

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

**Untersuchung zur Phosphorylierung von Proteinkinase B sowie  
Phosphorylierung und Expression von *Signal Transducer and  
Activator of Transcription 5* in der Signalübertragung der  
ischämischen Fernpräkonditionierung des Herzens**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Christian Reiter

2022

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hug Aubin

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht (1):

A. RAUPACH, K. FEIGE, C. REITER, T. BRANDENBURGER, N. HEINEN, A. HEINEN,  
M.W. HOLLMANN, R. HUHN und C. TORREGROZA.

Remote ischemic preconditioning does not induce activation of Akt and STAT5  
in the rat heart.

Experimental and therapeutic medicine, 2021, 21(5), 432.

doi:10.3892/etm.2021.9849

## Zusammenfassung:

**Hintergrund:** Bei der ischämischen Fern-Präkonditionierung („*remote ischemic preconditioning*“ = RIPC) handelt es sich um eine effektive Methode, das Herz vor ischämischer Schädigung, wie sie beispielsweise bei Myokardinfarkten oder während herzchirurgischer Eingriffe auftritt, zu schützen. Obwohl experimentelle Studien vielversprechend sind, liefern klinische Studien zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Es ist daher wichtig, die molekularen Grundlagen dieses Phänomens vollständig aufzudecken, um es anschließend in eine Verbesserung der Patientenversorgung überführen zu können. In Studien zu anderen Formen der ischämischen Konditionierung kommt zwei intrazellulären Signalwegen besondere Relevanz zu, dem „*reperfusion injury salvage kinases*“ oder „RISK“ Signalweg und dem „*survivor activating factor enhancement*“ oder „SAFE“ Signalweg.

**Ziele:** Ziel dieser Studie war es, die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt), einem zentralen Protein des RISK Signalwegs, sowie die Phosphorylierung und Expression von STAT5, einem Element des SAFE Signalweges, im Rahmen der RIPC zu untersuchen.

**Methode:** Nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde wurden männliche Wistar Ratten zwei Versuchsprotokollen unterzogen. Die Randomisierung fand innerhalb des jeweiligen Protokolls statt. Das erste Versuchsprotokoll umfasste zwei Gruppen (n=6 /Gruppe): Die Herzen wurden 10 Minuten nach Ende der jeweiligen Intervention entnommen (TP1). Tiere der ersten Versuchsgruppe (RIPC TP1) erhielten eine RIPC Behandlung (4x5 Minuten Ischämie gefolgt von 5 Minuten Reperfusion) mittels einer aufblasbaren Manschette am Hinterlauf. Die zweite Versuchsgruppe (*Sham* TP1) erhielt eine analoge Placebo-Behandlung (*Sham*). Das zweite Versuchsprotokoll umfasste vier Versuchsgruppen (n=6 /Gruppe). Die Herzen wurden 165 Minuten nach RIPC bzw. *Sham* entnommen (TP2). Zwei Gruppen erhielten, entsprechend dem ersten Protokoll, eine RIPC-, zwei weitere eine *Sham* Intervention. Anschließend wurden die Tiere thorakotomiert und, mittels einer um den *Ramus Interventricularis Anterior* gelegten Fadenschlinge, eine Myokardischämie von 35 Minuten induziert (I/R und RIPC + I/R) oder eine analoge Placebo-Intervention durchgeführt (*Sham* TP2 und RIPC TP2). Als Maß für die Aktivierung von Akt und STAT5 wurde die relative Expression der phosphorylierten Formen im Herzgewebe bestimmt. Nach Isolation der zytosolischen Proteine und Auftrennung mittels *Western Blot*-Verfahren wurden die zu untersuchenden Proteine mit Antikörpern markiert, anschließend mittels Chemolumineszenz detektiert und die Signalstärke digital analysiert. Die so ermittelten Signalstärken der phosphorylierten Proteinformen wurden mit den Signalstärken der Gesamtmenge des jeweiligen Proteins in Relation gesetzt, um die relative Expression zu ermitteln. Darüber hinaus wurden die Signalstärken der Gesamtmenge von STAT5 in den Kompartimenten Zytosol und Zellkern ermittelt und verglichen, um eine mögliche Translokation zu erfassen. Zur statistischen Auswertung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  bestimmt.

**Ergebnis:** Für Akt und STAT5 konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine gesteigerte Phosphorylierung durch RIPC gezeigt werden (stets *Sham* vs. Versuchsgruppe) (Akt: TP1:  $0,71 \pm 0,57$  vs.  $0,93 \pm 0,73$ ;  $P=0,57$ ; TP2:  $0,13 \pm 0,05$  vs.  $0,15 \pm 0,12$ ;  $P=0,77$ / STAT5:  $0,27 \pm 0,08$  vs.  $0,25 \pm 0,07$ ;  $P=0,70$ ; TP2:  $0,036 \pm 0,014$  vs.  $0,03 \pm 0,01$ ;  $P=0,17$ ). Auch nachfolgende Ischämie und Reperfusion konnte keine Phosphorylierung von Akt oder STAT5 durch RIPC induzieren (Akt:  $1,36 \pm 1,07$  vs.  $2 \pm 1,30$ ;  $P=0,300$ / STAT5:  $0,26 \pm 0,12$  vs.  $0,34 \pm 0,10$ ;  $P=0,22$ ). Es konnte keine Abnahme der relativen Expression von STAT5 im Zytosol zehn Minuten nach RIPC beobachtet werden ( $0,79 \pm 0,33$  vs.  $1,29 \pm 0,54$ ;  $P=0,09$ ). Der Nachweis einer Translokation von STAT5 in den Zellkern gelang nicht ( $1,0 \pm 0,34$  vs.  $0,72 \pm 0,28$ ;  $P=0,15$ ).

**Schlussfolgerung:** RIPC geht zu den untersuchten Zeitpunkten nicht mit einer Aktivierung von Akt oder STAT5 einher. Eine Translokation von STAT5 findet zum untersuchten Zeitpunkt ebenfalls nicht statt. Dass es zu anderen als den hier untersuchten Zeitpunkten zu einer Aktivierung von Akt oder STAT5 oder zu einer Translokation von STAT5 kommt, ist möglich und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## Abstract:

**Background:** Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a powerful method to protect the heart from ischemic damage as it may, for example, occur during myocardial infarction or cardiac surgery. Yet, to this day, the molecular mechanisms that underlie the phenomenon are not fully understood. While the effect is easily reproducible under experimental conditions, clinical studies have produced conflicting results. To convert this powerful effect into an actual improvement in patient care, it will therefore be crucial to fully uncover the molecular mechanisms on the cellular level. Many possible messenger proteins and pathways have been investigated. In studies on other forms of ischemic conditioning, two pathways seem to stand out: The “reperfusion injury salvage kinases” pathway (RISK) and the “survivor activating factor enhancement” pathway (SAFE).

**Objective:** The aim of this study was to investigate the role of Protein-Kinase B (Akt), a central protein of the RISK pathway as well as the role of STAT5, a possible element of the SAFE pathway during RIPC.

**Method:** With ethical approval from the State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection, male Wistar rats were assigned to two different experimental protocols: In the first experimental protocol, male Wistar rats were randomized into 2 groups (n=6 per group). Hearts were excised 10 minutes after completion of the intervention (TP1): The first group received a RIPC treatment through a hind limb inflatable pressure cuff (RIPC TP1), while the second group received a placebo treatment (Sham TP1). In the second experimental protocol, the rats were randomized into 4 groups (n=6 per group) that either underwent RIPC or sham treatment prior to 35 min of ischemia by occlusion of the left anterior descending coronary artery through thoracotomy either followed by 120 min reperfusion (I/R and RIPC + I/R) or a respective placebo treatment (Sham TP2 or RIPC TP2). To determine activation of Akt and STAT5, relative expression of the phosphorylated forms was measured. To detect a possible translocation of STAT5 from the cytosol into the nucleus, relative expression was measured in the two cellular compartments and compared. After isolation of the cytosolic proteins, western-blot analysis was performed. The target proteins and their phosphorylated forms were marked with specific antibodies. Chemiluminescence was used to measure antibody load through digital camera imaging. The signal strength of the phosphorylated proteins was then compared to the signal strength of the total amount of the protein to calculate relative expression. Mean values and standard deviations were calculated. Statistical significance was determined using the unpaired, two-sided t-test with a level of significance of  $p < 0,05$ .

**Results:** The results show that the relative phosphorylation for Akt as well as STAT5 was not altered by RIPC at the timepoints measured: (*Sham* vs. Experimental group) (Akt: TP1:  $0,71 \pm 0,57$  vs.  $0,93 \pm 0,73$ ;  $P=0,57$ ; TP2:  $0,13 \pm 0,05$  vs.  $0,15 \pm 0,12$ ;  $P=0,77$ / STAT5:  $0,27 \pm 0,08$  vs.  $0,25 \pm 0,07$ ;  $P=0,70$ ; TP2:  $0,036 \pm 0,014$  vs.  $0,03 \pm 0,01$ ;  $P=0,17$ ). Subsequent ischemia and reperfusion were not able to induce phosphorylation of Akt or STAT5 through RIPC: (Akt:  $1,36 \pm 1,07$  vs.  $2 \pm 1,30$ ;  $P=0,300$ / STAT5:  $0,26 \pm 0,12$  vs.  $0,34 \pm 0,10$ ;  $P=0,22$ ). No decrease in cytosolic STAT5 relative expression levels could be observed at TP1: ( $0,79 \pm 0,33$  vs.  $1,29 \pm 0,54$ ;  $P=0,09$ ). Relative expression of STAT5 in the nucleus was not altered at TP1: ( $1,0 \pm 0,34$  vs.  $0,72 \pm 0,28$ ;  $P=0,15$ ).

**Conclusion:** RIPC may not involve activation of Akt or STAT5, at least not at the specific time points examined in this study. STAT5 does not seem to translocate into the nucleus after RIPC. Involvement of Akt or STAT5 at other time points remains a possibility and should be the subject of future studies.

## Abkürzungsverzeichnis:

<b>AAR</b>	<i>Area at Risk</i>
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalziumion
<b>CABG</b>	Koronararterielle <i>Bypass</i> operation
<b>CPR</b>	Kardiopulmonale Reanimation
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL™</b>	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGTA</b>	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
<b>eNOS</b>	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase
<b>EPO</b>	Erythropoietin
<b>ERK</b>	Extrazellulär Regulierte Kinase
<b>FGF2</b>	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GFR</b>	Wachstumsfaktor Rezeptor
<b>GPCR</b>	G-Protein gekoppelter Rezeptor
<b>GSK3β</b>	Glykogensynthasekinase 3 Beta
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoffion
<b>I/R</b>	Ischämie und Reperfusion
<b>IGF1</b>	Insulinabhängiger Wachstumsfaktor
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IC</b>	Ischämische Konditionierung
<b>IPC</b>	Ischämische Präkonditionierung
<b>IPoC</b>	Ischämische Postkonditionierung
<b>JAK</b>	Januskinase

<b>K<sup>+</sup></b>	Kaliumion
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LAD</b>	<i>Ramus Interventricularis Anterior</i>
<b>mAK</b>	Mitochondriale Atmungskette
<b>mKATP</b>	Mitochondrialer Adenosinriphosphatabhängiger Kaliumkanal
<b>mPTP</b>	Mitochondriale Permeabilitäts Transitions-pore
<b>MVO</b>	Mikrovaskuläre Obstruktion
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumion
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>p38MAPK</b>	p38 Mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
<b>pAKT</b>	Phosphorylierte Proteinkinase B
<b>PCI</b>	Perkutane Koronarintervention
<b>PDK</b>	Phosphoinositid-abhängige Kinase
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>pSTAT5</b>	Phosphoryliertes STAT5
<b>PTCA</b>	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RIC</b>	Ischämische Fernkonditionierung
<b>RIPC</b>	Ischämische Fern-Präkonditionierung
<b>RIPerC</b>	Ischämische Fern-Perkonditionierung
<b>RIPoC</b>	Ischämische Fern-Postkonditionierung
<b>RISK</b>	<i>Reperfusion Injury Survival Kinases</i> Signalkaskade
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>SAFE</b>	<i>Survival Activating Factor Enhancement</i> Signalkaskade
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat

<b>Ser</b>	Serin
<b>SPECT</b>	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
<b>STAT</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>STEMI</b>	ST-Elevations Myokardinfarkt
<b>TBS-T</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung - <i>Tween</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TNF-R2</b>	Tumornekrosefaktor Rezeptor 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor <i>Alpha</i>
<b>TP</b>	Zeitpunkt

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung: .....	I
Abstract: .....	II
Abkürzungsverzeichnis: .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1. Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden .....	2
1.1.1. Pathogenese und molekulare Mechanismen.....	3
1.1.2. Klinische Relevanz des Ischämie-Reperfusionsschadens .....	5
1.2. Kardioprotektion .....	6
1.2.1. Pharmakologische Kardioprotektion.....	6
1.2.2. Ischämischen Konditionierung des Myokards.....	7
1.2.3. Bedeutung der ischämischen Konditionierung für die klinische Praxis .....	9
1.3. Molekulare Grundlagen der ischämischen Fern-Präkonditionierung .....	10
1.3.1. Signalbildung und extrazelluläre Übertragungswege .....	10
1.3.2. Intrazelluläre Übertragungswege: Der <i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i> Signalweg und die Proteinkinase B .....	12
1.3.3. Intrazelluläre Übertragungswege: Der <i>Survival Activating Factor Enhancement</i> Signalweg und der <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i> .....	14
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1. Material .....	17
2.1.1. Chemikalien .....	17
2.1.2. Lösungen .....	18
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.4. Antikörper .....	21
2.1.5. Proteinstandard.....	22
2.1.6. Geräte.....	22

2.1.7.	Computerprogramme .....	23
2.1.8.	Versuchstiere.....	23
2.2.	Methoden.....	24
2.2.1.	Vorbehandlung der Versuchstiere .....	24
2.2.2.	Versuchsprotokolle und Versuchsgruppen .....	25
2.2.3.	Proteinextraktion und Fraktionierung .....	26
2.2.4.	Proteinbestimmung.....	27
2.2.5.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	27
2.2.6.	Western-Blot .....	28
2.2.7.	Chemolumineszenz-Detektion .....	29
2.2.8.	Auswertung der Daten und Statistik .....	29
3	Ergebnisse .....	30
3.1.	Relative Phosphorylierung von Akt .....	30
3.2.	Relative Phosphorylierung von STAT5 .....	32
3.3.	Relative Expression von STAT5.....	34
4	Diskussion.....	36
4.1.	Phosphorylierung der Proteinkinase B im Rahmen der Ischämischen Fernpräkonditionierung .....	36
4.2.	Phosphorylierung und Translokation von <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i> im Rahmen der Ischämischen Fernpräkonditionierung.....	38
4.3.	Limitationen .....	39
4.4.	Fazit und Ausblick.....	41

# 1 Einleitung

In Deutschland leiden 6 % der Männer und 3,7 % der Frauen an einer koronaren Herzkrankheit und entwickeln in der Folge meist eine ischämische Kardiomyopathie oder eine akute Myokardischämie (2, 3). Mehr als 200.000 Menschen erleiden so hierzulande jedes Jahr einen Myokardinfarkt (4).

Dabei hat die Krankenhaus-Letalität des akuten Myokardinfarkts von etwa 20%, Ende der 1980er Jahre, auf ca. 5-11% in den 2000er Jahren abgenommen, was auf die Einführung und flächendeckende Verfügbarmachung einer schnellen Reperfusionstherapie zurückzuführen ist (4-6). Ebenso konnte die Inzidenz des ST-Hebungsinfarktes durch Präventionsprogramme und eine pharmakologische Kontrolle von Risikofaktoren innerhalb der letzten Jahre deutlich gesenkt werden (7). Die koronare Herzkrankheit stellt aber trotz dieser Erfolge noch immer die häufigste Todesursache in Deutschland sowie weltweit dar und bleibt damit eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen unserer Zeit (8).

Akute Myokardinfarkte können unter anderem dann auftreten, wenn das Herzkreislaufsystem einer besonderen Belastung ausgesetzt wird, wie dies beispielsweise bei chirurgischen Eingriffen der Fall ist. Mit einer Inzidenz von etwa 16% sind Patienten, die sich herzchirurgischen Eingriffen unterziehen, besonders gefährdet (9). Aber auch Patienten, die sich nicht-herzchirurgischen Eingriffen unterziehen, zeigen eine Inzidenz von 6-7% (10, 11), wobei die Infarkte häufig klinisch inapparent verlaufen und nicht rechtzeitig diagnostiziert werden (12). Die Mortalität des perioperativen Myokardinfarkts ist mit bis zu 30% weiterhin sehr hoch (10, 11).

