, dass Personen mit einem geringen sozialen Status ein deutlich erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen aufweisen.^{5,6}

Im Jahr 2015 geborene Kinder werden Berechnungen zufolge durchschnittlich das 80. Lebensjahr erreichen und somit wahrscheinlich ein höheres Risiko haben im Alter Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erleiden.⁷ Der demographische Wandel führt in der Bevölkerung zu einem immer weiter ansteigenden Anteil an alten Patienten. Im Rahmen dieser Entwicklung gewinnen Strategien zur Reduktion von Mortalität und Morbidität bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer mehr an Bedeutung.⁷ Es muss versucht werden, eine effektive und einfach umsetzbare Methode zur Reduktion von Mortalität und Morbidität im Rahmen der KHK zu schaffen. Einen ersten Schritt stellt hierbei die Erforschung der ischämischen Präkonditionierung dar.

1.2 Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Im Rahmen des Myokardinfarktes kommt es zu einem Verschluss der Koronararterien mit Ischämie der Kardiomyozyten und nachfolgendem Zelltod.⁸ In dem von der betroffenen Koronararterie versorgten Areal (AAR; *area at risk*) führen eine fehlende Wiederherstellung der Perfusion und die damit verbundene Sauerstoffunterversorgung zu einem Verlust von Myokardzellen. Die Nekrose der Myokardzellen des Risikogebietes wird als Infarktgröße bezeichnet (IS; *infarct size*).^{9,10} Die Ischämietoleranz ist abhängig von Organ und Spezies.^{9,11,12} Beim menschlichen Myokard sind die entstehenden Ischämieschäden in den ersten 30-40 Minuten teilweise reversibel.¹³ Auch eine iatrogen unterbrochene Blutzufuhr am Herzen bei Behandlungsverfahren wie Organtransplantation, Ballonangioplastie und Bypass-Operation kann einen Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) auslösen.¹⁴

Die endgültige Infarktgröße wird sowohl von der Ischämiephase als auch von der Reperfusionphase bestimmt.¹⁵ Beide Prozesse tragen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu der Entwicklung des Gesamtschadens bei.^{15,16} Einen Überblick der Zusammenhänge zwischen Ischämie und Reperfusion gibt Abbildung 1.

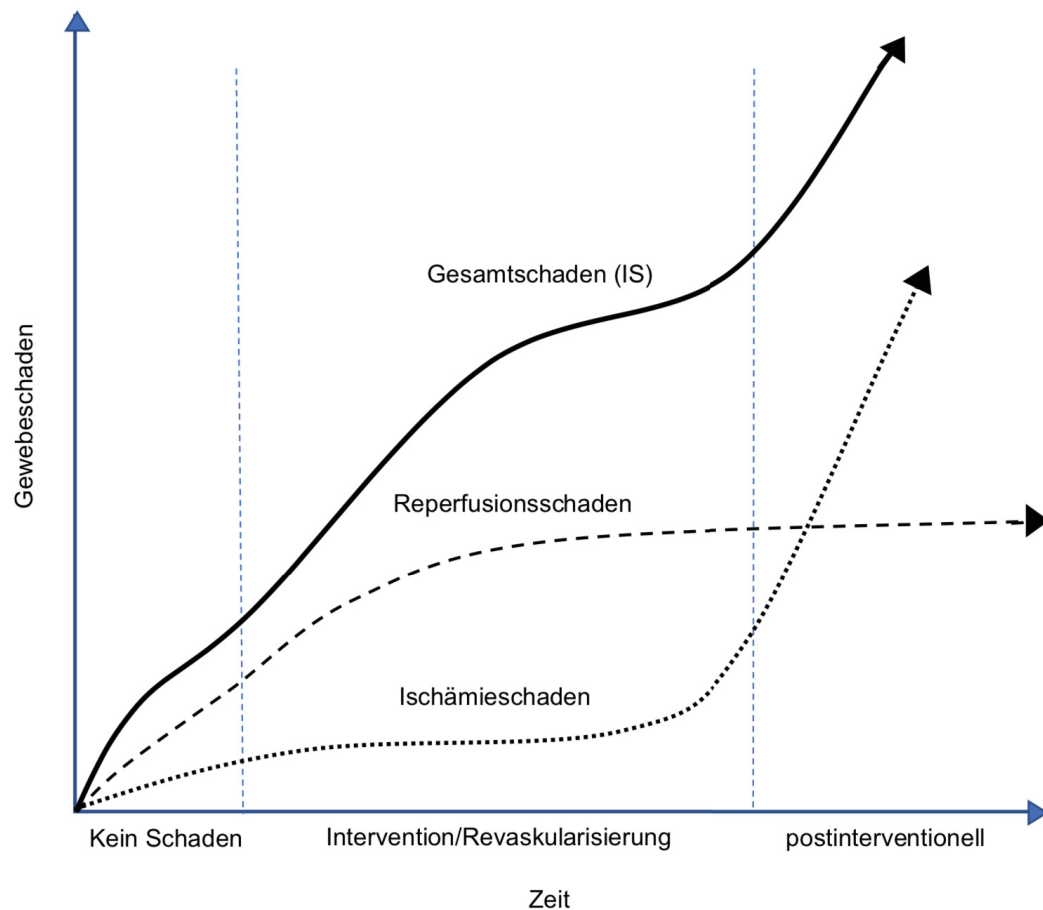


Abb.1: **Verlauf Ischämie-Reperfusionsschaden:** Abbildung 1 zeigt schematisch den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Gewebes Schadens durch einen Myokardinfarkt mit nachfolgender Intervention (Revaskularisierung). Reperfusionsschaden und Ischämieschaden treten zu unterschiedlichen Zeiten auf und führen in ihrer Summe zur Gesamtgröße des Infarkts (IS; *infarct size*). Modifiziert nach Bulkley et al. (1987).¹⁷

1.2.1 Ischämiephase

Durch das verringerte Angebot an Sauerstoff kommt es während der Ischämie zu einer Veränderung von zellulären und molekularen Prozessen in den Kardiomyozyten.¹⁸ Eine vereinfachte Darstellung findet sich in Abbildung 2. Die Umstellung der Zellen von aerober auf anaerobe Glykolyse führt zu einem verringerten ATP-Gehalt, einem sinkenden pH-Wert und einem erhöhten Laktatgehalt in der Zelle.¹⁹ Diese Prozesse lösen Veränderungen im Calciumhaushalt aus.¹⁸ Der Gehalt an intrazellulärem Calcium nimmt durch die fehlende Funktion verschiedener ATP-abhängiger Membrantransporter zusätzlich zu.

Klinisch können sich während der Ischämiephase typische Veränderungen im EKG wie z.B. ST-Strecken-Veränderung zeigen.¹ Auch eine eingeschränkte kardiale Funktion und auftretende Arrhythmien können beobachtet werden.¹

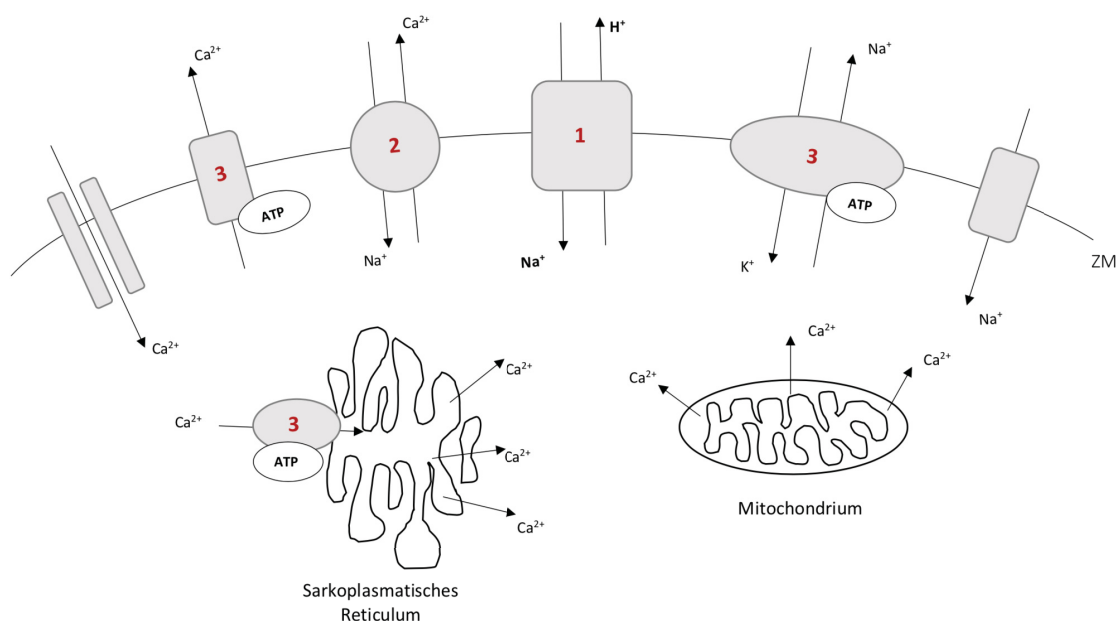


Abb.2: **Ischämiephase des Kardiomyozyten:** Abbildung 2 zeigt exemplarisch die intrazellulären Vorgänge während der Ischämiephase eines Kardiomyozyten. Aufgrund des steigenden pH-Wertes kommt es zu einem Austausch von H⁺ gegen Na⁺ aus der Zelle (1). Bei steigendem intrazellulärem Na⁺ sinkt die Aktivität des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (2). Der Mangel an ATP führt zum Ausfall ATP-abhängiger Ionenkanäle (3), dies führt zusätzlich zu einer Akkumulation von Ca²⁺ und Na⁺ intrazellulär. Modifiziert nach Sanada et al. (2011).¹⁹

1.2.2 Reperfusionsphase

Durch die anschließende Reperfusion steigt der Sauerstoffgehalt der Zelle an, der ATP-Gehalt und der extrazelluläre pH-Wert normalisieren sich.¹⁹ Dies führt zu einem hohen pH-Gradienten gegenüber dem intrazellulären Raum und einem Einstrom von Na^+ über den Na^+/H^+ -Austauscher. Über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gelangt das überflüssige Na^+ aus der Zelle, dafür wird Ca^{2+} in die Zelle aufgenommen. Der normalisierte intrazelluläre pH-Wert hebt die Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain auf.^{18,20} Dies aktiviert die Apoptosekaskade im Kardiomyozyten. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) aus den Mitochondrien schädigen zelluläre Strukturen wie Enzyme, Ionenkanäle und die Zellmembran. Durch den inflammatorischen Prozess immigrierte neutrophile Granulozyten sezernieren zusätzlich ROS.^{21,22} Der Ca^{2+} -Überschuss und die vorhandenen Sauerstoffradikale stoßen Nekrose- und Apoptosekaskaden an.¹⁹ Das freigesetzte Calcium führt zu DNA-Schäden, Denaturierung von Enzymen und Zellmembranschäden.²³ In den Mitochondrien führt der Ca^{2+} -Anstieg in Kombination mit der Freisetzung von ROS und dem normalisierten pH-Wert in der Reperfusionsphase zur verlängerten Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP).^{23,24} Es folgt eine unregulierte Freisetzung von Ca^{2+} , Schwellung der Mitochondrienmatrix und die oxidative Phosphorylierung wird nachfolgend beendet. Die Ruptur der äußeren Membran und Freisetzung der dort vorhandenen Apoptosetrigger wie Cytochrom C führt zum Zelltod des Kardiomyozyten.²⁴ Die verschiedenen Abläufe der Reperfusionsphase finden sich in Abbildung 3.

Klinisch können sich nach der Reperfusion zum Beispiel Arrhythmien und eine verlängerte kontraktile Dysfunktion zeigen.¹³ Histologisch finden sich unter anderem myokardiale Hämorrhagien (Kontraktionsbande), Nekrosen von Kardiomyozyten und zerstörte kleine Gefäße als Zeichen einer mikrovaskulären Obstruktion.^{13,25}

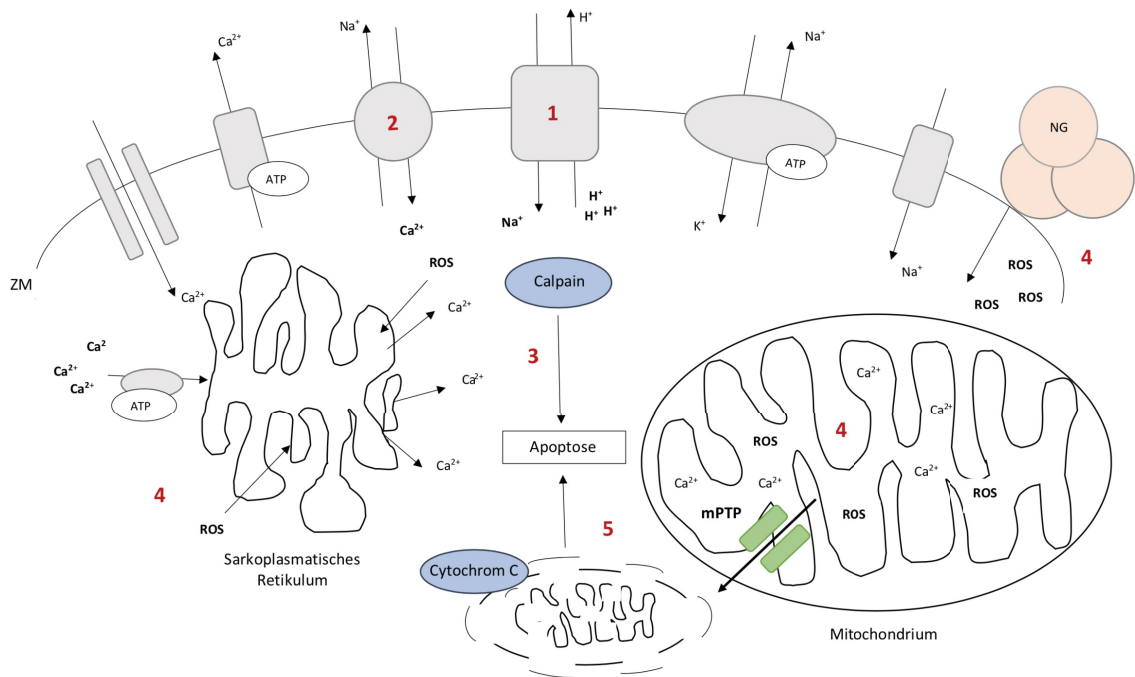


Abb.3: **Reperfusionsphase des Kardiomyozyten:** Abbildung 3 zeigt die intrazellulären Vorgänge während der Reperfusionsphase eines Kardiomyozyten. Aufgrund des sinkenden extrazellulären pH-Wertes steigt der H⁺-Gradient gegenüber dem Intrazellularraum an und der Na⁺/H⁺- Austauscher bringt Na⁺ in die Zelle (1). Über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher wird Na⁺ aus der Zelle und Ca²⁺ in die Zelle gebracht (2). Der normalisierte intrazelluläre pH-Wert hebt die Hemmung der Ca²⁺-abhängigen Protease Calpain auf, es folgt eine Aktivierung der Apoptosekaskade (3). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden von Mitochondrien und neutrophilen Granulozyten sezerniert. Sie schädigen zelluläre Strukturen wie Enzyme, Ionenkanäle und die Zellmembran (4). Der Ca²⁺-Anstieg und die freigesetzten ROS führen in den Mitochondrien zur Öffnung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP). Die oxidative Phosphorylierung wird beendet und die äußere Mitochondrienmembran rupturiert. Es werden Apoptosetrigger (Cytochrom C) frei und der Zelltod wird eingeleitet (5). Neutrophile Granulozyten (NG); Zellmembran (ZM). Modifiziert nach Sanada et al. (2011) und Hausenloy et al. (2013).^{19,23}

1.3 Präkonditionierung

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC; *Ischemic Preconditioning*) beschreibt, dass bestimmte Organe durch vorherige wiederholte kurze Ischämie- und Reperfusionsphasen einen geringeren Schaden durch eine längere Ischämiephase erleiden können. Im Falle des Herzens würde so eine vorher gesetzte Ischämie mit nachfolgender Reperfusion das Myokard schützen und zu einem geringeren Infarktareal und einer verbesserten Organfunktion führen.^{26,27}

Mitte der 1980er Jahre zeigten Murry et al. erstmalig, dass mit Hilfe der Präkonditionierung die Infarktgröße verringert werden kann.²⁸ Dazu führte die Arbeitsgruppe bei narkotisierten Hunden *in vivo* vier Zyklen eines jeweils fünfminütigen Verschlusses einer Koronararterie mit nachfolgender Reperfusionsphase durch. Im Anschluss daran durchliefen Interventions- und Kontrollgruppe eine vierzigminütige Okklusion der Koronararterie. Eine exemplarische Darstellung des Versuchsprotokolls findet sich in Abbildung 4.

