

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

**Kardioprotektion durch ischämische
Fernpräkonditionierung: Welchen Effekt hat die Blockade
von Östrogenrezeptoren auf die kardioprotektive Potenz im
Plasma junger Frauen?**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lea Zerbin

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Für meine Familie, meinen Partner und all die Freunde, die immer an mich glauben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

A. Heinen, F. Behmenburg, A. Aytulun, M. Dierkes, L. Zerbin, W. Kaisers, M. Schaefer, T. Meyer-Treschan, S. Feit, I. Bauer, M.W. Hollmann, R. Huhn: "*The release of cardioprotective humoral factors after ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*". Journal of Translational Medicine, 2018. **16**(1): p.112 [1].

Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Mit Hilfe der ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) könnte der entstehende kardiale Ischämie-Reperfusionsschaden reduziert und die Mortalitätsrate gesenkt werden. Durch RIPC kommt es zur Freisetzung humoraler Faktoren. Dieser Effekt ist geschlechtsspezifisch. Interessanterweise besitzt Plasma junger Frauen endogene kardioprotektive Eigenschaften, welche sich nicht durch RIPC steigern lassen. Östrogen spielt für die Vermittlung kardioprotektiver Effekte prämenopausaler Frauen eine essenzielle Rolle. Ziel der vorliegenden Studie war es, in einem translationalen Ansatz zu untersuchen, ob die Blockade von Östrogenrezeptoren die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen beeinflusst.

Die vorliegende Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission (Referenznummer 3911) und des Tierschutzbeauftragten (Projektnummer O 27/12) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bei 10 jungen Probandinnen (23 ± 1 Jahr) wurde Blut vor (Kontrollgruppe) und nach RIPC abgenommen. RIPC bestand aus drei Zyklen 5-minütiger Oberarmischämie jeweils gefolgt von 5-minütiger Reperfusion. Das Kontroll- bzw. RIPC-Plasma wurde nach vorheriger Zugabe des Östrogenrezeptorblockers Fulvestrant (100 nM) bzw. des Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) randomisiert auf isoliert perfundierte Rattenherzen (Langendorff-Präparation) übertragen. Die insgesamt vier Versuchsgruppen (je $n=10$) durchliefen eine 33-minütige Globalischämie und eine 60-minütige Reperfusion. Hämodynamische Variablen wurden dabei kontinuierlich aufgezeichnet. Anschließend wurden Infarktgrößen mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse, dem Tukey post-hoc Test sowie Dunett's post-hoc Test. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Die Blockade der Östrogenrezeptoren durch Fulvestrant hatte keinen Einfluss auf die Infarktgrößen (Fulvestrant + Kontrollplasma: 31 ± 9 % vs. Fulvestrant + RIPC-Plasma: 34 ± 9 %). In der Kontrollgruppe + DMSO betrug die Infarktgröße 31 ± 9 % und konnte durch RIPC nicht weiter reduziert werden (RIPC-Plasma + DMSO 33 ± 9 %). Die hämodynamischen Variablen unterschieden sich größtenteils nicht relevant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Blockade von Östrogenrezeptoren hat keinen Einfluss auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen. Ob bei Frauen möglicherweise eine höhere Schwelle zur effektiven RIPC existiert, muss weiter untersucht werden.

Summary

Coronary heart disease is one of the most common cause of death worldwide. Remote ischemic preconditioning (RIPC) could attenuate the emerging cardiac ischemia-reperfusion injury and therefore reduce the mortality. RIPC induces the release of humoral factors and this effect is gender-specific. Plasma of young females holds endogenous cardioprotective properties which cannot be enhanced by RIPC. Estrogen plays an important role by mediating cardioprotective effects in premenopausal women. The present study aims to evaluate in a translational setting, whether the inhibition of estrogen receptors affects the cardioprotective potency in the plasma of young women.

The study was performed with permission from the ethics committee (reference number 3911) and the animal protection commissioner (project number O 27/12) of the Heinrich-Heine-University of Düsseldorf. Blood was drawn from 10 young female volunteers (23 ± 1 year) before (control group) and after RIPC. RIPC was performed by three cycles of upper-arm ischemia (5 minutes) and reperfusion (5 minutes) by inflation/deflation of a blood pressure cuff. The control- and respectively RIPC-plasma was transferred to isolated perfused rat hearts (Langendorff preparation) after the application of the estrogen receptor inhibitor Fulvestrant (100 nM) or the solvent dimethylsulfoxide (DMSO). The four experimental groups were subjected to 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. Hemodynamic variables were recorded continuously. Subsequently infarct sizes were determined by triphenyltetrazolium chloride staining. Statistical analysis was performed by analysis of variance, Tukey post-hoc test and Dunnett post-hoc test. Data are expressed as mean \pm standard deviation. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The inhibition of estrogen receptors by Fulvestrant did not affect infarct size (Fulvestrant + control-plasma 31 ± 9 % vs. Fulvestrant + RIPC-plasma 34 ± 9 %). Infarct size of control-group + DMSO was 31 ± 9 % and could not be further reduced by RIPC (RIPC-plasma + DMSO 33 ± 9 %). For the most part, hemodynamic variables did not differ significantly between the experimental groups.

The inhibition of estrogen receptors does not impact the cardioprotective potency of young female plasma. Further investigation needs to be done to identify whether there is a higher threshold for an effective RIPC in women.

Abkürzungsverzeichnis

AAR <i>area at risk</i> , Risikogebiet
AMIakuter Myokardinfarkt
ANOVA <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AOP <i>aortic pressure</i> , aortaler Perfusionsdruck
ATPAdenosintriphosphat
BMI <i>Body-Mass-Index</i>
cAMPcyklisches Adenosinmonophosphat
CF <i>coronary flow</i> , Koronarfluss
CGRP <i>calcitonin gene-related peptide</i>
CoaKoaktivator
DMSODimethylsulfoxid
ERÖstrogenrezeptor
ERE <i>estrogen-response-element</i>
ERKextrazellulär-regulierte Kinase
GPCRG-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPER <i>G protein-coupled estrogen receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
HR <i>heart rate</i> , Herzfrequenz
IOPInter-Organ-Protektion
IPCischämische Präkonditionierung
I/R-SchadenIschämie-Reperfusionsschaden
IS <i>infarct size</i> , Infarktgröße
KHKkoronare Herzkrankheit
LVDPlinksventrikulär entwickelter Druck
LVPlinksventrikulärer Druck
LVPmaxmaximaler linksventrikulärer Druck
LVPminminimaler linksventrikulärer Druck
MIMyokardinfarkt
mPTPmitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
NYHA <i>New York Heart Association</i>
PCIperkutane Koronarintervention
PI3K/AktPhosphatidylinositol 3-Kinase/Akt
PKCϵ ϵ -Isoform der Proteinkinase C

PKG	Proteinkinase G
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i> , ischämische Fernpräkonditionierung
RISK-Pathway	<i>reperfusion injury salvage kinase pathway</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPP	<i>Rate Pressure Product</i>
TF	Transkriptionsfaktoren
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT		zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutz aufgaben

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	1
1.2 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	1
1.3 Ischämische Präkonditionierung zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	5
1.4 Ischämische Fernpräkonditionierung als Alternative zur ischämischen Präkonditionierung.....	6
1.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede und der Einfluss von Östrogen bei der Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens.....	11
1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei ischämischer (Fern-) Präkonditionierung	15
1.7 Ziele dieser Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Gewinnung des humanen Blutplasmas	20
2.1.1 Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen	21
2.1.2 Screening und Aufklärung der Studienteilnehmerinnen.....	21
2.1.3 Erklärung zum Datenschutz.....	22
2.1.4 Ablauf der ischämischen Fernpräkonditionierung.....	22
2.1.5 Aufbereitung der Blutproben	22
2.2 Versuchstiere	23
2.3 Materialliste.....	23
2.4 Versuchsaufbau.....	25
2.4.1 Untersuchungen zum Effekt der ischämischen Prä- konditionierung	25
2.4.2 Untersuchungen zum Effekt der Östrogenrezeptorblockade nach ischämischer Fernpräkonditionierung	26

2.4.3 Vorbereitung der Versuchstiere	27
2.4.4 Aufbau und Funktion der Langendorff-Anlage	28
2.4.5 Applikation des Östrogenrezeptorblockers Fulvestrant und des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid	30
2.4.6 Übertragung des humanen Plasmas auf das Rattenherz	32
2.4.7 Induktion der Globalischämie.....	32
2.4.8 Überwachung der Herzfunktion.....	33
2.8 Ermittlung der Infarktgrößen	34
2.9 Statistische Grundlagen	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Kardioprotektion durch Ischämische Präkonditionierung	37
3.2 Effekt der Östrogenrezeptorblockade auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen	38
3.2.1 Infarktgrößenvergleich nach Applikation von ischämisch fernpräkonditioniertem Plasma mit und ohne Fulvestrant.....	38
3.2.2. Vergleich der hämodynamischen Variablen.....	39
4. Diskussion.....	42
4.1. Diskussion der Methodik	42
4.1.1 Das isoliert perfundierte Herz nach Oskar Langendorff.....	43
4.1.2 Studiendesign.....	44
4.2 Diskussion der Ergebnisse	48
4.2.1 Versuchsreihe zur ischämischen Präkonditionierung	48
4.2.2 Versuchsreihe zur ischämischen Fernpräkonditionierung.....	48
4.3. Schlussfolgerungen	51
5. Literaturverzeichnis.....	53
6. Danksagung.....	1

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind jährlich für über 4 Millionen Todesfälle in Europa verantwortlich und stehen damit, trotz sinkender Mortalitätsrate, noch immer an erster Stelle der häufigsten Todesursachen. Fast 1,8 Millionen Todesfälle können allein auf die koronare Herzkrankheit (KHK) zurückgeführt werden, womit ihr, unter der Gesamtheit an kardiovaskulären Erkrankungen, besonderer Aufmerksamkeit bedarf [2].

Die KHK prädisponiert wesentlich zur Entwicklung akuter Koronarsyndrome wie Angina Pectoris, Myokardinfarkt (MI) und plötzlichem Herztod. Im Jahre 2019 verstarben mehr als 44.000 Menschen in Deutschland an akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkten [3].

Der Goldstandard in der Therapie des akuten MI (AMI) ist die möglichst zügige Reperfusion des ischämischen Myokards, wodurch das Ausmaß des Infarktareals reduziert und der Entstehung von Sekundärkomplikationen vorgebeugt werden kann. Paradoxerweise kann es durch die vermeintlich rettende Reperfusion zu einer weiteren Schädigung des Myokards kommen. Dieses Phänomen wird als Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet und trägt mit bis zu 50 % erheblich zum Ausmaß des Infarktareals bei [4].

1.2 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens

Durch den Verschluss einer Koronararterie beim AMI kommt es zum absoluten Sauerstoffmangel und dadurch bedingt zu metabolischen und biochemischen Veränderungen des nicht perfundierten Myokards. Myozyten benötigen für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion den höchsten kontinuierlichen Adenosintriphosphat-(ATP-)Bedarf des Körpers, welcher sich nur unter aeroben Bedingungen und bei intakter mitochondrialer Funktion decken lässt [5]. Unter anaeroben Bedingungen werden die oxidative Phosphorylierung gehemmt, vorhandene ATP-Speicher abgebaut und die kontraktile Funktion blockiert [6]. Daraufhin generieren die Myozyten mit Hilfe der anaeroben Glykolyse Energie für ihren Zellstoffwechsel. Das dabei entstehende Abbauprodukt Laktat senkt wiederum den intrazellulären pH-Wert. Um dem sinkenden pH-Wert entgegenzuwirken, kommt es zur Aktivierung der Na^+/H^+ -Antiporter, welche Protonen im Austausch gegen Na^+ aus der Zelle schleusen. Da die Natrium-Kalium-ATPase ($3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$ -ATPase) für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion auf ATP angewiesen ist, kommt es

schnell zu einem relativen Überschuss an intrazellulärem Na^+ . Die hohe Na^+ -Konzentration führt schließlich zur Aktivierung von $2 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern, welche Natrium aus der Zelle transportieren und gleichzeitig eine intrazelluläre Kalziumüberladung bewirken [6]. Die während der Ischämie entstehenden metabolischen und biochemischen Veränderungen werden während der Reperfusion durch weitere schädigende Prozesse ergänzt, wodurch sich der I/R-Schaden manifestiert. Es werden vier Formen des myokardialen Reperfusionsschadens unterschieden [6].

Reperusionsarrhythmien zählen zu den therapierbaren und damit reversiblen Folgen [7]. Eine weitere reversible Folge stellt die post-ischämische kontraktile Dysfunktion des Myokards dar, die auch als *myocardial stunning* bezeichnet wird [7].

Zu den irreversiblen Schäden, die durch die Reperfusion ischämischen Myokards hervorgerufen werden, zählen die mikrovaskuläre Obstruktion und intramyokardiale Einblutung, sowie der zum Zelltod führende letale Reperfusionsschaden [7].

Beim letalen Reperfusionsschaden kommt es durch die Reperfusion zum Untergang von Zellen, die während der vorherigen Ischämie noch nicht irreversibel geschädigt waren [8]. Durch ein Zusammenspiel von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), intrazellulärem Kalziumüberschuss, der schnellen Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes sowie akuter Entzündungsreaktionen wird über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) und durch Hyperkontraktilität der Myozyten der Zelltod eingeleitet (vgl. Abb. 1) [4].

Die mPTP ist ein nicht-selektiver Ionenkanal der inneren Mitochondrienmembran, die eine Schlüsselrolle im Prozess des letalen Reperfusionsschadens einnimmt. Während die mPTP unter ischämischen Bedingungen geschlossen bleibt, kommt es bei Reperfusion durch o.g. metabolische und biochemische Veränderungen zur Öffnung. Die Öffnung der mPTP bewirkt ihrerseits den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und, nach Erschöpfung der ATP-Speicher, den Zelltod [4].

ROS entstehen in der frühen Phase der Reperfusion in den Endothelzellen durch die Aktivität der Xanthinoxidase sowie durch die Wiederherstellung des Elektronentransports in den Mitochondrien bei Reperfusion. Einige Stunden später trägt die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase einwandernder neutrophiler Granulozyten zusätzlich zu deren Entstehung bei. ROS bewirken die Öffnung der mPTP, wirken chemotaktisch auf weitere neutrophile Granulozyten, zerstören Zellmembranen durch die Oxidation von Fettsäuren, induzieren die Denaturierung von Enzymen und können die

Desoxyribonukleinsäure durch oxidativen Stress beschädigen. Durch die ROS kommt es zusätzlich zur Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums sowie zur Beschädigung sarkolemmaler Membranen, wodurch wiederum die in der Ischämie entstandene intrazelluläre Kalziumüberladung verstärkt wird [4]. Die Überladung der Zelle mit Kalzium bewirkt bei wiederhergestellter Mitochondrienfunktion über eine Hyperkontraktilität der Myozyten, sowie über die Öffnung der mPTP, den Zelltod [4].

Die schnelle Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes während der Reperfusion erfolgt durch das Auswaschen des in der anaeroben Glykolyse entstandenen Laktats sowie durch die Aktivierung von $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschern und $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Symportern. Sowohl die Öffnung der mPTP als auch die Hyperkontraktilität wird durch die Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes vermittelt [4].

ROS, Zytokine und Komplementsystemaktivierung initiieren nach einiger Zeit über chemotaktische Signale die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Infarktareal. Durch Hochregulierung bestimmter Zelladhäsionsmoleküle wird die Migration der neutrophilen Granulozyten in das Myokard erleichtert. Dort induzieren sie über die Freisetzung von ROS und abbauenden Enzymen sowie durch Verstopfung von Gefäßen eine akute Entzündungsreaktion und tragen zum Zelltod der Kardiomyozyten bei [4].

Obwohl die Entdeckung verschiedener Pathomechanismen des I/R-Schadens neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet, gibt es derzeit noch keine effektive Methode, mit der sich dieser bei der Therapie eines MI reduzieren lässt [7].

Einen vielversprechenden Ansatz stellen jedoch mechanische Interventionen wie die ischämische Präkonditionierung (*ischemic preconditioning*, IPC), ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) sowie die ischämische Post-Konditionierung (*post-conditioning*) dar.

1.3 Ischämische Präkonditionierung zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens

Murry et al. haben 1986 mit der Entdeckung der ischämischen Präkonditionierung die Forschung der Kardioprotektion revolutioniert. Sie untersuchten bei anästhesierten Hunden, ob kurze subletale ischämische Perioden, erzeugt durch die Okklusion der *A. circumflexa*, vor einer länger andauernden Ischämie Auswirkungen auf die Infarktgrößenentwicklung haben. Eine Versuchsgruppe wurde mit 4 Zyklen 5-minütiger Myokardischämie gefolgt von 5-minütiger Reperfusion präkonditioniert, bevor sie einer 40-minütigen Ischämie ausgesetzt wurde. Die Kontrollgruppe erfuhr lediglich die 40-minütige Ischämie. Anhand der anschließend ermittelten Infarktgrößen zeigte sich, dass durch IPC das Infarktareal um 75 % reduziert werden konnte [9].

In nunmehr 35 Jahren Forschung auf dem Gebiet der IPC konnte gezeigt werden, dass sich der kardioprotektive Effekt in unterschiedlichen Modellen und Spezies, *in vitro* sowie *in vivo*, reproduzieren lässt [10].

Die Mechanismen, die an der Vermittlung des kardioprotektiven Effektes der IPC beteiligt sind, sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es besteht jedoch ein allgemeiner Konsens über beteiligte Abläufe, welche in den Referenzen [5, 10-12] zusammengefasst sind. Der Stimulus der IPC bewirkt demnach im Myokard die Freisetzung von bestimmten Triggerfaktoren wie beispielsweise Adenosin, Bradykinin und Opioiden. Durch die Bindung der Triggerfaktoren an ihre entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf den Kardiomyozyten, kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden. Zu Beginn der Ischämie spielt die Aktivierung bestimmter Kinasen, wie beispielsweise der ϵ -Isoform der Protein-Kinase C und die Stickstoffmonoxid-vermittelte Aktivierung der Protein-Kinase G, eine entscheidende Rolle. Während der Reperfusion kommt es zusätzlich zur Aktivierung des RISK-Pathways (*reperfusion injury salvage kinase pathway*) bei dem besonders die Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt (PI3K/Akt) und die extrazellulär-regulierte Kinase (ERK) wichtige Komponenten darstellen. Die verschiedenen rezeptor-vermittelten Signale tragen zur Stabilisierung der Mitochondrienmembran bei und verhindern die Öffnung der mPTP, wodurch letztlich die Schwellung und Ruptur der Mitochondrien vermieden wird [10].