Doch die Mortalität ist nicht die einzige wichtige Determinante in diesem Zusammenhang. Dass heute mehr Patienten einen akuten Myokardinfarkt überleben als noch vor wenigen Jahrzehnten hat wiederum zu einer Zunahme der Morbidität mit deutlicher Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen und Belastung der Gesundheitssysteme geführt. Untergegangenes Herzmuskelgewebe wird nicht durch neues Herzmuskelgewebe, sondern durch funktionsloses Narbengewebe ersetzt. Dadurch, dass viele kardial vorgeschädigte Patienten mit eingeschränkter Pumpfunktion, die früher an einem Myokardinfarkt verstorben wären, diesen heute mit schwer geschädigtem Herzmuskel überleben, hat die Prävalenz der schweren Herzinsuffizienz zugenommen (5). Damit ist der Myokardinfarkt eine der Hauptursachen für chronische Herzinsuffizienz weltweit. Die wichtigste Determinante für die linksventrikuläre Funktion nach einem Infarkt stellt neben der Lokalisation die Größe des infarzierten Areals dar (13, 14). Um sich diesem neuen Problem zu stellen, hat sich innerhalb der letzten Jahre ein Paradigmenwechsel in der Erforschung des Myokardinfarktes vollzogen. Diese sucht nun nach Wegen, nicht nur das reine

Überleben des Patienten zu sichern, sondern auch den Schaden am Myokard möglichst gering zu halten und dadurch die Inzidenz und das Ausmaß einer späteren infarktbedingten Herzinsuffizienz zu verringern (15).

### 1.1. Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden

Bereits 1985 postulierten Braunwald et al., dass nicht nur die Ischämie selbst, sondern auch die Reperfusion dem Myokard Schaden zufügt, dies wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (16). Da die schädigenden Prozesse der Ischämie- und der Reperusionsphase zum Teil schwierig voneinander zu trennen sind, ist es vorteilhaft vom Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) zu sprechen (16). Während der Ischämie kommt der Blutfluss zu einem Gewebe zum Erliegen. Dies führt zum einen zu einem Mangel an Sauerstoff für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), zum anderen zur Akkumulation von Stoffwechselprodukten im Gewebe, welche zum Absterben der im Infarktgebiet befindlichen Zellen führt. Der Infarktkern ist von einer Zone umgeben, welche durch Kollateralgefäße eine Restdurchblutung erhält und dadurch vorerst am Leben erhalten wird. Das gesamte von der Ischämie betroffene Areal wird als die *Area at Risk* (AAR) bezeichnet und kann im Falle einer zeitigen mechanischen oder medikamentösen Reperfusion teilweise oder ganz vor dem Untergang gerettet werden (17, 18). Gleichzeitig ist die AAR aber auch der Ort, an dem sich die Prozesse abspielen, welche im Rahmen des Reperfusionsschadens zu einem weiteren Absterben von Zellen führen (19).

Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung 1 illustriert. Dort dargestellt ist der jeweilige Anteil der Ischämie und des Reperfusionsschadens an der endgültigen Infarktgröße bei Patienten bis 24 Stunden im Anschluss an eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder Lysetherapie. Die schwarze Linie beschreibt die Größenentwicklung des irreversibel geschädigten Myokardareals über die Zeit. Es ist erkennbar, dass sich der Infarkt progressiv entwickelt. Zum Zeitpunkt der PTCA oder Lyse steigt die Infarktgröße sprunghaft an. Dieser Anteil an der endgültigen Infarktgröße ist auf den Reperfusionsschaden zurückzuführen. Die grün gestrichelte Linie zeigt den Anteil der Infarktgröße an, welcher ausschließlich auf den ischämischen Zellschaden zurückzuführen ist. Dieser würde der endgültigen Infarktgröße entsprechen, wenn man in der Lage wäre, den Reperfusionsschaden vollständig zu verhindern. Die rot gestrichelte Linie zeigt die theoretische Größe an, die das Infarktareal ohne Einflussnahme in Form von PTCA oder Lyse erreichen würde. Dies zeigt, dass die frühzeitige PTCA oder Lyse nach wie vor den ersten Schritt in der Behandlung des Myokardinfarktes darstellen muss. Das Finden therapeutischer Maßnahmen zur Verringerung des Reperfusionsschadens ist demnach der logische zweite Schritt, um den Erfolg der PTCA oder Lyse zu maximieren.

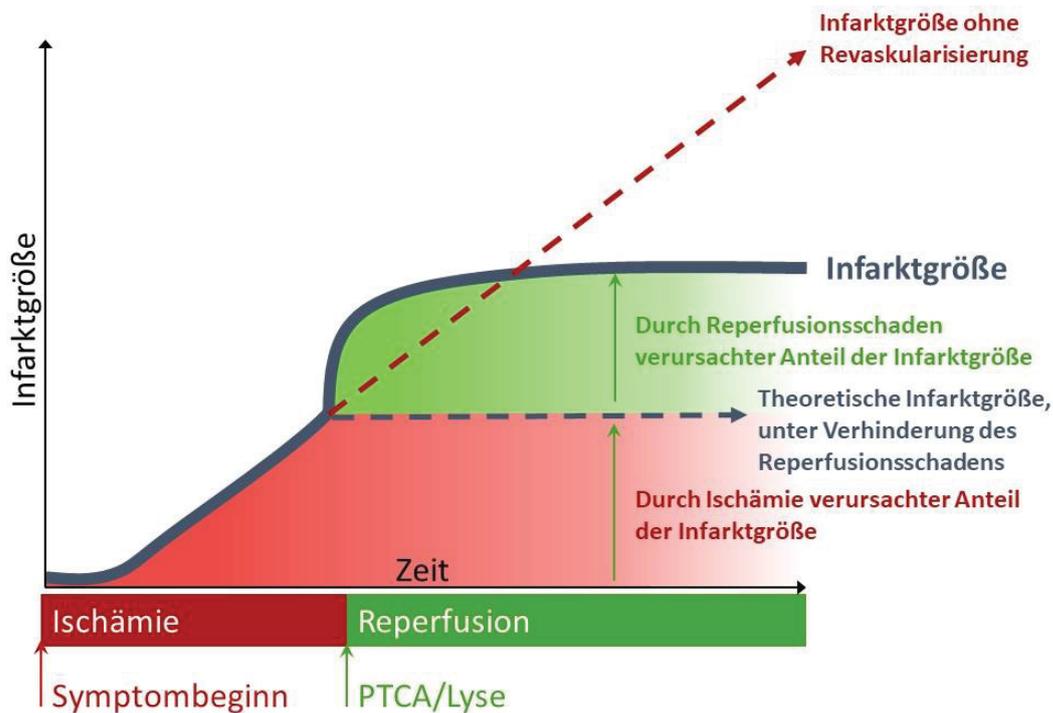


Abb. 1: Anteil der Ischämie und des Reperfusionsschadens an der Infarktgröße nach Revaskularisation  
 Schematisch dargestellt ist die Entwicklung der Infarktgröße bei Patienten bis 24 Stunden im Anschluss an eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder Lysetherapie. Der Anteil der unterschiedlichen Schädigungsmechanismen, Ischämie und Reperfusionsschaden, sind farblich gekennzeichnet. (Abbildung angelehnt an Hausenloy et al., 2013) (20)

### 1.1.1. Pathogenese und molekulare Mechanismen

Die im Folgenden beschriebenen Prozesse werden in der Abbildung 2 veranschaulicht. Während der Myokardischämie erfährt die AAR einen Sauerstoffmangel, welcher über die anaerobe Glykolyse zur Ansäuerung des Sarkoplasmas der Kardiomyozyten führt. Über den  $H^+/Na^+$ -Austauscher erhöht sich auf diese Weise die intrazelluläre Natriumkonzentration, welche, vor dem Hintergrund des zunehmenden Mangels an ATP aus der sauerstoffabhängigen Atmungskette, nicht durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase ausgeglichen werden kann. Dies resultiert in einem Einstrom von Kalzium über den nun retrograd laufenden  $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiporter (21, 22). Der erhöhte Kalziumspiegel ist unmittelbar und mittelbar in der Lage die Apoptose herbeizuführen (22, 23).

Wird der Blutfluss wiederhergestellt, führen gleich mehrere parallel ablaufende Prozesse zu einer weiteren Schädigung des Myokards in der AAR: Die plötzliche Re-Energetisierung führt im Rahmen der erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration zu oszillatorischer  $Ca^{2+}$ -Aufnahme und Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zu unkontrollierter myofibrillärer Hyperkontraktion kommt (22). Die schnelle Re-Normalisierung des intrazellulären pH-Werts führt zur Aktivierung von Calpain, welches die Zelle proteolytisch schädigt, und zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP) (24, 25). Die plötzliche

Normalisierung der extrazellulären Elektrolytkonzentrationen bedingt ein osmotisches Zellödem bis hin zur Ruptur der Zellmembran (26). Darüber hinaus führt eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Mitochondrien und eingewanderte Granulozyten zu einer generellen, den Zelltod induzierenden, Schädigung von Zellstrukturen (26). Durch den Untergang von Zellen, sowie aus dem Thrombus freigesetzte Mediatoren wie Interleukine und Tumornekrosefaktor *Alpha* (TNF $\alpha$ ), kommt es zur Induktion einer Entzündungsreaktion im Gewebe, welche unter anderem durch eine weitere Produktion von ROS die Schädigung verstärkt (20).

Als ein weiterer Mechanismus der Zellschädigung in der Reperfusionphase ist das Phänomen der mikrovaskulären Obstruktion (MVO) zu sehen, welches bei bis zu 30% der Infarktpatienten nachweisbar ist (27). Bei der MVO kommt es u.a. durch Obstruktion der Kapillaren durch Zellkonglomerate und durch Trümmer aus der aufgerissenen arteriosklerotischen Läsion zu keiner Gewebedurchblutung, obwohl die Blutversorgung durch die zuvor obstruierte Arterie wiederhergestellt wurde (15).

All diese Mechanismen konvergieren entweder in eine direkte Zellschädigung, welche zur Nekrose der Herzmuskelzelle führt oder leiten über die Öffnung der mPTP den Zelltod ein (28, 29).

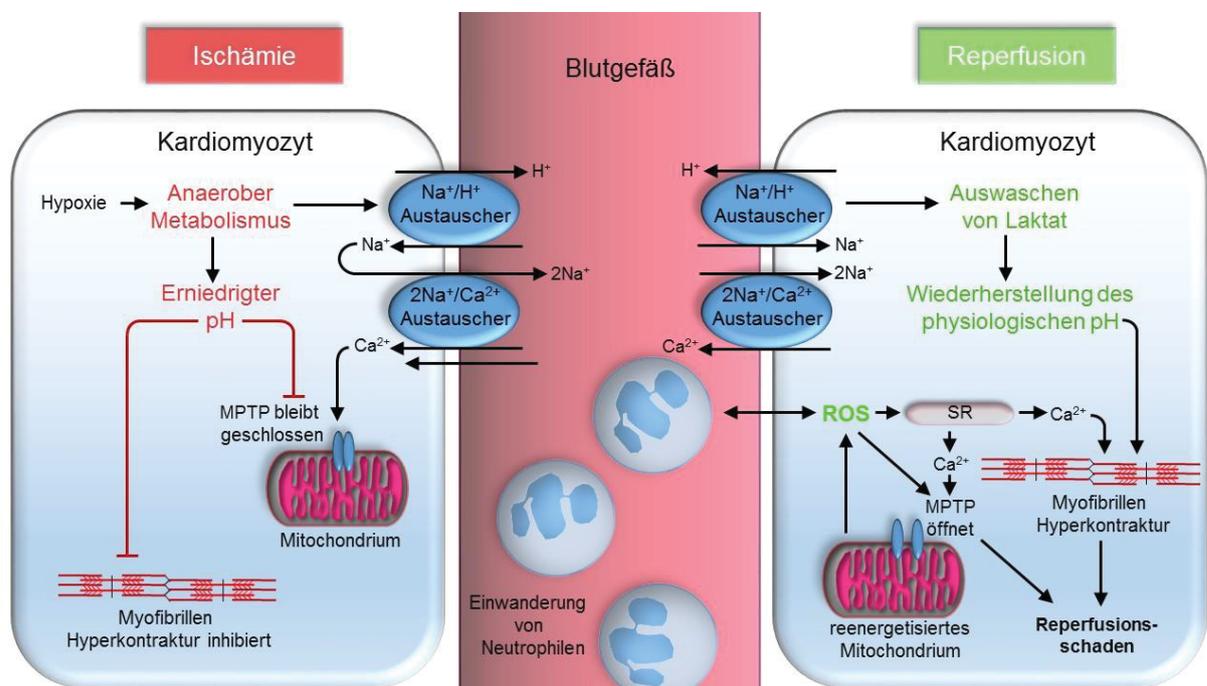


Abb. 2: Schematische Darstellung der wichtigsten molekularen Mechanismen des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens.

Während der akuten Ischämie findet aufgrund des Sauerstoffmangels ein anaerober Metabolismus statt, wobei Laktat produziert wird. Der daraus resultierende pH-Abfall führt dazu, dass H<sup>+</sup> dem Gradienten entsprechend, im Austausch gegen Na<sup>+</sup>, aus der Zelle ausgeschleust wird. Daraus resultiert eine intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Überladung. Aufgrund des Adenosintriphosphat (ATP)-Mangels kann die Na<sup>+</sup>-Überladung nicht ausgeglichen werden, sodass es über den 2Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher zu einer intrazellulären Kalziumüberladung kommt. Die azidotischen Verhältnisse verhindern zu diesem Zeitpunkt eine Öffnung der

mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP) und eine Hyperkontraktion der Myofibrillen. Während der Reperfusion wird die Atmungskette reaktiviert, wodurch rasch eine große Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) produziert wird. Durch die Xanthinoxidase der Endothelzellen und die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase der neutrophilen Granulozyten, welche in das Gewebe einwandern, fallen ebenfalls ROS an. ROS sind wichtige Mediatoren des myokardialen Reperfusionsschadens, da durch ihre direkte Einwirkung die mPTP geöffnet wird, die zu diesem Zeitpunkt nicht mehr refraktär ist, da die Azidose durch das wieder fließende Blut ausgewaschen wurde. ROS agieren zudem als chemischer Lockstoff für neutrophile Granulozyten, führen zur Dysfunktion des endoplasmatischen Retikulums, schädigen die Zellmembran und die DNA. Die Myofibrillen verlieren durch das Auswaschen der Azidose ebenfalls ihre Refraktion und beginnen unkontrolliert zu kontrahieren (Hyperkontraktion). Die Wiederherstellung des mitochondrialen Membranpotentials führt zur Verlagerung von Kalzium in die Mitochondrien, was ebenfalls die Öffnung der mPTP bewirkt. Einige Stunden nach Beginn der Reperfusion kommt es zur Entzündungsreaktion: Es akkumulieren neutrophile Granulozyten im reperfundierten Myokardgewebe als Reaktion auf die Ausschüttung von ROS, Zytokinen und aktiviertem Komplement. (Abbildung angelehnt an Hausenloy et al., 2013) (20)

### 1.1.2. Klinische Relevanz des Ischämie-Reperfusionsschadens

Die Mortalität des ST-Elevations Myokardinfarktes (STEMI) ist zum einen abhängig von den Risikofaktoren des Patienten, wie dem Alter oder Komorbiditäten (darunter vor allem Niereninsuffizienz, Diabetes, Herzinsuffizienz und Koronare Herzkrankheit) (30), zum anderen von bestimmten Faktoren der Behandlung - hier vor allem von der verstrichenen Zeit bis zur Reperfusion und der gewählten Behandlungsstrategie (31). Wichtig ist, dass Patienten mit einem größeren Infarkt ein erhöhtes Risiko für symptomatische Herzinsuffizienz und Tod aufweisen (32, 33). Die Infarktgröße ist dabei direkt mit der Mortalität assoziiert, so haben Patienten mit einer Infarktgröße <12% des linken Ventrikelmyokards eine Mortalität von beinahe 0 % über zwei Jahre während Patienten, die einen Infarkt von >12% des linken Ventrikelmyokards erleiden, eine 2-Jahres-Mortalität von 7 % aufweisen (33).

Der direkte Zusammenhang von Infarktgröße und verminderter myokardialer Pumpfunktion bis hin zur manifesten Herzinsuffizienz wurde erstmals von Pfeffer et al. am Rattenmodell beschrieben (34). So wiesen Ratten mit kleinen Infarkten (4-30 % des Myokards) kaum Funktionseinschränkungen auf, während Ratten, bei denen mehr als 46 % des Myokards betroffen waren, alle Einschränkungen einer manifesten Herzinsuffizienz aufwiesen, wie erhöhte ventrikuläre Füllungsdrücke, eine eingeschränkte Ejektionsfraktion sowie den Verlust der Fähigkeit adäquat auf Vor- und Nachlastschwankungen zu reagieren. Der Zusammenhang von Infarktgröße und Schweregrad der Herzinsuffizienz zeigte sich in diesem Fall direkt proportional (34). Therapien des I/R-Schadens sind also dann als erfolgreich anzusehen, wenn sie die Größe des Infarktareals zu reduzieren vermögen.