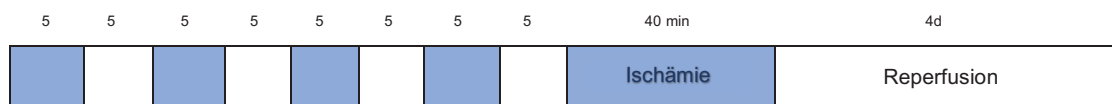


Abb. 4: **Exemplarisches Versuchsprotokoll IPC:** Abbildung 4 zeigt den exemplarischen Versuchsaufbau des durch Murry et al. durchgeführten Versuchs. Dargestellt sind jeweils vier fünfminütige Ischämiephasen (blau) mit nachfolgender fünfminütiger Reperfusion (weiß). Im Anschluss erfolgt eine Ischämie von 40 Minuten. Der Versuch endet nach einer Reperfusionsphase von 4 Tagen (4d).²⁸

Murry et al. konnten zeigen, dass die Koronarokklusion in der Interventionsgruppe zu einer um 75% reduzierten Infarktgröße im Vergleich zu der Kontrollgruppe führte. In der Interventionsgruppe, die einen dreistündigen Koronarverschluss erhielt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Anfang der 1990er Jahre konnte erstmals der Effekt der IPC am menschlichen Herzen während einer Bypass Operation belegt werden.²⁹ Nach zwei dreiminütigen Ischämien mit nachfolgender Reperfusion zeigte sich, dass in den

Myokardbiopsien der Interventionsgruppe mehr ATP gemessen werden konnte. Dies führte zu der Annahme, dass der verringerte ATP Verbrauch auf eine erhöhte Ischämietoleranz hinweise.²⁹

Auch in anderen Organen konnten im Verlauf die Effekte der IPC nachgewiesen werden. Die Präkonditionierung bei der Ratte führte zu einer Reduktion des Infarktareals im Gehirn.³⁰ Auch in Organen wie der Niere, der Leber und der Lunge konnte die Wirksamkeit der IPC nachgewiesen werden.^{31,32,33}

Einen Nachteil der IPC stellt die Notwendigkeit der Applikation des Reizes am Zielorgan dar. Um den positiven Effekt zu erzielen muss eine direkte Ischämie zum Beispiel am Herzen erfolgen. Aufgrund der hohen Invasivität der IPC und den damit verbundenen Risiken für den Patienten ist diese Methode für den klinischen Alltag wenig geeignet.

Die im Folgenden beschriebene ischämische Fernpräkonditionierung stellt eine mögliche Alternative zur IPC dar und könnte nicht-invasiv im klinischen Alltag eingesetzt werden.

1.3.1 Ischämische Fernpräkonditionierung

Erstmals wurde der Effekt der ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC; *Remote Ischemic Preconditioning*) von Przyklenk et al. sieben Jahre nach der Entdeckung der IPC durch Murry et al. beschrieben.³⁴ In ihrer Studie erhielten narkotisierte Hunde *in vivo* in der Interventionsgruppe vier Zyklen einer jeweils fünfminütigen Okklusion des *Ramus circumflexus*, gefolgt von jeweils fünfminütigen Reperusionsphasen.³⁴ Im Anschluss wurde die linke deszendierende Koronararterie verschlossen und es zeigte sich eine signifikant reduzierte Infarktgröße in der Interventionsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Przyklenk et al. konnten so erstmals aufzeigen, dass eine ischämische Präkonditionierung zu einem Effekt in Myokardzellen eines fernen Versorgungsgebietes führt.³⁴

In darauffolgenden Studien wurden die Effekte von RIPC unter anderem bezüglich Zeitpunkt, Ort und Umfang des Stimulus näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ischämie im Bereich der Nieren- oder Intestinalarterien zu einer Reduktion des Infarktareals am Herzen führt.³⁵

Es wurde so belegt, dass das Zielorgan und der Ort des Stimulus unterschiedlich sein können.³⁵

Auch der benötigte Stimulus wurde näher untersucht und es zeigte sich, dass neben der invasiven Technik durch direkte Ischämie an einem entfernten Organ auch eine nicht-invasive Technik den gewünschten protektiven Effekt erzielen kann. In einem ersten Schritt gelang es in einem *in vivo* Modell zu demonstrieren, dass eine Ischämie in Kombination mit elektrischer Stimulation am *M. gastrocnemius* beim Kaninchen zu einer 65-prozentigen Reduktion der Infarktgröße am Herzen führt.³⁶ Anschließend konnte in einem *in vivo* Versuch am Schwein gezeigt werden, dass vier Zyklen einer einseitigen Hinterlaufischämie mit Hilfe eines *Tourniquet*, gefolgt von einer Reperusionsphase, eine deutliche Reduktion der Infarktgröße hervorrufen.²⁶

Im Verlauf wurden Fragen nach der Anzahl der benötigten Zyklen, der Wahl der Extremität und Dauer der Ischämiephase näher untersucht. In einem *in vivo* Modell an Kaninchen belegten Sandhu et al. , dass drei Zyklen einer IPC am Herzen die Effektivität gegenüber einem durchgeführten Zyklus steigern.³⁷ Auch in einem Versuch an Mäusen bestätigte sich dieser Effekt.³⁸ Zusätzlich wurde festgestellt, dass das Ausmaß der Protektion unabhängig von der Anzahl der Extremitäten und damit der ischämischen Muskelmasse ist.³⁸

Mittlerweile hat sich der Einsatz der Blutdruckmanschette aus Kostengründen und wegen ihrer einfachen klinischen Anwendbarkeit in der Forschung etabliert. In einer klinischen Studie von Candilio et al. wurde der Einsatz im klinischen Umfeld erprobt.³⁹ Sie konnten zeigen, dass die Verwendung einer Blutdruckmanschette im Rahmen von RIPC zu einem reduzierten Troponinanstieg bei Bypass-Operationen führt.³⁹ Sie schlossen auf ein reduziertes perioperatives Infarktareal.³⁹ In einer Multicenterstudie an 240 Patienten mit PCI konnte der Effekt von RIPC ebenfalls nachgewiesen werden.⁴⁰ Es wurde gezeigt, dass bereits ein Zyklus einer fünfminütigen einseitigen Oberarmischämie zu einer Troponinreduktion führt.⁴⁰

Das Herz stellt nicht das einzige durch Ischämien gefährdete Organ dar. Es konnte auch in anderen, durch ischämische Episoden besonders bedrohten Organen, der protektive Effekt durch RIPC dokumentiert werden.

Eine Multicenterstudie von Zarbock et al. aus dem Jahr 2015 konnte zeigen, dass durch RIPC eine verringerte Anzahl an akutem Nierenversagen bei 240 Patienten, die sich einer Bypass Operation unterzogen, auftrat.⁴¹

Nicht nur im Bereich der Nephroprotektion, sondern auch bei Leberresektionen und Lungenresektionen konnte ein organprotektiver Effekt durch RIPC nachgewiesen werden.^{42,43} In einer prospektiven Studie an über 200 Patienten, die eine Lungenresektion erhielten, zeigte sich, dass es nicht nur postoperativ zu geringeren Serumleveln für IL-6 und TNF- α kam, sondern auch verbesserte sekundäre Endpunkte (akutes Lungenversagen) zu beobachten waren.⁴³

Trotz einfacher Ausführbarkeit und bereits in *in vivo* Modellen gezeigter Effektivität konnte nicht immer ein signifikant reduziertes Troponin als primärer Endpunkt gemessen werden. Thielmann et al. belegten in einer Singlecenterstudie an über 300 Patienten einen kardioprotektiven Effekt.⁴⁴ Im Gegensatz dazu wurde in zwei großen Phase III Multicenterstudien mit jeweils über 1000 Patienten (RIPHeart⁴⁵; ERICCA⁴⁶) kein positiver Effekt der RIPC gezeigt.

Die Wirksamkeit von RIPC könnte *in vivo* durch verschiedene Faktoren beeinflusst worden sein. In Betracht kommen hierbei nicht nur die Wahl des Anästhetikums und die Vormedikation der Probanden, sondern auch vorhandene Komorbiditäten könnten die Studien beeinflusst haben. Um die positiven Effekte von RIPC im klinischen Alltag nutzen zu können, muss die Frage nach der genauen Signaltransduktion beantwortet und die möglichen Einflussfaktoren untersucht werden.

1.3.2 Signaltransduktion RIPC

Bei RIPC am Herzen wird der ischämische Stimulus an einem herzfernen Organ induziert.⁴⁷ Nach der Stimulation findet eine Übertragung über bisher nicht abschließend geklärte Wege zum Effektororgan statt.^{48,49} Es muss zwischen zwei Teilstrecken der Signaltransduktion unterschieden werden.

Der erste Teil besteht aus der Übertragung vom Ort des Stimulus (Extremität) zum Kardiomyozyten. Den zweiten Teil stellt die nachfolgende Übertragung in

der Zelle (zelluläre Signalkaskade) dar.¹⁵ Abbildung 5 zeigt in einer Übersicht die möglichen Signaltransduktionswege der RIPC.



Abb.5: **Signaltransduktionswege RIPC:** Abbildung 5 zeigt schematisch die möglichen Wege der Signaltransduktion durch RIPC. Der Stimulus (Ischämie mit anschließender Reperfusion) wird über zwei Hauptwege zum Effektororgan (Herz) geleitet. Es wird zwischen einem neuronalen und humoralen Weg unterschieden. Am Herz findet dann eine Übertragung mit Hilfe von zellulären Signalkaskaden statt, die eine Kardioprotektion auslösen. Zusätzlich werden systemische Prozesse wie die inflammatorische Immunantwort moduliert. Am Herzen führt die RIPC zu einer Kardioprotektion mit Infarktgrößenreduktion. Modifiziert nach Heusch et al. (2015).⁴⁹

Der Stimulus kann beispielsweise elektrisch^{50,51}, mechanisch⁵², chemisch⁵³ oder, wie im Fall der RIPC, durch Ischämie mit anschließender Reperfusion appliziert werden.¹⁵ Die Übertragung zwischen Ort des Stimulus und Effektororgan erfolgt auf mindestens zwei Wegen.¹⁵

Den ersten möglichen Übertragungsweg stellt die neuronale Übertragung dar.⁵⁴ Für die Beteiligung dieses Übertragungswegs spricht, dass in der Ratte *in vivo* eine Vagotomie zur Aufhebung der kardioprotektiven Effekte durch RIPC führt und die vagale Stimulation in verschiedenen Spezies den Effekt der RIPC imitieren konnte.^{55,56} Der zweite in der Literatur beschriebene Übertragungsweg zwischen Stimulationsort und Effektor (Herz) besteht in der Sekretion von humoralen Faktoren.^{15,57} Für diesen Weg der Übertragung spricht die Beobachtung, dass Blut, Plasma oder Dialysat eines mit RIPC behandelten Spenders auf ein isoliertes Empfängerherz übertragen werden und dort eine Infarktgrößenreduktion erzielen können.^{49,58–60} Auch eine Übertragung zwischen verschiedenen Spezies ist möglich und führt zu einer Infarktgrößenreduktion.⁶¹

Die protektiven humoralen Faktoren wurden als hydrophob^{62,63} und thermolabil⁶³ beschrieben. Dies führt zu der Annahme, dass einige der gesuchten Faktoren Proteine sein könnten.¹⁵ Eventuell findet ein Transport der Faktoren vom Ort der

Stimulation über extrazelluläre Vesikel zum Effektororgan statt.⁶⁴ Sie könnten z.B. verschiedene Proteine, mRNA, DNA oder miRNA transportieren.^{15,65}

Als mögliche humorale Faktoren konnten für die RIPC bisher *Glucagon like peptide-1* (GLP-1)⁶⁶, Adenosin⁶⁷, Opiate⁶⁸, Acetylcholin⁶⁹, Erythropoetin (EPO)⁷⁰, IL-10⁷¹ und der *stromal cell-derived factor 1 α* (SDF-1 α)⁷² identifiziert werden.⁷³

Eine weitere Rolle in der Protektion durch RIPC scheint der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α ; *hypoxia inducible factor 1 alpha*) zu spielen, ein Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der Hypoxie verschiedene zelluläre Mechanismen (z.B. Apoptose, Angiogenese und Glykolyse)⁷⁴ durch Genexpression beeinflusst.⁷⁵

Connexin 43, ein unter anderem an der Bildung von *gap junctions* beteiligtes Transmembranprotein, konnte in kardialen Mitochondrien gefunden werden.⁷⁶ *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Connexin 43 nach RIPC im phosphorylierten Zustand verbleibt und sich ein reduzierter Ischämie- und Reperfusionsschaden findet.⁷⁷ Connexin scheint durch seine Öffnung die gestörte Volumenregulation während der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens zu verstärken.⁷⁷

Nach der Übertragung des Signals aus der Peripherie zum Kardiomyozyten findet eine intrazelluläre Signaltransduktion statt.¹⁵

Diese erfolgt ähnlich der IPC wahrscheinlich hauptsächlich über die drei in Abbildung 6 dargestellten Signaltransduktionswege: *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg, den *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)-Signalweg und den *Endothelial Nitric Oxide Synthase/Proteinkinase G* (eNOS/PKG)-Signalweg. Systemische Reaktionen mit Beteiligung von Erythrozyten und der Freisetzung von Neutrophilen Granulozyten als Teil der inflammatorischen Reaktion werden als mögliche weitere durch RIPC beeinflusste Mechanismen beschrieben.^{78,79}

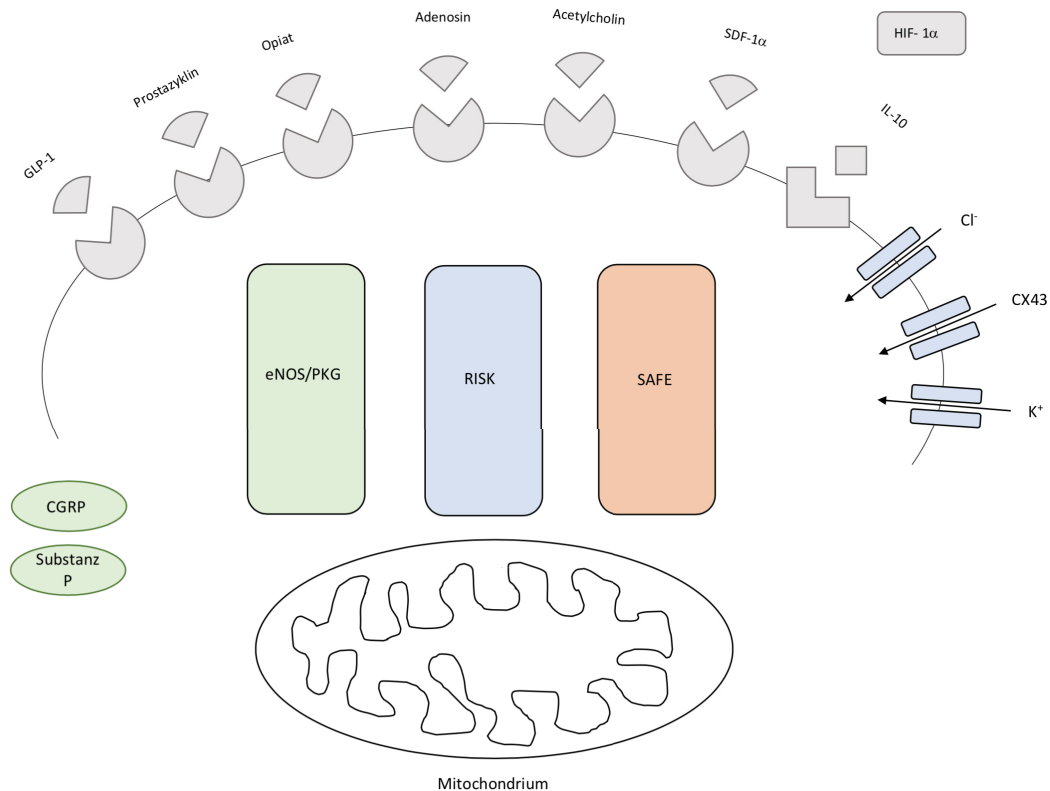


Abb.6: **Mögliche intrazelluläre Signaltransduktion RIPC:** Abbildung 6 zeigt die möglichen humoralen und intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der RIPC in den Kardiomyozyten. Die drei möglichen Wege der Signaltransduktion: RISK-Weg (blau; *reperfusion injury salvage kinase*), SAFE-Weg (orange; *survivor activating factor enhancement*) und der eNOS/PKG-Weg (grün; *endothelial nitric oxide synthase/protein kinase G*). Nach der Bindung der Liganden an den Rezeptor erfolgt die Aktivierung der Signalübertragung. Einen wichtigen Teil der zellulären Endstrecke stellt das Mitochondrium dar (vgl. Abb.7). Die genaue Funktion des Calcitonin gene related peptide (CGRP) und der Substanz P sind nicht abschließend geklärt. *Glucagon like peptide-1* (GLP-1); Erythropoetin (EPO); Interleukin-10 (IL-10); *stromal cell-derived factor 1α* (SDF-1α); Connexin 43 (CX43); Hypoxie-induzierbare Faktor 1α (HIF-1α). Modifiziert nach Kleinbongard et al. (2016).¹⁵