Im Jahr 1993 zeigten Yellon et al. zum ersten Mal, dass IPC auch am menschlichen Myokard einen kardioprotektiven Effekt bewirkt [13]. Zahlreiche folgende Studien bestätigen, dass

sich durch IPC das Ausmaß des myokardialen Schadens nach kardiochirurgischen Operationen reduzieren lässt [14].

Da die IPC *per definitionem* vor dem Auftreten eines akuten ischämischen Infarktes durchgeführt werden muss, was sich im Falle eines AMI durch die fehlende Vorhersehbarkeit kaum realisieren lässt, bleibt ihr Einsatz nur planbaren kardiochirurgischen und interventionellen Eingriffen vorbehalten. Sie ist zudem ein sehr invasiver und riskanter Eingriff, da sie die Abbindung von Koronararterien bzw. der Aorta erfordert und es dabei beispielsweise zu Thrombembolien kommen kann.

Auf der Suche nach einer weniger invasiven und risikoärmeren Methode, die auf ähnlichem Wege wie die IPC einen kardioprotektiven Effekt vermittelt, entstand das Konzept der RIPC.

1.4 Ischämische Fernpräkonditionierung als Alternative zur ischämischen Präkonditionierung

Im Jahr 1993 zeigten Przyklenk et al. in einer tierexperimentellen Studie an anästhesierten Hunden, dass IPC, initiiert an der *A. Circumflexa* bei nachfolgender Ischämie durch Okklusion des *Ramus interventricularis anterior*, einen protektiven Effekt auf das ischämische Myokard ausübt [15]. Da die Präkonditionierung in diesem Falle an einem vom Infarktareal entfernten arteriellen Teilstromgebiet stattgefunden hat, liegt die Vermutung nahe, dass es bei dieser Form der IPC zur Aktivierung kardioprotektiver Signalkaskaden kommt, die ihre Wirkung auch in entfernten Regionen entfalten [15].

Dieses Phänomen wurde als ischämische Fernpräkonditionierung bezeichnet.

Weitere Studien zeigten, dass der protektive Effekt der RIPC auch zwischen entfernten Organsystemen, im Sinne einer Inter-Organ-Protektion (IOP), übertragen werden kann. Beispiele für IOP durch RIPC sind in der Referenz [16] und in Abb. 2 zusammengefasst.

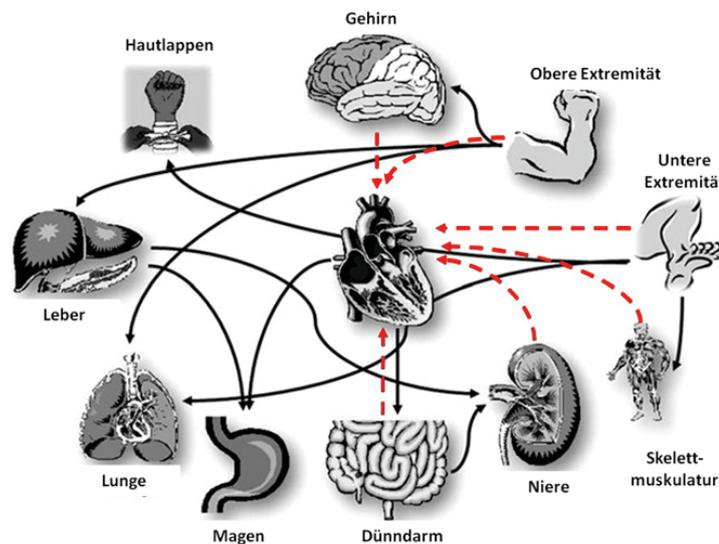


Abb. 2: Inter-Organ-Protektion durch ischämische Fernpräkonditionierung. Ischämische Präkonditionierung an herzfernen Organen (RIPC) kann eine myokardiale Infarktgrößenreduktion nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden bewirken (s. gestrichelte rote Pfeile). Weiterhin lässt sich durch RIPC auch an nicht-kardialen Organen ein protektiver Effekt vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden erzielen (s. durchgängige Pfeile, die vom präkonditionierten Organ zu dem Organ zeigen, an dem sich der protektive Effekt einstellt.) Abb. mit Erlaubnis modifiziert nach [18].

Von besonderem klinischen Interesse ist die RIPC initiiert am Skelettmuskel der oberen bzw. unteren Extremität, da auf diesem Wege die kurzen ischämischen Perioden nicht-invasiv mit Hilfe einer aufgepumpten Blutdruckmanschette bzw. eines Tourniquets erzeugt werden können [17].

Eine detaillierte Zusammenfassung der bisherigen Kenntnisse über die Vermittlung des kardioprotektiven Effekts durch RIPC geben Hausenloy et al. [18] sowie Costa et al. [19]. Neben Hinweisen auf Überschneidungen zwischen den Wirkmechanismen der IPC und RIPC, besteht ein allgemeiner Konsens darüber, dass es bei RIPC (1.) zur Freisetzung von Effektoren im ischämischen Organ kommt, (2.) eine Inter-Organ-Kommunikation besteht und dadurch (3.) ein kardioprotektiver Prozess initiiert wird [19]. Die Signalvermittlung findet dabei vermutlich durch ein Zusammenspiel humoraler, neuronaler und systemischer Faktoren statt (vgl. Abb. 3).

Die Hypothese der humoralen Signalübertragung besagt, dass der ischämische Stimulus zur Freisetzung endogener Substanzen führt, die mit dem Blutkreislauf zum Herzen gelangen. Durch Bindung an ihren spezifischen Rezeptor vermitteln sie hier vermutlich die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die letztendlich einen kardioprotektiven Effekt

bewirken [20]. Dickson et al. zeigten in diesem Rahmen erstmals, dass der kardioprotektive Effekt nach RIPC durch Bluttransfusion interindividuell übertragen werden kann [21]. Als mögliche humorale Faktoren werden Adenosin, Bradykinin, Opioide, *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP), Angiotensin 1, Endocannabinoide, Stickstoffmonoxid, Nitrit sowie bisher unbekannte Mediatoren diskutiert [18, 22].

Einen anderen Erklärungsansatz stellt die neuronale Hypothese dar, die besagt, dass es durch den ischämischen Stimulus zur Freisetzung endogener Substanzen (z.B. Adenosin, Bradykinin, CGRP) kommt. Diese Substanzen stimulieren afferente Nervenfasern, die wiederum über Efferenzen zum Herzen einen kardioprotektiven Effekt vermitteln [20].

Die dritte Hypothese besagt, dass bei RIPC eine systemische Antwort generiert wird, die durch Änderungen der Gentranskription zur Verminderung von Entzündungsreaktionen und Apoptose führt [23].

Die kardioprotektiven Effekte der IPC sowie der RIPC lassen sich einer frühen bzw. späten Phase zuordnen [24]. In der frühen Phase bewirken bestimmte Trigger/Mediatoren auf humoralem bzw. neuronalem Wege sofortige Veränderungen am Myokard, die nur einige Stunden anhalten und u.a. durch Verbesserung der Koronarperfusion vor den akuten Folgen des I/R-Schadens schützen [25].

Die späte Phase beginnt nach etwa 24 Stunden und hält für ca. 48 Stunden an [24]. In dieser Phase bewirkt eine systemische Antwort auf oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen einerseits die Unterdrückung pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Genexpression in Kardiomyozyten und Leukozyten [23, 26] sowie andererseits die *de novo* Proteinsynthese kardioprotektiver Mediatoren [27].

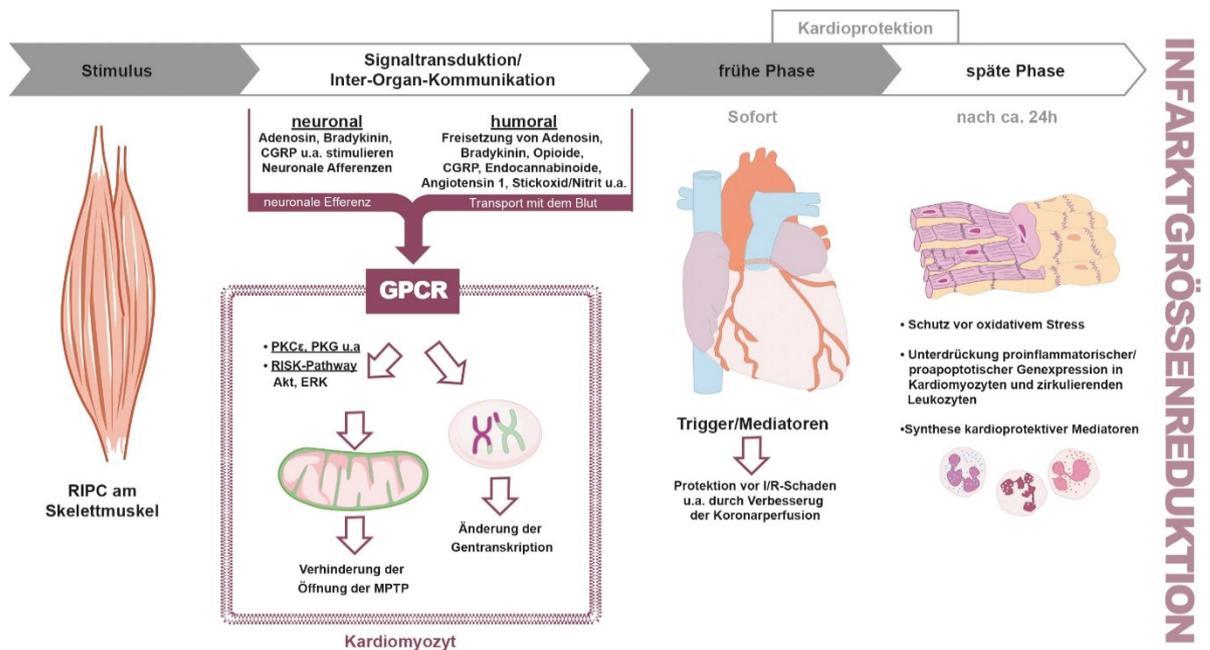


Abb. 3: Hypothesen zur Vermittlung der Kardioprotektion durch ischämische Fernpräkonditionierung. Hier werden allgemein anerkannte Hypothesen zur Vermittlung eines kardioprotektiven Effekts durch die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) dargestellt, die vermutlich durch ein komplexes Zusammenspiel interagieren. RIPC, initiiert durch kurze Phasen Ischämie/Reperfusion am Skelettmuskel, könnte zur Freisetzung endogener Substanzen führen, welche entweder (1.) neuronale Afferenzen stimulieren, die über efferente Bahnen am Herzen einen kardioprotektiven Effekt vermitteln oder (2.) auf humoralem Wege mit dem Blut zum Herzen transportiert werden und dort u.a. über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zur Freisetzung protektiver Mediatoren und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen, die letztlich die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (MPTP) verhindern. Zusätzlich kommt es im Zuge einer (3.) systemischen Antwort zur Veränderung der Genexpression und Vermittlung eines anti-apoptotischen sowie anti-inflammatorischen Effekts. Die durch RIPC vermittelte Kardioprotektion kann einer frühen Phase mit sofortigem Schutz vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) und einer späten Phase nach ca. 24 Stunden (= 24 h) mit verzögertem Schutz vor Entzündungsprozessen zugeordnet werden und resultiert letztendlich in einer Infarktgrößenreduktion. CGRP = *calcitonin gene-related peptide*; PKCε = ε-Isoform der Protein-Kinase C; PKG = Protein-Kinase G; RISK-Pathway = *reperfusion injury salvage kinase pathway*; ERK = Extrazellulär-Regulierte-Kinase. Abb. modifiziert nach [19].

Die RIPC bietet auf Grund ihrer Effektivität, leichten Anwendbarkeit und geringen Invasivität einen vielversprechenden Ansatz zur Optimierung kardioprotektiver Strategien im klinischen Alltag.

In den letzten Jahren wurde das Prinzip der RIPC sowohl an Erwachsenen als auch an Kindern evaluiert, die sich einem interventionellen oder operativen Eingriff auf Grund einer

Herzerkrankung unterziehen mussten. RIPC wurde dabei durch I/R-Phasen am Bein und/oder am Arm mittels eines Tourniquets bzw. einer Blutdruckmanschette erzeugt [28]. Als Endpunkt der meisten Studien wurde nach der Intervention die Serum-Konzentration spezifischer kardialer Proteine (Kreatinin-Kinase, Troponin-I und/oder Troponin-T) bestimmt, welche als Indikatoren für einen myokardialen Zelluntergang dienen [28].

Die Ergebnisse klinischer Studien zum Effekt der RIPC sind inhomogen. Aus diesem Grunde wird die Übertragbarkeit der aus tierexperimentellen Studien gewonnenen Erkenntnisse über protektive Effekte der RIPC auf den Menschen häufig in Frage gestellt.

Heusch et al. haben 2016 eine Zwischenbilanz klinischer Forschungsergebnisse gezogen und diese detailliert zusammengefasst [29].

Bei Patienten mit akutem ST-Streckenhebungsinfarkt konnte RIPC zur Reduktion der Infarktgröße beitragen [30-32] und führte in einer retrospektiven Analyse weiterhin zur Reduktion schwerer *postinterventioneller* kardialer und zerebraler Komplikationen und damit zu positiven Effekten auf das klinische *Outcome* [33].

Auch bei Patienten, die eine elektive perkutane transluminale Koronarangioplastie erhielten, konnte RIPC in den meisten Studien zur Infarktgrößenreduktion beitragen [34-36].

Andererseits führte RIPC in einer anderen Studie zur Vergrößerung des Infarktareals [37].

Besonders die Ergebnisse von Studien zum Effekt der RIPC vor koronaren *Bypass*-Operationen mit/ohne zusätzlicher Herzklappenchirurgie sind inhomogen [29]. Einige zeigten eine Infarktgrößenreduktion [38-41], andere keinen Effekt auf die Infarktgrößenentwicklung [42-46] und eine Studie sogar eine Zunahme der Infarktgröße, des postoperativen Bedarfs an Vasopressoren, sowie der Aufenthaltsdauer und mechanischen Ventilation auf der Intensivstation [47].

In einer großen Metaanalyse 44 klinischer Studien mit insgesamt 5317 eingeschlossenen Patienten, die sich elektiv oder notfallmäßig einem operativen bzw. interventionellen kardialen Eingriff unterzogen, konnte gezeigt werden, dass RIPC (1.) die Freisetzung kardialer Biomarker signifikant reduziert, (2.) zur signifikanten Senkung schwerwiegender kardialer und zerebrovaskulärer Ereignisse führt und somit (3.) zur Reduktion der Gesamtmortalität beiträgt [48].

Diese Metaanalyse berücksichtigte jedoch nicht zwei Phase-III-Studien, in denen kein protektiver Effekt der RIPC nachgewiesen werden konnte [42, 46].

In einer weiteren randomisiert kontrollierten Studie wurde der Effekt von RIPC auf das klinische *Outcome* von Patienten mit ST-Hebungsinfarkt und Revaskularisationstherapie untersucht. Auch hier konnte durch RIPC keine Verbesserung erzielt werden [49].

Die sehr inhomogene Studienlage bezüglich des Effekts der RIPC in klinischen Studien begründet die Tatsache, dass dieses Verfahren bisher keinen festen Einzug in den klinischen Alltag gehalten hat. Mögliche Erklärungsansätze für die widersprüchlichen Studienergebnisse bieten folgende Überlegungen:

Häufig finden sich Unterschiede im Patientenkollektiv hinsichtlich der Variablen Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und Medikation, die als Störfaktoren agieren und Einfluss auf das Ausmaß des erreichbaren kardioprotektiven Effekts nehmen können [50].

Da besonders durch die Entdeckung geschlechtsspezifischer Unterschiede bei der Entstehung eines I/R-Schadens sowie bei Präkonditionierungsinterventionen neue klinische Therapieansätze entstehen könnten, soll im Folgenden genauer hierauf eingegangen werden.

1.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede und der Einfluss von Östrogen bei der Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens

Experimentelle und klinische Beobachtungen zeigen, dass sowohl die physiologische Herzfunktion als auch die Prävalenz und die Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen maßgeblich durch das biologische Geschlecht beeinflusst werden [51].

So ist das weibliche Herz nach der Pubertät ca. 15-30 % leichter und weist eine höhere Herzfrequenz sowie einen niedrigeren systolischen und diastolischen Blutdruck auf als das männliche Herz [51], welches zudem einer deutlich höheren altersunabhängigen Apoptoserate unterliegt [52].

Männer haben im Vergleich zu gleichaltrigen prämenopausalen Frauen ein generell höheres Risiko eine KHK, Hypertension, Herzinsuffizienz sowie Herzrhythmusstörungen auszubilden [53]. Epidemiologische Studien zeigen, dass prämenopausale Frauen im Durchschnitt 10 Jahre später an einer KHK und 20 Jahre später an einem MI erkranken als Männer [53]. Andererseits steigt die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen nach der Menopause stetig an, weshalb ein Zusammenhang mit sinkenden Östrogenkonzentrationen vermutet wird [54].

Mit Hilfe von tierexperimentellen Studien konnten verschiedene potenzielle kardioprotektive Wirkmechanismen prämenopausaler Frauen identifiziert werden.

Auf zellulärer/molekularer Ebene zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Energiestoffwechsel und Kalzium-Metabolismus der Kardiomyozyten, welche letztendlich mit der kardialen Funktion zusammen hängen [55, 56].