Etwa 40 % bis 50 % der endgültigen Infarktgröße beim Menschen sind auf den Effekt des Reperfusionsschadens zurückzuführen, der Rest ist das Ergebnis der Ischämie (35). Der ischämische Schaden kennt mit der Reperfusionstherapie, sei sie interventionell oder

medikamentös, bereits eine effektive Behandlungsmethode. Eine Effektivitätssteigerung ist in diesem Bereich nur noch durch eine weitere Verkürzung der Zeitspanne zwischen Ischämiebeginn und Reperfusion zu erreichen (31). Im Gegensatz dazu bietet der Reperfusionsschaden, wie die Ergebnisse der Kardioprotektion zeigen, noch ein großes, bisher nicht ausgeschöpftes, Potential zur Reduktion endgültiger Infarktgrößen. Die verschiedenen Formen der Kardioprotektion werden im Folgenden vorgestellt.

## 1.2. Kardioprotektion

Das Myokard durch endogene oder exogene Schutzmechanismen widerstandsfähiger gegen den I/R-Schaden zu machen, und damit die resultierende Infarktgröße zu verringern, ist das Ziel der Kardioprotektion (36).

Die bisher entwickelten Techniken der Kardioprotektion können in pharmakologische und nicht pharmakologische Therapien unterteilt werden. Die Zahl der getesteten Substanzen im Rahmen der pharmakologischen Konditionierung ist groß. Im folgenden Abschnitt werden zunächst einige Beispiele für pharmakologische Kardioprotektion vorgestellt. Im Anschluss wird in den Abschnitten 1.2.2 und 1.2.3 genauer auf die verschiedenen Formen der ischämischen Konditionierung eingegangen und ihre Bedeutung für die klinische Praxis näher beleuchtet.

### 1.2.1. Pharmakologische Kardioprotektion

Wichtige Beispiele für pharmakologische Substanzen, für die ein kardioprotektiver Effekt angenommen wird, sind unter anderem inhalative Anästhetika (37–39), Opiode (40), Nitrate (41), myokardiale Kalziumsensitivierer (42), Phosphodiesterasehemmer (43) oder Cyclosporin A (44).

Die inhalativen Anästhetika umfassen die Gruppe der volatilen Anästhetika wie beispielsweise Isofluran, Sevofluran oder Desfluran sowie das Edelgas Xenon. Für volatile Anästhetika konnte in experimentellen Studien ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden (37), während klinische Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (45, 46). Für das nicht anästhetisch wirkende Edelgas Helium konnte im experimentellen Setting ein protektiver Effekt gezeigt werden, indem die ischämiebedingte endotheliale Dysfunktion verringert werden konnte (38). Eine erste klinische Studie im herzchirurgischen Kontext, konnte jedoch keinen Effekt von Heliumapplikation auf die postoperative Konzentration von Biomarkern wie Troponin nachweisen (47). Hofland et al. konnten für Xenon einen ähnlichen Effekt wie für volatile Anästhetika nachweisen und eine Überlegenheit gegenüber propofolbasierter totaler intravenöser Anästhesie bezüglich der Freisetzung von Troponin im Anschluss an elektive koronararterielle Bypasschirurgie zeigen (39).

Auch für Opioide konnte vielfach ein kardioprotektiver Effekt gezeigt werden (40), welcher auch in klinischen Studien bestätigt werden konnte (48).

Nitrate schützen das Herz gegen endotheliale Dysfunktion (49). Im Rahmen elektiver herzchirurgischer Eingriffe konnte, bei Nitrat-naiven Patienten, ein positiver Effekt in Form verringerter postoperativer Biomarker nachgewiesen werden (41). Beim Einsatz während der nicht elektiven Angioplastie im Rahmen des akuten Myokardinfarkts war allerdings kein Effekt zu beobachten (50).

Für den Phosphodiesterasehemmer Milrinon konnte in experimentellen Studien ein kardioprotektiver Effekt gezeigt werden (51), doch aussagekräftige klinische Studien zu diesem Wirkstoff fehlen bislang. Für den Kalziumsensitivierer Levosimendan hingegen, konnte sowohl im experimentellen Umfeld eine Reduzierung des I/R-Schadens gezeigt werden als auch eine Verringerung kardialer Biomarker beim Menschen nach Bypasschirurgie (42, 52).

Dem gegenüber steht die nicht pharmakologische Konditionierung des Myokards, welche hauptsächlich die ischämische Konditionierung (IC) umfasst und im Folgenden näher ausgeführt werden soll.

### 1.2.2. Ischämische Konditionierung des Myokards

1986 machten Murry et al. die Entdeckung, dass kurze, wiederholte Ischämie- und Reperusionsperioden, durchgeführt vor einem länger andauernden Verschluss der Koronararterie, die endgültige Infarktgröße bei Hunden um durchschnittlich 75% zu reduzieren vermochten (53). Dieses Phänomen wird als „Ischämische Präkonditionierung“ (IPC) bezeichnet. Ischämische Präkonditionierung ist „[...] ein ubiquitärer, endogener protektiver Mechanismus auf zellulärer Ebene [...]“ (54, S. 569) (eigene Übersetzung, Originalzitat: „Ischemic preconditioning exerts robust and reproducible protection, and appears to be a ubiquitous endogenous protective mechanism at the cellular level that has been observed in the heart of every species tested“) der innerhalb eines Zeitfensters von etwa 3 bis 4 Stunden in der Lage ist, Infarktgrößen zu reduzieren (55). Zudem existiert ein sogenanntes „zweites Fenster“, ein Wiederauftreten des kardioprotektiven Effekts, wenn auch abgeschwächt, nach etwa 24 Stunden (56, 57).

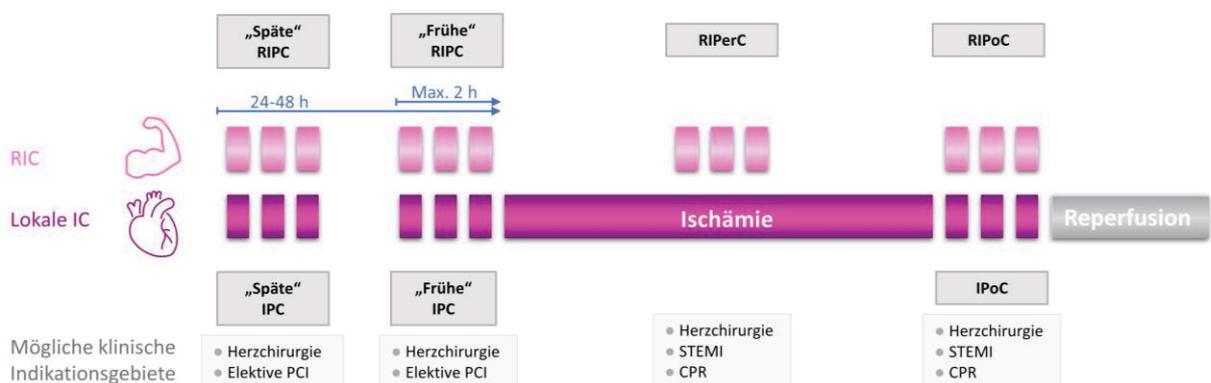
Zhao et al. konnten 2002 zeigen, dass auch ein während der Reperusionsphase applizierter Stimulus in der Lage ist, die Infarktgröße zu beeinflussen: Das „ischämische Postkonditionierung“ (IPoC) genannte Phänomen reduzierte die Infarktgröße im Hundemodell um 44 % (19), beim Menschen konnte eine Infarktgrößenreduktion von 18 bis 39 % beobachtet

werden (58–60). Durch diese Entdeckung konnte belegt werden, dass die Wirkmechanismen der IC mindestens teilweise in der Reperfusionphase zu suchen sind (61).

Neben dieser zeitlichen Unterscheidung in Prä- und Postkonditionierung, gibt es zudem eine räumliche Dimension: 1993 stellten Przyklenk et al. im Hundemodell fest, dass es zur Kardioprotektion ebenfalls dann kommt, wenn ein, dem Effektor fernes, Gewebe präkonditioniert wird. In dieser Studie führte ein, am *Ramus Circumflexus* der linken Koronararterie durchgeführtes, Konditionierungsprotokoll zu einer Kardioprotektion im Bereich des *Ramus Interventricularis Anterior* mit resultierender Infarktgrößenreduktion von 35 % (62).

Nachdem auch gezeigt werden konnte, dass ein an der Nierenarterie durchgeführtes Präkonditionierungsprotokoll zu einer Kardioprotektion führt (63, 64), konnten Birnbaum et al. 1997 zeigen, dass ein Präkonditionierungsprotokoll am *M. Gastrocnemius* am Nagetiermodell ähnlich kardioprotektiv wirkt (65). Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit, lediglich mithilfe einer einfachen Blutdruckmanschette, konnten Kharbanda et al. das Phänomen auf den Menschen übertragen, indem Sie zeigten, dass Präkonditionierung des rechten Unterarms eine endotheliale Dysfunktion im linken Unterarm nach 20-minütiger Ischämie verhindert. Sie zeigten zusätzlich, dass Präkonditionierung am Hinterlauf bei Schweinen zu einer Infarktgrößenreduktion von ca. 50 % führt (66).

Auch für die Fern-Konditionierung (*Remote Ischemic Conditioning* = RIC) konnte gezeigt werden, dass sie sowohl vor (*pre-*, RIPC) als auch nach (*post-*, RIPC) der Ischämieperiode erfolgreich angewendet werden kann (19, 62, 67). Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit, anders als bei der lokalen ischämischen Konditionierung, den Stimulus auch während der Ischämieperiode zu applizieren (*per-*, RIPC), was auch erfolgreich durchgeführt wurde (67). Abbildung 3 illustriert die verschiedenen Formen der IC.



**Abb. 3: Formen der ischämischen Konditionierung des Myokards**

Hier gezeigt sind die verschiedenen Formen der ischämischen Konditionierung im zeitlichen Verhältnis zur Ischämie und Reperfusion. Das „späte Fenster“ der Präkonditionierung die sowohl lokal als auch fern

durchgeführt werden kann liegt etwa 48 h nach dem Präkonditionierungsstimulus, während das „frühe Fenster“ wenige Minuten nach dem Präkonditionierungsstimulus beginnt und sich nach wenigen Stunden wieder schließt. Die ischämische Perkonditionierung erfolgt während der anhaltenden Ischämie und kann nur organfern durchgeführt werden, während die Postkonditionierung kurz nach Beginn der Reperfusion eingeleitet werden muss, um wirksam zu sein. Fern-Konditionierung (RIC); Ischämische Konditionierung (IC); Ischämische Fern-Präkonditionierung (RIPC); Ischämische Fern-Perkonditionierung (RIPerC); Ischämische Fern-Postkonditionierung (RIPoC); Ischämische Postkonditionierung (IPoC); Perkutane Koronarangioplastie (PCI); ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI); Kardiopulmonale Reanimation (CPR); Stunde (h); Minute (min); Angelehnt an Hausenloy et al. 2016 (57)

### 1.2.3. Bedeutung der ischämischen Konditionierung für die klinische Praxis

Wichtige klinische Situationen, bei denen es zu Myokardischämien kommt und in deren Kontext die Wirksamkeit der ischämischen Konditionierung untersucht wurde, sind vor allem der akute STEMI mit zeitnaher perkutaner Koronarangioplastie (PCI), die elektive PCI im Rahmen stabiler Koronarstenosen und herzchirurgische Eingriffe (68).

Im Rahmen des STEMI spielt die IPC und RIPC aufgrund der Unvorhersehbarkeit des Ereignisses keine Rolle, doch ist eine ischämische Fern-Konditionierung auch während des ischämischen Ereignisses wirksam (67). Dieses Prinzip machten sich die Autoren einer Studie zu Nutze, welche als erste den Nutzen eines RIPerC Protokolls, appliziert mithilfe einer Blutdruckmanschette am Oberarm des Patienten, untersuchten. Die Studie umfasste 333 Patienten, welche bei Verdacht auf STEMI noch auf dem Krankentransport zur Klinik konditioniert wurden. 30 Tage nach erfolgreicher PCI konnte in der konditionierten Patientengruppe mittels Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) ein myokardialer *Salvage*-Index von 0,75 im Vergleich mit 0,55 in der Kontrollgruppe gemessen werden (69). In einer *follow-up* Studie konnte nach 4 Jahren ebenfalls eine positive Wirkung auf die Auftretenswahrscheinlichkeit negativer klinischer Endpunkte (kardial und neurologisch) gezeigt werden (13,5% in der RIPerC Gruppe gegenüber 25,6 % in der Kontrollgruppe) sowie eine Reduktion der Sterbewahrscheinlichkeit im selben Zeitraum um 32 % (70).

Der Myokardschaden bei elektiver PCI unterscheidet sich von demjenigen, welcher bei STEMI auftritt in vielerlei Hinsicht. So ist dieser Myokardschaden in der Regel deutlich geringer ausgeprägt und räumlich weniger klar begrenzt. Die ihm zugrundeliegenden Mechanismen sind vor allem in der, in Abschnitt 1.1.1 bereits genauer ausgeführten, MVO durch Plaque-Trümmer sowie der Obstruktion derjenigen Gefäße, die in dem Bereich von der größeren Koronararterie abzweigen, in welchen der Stent eingebracht wird, zu sehen (sog. „*Jailing*“) (71, 72). Entsprechend lässt sich das Infarktausmaß auch nicht durch funktionale Bildgebung, sondern besser durch laborchemische Untersuchungen abschätzen, wobei sich der postinterventionelle Anstieg des Troponin-T im Serum bewährt hat (73).

Die bisher größte Studie zu diesem Thema war die „*Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting*“ = CRISP-Stent-Studie, in der 242 Patienten entweder eine RIPC- oder eine *Sham*-Prozedur erhielten und sich anschließend einer elektiven PCI unterzogen. Es konnte ein reduzierter Troponin-Anstieg, eine verringerte Inzidenz von ST-Streckenveränderungen und eine geringere Komplikationsrate gezeigt werden. Eine *follow-up* Studie nach 6 Monaten konnte zudem belegen, dass Patienten die RIPC erhalten hatten, in dieser Zeit ein signifikant geringeres Risiko aufwiesen zu sterben, einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall zu erleiden (74). In einer weiteren *follow-up* Studie nach 6 Jahren war dieser Effekt noch immer nachweisbar (75).

Am besten untersucht ist der Effekt der ischämischen Konditionierung während kardiochirurgischer Eingriffe. Die Planbarkeit der Eingriffe und die zugleich große Ischämiegefahr für das Myokard machen die Kardiochirurgie zum prädestinierten Feld für die Anwendung der RIPC. Zwei große, multizentrische Phase III Studien, welche den Effekt der RIPC in diesem Kontext quantifizieren wollten, konnten jedoch keinen positiven Effekt nachweisen. Die ERICCA Studie untersuchte 1612 Patienten, welche sich einer elektiven koronaren Bypassoperation im *On-Pump* Verfahren unterzogen (76). Die RIPHeart Studie untersuchte 1385 Patienten mit elektiven kardiochirurgischen Operationen (77). Beide Studien benutzten ein RIPC-Protokoll, welches mithilfe einer aufblasbaren Oberarmmanschette durchgeführt wurde. In keiner der beiden Studien konnte ein protektiver Effekt der RIPC auf Morbidität oder Mortalität der Patienten gezeigt werden. Diese Erkenntnisse widersprechen teilweise den Ergebnissen früherer, kleiner Studien (78–80). Es gibt Anzeichen dafür, dass Propofol, welches bei den meisten Patienten der ERICCA Studie und allen Patienten der RIPHeart Studie zur Anästhesie verwendet wurde, in der Lage ist, den Effekt der RIPC vollständig aufzuheben (81, 82).

Dies zeigt, dass es notwendig ist, zu verstehen wie der Effekt der RIPC auf zellulärer Ebene vermittelt wird, wenn die vielversprechenden Erkenntnisse aus experimentellen Studien in einen reproduzierbaren Vorteil für Patienten umgewandelt werden sollen. Im folgenden Abschnitt wird der aktuelle Wissensstand zusammengefasst dargestellt.

### 1.3. Molekulare Grundlagen der ischämischen Fern-Präkonditionierung

#### 1.3.1. Signalbildung und extrazelluläre Übertragungswege

Die extrazelluläre Übermittlung des RIC Signals bis zum Herzen scheint sowohl neuronale als auch humorale Anteile aufzuweisen (61). Bei der Generierung des Signals im peripheren Gewebe scheinen nozizeptive Nervenfasern eine bedeutende Rolle zu spielen. Neben dem klassischen

Stimulus, das bedeutet kurze subletale Ischämie- und Reperfusionen an einem peripheren Organ wie dem Skelettmuskel (83) oder dem Darm (64), kann auch eine Stimulation peripherer nozizeptiver Nervenfasern einen kardioprotektiven Effekt auslösen (84–86). Andersherum führt eine Behandlung mit Lidocain (84) oder Durchtrennung des versorgenden sensorischen Nervs zur Aufhebung des kardioprotektiven Effekts der RIPC (87). Die Frage, auf welchem Wege dieser neuronale Stimulus bis zum Herzen übermittelt wird, ist nicht abschließend geklärt (61).