Als zellulärer Endeffektor der RIPC wird das Mitochondrium diskutiert.^{80,81} In einer *in vitro* Studie wurde Plasma von mit RIPC behandelten Schweinen auf isolierte Rattenherzen übertragen und im Anschluss daran die gewonnenen Mitochondrien untersucht.⁸⁰ In den behandelten Herzen wurde eine Infarktgrößenreduktion neben einer verbesserten Funktion der isolierten Mitochondrien dargestellt.⁸⁰ Es zeigte sich in den Mitochondrien eine erhöhte Aktivität der Atmungskette mit einer gesteigerten ATP-Synthese und eine

reduzierte ROS-Produktion.⁸⁰ Außerdem nahm die Calcium-Retentionskapazität der Mitochondrien, als Indikator für eine Öffnung der mPTP, ab.⁸⁰ Die Beteiligung der Mitochondrien an RIPC wurde daher vermutet.⁸⁰

Ein *in vivo* Modell an Ratten, in dem nach RIPC erhöhte mitochondriale Fusionsproteine gemessen wurden, gab ebenfalls einen Hinweis auf die Beteiligung der Mitochondrien an der Kardioprotektion durch RIPC.⁸²

Als mögliche Mechanismen für den Einfluss der Mitochondrien auf die Präkonditionierung werden die Öffnung der mitochondrialen-Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP)^{83,84}, der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mK_{ATP})⁸⁵ und der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle (mK_{Ca})^{86,87} als Endpunkte diskutiert. Eine vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Signaltransduktion erfolgt in Abbildung 7.

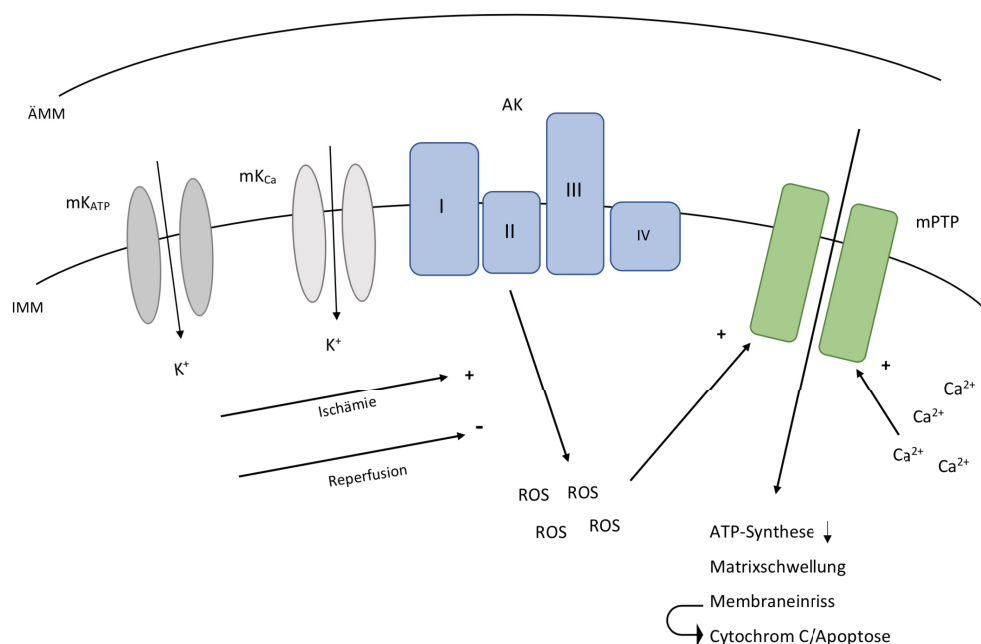


Abb.7: Mögliche mitochondriale Signaltransduktion RIPC: Abbildung 7 zeigt schematisch die mögliche Beeinflussung der RIPC am Mitochondrium. In der Ischämiephase führt die Öffnung der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle (mK_{Ca}) und der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mK_{ATP}) zu einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dieses Signal senkt in der Reperfusionsphase die Bildung von ROS und die Freisetzung von Calcium. Nachfolgend führt dies zu einer verringerten Öffnung der mitochondrialen-Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP). Die Öffnung der mPTP würde die ATP-Synthese beenden, die äußere Mitochondrienmembran rupturieren lassen und den Zelltod einleiten. Äußere Mitochondrienmembran (ÄMM); Innere Mitochondrienmembran (IMM); Atmungskette (AK). Modifiziert nach Bugger et al. (2020) und Rotko et al. (2020).^{86,88}

1.4 Einflussfaktoren der RIPC

Es sind verschiedene Einflussfaktoren bekannt, die den Infarkt-reduzierenden Effekt von RIPC aufheben. In Frage kommen beispielsweise verschiedene Medikamente, die in unterschiedlichem Ausmaß Einfluss auf die ischämische Fernpräkonditionierung nehmen. Unter anderem können laut Studienlage Opioide⁸⁹, ACE-Hemmer⁹⁰, β -Blocker^{91–93}, Statine⁹⁴ und verschiedene Anästhetika⁹⁵ die ischämische Fernpräkonditionierung beeinflussen. Im Rahmen der Therapie erhalten insbesondere Patienten des Risikokollektivs für ischämische Herzerkrankungen Statine und β -Blocker.² Bei der Therapie mit Statinen zeigte sich eine verbesserte Protektion durch RIPC.^{94,96} Die in der Therapie der koronaren Herzerkrankung gängigen β -Blocker hingegen verringerten den kardioprotektiven Effekt.⁹²

Einen weiteren möglichen Einflussfaktor könnte der im Alter gehäuft auftretende *Diabetes mellitus* darstellen.⁹⁷ Es konnte nachgewiesen werden, dass die protektiven Effekte von IPC und RIPC unter akuter Hyperglykämie und bei an *Diabetes mellitus* erkrankten Personen aufgehoben sind.^{98–100} Auch in der Therapie des *Diabetes mellitus* angewandte Medikamente scheinen eine Rolle zu spielen. Kottenberg et al. untersuchten den Einfluss von Sulfonylharnstoffen auf die Kardioprotektion durch RIPC und stellten fest, dass der Infarkt-reduzierende Effekt aufgehoben ist.¹⁰¹

1.5 Einflussfaktor Alter

Das Alter der Probanden könnte bei der Aufhebung der positiven Effekte durch IPC und auch bei der Wirksamkeit der RIPC eine gesonderte Rolle spielen.^{46,102} Im Rahmen des Alterungsprozesses kommt es im Herzen und insbesondere den Kardiomyozyten zu verschiedenen Veränderungen.¹⁰³

Es finden sich so zum Beispiel eine veränderte Gen- und Proteinexpression, ein erhöhtes Level an oxidativem Stress und veränderte Apoptose-mechanismen.^{103,104} Diese Veränderungen können nicht nur zu einer geringeren Kontraktilität, sondern auch zu einer geringeren Toleranz gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden (s. Kap. 1.2.1) führen.¹⁰⁵

Ein Beispiel für die veränderte Genexpression ist das während der Zellreplikation aktive Enzym Telomerase. In gealterten Kardiomyozyten der Ratte kommt es zu einer verringerten Telomeraseaktivität.¹⁰⁴ Es ergibt sich so der Hinweis auf eine verringerte Proliferationsaktivität und damit eventuell verbundene Reparaturdefizite.

Auch der Umgang mit oxidativem Stress ist in den gealterten Kardiomyozyten verändert.¹⁰³ Hierfür kommen einerseits fehlende Schutzmechanismen wie antioxidative Proteine (z.B. Hämoxygenase-1)¹⁰⁶ und andererseits eine vermehrte Produktion von oxidativen Stress auslösenden Substanzen (ROS) in Frage.¹⁰⁷ Der erhöhte oxidative Stress kann dann zu einem veränderten Apoptose- und Nekroseverhalten in den Kardiomyozyten führen.¹⁰³ Die damit verbundenen Umbauprozesse führen wiederum zu einer verringerten Kontraktilität.¹⁰⁸

1.5.1 Einfluss des Alters auf IPC

In verschiedenen Studien wurden bereits die Auswirkungen von Alter auf die IPC untersucht und *in vitro* konnte der Verlust der IPC bei Ratten im mittleren Lebensalter (7-8 Monate) aufgezeigt werden.¹⁰⁹ Diese Ergebnisse stützen die Beobachtung *in vitro*, dass bei einer einmalig applizierten fünfminütigen Koronarokklusion bei mittelalten Ratten kein positiver Effekt durch IPC nachweisbar war.¹¹⁰ Eine gesteigerte Stimulation führte bei den mittelalten Ratten zu einem reduzierten Infarktareal.¹¹⁰ In den alten Tieren war dieser kardioprotektive Effekt nicht vorhanden.¹¹⁰ Der Effekt der IPC scheint *in vitro* im Alter komplett aufgehoben, jedoch in mittelalten Tieren durch erhöhte Stimulation noch auslösbar zu sein.¹¹⁰

In vorhandenen *in vivo* Studien konnte hingegen kein eindeutiger Verlust der IPC durch den Faktor Alter nachgewiesen werden. Sowohl in einer *in vivo* Studie an jungen und alten Schafen als auch an Kaninchen aus drei Altersklassen, konnte kein Unterschied in der Effektivität der IPC dargestellt werden.^{111,112} Im Gegensatz dazu konnte *in vivo* keine Wirksamkeit durch IPC an gealterten Mäusen aufgezeigt werden.¹¹³ Es ergibt sich somit keine eindeutig belegbare Aufhebung der IPC im Alter *in vivo*.

Ein Ansatz um die klinische Wirksamkeit der IPC *in vivo* zu untersuchen, stellt die nähere Betrachtung der Präinfarktangina als Korrelat der IPC dar. Ähnlich der IPC kommt es hierbei zum Beispiel im Vorfeld eines Myokardinfarktes zu kurzzeitigen Myokardischämien, die dann einen Infarkt-reduzierenden Effekt haben können.^{114,115} Eine retrospektive Untersuchung mit Patienten im mittleren (< 65 Jahre) oder höheren (>65 Jahre) Lebensalter zeigte, dass eine innerhalb von 48 Stunden einem Myokardinfarkt vorausgehende *Angina pectoris* einen positiven Effekt auf das Outcome der Patienten hat.¹¹⁶ In mittelalten Patienten waren Ereignisse wie Schock, Herzinsuffizienz und Mortalität reduziert.¹¹⁶ Bei älteren Patienten zeigte sich dieser Effekt nicht.¹¹⁶ Diese Beobachtung konnte auch in anderen Studien bestätigt werden.¹¹⁷ Die Ergebnisse sprechen für eine Aufhebung protektiver Mechanismen durch IPC im Alter.

1.5.2 Einfluss des Alters auf RIPC

Der Einfluss von Alter auf die RIPC ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise, dass nicht nur ein hohes, sondern auch ein sehr junges Alter Einfluss auf die Wirksamkeit der RIPC nehmen kann. In einer Studie an neugeborenen Schweinen und Kaninchen konnten verminderte kardioprotektive Effekte beobachtet werden.^{118,119}

In anderen Organen wie der Niere wurde ein verminderter protektiver Effekt von RIPC im hohen Alter beschrieben.¹²⁰ In zwei großen klinischen Studien (RIPHeart^{45,102}; ERICCA⁴⁶) wurden keine kardioprotektiven Effekte von RIPC an kardiochirurgischen Patienten aufgezeigt. Fraglich ist, ob hier das Alter und nicht andere Einflussfaktoren wie die Anästhesiewahl^{92,95} oder Vormedikationen ausschlaggebend für die fehlende Wirksamkeit waren.

Eine retrospektive Metaanalyse konnte keinen Einfluss von Alter auf RIPC bei herzchirurgischen Patienten zeigen.¹²¹ Kritisch ist hier die fehlende Voraussetzung für eine Subgruppenanalyse und die nicht vorhandene Kontrollgruppe mit jungen Patienten zu bewerten.¹²¹

Im Kontrast dazu beobachteten Heinen et al., dass das Plasma von jungen Probanden nach Übertragung *in vitro* in einem isolierten Rattenherz zu einer

signifikanten Infarktreaktion führte.¹²² In den mit Plasma von älteren Probanden perfundierten Herzen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.¹²² Diese Beobachtungen sprechen ihrer Ansicht nach für eine veränderte Freisetzung von humoralen Faktoren bei alten Patienten.¹²² Die Übertragung des jungen Plasmas auf alte Herzen führte zu einer 20-prozentigen Infarktreaktion, was für den zumindest teilweisen Erhalt der intrazellulären Signalkaskade und der Möglichkeit des Einsatzes von RIPC am gealterten Herzen spricht.¹²² Eventuell ist die bei der RIPC freigesetzte Menge an humoralen Faktoren im Alter reduziert und nicht ausreichend für die Initiierung eines infarktreaktierenden Effekts.¹²²

Die Reduktion von Reparaturmechanismen¹⁰³, Veränderungen an Muskulatur- und Gefäßaufbau^{123,124}, sowie die steigende Anfälligkeit gegenüber Ischämie- und Reperfusionsschäden¹⁰⁵ könnten bei der fehlenden Wirksamkeit durch RIPC ebenfalls von Bedeutung sein.

Die genauen Mechanismen der Signaltransduktion der RIPC müssen in Zukunft weiter identifiziert werden, um dann die durch das Alter veränderten Anteile der Signalkaskade beeinflussen zu können.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob der Effekt der RIPC im Alter aufgehoben ist und sich im Rahmen einer fehlenden Infarktgrößenreduktion zeigt. Es soll untersucht werden, ob dieser Effekt isoliert ohne weitere Einflussfaktoren wie zum Beispiel Hyperglykämie, *Diabetes mellitus* oder Vormedikation besteht.

Um die oben genannten Fragen zu beantworten, wurde der folgende methodische Ansatz gewählt:

Es wurden insgesamt 24 männliche Wistar Ratten in einem *in vivo* Modell in vier Gruppen (n=6) randomisiert. Die Gruppen unterschieden sich durch das Alter der Versuchstiere und die Durchführung von RIPC. Auf diese Weise erfolgte eine Zuordnung die den Einflussfaktor Alter (A-CON; J-CON) und die Intervention (J-RIPC; A-RIPC) umfasste. RIPC wurde im Versuch mittels vier Zyklen einer fünfminütigen Hinterlaufischämie mit nachfolgender Reperfusion initiiert. Es wurden sowohl die hämodynamischen Parameter während RIPC und der anschließenden Ischämie/Reperfusion als auch die endgültige Infarktgröße erfasst. Die Infarktgröße wurde mit Hilfe der bereits etablierten Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung dargestellt. Die planimetrische Messung von Risikogebiet für einen Infarkt und tatsächlicher Infarktgröße erfolgte verblindet.