Im Vergleich von kardialen Mitochondrien aus intakten und ovariectomierten weiblichen sowie männlichen Ratten zeigte sich, dass nur die Mitochondrien intakter weiblicher Ratten auch bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen vor einem erhöhten Kalziumeinstrom (charakteristisch für den I/R-Schaden) geschützt sind und dadurch ihr Membranpotential für ihre überlebenswichtige Energieproduktion aufrechterhalten können [57]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen erhöhter myokardialer Kontraktilität in weiblichen Myozyten die Expression von Stickstoffmonoxid-Signalkaskaden steigt, wodurch es zur S-Nitrosylierung von L-Typ Kalziumkanälen kommt. Auf diesem Wege wird wiederum einer intrazellulären Kalziumüberladung während einer I/R-Situation entgegen gewirkt [58].

Zusätzlich weisen weibliche Rattenherzen im Vergleich zu männlichen weniger Mitochondrien auf, welche jedoch effizienter arbeiten, weniger freie Radikale produzieren und somit zu einer geringeren oxidativen Schädigung führen [59, 60].

Lagranha et al. demonstrierten die Beteiligung von Östrogen an der Vermittlung eines kardioprotektiven Effekts bei prämenopausalen Ratten, indem sie zeigten, dass (1.) eine Ovariectomie zu einer Infarktgrößenzunahme nach einer I/R-Situation führt und (2.) eine Östrogensubstitution bei männlichen Ratten einen kardioprotektiven Effekt nach einer I/R-Situation bewirkt [60].

In einer *in vivo* Studie an ovariectomierten Kaninchen konnte durch die intravenöse Applikation von 17- β -Östradiol (= Östrogen) vor einer I/R-Situation eine Infarktgrößenreduktion erreicht werden und dieser kardioprotektive Effekt ließ sich in einem weiteren Experiment durch die zusätzliche Applikation des nicht-selektiven Östrogenrezeptorblockers Fulvestrant signifikant reduzieren [61].

Die Wirkmechanismen von Östrogen sind hochkomplex und trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig ergründet. Im Folgenden soll insbesondere die Wirkung von Östrogen bei der Entstehung eines I/R-Schadens beleuchtet werden.

Östrogen wirkt über nukleäre und membrangebundene Östrogenrezeptoren (*estrogen receptor* = ER) und vermittelt auf diese Weise sowohl genomische als auch nicht-genomische (akute) Zellsignale [62].

Es existieren drei ER: ER α , ER β und ein G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor (*G protein-coupled estrogen receptor* = GPER), die wiederum in unterschiedlichsten Geweben und Zellen exprimiert werden [63]. Lizotte et al. untersuchten die zelluläre Verteilung von

ER in weiblichen und männlichen Mäuseherzen und fanden interessanterweise keine wesentlichen Unterschiede [64].

ER α wird überwiegend in ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert und befindet sich im Zellkern, im Zytosol, an Plasmamembranen [64] sowie an Mitochondrien [65]. Durch die Aktivierung von ER α kommt es beispielsweise zu einer myokardialen Funktionsverbesserung nach I/R sowie zu einer Aktivitätssteigerung der protektiven ERK-1 und -2 und Suppression proapoptotischer Zellsignale durch die c-Jun N-terminale Kinase [66]. ER α vermittelt außerdem eine Infarktgrößenreduktion nach I/R und verhindert eine Aktivierung des Komplementsystems [67]. In männlichen Mäuseherzen mit fehlendem ER α (ER α -*Knockout*-Mäuse) konnte im Vergleich mit einer Kontrollgruppe nach I/R eine beeinträchtigte mitochondriale Funktion, geringere Nitrit Produktion und verstärkte Kalziumakkumulation gezeigt werden [68].

ER β wird gleichmäßig im gesamten Herzen exprimiert und befindet sich vor allem im Zytosol und Zellkern [64] sowie an Mitochondrien von Kardiomyozyten [69]. Die Aktivierung von ER β durch Östrogen bzw. einen spezifischen ER β -Agonisten vor I/R führte in isoliert perfundierten Mäuseherzen nach I/R zu einer verbesserten kardialen Funktion, zu mitochondrialem Funktionserhalt sowie zu einer reduzierten Apoptoserate [70]. Wang et al. demonstrierten, dass isoliert perfundierte weibliche Mäuseherzen eine signifikant bessere kardiale Funktion nach I/R aufweisen und zudem weniger myokardiale Entzündungsmediatoren freisetzen als männliche Herzen und dieser protektive Effekt abhängig von der Anwesenheit von ER β ist [71].

ER α und ER β regulieren die Expression unterschiedlicher Gene und können teilweise als Gegenspieler wirken, wobei der Effekt von Östrogen maßgeblich vom Verhältnis der vorhandenen Rezeptoren, sowie von der Anwesenheit von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren abhängig ist [72]. Die komplexen genomischen Effekte von Östrogen auf das kardiovaskuläre System beinhalten u.a. Veränderungen der Expression und Aktivierung von Ionenkanälen und Transportern, die wiederum die kardiale Kontraktilität, Repolarisation und Anfälligkeit für Arrhythmien beeinflussen [73].

ER α können neben dem GPER auch an Plasmamembranen lokalisiert sein [74], wo sie an der Vermittlung nicht-genomischer akuter Zellsignale beteiligt sind, die in Abhängigkeit von Östrogen zu Veränderungen von Enzymaktivitäten beitragen. Durch Bindung von Östrogen an den membrangebundenen ER α kommt es beispielsweise zur Aktivierung intrazellulärer Kinasen wie der PI3K, die wiederum die Proteinkinase B/Akt und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase aktiviert. Auf diesem Wege werden einerseits anti-

apoptotische Signalkaskaden aktiviert [75] sowie andererseits die Akkumulation von Leukozyten nach einem I/R-Schaden reduziert [76] und somit ein kardioprotektiver Effekt erzielt.

Weiterhin führt die Bindung von Östrogen an den GPER zur Aktivierung der PI3K-Signalkaskade sowie zur Aktivierung der ERK-1 und 2 [77], welche wiederum die Öffnung der mPTP nach einer I/R-Situation verhindern und zur Kardioprotektion führen [78]. Durch die Stimulation von GPER mit dem spezifischen GPER-Antagonisten G-1 vor I/R konnten zudem in männlichen und weiblichen isoliert perfundierten Rattenherzen sowohl postischämische Kontraktilitätsstörungen als auch Infarktgrößen signifikant reduziert werden [79]. Auch in dieser Studie spielte die GPER induzierte Aktivierung von PI3K eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des kardioprotektiven Effekts [79].

Luo et al. haben die östrogenvermittelten Effekte auf Kardiomyozyten zusammengefasst [80] und diese werden in Abbildung 4 dargestellt.

Östrogen wirkt nachweislich über direkte Effekte auf Kardiomyozyten und vaskuläre Endothelzellen sowie indirekt über systemische Effekte auf Stamm- und Entzündungszellen und beeinflusst dabei auf vielfältige Weise das kardiovaskuläre System und trägt maßgeblich zur Reduktion des I/R-Schadens bei prämenopausalen Frauen bei [73].

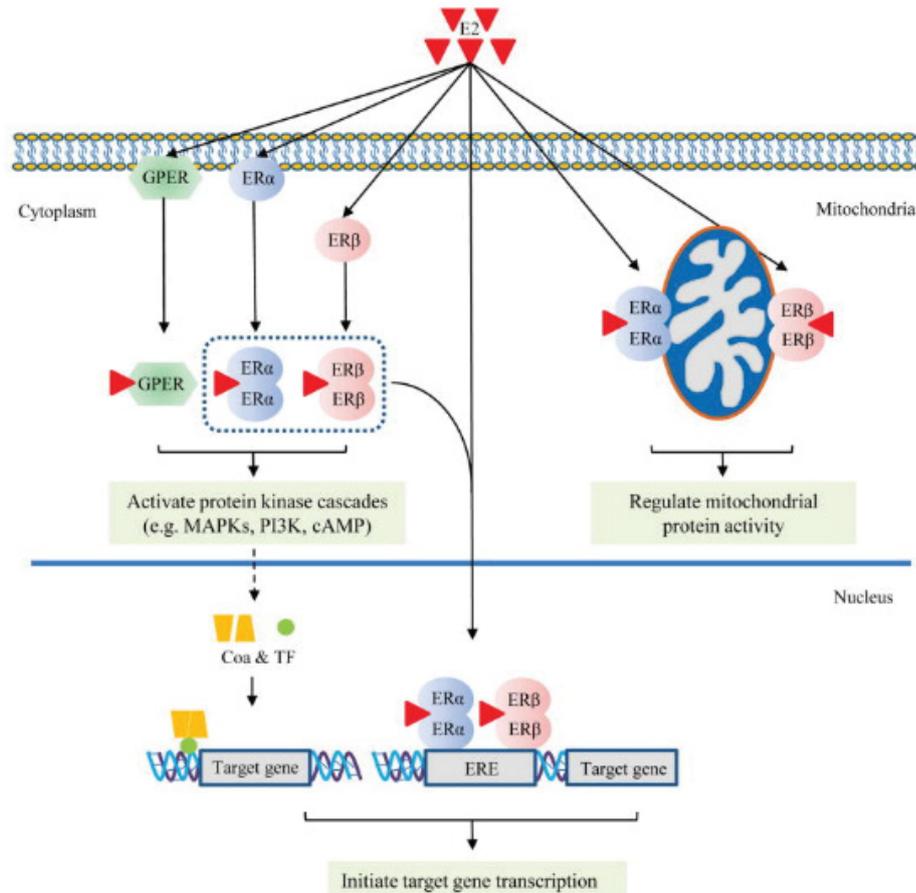


Abb. 4: Östrogenvermittelte Effekte auf Kardiomyozyten. Genomische Effekte: Östrogen (E2) aktiviert ER- (= Östrogenrezeptor) - α und - β die daraufhin an Promotorgene (ERE = *estrogen-response-element*) binden und die Zielgenentranskription initiieren (= *initiate target gene transcription*). Nicht-genomische Effekte: Östrogen bindet an ER in Membranen und im Zytoplasma (*Cytoplasm*) woraufhin verschiedene Protein Kinasen aktiviert werden (= *Activate protein kinase cascade*), welche zusätzlich die Genexpression durch Stimulation von Koaktivatoren (= *Coa*) und Transkriptionsfaktoren (= *TF*) beeinflussen. Weiterhin bindet Östrogen an ER an Mitochondrien (= *Mitochondria*) und reguliert hier die mitochondriale Funktion und Homöostase (= *Regulate mitochondrial protein activity*). GPER = G Protein-gekoppelter Rezeptor; MAPK = Mitogen aktivierte Proteinkinase; PI3K = Phosphatidylinositol 3-Kinase; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; *Nucleus* = Zellkern. Abb. Mit Erlaubnis übernommen aus [80].

1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei ischämischer (Fern-) Präkonditionierung

Die zuvor beschriebenen Erkenntnisse bezüglich eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes in der Entstehung eines I/R-Schadens legen nahe, dass auch Präkonditionierungsinterventionen durch das Geschlecht beeinflusst werden könnten.

Wever et al. untersuchten in einer großen Metaanalyse von insgesamt 503 tierexperimentellen Studien, welche Determinanten die erfolgreiche Translation der IPC bzw. RIPC in klinische Studien behindern könnten [81]. Demnach repräsentierten nur 5 % der Vergleiche zwischen IPC/RIPC und Kontrollgruppe Daten, die von weiblichen Versuchstieren stammten. Darüber hinaus enthielten 20 % der Studien keine Information bezüglich des Geschlechts der verwendeten Versuchstiere [81].

Interessanterweise unterschied sich jedoch die Effektivität von IPC/RIPC zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren, wobei das Geschlecht für 3,4 % der Inter-Studien-Varianz verantwortlich gemacht werden konnte [81].

Bisher existieren nur wenige Studien, die sich mit geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Präkonditionierungsinterventionen befassen und deshalb besteht auf diesem Gebiet dringend weiterer Forschungsbedarf.

Song et al. untersuchten in einer experimentellen Studie an isoliert perfundierten Mäuseherzen, ob das Geschlecht bzw. Östrogen einen Einfluss auf die Kardioprotektion nach IPC hat [82]. Durch IPC konnte bei männlichen Herzen sowohl eine Verbesserung der Herzfunktion als auch eine reduzierte Infarktgröße nach einer I/R-Situation erzielt werden. Weibliche Herzen wiesen stattdessen eine *per se* bessere Herzfunktion und geringere Infarktgrößen auf, die sich durch IPC nicht weiter positiv beeinflussen ließen. Eine Gonadektomie führte in weiblichen Herzen zu negativen Auswirkungen auf die Herzfunktion und die Infarktgrößenentwicklung nach einer I/R-Situation, die sich weder durch die Substitution von 17 β -Östradiol, noch durch IPC signifikant reduzieren ließen. Andererseits führte die Gonadektomie in männlichen Herzen zu einer verbesserten Herzfunktion und zu einer tendenziellen Reduktion der Infarktgrößen, jedoch konnte hier kein Effekt durch IPC festgestellt werden, und eine Östradiolsubstitution führte sogar zu einer Verschlechterung der Herzfunktion. Diese Ergebnisse zeigen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Kardioprotektion durch Präkonditionierungsinterventionen bestehen, welche teilweise mit der Wirkung von Östrogen im Zusammenhang stehen könnten [82].

Turcato et al. [83] konnten in einer weiteren experimentellen Studie an isoliert perfundierten Mäuseherzen demonstrieren, dass junge weibliche Mäuseherzen einen angeborenen/endogenen Schutz vor einem I/R-Schaden aufweisen und dass IPC diesen Schutz nicht verbessert, während dies bei jungen männlichen Herzen der Fall ist. Andererseits konnte durch IPC in älteren weiblichen und männlichen Herzen eine

signifikante Verbesserung der postischämischen Herzfunktion und eine Reduktion der Infarktgrößen erreicht werden. Dadurch zeigt sich, dass IPC, in Abhängigkeit vom Alter, auch an weiblichen Herzen protektiv wirken kann [83].

Die vorliegende Studie ist ein Teilprojekt einer größeren Studie aus der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, welche sich mit alters- und geschlechtsspezifischen Unterschieden bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach ischämischer Fernpräkonditionierung beim Menschen beschäftigt. Ein weiteres Teilprojekt wurde im Rahmen eines Promotionsvorhabens von Herrn Dr. Maximilian Dierkes durchgeführt. Hier wurden geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC bei jungen Probanden (durchschnittliches Alter 23 ± 1 Jahr) untersucht [84]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Transfer von humanem Plasma ischämisch fernpräkonditionierter Männer auf isoliert perfundierte Rattenherzen, im Vergleich zum Transfer von männlichem Kontrollplasma, nach Auslösung einer I/R-Situation zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führte. Andererseits konnte im selben Experiment durch den Transfer von Plasma ischämisch fernpräkonditionierter Frauen, im Vergleich zum Transfer von weiblichem Kontrollplasma, keine signifikante Infarktgrößenreduktion nach I/R-Situation verzeichnet werden. Interessanterweise zeigte sich aber hier, dass, unbeeinflusst von einer etwaigen RIPC, durch den Transfer von weiblichem Plasma geringere Infarktgrößen nach einer I/R-Situation erreicht wurden, auch wenn dieser Effekt nicht signifikant war ($p = 0,06$) [1, 84].

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es durch RIPC in jungen männlichen Probanden zur Freisetzung kardioprotektiver humoraler Faktoren kommt, die sich durch Plasmatransfer zwischen Spezies übertragen lassen und dass dieser Effekt der RIPC geschlechtsspezifischen Unterschieden unterliegt.

Geschlechtsspezifische Unterschiede scheinen demnach auch eine Rolle bei der Kardioprotektion durch ischämische Fernpräkonditionierungsinterventionen zu spielen und letztere werden vermutlich auch durch Östrogen beeinflusst. Um die zu Grunde liegenden Mechanismen der geschlechtsspezifischen Unterschiede bei ischämischen Fernpräkonditionierungsinterventionen besser zu verstehen und daraus mögliche Verbesserungen für kardioprotektive Strategien im klinischen Alltag ableiten zu können, sind grundlagenwissenschaftliche Studien wie die vorliegende notwendig.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum Verständnis der komplexen Wirkmechanismen der ischämischen Fernpräkonditionierung beizutragen.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus 35 Jahren Forschung auf dem Gebiet der ischämischen Präkonditionierung zeigen, dass noch viele Fragen bezüglich der Vermittlung sowie der exakten Wirkweise des kardioprotektiven Effekts durch IPC/RIPC unbeantwortet sind. Von besonderem Interesse sind hierbei die Mechanismen, die zur Entstehung geschlechtsspezifischer Unterschiede bei Präkonditionierungsinterventionen beitragen. Dabei scheint Östrogen auf nicht vollständig geklärte Weise an der Vermittlung kardioprotektiver Effekte in prämenopausalen Frauen beteiligt zu sein.

Daten der eigenen Arbeitsgruppe suggerieren, dass Plasma junger Frauen *per se* kardioprotektive Eigenschaften zu besitzen scheint und sich diese durch RIPC nicht weiter steigern lassen [1, 84]. Aufbauend auf dieser Erkenntnis war es Ziel der vorliegenden Studie zu überprüfen, ob Östrogen im Plasma junger Frauen für diese kardioprotektiven Eigenschaften verantwortlich ist und ob eine Östrogenrezeptoraktivierung einen möglichen protektiven Effekt durch RIPC maskieren könnte. Aus diesen Überlegungen ergibt sich folgende Forschungsfrage:

Welchen Effekt hat die Blockade von Östrogenrezeptoren auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine *in vivo* RIPC bei gesunden weiblichen Probandinnen durchgeführt und vor bzw. nach RIPC Blut abgenommen. Das aus den Blutproben gewonnene Plasma wurde anschließend mit bzw. ohne vorherige Applikation des nicht-selektiven Östrogenrezeptorblockers Fulvestrant auf isoliert perfundierte männliche Rattenherzen übertragen. Anschließend wurde eine I/R-Situation erzeugt und hämodynamische Variablen während der Reperfusion sowie Infarktgrößen nach Versuchsablauf bestimmt, um die kardioprotektive Potenz des Plasmas zu quantifizieren.