Es gibt Evidenz dafür, dass humorale Faktoren in der Übermittlung des neuronalen Stimulus eine Rolle spielen: Isolierte Empfängerherzen zeigen eine Infarktgrößenreduktion, wenn sie mit einem Dialysat behandelt werden, das aus dem Blut eines Spenders gewonnen wird, welcher zuvor eine periphere Nervenstimulation mittels chemischer oder elektrischer Reizung erhielt (86, 87).

Darüber hinaus konnte Evidenz dafür gewonnen werden, dass eine Übermittlung des RIC Signals auf neuronalem Wege über das Rückenmark und das autonome Nervensystem stattfindet. Eine Durchtrennung des Rückenmarks auf Höhe der Segmente T7-T10 führt zur Aufhebung des RIPC Effekts (88, 84), während eine elektrische Stimulation des Rückenmarks auf Höhe C8-T2 einen kardioprotektiven Effekt produziert (89). Der Ganglienblocker Hexamethonium ist in der Lage, den kardioprotektiven Effekt der RIPC aufzuheben (64, 84). Gleiches gilt für eine Vagotomie oder die Gabe von Atropin (88, 90).

Durch die erfolgreiche RIPC von transplantierten und denervierten Herzen konnten Konstantinov et al. im Schweinmodell zeigen, dass ein oder mehrere humorale Faktoren in der Übertragung involviert sein müssen (91). Ebenso führt die Transfusion von Dialysat präkonditionierter Spender zu einer, der klassischen RIPC vergleichbaren, Kardioprotektion, sowohl innerhalb derselben (92) wie auch zwischen verschiedenen Spezies (93, 94).

Als potenzielle Mediatoren mit kardioprotektiven Eigenschaften konnten bereits viele, völlig unterschiedliche, blutgebundene Faktoren identifiziert werden. Zu diesen zählen unter anderem Adenosin (95), Nitrit (96), Erythropoietin (97), extrazelluläre Vesikel und mikro-RNAs (98, 99) oder endogene Opiode (100).

Adenosin scheint eine Rolle als Mediator in der Übertragung des Präkonditionierungssignals vom präkonditionierten Gewebe zum Herzen zu spielen. Bereits 1992 konnten Toombs et al. zeigen, dass Adenosininfusion während der Ischämiephase zu Kardioprotektion führt (95). Blockade des Adenosinrezeptors führt wiederum zur Aufhebung des RIPC-Effekts (101). Der Effekt scheint über die Proteinkinase C und die dadurch hervorgerufene Inhibition der mPTP vermittelt zu werden (102).

Nitrit spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Übertragung der RIPC vom peripheren Gewebe auf die Kardiomyozyten. Wie bereits erläutert, kommt es im Rahmen einer Ischämie zu Kalziumeinstrom in die hypoxischen Endothelzellen. Die erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert wiederum die kalziumabhängige endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase (eNOS), welche in erhöhtem Maße Stickstoffmonoxid (NO) produziert. Weiterhin werden durch die bei der Reperfusion auftretende Hyperämie Scherkräfte hervorgerufen, die die NO Produktion verstärken. Dieses wird anschließend zu Nitrit oxigeniert und zirkuliert mit einer Halbwertszeit von ca. 35 Minuten im Blut, wo es wiederum kontinuierlich zu NO zurückreduziert wird (103). Rassaf et al. konnten zeigen, dass RIPC die Konzentration von Nitrit im Plasma und im Kardiomyozyten steigert. In eNOS defizienten Mäusen war der kardioprotektive Effekt der RIPC wiederum vollständig aufgehoben. Durch exogene Zufuhr von Nitrit konnte ein mit der RIPC vergleichbarer kardioprotektiver Effekt erreicht werden (96).

Erythropoietin (EPO) ist nicht nur ein wichtiger Regulator der Erythrozytenproduktion sondern auch ein Mediator der RIPC. Oba et al. zeigten im Mausmodell, dass RIPC des Skelettmuskels mit verringerter Nierendurchblutung und konsekutiver EPO Produktion einhergeht. Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass EPO Hemmung mittels eines Antikörpers sowie renale Denervierung den RIPC-Effekt aufheben kann. Im Menschen führt RIPC ebenfalls zu verringerter Nierendurchblutung und erhöhten EPO Konzentrationen (97).

Gemeinsam ist den hier genannten extrazellulären Botenstoffen, dass Sie über die Bindung an Rezeptoren der Kardiomyozyten intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, deren Identifikation auch das Thema dieser Arbeit darstellt. Im folgenden Abschnitt werden daher die, für die RIPC wichtigsten, bisher bekannten intrazellulären Signalkaskaden vorgestellt.

### 1.3.2. Intrazelluläre Übertragungswege: Der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* Signalweg und die Proteinkinase B

Eine gemeinsame Endstrecke zahlreicher kardioprotektiver Interventionen ist der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* Signalweg (RISK), der auch bei der ischämischen Konditionierung eine wichtige Rolle spielt (104). RIC und IPoC gehen im Nagetiermodell regelhaft mit der Aktivierung der RISK Signalkaskade einher (105, 106). Beim Menschen konnte eine RISK Aktivierung durch Präkonditionierung von isolierten Myokardproben gezeigt werden, welche bei kardiochirurgischen Eingriffen gewonnen wurden (107). Während transiente RISK Aktivierung mit Zellprotektion assoziiert ist, hat die chronische Aktivierung einen deletären Effekt, indem sie das Myokard zur Hypertrophie anregt. Dies ist beispielsweise bei der chronischen Herzinsuffizienz der Fall (108).

Es konnte gezeigt werden, dass exogene kardioprotektive Agonisten, darunter Adenosin (109), Bradykinin (110), Opioide (111), Acetylcholin (112), Katecholamine (113), Angiotensin II (114), und ROS (115) zu einer Aktivierung von Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) über G-Protein gekoppelte Rezeptoren führen (116–118, 55). Auch Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) und der insulinartige Wachstumsfaktor 1 (IGF1) aktivieren den RISK Signalweg über ihre jeweiligen Rezeptoren (119, 120).

Beim RISK Signalweg wird über G-Protein gekoppelte Rezeptoren die PI3K aktiviert, welche ihrerseits, mit Umweg über die Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK), die Proteinkinase B (Akt) und die Extrazellulär-Regulierte Kinase (ERK) phosphoryliert und damit aktiviert (121, 106). Wachstumsfaktoren wie der IGF1 können über ihre eigenen Rezeptoren ERK und PI3K direkt aktivieren. Gemeinsame Endstrecke bilden die p30s6-Kinase und die Glykogen Synthetase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (106, 122). Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 4 dargestellt.

Über die Inhibition von GSK3 $\beta$  durch die p30s6-Kinase, kommt es zu einer Stabilisierung der Mitochondrien indem die Öffnungsschwelle der mPTP heraufgesetzt und die Einleitung des apoptotischen Zelltodes inhibiert wird (123–125).

Als weiterer Effektor dieses Signalweges konnte die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) identifiziert werden, welche zur Öffnung der mitochondrialen Adenosintriphosphat-abhängigen Kaliumkanäle (mKATP) führt. Dadurch kommt es zur Produktion von ROS und einer, damit einhergehenden, positiven Rückkopplung des protektiven Effekts (126).

Es konnte gezeigt werden, dass die RISK Aktivierung in zwei Phasen erfolgt: Während der Präkonditionierungszyklen und dann erneut während der frühen Reperfusionsperiode (106). Die kausale Bedeutung der einzelnen Komponenten des RISK Signalweges PI3K, Akt und GSK3 $\beta$  konnte sowohl für die IPC als auch für die IPoC nachgewiesen werden (105, 118). Für die RIPC ist die Evidenzlage jedoch noch lückenhaft.

Die Serin/Threoninkinase Akt ist mit ihren drei Subtypen Akt1, Akt2 und Akt3, das zentrale Bindeglied des RISK Signalwegs. Sie wird synonym auch als Proteinkinase B bezeichnet. Ihre Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch die Sequenz PI3K und PDK, um von hier aus eine große Zahl unterschiedlicher Signalwege anzustoßen (127).

### 1.3.3. Intrazelluläre Übertragungswege: Der *Survival Activating Factor Enhancement* Signalweg und der *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*

Der SAFE Aktivierungsweg stellt eine Entdeckung neueren Datums dar, die 2009 von Lecour et al. erstmals vorgeschlagen wurde (128, 129). Die Abkürzung SAFE steht für *Survival Activating Factor Enhancement* und umfasst den TNF $\alpha$  Rezeptor Subtyp 2, *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3, STAT5 und ferner STAT1 (128, 130). Auch Interleukin (IL) 6 (131) und EPO aktivieren diesen Signalweg über Januskinase (JAK) gekoppelte Rezeptoren (132).

STAT5 und STAT3 wurden beide in verschiedenen Modellen mit Kardioprotektion assoziiert. Sie scheinen jedoch in Menschen und Nagetieren gegenteilige Funktionen auszuüben: STAT5, und nicht STAT3-Aktivierung, ist mit Kardioprotektion beim Menschen assoziiert, während STAT3 Aktivierung (133) und möglicherweise STAT5 Inhibierung mit der Kardioprotektion in Nagetieren assoziiert ist (134).

In STAT3-defizienten Mäusen zeigt IPC keinen Effekt (135). Das Perfusat von präkonditionierten Spenderherzen führt zu STAT3-Aktivierung und Infarktgrößenreduktion bei Empfängerherzen (136). Aktivierung von STAT3 und TNF $\alpha$  Rezeptor Subtyp 2 sind ebenfalls zwingende Voraussetzungen für den kardioprotektiven Effekt der IPoC (129, 137).

Dabei vermittelt der SAFE Aktivierungsweg nicht nur eine langfristige Hochregulation der Transkription bestimmter kardioprotektiver Proteine (138), sondern auch eine akute Verbesserung der mitochondrialen Atmungskette (139). Wichtigster Effekt der SAFE Signalkaskade ist allerdings, und dort konvergieren die beiden Aktivierungswege SAFE und RISK, dass die mPTP in ihrer Öffnung inhibiert wird (123).

Das STAT5 Protein kann unterteilt werden in die Varianten STAT5a und STAT5b, welche zu 90 % identisch aufgebaut sind. Alle Proteine der STAT-Familie werden durch Phosphorylierung mittels der JAK aktiviert (140). STAT5 wird zusätzlich durch die PI3K aktiviert (141). Seine Rolle in der Kardioprotektion ist weniger klar etabliert als es für STAT3 der Fall ist. Seine Notwendigkeit für Kardioprotektion konnte anhand von Knockout-Mäusen, welchen das STAT5 Gen aus dem Erbgut entfernt wurde, nachgewiesen werden (141). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum Menschen, eine verringerte Phosphorylierung von STAT5 mit geringeren Infarktgrößen assoziiert ist (134, 142). In Zellkulturen aus Kardiomyozyten der Ratte, konnte in einer Studie zur Präkonditionierung mittels Dehydroascorbinsäure ebenfalls eine inhibierte STAT5 Phosphorylierung und vermehrte STAT3 Phosphorylierung nachgewiesen werden (143).

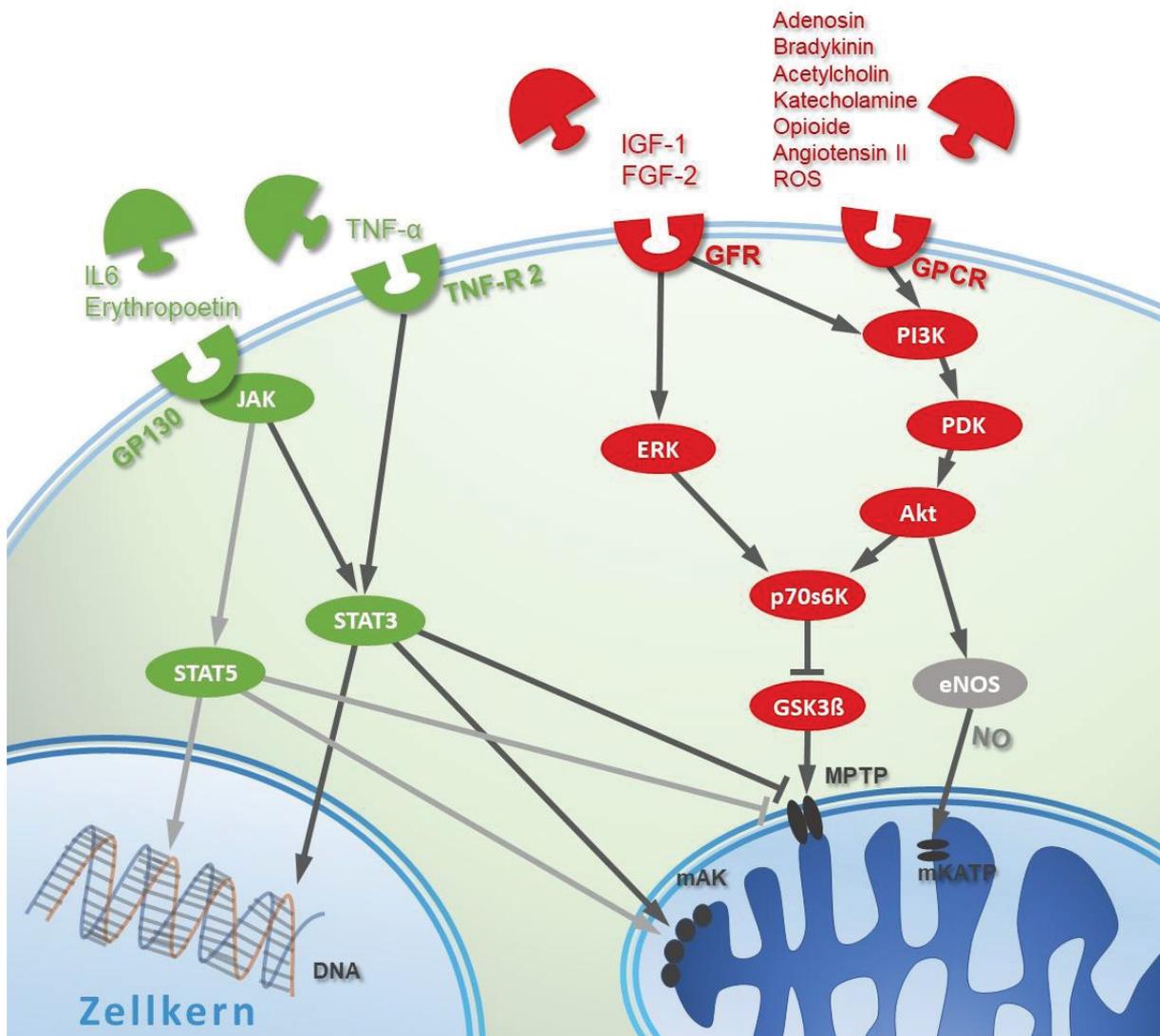


Abb. 4 Intrazelluläre Signalwege der ischämischen Konditionierung.

Vereinfacht dargestellt sind der *Survival Activating Factor Enhancement* (SAFE) Signalweg in Grün sowie der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) Signalweg in Rot. Wahrscheinliche, aber bisher noch nicht ausreichend belegte, Zusammenhänge sind hellgrau eingezeichnet. *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3 und 5 werden über die Januskinase (JAK) und STAT3 zusätzlich über den Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ )-Rezeptor 2 (TNF-R 2) aktiviert. Die Wirkungen sind sowohl kurzfristiger Natur wie eine Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette (mAK) und Inhibition der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore (mPTP) als auch mittelfristig als Transkriptionsfaktor. Der RISK Signalweg wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden aktiviert. Dies geschieht in der Mehrzahl der Fälle über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aber auch andere, wie unterschiedliche Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GFR). Es wird deutlich, dass der RISK Signalweg in einer Inhibition der GSK3 $\beta$  mündet. Ein Protein, das in aktiviertem Zustand die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP erhöht. Die MPTP wird auf diese Weise inhibiert. Dargestellt ist zudem die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) welche mittels der Herstellung von Stickstoffmonoxid (NO) die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Kaliumkanäle der inneren Mitochondrienmembran (mKATP) öffnet. Es kommt zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und konsekutiver positiver Rückkopplung des RISK Signalwegs. (Eigene Abbildung)

#### 1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit steht das Phänomen der ischämischen Fern-Präkonditionierung. Im Vergleich zur Konditionierung am selben Organ, muss bei dieser Form der Konditionierung

zusätzlich zur intrazellulären Signalbildung ein oder mehrere extrazelluläre Mediatoren hinzukommen, welche das Signal vom fernen Organ an die Kardiomyozyten übermitteln. Es ist möglich, aber keineswegs bewiesen, dass die intrazellulären Signalkaskaden im Effektororgan bei lokaler Konditionierung und Fern-Konditionierung dieselben sind (105). Der Großteil der Erkenntnisse zur intrazellulären Signalübertragung stammt aus lokalen Konditionierungsmodellen und ist in den Abschnitten 1.3.2 bis 1.3.4 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente lagen nur wenige Veröffentlichungen vor, die sich mit der Fragestellung beschäftigten, ob der, für die lokale ischämische Konditionierung etablierte, Signalweg RISK auch bei der ischämischen Fern-Präkonditionierung (RIPC) aktiv ist. Dies anhand des Aktivierungszustandes von AKT zu untersuchen, stellte das erste Ziel dieser Studie dar.