2 Material und Methoden

Die Durchführung der beschriebenen Versuche erfolgte gemäß dem Tierversuchsantrag in einem *in vivo* Modell an männlichen Wistar Ratten. Die für die Versuche erforderliche Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW und liegt unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A101 vor.

2.1 Material

In Tabelle 1 sind alle im Rahmen der Studie verwendeten Materialien aufgelistet. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Materialien von den Firmen Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co.KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Linde AG (München, Deutschland) und der Zentralapotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen.

Tabelle 1: Übersicht Material/Laborgeräte/Software

Pentobarbital (Narcoren®)	16 g/100ml, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Evans Blue Färbelösung	1 g Evans Blue 5 g Dextran NaCl 0,9% ad 500 ml Aqua dest.
Triphenyltetrazoliumhydrochlorid (TTC)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TTC Färbelösung	200 ml NaCl 0,9% 2,42 g Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Puffer) 1,5 g Triphenyltetrazoliumhydrochlorid (TTC)
Beatmungsgerät	Servo Ventilator 900C, Siemens-Elema AB, Solna, Schweden
Blutgasanalysegerät	ABL 700, Fa Radiometer, Willich, Deutschland
Monitor	Capnomac Ultima™, Datex, Finnland

Aufzeichnungssoftware	LabChart© Pro Version 8.0.5 ADInstruments Pty Ltd, Sydney/NSW, Australien
Statistiksoftware	GraphPad StatMate™ Version 1.01, GraphPad Software Inc., San Diego/CA, USA
Planimetriesoftware	SigmaScan Pro5® für Windows, SPSS Science Software, San Jose/CA, USA

In Tabelle 1 sind die für den Versuchsaufbau benötigten Materialien, Laborgeräte und Software mit Herstellerangabe und die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau

Es wurden insgesamt 24 männliche Wistar Ratten für die *in vivo* Versuche verwendet. Vor Beginn der chirurgischen Intervention wurden die Ratten mit Hilfe einer intraperitonealen Applikation von Pentobarbital (100 mg/kg KGW) narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Ratten im Verlauf 40 mg/kg KGW/h als kontinuierliche intravenöse Infusion über einen Perfusor. Die Ratten wurden tracheal intubiert, um eine Beatmung zu gewährleisten. Die druckkontrollierte Beatmung erfolgte mit einer FiO_2 von 0,3 und einer kontinuierlichen Messung des endexpiratorischen CO_2 . Es wurde die rechte *Vena jugularis* zur Verabreichung der Narkose und der Gabe von Flüssigkeit (isotone NaCl-Lösung) präpariert. Zur kontinuierlichen Messung des Blutdruckes wurde die linke *Arteria carotis communis* punktiert. Arterielle Blutgasanalysen wurden regelmäßig während des gesamten Versuchs durchgeführt, um zu prüfen, ob sich sowohl die Beatmung als auch der Säure-Base-Haushalt im physiologischen Bereich befanden.

In Rechtsseitenlage wurde eine linksseitige Thorakotomie durchgeführt, das Perikard stumpf präpariert und die linke anteriore deszendierende Koronararterie aufgesucht und mit Hilfe einer Ligatur (5-0 Prolene Faden) zur späteren Induktion der Ischämie umschlungen. Nach Abschluss des Versuchsprotokolls (s. Kapitel 2.2.3) wurden die Herzen entnommen und das Infarktareal dargestellt.¹²⁵

2.2.2 Darstellung des Infarktareals

Für die Darstellung des Infarktareals wurde nach der Entnahme der Herzen auf eine modifizierte Langendorff Apparatur zurückgegriffen. Die Herzen wurden mittels eines aortalen Zugangs aufgehängt und an der Apparatur festgeknotet. Mit Hilfe von Kochsalzlösung wurde das intravasale Blut mit einem Druck von 80 mmHg ausgespült. Es folgte ein erneuter Verschluss der bereits zuvor für die regionale Ischämie ligierten Koronararterie und eine anschließende zehnminütige Spülung mit 0,2% Evans Blue in NaCl Lösung. Im Anschluss wurden die Herzen erneut mit NaCl Lösung gespült und das überflüssige Evans Blue intravasal entfernt.¹²⁵ Evans Blue diente im Versuchsaufbau der Bestimmung des Risikogebiets, das durch die betroffene Koronararterie (linke anteriore descendierende Koronararterie) versorgt wird. Durch die vorherige Okklusion der Arterie wurden nur außerhalb ihres Versorgungsgebiets liegende Bereiche angefärbt (Nicht-Risikogebiet; blau). Das Versorgungsgebiet der Arterie, das zugleich Risikogebiet für einen Infarkt ist, erschien ungefärbt.

Zur Darstellung der Infarktgröße wurde das Herz transversal in 2 mm dicke, gleichmäßige Scheiben geschnitten und anschließend mit 0,75-prozentiger Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung für 10 min bei 37°C und einem pH-Wert von 7,42 eingefärbt. Zum Schluss wurden die Herzscheiben für 24 Stunden in Formalin fixiert.

TTC eignet sich als Färbemittel für *ex vivo* Präparate (isolierte Herzen) und Zellkulturen.¹²⁶ Das quartäre Ammoniumsalz TTC dient als Redox-Indikator und stellt das vitale Myokard rötlich dar, während das nekrotische Myokard gräulich erscheint.¹²⁶ Biochemisch wird in der vorliegenden Redoxreaktion das farblose TTC unter Voraussetzung intakter zellulärer Stoffwechselmechanismen (Mitochondrien, Atmungskette, Dehydrogenasen, NADH) zu rotem Triphenylformazan umgesetzt.¹²⁶ In inaktiven, toten Zellen erfolgt keine enzymatische Reduktion und die Nekrose erscheint gräulich-weiß.¹²⁶

Mit Hilfe der Software SigmaScan Pro5® (SPSS Science Software, Chicago, IL, USA) wurden im Anschluss das Risikogebiet und die tatsächliche Infarktgröße planimetrisch bestimmt. Die genannte Auswertung erfolgte verblindet. Beispiele von Herzscheiben für die Infarktgrößenbestimmung finden sich in Abbildung 8.



Con



RIPG

Abb.8: **Infarktgrößenbestimmung:** Abbildung 8 zeigt exemplarische Herzscheiben. Evans Blue diente im Versuchsaufbau der Bestimmung des Infarkttrisikogebiets (ungefärbt). Das Myokard außerhalb des Versorgungsgebiets stellt sich blau dar. Nach Entnahme und Einschnitt der Herzen wurden diese zuerst mit 0,75-prozentiger Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung eingefärbt und danach mit Formalin fixiert. Die rötliche Färbung kennzeichnet vitales, die gräulichen Anteile nekrotisches Myokard.

2.2.3 Versuchsprotokoll

In die Versuche wurden 12 junge, männliche Wistar Ratten (2-4 Monate, 263 ± 18 g) und 12 alte, männliche Wistar Ratten (22-24 Monate, 657 ± 42 g) eingeschlossen. Die Ratten wurden in vier Gruppen ($n=6$ pro Gruppe) randomisiert. Im Anschluss an die chirurgische Intervention (s. Kapitel 2.2.1) erhielten alle Versuchstiere eine 15-minütige Interventionspause. Die Herzfrequenz und der aortale Druck wurden während der Intervention kontinuierlich gemessen. Die Tiere der Kontrollgruppen (J-Con; A-Con) erhielten nun für 40 Minuten eine intravenöse Anästhesie mit einer druckkontrollierten Beatmung. In den Interventionsgruppen (J-RIPG; A-RIPG) erhielten die Versuchstiere zusätzlich zur bereits aufgeführten Anästhesie vier Zyklen einer je fünfminütigen beidseitigen Ischämie der Hintergliedmaßen mit Hilfe von modifizierten Blutdruckmanschetten, gefolgt von jeweils fünf Minuten Reperfusion. Die Blutdruckmanschette wurde dabei bis zu einem Druck von 200 mmHg aufgepumpt. Alle Tiere erhielten im Anschluss eine 25-minütige regionale Myokardischämie durch Verschluss der bereits umschlungenen Koronararterie. Die darauffolgende Reperfusionsphase dauerte in allen Versuchsgruppen 120 Minuten.¹²⁵ Das verwendete Versuchsprotokolle ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

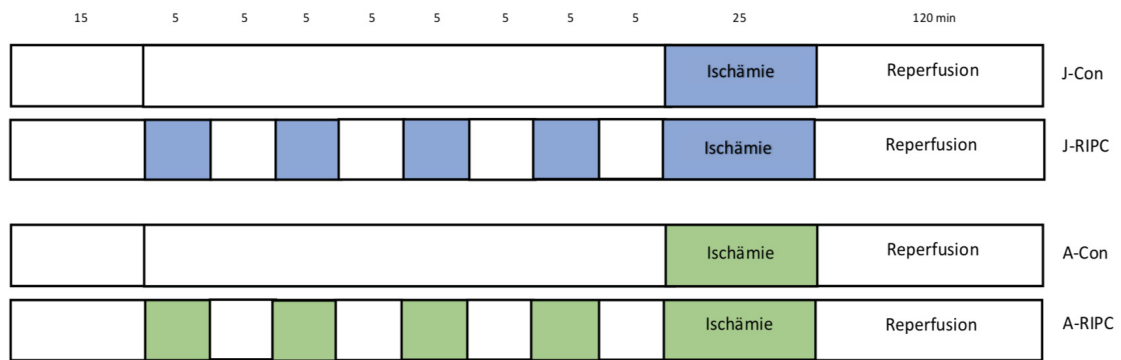


Abb.9: **Versuchsprotokoll RIPC:** Abbildung 9 zeigt den Versuchsaufbau der Präkonditionierungsgruppen (J-RIPC; A-RIPC) und der Kontrollgruppen (J-Con; A-Con). Nach 15 Minuten Ruhephase erhielten die Tiere der RIPC-Gruppe vier Zyklen einer fünfminütigen beidseitigen Hinterlaufischämie mit nachfolgender Reperfusionsphase. Anschließend wurde bei allen Gruppen eine Ischämie der linken descendierenden Koronararterie hervorgerufen. Nach einer darauffolgenden 120-minütigen Reperfusion wurden die Herzen entnommen und einer modifizierten Langendorff Apparatur zugeführt. Jung (J); Alt (A); Kontrolle (Con); Präkonditionierung (RIPC). Modifiziert nach Behmenburg et al. (2017).¹²⁵

2.2.4 Statistik

Der primäre Endpunkt der durchgeführten Studie ist die am Herzen gemessene Infarktgröße (*IS; infarct size*). Von Interesse ist hier insbesondere der Vergleich zwischen Kontroll (Con)- und Interventionsgruppen (RIPC). Die für den Versuchsaufbau erforderliche Festlegung der Gruppengröße und die statistische Auswertung wurden mit Hilfe der Graph Pad StatMate™ Software Version 1.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Fallzahlanalyse ergab eine benötigte Gruppengröße von n=6, um eine Differenz von 20% in der Infarktgröße mit einer Teststärke von 80% und einem α -Fehler <0,05 detektieren zu können. Die Darstellung und Auswertung aller Ergebnisse erfolgten mit Hilfe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Die Infarktgröße wurde mittels t-Test analysiert. Der hämodynamische Vergleich der Gruppen untereinander und der Vergleich verschiedener Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe erfolgten mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalyse, gefolgt vom Tukey's post-hoc Test. Änderungen der hämodynamischen Parameter innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war.¹²⁵

3 Ergebnisse

3.1 Effekt der RIPC auf die Infarktgröße

Die Infarktgrößenauswertung der 24 Versuchstiere ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Datenerhebung wurde mittels des in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Versuchsprotokolls durchgeführt. Die Darstellung der Infarktgröße erfolgt als prozentualer Anteil des Risikogebietes für einen Infarkt. Das Risikogebiet ist als durch die linke anteriore deszendierende Koronararterie versorgter Bereich festgelegt (s. Kapitel 2.2.1).

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Größe des Risikogebiets (AAR) zwischen den Versuchsgruppen (J-Con $30\pm 9\%$ vs. J-RIPC $26\pm 9\%$; ns. A-Con $18\pm 8\%$ vs. A-RIPC $20\pm 8\%$; ns.).¹²⁵

Die Infarktgröße in der Kontrollgruppe der jungen Ratten betrug $56\pm 9\%$ des Risikogebietes. Nach Fernpräkonditionierung reduzierte sich die Infarktgröße signifikant um 39% auf $31\pm 9\%$ des Risikogebiets ($p < 0,05$ vs. J-Con, s. Abb.10).¹²⁵ Die Infarktgröße in der Kontrollgruppe der alten Ratten (A-Con) betrug $63\pm 8\%$ des Risikogebietes.¹²⁵ Durch RIPC konnte in der alten Interventionsgruppe (A-RIPC) keine signifikante Infarktgrößenreduktion erzielt werden ($62\pm 8\%$ vs. A-Con; ns.).¹²⁵

Es ergibt sich in dem durchgeführten *in vivo* Modell der Ratte eine aufgehobene Infarktgrößenreduktion im Alter. Der dargestellte kardioprotektive Effekt in den jungen Versuchsgruppen ist signifikant.

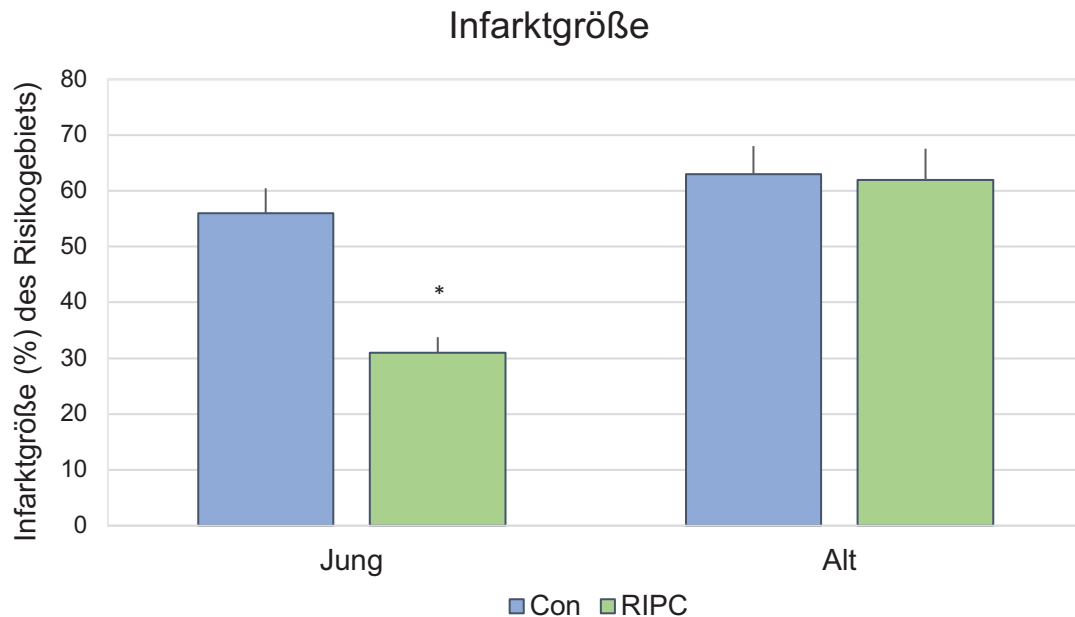


Abb.10: **Effekt der RIPC auf die Infarktgröße:** Abbildung 10 zeigt die Infarktgröße (Prozent des Risikogebiets) der Kontrollgruppe (Con) und der Interventionsgruppe (RIPC). Dargestellt sind sowohl der Vergleich der jungen (J-Con) und alten Kontrollgruppe (A-Con) als auch der Vergleich der jungen (J-RIPC) und alten (A-RIPC) Interventionsgruppe. Bei der jungen Interventionsgruppe (J-RIPC) zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion gegenüber der Kontrollgruppe (J-Con) ($p < 0,05$). Dieser Effekt konnte zwischen der alten Kontroll (A-Con)- und Interventionsgruppe (A-RIPC) nicht gezeigt werden. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Con). Modifiziert nach Behmenburg et al. (2017).¹²⁵

3.2 Effekt der RIPC auf die Hämodynamik

Die während der Versuche erhobenen hämodynamischen Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt.¹²⁵ Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen (J-Con, J-RIPC, A-Con, A-RIPC) bezüglich der Herzfrequenz oder des Blutdruckes zu verschiedenen Zeitpunkten (Baseline, Ischämie, Reperfusion). Innerhalb der Kontrollgruppe (J-Con vs. A-Con) und Interventionsgruppe (A-Con vs. A-RIPC) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Herzfrequenz festgestellt werden. Darüber hinaus gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den alten (A-Con; A-RIPC) und jungen (J-Con; J-RIPC) Ratten im Hinblick auf die Herzfrequenz.