Geschlechtsspezifische Unterschiede bei ischämischen Präkonditionierungsinterventionen könnten wichtige Determinanten der erfolgreichen Translation der kardioprotektiven Potenz von RIPC in den klinischen Alltag darstellen. Da Östrogen für geschlechtsspezifische Unterschiede eine zentrale Rolle spielt, soll diese Studie dazu beitragen, die Bedeutung von Östrogen für die Kardioprotektion nach RIPC zu klären und auf diesem Wege zu einem

besseren Verständnis kardioprotektiver Mechanismen führen. Durch ein verbessertes Verständnis der komplexen Wirkweise der Kardioprotektion nach RIPC könnte diese kostengünstige und wenig invasive Methode zukünftig kardioprotektive Strategien im klinischen Alltag ergänzen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung des humanen Blutplasmas

Die Genehmigung für die Blutentnahme an Probanden lag gemäß des Ethikvotums vom 27.02.2013 vor (Referenznummer: 3911). Die Gewinnung der Blutproben erfolgte im Rahmen des Promotionsvorhabens von Dr. Maximilian Dierkes [84]. Für die vorliegende Studie konnten die bereits vorhandenen Plasmaproben der jungen weiblichen Probandinnen verwendet werden.

Tabelle 1 gibt Auskunft über das Alter, die Körpergröße, das Gewicht sowie den *Body-Mass-Index* (BMI = Körpergewicht in [kg] / Körpergröße in [m²]) der insgesamt 10 Studienteilnehmerinnen. Das mittlere Alter betrug 23 ± 1 Jahr, die mittlere Körpergröße lag bei $1,68 \text{ m} \pm 0,05 \text{ m}$ und das mittlere Gewicht lag bei $62 \text{ kg} \pm 7 \text{ kg}$. Der BMI betrug im Mittel $21,9 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ [1].

Tabelle 1: Liste der Studienteilnehmerinnen.

Studiennummer	Alter	Größe [m]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]
2	22	1,62	58	22,1
3	22	1,70	58	20,1
4	23	1,71	59	20,2
10	23	1,68	62	22,0
11	23	1,72	72	24,3
12	23	1,72	62	21,0
15	21	1,56	50	20,5
16	23	1,68	66	23,4
17	22	1,68	56	19,8
19	23	1,69	73	25,6

Angegeben sind Mittelwerte von Alter [Jahren], Körpergröße [m], Gewicht [kg] und BMI (Body-Mass-Index) [kg/m²]. Daten veröffentlicht in [1].

2.1.1 Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen

Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen erfolgte über Aushänge. Die Teilnahme war freiwillig und es bestand kein Abhängigkeitsverhältnis zu den Organisatoren der Studie.

Einschlusskriterien:

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

Ausschlusskriterien:

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

2.1.2 Screening und Aufklärung der Studienteilnehmerinnen

Das Screening und die körperliche Untersuchung potenzieller Studienteilnehmerinnen erfolgte durch Frau Prof. Dr. med. habil. Tanja Meyer-Treschan (zur Zeit der Studiendurchführung Fachärztin für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf). Zunächst wurden die Freiwilligen über den Inhalt und Ablauf der Studie sowie die damit verbundenen Interventionen aufgeklärt. Lag ein grundsätzliches Einverständnis zur Studienteilnahme vor, wurde eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung durchgeführt und das Vorliegen der Einschlusskriterien bzw. etwaiger Ausschlusskriterien

überprüft. Die körperliche Untersuchung bestand aus der Auskultation und Palpation von Herz, Lunge und Abdomen sowie einer Blutdruckmessung an beiden Armen. Mit einem Urin-Test (Tabelle 2) wurde abschließend das Vorliegen einer Schwangerschaft ausgeschlossen. Bestanden keine Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme, wurde das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erbeten.

2.1.3 Erklärung zum Datenschutz

Die Datenerfassung erfolgte pseudonymisiert und nur bei vorliegendem schriftlichem Einverständnis zur Studienteilnahme. Die elektronische Speicherung, Auswertung und Veröffentlichung der Daten erfolgte anonymisiert. Bei Nicht-Teilnahme wurden auch keine Daten gespeichert.

2.1.4 Ablauf der ischämischen Fernpräkonditionierung

Auch die Durchführung der RIPC sowie die Überwachung der Studienteilnehmerinnen währenddessen erfolgte durch die Studienärztin Prof. Dr. med. habil. Meyer-Treschan.

Zu Beginn wurden die Studienteilnehmerinnen erneut hinsichtlich ihres Gesundheitsstatus befragt. Wenn dieser seit dem Screening unverändert geblieben war, wurde die Intervention durchgeführt.

Zunächst wurde eine Venenverweilkanüle (24 G) in die rechte Kubitalvene gelegt, die über die Dauer des Versuchs in der Vene verblieb. Anschließend wurde über die Venenverweilkanüle 50 ml Blut in Lithium-Heparin Plasmaröhrchen (Tabelle 2) abgenommen (Kontrollblut). Die RIPC wurde am Skelettmuskel des linken Oberarms mit Hilfe einer Blutdruckmanschette erzeugt, indem diese insgesamt 3-mal für 5 Minuten auf 200 mmHg aufgepumpt wurde, gefolgt von jeweils 5 Minuten Reperfusion (Deflation der Blutdruckmanschette). Nach der ischämischen Fernpräkonditionierung wurden ebenfalls 50 ml Blut (RIPC-Blut) über die Venenverweilkanüle in Lithium-Heparin Plasmaröhrchen abgenommen. Es traten keine peri- bzw. postinterventionellen Komplikationen auf.

2.1.5 Aufbereitung der Blutproben

Die Blutproben wurden zunächst für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Das dabei gewonnene Blutplasma wurde anschließend bis zur späteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren gelagert.

2.2 Versuchstiere

Vor Beginn der Tierversuche wurde ein Übungsschein bei der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf erworben, der zur Vermittlung der notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten zum Töten von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken gedient hat. Die Genehmigung zur Durchführung dieser Studie wurde am 10.05.2012 erteilt (Projektnummer: O 27/12).

Wir verwendeten männliche Wistar-Ratten (Fa. Janvier; Laval, Frankreich) mit einem Körpergewicht zwischen 250-300 g. Die Tiere wurden am Tag der Versuchsdurchführung von der ZETT bezogen. Bis zum Beginn des Versuchs standen ihnen Wasser und Futter zur freien Verfügung.

2.3 Materialliste

Tabelle 2: Materialliste.

Chemikalien/Pharmaka	Hersteller
NaCl	Prolabo; Leuven, Belgium
KCl	Merck Eurolab GmbH; Darmstadt
MgSO ₂ + 7H ₂ O	Merck Eurolab GmbH; Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck Eurolab GmbH; Darmstadt
NaHCO ₃	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
CaCl ₂	Merck Eurolab GmbH; Darmstadt
D-Glucose	Roth; Karlsruhe
Laktat (L-Lactic acid-Na-salt)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Pentobarbital Natrium (Narcoren®) Ch.B.86073	Merial GmbH; Hallbergmoos
Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml, Ch.B.010242	Ratiopharm GmbH; Ulm
TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) Lot.:111722	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Carbogen (5 % CO ₂ ; 95 % O ₂)	Linde-AG; 82049 Pullach
Stickstoff 5.0 (N ₂)	Linde-AG; 82049 Pullach
Fulvestrant (ICI 182,780)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Schwangerschaftstest DiaView hCG; Artikel-Nr. 50150	Diagonal GmbH & Co.KG; Münster
Tygon Schlauch R 3630, Innendurchmesser: 3,2mm, Außendurchmesser: 6,4mm	Saint Gobain Performance-Plastics Verneret; Charny Frankreich
Schlauch F11794, Innendurchmesser: 3,16mm	Gilson; Villiers le Bel, Frankreich
Schlauch F117943, Innendurchmesser: 1,65mm	Gilson; Villiers le Bel, Frankreich
Lithium-Heparin Plasmaröhrchen, Vacutainer, Ref-Nr. 366567, PST II	Fa. Becton and Dickinson; New Jersey, USA
Geräte	Hersteller
Guillotine: Biological Research Applikationaratus; Modell: 7950, Serien- Nr.:045017 12070	Ugo Basile S.R.L; Gemonio VA, Italien
Zentrifuge Rotina 420R; Typ: 4706; Werk Nr.: 0010238	Hettich Zentrifugen Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen,
Minipuls 3 Peristaltik Pump ML 172	AD Instruments; Oxford, England
Wasserbad, Modell EC	Julabo; Seelbach
Wasserbad, Modell MW-6	Julabo; Seelbach
Pacer, Typ TG2/8	Ingenieurbüro für Datenverarbeitung; Berlin
Perfusor®Space, Typ 8713030	B Braun; Melsungen
Scanner CanoScan LIDE 700F	Canon; Krefeld
Computerprogramme	Hersteller
SigmaScan Pro Version 5	Systat Software GmbH; Erkrath
R (Version 3.3.2)	R Core Team; R Foundation for statistical computing, Wien, Österreich
LabChart 7, Version 7.3.7	AD Instruments Ltd.; Oxford, UK
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
SigmaPlot 13	Systat Software GmbH, Erkrath
SPSS Science Software, Version 12.0.1	SPSS Science Software GmbH; Erkrath

Chemikalien, Pharmaka, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Computerprogramme, die für die Studie verwendet wurden und im Fließtext beschrieben werden.

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Untersuchungen zum Effekt der ischämischen Präkonditionierung

Zu Beginn der Studie wurde eine Versuchsreihe zur klassischen IPC durchgeführt, die dazu diente, den bekannten Effekt der IPC an der eigenen Versuchsanlage zu reproduzieren und damit zu zeigen, dass das verwendete Modell zur Detektion von Infarktgrößenunterschieden geeignet ist. Abbildung 5 zeigt den Versuchsaufbau. In der 20-minütigen Einpendlungsphase konnte sich das Herz zunächst an die veränderten Umstände gewöhnen und einen stabilen Rhythmus aufbauen. Anschließend erfolgte die IPC durch insgesamt 3 Zyklen 3-minütiger Globalischämie, gefolgt von einer 3-minütigen Reperfusion (Präkonditionierungsphase). Auf die letzte Reperfusion folgte die 33-minütige Indexischämie und schließlich eine 60-minütige Reperfusionsphase. Auf Grund der insgesamt 18-minütigen Präkonditionierung der IPC-Gruppe vor Beginn der Ischämiephase, wurde die Einpendlungsphase der Kontrollgruppe von 20 auf 38 Minuten verlängert und somit eine identische Gesamtversuchsdauer erreicht. Die Dauer von Ischämie- und Reperfusionsphase war in allen Versuchsgruppen der IPC- und RIPC-Versuchsreihen identisch.

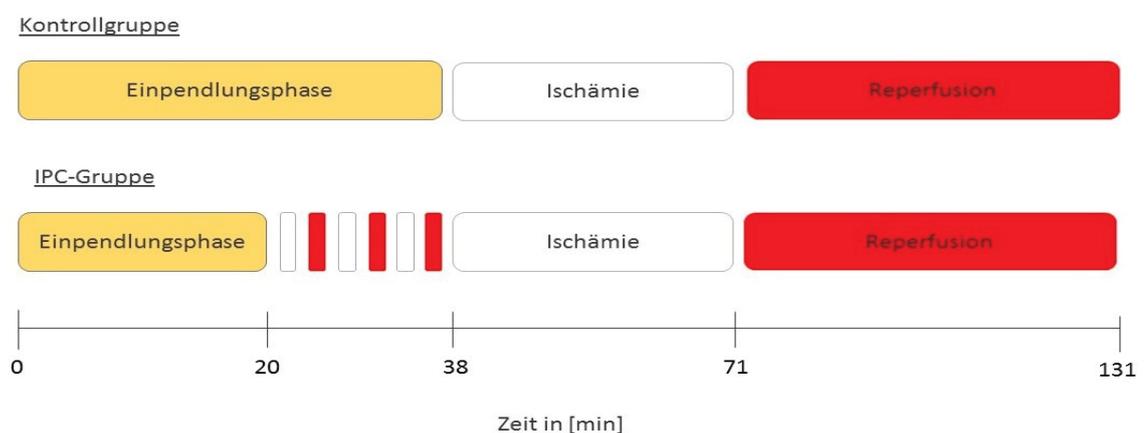


Abb. 5: Versuchsprotokoll Kontroll- vs. ischämisch präkonditionierte-Gruppe. In der Kontrollgruppe (n=6), die keine Intervention erfuhr, betrug die Länge der Einpendlungsphase 38 Minuten (= min). In der ischämisch präkonditionierten-Gruppe (n=5) betrug die Einpendlungsphase 20 Minuten. Die ischämische Präkonditionierung (IPC) bestand aus insgesamt drei Zyklen 3-minütiger Ischämie (weiße Felder) gefolgt von 3-minütiger Reperfusion (rote Felder). Die Dauer der Indexischämie (33 Minuten) sowie der Reperfusion (60 Minuten) waren ebenso wie die Gesamtdauer (131 Minuten) in beiden Versuchsgruppen identisch.

2.4.2 Untersuchungen zum Effekt der Östrogenrezeptorblockade nach ischämischer Fernpräkonditionierung

Der zentrale Teil der vorliegenden klinisch-experimentellen Studie beschäftigte sich mit der RIPC.

Ziel war es, den Effekt der Östrogenrezeptorblockade auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen zu untersuchen.

Hierfür wurde RIPC- bzw. Kontrollplasma jeweils mit Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Fulvestrant auf isoliert perfundierte Herzen übertragen, sodass sich insgesamt 4 Versuchsgruppen (jeweils n=10) ergaben. Die Auswahl des Probandenplasmas erfolgte randomisiert und verblindet. Abbildung 6 stellt den Versuchsablauf schematisch dar.

Die Versuche zum Effekt der Östrogenrezeptorblockade bei RIPC starteten ebenfalls mit einer 20-minütigen Einpendlungsphase. In der anschließenden Applikationsphase wurde zunächst DMSO bzw. Fulvestrant auf die isoliert perfundierten Herzen übertragen.

Ziel war es, eine effektive Östrogenrezeptorblockade vor Plasmaapplikation sicher zu stellen und in der Kontrollgruppe einen möglichen Effekt des Lösungsmittels DMSO zu überprüfen. Die Applikation von Fulvestrant bzw. DMSO erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten und wurde 5 Minuten vor Applikation des Plasmas begonnen. Das Plasma wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten appliziert.

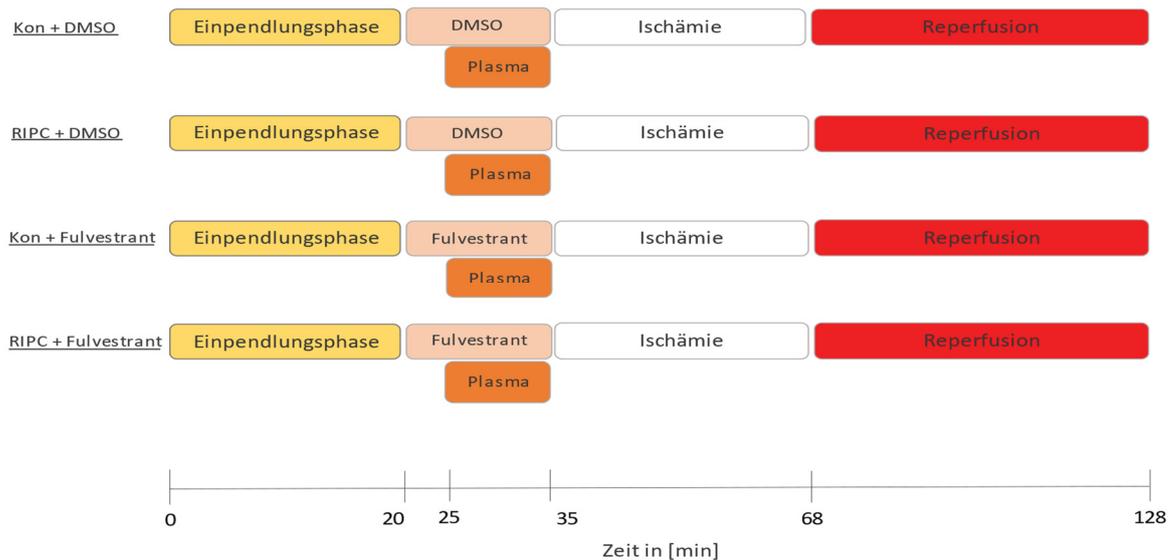


Abb. 6: Versuchsprotokoll zur Östrogenrezeptorblockade bei ischämischer Fernpräkonditionierung. Dargestellt sind die einzelnen Versuchsgruppen (jeweils n=10) und Versuchsabläufe. Nach der 20-minütigen Einpendlungsphase erfolgte zunächst die Applikation von DMSO bzw. Fulvestrant für insgesamt 15 Minuten (= min). 5 Minuten später wurde für 10 Minuten überlappend das Plasma appliziert. Es folgten eine 33-minütige Indexischämie sowie eine 60-minütige Reperfusion. Die Gesamtversuchsdauer betrug jeweils 128 Minuten. RIPC = ischämisch fernpräkonditioniertes Plasma; Kon = Kontrollplasma; DMSO = Dimethylsulfoxid.