Während die Rolle von STAT3 im Rahmen des SAFE Signalwegs bei der ischämischen Fern-Präkonditionierung im Tiermodell bereits etabliert werden konnte (144), so wurde, bis zum Zeitpunkt dieser Studie, die Rolle von STAT5 noch nicht ausreichend beleuchtet. Wie bereits beschrieben, konnten Yamaura et al. zeigen, dass das Fehlen von STAT5 den Effekt der IPC aufhebt, was nahelegt, dass die Rolle von STAT5 wichtiger ist, als bisher angenommen (141). Es ist ebenfalls Ziel dieser Arbeit, einen Beitrag dazu zu leisten, diese Lücke zu schließen.

Die Fragestellung lautet zusammengefasst also wie folgt:

- Kommt es bei RIPC zu einer Aktivierung von Akt?
- Welchen Einfluss hat RIPC auf den Aktivierungszustand von STAT5? Kommt es unter RIPC zu einer Translokation von STAT5 in den Zellkern?

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die RIPC ein effektiver und effizienter Mechanismus, um den Schaden, den sowohl Ischämie wie auch Reperfusion am Myokard anrichten, zu limitieren. Bisher konnten die Erfolge aus der experimentellen Forschung in großen klinischen Studien oft nur teilweise oder gar nicht reproduziert werden. Die Erforschung der molekularen Grundlagen dieses Phänomens hat daher hohe Priorität, um diese Diskrepanzen zu erklären und eine Nutzbarmachung der RIPC für unsere Patienten zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Bovine Serum Albumin</i>	PAA Laboratories, Pasching
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
<i>Complete</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Coomassie Blue</i>	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
<i>Dried skimmed milk</i>	Roth, Karlsruhe
ECL Reagenz	Santa Cruz, Heidelberg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (unvergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folins Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kalium-Natrium-Tatrat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Fluka, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Destilliertes Wasser	Laboreigene Herstellung

Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Nonidet P40 substitute</i>	Fluka, Steinheim
Polyacrylamid (PAA) 30% / Rotiphorese	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) Base	Roth, Karlsruhe
<i>Tween</i>	Merck, Darmstadt

### 2.1.2. Lösungen

#### **Fraktionierung Gewebe**

Stammlösung	5 mM Sigma 7-9 pH 8
	50 mM NaF
	2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	2 mM EGTA
	100 ml Aqua dest.
Lysepuffer	10 ml Stammlösung
	400 µl <i>Complete</i>
	5 mM DTT

## Elektrophorese und Western blot

1,5 M TRIS-base	54,51g TRIS Base ad 300 ml Aqua dest. HCl pH 8,8
1,25 M Tris base	15,14 g TRIS Base ad 100 ml Aqua dest. HCl pH 6,8
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	5 g SDS ad 50 ml Aqua dest.
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	1 g APS ad 10 ml Aqua dest.
SDS Stopp Puffer	7 ml Aqua dest. 1 ml 1,25 M TRIS-Base, pH 6,8 2 ml Glycerol 1 g SDS 30 mg Bromphenolblau (0,5%)
<i>Running Buffer</i> (10 x)	30 g TRIS Base 144 g Glycin 10 g SDS 1 l Aqua dest.

*Transfer Buffer*

1,453 g TRIS Base

7,206 g Glycin

1000 ml Aqua dest.

*Coomassie Staining*

750 mg *Coomassie Blue*

25 ml Eisessig

112,5 ml Ethanol

112,5 ml Aqua dest.

Blotto 5 %

50 g *Dried skimmed milk*

1000 ml TBS-T

Blotto 1 %

Blotto 5% 1 : 5 mit TBS-T verdünnt

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit *Tween* (TBS-T)

6 g TRIS Base

22,2 g NaCl

2 ml *Tween*

HCl

ad 2 l Aqua dest.

pH 8

**Lowry - Proteinbestimmung**

Reagenz A

10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

500 ml 0,1 M NaOH

Reagenz B

2 g KNa - Taträt

ad 100 ml Aqua dest.

Reagenz C  
1 g Cu-Sulfat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )  
ad 100 ml mit Aqua dest.

Lösung 1  
20 ml Reagenz A  
200  $\mu\text{l}$  Reagenz B  
200  $\mu\text{l}$  Reagenz C

Lösung 2  
5 ml Folins Reagenz  
ad 5 ml Aqua dest.

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

96 Well F Microtestplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon -TM- Zentrifugenröhrchen	Corning, Corning (USA)
<i>Fiberpads</i>	Bio-Rad, München
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugen-Probeaufnahme Röhrchen	Beckman Instruments, Pao Alto (USA)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck-Millipore, Darmstadt

### 2.1.4. Antikörper

#### Primäre Antikörper

<b>Antikörper:</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Akt	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt am Main

GAPDH	1:5000	Maus	Abcam, Cambridge (UK)
Phospho-Akt (Ser <sup>473</sup> )	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Phospho-STAT 5 (Thy <sup>694</sup> )	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt am Main
STAT 5	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt am Main

#### Sekundäre Antikörper, an Peroxidase gekoppelt

<b>Antikörper:</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti- <i>Mouse</i>	1:10.000	Ziege	Jackson Immuno Research, West Grove (USA)
Anti- <i>Rabbit</i>	1:10.000	Esel	Jackson Immuno Research, West Grove (USA)

#### 2.1.5. Proteinstandard

Roti®-Mark *Prestained Protein Molecular Weight Marker* Roth, Karlsruhe

#### 2.1.6. Geräte

Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Transferkammer	Bio-Rad, München
Multi-Detektions-Reader für Mikropplatten (Synergy)	BioTek, Bad Friedrichshall
Spannungsquelle	Consort, Turnhout (Belgien)
Kamerasystem	Decon Science, Hohengandern
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Magnet-Rührplatte	H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach
Potter	IKA, Staufen
Schüttler	IKA, Staufen
Heizblock	neoLab, Heidelberg
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt
pH-Meter	WTW, Weiheim
Homogenisierer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter, Krefeld

#### 2.1.7. Computerprogramme

<i>Excel v16.0</i>	Microsoft, Redmond (USA)
<i>Gel-Pro<sup>®</sup> Analyzer v6.3</i>	Media Cybernetics, Rockville (USA)
<i>GelScan v6.0</i>	Bioscitech, Frankfurt am Main
<i>Gen 5 v1.11<sup>™</sup></i>	BioTek, Bad Friedrichshall
<i>Prism v8.4.3</i>	GraphPad Software, La Jolla (USA)

#### 2.1.8. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt. (AZ 8.87-50.10.37.09.148)

Es wurden ausschließlich männliche Ratten der Gattung *rattus rattus norvegicus* des Stammes Wistar aus hauseigener Zucht der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf genutzt.

## 2.2. Methoden

Im Rahmen der Gesamtstudie sind, den hier vorgestellten proteinbiochemischen Experimenten, einige Untersuchungsschritte vorausgegangen, die von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt und bereits an anderer Stelle veröffentlicht wurden (1, 145).

Diese vorangegangenen Untersuchungsschritte sind in den Abschnitten 2.2.1., 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben. Die vom Autor selbst durchgeführten proteinbiochemischen Analysen sind in den Abschnitten 2.2.4. bis 2.2.9. dargestellt.

Während die im ersten Teil verwendeten Gewebeproben für die hier vorliegende Studie angefertigt wurden, wurde für den zweiten Teil der Studie Herzgewebe verwendet, welches aus einer Vorgängerstudie von Brandenburger et al. (145) stammt, in der eine signifikante Verringerung der Infarktgröße nach RIPC im Vergleich zu den Kontrollherzen gezeigt werden konnte.

### 2.2.1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie dem aktuellen Leitfaden der *National Institutes of Health (NIH)* zur Haltung und Nutzung von Labortieren durchgeführt (146).

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital in einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht anästhesiert. Eine ausreichende Anästhesietiefe wurde durch Abwesenheit von Reaktion auf schmerzhafte Stimuli kontrolliert. Anschließend wurden die Tiere tracheal intubiert und die linke *Arteria Carotis* zur aortalen Druckmessung kanüliert. Die rechte *Vena Jugularis* wurde zur Infusion der Medikamente ebenfalls kanüliert. Beatmet wurde mittels eines Gasgemisches aus 30% Sauerstoff und 70% Stickstoff. Die Beatmung wurde mittels regelmäßiger Blutgasanalysen überwacht. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie diente eine kontinuierliche Infusion von Pentobarbital mit einer Rate von 40 mg/kg/h. Es wurde eine linksseitige Thorakotomie durchgeführt und eine Fadenschlinge um den *Ramus Interventricularis Anterior* (RIVA) der linken Koronararterie angelegt. Zum Erhalt der Normothermie wurden die Tiere auf einer Heizplatte gelagert und die Körpertemperatur kontinuierlich kontrolliert. Es folgte für alle Tiere eine 10-minütige Stabilisierungsphase vor Beginn des jeweiligen Protokolls (1).

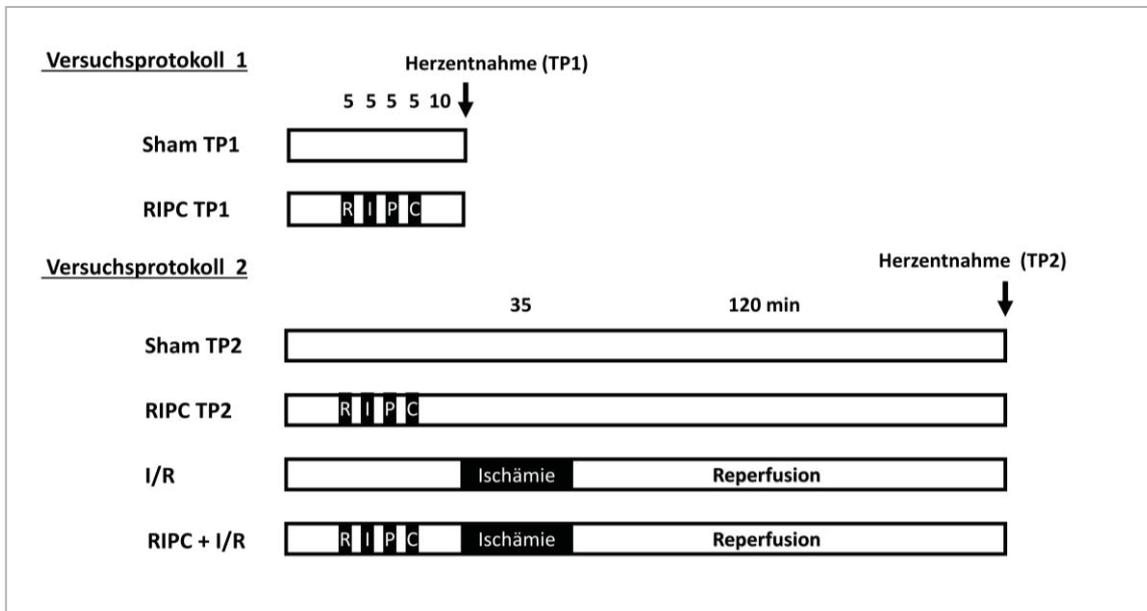
### 2.2.2. Versuchsprotokolle und Versuchsgruppen

Es wurden zwei Versuchsprotokolle durchgeführt. Das erste Versuchsprotokoll diente dazu, die relative Phosphorylierung von AKT und STAT5 unmittelbar nach RIPC zu untersuchen. Dazu wurden die für die Analyse benötigten Herzen 10 min nach *Sham*- oder RIPC-Behandlung exzidiert (TP 1). Die Versuchstiere wurden zufällig einer von zwei experimentellen Gruppen zugeteilt (n=6/Gruppe; Abb. 5). **RIPC TP1:** Die Tiere erhielten eine RIPC-Behandlung mit 4 Zyklen 5-minütiger Ischämie der Hinterbeine gefolgt von jeweils 5 Minuten Reperfusion. **Sham TP1:** Hier erhielten die Tiere eine synchronisierte Placebo-Intervention (*Sham*). Die RIPC-Behandlung wurde bilateral durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aufblasbare Manschetten an beiden Hinterläufen angebracht und zur Induktion der Ischämie für jeweils 5 Minuten auf 200 mmHg aufgeblasen und zur Einleitung der Reperfusion für wiederum jeweils 5 Minuten entlüftet. Für die *Sham*-Behandlung wurden die Manschetten an den Hinterbeinen angelegt, aber nicht aufgeblasen. 10 min nach Abschluss der jeweiligen Intervention wurden die Herzen exzidiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (1).

Das zweite Versuchsprotokoll diente dazu, die relative Phosphorylierung von Akt und STAT5 zu einem späteren Zeitpunkt nach RIPC und den Einfluss einer zwischenzeitlich erfolgten langanhaltenden Myokardischämie zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere randomisiert und vier verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet (n=6/Gruppe; Abb. 5). Die Interventionen wurden wie unter 2.1.1. beschrieben durchgeführt und die Herzen 165 Minuten nach der RIPC oder *Sham*-Intervention entnommen. Die Gruppen erhielten folgende Interventionen: **Sham TP2:** Diese Gruppe erhielt eine *Sham*-Intervention, anschließend wurde die chirurgische Präparation wie beschrieben durchgeführt, die Fadenschlinge aber nicht zugezogen und keine Ischämie induziert. **RIPC TP2:** Es wurde eine RIPC Intervention wie oben beschrieben durchgeführt, nach chirurgischer Präparation wurde auch hier die Fadenschlinge nicht zugezogen und keine Myokardischämie induziert. **I/R:** Die Versuchstiere erhielten eine *Sham*-Intervention. Nach einer zehnminütigen Stabilisierungsphase wurde die, um den RIVA gelegte, Fadenschlinge zugezogen und eine 35 Minuten andauernde Myokardischämie induziert. Anschließend wurde der Blutfluss wieder frei gegeben und die Herzen einer 120-minütigen Reperfusion ausgesetzt. **RIPC + I/R:** In dieser Versuchsgruppe erhielten die Tiere ein RIPC Protokoll und anschließend eine 35-minütige Myokardischämie gefolgt von einer 120-minütigen Reperfusion (1).

In den Gruppen I/R und RIPC + I/R wurde der RIVA nach Abschluss der 120-minütigen Reperfusion erneut verschlossen und es wurden 5 ml *Evans*-Blau-Lösung intravenös injiziert. Dadurch wurde das Myokardgewebe, mit Ausnahme des Gefäßterritoriums des RIVA, blau eingefärbt. Die AAR konnte dadurch makroskopisch identifiziert und exzidiert werden. Für die Analysen wurde in

diesen Gruppen nur das Gewebe der AAR benutzt. In den Gruppen die keine I/R erhielten wurde das gesamte Myokardgewebe verwendet. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (1).



**Abb 5: Versuchsprotokolle *in vivo***

Es wurden 2 Versuchsprotokolle durchgeführt. Das erste Versuchsprotokoll umfasst zwei Gruppen (n=6/Gruppe): Die Herzen wurden 10 Minuten nach Ende der jeweiligen Intervention entnommen (TP1). Tiere der ersten Versuchsgruppe (RIPC TP1) erhielten mittels einer aufblasbaren Manschette am Hinterlauf eine RIPC Behandlung (4x5 Minuten Ischämie gefolgt von 5 Minuten Reperfusion). Die zweite Versuchsgruppe (*Sham* TP1) erhielt eine zeitlich analoge Placebo-Behandlung (*Sham*). Das zweite Versuchsprotokoll umfasst vier Versuchsgruppen (n=6/Gruppe). Die Herzen wurden 165 Minuten nach RIPC bzw. *Sham* entnommen. Zwei Gruppen erhielten, analog zum ersten Protokoll, eine RIPC-, zwei weitere eine entsprechende *Sham* Intervention. Anschließend wurden die Tiere thorakotomiert und, mittels einer um den *Ramus Interventricularis Anterior* gelegten Fadenschlinge, eine Myokardischämie von 35 Minuten induziert (I/R und RIPC + I/R) oder eine analoge Placebo-Intervention durchgeführt (*Sham* TP2 und RIPC TP2). RIPC = Ischämische Fernpräkonditionierung, I/R = Ischämie/Reperfusion.

### 2.2.3. Proteinextraktion und Fraktionierung

Vom gefrorenen Herzgewebe wurden etwa 50 mg Gewebe abgetrennt und im Verhältnis 1:10 mit Lysepuffer übergossen. Die Gewebe- und Zellstrukturen wurden anschließend mithilfe eines mechanischen Homogenisators aufgetrennt.

Im Anschluss wurde eine Auftrennung der homogenisierten Gewebeproben in die Zellkompartimente Kern, Mitochondrien, Zytosol und Membran-lösliche Proteine durchgeführt. Dies wurde durch eine Reihe aufeinanderfolgender Zentrifugationsschritte mit wiederholter Abschöpfung des Überstands und Resuspension der erhaltenden *Pellets* in Lyse-Puffer erreicht.