Während der Reperfusionphase unterschied sich der Blutdruck in beiden Gruppen der jungen Tiere (J-Con; J-RIPC) signifikant zum Ausgangswert (Baseline) (s. Tabelle 2). Zwischen den beiden jungen Gruppen (J-Con vs. J-RIPC) konnte kein Unterschied bezüglich des Blutdrucks während der Reperfusion gezeigt werden. Innerhalb beider Gruppen kam es zu einem ähnlich ausgeprägten Blutdruckabfall während der Reperfusionphase. Bei den zwei Versuchsgruppen der älteren Ratten zeigte sich diese Veränderung des Blutdrucks weder innerhalb der jeweiligen Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten noch zwischen den beiden Gruppen (A-Con vs. A-RIPC).

Tabelle 2: Hämodynamische Parameter

		<u>Ischämie</u>	<u>Reperfusion</u>	
	Baseline	15 min	30 min	120 min
<i>Herzfrequenz (min⁻¹)</i>				
J-Con	412 ± 46	418 ± 32	385 ± 41	372 ± 35
J-RIPC	385 ± 54	388 ± 37	365 ± 55	345 ± 32
A-Con	361 ± 20	376 ± 11	370 ± 30	337 ± 12
A-RIPC	353 ± 30	372 ± 36	322 ± 70	358 ± 46
<i>Mitteldruck (mmHg)</i>				
J-Con	97 ± 20	85 ± 11	68 ± 8*	66 ± 15*
J-RIPC	102 ± 8	82 ± 11*	67 ± 15*	61 ± 14*
A-Con	133 ± 20	133 ± 9	120 ± 17	116 ± 13
A-RIPC	130 ± 32	121 ± 35	99 ± 27	109 ± 21

Tabelle 2 zeigt die hämodynamischen Parameter der Kontrollgruppen (Con) und der Interventionsgruppen (RIPC). Es sind die Herzfrequenzen (min⁻¹) und die arteriellen Mitteldrücke (mmHg) der jungen (J-Con; J-RIPC) und der alten (A-Con; A-RIPC) Versuchsgruppen dargestellt. Die Erhebung der Messwerte erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (Baseline, Ischämie, Reperfusion). Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. n=6 pro Gruppe. *p<0,05 vs. Baseline. Modifiziert nach Behnenburg et al. (2017).¹²⁵

4 Diskussion

Aufgrund des demographischen Wandels, des medizinischen Fortschritts und der steigenden Anzahl an operativen und minimalinvasiven Methoden in der Kardiochirurgie, ist es notwendig, die häufig bereits vorerkrankten Patienten vor ischämiebedingten Schäden am Herzen zu schützen. Obwohl sich die präoperative Evaluation, das intraoperative Vorgehen und die medizinische postoperative Versorgung der Patienten kontinuierlich verbessert, fehlt es an klar definierten Möglichkeiten der aktiven Kardioprotektion. RIPC könnte eine kostengünstige und im klinischen Alltag einfach umsetzbare Methode darstellen. Die Wirksamkeit der RIPC konnte jedoch in den bisher erfolgten klinischen Studien nicht eindeutig belegt werden.

Verschiedene *proof of concept* Studien konnten die Wirksamkeit von RIPC belegen. Es wurden durch RIPC reduziertes Troponin T nach PCI¹²⁷ und Bypass Operationen¹²⁸ gezeigt. Hierzu wurden *in vivo* Troponinwerte von PCI Patienten gemessen und geringere Werte nach angewendeter RIPC festgestellt.⁴⁰ Thielmann et al. belegten ein verbessertes Outcome (Mortalität; Morbidität/ MACCE) bei Patienten mit elektiver Bypass Operation durch RIPC.⁴⁴

Zwei große Phase III Studien mit mehr als 1000 eingeschlossenen Patienten (RipHeart^{45,102}; ERICCA⁴⁶) konnten im Gegensatz dazu keine Wirksamkeit von RIPC nachweisen. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse und die fehlende Übertragbarkeit in den klinischen Kontext sind unklar. Wie bereits in Kapitel 1.4 dargestellt sind verschiedene Einflussfaktoren bekannt, die den kardioprotektiven Effekt von RIPC aufheben können. Ein Einfluss kann beispielsweise durch Opioiden⁸⁹, ACE Hemmer⁹⁰, β -Blocker^{91–93}, Statine⁹⁴ und verschiedene Anästhetika⁹⁵ erfolgen.

Einen möglichen unabhängigen Faktor stellt darüber hinaus das Alter der Probanden dar.

4.1 Beantwortung der Fragenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob Alter ein unabhängiger Einflussfaktor der RIPC ist und damit die fehlende Übertragbarkeit der positiven Effekte von RIPC in großen klinischen Studien (RIPHeart^{45,102}; ERICCA⁴⁶) zu erklären ist.

In einer Studie an männlichen, jungen (2-4 Monate) und alten (22-24 Monate) Wistar Ratten wurde RIPC *in vivo* durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein Vergleich der Infarktgrößenreduktion der beiden Gruppen untereinander und mit einer jeweils entsprechenden Kontrollgruppe desselben Alters.

Zusammenfassend kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass RIPC bei den jungen Ratten zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führte. Dieser protektive Effekt war bei den alten Ratten vollständig aufgehoben.

Somit scheint der Einflussfaktor Alter unabhängig von Vorerkrankungen und Vormedikationen die positiven Effekte der RIPC zu beeinflussen.

4.2 Einfluss des Alters auf die Präkonditionierung

In der Literatur finden sich keine eindeutigen Daten bezüglich der Wirksamkeit der verschiedenen Präkonditionierungsformen bei alternden Probanden.

Boengler et al. zeigten *in vivo* an Mäusen, dass die IPC in gealterten Herzen aufgehoben ist.¹¹³ Auch in anderen Studien konnte kein Effekt der IPC gefunden werden.^{116,129,130} Im Gegensatz dazu wurde in einem *in vivo* Modell an Schafen eine im Alter erhaltene Fähigkeit der Kardioprotektion durch IPC festgestellt.¹¹¹ Eine Studie an Kaninchen konnte ebenfalls eine erhaltene Wirksamkeit der Präkonditionierung bestätigen.¹¹²

Die Aufhebung der RIPC im Alter konnte ebenfalls nicht eindeutig belegt werden. Die retrospektive Analyse einer Studie von Thielmann et al. an Patienten die eine Bypass Operation erhielten, zeigte keinen Einfluss des Alters auf RIPC.^{44,121} Diese Schlussfolgerung ist jedoch kritisch zu bewerten, da es weder ein junges Kontrollkollektiv gab, noch Voraussetzungen für eine Subgruppenanalyse vorlagen.

Im Gegensatz dazu konnte in einer Metaanalyse eine verbesserte Nierenprotektion bei jungen Probanden gegenüber alten Probanden nach RIPC festgestellt werden.¹²⁰

Aber nicht nur bei alternden Herzen wurde eine fehlende Präkonditionierung gefunden. Bei neugeborenen Kaninchen wurde beobachtet, dass weder die Gabe von Dialysat von präkonditionierten erwachsenen Kaninchen *in vitro* noch RIPC *in vivo* einen positiven Effekt am Herzen auslösten.¹¹⁹ Die Infarktgröße nahm sogar zu. Diese Beobachtung bestätigte eine klinische Studie, in der Neugeborene einen kardiochirurgischen Eingriff erhielten.¹³¹ RIPC bewirkte präoperativ angewendet keine Verbesserung der myokardialen postoperativen Funktion (Primärer Endpunkt: Troponin I).¹³¹

Fraglich ist nun, auf welcher Ebene der Signaltransduktion der RIPC es zu einer Einschränkung oder Aufhebung der Übertragungsmechanismen kommt. Im Folgenden soll nun genauer auf die verschiedenen in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Signaltransduktionsebenen eingegangen werden. Es soll versucht werden, den Einfluss durch den Faktor Alter darzustellen und Strategien zur Verbesserung der Anwendbarkeit der RIPC im Alter aufzuzeigen.

4.3 Altersbedingte Veränderungen der Signaltransduktion der RIPC

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, werden für die Übertragung der RIPC verschiedene Signalkaskaden vermutet. Eventuell kann mit einer altersbedingten Störung auf Ebene der Signaltransduktionsmechanismen die fehlende Übertragbarkeit in den klinischen Alltag (RIPHeart^{45,102}; ERICCA⁴⁶) erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass RIPC im Alter *in vivo* aufgehoben ist.¹²⁵

Eine Möglichkeit dieses Ergebnis zu erklären, ist eine Störung der Signalkaskade auf Ebene der Signaltransduktion. Es könnte beispielsweise zu einer fehlenden Reizübertragung zwischen Ort des Stimulus und dem Effektororgan kommen. Denkbar wäre hier eine fehlende oder nicht ausreichende Freisetzung von humoralen Faktoren oder eine gestörte nervale Aktivierung im Alter.

Eine zweite Möglichkeit stellt eine veränderte Struktur am Effektororgan dar. Es könnte am Herzen im Alter zu strukturellen Veränderungen in der Signalkaskade kommen. Die genauen Mechanismen der RIPC sind nicht abschließend geklärt und momentan Gegenstand der Forschung. Nachfolgend sollen nun mögliche Mechanismen auf verschiedenen Signaltransduktionsebenen aufgezeigt werden, die durch das Alter beeinflusst werden könnten.

4.3.1 Stimulus

In der vorliegenden Studie wurde ein bereits etabliertes RIPC-Protokoll gewählt. Die Versuchstiere erhielten in der Interventionsgruppe vier Zyklen einer je fünfminütigen beidseitigen Ischämie der Hintergliedmaßen mit nachfolgender Reperfusion. Die Induktion der Ischämie erfolgte mit Hilfe von modifizierten Blutdruckmanschetten, diese wurden bis zu einem Druck von 200 mmHg aufgepumpt.

Fraglich ist, ob der in der vorliegenden Arbeit genutzte Stimulus ausreichend für die Freisetzung der benötigten Faktoren im Alter ist. Die Auswahl der Anzahl und der Dauer des Stimulus erfolgten auf empirischer Grundlage.¹³²

In einem *in vivo* Modell an Kaninchen wurde gezeigt, dass drei Zyklen einer IPC am Herzen die Effektivität gegenüber einem durchgeführten Zyklus steigern können.³⁷ Auch in anderen Tiermodellen konnte dieser Effekt beobachtet werden.³⁸ Der Effekt war bei einer Ischämiedauer über zehn Minuten aufgehoben.³⁸ Somit scheinen sowohl die Anzahl der Zyklen als auch die Dauer der einzelnen Ischämien die Kardioprotektion zu beeinflussen.

Bei den in der vorliegenden Studie durchgeführten Versuchen kann davon ausgegangen werden, dass die Wahl des RIPC-Protokolls ausreichend für einen infarktreduzierenden Effekt ist, da die junge Interventionsgruppe eine signifikante Infaktreduktion zeigte. Eventuell muss jedoch der Stimulus an verschiedene Altersgruppen adaptiert werden. Es stellt sich in diesem Kontext die Frage, ob es sich nur um eine unzureichende oder eine fehlende Freisetzung der benötigten Faktoren handelt. Möglicherweise kann beim älteren Patienten über die Anzahl oder Dauer der Zyklen die freigesetzte Menge an Faktoren erhöht werden.

Ein Grund für die fehlende Wirksamkeit der RIPC bei alten Probanden könnte sich in alterstypischen Veränderungen am Ort des Stimulus (Skelettmuskulatur) finden. Von Änderungen im Alter können die nervale Innervation, die Blutversorgung und der Aufbau und die Masse der Skelettmuskulatur betroffen sein.¹³³

Veränderungen der Gefäße führen in älteren Patienten zu Atherosklerose und damit verbunden zu endothelialer Dysfunktion.¹³⁴ Besonders im Kollektiv der Patienten mit Myokardinfarkten kann von einem vermehrten Auftreten dieser Veränderungen ausgegangen werden.^{1,2} Auch die Skelettmuskulatur verändert sich und es kommt unter anderem zu einer Atrophie.¹³⁵ Die in der atrophierten Muskulatur älterer Probanden gebildeten Faktoren könnten nicht ausreichend für eine Kardioprotektion sein. In einem *in vivo* Modell an Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Protektion unabhängig von der Anzahl der Extremitäten und damit der ischämischen Muskelmasse ist.³⁸ Ein alleiniger Verlust von Muskelmasse kann also die fehlende Stimulation im vorliegenden Tiermodell nicht ausreichend erklären.

Einen weiteren Ansatzpunkt, um die fehlenden kardioprotektiven Effekte durch RIPC zu erklären, bietet die Betrachtung der nervalen Innervation. Sie verändert sich im Alter, die Nervenleitgeschwindigkeit nimmt ab.¹³⁶ Es kann so zu einer Störung am Ort des Stimulus oder im Signalweg zum Endeffektor (Herz) kommen. Als Beispiel für fehlende nervale Innervation kann die diabetische Polyneuropathie bei Patienten mit *Diabetes mellitus* gesehen werden. Bei diesem Patientenkollektiv konnte eine aufgehobenen Kardioprotektion nach RIPC gefunden werden.¹³⁷

Es muss die Frage beantwortet werden, ob es eine mögliche Strategie geben kann, den Stimulus zu verbessern. In einem Modell an isolierten Rattenherzen konnte nach IPC eine Infarktgrößenreduktion bei mittelalten Ratten (12 Monate) durch einen erhöhten Stimulus erzeugt werden.¹¹⁰ Bei den alten Ratten hatte die Erhöhung des Stimulus keinen positiven Effekt auf die Infarktgrößenreduktion.¹¹⁰ Fraglich ist, ob auch bei RIPC die Erhöhung des Stimulus zu einer Infarktgrößenreduktion führt. Die Erforschung der genauen Mechanismen der RIPC scheint somit essentiell für die Weiterentwicklung der Methodik und der notwendigen Stimulationsmechanismen zu sein.

4.3.2 Neuronale Übertragung

Die genauen Abläufe und die Rolle der neuronalen Übertragung im Rahmen der RIPC sind nicht abschließend geklärt. Das parasympathische Nervensystem scheint eine wichtige Rolle bei der Präkonditionierung zu spielen.^{56,138} Es konnte gezeigt werden, dass eine intakte nervale Innervation für die Entstehung des Reizes am Induktionsorgan notwendig ist.^{55,56,138–140}

Isolierte Kaninchenherzen konnten *in vitro* mit dem Plasma gesunder Probanden, die vorher mit RIPC behandelt wurden, präkonditioniert werden.¹³⁷ Auch das Plasma an *Diabetes mellitus* erkrankter Probanden ohne Polyneuropathie zeigte diesen Effekt.¹³⁷ Das Plasma von Patienten, die erkrankt waren und eine Polyneuropathie aufwiesen, zeigte keine infarktreduzierenden Effekte.¹³⁷ Die nervale Innervation scheint für die Entstehung der übertragbaren Faktoren essentiell zu sein. Alterstypische Veränderungen wie zum Beispiel eine Polyneuropathie bei an *Diabetes mellitus* erkrankten Patienten können so Einfluss auf die Reizentstehung nehmen.¹³⁷

Die Übertragung am Effektororgan (isoliertes Herz) ist trotz fehlender neuronaler Verbindungen möglich.^{49,58,59,61} Dieser Umstand führt zu dem Schluss, dass es zusätzlich zu den nervalen Strukturen einen oder mehrere Übertragungswege zum Herzen geben muss.

Der wissenschaftliche Diskurs beschäftigt sich aktuell insbesondere mit den bei der RIPC freigesetzten und für die Übertragung verantwortlichen humoralen Faktoren.