2.4.3 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden zu Beginn des Versuchs gewogen und ihr Gewicht dokumentiert. Anschließend wurden die Tiere durch die intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital gemischt mit 1000 I.E. Heparin (Tabelle 2) anästhesiert und antikoaguliert, um Schmerzen sowie einer Blutkoagulation während der Organentnahme vorzubeugen. Sobald eine tiefe Narkose eingetreten war (fehlender Zwischenzehenreflex), erfolgte die Dekapitation mittels Guillotine (Tabelle 2). Durch eine mediane Thorakotomie wurde zunächst der Brustkorb und anschließend das Perikard eröffnet, sodass das freiliegende Herz zügig an seinem Gefäßstamm abgesetzt werden konnte. Sofort nach Entnahme wurde das Herz in ein Gefäß mit 0,9 % NaCl gegeben. Anschließend erfolgte umgehend die Aufhängung des Herzens an der Langendorff-Anlage (Abb. 7). Dafür wurde die Aorta ascendens vorsichtig über die Perfusionskanüle der Langendorff-Anlage gezogen und mit Hilfe eines doppelten chirurgischen Knotens befestigt. Im Mittel betrug die Zeit vom Absetzen der Herzen bis zum Anschluss an die Langendorff-Anlage 132 Sekunden.

2.4.4 Aufbau und Funktion der Langendorff-Anlage

Oscar Langendorff beschrieb im Jahre 1895 erstmals das Prinzip des isoliert perfundierten Herzens. Das isolierte Herz wird an der nach ihm benannten Langendorff-Anlage über eine in der Aorta positionierte Kanüle retrograd mit einem blutähnlichen Puffer perfundiert. Bei retrograder Perfusion steigt der Druck in der Aorta. Dadurch kommt es zum passiven Verschluss der Aortenklappe und zur Perfusion der Koronararterien. Das Perfusat wird anschließend über die Koronarvenen in den Koronarsinus und schließlich in den rechten Vorhof geleitet, wo es frei drainiert wird, ohne in die Herzkammern zu gelangen. Auf diese Weise kann die Vitalität des isolierten Herzens erhalten und die Herzfunktion unabhängig von Einflüssen anderer Organsysteme untersucht werden [85].

In der vorliegenden Studie wurden die Herzen retrograd über die Aorta mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert (Tabelle 3), der an jedem Versuchstag neu angesetzt wurde.

Tabelle 3: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers.

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

Die aufgelisteten Chemikalien, angegeben in Millimolar (= mM), wurden in destilliertes Wasser gegeben und mit Hilfe einer Rührplatte vermischt.

Der Puffer hatte einen konstanten pH-Wert von $7,4 \pm 0,05$ und wurde während des gesamten Versuchs mit Carbogen (5 % CO₂, 95 % O₂) begast. Er befand sich in einem auf 45 °C erwärmten Wasserbad, um den Wärmeverlust im Schlauchsystem auf dem Weg zum Herzen zu kompensieren und eine konstante Puffer-Temperatur von ca. 37 °C bei Erreichen des Herzens zu gewährleisten. Ergänzend passierte das Perfusat zwei integrierte Wärmekammern, bevor es das Herz erreichte (Abb. 7).

Über ein Schlauchsystem und eine integrierte Pumpe (Tabelle 2) wurde das Perfusat über die in der Aorta befindliche Perfusionskanüle mit einem konstanten Druck (aortaler Perfusionsdruck = *aortic pressure* = AOP) von 80 mmHg in das Herz gepumpt. Mit Hilfe von Dreiwegehähnen konnte in der Applikationsphase das humane Plasma sowie Fulvestrant und DMSO ebenfalls über die Perfusionskanüle in das Herz geleitet werden (Abb. 7). Das drainierte koronare Effluat wurde zur manuellen Messung des Koronarflusses (*coronary flow* = CF) genutzt und anschließend verworfen.

Eine um das aufgehängte Herz befindliche Wärmekammer zum Schutz vor Auskühlung, sowie die das Perfusat umgebenden Wärmekammern, wurden mit 38,5 °C warmem Wasser aus einem separaten Wasserbad durchspült.

Mit Hilfe von zwei integrierten Druckaufnehmern, die die aortale Kanüle bzw. einen im linken Ventrikel befindlichen Ballon (s.u.) mit dem Computerprogramm LabChart 7 verbanden, konnten der AOP sowie der linksventrikuläre Druck (*left ventricular pressure* = LVP) und die Herzfrequenz (*heart rate* = HR) aufgezeichnet werden (Abb. 7).

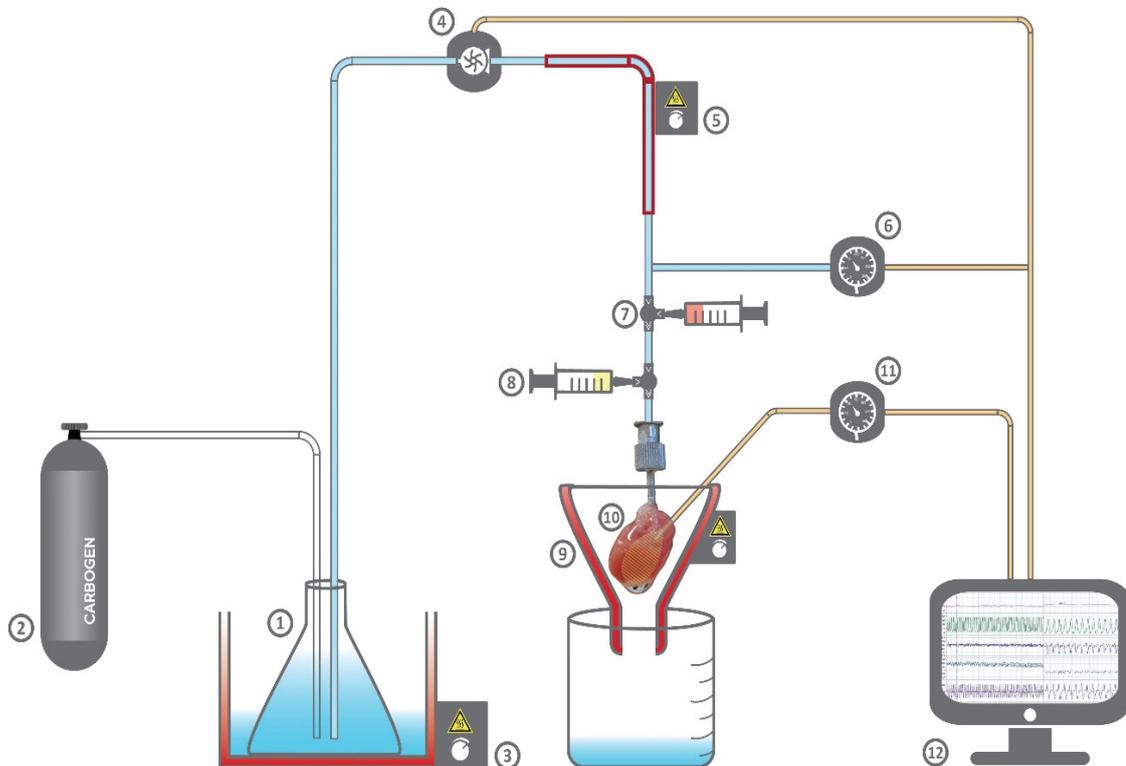


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Langendorff-Anlage: Das Perfusat (1) wurde mit Carbogen (2) begast und im beheizten Wasserbad (3) warmgehalten. Durch eine Pumpe (4) wurde das Perfusat zum Herzen befördert und durch zwei weitere Wärmekammern (5) vor dem Auskühlen geschützt. Der Perfusionsdruck (6) wurde auf 80 mmHg konstant eingestellt. Über Dreiwegehähne und Perfusoren konnte das Plasma (7) und Fulvestrant bzw. Dimethylsulfoxid (8) appliziert werden sowie die Perfusatzufuhr in der Ischämiephase unterbunden werden. Eine Wärmekammer (9) schützte das Herz vor Auskühlung. Mit Hilfe des im linken Ventrikel positionierten Ballons (10) und einem damit verbundenen Druckaufnehmer (11) konnten die hämodynamischen Parameter am Computer (12) gemessen werden.

2.4.5 Applikation des Östrogenrezeptorblockers Fulvestrant und des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid

Um zu überprüfen, ob Östrogen an der Vermittlung eines kardioprotektiven Effekts im Plasma junger Frauen beteiligt ist, wurde zunächst der Östrogenrezeptorblocker Fulvestrant

bzw. das Lösungsmittel DMSO (Kontrollgruppe) am isoliert perfundierten Herzen appliziert.

Fulvestrant (ICI 182,780; 7α -[9-(4,4,5,5,5-Pentafluoro-pentylsulphanyl)nonyl]oestra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol) ist ein synthetisch hergestelltes 7α -Alkylsulphinylanalogon des 17 β -Östradiol (Abb. 8). Fulvestrant bindet kompetitiv und mit hoher Affinität an ER α und ER β . Die entstehenden Fulvestrant-ER-Komplexe sind transkriptionell inaktiv und instabil, wodurch es zum Zerfall von ER-Proteinen kommt, der wiederum in einer ER-Rezeptor-Herabregulation resultiert. Auf diesem Wege verhindert Fulvestrant effektiv die östrogenvermittelte Wirkung auf ER und wird deshalb als selektiver Östrogenrezeptor-Herunterregulator bezeichnet [86, 87].

In einer Studie von Filice et al. konnte gezeigt werden, dass die Applikation von 100 nM Fulvestrant zu einer effektiven Östrogenrezeptorblockade in isoliert perfundierten Rattenherzen führt [88]. Konträr zu dem rein antagonistischen Effekt auf ER konnte später ein agonistischer Effekt von Fulvestrant am GPER gezeigt werden [77, 89].

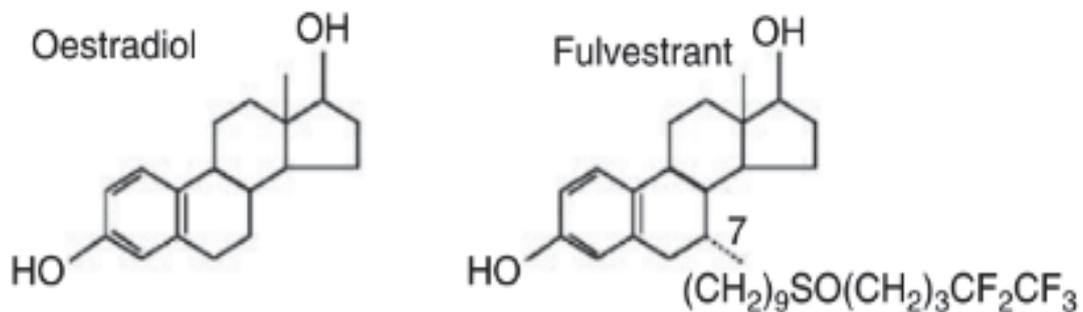


Abb. 8: Strukturformeln von Östrogen und Fulvestrant. Fulvestrant trägt im Vergleich zu Östrogen eine Alkylsulphanyl-Kette an der Position 7α . Oestradiol = 17 β -Östradiol = Östrogen. Abb. modifiziert nach [86].

Mit Hilfe des organischen Lösungsmittels DMSO wurde zunächst eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mM Fulvestrant hergestellt.

Die Stocklösung wurde 1:50 mit 0,9 % NaCl verdünnt, sodass die entstandene Lösung 20 μ M Fulvestrant enthielt. Diese wurde in eine Perfusorspritze übertragen, anschließend in eine Infusionspumpe (Tabelle 2) eingespannt und über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn mit der Perfusionskanüle der Langendorff-Anlage verbunden (Abb. 7).

Um eine Zielkonzentration von 100 nM Fulvestrant in den isoliert perfundierten Herzen zu erreichen, wurde über folgende Formel die einzustellende Laufrate an der Infusionspumpe berechnet:

$$\frac{\text{aktueller CF [ml]}}{200} \times 60 = \text{Laufrate Fulvestrant bzw. DMSO Applikation [ml/min]}$$

Um einen möglichen Effekt von DMSO auf die Versuchsreihe zu detektieren, wurde in den Kontrollgruppen DMSO anstelle von Fulvestrant appliziert. Dafür wurden 0,1 ml DMSO mit 4,9 ml NaCl (1:50) verdünnt und in eine Perfusorspritze (Tabelle 2) übertragen. Die Verbindung mit der Langendorff-Anlage sowie die Berechnung der Laufrate an der Infusionspumpe erfolgte analog zur Applikation von Fulvestrant.

Die Applikation von Fulvestrant bzw. DMSO erfolgte im Anschluss an die Einpendlungsphase für insgesamt 15 Minuten, wobei während der letzten 10 Minuten überlappend das Probandenplasma appliziert wurde (vgl. Abb. 6).

2.4.6 Übertragung des humanen Plasmas auf das Rattenherz

Das eingefrorene Plasma wurde vor der Applikation im 45 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend erfolgte die Übertragung in eine Perfusor-Spritze, welche über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn analog zur Applikation von Fulvestrant bzw. DMSO an die Perfusionskanüle der Langendorff-Anlage angeschlossen und in eine Infusionspumpe eingespannt wurde (Abb. 7). Nach der Messung des aktuellen CF wurde die angestrebte Flussrate von 0,5 % des CF an der Infusionspumpe eingestellt und das Plasma über 10 Minuten appliziert.

2.4.7 Induktion der Globalischämie

Mit Hilfe eines Dreiwegehahns wurde der Perfusatzufluss zum Herzen unterbrochen und damit eine globale Ischämie des Herzens induziert. Um eine Diffusion von Sauerstoff aus der Umgebungsluft in das ischämische Herz zu verhindern, wurde die das Herz umgebende Wärmekammer während der Ischämie mit Perfusat aus einem separaten Behälter aufgefüllt.

Dieses Perfusat war zuvor bereits für mindestens 20 Minuten mit Stickstoff begast und im Wärmebad erwärmt worden. Zusätzlich wurde Stickstoff während der Ischämie in die Wärmekammer eingeleitet.

Über die Wiederherstellung der Perfusatzufuhr und die Entleerung der mit Stickstoff begasten Wärmekammer wurde die Organischämie aufgehoben und die Reperfusion eingeleitet.

War 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion keine rhythmische Herzaktion zu verzeichnen, wurde das Herz mittels eines *Pacers* mit 28 Volt defibrilliert (Pulsbreite 2 ms; Pulspause 200 ms). Dieser Vorgang wurde bei Bedarf alle 3 Minuten 3-mal wiederholt, bis eine regelmäßige Herzaktion zu verzeichnen war. Trat Kammerflimmern während der Reperfusion auf, wurde 3-mal im Abstand von 3 Sekunden defibrilliert.

Herzen, die während der Reperfusion keinen stabilen Rhythmus über mindestens 10 Minuten aufbauen konnten, wurden in der anschließenden Auswertung ausgeschlossen.

2.4.8 Überwachung der Herzfunktion

Während der gesamten Laufzeit eines Versuchs wurden die hämodynamischen Variablen kontinuierlich überwacht und mit dem Programm *LabChart 7 Reader* aufgezeichnet, sodass im Anschluss die Auswertung zu definierten Zeitpunkten erfolgen konnte:

1. 5 Minuten vor Ende der Einpendlungsphase
2. Kurz vor Ende der Applikationsphase
3. In Minute 15, 30 und 60 der Reperfusionsphase

Der CF wurde während der Einpendlungs- und Reperfusionsphase manuell bestimmt, indem das aus dem rechten Vorhof drainierte Perfusat über einen bestimmten Zeitraum in einem Messzylinder aufgefangen wurde (Angabe in ml/min). Mit Hilfe des CF wurden die Laufraten von Fulvestrant, DMSO und humanem Plasma in der Applikationsphase bestimmt (s.o.).

Zu Beginn des Versuchs wurde über eine Inzisur im linken Herzohr ein Ballon in den linken Ventrikel eingeführt, der zur Messung der HR sowie der kontraktilen Funktion des linken Ventrikels diente. Dieser Ballon wurde nach Positionierung über einen Dreiwegehahn luftblasenfrei mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt. Über einen mit dem Ballon und dem o.g. Computerprogramm verbundenen Druckaufnehmer konnten anschließend

Druckschwankungen im linken Ventrikel gemessen werden (s. Abb. 7). Bei Versuchsbeginn erfolgte zunächst über die manuelle Füllung des Ballons die Einstellung des enddiastolischen Druckes im linken Ventrikel (minimaler linksventrikulärer Druck = LVPmin.). Ziel war ein LVPmin zwischen 3-8 mmHg.

Durch die Aufzeichnung des LVPmin sowie des LVPmax (= maximaler linksventrikulärer Druck) im Verlauf des Versuchs konnte über folgende Formel

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

der linksventrikulär entwickelte Druck (*left ventricular developed pressure* = LVDP) als Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels berechnet werden. LVPmax und LVPmin wurden bei der Auswertung durch das Computerprogramm als Durchschnittswerte im gewählten Zeitraum ermittelt.

Das Programm berechnete weiterhin die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit dp/dt_{max} sowie die maximale Relaxationsgeschwindigkeit dp/dt_{min} des linken Ventrikels, die ebenfalls zur Evaluation der kontraktilen Funktion des Herzens dienen.

Um die Arbeitsleistung des Herzens zu ermitteln, wurde das *Rate Pressure Product* (RPP) mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$RPP = LVDP * HR$$

2.8 Ermittlung der Infarktgrößen

Nach Ablauf des Versuchsprotokolls wurden die Herzen an der Herzbasis abgeschnitten und bei -20 °C eingefroren. Zur Ermittlung der Infarktgrößen wurden die gefrorenen Herzen in 1-2 mm dünne Scheiben geschnitten und anschließend mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC-Lösung), bestehend aus 0,75 g TTC gelöst in 1,41 g Sigma 7-9 Puffer und 100 ml NaCl 0,9 %, inkubiert (Tabelle 2).

Die Inkubation der Herzscheiben mit der TTC-Lösung erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C. Die TTC-Färbung ist eine biologische Färbung, mit dessen Hilfe eine makroskopische Abgrenzung von Infarktarealen ermöglicht wird. TTC ist ein Redox-Farbstoff, der die

Zellmembran durchdringt. Durch die Bindung an intrazelluläre Dehydrogenasen vitaler Zellen wird das farblose TTC zu 1,3,5-Triphenylformazan (Formazan) reduziert, welches der vitalen Zelle eine charakteristische Rotfärbung verleiht. In infarzierten Zellen kommt es durch platzende sarkolemmale Membranen zur Auswaschung von Enzymen und dabei zum Verlust des Reduktionspotentials, wodurch diese Zellen sich anhand ihrer fehlenden Anfärbbarkeit abgrenzen lassen.