Nach einem ersten Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 600 g wurde aus dem erhaltenen *Pellet*, durch Resuspension in Lysepuffer, die Kernfraktion gewonnen. Der erhaltene Überstand

wurde einem zweiten Zentrifugationsschritt von 15 Minuten Dauer bei 15.000 g zugeführt. Im Anschluss daran wurde aus dem erhaltenen *Pellet*, durch Resuspension in Lysepuffer, die mitochondriale Fraktion gewonnen. Anschließend wurde der Überstand in, zur Ultrazentrifugation geeignete, Röhrchen umgefüllt und durch Zugabe von Lyse-Puffer austariert. Es folgte eine Zentrifugation von einer Stunde bei 100.000 g. Der Überstand wurde abgeschöpft, um die zytosolische Fraktion zu erhalten. Die erhaltenen *Pellets* wurden mit jeweils 100 µl Lyse-Puffer unter Zusatz von 1 % Triton resuspendiert und, nach einer 60-minütigen Inkubation auf Eis, erneut 15 Minuten lang bei 10.000 g zentrifugiert. Um die Fraktion der Membran-löslichen Proteine zu erhalten, wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß übertragen, die *Pellets* wurden verworfen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt (1). Zur weiteren Analyse wurden ausschließlich die Zytosol- und Kernfraktion verwendet.

#### 2.2.4. Proteinbestimmung

Um für jede Probe die gleiche Menge Protein bei der Gelelektrophorese auftragen zu können, wurden die Proteinkonzentrationen photometrisch, nach der durch Lowry et al., etablierten Methode, bestimmt (147). Hierbei macht man sich die Biuret-Reaktion zu Nutze, bei der die Proteine in alkalischer Lösung mit zweifach positiv geladenen Kupferionen Komplexe ausbilden. Hierzu wurden 5 µl der Probenlösung mit 495 µl Aqua dest. verdünnt, 100 µl dieser verdünnten Lösung mit 500 µl der Lösung 1 (siehe 2.1.2) versetzt und 10 Minuten inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 50 µl der Lösung 2 werden die zweifach positiv geladenen Kupferionen zu einfach positiv geladenen Kupferionen reduziert und bilden mit dem in Lösung 2 enthaltenen Folin's-Reagenz eine violette Färbung, deren Extinktion photometrisch gemessen werden kann. Die Extinktion der zu untersuchenden Proteinlösung wurde mit der Extinktion von Standardlösungen mit bekannter Proteinkonzentration verglichen.

Die Extinktion wurde maschinell, mittels eines Multi-Detektions-Readers für Mikroplatten der Firma BioTek (Winooski, Vermont, USA), gemessen. Als Standard diente eine Messreihe von Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen in aufsteigender Konzentration von 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 und 2,0 mg/ml. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Proben durch Verdünnung mit Lysepuffer untereinander angeglichen (1).

#### 2.2.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewendet (148). Es wurden diskontinuierliche

Gele, bestehend aus einem Trenngel mit einem Polyacrylamidgehalt von 7,5% sowie einem Sammelgel mit einem Polyacrylamidgehalt von 5%, mit 10 oder 15 Probensammeltaschen verwendet. Im Vorfeld der Elektrophorese wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit *Loading-Puffer*, bestehend aus Mercaptoethanol und SDS Stopp-Puffer im Verhältnis 1:10, vermischt. Es folgte eine Erwärmung auf 95°C für 5 Minuten im Heizblock. Anschließend wurden die Gele in die mit *Running-Puffer* gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht und die zu analysierenden Proben, mit Proteinmengen von 30 µg oder 50 µg, mithilfe einer Pipette eingefüllt.

Die Elektrophorese wurde im Anschluss mit einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 400 mA für eine Dauer von etwa 85 Minuten durchgeführt (1).

#### 2.2.6. Western-Blot

Die Proteine wurden im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung mithilfe des durch Towbin et al. etablierten *Western-Blotting* Verfahrens auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen (149). Die Membranen wurden vor dem Transfer in Methanol aktiviert.

Die Gele und Membranen wurden in eine Transferkammer eingelegt. Die Membran wurde dabei blasenfrei auf das Gel aufgelegt und Gel und Membran beidseits von jeweils drei Lagen Filterpapier und abschließend jeweils einem *Fiberpad* umschlossen. Dies wurde in einer Plastikkassette fixiert und so in eine Wanne mit 4°C kalten Transfer-Puffer eingehängt, dass die Membran kathodenseitig des Gels zu liegen kam. Der Puffer wurde während des gesamten Transfervorgangs mithilfe eines Kühlelements gekühlt. Der Transfer wurde mit einer Stromstärke von 280 mA über 60 Minuten durchgeführt.

Die Gele wurden anschließend mit *Coomassie Staining-Lösung* gefärbt und die schwachen Proteinbanden durch Waschen mit Leitungswasser sichtbar gemacht. Dies diente der optischen Kontrolle der regelrechten Wanderung der Proteine. Im Anschluss wurden die Gele verworfen.

Die PVDF-Membranen wurden im Anschluss in 5%iger Blotto Lösung eingelegt, um ungesättigte Proteinbindungsstellen mit für den Antikörper nicht erkennbaren Proteinen zu sättigen, sodass eine nachträgliche Kontamination der Membran vermieden wurde.

Um die nachzuweisenden Proteine zu markieren, wurden die in Kapitel 2.1.4 aufgeführten primären Antikörper in der dort angegebenen Verdünnung in 1% Blotto benutzt. Hierzu wurde die Membran, im Anschluss an einen 45-minütigen Waschvorgang mit zweimaligem Austausch der Waschflüssigkeit, für mindestens 10 Stunden bzw. über Nacht mit der Antikörper-Lösung bei 4°C inkubiert. Zum Waschen der Membranen wurde Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit *Tween 2%* (TBS-T) verwendet.

Die Membranen wurden im Anschluss an einen erneuten, wie oben beschriebenen, Waschvorgang, mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper in der, im Kapitel 2.1.4 aufgeführten Verdünnung in 1% Blotto, für 2h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen erneut, wie oben beschrieben, gewaschen (1).

#### 2.2.7. Chemolumineszenz-Detektion

Jede gewaschene Membran wurde vor dem Detektionsvorgang eine Minute lang mit *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Reagenz bedeckt, dann in eine lichtundurchlässige Kammer eingebracht und mithilfe eines hochempfindlichen Digital-Kamerasystems abgelichtet. Die Belichtungszeiten betragen hierbei zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten. Die sehr unterschiedlichen Belichtungszeiten ergeben sich aus den sehr unterschiedlichen Signalstärken der Proben für die verschiedenen primären Antikörper und wurden so gewählt, dass sich das beste Verhältnis von Signalstärke zu Artefaktbildung ergab (1).

#### 2.2.8. Auswertung der Daten und Statistik

Die erstellten Bilder wurden im 8 Bit Format gespeichert und invertiert, dann mit dem Programm GelScan<sup>®</sup> von Bioscience<sup>®</sup> densitometrisch ausgewertet. Die entsprechenden Daten wurden in Microsoft<sup>®</sup>-Excel eingefügt. In Excel wurden die Werte der zu bestimmenden Banden mit den Werten der korrespondierenden Banden des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) derselben Membran korrigiert. Auf diese Weise konnten Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge zwischen den Proben ausgeglichen werden.

Um den Phosphorylierungsgrad der Proteine zu ermitteln, wurde die Menge der phosphorylierten Form mit der Gesamtmenge des Proteins korrigiert. Anschließend wurden die Werte auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normiert, sodass die Kontrollgruppe stets den Mittelwert 1 erhielt.

Um die Gesamtmenge eines Proteins zu analysieren, wurden die mit GAPDH korrigierten Werte der Gesamtmenge des Proteins ebenfalls auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normiert.

Anschließend wurden die so erhaltenen Werte zur vergleichenden statistischen Analyse und graphischen Darstellung in das Programm GraphPad<sup>®</sup> Prism eingefügt.

Für die Datensätze wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests mit *Welch's*-Korrektur geprüft (1).

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Relative Phosphorylierung von Akt

In der vorliegenden Studie wurde die Phosphorylierung von Akt an Ser473, 10 bzw. 165 Minuten nach Abschluss des RIPC Protokolls sowohl mit als auch ohne zwischenzeitliche I/R bestimmt.

Zum Zeitpunkt TP1 konnte keine signifikante Differenz in der relativen Phosphorylierung von Akt in der Interventionsgruppe RIPC TP1 gegenüber der Kontrollgruppe *Sham* TP1 festgestellt werden ( $0,93 \pm 0,73$  gegenüber  $0,71 \pm 0,57$ ;  $P=0,57$ ). (1) In der Abbildung 6 A sind die Ergebnisse graphisch aufgetragen.

Zum Zeitpunkt TP2 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die relative Phosphorylierung unterschied sich weder zwischen der Interventionsgruppe RIPC TP2 und ihrer Kontrollgruppe *Sham* TP2 signifikant ( $0,15 \pm 0,12$  gegenüber  $0,13 \pm 0,05$ ;  $P=0,77$ ) (1), noch zwischen der Interventionsgruppe RIPC + I/R und ihrer Kontrollgruppe I/R ( $1,36 \pm 1,07$  gegenüber  $1,12 \pm 1,30$ ;  $P=0,300$ ) (1). Die Ergebnisse des Zeitpunkts TP2 sind in den Abbildungen 6 B und 6 C graphisch dargestellt.

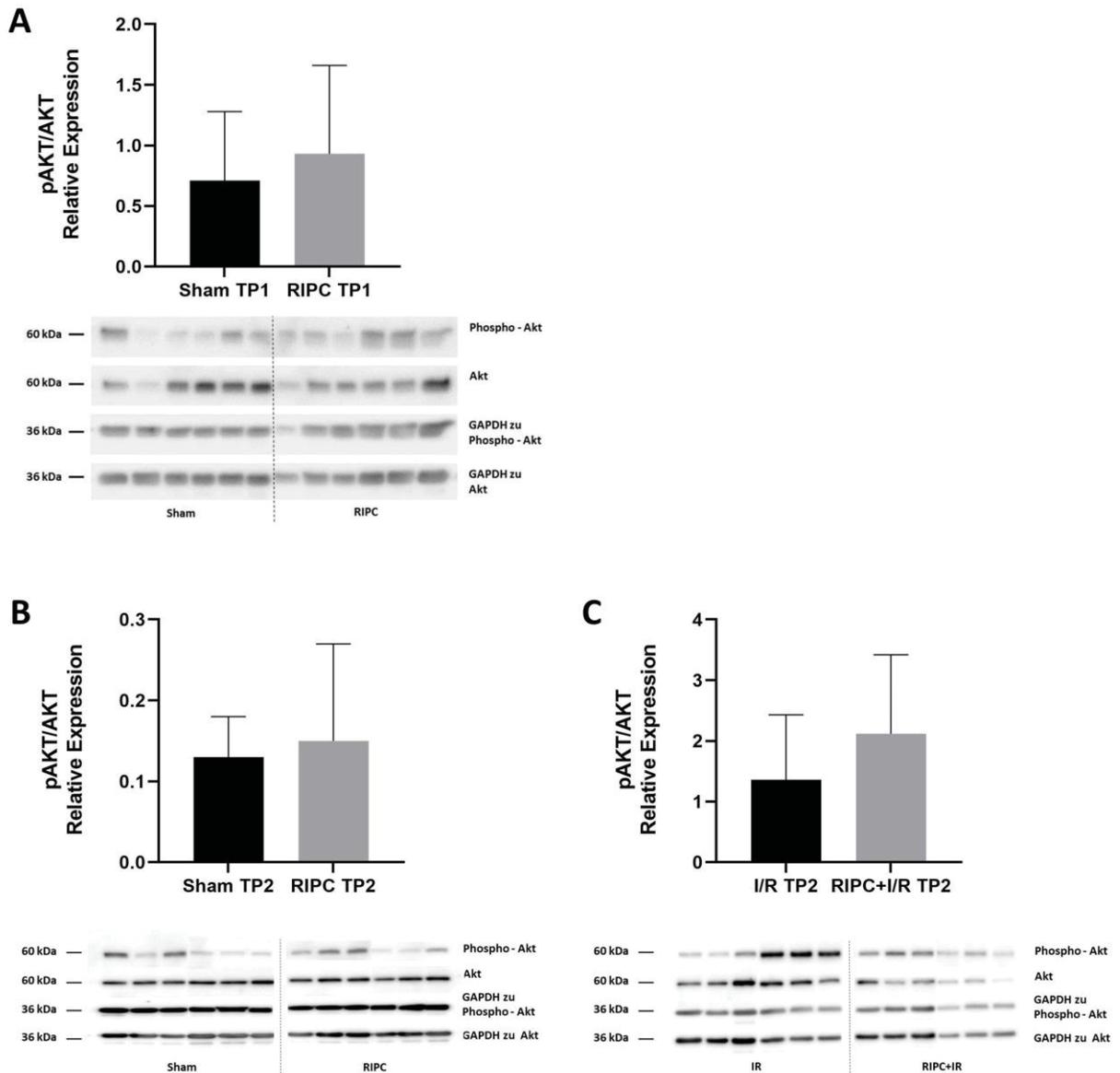


Abb. 6 Relative Expression der phosphorylierten Form von Akt (pAKT) Hier graphisch aufgetragen sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur relativen Expression der phosphorylierten Form von Akt (pAKT) im Zytosol im Verhältnis zur Expression von Akt insgesamt. Unter den Graphiken sind die zugehörigen Western Blot-Banden exemplarisch abgebildet. Links der Banden ist die Proteingröße in Kilodalton (kDa) angegeben, rechts der Banden ist angegeben, welches Protein mittels Antikörper sichtbar gemacht wurde.

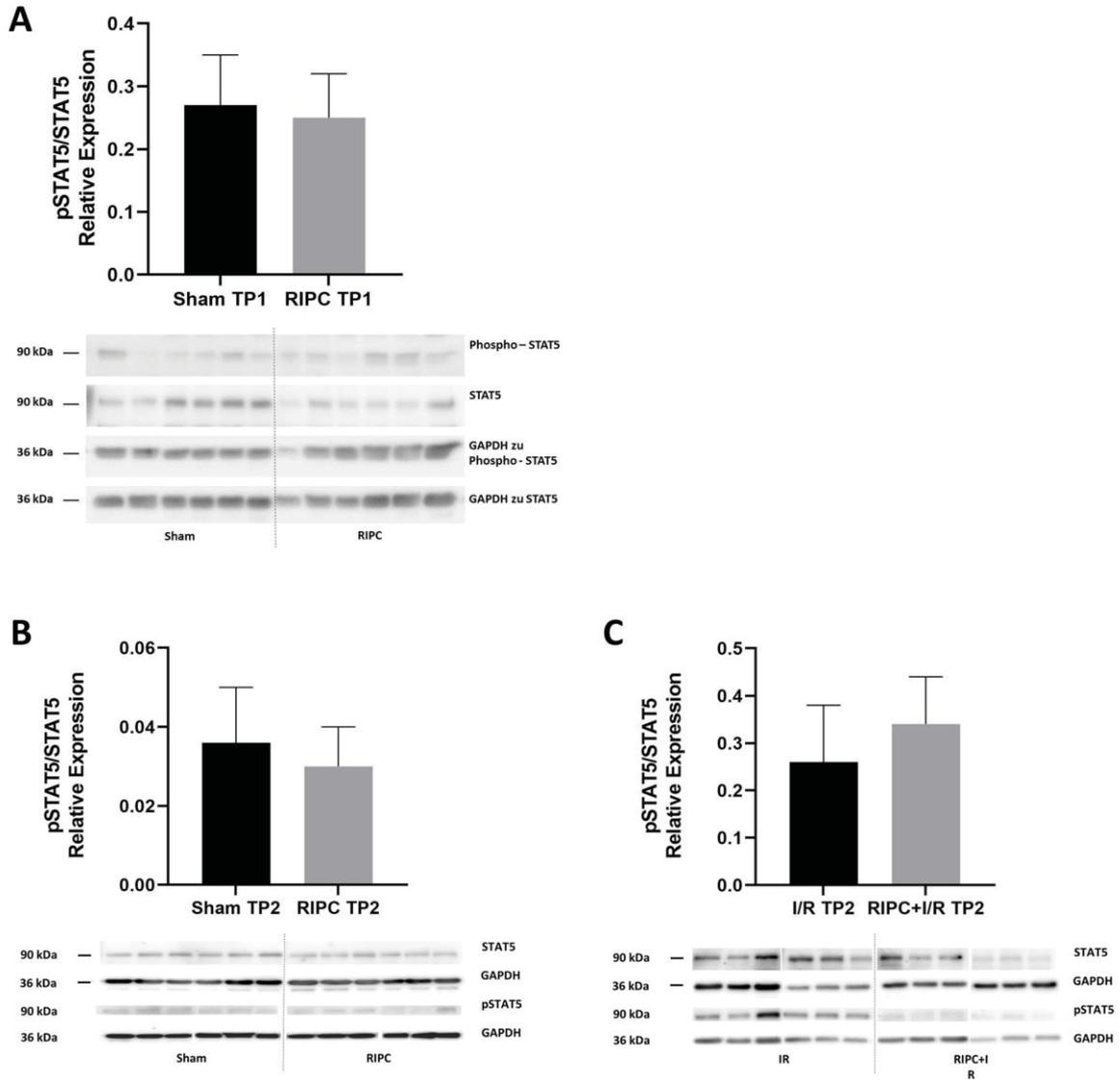
**Teilabbildung A** zeigt die relative Expression von pAKT der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP1 im Vergleich. Mittelwert: (MW) 0,93 und Standardabweichung: (SD)  $\pm 0,73$  für RIPC gegenüber MW: 0,71 und SD:  $\pm 0,57$  für Sham;  $P=0,57$  (1). **Teilabbildung B** zeigt die relative Expression von pAKT der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 0,15; SD:  $\pm 0,12$  für RIPC gegenüber MW: 0,13; SD:  $\pm 0,05$  für Sham;  $P=0,77$  (1). **Teilabbildung C** zeigt die relative Expression von pAKT der Versuchsgruppen I/R und RIPC + I/R zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 1,36; SD:  $\pm 1,07$  für RIPC I/R gegenüber MW: 1,12; SD:  $\pm 1,30$  für I/R;  $P=0,300$  (1). RIPC: Versuchsgruppe, an welcher ein Protokoll für ischämische Fern-Präkonditionierung durchgeführt wurde; Sham: Kontrollgruppe, die stattdessen eine Placebo-Intervention erhielt; I/R: Kontrollgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach Vorbehandlung mit einer Sham-Prozedur, RIPC + I/R Versuchsgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach vorheriger Behandlung mit einem RIPC Protokoll; TP1: Erster Zeitpunkt der Gewebeentnahme 10 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur; TP2: Zweiter Zeitpunkt der Gewebeentnahme 165 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

### 3.2. Relative Phosphorylierung von STAT5

Neben Akt wurde für dieselben Versuchsgruppen auch die relative Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (Phosphorylierungsstelle Thy694) untersucht.