4.3.3 Humorale Übertragung

Humorale Faktoren scheinen die Konditionierung zu vermitteln und zur Kardioprotektion beizutragen. Bisher konnte eine Reihe von Molekülen identifiziert werden, darunter *Glucagon like peptide-1* (GLP-1)⁶⁶, Adenosin⁶⁷, Opiate^{68,141}, Acetylcholin^{69,142}, Erythropoetin (EPO)⁷⁰, IL-10⁷¹, *stromal cell-derived factor 1 α* (SDF-1 α)⁷² und Nitrit¹⁴³. Auch der Transport der Faktoren zum Effektororgan wurde diskutiert und ein Transport über extrazelluläre Vesikel (Mikrovesikel¹⁴⁴ und Exosomen¹⁴⁵) vermutet.⁶⁴

Die humorale Übertragung der RIPC konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Die kardioprotektiven Faktoren konnten *in vivo* auf Kaninchenherzen und Kardiomyozyten übertragen werden.¹⁴⁶ Eine andere Studie bestätigte die Übertragung durch humorale Faktoren, da eine Übertragung zwischen Spender und Empfänger am isolierten Herzen *in vitro* und an Kaninchen durch die Übertragung von Plasma *in vivo* möglich war.^{59,147} Die genauen kardioprotektiven Signalübertragungswege konnten in diesen Modellen nicht festgestellt werden.^{59,147}

Die Identifizierung der humoralen Faktoren ist aufgrund ihrer Übertragbarkeit und der daraus eventuell resultierenden therapeutischen Einsatzmöglichkeiten von großem Interesse. Es könnte sich ein Ansatzpunkt finden, um altersbedingte Verluste der RIPC zu umgehen. Um die möglichen Stellen der Signalübertragung für die Beeinflussung der Veränderung der RIPC im Alter zu finden, müssen die grundsätzlichen Signaltransduktionswege weiter identifiziert werden.

Wie bereits beschrieben, bewirken die genannten Faktoren über verschiedene Signalwege einen verringerten Ischämie- und Reperfusionsschaden.^{19,23} Dies führt zu einer reduzierten Anzahl an durch Nekrose oder Apoptose untergegangener Kardiomyozyten.¹⁴⁸

Unterschiedliche Konditionierungsformen (RIPC; IPC) scheinen verschiedene, zum Teil überlappende Signalkaskaden zu nutzen.⁹³

Nach der Übertragung des Signals aus der Peripherie zum Kardiomyozyten findet eine intrazelluläre Signaltransduktion statt.¹⁵ Für die IPC sind die drei Signaltransduktionswege *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg, der *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)-Signalweg und der *Endothelial Nitric Oxide Synthase/Proteinkinase G* (eNOS/ PKG)-Signalweg bekannt.¹⁵ Im Folgenden soll nun genauer auf die bereits für die IPC gezeigten Signalwege eingegangen und ihre mögliche Rolle für die RIPC mit potentiellen Veränderungen im Alter aufgezeigt werden.

Einen ersten möglichen Weg der Signaltransduktion durch RIPC stellt der RISK-Signalweg dar.^{48,146,147,149–151} Zum RISK- Signalweg gehören unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase B (Akt), die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK 1/2) und die Glykogensynthase-Kinase 3β

(GSK 3 β).^{149,151} Bisher konnte besonders im Bereich der IPC eine Bedeutung des RISK- Signalwegs gezeigt werden. *In vivo* und *in vitro* wurde beobachtet, dass der Signalweg um ERK 1/2 an den kardioprotektiven Effekten durch IPC beteiligt ist.¹⁵²

Für die RIPC zeigte sich *in vivo* an einem Schweinemodell keine Aktivierung des RISK-Signalwegs.⁶¹ Ein *in vitro* Versuch an isolierten Rattenherzen, die mit RIPC-Plasma von Schweinen perfundiert wurden, zeigte im Gegensatz dazu eine Beteiligung von Akt und ERK 1/2 (RISK-Signalweg) bei der Präkonditionierung.⁶¹ Auch Heinen et al. fanden eine Aktivierung des RISK- Signalwegs.¹²² Sie übertrugen humanes Plasma auf isolierte Rattenherzen und stellten eine Infarktgrößenreduktion und Phosphorylierung von GSK 3 β fest.¹²² Sie fanden keine Phosphorylierung von GSK 3 β nach Applikation von Plasma alter Probanden auf isolierte junge Rattenherzen.¹²² Eine Störung des RISK-Signalwegs im Alter könnte hier ursächlich sein.

Einen weiteren Ansatzpunkt für die Erklärung der fehlenden Kardioprotektion im Alter stellt die Betrachtung eventueller altersbedingter Veränderungen im SAFE-Signalweg dar. Die Aktivierung von Januskinasen (JAK) und Transkriptionsfaktoren (STAT= *signal transducer and activator of transcription*) führen zur Kardioprotektion.^{153–155} Aktiviert wird dieser Signalweg über die Bindung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) an den Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR-4).¹⁵⁵ Es sind verschiedene Gruppen der STAT identifiziert worden. Lecour et al. konnten zeigen, dass bei der Präkonditionierung durch IPC an isolierten Rattenherzen nicht nur eine Aktivierung des RISK-Signalwegs, sondern auch des SAFE-Signalwegs zu finden ist.¹⁵⁶ Die Aktivierung des TNF- α -Signalwegs (SAFE-Signalweg) und die Durchführung von IPC führen zu einer Phosphorylierung von STAT3. Die Gabe von AG 490, einem JAK-STAT3-Signalweg-Inhibitor, verhindert die Präkonditionierung beider Signaltransduktionsmechanismen.¹⁵⁶ Eine Blockade des RISK-Signalwegs (Akt; Erk 1/2) schränkt die Aktivierung von TNF- α hingegen nicht ein.¹⁵⁶ Auch mit Hilfe der Kardiomyozyten von STAT3-defizienten Mäusen *in vitro* konnten die besondere Bedeutung von STAT3 für die IPC bestätigt werden.¹⁵⁷ Bei der Gabe von TNF- α konnte nur einen Anstieg der STAT-3-Aktivierung gemessen werden.¹⁵⁷

An isolierten Rattenherzen zeigte sich, dass durch IPC sowohl der RISK-Signalweg, als auch der SAFE-Signalweg aktiviert werden.¹⁵⁷ Eine Interaktion zwischen beiden Signalwegen wird vermutet.¹⁵⁷

Besonders STAT3 scheint im Zusammenhang mit RIPC eine Rolle zu spielen.^{158,159} Neben dem SAFE-Signalweg (STAT3) wurde STAT5 als weiterer möglicher Teil der Signalübertragung durch RIPC identifiziert. An STAT5-*Knockout*-Mäusen wurde gezeigt, dass STAT5 eine wichtige Rolle in der Kardioprotektion durch RIPC spielt.¹⁶⁰

In einer Single-Center-Studie untersuchten Heusch et al. 24 Patienten, die eine Bypass Operation erhielten.¹⁶¹ Sie konnten sowohl eine verbesserte Kardioprotektion, gemessen an verringerten Troponinwerten, als auch eine gesteigerte Aktivierung von STAT5 in Myokardbiopsien ihrer Probanden nach RIPC finden.¹⁶¹

Im Gegensatz dazu war *in vivo* bei Schweinen keine gesteigerte STAT5-Aktivierung nach RIPC festzustellen.⁶¹ Dies spricht nicht nur für unterschiedliche Signalübertragungswege der RIPC in verschiedenen Spezies, sondern auch für Interaktionen zwischen den verschiedenen Wegen.^{61,157}

Eine Übersichtsarbeit bestätigt diese Annahme und beschreibt Veränderungen der Signalkaskaden im Alter in verschiedenen Geweben auch aus der Gruppe der STAT.¹⁶² Eventuell kann diese Beobachtung die reduzierte Kardioprotektion im Alter mit erklären.

Als dritter möglicher Weg für die Signalübertragung der Kardioprotektion durch RIPC wurde die NO-Synthase (eNOS) identifiziert.⁴⁹ Die eNOS steigert die Bildung von NO und es werden im Anschluss Proteinkinase G (PKG) und Proteinkinase C (PKC) aktiviert.^{163,164}

Die PKG scheint danach kardioprotektive Effekte über verschiedene Wege zu initiieren. Eventuell führt sie nicht nur zu einem gesenkten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum sondern aktiviert zusätzlich mitochondriale calciumabhängige Kaliumkanäle (mK_{Ca}), was insgesamt zu einer verringerten Calciumüberladung der Zelle während der Reperfusionsphase führen würde.¹⁶⁵ Die PKC beeinflusst mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanälen (mK_{ATP}) und führt zu einem geringeren Calciumeinstrom.^{86,164} Das reduzierte Calcium führt in beiden Fällen zu weniger geöffneten mPTP und verhindert so den Zelluntergang.

Heinen et al. konnten keine erhöhte Phosphorylierung der eNOS, als Marker für die Aktivierung des NO-PKG-Signalwegs nach RIPC nachweisen.¹²² Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der NO/PKG-Signaltransduktionsweg bei der RIPC im Gegensatz zur IPC nicht involviert ist.¹²²

Im Unterschied dazu konnte an eNOS-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass RIPC nicht zu einer Infarktgrößenreduktion führte und eine Beteiligung der eNOS vermutet werden kann.¹⁴³ Auch bei Gabe eines NO-Radikalfängers konnte kein Effekt durch RIPC gemessen werden.¹⁴³ Der Transfer von humanem RIPC-Plasma auf isolierte Mäuseherzen zeigte nach Gabe eines NO-Radikalfängers ebenfalls keinen Effekt.¹⁴³ Fraglich ist, ob hier Speziesunterschiede zu einer unterschiedlich ausgeprägten Signaltransduktion geführt haben.

Die bereits beschriebenen Veränderungen an den Gefäßen der Patienten im Rahmen der Atherosklerose könnten zu einer verminderten Freisetzung von Nitrit als NO-Donor führen.^{134,143} Eine verminderte eNOS-Phosphorylierung in der Aorta alter Ratten konnte in diesem Zusammenhang festgestellt werden und gibt Hinweise auf die im Alter veränderte Bereitstellung von humoralen Faktoren.¹⁶⁶

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Signaltransduktionsmechanismen der RIPC durch humorale Faktoren und ihre Veränderungen im Alter weiter identifiziert werden müssen, um die veränderten Mechanismen umgehen zu können.

4.3.4 Mitochondrium

Für die Kardiomyozyten sind funktionierende Mitochondrien essentiell.¹⁰³ Auch sie unterliegen altersbedingten Veränderungen und können so verschiedene zelluläre Mechanismen beeinflussen.¹⁶⁷

Veränderungen in Morphologie und Funktion der Mitochondrien können die Signalkaskade der RIPC im Alter beeinflussen und so den kardioprotektiven Effekt aufheben.

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Ischämie- und Reperfusionsschadens.^{19,23} Außerdem scheinen sie eine Schlüsselposition in der Kardioprotektion durch Präkonditionierung einzunehmen.^{23,86,88}

Als mögliche Mechanismen für den Einfluss der Mitochondrien auf die Präkonditionierung werden die Öffnungswahrscheinlichkeit der mitochondrialen-Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTP), der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle (mK_{ATP}) und der mitochondrialen calciumabhängigen Kaliumkanäle (mK_{Ca}) als Endpunkte diskutiert.^{83-85,87}

Die in der inneren Mitochondrienmembran liegenden mK_{ATP} regulieren den Einstrom von Kalium und den daraus folgenden osmotischen Gradienten. Dieser beeinflusst seinerseits die Schwellung der Mitochondrienmatrix.¹⁶⁸ Des Weiteren könnten sie durch Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials die Freisetzung von Calcium und damit verbunden die Öffnung der mPTP verhindern.¹⁶⁸

Der von Xu et al. erstmals beschriebene mK_{Ca} steigert durch seine Öffnung die Energiebereitstellung (Atmungskette) der Mitochondrien, verbessert die Volumenregulation und senkt das mitochondriale Calcium.⁸⁷ Es konnte gezeigt werden, dass die Öffnung der mK_{Ca} die ROS-Produktion während der Ischämiephase steigert und dies anschließend als Signal für eine verringerte Calciumüberladung und ROS-Freisetzung in der Reperfusionsphase der kardialen Mitochondrien dienen könnte.¹⁶⁹ Diese Mechanismen führen zu einer verringerten Öffnung der mPTP und damit zu einem reduzierten Ischämieschaden am Herzen.⁸⁶ Die Öffnung des mK_{Ca} wird durch die PKA reguliert.⁸⁶ Die zyklische Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase A ($cAMP$ PKA) scheint an der Vermittlung von Kardioprotektion durch IPC beteiligt und altersabhängig reduziert zu sein.¹⁷⁰ Eine erhöhte Aktivität der PKA konnte im Rahmen der RIPC nicht festgestellt werden.¹²² Anscheinend sind die genannten mitochondrialen Kanäle an verschiedenen Präkonditionierungsformen unterschiedlich beteiligt.

An der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Komplexe der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung.^{19,23} Sie ist weitestgehend undurchlässig und erzeugt so, hauptsächlich durch einen H^+ -Gradienten, ein negatives mitochondriales Membranpotential, das für die ATP-Synthese benötigt wird.

Die Öffnung der mPTP, einer unspezifischen Membranpore, führt zur Aufhebung des Membranpotentials und dem Ende der oxidativen Phosphorylierung.²³ Der Anstieg des intrazellulären und mitochondrialen Calciums und die vermehrten

ROS während der Reperfusionsphase bewirken die Öffnung der mPTP.²³ Das mitochondriale Membranpotential nimmt ab, die oxidative Phosphorylierung wird beendet und die äußere Membran rupturiert. Cytochrom C führt als Apoptosetrigger zum Zelltod.^{19,23} Eine altersbedingt gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP und eine damit verbundene erhöhte Wahrscheinlichkeit des Zelluntergangs durch Apoptose werden vermutet.¹⁷¹

Es wurden auf verschiedenen Ebenen altersbedingte Veränderungen der Mitochondrien gefunden. Elektronenmikroskopisch zeigen sich die gealterten Mitochondrien vergrößert und es lässt sich eine Abnahme an mitochondrialen Teilungen beobachten.¹⁷¹

Auf Signalebene wurde unter anderem eine reduzierte Expression von Cytochrom C mit reduzierter Aktivität der Atmungskette festgestellt.^{103,167,171} Auch eine vermehrte Bildung von ROS wird in der Literatur diskutiert und könnte mitochondriale Strukturen und DNA schädigen.^{103,167,171,172}

Es könnten in den gealterten Kardiomyozyten pro-apoptotische Prozesse gesteigert und die anti-apoptotischen Signalwege verringert sein.¹⁰³ Eine Abnahme der ROS im Alter konnte durch Kalorienrestriktion und Training erzielt werden und stellt einen möglichen Ansatzpunkt für eine verbesserte Kardioprotektion im Alter dar.¹⁷²

Die Erforschung der Zusammenhänge des Alterungsprozesses der Mitochondrien und der Präkonditionierung durch RIPC, sowie mögliche therapeutische Einflussmöglichkeiten auf dieser Ebene sollten geprüft werden.

4.4 Diskussion der Methode

4.4.1 Versuchstiere

Das Alter der Probanden kann bei der Aufhebung der positiven Effekte durch IPC und auch bei der Wirksamkeit der RIPC eine gesonderte Rolle spielen.^{46,102}

Um andere Einflussfaktoren auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit der in Kapitel 2.2.1 beschriebene Versuchsaufbau gewählt. Es sollten Geschlecht, Medikamente und Vorerkrankungen als Einflussfaktoren

ausgeschlossen und die Einflussgröße Alter gesondert untersucht werden. Für die Durchführung der Studie wurde ein bereits etabliertes Modell mit Wistar Ratten verwendet.¹⁷⁰

Es wurden männliche Wistar Ratten in zwei Altersgruppen für die *in vivo* Versuche genutzt.¹⁷³ Das weibliche Geschlecht wurde so als Einflussfaktor ausgeschlossen.^{174,175}

Heinen et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass das Plasma junger, männlicher Probanden, die mit RIPC behandelt wurden, am isolierten Herzen zu einer Infarktgrößenreduktion führt.¹²² Das Plasma von jungen, weiblichen Probanden führte unabhängig von RIPC zu einer Infarktgrößenreduktion.¹²² Außerdem konnte gezeigt werden, dass der nicht-selektive Östrogenrezeptorantagonist Fulvestrant keinen Effekt auf die Infarktgrößenreduktion hat.¹²² Ein von Östrogenrezeptoren unabhängiger infarktreduzierender Effekt durch die Freisetzung von humoralen Faktoren bei weiblichen Probanden wird vermutet.¹²²

Der Einsatz von männlichen Tieren schloss somit die möglichen geschlechtsspezifischen und altersunabhängigen Effekte aus.