Die Fixierung der Färbung erfolgte anschließend durch 4-stündige Inkubation bei 20 °C in 4%iger Formaldehyd-Lösung.

Die gefärbten Herzscheiben wurden eingescannt (Abb. 9). Das Ausmaß der Infarktgröße (*infarct size* = IS) wurde planimetrisch mit Hilfe des Programms SigmaScan Pro 5 (Tabelle 2) als Verhältnis von vitalem zu infarziertem Gewebe gemessen und in Prozent des Risikogebiets (*area at risk* = AAR) berechnet. Die AAR bezeichnet in dieser Studie die gesamte Fläche des linken Ventrikels.



Abb. 9: TTC-Färbung eines geschnittenen Herzens. Die rot gefärbten Anteile markieren vitales Gewebe. Infarziertes Gewebe lässt sich nicht anfärben und erscheint blass. Die Herzscheiben wurden vom Apex (links) bis zur Basis (rechts) angeordnet.

Die Auswertung der Infarktgrößen erfolgte verblindet. Nach der Ermittlung der Infarktgrößen wurden die Herzscheiben für mindestens eine Woche getrocknet und anschließend gewogen, um das Herzgewicht zu bestimmen.

2.9 Statistische Grundlagen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch Frau Dr. Friederike Behmenburg im Rahmen der Publikation „*The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*“ [1].

Zu Beginn der Versuchsreihen unserer Forschungsgruppe wurde mit dem Programm SigmaPlot 13 (Tabelle 2) eine Gruppengröße von mindestens $n=10$ berechnet, um eine Differenz von 15 % in der Infarktgröße feststellen zu können (Power 0,8; erwartete Standardabweichung 0,08; $\alpha < 0.05$). Mit Hilfe des Programms R (Version 3.3.2, Tabelle 2) wurden die Infarktgrößen verglichen. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (*analysis of variance* = ANOVA) und anschließendem Tukey's post hoc Test berechnet.

Die Auswertung der hämodynamischen Parameter erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 6 (Tabelle 2) zu definierten Zeitpunkten des Versuchsablaufs. Behandlungs- und zeitabhängige Effekte wurden mit Hilfe der zweifaktoriellen ANOVA berechnet.

Bei signifikanten Unterschieden wurden die Werte der einzelnen Gruppen zu den bestimmten Zeitpunkten mit Hilfe der ANOVA verglichen und anschließend mit Dunett's post-hoc-Test mit der jeweiligen Kontrollgruppe als Referenzgruppe verglichen.

Zeitliche Effekte innerhalb einer Versuchsgruppe wurden durch wiederholte ANOVA und anschließendem zweiseitigem Dunett post-hoc-Test mit dem jeweiligen Wert in der Einpendlungsphase als Referenzwert verglichen.

Als Signifikanzniveau wurde jeweils $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Kardioprotektion durch Ischämische Präkonditionierung

Zur Testung der Kardioprotektion durch IPC wurden in der IPC-Gruppe n=5 und in der Kontroll-Gruppe n=6 Herzen untersucht. Das mittlere Tier- und Herzgewicht der Versuchsgruppen ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 4: Körper- und Herzgewicht von ischämisch präkonditionierter- und Kontroll-Gruppe.

Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Herzgewicht [g]
IPC-Gruppe	269 ± 11	0,144 ± 0,15
Kontroll-Gruppe	274 ± 17	0,136 ± 0,011

Herzgewicht = Trockengewicht. IPC = ischämische Präkonditionierung. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Beim Vergleich der Infarktgrößen in Prozent der AAR der IPC-Gruppe (24 ± 6 %) mit der Kontroll-Gruppe (45 ± 2 %) zeigte sich ein signifikanter Unterschied (*p < 0,05) im Sinne einer Infarktgrößenreduktion (vgl. Abb. 10).

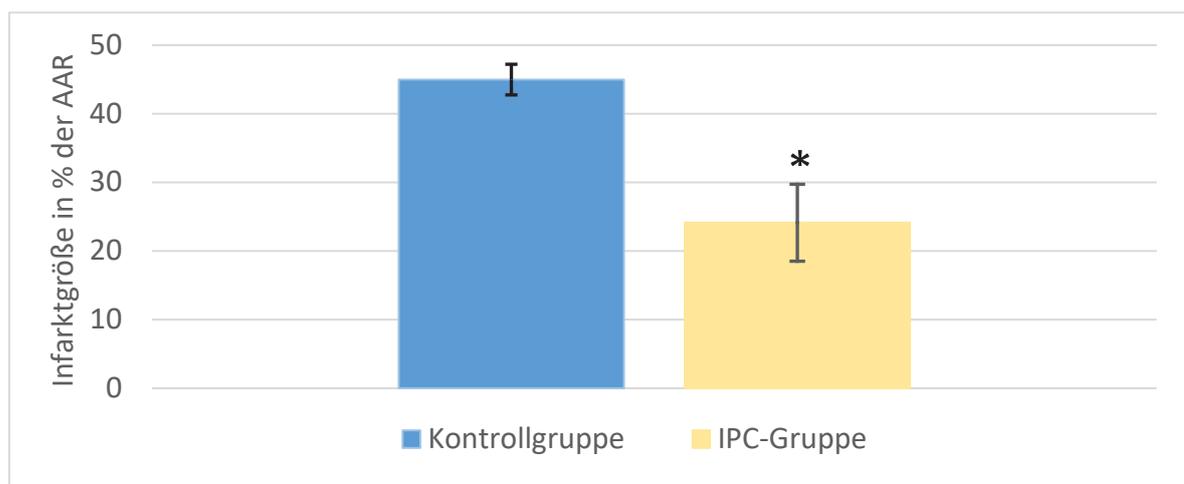


Abb. 5: Infarktgrößen der ischämisch präkonditionierten- und Kontroll-Gruppe. Dargestellt sind die Infarktgrößen im Vergleich. IPC = ischämische Präkonditionierung. AAR = *area at risk* = Fläche des linken Ventrikels. Durch IPC kommt es zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion (*p < 0,05).

3.2 Effekt der Östrogenrezeptorblockade auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen

In der Versuchsreihe zur ischämischen Fernpräkonditionierung wurden insgesamt 40 Herzen untersucht, die sich in 4 Gruppen mit jeweils n=10 unterteilen lassen. Auch hier wurden das mittlere Körper- und Herzgewicht verglichen (s. Tabelle 5). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 5: Körper- und Herzgewicht von ischämisch fernpräkonditionierter- und Kontroll-Gruppe im Vergleich.

Versuchsgruppe	Körpergewicht [g]	Herzgewicht [g]
Kon. + DMSO	271 ± 19	0,152 ± 0,013
RIPC + DMSO	261 ± 19	0,143 ± 0,007
Kon. + Fulvestrant	274 ± 18	0,153 ± 0,015
RIPC + Fulvestrant	260 ± 15	0,146 ± 0,006

Kon. = Kontrollgruppe; RIPC = ischämisch fernpräkonditionierte Gruppe; DMSO = Dimethylsulfoxid; Herzgewicht = Trockengewicht; angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

3.2.1 Infarktgrößenvergleich nach Applikation von ischämisch fernpräkonditioniertem Plasma mit und ohne Fulvestrant

Der Vergleich der Infarktgrößen in Prozent der AAR in den einzelnen Versuchsgruppen ergab insgesamt keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abb. 11). In der Gruppe, in der Kontrollplasma + DMSO appliziert wurde, betrug die Infarktgröße 31 ± 9 %. Diese war identisch mit der Infarktgröße der Gruppe Kontrollplasma + Fulvestrant (31 ± 9%). In der RIPC-Gruppe + DMSO betrug die Infarktgröße 33 ± 9 %. In der RIPC-Gruppe + Fulvestrant ergab sich eine Infarktgröße von 34 ± 9 %. Fulvestrant hat im Vergleich mit der Kontroll- und RIPC-Gruppe + DMSO die Infarktgröße nicht beeinflusst. DMSO hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Daten veröffentlicht in [1].

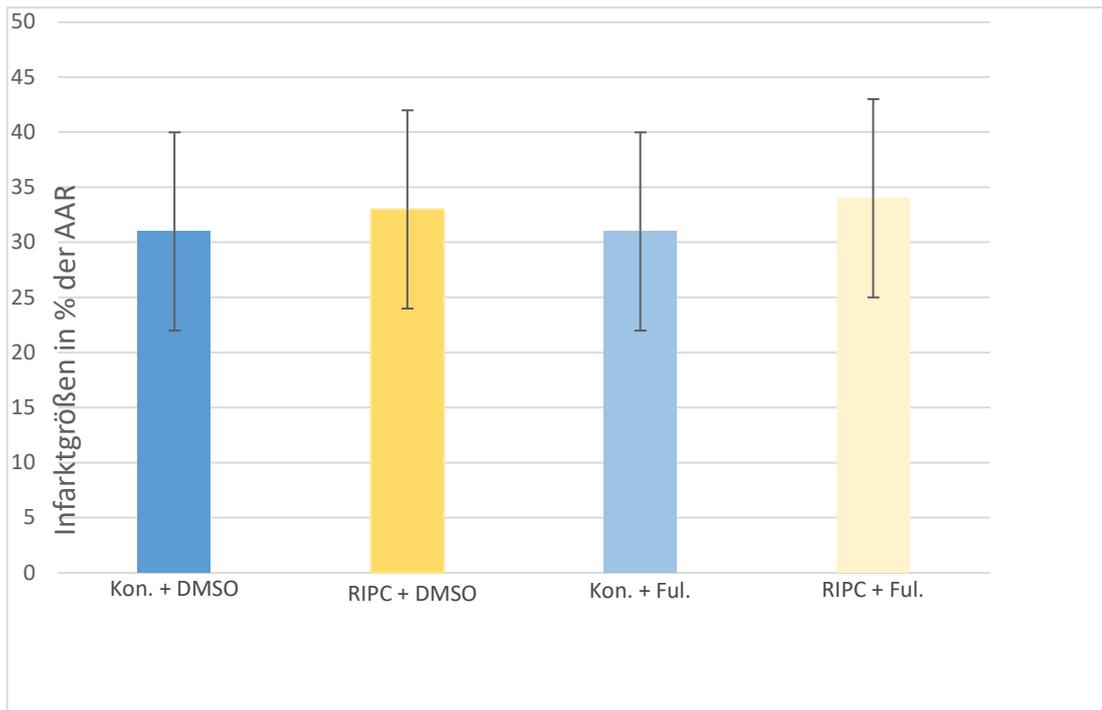


Abb. 11: Infarktgrößen der Versuchsreihe zur ischämischen Fernpräkonditionierung mit und ohne Fulvestrant. Dargestellt sind die Infarktgrößen der einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich. Kon. = Kontrollgruppe; RIPC = ischämisch fernpräkonditionierte Gruppe; DMSO = Dimethylsulfoxid; Ful. = Fulvestrant; AAR = *area at risk* = Fläche des linken Ventrikels; angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.2.2. Vergleich der hämodynamischen Variablen

In Tabelle 6 sind die wichtigsten hämodynamischen Variablen der einzelnen Versuchsgruppen zusammengefasst. Die Messung erfolgte zu definierten Zeitpunkten:

1. 5 Minuten vor Ende der Einpendlungsphase
2. Kurz vor Ende der Applikationsphase
3. Während der 30. und 60. Minute der Reperfusionphase

Um zu ermitteln, ob ein signifikanter Unterschied vorlag, erfolgte innerhalb einer Versuchsgruppe stets der Vergleich über die Zeit mit dem jeweiligen Ausgangswert in der Einpendlungsphase. Zusätzlich wurden die ermittelten Variablen zwischen den 4 Versuchsgruppen zu den gewählten Zeitpunkten verglichen.

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten der Herzfrequenz, des Koronarflusses und der linksventrikulär entwickelten Kraft der einzelnen Versuchsgruppen. Die HR unterschied sich zu keinem angegebenen Zeitpunkt signifikant. Der CF ist in diesem Versuchsaufbau ein Maß für den Gefäßwiderstand der Koronararterien. Der CF reduzierte sich signifikant in der Applikationsphase der Kontrollgruppe + DMSO um 24 % (*p <0,05) bzw. in der Kontrollgruppe + Fulvestrant um 23 % (*p <0,05). Während der Applikationsphase der RIPC-Gruppen kam es hingegen nicht zu einer signifikanten Veränderung des CF. In der Reperfusionphase reduzierte sich der CF in allen Versuchsgruppen signifikant (*p <0,05).

Der LVDP ist ein Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels. Bereits die Applikation des humanen Plasmas reduzierte den LVDP signifikant (*p <0,05) in allen Gruppen um 14 – 21 %. In der Reperfusionphase ließ die Kontraktionskraft in allen Gruppen ebenfalls signifikant nach und erreichte nur noch 14 – 22 % des Ausgangswertes.

Tabelle 6: Hämodynamische Variablen der Versuchsgruppen im Vergleich.

Versuchsgruppe		Einpendlungsphase	Applikationsphase	Reperfusionphase	
				30. Min	60. Min.
HR [bpm]	Kon. + DMSO	332 ± 48	322 ± 29	349 ± 64	303 ± 112
	RIPC + DMSO	343 ± 37	348 ± 35	313 ± 55	310 ± 35
	Kon. + Ful.	343 ± 33	321 ± 37	293 ± 41	285 ± 38
	RIPC + Ful.	311 ± 56	307 ± 44	263 ± 67	260 ± 35
CF [ml/min]	Kon. + DMSO	17 ± 3	13 ± 4*	11 ± 5*	11 ± 6*
	RIPC + DMSO	16 ± 4	13 ± 3	13 ± 5*	12 ± 4*
	Kon. + Ful.	18 ± 4	14 ± 4*	13 ± 5*	9 ± 2*
	RIPC + Ful.	16 ± 4	14 ± 4	11 ± 4*	10 ± 4*
LVDP [mmHg]	Kon. + DMSO	140 ± 26	111 ± 21*	23 ± 10*	28 ± 10*
	RIPC + DMSO	137 ± 23	110 ± 22*	20 ± 13*	25 ± 7*
	Kon. + Ful.	134 ± 15	115 ± 13*	20 ± 10*	26 ± 11*
	RIPC + Ful.	130 ± 23	113 ± 18*	20 ± 8*	25 ± 7*

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung bei n=10 pro Gruppe zu bestimmten Zeitpunkten des Versuchsablaufs. Die einzelnen Parameter wurden in der Einpendlungsphase, kurz vor Ende der Applikationsphase, sowie in der 30. und 60. Minute der Reperfusion bestimmt. Signifikanzen sind dargestellt als *p <0,05 verglichen mit dem Ausgangswert in der Einpendlungsphase. HR = *Heart Rate [bpm]* = Herzfrequenz (Schläge/Minute); CF = Koronarfluss; LVDP = Druckentwicklung des linken Ventrikels; Kon. = Kontrollplasma; DMSO = Dimethylsulfoxid; RIPC = Plasma nach ischämischer Fernpräkonditionierung; Ful. = Fulvestrant. Daten veröffentlicht in [1].

4. Diskussion

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, zum Verständnis der komplexen Wirkmechanismen der ischämischen Fernpräkonditionierung beizutragen.

In einer vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde untersucht, ob es nach RIPC im Plasma junger weiblicher und männlicher Probanden zur Freisetzung eines humoralen Faktors kommt und ob durch Plasmatransfer auf isoliert perfundierte Rattenherzen ein kardioprotektiver Effekt nach I/R erreicht werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPC gibt. RIPC-Plasma junger Männer konnte einen signifikant kardioprotektiven Effekt im ischämischen Rattenherz bewirken, während Kontrollplasma junger Frauen *per se* kardioprotektive Eigenschaften aufwies, welche sich durch RIPC nicht weiter steigern ließen [1, 84].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir in der vorliegenden Studie, ob die Blockade von Östrogenrezeptoren einen Einfluss auf die kardioprotektive Potenz im Plasma junger Frauen hat. Die Blockade von Östrogenrezeptoren durch den nicht-selektiven Östrogenrezeptorblocker Fulvestrant vor Applikation von weiblichem Kontroll- und RIPC-Plasma hatte keinen Einfluss auf die Infarktgrößenentwicklung nach I/R im isoliert perfundierten Rattenherz.

4.1. Diskussion der Methodik

Die vorliegende Studie ist eine translationale Studie. Durch die Übertragung von Plasma ischämisch fernpräkonditionierter Probandinnen auf isoliert perfundierte Rattenherzen kann ein potenziell kardioprotektiver Effekt durch RIPC *in vitro* unter standardisierten Bedingungen untersucht werden. Zahlreiche Studien demonstrierten bereits zuvor, dass durch RIPC kardioprotektive humorale Faktoren freigesetzt werden, die sich durch Plasmatransfer interindividuell übertragen lassen [21, 22, 84, 90]. Dies deutet daraufhin, dass die Übertragung von RIPC-Plasma auf isoliert perfundierte Herzen einer anderen Spezies ein hilfreiches und praktikables Vorgehen ist, welches zur Grundlagenforschung geeignet ist.

4.1.1 Das isoliert perfundierte Herz nach Oskar Langendorff

Das Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Oskar Langendorff erlaubt uns bis heute das Herz unabhängig von systemischen, exokrinen und neurogenen Einflüssen zu untersuchen [85]. Da wir in der vorliegenden Studie den Fokus auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach RIPG gerichtet haben, war der Ausschluss systemischer, exokriner und neurogener Einflüsse essenziell und somit das Langendorff-Modell besonders geeignet.