Zum Zeitpunkt TP1 konnte kein signifikanter Unterschied in der relativen Phosphorylierung zwischen den Versuchsgruppen RIPC TP1 und *Sham* TP1 gezeigt werden ( $0.27 \pm 0.08$  gegenüber  $0,25 \pm 0,07$ ;  $P=0,70$ ) (1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 A graphisch dargestellt.

Auch zum Zeitpunkt TP2 konnte keine Aktivierung von STAT5 in den Interventionsgruppen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe gezeigt werden. So unterschied sich die Phosphorylierung zwischen den Versuchsgruppen RIPC TP2 und *Sham* TP2 ( $0.03 \pm 0.01$  gegenüber  $0,036 \pm 0,014$ ;  $P=0.17$ ) (1) wie auch zwischen den Versuchsgruppen RIPC + I/R und I/R ( $0,26 \pm 0,12$  gegenüber  $0,34 \pm 0,10$ ;  $P=0,22$ ) (1) nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 B und 7 C dargestellt.

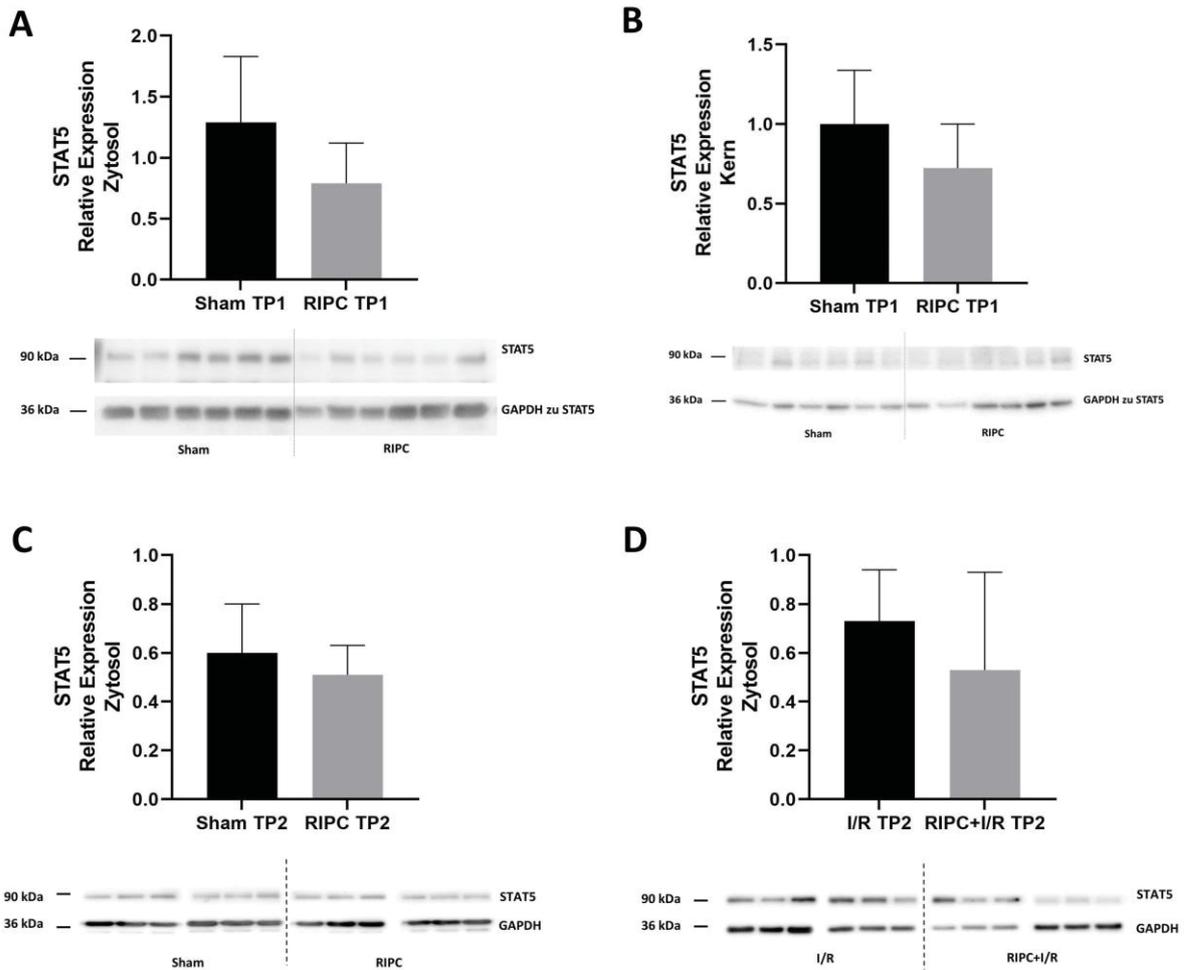


**Abb. 7** Relative Expression der phosphorylierten Form von STAT5 (pSTAT5) Hier graphisch aufgetragen sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur relativen Expression der phosphorylierten Form von STAT5 (pSTAT5) im Zytosol im Verhältnis zur Expression von STAT5 insgesamt. Unter den Graphiken sind die zugehörigen Western Blot-Banden exemplarisch abgebildet. Links der Banden ist die Proteingröße in Kilodalton (kDa) angegeben, rechts der Banden ist angegeben, welches Protein mittels Antikörper sichtbar gemacht wurde. **Teilabbildung A** zeigt die relative Expression von pSTAT5 der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP1 im Vergleich. Mittelwert: (MW) 0,27 und Standardabweichung: (SD)  $\pm 0,08$  für Sham;  $P=0,70$  (1). **Teilabbildung B** zeigt die relative Expression von pSTAT5 der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 0,036; SD  $\pm 0,014$  für Sham;  $P=0,17$  (1). **Teilabbildung C** zeigt die relative Expression von pAKT der Versuchsgruppen I/R und RIPC + I/R zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 0,34; SD  $\pm 0,10$  für RIPC I/R gegenüber MW: 0,26; SD  $\pm 0,12$  für I/R;  $P=0,22$  (1). RIPC: Versuchsgruppe, an welcher ein Protokoll für ischämische Fern-Präkonditionierung durchgeführt wurde; Sham: Kontrollgruppe, die stattdessen eine Placebo-Intervention erhielt; I/R: Kontrollgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach Vorbehandlung mit einer Sham-Prozedur, RIPC + I/R: Versuchsgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach vorheriger Behandlung mit einem RIPC Protokoll; TP1: Erster Zeitpunkt der Gewebeentnahme 10 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur; TP2: Zweiter Zeitpunkt der Gewebeentnahme 165 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

### 3.3. Relative Expression von STAT5

Um, wie einleitend dargestellt, der Eigenschaft STAT5 als Transkriptionsfaktor gerecht zu werden, wurde neben der relativen Phosphorylierung ebenfalls die Translokation von STAT5 aus dem Zytosol in den Nukleus untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellkompartimente, wie im zweiten Kapitel beschrieben, aufgetrennt und die relative Expression von STAT5 separat untersucht.

Zum Zeitpunkt TP1 konnte im Zytosol keine signifikante Reduktion der relativen Expression von STAT5 zwischen Interventionsgruppe RIPC TP1 und Kontrollgruppe *Sham* TP1 gezeigt werden ( $0,79 \pm 0,33$  gegenüber  $1,29 \pm 0,54$ ;  $P=0,09$ ). Es konnte darüber hinaus auch keine signifikante Erhöhung des Expressionslevels in der entsprechenden Kernfraktion gefunden werden ( $1,0 \pm 0,34$  gegenüber  $0,72 \pm 0,28$ ;  $P=0,15$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 A und 8 B dargestellt. Zum Zeitpunkt TP2 konnte ebenfalls keine signifikante Reduktion der relativen Konzentration von STAT5 zwischen den Gruppen RIPC TP2 und *Sham* TP2 ( $0,51 \pm 0,12$  gegenüber  $0,60 \pm 0,20$ ;  $P=0,38$ ) sowie zwischen den Gruppen RIPC + I/R und I/R ( $0,53 \pm 0,40$  gegenüber  $0,73 \pm 0,21$ ;  $P=0,31$ ) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 C und 8 D graphisch dargestellt.



**Abb. 8 Relative Expression von STAT5 im Zytosol und Kern der Kardiomyozyten** Hier graphisch aufgetragen sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur relativen Expression von STAT5 in Kern und Zytosol. Unter den Graphiken sind die zugehörigen Western Blot-Banden exemplarisch abgebildet. Links der Banden ist die Proteingröße in Kilodalton (kDa) angegeben, rechts der Banden ist angegeben, welches Protein mittels Antikörper sichtbar gemacht wurde. **Teilabbildung A** vergleicht die relative Expression von STAT5 der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP1 im Zytosol. Mittelwert: (MW) 0,79 und Standardabweichung: (SD)  $\pm 0,33$  für RIPC gegenüber MW: 1,29 und SD:  $\pm 0,54$  für Sham;  $P=0,09$ . **Teilabbildung B** vergleicht die relative Expression von STAT5 der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP1 im Kern: MW: 0,72; SD  $\pm 0,28$  für RIPC gegenüber MW: 1,0; SD  $\pm 0,34$  für Sham;  $P=0,15$ . **Teilabbildung C** zeigt die relative Expression von pSTAT5 der Versuchsgruppen Sham und RIPC zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 0,51; SD:  $\pm 0,12$  für RIPC gegenüber MW: 0,60; SD:  $\pm 0,20$  für Sham;  $P=0,38$ . **Teilabbildung D** zeigt die relative Expression von pAKT der Versuchsgruppen I/R und RIPC + I/R zum Zeitpunkt TP2 im Vergleich. MW: 0,53; SD:  $\pm 0,40$  für RIPC + I/R gegenüber MW: 0,73; SD:  $\pm 0,21$  für I/R;  $P=0,31$ . RIPC: Versuchsgruppe, an welcher ein Protokoll für ischämische Fern-Präkonditionierung durchgeführt wurde; Sham: Kontrollgruppe, die stattdessen eine Placebo-Intervention erhielt; I/R: Kontrollgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach Vorbehandlung mit einer Sham-Prozedur, RIPC + I/R Versuchsgruppe welche einer Ischämie/Reperfusion ausgesetzt wurde nach vorheriger Behandlung mit einem RIPC Protokoll; TP1: Erster Zeitpunkt der Gewebeentnahme 10 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur; TP2: Zweiter Zeitpunkt der Gewebeentnahme 165 Minuten nach RIPC oder Sham-Prozedur. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

## 4 Diskussion

In dieser Studie wurde die Aktivierung der intrazellulären Signalproteine Akt sowie STAT 5 in Kardiomyozyten im Zusammenhang mit der ischämischen Fernpräkonditionierung in Wistar Ratten untersucht. Zu zwei Zeitpunkten wurden dazu Myokardproben gewonnen: Zehn Minuten (TP1) sowie 165 Minuten (TP2) nach Durchführung eines RIPC Protokolls, zum Zeitpunkt TP2 wiederum mit und ohne zwischenzeitig erfolgter Ischämie und Reperfusion. Im Anschluss wurde die relative Phosphorylierung der genannten Proteine als Surrogat für ihre Aktivierung bestimmt. Dazu kam ein Western Blot-Verfahren mit anschließender Immunlumineszenz-Quantifizierung zum Einsatz.

Im Ergebnis konnte weder für Akt noch für STAT5, zu den untersuchten Zeitpunkten, eine statistisch signifikante Veränderung in der relativen Phosphorylierung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe, festgestellt werden (1).

### 4.1. Phosphorylierung der Proteinkinase B im Rahmen der Ischämischen Fernpräkonditionierung

Die Herzen aus dem ersten Versuchsprotokoll, wurden zehn Minuten nach Beendigung der RIPC bzw. Sham-Intervention zur Proteinanalyse entnommen. Dieser sehr frühe Zeitpunkt nach RIPC wurde bisher nur in sehr wenigen Publikationen beleuchtet, während es zahlreiche Arbeiten gibt, die sich mit der Rolle von Akt und anderen intrazellulären Signalmolekülen zu ähnlich frühen Zeitpunkten nach lokaler IPC des Myokards beschäftigen. Hier konnte eine Aktivierung von Akt regelhaft beobachtet werden (121, 122, 124, 150).

Es liegt allerdings nicht auf der Hand, dass diese, für die lokale IPC beschriebenen, Prozesse bei der RIPC genauso und in den gleichen Zeitintervallen ablaufen. Im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen, konnten auch Rassaf et al. keine Aktivierung von Akt 5 Minuten im Anschluss an ein RIPC Protokoll bei Mäusen feststellen (96). Auch Heinen et al. führten ein RIPC-Protokoll am Rattenmodell durch und entnahmen die Herzen 10 Minuten nach Beendigung des Protokolls zur Analyse. Wie Rassaf et al. fanden auch sie gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikante Aktivierung von PKC, deren Phosphorylierung über die PDK1 eng mit der Phosphorylierung von Akt verbunden ist sowie von ERK1/2, p38 Mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK) und JNK1/2 (151, 152). Die frühe Aktivierung dieser Signalmoleküle ist im Rahmen der lokalen IPC allerdings etabliert (153), weshalb die Untersucher die These aufstellten, dass sich die

RIPC in ihren Mechanismen bzw. deren zeitlichem Ablauf von der lokalen Präkonditionierung unterscheiden muss (152).

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen fanden Li et al. im Mausmodell, 15 Minuten nach Abschluss des RIPC-Protokolls, eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von Akt und GSK3 $\beta$  im Myokardgewebe (154). Die Vergleichbarkeit der Studien ist dadurch limitiert, dass die Herzen in dieser Studie nach 15 Minuten statt 10 Minuten entnommen wurden. Darüber hinaus weist die C57 Maus mit einer mittleren Sauerstoffaufnahme von 60 bis 70 ml/kg/min einen aktiveren Metabolismus auf als die Wistar Ratte mit durchschnittlich 25 bis 30 ml/kg/min, weshalb anzunehmen ist, dass die zeitlichen Abläufe der Signaltransduktion zwischen beiden Spezies nicht vergleichbar sind (155). Darüber hinaus ist anzumerken, dass der Metabolismus der Maus, gegenüber demjenigen der Ratte und des Menschen, einige Besonderheiten in der Reaktion auf hypoxischen Stress aufweist, die ihre Eignung als Modellorganismus einschränken (156, 157).