Die im Versuchsaufbau verwendeten Tiere wiesen darüber hinaus keine Vorerkrankungen auf. Es konnten Einflussfaktoren wie Medikation (ACE Hemmer⁹⁰, β -Blocker^{91–93}, Statine⁹⁴) und Vorerkrankungen wie zum Beispiel *Diabetes mellitus*^{98,100,107,127} ausgeschlossen werden.

4.4.2 Versuchsaufbau

Die Durchführung der Studie erfolgte an einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Modell.¹⁷⁰

Eine mögliche Einflussgröße könnte sich aus dem gewählten Anästhesieverfahren ergeben.⁹⁵ Die Ratten wurden in den Versuchen mit Pentobarbital narkotisiert, um mögliche positive und negative Einflüsse von Propofol und anderen Anästhetika auf die Kardioprotektion durch RIPC auszuschließen.^{95,176–178} Pentobarbital wird aufgrund seiner hämodynamischen

Stabilität verwendet, um einen Einfluss auf die Versuche durch das Narkotikum auszuschließen.¹⁷⁹

Eine weitere mögliche Beeinflussung der Ergebnisse könnte sich während der Versuche aus der Körpertemperatur der Versuchstiere ergeben. Durch eine bestehende Hypothermie während der Versuche könnte es zu einem zusätzlichen protektiven Effekt am Herzen kommen.¹⁸⁰ Während der Versuche wurde daher die Temperatur der Ratten mit Hilfe einer Wärmematte normotherm gehalten.¹²⁵

4.5 Limitation

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit sind rein deskriptiv. Der Umfang der vorliegenden *in vivo* Studie mit insgesamt 24 männlichen Wistar-Ratten ist begrenzt und eine Übertragbarkeit auf ein größeres Kollektiv mit menschlichen Probanden nicht uneingeschränkt möglich.

Die vorliegende Arbeit ist darüber hinaus durch die nicht näher untersuchten Blockademechanismen limitiert. Ziel der Studie war es, nur den unabhängigen Einflussfaktor Alter auf RIPC darzustellen. Die zugrunde liegenden Signalmechanismen bildeten nicht den Schwerpunkt der Arbeit. Insgesamt scheinen verschiedene Übertragungswege unterschiedlich zusammenzuspielen und so für die Signaltransduktion der RIPC am Herzen verantwortlich zu sein. Die gezeigten Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies könnten die fehlende Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen in klinischen Studien mit erklären.^{61,157}

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein *in vivo* Modell, sodass verschiedenen bereits beleuchtete Mechanismen für die fehlende Wirksamkeit von RIPC im Alter in Frage kommen. Wie in unterschiedlichen Studien diskutiert, könnten sich die verschiedenen Übertragungswege ergänzen bzw. in Interaktion miteinander treten.^{61,157}

4.6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der Einflussfaktor Alter in dem hier gewählten Modell die protektiven Effekte der RIPC vollständig blockiert. Somit trägt die Studie einen Teil dazu bei, die fehlende Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse aus experimentellen Studien *in vitro* und *in vivo* in den klinischen Alltag zu erklären.

Im Folgenden müssen nun die genauen Mechanismen der Beeinflussung der RIPC durch den Faktor Alter identifiziert werden. Im Anschluss daran können dann die in verschiedenen experimentellen Untersuchungen^{26,35} und klinischen Studien^{39,40} gezeigten kardioprotektiven Effekte genutzt werden.

Da RIPC einen kostengünstigen und einfach durchführbaren Ansatz für den klinischen Alltag darstellt, sollte versucht werden eine altersadaptierte Durchführung der RIPC-Protokolle zu etablieren.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, könnte eine Anpassung des Stimulus an den alternden Patienten positive Effekte erzielen. Es könnte darüber hinaus sinnvoll sein, die im Alter häufig bestehende Muskelatrophie in der Signalkaskade zu umgehen. Wie in den Ergebnissen von Heinen et al. gezeigt, könnte das Plasma junger Probanden für die Präkonditionierung älterer Patienten genutzt werden.¹²² Eventuell muss hier eine Dosisanpassung des Plasmas erfolgen, eine Konzentrationssteigerung könnte den Effekt am Myokard verbessern.¹²²

Des Weiteren wäre es möglich bei älteren Patienten die Anzahl der Stimulationszyklen zu verändern. Sandhu et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Anzahl von Zyklen den Effekt der Präkonditionierung steigern kann.³⁷ Eine Anpassung an die durch Muskelatrophie reduzierte Muskelmasse wäre denkbar. Die in klinischen Studien durchgeführte einseitige Oberarmischämie könnte durch eine in Tierversuchen bereits etablierte Ischämie der Oberschenkel, eventuell auch beidseits, ausgeweitet werden.¹²⁵ So könnte es gelingen, die reduzierte Muskelmasse auszugleichen.

Eventuell kann der Einsatz von Bewegung die im Alter zunehmende Muskelatrophie¹²³ verbessern und die Durchblutung der Muskulatur¹²⁴ steigern. Fraglich ist hier, ob die Bewegung die Muskelmasse und damit die freigesetzte Menge an Faktoren ausreichend erhöhen kann.

Die Erforschung der Beeinflussung der RIPC durch weitere Einflussfaktoren (bestehende Medikation und Vorerkrankungen) sollte intensiviert werden. Da es sich um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener, gerade im Risikokollektiv für einen Myokardinfarkt auftretender Faktoren handelt, bedürfen diese einer separaten Betrachtung.

Die zusätzliche Steigerung der Ischämietoleranz durch andere Strategien könnte das Outcome durch RIPC zusätzlich verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kalorienrestriktion in der Ratte über einen Zeitraum von acht Monaten zu einer verbesserten postischämischen Erholung mit verbesserter kardialer Funktion führte.¹⁸¹ Auch eine erhöhte Anzahl an Bewegungseinheiten förderte den kardioprotektiven Effekt.¹⁸¹

Weitere Studien zu den genauen Mechanismen der RIPC und den Veränderungen im Alter sind notwendig. Ziel sollte es sein, RIPC für den Einsatz im Risikokollektiv zu modulieren, um dann von Vorzügen wie der einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit in einem immer größer werdenden Kollektiv an älteren Patienten im klinischen Alltag zu profitieren.

5 Literaturverzeichnis

1. Herold, G. *Innere Medizin*. vol. 2018 (Herold Verlag, 2017).
2. Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK - Langfassung, 4. Auflage. Version 1. 158 (2016).
3. Statistisches Bundesamt (Destatis), Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017;
https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html
(Stand: 28.10.2020).
4. Statistisches Bundesamt (Destatis), Pressemitteilungen - Zahl der Todesfälle im Jahr 2018 um 2,4 % gestiegen;
<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>
(Stand: 28.10.2020).
5. Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E. & Busch, M. A. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56, 650–655 (2013).
6. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet* 364, 937–952 (2004).
7. Robert Koch Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes;
<http://www.gbe-bund.de/pdf/GESBER2015.pdf> (Stand: 28.10.2020).
8. Thygesen, K. *et al.* Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart Journal* (2018) ,237-269.
9. Reimer K A, Lowe J E, Rasmussen M M & Jennings R B. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786–794 (1977).
10. Rochitte, C. E. & Azevedo, C. F. The myocardial area at risk. *Heart* 98, 348 (2012).
11. Verdouw, P. D., van den Doel, M. A., de Zeeuw, S. & Duncker, D. J. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc. Res.* 39, 121–135 (1998).
12. Ytrehus, K. The ischemic heart—experimental models. *Pharmacol. Res.* 42, 193–203 (2000).

13. Pasotti, M., Prati, F. & Arbustini, E. The pathology of myocardial infarction in the pre- and post-interventional era. *Heart Br. Card. Soc.* 92, 1552–1556 (2006).
14. Abela, C. B. & Homer-Vanniasinkham, S. Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury. *Pathophysiology* 9, 229–240 (2003).
15. Kleinbongard, P., Skyschally, A. & Heusch, G. Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 469, 159–181 (2017).
16. Bulkley, G. B. Pathophysiology of free radical—mediated reperfusion injury. *J. Vasc. Surg.* 5, 512–517 (1987).
17. Bulkley, G. B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer. Suppl.* 8, 66–73 (1987).
18. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. & Korthuis, R. J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 229–317 (2012).
19. Sanada, S., Komuro, I. & Kitakaze, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 301, 1723–1741 (2011).
20. Thompson, J., Hu, Y., Lesnefsky, E. J. & Chen, Q. Activation of mitochondrial calpain and increased cardiac injury: beyond AIF release. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 310, 376–384 (2015).
21. Ciz, M. *et al.* Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 181295–181295 (2012).
22. Jordan, J. E., Zhao, Z.-Q. & Vinten-Johansen, J. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 43, 860–878 (1999).
23. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 123, 92–100 (2013).
24. Halestrap, A. P. Mitochondria and reperfusion injury of the heart—A holey death but not beyond salvation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 113–121 (2009).
25. Ostergaard, L. *et al.* The role of capillary transit time heterogeneity in myocardial oxygenation and ischemic heart disease. *Basic Res. Cardiol.* 109, 409–409 (2014).

26. Kharbanda, R. K. *et al.* Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation* 106, 2881 (2002).
27. Munk Kim *et al.* Remote Ischemic Conditioning in Patients With Myocardial Infarction Treated With Primary Angioplasty. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 3, 656–662 (2010).
28. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124 (1986).
29. Yellon, D. M., Alkhulaifi, A. M. & Pugsley, W. B. Preconditioning the human myocardium. *The Lancet* 342, 276–277 (1993).
30. Ren, C., Gao, X., Steinberg, G. K. & Zhao, H. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience* 151, 1099–1103 (2008).
31. Torras, J. *et al.* Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.* 61, 2218–2227 (2002).
32. Young, S. B. *et al.* Effect of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Liver Regeneration in Prepubertal Rats. *Transplant. Proc.* 46, 1867–1871 (2014).
33. Soncul, H., O'z, E. & Kalaycioglu, S. Role of Ischemic Preconditioning on Ischemia-Reperfusion Injury of the Lung. *CHEST* 115, 1672–1677 (1999).
34. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A. & Whittaker, P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87, 893 (1993).
35. Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J. & Verdouw, P. D. Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation* 94, 2193 (1996).
36. Birnbaum, Y., Hale, S. L. & Kloner, R. A. Ischemic Preconditioning at a Distance. *Circulation* 96, 1641 (1997).
37. Sandhu, R., Diaz, R. J., Mao, G. D. & Wilson, G. J. Ischemic Preconditioning. *Circulation* 96, 984 (1997).
38. Johnsen, J. *et al.* The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res. Cardiol.* 111, 10 (2016).

39. Candilio, L. *et al.* Effect of remote ischaemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing cardiac bypass surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart* 101, 185 (2015).
40. Zografos, T. A. *et al.* Effect of One-Cycle Remote Ischemic Preconditioning to Reduce Myocardial Injury During Percutaneous Coronary Intervention. *Am. J. Cardiol.* 113, 2013–2017 (2014).
41. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H & *et al.* Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: A randomized clinical trial. *JAMA* 313, 2133–2141 (2015).
42. Kanoria, S. *et al.* Effect of Remote Ischaemic Preconditioning on Liver Injury in Patients Undergoing Major Hepatectomy for Colorectal Liver Metastasis: A Pilot Randomised Controlled Feasibility Trial. *World J. Surg.* 41, 1322–1330 (2017).
43. Li, C. *et al.* Limb Remote Ischemic Preconditioning Attenuates Lung Injury after Pulmonary Resection under Propofol–Remifentanyl AnesthesiaA Randomized Controlled Study. *Anesthesiology* 121, 249–259 (2014).
44. Thielmann, M. *et al.* Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet* 382, 597–604.
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.* 7, (2018).
46. Hausenloy, D. J. *et al.* Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* 373, 1408–1417 (2015).
47. Stoppe, C., Meybohm, P. & Goetzenich, A. Remote Ischaemic Conditioning - Eine Übersicht. *Anästhesiol Intensiv. Notfallmed Schmerzther* 51, 596–603 (2016).
48. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc. Res.* 79, 377–386 (2008).
49. Heusch, G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ. Res.* 116, 674 (2015).

50. Redington, K. L. *et al.* Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Res. Cardiol.* 107, 241 (2012).
51. Merlocco, A. C. *et al.* Transcutaneous electrical nerve stimulation as a novel method of remote preconditioning: in vitro validation in an animal model and first human observations. *Basic Res. Cardiol.* 109, 406 (2014).
52. Gross, E. R., Hsu, A. K., Urban, T. J., Mochly-Rosen, D. & Gross, G. J. Nociceptive-induced myocardial remote conditioning is mediated by neuronal gamma protein kinase C. *Basic Res. Cardiol.* 108, 381 (2013).
53. Schoemaker, R. G. & van Heijningen, C. L. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 278, H1571–H1576 (2000).
54. Gourine, A. & Gourine, A. V. Neural Mechanisms of Cardioprotection. *Physiology* 29, 133–140 (2014).
55. Uitterdijk, A. *et al.* Vagal nerve stimulation started just prior to reperfusion limits infarct size and no-reflow. *Basic Res. Cardiol.* 110, 51 (2015).
56. Donato Martín *et al.* Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp. Physiol.* 98, 425–434 (2013).
57. Gedik, N. *et al.* Potential humoral mediators of remote ischemic preconditioning in patients undergoing surgical coronary revascularization. *Sci. Rep.* 7, 12660 (2017).
58. Dickson, E. W. *et al.* Rabbit heart can be “preconditioned” via transfer of coronary effluent. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 277, 2451–2457 (1999).
59. Dickson Eric W. *et al.* “Preconditioning at a Distance” in the Isolated Rabbit Heart. *Acad. Emerg. Med.* 7, 311–317 (2008).
60. Hildebrandt, H. A. *et al.* Kinetics and Signal Activation Properties of Circulating Factor(s) From Healthy Volunteers Undergoing Remote Ischemic Pre-Conditioning. *Jacc Basic Transl. Sci.* 1, 3–13 (2016).
61. Skyschally Andreas *et al.* Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ. Res.* 117, 279–288 (2015).

62. Dickson, E. W. *et al.* Naloxone Blocks Transferred Preconditioning In Isolated Rabbit Hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1751–1756 (2001).
63. Serejo, F. C., Rodrigues, L. F. J., da Silva Tavares, K. C., de Carvalho, A. C. C. & Nascimento, J. H. M. Cardioprotective Properties of Humoral Factors Released From Rat Hearts Subject to Ischemic Preconditioning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 49, (2007).
64. Giricz, Z. *et al.* Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 68, 75–78 (2014).
65. Oyama, Y., Bartman, C. M., Gile, J. & Eckle, T. Circadian MicroRNAs in Cardioprotection. *Curr. Pharm. Des.* 23, 3723–3730 (2017).
66. Basalay, M. V. *et al.* Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning. *Cardiovasc. Res.* 112, 669–676 (2016).
67. Surendra, H. *et al.* Interaction of δ and κ opioid receptors with adenosine A1 receptors mediates cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 60, 142–150 (2013).
68. Randhawa, P. K. & Jaggi, A. S. Opioids in Remote Ischemic Preconditioning-Induced Cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 22, 112–121 (2016).
69. Heusch Gerd. The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection. *Circ. Res.* 118, 1643–1658 (2016).
70. Oba, T. *et al.* Renal Nerve-Mediated Erythropoietin Release Confers Cardioprotection During Remote Ischemic Preconditioning. *Circ. J.* 79, 1557–1567 (2015).
71. Cai, Z. P., Parajuli, N., Zheng, X. & Becker, L. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia–reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res. Cardiol.* 107, 277 (2012).
72. Davidson, S. M. *et al.* Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 α /CXCR4 signalling axis. *Basic Res. Cardiol.* 108, 377 (2013).
73. Tsibulnikov, S. Y. *et al.* A Review of Humoral Factors in Remote Preconditioning of the Heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 24, 403–421 (2019).
74. Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors AU- Dengler, Veronica L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 1–15 (2014).