Zusätzliche Vorteile des Langendorff-Modells sind der einfache Aufbau, geringe Kosten und eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [85]. Das Modell ermöglicht uns, Untersuchungen am Herzen durchzuführen, die *in vivo* tödlich verlaufen könnten. Andererseits führt man auch im Langendorff-Modell Untersuchungen an einem sterbenden Organ durch [85]. So zeigten Sutherland et al., dass das Herz stündlich 5-10 % seiner kontraktilen und chronotropen Funktion einbüßt [91]. Da in unserer Studie die Gesamtversuchsdauer 128 Minuten betrug, ist ein kardialer Funktionsverlust von ca. 10 bis 20 % über die Gesamtversuchsdauer zu erwarten. Durch die Festlegung einer möglichst kurzen Gesamtversuchsdauer wurde dieser Einfluss begrenzt und kann insgesamt als gering betrachtet werden.

Die Präparation und Isolation des Herzens muss vorsichtig und standardisiert durchgeführt werden, damit reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden und das sensible Organ nicht beschädigt wird [85]. Die Zeit zwischen der Präparation und der erfolgreichen Aufhängung und Perfusion des Herzens an der Langendorff-Anlage sollte weniger als 5 Minuten betragen, um einen präkonditionierenden Effekt auszuschließen [92]. Durch ein standardisiertes Vorgehen betrug die mittlere Dekapitations-Perfusionszeit in unserer Studie 132 Sekunden. Somit kann ein zusätzlich präkonditionierender Effekt vor Versuchsbeginn mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden.

Um deletäre Luftembolien zu vermeiden, wurde das Herz nach der Präparation in einen Behälter mit NaCl gegeben und die Perfusionskanüle, sowie alle zuleitenden Wege, vor Versuchsbeginn entlüftet. Zusätzlich erfolgte die Aufhängung des Herzens an der bereits tropfenden Perfusionskanüle.

Der Erhalt einer konstanten, physiologischen Temperatur des isoliert perfundierten Herzens ist essenziell, um die Herzfunktion aufrecht zu erhalten [91] und präkonditionierende Effekte durch Hypo- [93] bzw. Hyperthermie [94] auszuschließen. Dies wurde in der vorliegenden Studie durch konstante Erwärmung des Puffers und zusätzliche Wärmekammern ermöglicht, wodurch sich Wärmeverlust bei der Förderung des Puffers zum Herzen sowie

Wärmestrahlung des Herzens reduzieren ließen und eine konstante Temperatur von 37 -38°C in diesem sichergestellt wurde.

Bell et al. konstatieren, dass eine globale Ischämie zwischen 30 - 35 Minuten ideal ist, um Infarktgrößenveränderungen durch Präkonditionierungsinterventionen detektieren zu können [85]. Die von uns gewählte globale Ischämiedauer von 33 Minuten befand sich somit in diesem Rahmen.

Auch ist die Dauer der Reperfusion entscheidend, da, wie einleitend beschrieben, die Reperfusion die finale Infarktgröße erheblich beeinflusst [4]. Ist die Reperusionsphase zu kurz, kann sich dies auf die Infarktgröße auswirken und die Ergebnisse verfälschen [85]. Demnach würde bei zu kurzer Reperusionszeit die Infarktgröße geringer ausfallen, da der Reperfusionsschaden sich nicht vollständig ausbilden könnte. Bei isoliert perfundierten Rattenherzen hat sich eine Reperusionszeit von 60 Minuten als ausreichend lang erwiesen, um maximale Infarktgrößen mittels TTC-Färbung zu detektieren [95]. Diese Reperusionszeit wurde in unserem Versuchsaufbau genau eingehalten.

Das Langendorff-Modell ist ein etabliertes Modell der Grundlagenforschung zu Präkonditionierungsinterventionen und I/R-Schäden und liefert bei Einhaltung der oben genannten Bedingungen valide, reproduzierbare Ergebnisse. Da geschlechtsspezifische Unterschiede bei RIPIC bisher kaum untersucht wurden, bilden *in vitro* Grundlagenstudien wie die vorliegende die notwendige Basis für erste Erkenntnisse auf diesem komplexen Gebiet.

4.1.2 Studiendesign

Nach der Entdeckung geschlechtsspezifischer Unterschiede bei der Kardioprotektion nach RIPIC im Plasma junger Menschen in der eigenen Arbeitsgruppe [1, 84], entstand die Idee, einen möglichen Zusammenhang mit Östrogen zu untersuchen.

Für die vorliegende Studie bedeutete dies, dass die benötigten Blutproben der jungen Probandinnen bereits vorhanden waren und keine neuen Probandinnen rekrutiert werden mussten. Dies ist einerseits ressourcenschonend, hat andererseits aber auch Nachteile. So war zum Zeitpunkt der Blutabnahme nicht von Interesse, in welchem Zeitpunkt des Menstruationszyklus sich die Probandinnen befanden.

Da allgemein bekannt ist, dass der weibliche Zyklus aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener hormoneller Regelkreise besteht und Östrogen dabei eine essenzielle Rolle

spielt, wäre es für unsere Fragestellung von Interesse gewesen den genauen Zeitpunkt des Zyklus zu kennen. Da weiterhin allgemein bekannt ist, dass der weibliche Zyklus, und damit auch die Östrogenkonzentrationen im Blut prämenopausaler Frauen, durch die Einnahme von hormonellen Verhütungsmitteln beeinflusst werden, wäre auch die Kenntnis über eine eventuelle Einnahme solcher Präparate von Interesse gewesen. Die Einnahme hormoneller Verhütungsmittel war jedoch zum Zeitpunkt der Rekrutierung der Probandinnen kein Ausschlusskriterium und wurde deshalb auch nicht abgefragt.

In einer Studie von Hamelin et al. konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass der Zeitpunkt des weiblichen Zyklus eine zentrale Rolle für die Entstehung von akuten myokardialen Ischämien bzw. Infarkten spielt. In dieser Studie traten myokardiale Ischämien und Infarkte signifikant häufiger innerhalb der ersten 6 Tage nach der Menstruation auf [96] und dieser Zeitraum ist wiederum mit vergleichsweise niedrigen Östrogenkonzentrationen im Blut assoziiert [97].

Es lässt sich zusammenfassen, dass ein Schwachpunkt der vorliegenden Studie darin besteht, dass zum Zeitpunkt der Blutabnahme der aktuelle hormonelle Zyklus der Probandinnen, sowie diesen eventuell beeinflussende Faktoren, nicht bekannt waren.

Daher untersuchten wir im Nachhinein die Östrogenkonzentrationen im Plasma der jungen weiblichen Probandinnen und verglichen diese zudem mit den Östrogenkonzentrationen im Plasma junger männlicher Probanden. Die Plasmaproben stammten hierbei, wie auch die der vorliegenden Studie, aus dem gemeinsamen Projekt zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede nach RIPC [1, 84]. Verglichen wurden die Östrogenkonzentrationen im Plasma von weiblichem und männlichem Kontroll- bzw. RIPC-Plasma (s. Tabelle 7).

Es ergaben sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede der Östrogenkonzentrationen, weder im Kontroll- noch im RIPC-Plasma. Auch wenn dieses Ergebnis überraschend war, hat es auf Grund der fehlenden Informationen zu Zyklusphase und Einnahme hormoneller Verhütungsmethoden nur eine geringe Aussagekraft. Anhand der hohen Standardabweichungen in den untersuchten weiblichen Blutproben wird insbesondere ersichtlich, welchen Schwankungen die Östrogenkonzentrationen im Blut junger Frauen unterliegen.

Tabelle 7: Vergleich von Östrogenkonzentrationen im Plasma junger Männer und Frauen.

Plasma	Gruppe	Östrogenkonzentration [pg/ml]
Männer	Kon.	25 ± 4
	RIPC	27 ± 5
Frauen	Kon.	40 ± 63
	RIPC	30 ± 50

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der einzelnen Versuchsgruppen (je n=10). Die Östrogenkonzentrationen im Plasma unterschieden sich nicht signifikant. Kon. = Kontrollplasma; RIPC = Plasma ischämisch fernpräkonditionierter Proband/innen.

Häufig diskutierte Aspekte bei ischämischen Präkonditionierungsinterventionen betreffen den Ablauf und die Durchführung letzterer, da sich hier in der Literatur Unterschiede finden. In unserem Studiendesign durchliefen die Probandinnen bei der RIPC jeweils 3 Phasen 5-minütiger Ischämie gefolgt von jeweils 5 Minuten Reperfusion. Dies erfolgte in Anlehnung an das Studienprotokoll der ersten humanen *in vivo* RIPC von Kharbanda et al. [17]. Johnsen et al. untersuchten 2016 in einem tierexperimentellen Modell an männlichen Mäusen den Einfluss der Zyklusanzahl, der Zyklusdauer und der Gewebemasse des präkonditionierten Organs auf den Effekt von RIPC, um ein optimales Versuchsprotokoll zu finden [98]. In dieser Studie konnten durch vier bis sechs Zyklen RIPC in Form einer Ischämie der hinteren Extremität in einer nachfolgenden I/R-Situation (Langendorff-Modell) bei denselben Tieren kardioprotektive Effekte erzielt werden. Hier erzielte eine 2-minütige Ischämie im RIPC-Protokoll ebenso wie eine 5-minütige Ischämie eine signifikante Infarktgrößenreduktion, wohingegen eine Ischämiedauer von 10 Minuten die Infarktgröße nicht reduzieren konnte [98]. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass 2 Zyklen I/R nicht ausreichend waren, um einen kardioprotektiven Effekt zu vermitteln [98]. Da der Effekt von drei Zyklen I/R, wie in unserem Versuchsprotokoll festgelegt, nicht untersucht wurde, bleibt es fraglich, ob sich dadurch ein kardioprotektiver Effekt eingestellt hätte. Dieselbe Studie untersuchte auch, ob eine simultane RIPC an beiden hinteren

Extremitäten einen Einfluss auf den kardioprotektiven Effekt hat. Hier war der erzielte kardioprotektive Effekt in beiden Gruppen (RIPC an einer vs. an beiden Extremitäten) identisch. Dies suggeriert, dass der Effekt der RIPC bei Mäusen unabhängig von der der RIPC unterzogenen Gewebemasse ist [98].

Im Gegensatz hierzu demonstrierten Lieder et al., dass die simultane RIPC an beiden Hinterläufen von Ratten bei einer nachfolgenden I/R-Situation eine signifikant kleinere Infarktgröße erzielt als die RIPC an nur einem Hinterlauf. Dieser Effekt war zudem unabhängig vom Geschlecht der Ratten und bestand wie in unserem Protokoll nur aus drei Zyklen I/R (5 Minuten/ 5 Minuten) [99].

Es gibt Hinweise darauf, dass die präkonditionierte Gewebemasse auch beim Menschen den kardioprotektiven Effekt der RIPC beeinflussen könnte [100]. Diesbezüglich konnte in einer Metaanalyse randomisiert-kontrollierter Studien zu RIPC bei perkutaner Koronarintervention (PCI) gezeigt werden, dass durch RIPC an der unteren Extremität ein stärkerer kardioprotektiver Effekt erzielt wird, als durch RIPC an der oberen Extremität [100]. Demnach könnte der Effekt der RIPC von der präkonditionierten Muskelmasse abhängig sein und zudem eine bestimmte Mindestmenge präkonditionierter Muskelmasse notwendig sein, um einen Effekt durch RIPC erzielen zu können.

Da die Muskelmasse der oberen Extremität von Frauen in der Regel wesentlich geringer ist als die von Männern, könnte dies auch in unserer Studie den Effekt der RIPC beeinflusst haben. Möglicherweise war die präkonditionierte Muskelmasse bei unseren weiblichen Probandinnen zu gering, um einen Einfluss von RIPC auf die Infarktgrößen zeigen zu können. Da keine Daten zu den jeweiligen Muskelmassen der Probandinnen unserer Studie vorliegen, kann über diesbezügliche Unterschiede und Auswirkungen auf unsere Ergebnisse nur spekuliert werden.

Es kann folglich festgestellt werden, dass Unterschiede im Versuchsprotokoll die Ergebnisse einer RIPC beeinflussen können und es zudem interindividuelle Unterschiede beim Effekt durch RIPC zu geben scheint. Dies könnten Gründe für die erschwerte Translation von tierexperimentell gewonnenen Erkenntnissen in die klinische Praxis sein. Bis heute existiert kein optimaler, auf das Geschlecht abgestimmter, Algorithmus für eine effektive und sichere RIPC im klinischen Alltag [101]. Dies könnte wiederum begründen, weshalb die Ergebnisse klinischer Studien zu RIPC bis heute inhomogen sind.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Versuchsreihe zur ischämischen Präkonditionierung

Die zu Beginn unserer Studie durchgeführten Versuche zur klassischen IPC dienten dazu, den vielfach gezeigten protektiven Effekt der IPC an der eigenen Versuchsanlage zu reproduzieren. Die Infarktgröße konnte von 45 % in der Kontrollgruppe auf 26 % in der IPC-Gruppe signifikant reduziert werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die eigene Langendorff-Anlage und die eigenen Fähigkeiten im Umgang mit eben dieser, reproduzierbare und valide Ergebnisse hervorrufen.

4.2.2 Versuchsreihe zur ischämischen Fernpräkonditionierung

In der RIPC-Versuchsreihe unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Blockade von ER α und - β durch den nicht-selektiven Östrogenrezeptorblocker Fulvestrant vor Applikation von weiblichem Kontroll- und RIPC-Plasma keinen Effekt auf die Infarktgrößenentwicklung nach I/R im Langendorff-Modell hat (Daten veröffentlicht in [1]). Weiterhin konnten wir zeigen, dass durch RIPC-Plasma junger Frauen im Vergleich zu Kontrollplasma junger Frauen, keine Infarktgrößenreduktion nach I/R hervorgerufen wird. Damit haben wir die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe [1, 84] reproduziert und erneut gezeigt, dass die eigene Versuchsanlage valide Ergebnisse erzielt. Die Applikation von DMSO hat sich nicht auf die Infarktgrößenentwicklung nach I/R ausgewirkt und demnach kann DMSO als Störfaktor ausgeschlossen werden.

Im Folgenden soll diskutiert werden, welche Schlussfolgerungen aus unseren Ergebnissen gezogen werden können.

Da Östrogen für eine Vielzahl kardioprotektiver Mechanismen in prämenopausalen Frauen verantwortlich ist, war das Ergebnis, dass in unserem Experiment die Infarktgrößen durch Fulvestrant nicht beeinflusst wurden, unerwartet.

Fulvestrant ist ein nicht-selektiver Östrogenrezeptorantagonist, der die Wirkung von Östrogen an ER α und - β durch kompetitiven Antagonismus und konsekutive Rezeptor-Herabregulation erfolgreich hemmen kann [86]. Fulvestrant zeichnet sich im Vergleich nicht-selektiver Östrogenrezeptorantagonisten durch die höchste Bindungsaffinität zu ER aus [102] und war daher für die vorliegende Studie das Mittel der Wahl zur effektiven ER-Blockade. Interessanterweise wirkt Fulvestrant jedoch agonistisch am GPER [77, 89].

Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von ER α , ER β und GPER, unabhängig voneinander, kardioprotektive Effekte in I/R-Situationen bewirken kann [67, 70, 79].

Es muss daher festgestellt werden, dass wir vermutlich (1.) keine vollständige Blockade aller ER erreicht haben und (2.) sogar durch einen möglichen agonistischen Effekt von Fulvestrant am GPER eine zusätzliche Stimulation von ER bewirkt haben könnten.

In einer Studie von Filice et al. wurde u.a. der Effekt von Östrogen und Fulvestrant auf die hämodynamische Funktion isoliert perfundierter männlicher Rattenherzen untersucht. Durch Perfusion der Herzen mit östrogenhaltigem Krebs-Henseleit Puffer zeigte sich ein signifikant negativ inotroper Effekt. Dieser konnte durch 10-minütige Applikation von 100 nM Fulvestrant gefolgt von 10-minütiger Perfusion mit Krebs-Henseleit Puffer, angereichert mit 1 nM Östrogen und 100 nM Fulvestrant, aufgehoben werden [88]. Dieses Ergebnis zeigt, dass Fulvestrant in der von uns verwendeten Konzentration sowie Applikationsdauer prinzipiell geeignet ist, um östrogenvermittelte Effekte an Kardiomyozyten männlicher Rattenherzen aufzuheben.

Um jedoch einen simultanen kardioprotektiven Effekt durch eine von Fulvestrant vermittelte GPER-Stimulation in unserem Versuchsaufbau sicher ausschließen zu können, sind weiterführende Untersuchungen mit einem spezifischen GPER Antagonisten, wie beispielsweise G36 [103], zur vollständigen Klärung unserer Fragestellung von Nöten.

Es gilt weiterhin zu beachten, dass in der vorliegenden Studie Plasmaproben von jungen weiblichen Probandinnen ausschließlich auf junge männliche Rattenherzen übertragen wurden und die ER-Blockade an eben diesen durchgeführt wurde. Dadurch konnte der Einfluss von hormonellen, zyklusabhängigen Schwankungen des Versuchstieres auf unsere Studie reduziert werden. Zum aktuellen Zeitpunkt ist allerdings unbekannt, ob die Expression und Verteilung von ER im Rattenherz geschlechtsspezifischen Unterschieden unterliegen. Sowohl eine gesteigerte Expression von ER zur Sensitivitätssteigerung als auch eine reduzierte Expression bei geringer Östrogenexposition wäre in männlichen Kardiomyozyten denkbar. Um die optimale Dosis Fulvestrant bzw. G36 für eine effektive ER-Blockade zu finden, wäre die Kenntnis der ER-Dichte am Zielorgan von Vorteil.

Bei Mäusen wurde die kardiale Verteilung und Expression von ER bereits untersucht und hier zeigten sich interessanterweise keine wesentlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede [64].

Die eigene Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass durch Transfer von RIPC-Plasma junger Männer auf isoliert perfundierte Rattenherzen vor I/R ein signifikant kardioprotektiver Effekt erzielt werden kann. Dieser Effekt ist geschlechtsspezifisch und ließ sich durch Transfer von weiblichem RIPC-Plasma auf isoliert perfundierte Rattenherzen nicht demonstrieren. Interessanterweise zeigte sich jedoch sowohl durch Plasmatransfer von weiblichem Kontroll- als auch RIPC-Plasma ein *per se* kardioprotektiver Effekt [1, 84].

Auch in der vorliegenden Studie entstanden durch Applikation von weiblichem Kontroll- bzw. RIPC-Plasma keine Unterschiede in den Infarktgrößen nach I/R. Daher muss weiterführend diskutiert werden, wieso RIPC-Plasma junger Frauen, im Vergleich zu Kontroll-Plasma junger Frauen, keinen interindividuell übertragbaren, zusätzlichen kardioprotektiven Effekt nach einer I/R-Situation erzeugen konnte.

Shimizu et al. demonstrierten zuvor, dass der Transfer von Plasma ischämisch fernpräkonditionierter Menschen auf isoliert perfundierte Kaninchenherzen einen kardioprotektiven Effekt nach I/R in eben diesen bewirken kann [90]. Diese Studie unterstützt die These, dass es durch RIPC bei Menschen zur Freisetzung humoraler kardioprotektiver Faktoren kommt, die interindividuell übertragen werden können. Es finden sich jedoch in dieser Studie weder Angaben zum Geschlecht der Probanden noch zum Geschlecht der Versuchstiere, wodurch die Aussagekraft limitiert wird.

Aktuell gibt es, neben unserer eigenen, keine Studien, die den geschlechtsspezifischen Unterschied bei RIPC explizit untersuchen.

In einer Metaanalyse von 5 Studien mit insgesamt 731 Patient/innen wurde der Effekt von RIPC vor einer PCI untersucht. Primärer Endpunkt war hier der periinterventionelle Myokardinfarkt. In dieser Studie waren insgesamt 25 % Frauen vertreten. Es konnte gezeigt werden, dass RIPC die Inzidenz von periinterventionellen Myokardinfarkten, u.a. unabhängig vom Geschlecht, signifikant reduziert [100].

RIPC scheint demnach prinzipiell bei beiden Geschlechtern kardioprotektive Mechanismen aktivieren zu können, jedoch bedarf es für valide Aussagen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bei RIPC weiterführender Studien, in denen Frauen nicht unterrepräsentiert sind.

Song et al. untersuchten schon früh den geschlechtsspezifischen Unterschied und Einfluss von Östrogen bei IPC an Mäuseherzen. Sie zeigten, dass weibliche Herzen einen endogenen Schutz vor I/R haben und dass dieser durch IPC nicht weiter gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte durch IPC bei männlichen Mäusen ein signifikant kardioprotektiver

Effekt erreicht werden. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied ließ sich nur teilweise durch den Effekt von Östrogen erklären [82].

Interessanterweise konnten Dierkes et al. den zuvor beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschied bei IPC ebenfalls bei RIPC zeigen [1, 84]. Die Ergebnisse dieser Studien werfen die berechtigte Frage auf, ob eine ischämische (Fern-) Präkonditionierung überhaupt bei Frauen möglich ist.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die den geschlechtsspezifischen Unterschied bei ischämischen Präkonditionierungsinterventionen untersuchen. Bei der Interpretation dieser Studien muss insbesondere darauf hingewiesen werden, dass sich diese bezüglich der angewandten Konditionierungsintervention (IPC, RIPC, ischämische Postkonditionierung, ischämische Perkonditionierung) und des Versuchsablaufs unterscheiden.

Zwei Studien konnten zeigen, dass ischämische Postkonditionierung bei weiblichen Rattenherzen die Infarktgröße weniger reduziert als bei männlichen. Hier waren jedoch die Infarktgrößen der weiblichen Rattenherzen *per se* kleiner [104, 105].

Weiterhin gibt es Studien, die keinen Effekt durch ischämische Konditionierungsinterventionen bei weiblichen Ratten zeigen konnten [106, 107].

In einer anderen Studie konnte durch IPC sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ratten eine signifikante Reduktion arrhythmischer Ereignisse nach I/R gezeigt werden [108]. In einer weiteren Studie konnten ebenfalls männliche und weibliche Ratten präkonditioniert werden. Hier ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass eine höhere Schwelle zu Präkonditionierung weiblicher Tiere notwendig sein könnte [109].

Sollte solch eine Schwelle existieren, könnte diese z.B. von der Anzahl und Dauer der I/R Phasen bei Präkonditionierungsmaßnahmen sowie bei RIPC von der präkonditionierten Gewebemasse abhängig sein. Eine höhere Schwelle zur effektiven Präkonditionierung von Frauen und weiblichen Versuchstieren könnte, neben uneinheitlichen Versuchsprotokollen, die widersprüchliche Studienlage teilweise erklären.

4.3. Schlussfolgerungen

RIPC ist eine kostengünstige und minimalinvasive Möglichkeit, die unterstützend zur Prophylaxe und Therapie akuter und chronischer Ischämien im klinischen Alltag eingesetzt werden könnte. Die Ursachen für eine bisher uneindeutige Studienlage bezüglich der Effektivität der RIPC im klinischen Alltag finden sich zu großen Teilen in uneinheitlichen

Versuchsprotokollen und fehlenden Phase-II-Studien bezüglich eines optimalen Präkonditionierungsalgorithmus im klinischen Alltag [99].

Weiterhin spielt das Geschlecht auf noch ungeklärte Weise eine wichtige Rolle bei ischämischen (Prä-) Konditionierungsinterventionen.

Um das Verständnis der komplexen Wirkmechanismen der ischämischen (Prä-) Konditionierungsinterventionen weiter zu verbessern, sollten zukünftige Studien ein einheitliches, standardisiertes Versuchsprotokoll aufweisen und geschlechtsspezifische Unterschiede explizit untersuchen.

5. Literaturverzeichnis

1. Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112.
2. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2950-9.
3. Statistisches Bundesamt Deutschland (Destatis), *Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - ausführliche vierstellige ICD-10 Klassifikation - 2019*. 30.11.2020, abgerufen am 15.06.2021, URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/todesursachenstatistik-5232101197015.html>.
4. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
5. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
6. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
7. Frohlich, G.M., et al., *Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI*. Eur Heart J, 2013. **34**(23): p. 1714-22.
8. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
9. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
10. Przyklenk, K., *Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations*. Anesth Analg, 2013. **117**(4): p. 891-901.
11. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
12. Hausenloy, D.J., et al., *Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery*. Basic Res Cardiol, 2016. **111**(6): p. 70.
13. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
14. Walsh, S.R., et al., *Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008. **34**(5): p. 985-94.
15. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
16. Tapuria, N., et al., *Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review*. J Surg Res, 2008. **150**(2): p. 304-30.
17. Kharbanda, R.K., et al., *Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2881-3.
18. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 377-86.

19. Costa, J.F., R. Fontes-Carvalho, and A.F. Leite-Moreira, *Myocardial remote ischemic preconditioning: from pathophysiology to clinical application*. Rev Port Cardiol, 2013. **32**(11): p. 893-904.
20. Gill, R., et al., *Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance*. Mol Cell Biochem, 2015. **402**(1-2): p. 41-9.
21. Dickson, E.W., et al., *Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence*. J Thromb Thrombolysis, 1999. **8**(2): p. 123-9.
22. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
23. Konstantinov, I.E., et al., *The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans*. Physiol Genomics, 2004. **19**(1): p. 143-50.
24. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 450-6.
25. Shimizu, M., et al., *Effects of intermittent lower limb ischaemia on coronary blood flow and coronary resistance in pigs*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190**(2): p. 103-9.
26. Konstantinov, I.E., et al., *The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(5): p. 1326-32.
27. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?* Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(3): p. 235-54.
28. Przyklenk, K. and P. Whittaker, *Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 255-9.
29. Heusch, G. and T. Rassaf, *Time to Give Up on Cardioprotection? A Critical Appraisal of Clinical Studies on Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning*. Circ Res, 2016. **119**(5): p. 676-95.
30. Botker, H.E., et al., *Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial*. Lancet, 2010. **375**(9716): p. 727-34.
31. White, S.K., et al., *Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction*. JACC Cardiovasc Interv, 2015. **8**(1 Pt B): p. 178-88.
32. Yellon, D.M., et al., *Remote Ischemic Conditioning Reduces Myocardial Infarct Size in STEMI Patients Treated by Thrombolysis*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(25): p. 2764-5.
33. Sloth, A.D., et al., *Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2014. **35**(3): p. 168-75.
34. Hoole, S.P., et al., *Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial*. Circulation, 2009. **119**(6): p. 820-7.
35. Luo, S.J., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing coronary stent implantation*. Can J Cardiol, 2013. **29**(9): p. 1084-9.
36. Liu, Z., et al., *Late remote ischemic preconditioning provides benefit to patients undergoing elective percutaneous coronary intervention*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(1): p. 437-42.

37. Iliodromitis, E.K., et al., *Increased C reactive protein and cardiac enzyme levels after coronary stent implantation. Is there protection by remote ischaemic preconditioning?* Heart, 2006. **92**(12): p. 1821-6.
38. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial.* Lancet, 2007. **370**(9587): p. 575-9.
39. Ali, N., et al., *Induced remote ischemic pre-conditioning on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing coronary artery bypass.* J Coll Physicians Surg Pak, 2010. **20**(7): p. 427-31.
40. Venugopal, V., et al., *Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial.* Heart, 2009. **95**(19): p. 1567-71.
41. Thielmann, M., et al., *Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial.* Lancet, 2013. **382**(9892): p. 597-604.
42. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery.* N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
43. Hong, D.M., et al., *The effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery.* Anaesth Intensive Care, 2010. **38**(5): p. 924-9.
44. Rahman, I.A., et al., *Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment?* Circulation, 2010. **122**(11 Suppl): p. S53-9.
45. Walsh, M., et al., *Effects of remote ischemic preconditioning in high-risk patients undergoing cardiac surgery (Remote IMPACT): a randomized controlled trial.* Cmaj, 2016. **188**(5): p. 329-36.
46. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery.* N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
47. Young, P.J., et al., *A pilot study investigating the effects of remote ischemic preconditioning in high-risk cardiac surgery using a randomised controlled double-blind protocol.* Basic Res Cardiol, 2012. **107**(3): p. 256.
48. Le Page, S., et al., *Remote ischemic conditioning and cardioprotection: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials.* Basic Research in Cardiology, 2015. **110**(2): p. 11.
49. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial.* Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1415-1424.
50. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic.* Lancet, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
51. Prabhavathi, K., et al., *Role of biological sex in normal cardiac function and in its disease outcome - a review.* J Clin Diagn Res, 2014. **8**(8): p. Be01-4.
52. Mallat, Z., et al., *Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(11): p. M719-23.
53. Ostadal, B., et al., *Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects.* Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(9): p. 1011-9.
54. Ostadal, B. and P. Ostadal, *Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications.* Br J Pharmacol, 2014. **171**(3): p. 541-54.
55. Wittnich, C., et al., *Sex differences in myocardial metabolism and cardiac function: an emerging concept.* Pflugers Arch, 2013. **465**(5): p. 719-29.

56. Chu, S.H., et al., *Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle*. Life Sci, 2005. **76**(23): p. 2735-49.
57. Arieli, Y., et al., *Gender modulation of Ca(2+) uptake in cardiac mitochondria*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 507-13.
58. Sun, J., et al., *Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca2+ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 403-11.
59. Colom, B., et al., *Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H2O2 production and oxidative damage*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 456-65.
60. Lagranha, C.J., et al., *Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females*. Circ Res, 2010. **106**(11): p. 1681-91.
61. Booth, E.A., et al., *17Beta-estradiol as a receptor-mediated cardioprotective agent*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 395-401.
62. Aryan, L., et al., *The Role of Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).
63. Deschamps, A.M., E. Murphy, and J. Sun, *Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury*. Trends Cardiovasc Med, 2010. **20**(3): p. 73-8.
64. Lizotte, E., et al., *Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(1-3): p. 75-86.
65. Jazbutyte, V., et al., *Estrogen receptor alpha interacts with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(4): p. 450-4.
66. Wang, M., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates acute myocardial protection in females*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2204-9.
67. Booth, E.A., N.R. Obeid, and B.R. Lucchesi, *Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H2039-47.
68. Zhai, P., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1640-7.
69. Yang, S.H., et al., *Mitochondrial localization of estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4130-5.
70. Schubert, C., et al., *Reduction of apoptosis and preservation of mitochondrial integrity under ischemia/reperfusion injury is mediated by estrogen receptor beta*. Biol Sex Differ, 2016. **7**: p. 53.
71. Wang, M., et al., *Estrogen receptor beta mediates acute myocardial protection following ischemia*. Surgery, 2008. **144**(2): p. 233-8.
72. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Estrogen regulation of protein expression and signaling pathways in the heart*. Biol Sex Differ, 2014. **5**(1): p. 6.
73. Murphy, E., *Estrogen signaling and cardiovascular disease*. Circ Res, 2011. **109**(6): p. 687-96.
74. Knowlton, A.A. and D.H. Korzick, *Estrogen and the female heart*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **389**(1-2): p. 31-9.
75. Wang, M., et al., *Estrogen receptor beta mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(4): p. R972-8.
76. Simoncini, T., et al., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 538-41.

77. Filardo, E.J., et al., *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
78. Bopassa, J.C., et al., *A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(1): p. H16-23.
79. Deschamps, A.M. and E. Murphy, *Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(5): p. H1806-13.
80. Luo, T. and J.K. Kim, *The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview*. *Can J Cardiol*, 2016. **32**(8): p. 1017-25.
81. Wever, K.E., et al., *Determinants of the Efficacy of Cardiac Ischemic Preconditioning: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0142021.
82. Song, X., et al., *Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice*. *Acta Physiol Scand*, 2003. **177**(4): p. 459-66.
83. Turcato, S., et al., *Ischemic preconditioning depends on age and gender*. *Basic Res Cardiol*, 2006. **101**(3): p. 235-43.
84. Dierkes, M., *Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Freisetzung humoraler Faktoren nach ischämischer Fernpräkonditionierung beim Menschen*, in *Experimentelle Anästhesie*. 2021, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
85. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 940-50.
86. Osborne, C.K., A. Wakeling, and R.I. Nicholson, *Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action*. *Br J Cancer*, 2004. **90 Suppl 1**: p. S2-6.
87. Wakeling, A.E. and J. Bowler, *Steroidal pure antioestrogens*. *J Endocrinol*, 1987. **112**(3): p. R7-10.
88. Filice, E., et al., *A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60**(4): p. 3-10.
89. Guo, X., et al., *Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(20): p. 19704-10.
90. Shimizu, M., et al., *Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **117**(5): p. 191-200.
91. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 613-27.
92. Minhaz, U., et al., *Perfusion delay causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation*. *Basic Res Cardiol*, 1995. **90**(5): p. 418-23.
93. Khaliulin, I., et al., *Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore*. *J Physiol*, 2007. **581**(Pt 3): p. 1147-61.
94. Yellon, D.M., et al., *The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1992. **24**(8): p. 895-907.

95. Schwarz, E.R., et al., *What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat?* J Thromb Thrombolysis, 2000. **10**(2): p. 181-7.
96. Hamelin, B.A., et al., *Influence of the menstrual cycle on the timing of acute coronary events in premenopausal women.* Am J Med, 2003. **114**(7): p. 599-602.
97. Mihm, M., S. Gangooly, and S. Muttukrishna, *The normal menstrual cycle in women.* Anim Reprod Sci, 2011. **124**(3-4): p. 229-36.
98. 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, 2016. **111**(2): p. 10.
99. Lieder, H.R., et al., *Sex is no determinant of cardioprotection by ischemic preconditioning in rats, but ischemic/reperfused tissue mass is for remote ischemic preconditioning.* Physiol Rep, 2019. **7**(12): p. e14146.
100. D'Ascenzo, F., et al., *Cardiac remote ischaemic preconditioning reduces periprocedural myocardial infarction for patients undergoing percutaneous coronary interventions: a meta-analysis of randomised clinical trials.* EuroIntervention, 2014. **9**(12): p. 1463-71.
101. Heusch, G., *Critical Issues for the Translation of Cardioprotection.* Circ Res, 2017. **120**(9): p. 1477-1486.
102. Wakeling, A.E. and J. Bowler, *Development of novel oestrogen-receptor antagonists.* Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 899-901.
103. Dennis, M.K., et al., *Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(3-5): p. 358-66.
104. Penna, C., et al., *Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender.* Basic Res Cardiol, 2009. **104**(4): p. 390-402.
105. Ciocci Pardo, A., et al., *Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia-reperfusion and ischemic post-conditioning.* Cardiovasc Pathol, 2018. **33**: p. 19-26.
106. Sachdeva, J., et al., *Combined remote preconditioning and postconditioning failed to attenuate infarct size and contractile dysfunction in a rat model of coronary artery occlusion.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014. **19**(6): p. 567-73.
107. Dow, J. and R.A. Kloner, *Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2007. **12**(2): p. 153-63.
108. Humphreys, R.A., K.A. Kane, and J.R. Parratt, *The influence of maturation and gender on the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning in rats.* Basic Res Cardiol, 1999. **94**(1): p. 1-8.
109. Pitcher, J.M., et al., *Is the preconditioning threshold different in females?* J Surg Res, 2005. **125**(2): p. 168-72.

6. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei **Frau Prof. Dr. Inge Bauer** und **Herrn Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen** für ihre Betreuung und Unterstützung beim Erstellen dieser Dissertation.

Zudem bedanke ich mich bei **Priv.-Doz. Dr. Dr. med. André Heinen**, **Dr. med. Friederike Behmenburg** und **Pof. Dr. med. habil. Tanja Meyer-Treschan** für die Organisation dieser Studie und die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die tatkräftige Unterstützung im täglichen Laborbetrieb bedanke ich mich bei **Claudia Dohle** und **Antje Nebert** sowie den weiteren **wissenschaftlichen Mitarbeiter/innen** der experimentellen Anästhesie.

Den **freiwilligen Probandinnen** möchte ich für ihre Teilnahme an dieser Studie danken.

Ein besonderer Dank geht an **meine Familie, meinen Partner und meine Freunde** – Ihr habt mich mit eurem Rückhalt und eurer Liebe bedingungslos unterstützt. Durch euch habe ich gelernt, dass man alle seine Ziele erreichen kann.