75. Cai, Z., Luo, W., Zhan, H. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17462 (2013).
76. Michela, P., Velia, V., Aldo, P. & Ada, P. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 768, 71–76 (2015).
77. Brandenburger, T. *et al.* Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo. *J. Transl. Med.* 12, 228 (2014).
78. Saxena, P. *et al.* Remote ischaemic preconditioning down-regulates kinin receptor expression in neutrophils of patients undergoing heart surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 17, 653–658 (2013).
79. Shimizu, M. *et al.* Remote Ischemic Preconditioning Decreases Adhesion and Selectively Modifies Functional Responses of Human Neutrophils. *J. Surg. Res.* 158, 155–161 (2010).
80. Gedik, N. *et al.* Cardiomyocyte mitochondria as targets of humoral factors released by remote ischemic preconditioning. *Arch. Med. Sci. AMS* 13, 448–458 (2017).
81. Jasova, M., Kancirova, I., Waczulikova, I. & Ferko, M. Mitochondria as a target of cardioprotection in models of preconditioning. *J Bioenerg Biomembr* 2017 (49), 357–368 (2017).
82. Cellier, L. *et al.* Remote Ischemic Conditioning Influences Mitochondrial Dynamics. *Shock* 45, (2016).
83. Bernardi, P. & Di Lisa, F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 100–106 (2015).
84. Ong, S.-B., Dongworth, R. K., Cabrera-Fuentes, H. A. & Hausenloy, D. J. Role of the MPTP in conditioning the heart – translatability and mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2074–2084 (2015).
85. Kristiansen, S. B. *et al.* Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 288, H1252–H1256 (2005).
86. Rotko, D., Kunz, W. S., Szewczyk, A. & Kulawiak, B. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 125, 105792 (2020).
87. Xu, W. *et al.* Cytoprotective Role of Ca²⁺- Activated K⁺ Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane. *Science* 298, 1029 (2002).

88. Bugger, H. & Pfeil, K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1866, 165768 (2020).
89. Rentoukas, I. *et al.* Cardioprotective Role of Remote Ischemic Periconditioning in Primary Percutaneous Coronary Intervention: Enhancement by Opioid Action. *JACC Cardiovasc. Interv.* 3, 49–55 (2010).
90. Miki, T. *et al.* Captopril potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through bradykinin B2 receptor activation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28, 1616–1622 (1996).
91. Suematsu, Y., Anttila, V., Takamoto, S. & del Nido, P. J. Cardioprotection afforded by ischemic preconditioning interferes with chronic beta - blocker treatment. *Scand. Cardiovasc. J.* 38, 293–299 (2004).
92. Zhou, C. *et al.* β -Blockers and Volatile Anesthetics May Attenuate Cardioprotection by Remote Preconditioning in Adult Cardiac Surgery: A Meta-analysis of 15 Randomized Trials. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 27, 305–311 (2013).
93. Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Baxter, G. F. & Schulz, R. Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacol. Rev.* 66, 1142 (2014).
94. Kocsis, G. F. *et al.* Lovastatin interferes with the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning and postconditioning in rat hearts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 294, H2406–H2409 (2008).
95. Behmenburg, F. *et al.* Impact of Anesthetic Regimen on Remote Ischemic Preconditioning in the Rat Heart In Vivo. *Anesth. Analg.* 126, (2018).
96. Sloth, A. D. *et al.* Impact of cardiovascular risk factors and medication use on the efficacy of remote ischaemic conditioning: post hoc subgroup analysis of a randomised controlled trial. *BMJ Open* 5, (2015).
97. Robert Koch Institut. DEGS1 Studie- Prävalenz von Diabetes mellitus; Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (2008-2011). https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Faktenblaetter/degs1/degs1_fb_node.html. (Stand: 28.10.2020)

98. Kersten, J. R., Toller, W. G., Gross, E. R., Pagel, P. S. & Warltier, D. C. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 278, H1218–H1224 (2000).
99. Kersten, J. R., Schmeling, T. J., Orth, K. G., Pagel, P. S. & Warltier, D. C. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 275, H721–H725 (1998).
100. Ishihara, M. *et al.* Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1007–1011 (2001).
101. Kottenberg E. *et al.* Myocardial protection by remote ischaemic pre - conditioning is abolished in sulphonylurea - treated diabetics undergoing coronary revascularisation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 58, 453–462 (2014).
102. Meybohm, P. *et al.* A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J. Med.* 373, 1397–1407 (2015).
103. Bernhard, D. & Laufer, G. The Aging Cardiomyocyte: A Mini-Review. *Gerontology* 54, 24–31 (2008).
104. Leri, A., Malhotra, A., Liew, C.-C., Kajstura, J. & Anversa, P. Telomerase Activity in Rat Cardiac Myocytes is Age and Gender Dependent. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 385–390 (2000).
105. Boengler, K., Schulz, R. & Heusch, G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc. Res.* 83, 247–261 (2009).
106. Otterbein, L. E., Foresti, R. & Motterlini, R. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart: The balancing act between danger signaling and pro-survival. *Circ. Res.* 118, 1940–1959 (2016).
107. Hassouna, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 69, 450–458 (2006).
108. Nakou, E. *et al.* Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int. J. Cardiol.* 209, 167–175 (2016).
109. Ebrahim, Z., Yellon, D. M. & Baxter, G. F. Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: Independent effects of aging and longstanding hypertension. *Exp. Gerontol.* 42, 807–814 (2007).

110. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 281, H1630–H1636 (2001).
111. Burns, P. G. *et al.* Is the preconditioning response conserved in senescent myocardium? *Ann. Thorac. Surg.* 61, 925–929 (1996).
112. Przyklenk, K., Li, G. & Whittaker, P. No loss in the in vivo efficacy of ischemic preconditioning in middle-aged and old rabbits. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1741–1747 (2001).
113. Boengler, K. *et al.* Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 292, H1764–H1769 (2007).
114. Kloner, R. A. & Yellon, D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 1133–1142 (1994).
115. Ottani, F. *et al.* Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation* 91, 291–7 (1995).
116. Abete, P. *et al.* Angina-Induced Protection Against Myocardial Infarction in Adult and Elderly Patients: A Loss of Preconditioning Mechanism in the Aging Heart? *J. Am. Coll. Cardiol.* 30, 947–954 (1997).
117. Ishihara, M. *et al.* Beneficial effect of prodromal angina pectoris is lost in elderly patients with acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 139, 881–888 (2000).
118. Schmidt, M. R. *et al.* Remote ischemic preconditioning with – but not without – metabolic support protects the neonatal porcine heart against ischemia-reperfusion injury. *Int. J. Cardiol.* 170, 388–393 (2014).
119. Schmidt, M. R. *et al.* Remote ischemic preconditioning impairs ventricular function and increases infarct size after prolonged ischemia in the isolated neonatal rabbit heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 147, 1049–1055 (2014).
120. Zhou, C., Bulluck, H., Fang, N., Li, L. & Hausenloy, D. J. Age and Surgical Complexity impact on Renoprotection by Remote Ischemic Preconditioning during Adult Cardiac Surgery: A Meta analysis. *Sci. Rep.* 7, 215 (2017).
121. Kleinbongard, P. *et al.* Confounders of Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Cardiology* 133, 128–133 (2016).

122. Heinen, A. *et al.* The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent. *J. Transl. Med.* 16, 112 (2018).
123. Keller, K. & Engelhardt, M. Strength and muscle mass loss with aging process. Age and strength loss. *Muscles Ligaments Tendons J.* 3, 346–350 (2014).
124. Hearon Jr, C. M. & Dinunno, F. A. Regulation of skeletal muscle blood flow during exercise in ageing humans. *J. Physiol.* 594, 2261–2273 (2016).
125. Behmenburg, F., Heinen, A., Bruch, L. vom, Hollmann, M. W. & Huhn, R. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 31, 1223–1226 (2017).
126. Csonka, C. *et al.* Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *Troubl. Methods Pharmacol. Toxicol.* 61, 163–170 (2010).
127. Hoole, S. P. *et al.* Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study. *Circulation* 119, 820 (2009).
128. 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. *The Lancet* 370, 575–579 (2007).
129. Abete, P. *et al.* Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 1777–1786 (1996).
130. Fenton, R. A., Dickson, E. W., Meyer, T. E. & Dobson, J. G. Aging Reduces the Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning in the Rat Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 1371–1375 (2000).
131. Jones, B. O. *et al.* Remote ischemic preconditioning in cyanosed neonates undergoing cardiopulmonary bypass: A randomized controlled trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 146, 1334–1340 (2013).
132. Randhawa, P. K., Bali, A. & Jaggi, A. S. RIPC for multiorgan salvage in clinical settings: Evolution of concept, evidences and mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 746, 317–332 (2015).
133. Kirkwood, T. B. L. Understanding the Odd Science of Aging. *Cell* 120, 437–447 (2005).
134. Paneni, F., Diaz Cañestro, C., Libby, P., Lüscher, T. F. & Camici, G. G. The Aging Cardiovascular System. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 1952 (2017).

135. Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412–423 (2010).
136. Vogel, Peter. *Kursbuch Klinische Neurophysiologie*. (Thieme Verlag, 2011).
137. Jensen, R. V., Støttrup, N. B., Kristiansen, S. B. & Bøtker, H. E. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res. Cardiol.* 107, 285 (2012).
138. Mastitskaya, S. *et al.* Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc. Res.* 95, 487–494 (2012).
139. Loukogeorgakis, S. P. *et al.* Remote Ischemic Preconditioning Provides Early and Late Protection Against Endothelial Ischemia-Reperfusion Injury in Humans: Role of the Autonomic Nervous System. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 450–456 (2005).
140. Lambert, E. A. *et al.* Sympathetic nervous response to ischemia-reperfusion injury in humans is altered with remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 311, H364–H370 (2016).
141. Zhang, Ph. D., Shi-zhong *et al.* κ -Opioid Receptors Mediate Cardioprotection by Remote Preconditioning. *Anesthesiology* 105, 550–556 (2006).
142. Lanza, G. A. *et al.* Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Coronary Procedure-Related Impairment of Vascular Dilator Function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2490–2492 (2016).
143. Rassaf, T. *et al.* Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning. *Circ. Res.* 114, 1601 (2014).
144. Jeanneteau, J. *et al.* Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 303, H871–H877 (2012).
145. Malik, Z. A. *et al.* Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 304, H954–H965 (2013).
146. 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.* 117, 191 (2009).

147. Dickson, E. W. *et al.* Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J. Thromb. Thrombolysis* 8, 123–129 (1999).
148. Rasola, A. & Bernardi, P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Spec. Issue Ca²⁺ Signal. Mech. Cell Surviv. Cell Death* 50, 222–233 (2011).
149. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* 61, 448–460 (2004).
150. Juhaszova Magdalena *et al.* Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Cardioprotection. *Circ. Res.* 104, 1240–1252 (2009).
151. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* 12, 217–234 (2007).
152. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 283, H1481–H1488 (2002).
153. Heusch Gerd, Boengler Kerstin & Schulz Rainer. Cardioprotection. *Circulation* 118, 1915–1919 (2008).
154. Lecour, S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 32–40 (2009).
155. Hadebe, N., Cour, M. & Lecour, S. The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res. Cardiol.* 113, 9 (2018).
156. Lecour Sandrine *et al.* Pharmacological Preconditioning With Tumor Necrosis Factor- α Activates Signal Transducer and Activator of Transcription-3 at Reperfusion Without Involving Classic Prosurvival Kinases (Akt and Extracellular Signal–Regulated Kinase). *Circulation* 112, 3911–3918 (2005).
157. Suleman, N., Somers, S., Smith, R., Opie, L. H. & Lecour, S. C. Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 79, 127–133 (2008).
158. Smith, R. M. *et al.* Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 63, 611–616 (2004).

159. Tamarelle, S. *et al.* RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 106, 1329–1339 (2011).
160. Chen, H. *et al.* Stat5-dependent cardioprotection in late remote ischaemia preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 114, 679–689 (2018).
161. Heusch, G. *et al.* STAT5 Activation and Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Humans. *Circ. Res.* 110, 111 (2012).
162. Shavlakadze, T. *et al.* Age-Related Gene Expression Signature in Rats Demonstrate Early, Late, and Linear Transcriptional Changes from Multiple Tissues. *Cell Rep.* 28, 3263–3273.e3 (2019).
163. Cohen, M. V. & Downey, J. M. Cardioprotection: spotlight on PKG. *Br. J. Pharmacol.* 152, 833–834 (2007).
164. Wolfrum, S. *et al.* Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC ϵ -isoform. *Cardiovasc. Res.* 55, 583–589 (2002).
165. Davidson, S. M. & Yellon, D. M. Cardioprotection – is no the answer? A renewed look at nitric oxide signalling in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 114, 773–775 (2018).
166. Smith, A. R. & Hagen, T. M. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)- α -lipoic acid. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1447–1449 (2003).
167. Tocchi, A., Quarles, E. K., Basisty, N., Gitari, L. & Rabinovitch, P. S. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *SI Mitochondrial Dysfunct. Aging* 1847, 1424–1433 (2015).
168. Murphy, E. & Steenbergen, C. Preconditioning: The Mitochondrial Connection. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 51–67 (2007).
169. Heinen, A. *et al.* Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 292, C148–C156 (2007).
170. Huhn, R. *et al.* Age-related loss of cardiac preconditioning: Impact of protein kinase A. *Exp. Gerontol.* 47, 116–121 (2012).
171. Lesnefsky, E. J., Chen, Q. & Hoppel, C. L. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ. Res.* 118, 1593–1611 (2016).

172. Judge, S. & Leeuwenburgh, C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 292, C1983–C1992 (2007).
173. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* 4, 624–630 (2013).
174. Ostadal, B., Netuka, I., Maly, J., Besik, J. & Ostadalova, I. Gender Differences in Cardiac Ischemic Injury and Protection—Experimental Aspects. *Exp. Biol. Med.* 234, 1011–1019 (2009).
175. Song, X., Li, G., Vaage, J. & Valen, G. Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia–reperfusion injury in mice. *Acta Physiol. Scand.* 177, 459–466 (2003).
176. Kottenberg E. *et al.* Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol – a clinical trial. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 56, 30–38 (2011).
177. Cason, M., Brian A., Gamperl, P., A. Kurt, Slocum, B., Robert E. & Hickey, M., Robert F. Anesthetic-induced Preconditioning Previous Administration of Isoflurane Decreases Myocardial Infarct Size in Rabbits. *Anesthesiology* 87, 1182–1190 (1997).
178. Kersten, M., Judy R., Schmeling, B., Todd J., Pagel, M., PhD ,Paul S., Gross, P., Garrett J. & Warltier, M., PhD ,David C. Isoflurane Mimics Ischemic Preconditioning via Activation of KATPChannels Reduction of Myocardial Infarct Size with An Acute Memory Phase. *Anesthesiology* 87, 361–370 (1997).
179. Frey H-H, Löscher W, Althaus FR, Herausgeber. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke in MVS Medizinverl. Stuttgart; 2010. 672 S.
180. Kohlhauer, M., Berdeaux, A., Ghaleh, B. & Tissier, R. Therapeutic hypothermia to protect the heart against acute myocardial infarction. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 109, 716–722 (2016).
181. Jacob, J., Gillis, M., Belke, T., Broderick, T. L. & Driedzic, W. R. Effects of Chronic Food Restriction and Exercise Training on the Recovery of Cardiac Function Following Ischemia. *J. Gerontol. Ser. A* 56, B33–B37 (2001).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen genannten Personen von ganzem Herzen bedanken, denn ohne ihre Mithilfe hätte ich diese Promotionsschrift nicht anfertigen können.

In erster Linie gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, im Besonderen bei Frau Dr. med. Friederike Behmenburg, Herrn Dr. med. Martin Ströthoff und Frau Franziska Eckelskemper für die große Hilfsbereitschaft und konstruktiven Diskussionen bedanken. Außerdem danke ich Franziska vom Bruch und Julia Giesen für ihre Hilfe.

Meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinem Mann möchte ich für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenssituation danken.