In vergleichbaren Studien, welche Untersuchungszeitpunkte mit größerem zeitlichen Abstand zur RIPC Intervention wählten, konnte die Aktivierung von Akt im Myokard allerdings nachgewiesen werden. So zeigten beispielsweise Hausenloy et al. am Schweinemodell, dass Akt in der Reperusionsphase verstärkt phosphoryliert vorliegt. Durch Gabe des PI3K Inhibitors Wortmannin vor der Ischämiephase wurde der Infarktgrößen-reduzierende Effekt der RIPC aufgehoben, wodurch die entscheidende Position des RISK Signalwegs noch einmal bestätigt wurde (158). Es handelt sich daher möglicherweise nicht um einen grundsätzlichen Unterschied in den intramyokardialen Mechanismen zwischen RIPC und lokaler IPC, sondern eher um ein Phänomen der zeitlich versetzten Aktivierung dieser Mechanismen. Während bei der IPC der Stimulus direkt auf das untersuchte Gewebe wirkt, sind bei der RIPC noch die Zwischenschritte der Signalbildung im Skelettmuskel und der Signalübermittlung vom Skelettmuskel zum Myokard mit zu berücksichtigen, welche ihrerseits Zeit benötigen. Interessanterweise wurde in derselben Studie von Hausenloy et al. die protektive Wirkung der RIPC, also der Applikation des konditionierenden Stimulus während der Ischämiephase, nicht durch Wortmannin beeinflusst (158). Dies kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass der RIC ein zeitliches Aufeinanderfolgen unterschiedlicher, einander ablösender und/oder überlappend wirkender, Prozesse zugrunde liegt. Die Herzen aus dem zweiten Versuchsprotokoll wurden 165 Minuten nach Beendigung der RIPC bzw. Sham-Intervention entnommen (1).

Wie bereits durch Brandenburger et al. an anderer Stelle veröffentlicht, konnte für den hier beschriebenen Versuchsaufbau zu diesem Zeitpunkt eine Infarktgrößenreduktion von 72.6 % auf 34.1 % der AAR gezeigt werden (145). Das Ergebnis der Studie legt allerdings nahe, dass dieser späte Effekt der Kardioprotektion nicht mehr auf die weiterhin bestehende Aktivierung des

untersuchten Signalwegs zurückgeht, sondern auf anderen Mechanismen beruhen muss, welche möglicherweise in den weiterhin wirksamen *Downstream-Effekten* auf Ebene der Mitochondrien oder Genexpression zu suchen sind.

Diese Ergebnisse können als Hinweis darauf betrachtet werden, dass Akt-Phosphorylierung durch RIPC nicht vor Ablauf von 10 Minuten und nicht länger als 165 Minuten im Anschluss an ein RIPC Protokoll stattfindet. Um den zeitlichen Ablauf der Aktivierung von Akt genauer skizzieren zu können, werden weitere Versuche benötigt, die die Phosphorylierung von Akt an mehreren, nah beieinanderliegenden, Zeitpunkten im Anschluss an das RIPC-Protokoll, untersuchen.

#### 4.2. Phosphorylierung und Translokation von *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* im Rahmen der Ischämischen Fernpräkonditionierung

Nachdem die Bedeutung von STAT 3 in der Vermittlung des kardioprotektiven Effekts der IPC erkannt wurde, stellte sich die Frage nach der Rolle anderer Unterformen aus der STAT-Familie sowie die Frage nach der spezifischen Rolle dieser bei der RIPC (159). Es konnte gezeigt werden, dass IPC in STAT 5 defizienten Mäusen keine kardioprotektive Wirkung entfalten kann (160, 161). Ebenso konnten mit STAT 5 -Phosphorylierung assoziierte, extrazelluläre Botenstoffe, wie EPO, mit Kardioprotektion in Verbindung gebracht werden (162). Die Brücke von tierexperimentellen Erkenntnissen zum Menschen konnte durch die Beobachtung hergestellt werden, dass in Biopsien aus Myokard von Patienten nach koronararterieller Bypassoperation (CABG), STAT 5 als einziges der untersuchten 19 Proteine der intrazellulären Signaltransduktion ausschließlich bei der mit RIPC vorbehandelten Versuchsgruppe erhöht war, nicht aber bei der Kontrollgruppe. Da auch in diesen Untersuchungen RIPC mit signifikant niedrigeren postoperativen Werten der Biomarker für myokardialen Zellschaden assoziiert war, ist eine Involvierung von STAT 5 in diesem Zusammenhang wahrscheinlich (134). Bei Kindern mit Fallotscher Tetralogie, die vor offenen, rekonstruktiven Herzeingriffen mit RIPC vorbehandelt wurden, fand man einen ähnlichen Zusammenhang (163).

In der vorliegenden Studie konnte allerdings zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine Veränderung in der relativen Phosphorylierung von STAT 5 zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen festgestellt werden (1). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen tierexperimentellen Studien, welche die, beim Menschen gut belegte, Rolle von STAT 5 in der Kardioprotektion durch RIPC und IPC im Tiermodell nicht bestätigen konnten: So fanden Hildebrand et al. beim Transfer von Plasma von mit RIPC vorbehandelten Menschen auf isolierte Mäuseherzen sowie auch

Skyschally et al. beim Transfer von Plasma von mit RIPC vorbehandelten Schweinen auf isolierte Rattenherzen zwar STAT 3 gegenüber den Kontrollgruppen signifikant phosphoryliert vor, für STAT 5 konnte allerdings kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (144, 164).

Heusch et al. postulierten daher, dass STAT 5 und STAT 3 bei Menschen und Tieren unterschiedliche Rollen in der Vermittlung des kardioprotektiven Effekts spielen. Während beim Menschen nicht STAT 3, sondern STAT 5 Phosphorylierung mit RIPC assoziiert ist, scheint es, dass in verschiedenen Tierspezies, darunter Nagetiere, vor allem STAT 3 Aktivierung und möglicherweise eine STAT 5 Inhibierung für den Effekt verantwortlich sind (134).

Bei STAT 5 handelt es sich, wie bei allen Vertretern der STAT Familie, um Transkriptionsfaktoren, welche nach Phosphorylierung in den Kern translozieren, um dort ihre Wirkung zu entfalten (165, 166). Es ist also denkbar, dass die phosphorylierten STAT 5 Proteine im Anschluss an ihre Phosphorylierung zügig in den Kern translozieren und daher die relative Zunahme ihrer Phosphorylierung in der Zelle nicht isoliert im Zytosol erfassbar ist.

Um also zu überprüfen, ob eine Translokation vom Zytosol in den Zellkern stattfindet, wurde die relative Expression von STAT 5 in den Zellkompartimenten Zytosol und Kern in Versuchs- und Kontrollgruppe ermittelt. Diese Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, durch ein etabliertes Protokoll von denen anderer Zellkompartimente abgetrennt. Es zeigte sich jedoch, sowohl im Zytosol wie auch im Kern, kein Unterschied in der relativen Expression zwischen den Gruppen. Es kann davon ausgegangen werden, dass RIPC mit und ohne anschließende I/R, im hier beschriebenen experimentellen Setting und zu den hier untersuchten Zeitpunkten, keine Translokation von STAT 5 in den Zellkern auslöst.

Neben dem Kern kommen auch andere Translokationsziele für STAT 5 in Frage, die in dieser Studie nicht untersucht wurden: Es konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes STAT 3 auch in die Mitochondrien transloziert und dort regulierenden Einfluss auf die Atmungskette ausübt (139). Zukünftige Untersuchungen werden klären müssen, ob dies möglicherweise auch für STAT 5 zutrifft.

### 4.3. Limitationen

Als Versuchsgruppengröße wurde in dieser Studie n=6 gewählt. Diese Entscheidung wurde mithilfe einer *Poweranalyse* getroffen, welche, basierend auf Vorerfahrungen aus Studien zur Infarktgrößenreduktion durch RIPC durchgeführt wurde (1). Ob allerdings die gleiche Stichprobengröße auch für den Nachweis der relativen Phosphorylierung der hier untersuchten Proteine ausreichend ist oder aber, ob eine größere Stichprobe in der Lage gewesen wäre, einen

geringer ausgeprägten, in dieser Studie nicht zu belegenden, Effekt nachzuweisen, kann nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden.

Für Akt lässt sich zum Zeitpunkt TP1 ein Trend zu einer vermehrten relativen Phosphorylierung erkennen, der aufgrund der großen Varianz nicht als signifikant zu bezeichnen ist. Ebenfalls lässt sich für STAT5 zum Zeitpunkt TP2 sowohl in der RIPC sowie auch in der RIPC I/R Gruppe ein Trend zu einer geringeren relativen Phosphorylierung gegenüber der Kontrollgruppe erkennen, welcher auch hier nicht als statistisch signifikant gelten kann (1). Möglicherweise könnte eine größer angelegte Studie hier Effekte nachweisen, für die die Sensitivität dieser Studie nicht ausreichte.

Es muss angemerkt werden, dass gemeinhin keine Einigkeit darüber besteht, welches Protokoll genau für den RIPC Stimulus zu nutzen ist. Die meisten Studien benutzen das ursprünglich von Przyklenk genutzte 4x5 Minuten Protokoll mit jeweils 5 Minuten Reperfusion zwischen den Zyklen (62, 167). Johnsen et al konnten zeigen, dass maximale Kardioprotektion bei Ratten im Rahmen der RIPC dann erreicht wird, wenn mindestens 4 bis maximal 8 Zyklen RIPC von mindestens 5 Minuten bis zu maximal 10 Minuten Dauer der Extremitätenischämie mit jeweils 5 Minuten Reperfusion zwischen den Zyklen durchgeführt werden. Dabei war die Effektstärke unabhängig davon, ob die RIPC an nur einem oder an beiden Hinterläufen durchgeführt wurde. In dieser Studie wurde ebenfalls die Dauer des Effekts innerhalb des frühen Fensters der RIPC untersucht: Eine Infarktgrößenreduktion konnte bei bis zu 1,5 Stunden Latenzzeit zwischen RIPC und Induktion der Ischämie beobachtet werden, bei einer Latenzzeit von 2h war kein Effekt mehr zu beobachten (167).

Die Versuchstiere wurden im Einklang mit den hier zitierten Erkenntnissen von Johnson et al. präkonditioniert. Die signifikante Infarktgrößenreduktion, die im Rahmen der Gesamtstudie gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen beobachtet werden konnte, bestätigt die Validität der Methode. Diese Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht (145).

Es scheint allerdings so, dass eine Zahl von 6 Zyklen einer Zahl von 4 Zyklen leicht überlegen ist. Daher ist zu empfehlen, zukünftig ein Protokoll mit 6 RIPC Zyklen zu nutzen, um einen noch eindeutigeren Effekt zu erzielen (167). Die Entwicklung eines allgemein akzeptierten Standardprotokolls zur Induktion der RIPC in Tierexperimenten könnte zu einer besseren Vergleichbarkeit zukünftiger Studien zu dem Thema untereinander beitragen.

Die relative Phosphorylierung der Proteine Akt und STAT5 wurde im Anschluss an einen Western Blot mittels Markierung der Proteine und ihrer jeweiligen Phosphoform durch spezifische Antikörper bestimmt (1). Die Serin/Threonin-Kinase Akt zeichnet sich dadurch aus, dass ihre im Myokard vorkommenden Isoformen Akt 1 und Akt 2 über jeweils zwei Phosphorylierungsstellen,

Ser473 und Thr308, verfügen, welche beide phosphoryliert sein müssen, um eine vollständige Aktivierung von Akt zu bewirken (168). In dieser Arbeit wurde, so wie in den meisten hier zitierten Studien, nur die Phosphorylierung von Ser473 untersucht. Da nicht mit abschließender Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass die Aktivierung von Akt dadurch hinreichend nachgewiesen werden konnte, sollten in zukünftigen Studien beide bekannten Phosphorylierungsstellen von Akt untersucht werden, um eine Aktivierung sicher nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen.

#### 4.4. Fazit und Ausblick

Ziel dieser Studie war die Untersuchung intrakardiomyozytärer Signalwege im Rahmen der RIPC. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung der kardiomyozytären Signalproteine Akt und STAT 5 durch Messung ihrer relativen Phosphorylierung untersucht. Es zeigte sich, dass zu den untersuchten Zeitpunkten, 10 Minuten und 165 Minuten nach Applikation des RIPC-Stimulus, weder Akt noch STAT5 im Vergleich mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe vermehrt phosphoryliert vorlagen (1).

Ähnliche Studien konnten teilweise eine Phosphorylierung von Akt nachweisen, bei der Ratte allerdings erst frühestens nach 15 Minuten im Anschluss an die Durchführung eines RIPC-Protokolls. Die relative Phosphorylierung von Akt 165 Minuten nach Durchführung des RIPC-Protokolls wurde in dieser Studie erstmalig untersucht.

Dieses Ergebnis wirft ein Schlaglicht auf die bisher in der Erforschung der Signaltransduktion der RIPC noch zu wenig berücksichtigte Chronologie der Aktivierung und Deaktivierung der jeweiligen Signalkaskaden. Es werden noch weitere Studien benötigt, um diese zeitlichen Abläufe genauer beschreiben zu können. Allerdings hat diese Studie einen Rahmen stecken können, der das zu untersuchende Zeitfenster für diese zukünftigen Untersuchungen eingrenzt.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Translokation von STAT 5 durch RIPC untersucht. Eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern durch RIPC konnte allerdings, wie auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors, nicht nachgewiesen werden. Dies unterstützt Beobachtungen anderer Autoren, dass STAT 5 beim Nager nicht die gleiche zentrale Funktion einnimmt, die es beim Menschen im Rahmen der RIPC innezuhaben scheint.

Es bleibt zu klären, ob STAT 5 möglicherweise in die Mitochondrien transloziert, wie dies bereits für STAT 3 gezeigt werden konnte.

## Literatur

1. RAUPACH, A., K. FEIGE, C. REITER, T. BRANDENBURGER, N. HEINEN, A. HEINEN, M.W. HOLLMANN, R. HUHN und C. TORREGROZA. Remote ischemic preconditioning does not induce activation of Akt and STAT5 in the rat heart [online]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2021, **21**(5), 432. ISSN 1792-0981. Verfügbar unter: doi:10.3892/etm.2021.9849
2. BUSCH, M.A. und R. KUHNERT. 12-Month prevalence of coronary heart disease in Germany [online]. *Journal of Health monitoring*, 2017, **2**(1), 58-63. Verfügbar unter: doi:10.17886/RKI-GBE-2017-018
3. LIBBY, P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy [online]. *The New England journal of medicine*, 2013, **368**(21), 2004-2013. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMra1216063
4. FREISINGER, E., T. FUERSTENBERG, N.M. MALYAR, J. WELLMANN, U. KEIL, G. BREITHARDT und H. REINECKE. German nationwide data on current trends and management of acute myocardial infarction [online]. Discrepancies between trials and real-life. *European Heart Journal*, 2014, **35**(15), 979-988. ISSN 0195-668X. Verfügbar unter: doi:10.1093/eurheartj/ehu043
5. EAPEN, Z.J., W.H.W. TANG, G.M. FELKER, A.F. HERNANDEZ, K.W. MAHAFFEY, A.M. LINCOFF und M.T. ROE. Defining heart failure end points in ST-segment elevation myocardial infarction trials: integrating past experiences to chart a path forward [online]. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes*, 2012, **5**(4), 594-600. ISSN 1941-7713. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.112.966150
6. GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA STREPTOCHINASI NELL'INFARTO MIOCARDICO. Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet (London, England)*, 1986, **1**(8478), 397-402.
7. P.T. O'GARA, F.G. KUSHNER, D.D. ASCHEIM, ET AL. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013, **61**(4), pp. 485–510. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109712055611>
8. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015 [online]. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, 2016, **388**(10053), 1459-1544. ISSN 0140-6736. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1
9. DU FAY DE LAVALLAZ, J., C. PUELACHER, G. LURATI BUSE, D. BOLLIGER, D. GERMANIER, R. HIDVEGI, J.E. WALTER, R. TWERENBOLD, I. STREBEL, P. BADERTSCHER, L. SAZGARY, A. LAMPART,

- J. ESPINOLA, C. KINDLER, A. HAMMERER-LERCHER, S. THAMBIPILLAI, L. GUERKE, K. RENTSCH, A. BUSER, D. GUALANDRO, M. JAKOB und C. MUELLER. Daytime variation of perioperative myocardial injury in non-cardiac surgery and effect on outcome [online]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2019, **105**(11), 826-833. ISSN 1355-6037. Verfügbar unter: doi:10.1136/heartjnl-2018-313876
10. SUNNY, J.C., D. KUMAR, N. KOTEKAR und N. DESAI. Incidence and predictors of perioperative myocardial infarction in patients undergoing non-cardiac surgery in a tertiary care hospital [online]. *Indian heart journal*, 2018, **70**(3), 335-340. ISSN 0019-4832. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.ihj.2017.08.010
  11. OLLILA, A., L. VIKATMAA, J. VIROLAINEN, P. VIKATMAA, A. LEPPÄNIEMI, A. ALBÄCK, M. SALMENPERÄ und V. PETTILÄ. Perioperative Myocardial Infarction in Non-Cardiac Surgery Patients [online]. A Prospective Observational Study. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*, 2017, **106**(2), 180-186. ISSN 1457-4969. Verfügbar unter: doi:10.1177/1457496916673585
  12. HIETALA, P., M. STRANDBERG, N. STRANDBERG, E. GULLICHSEN und K.E.J. AIRAKSINEN. Perioperative myocardial infarctions are common and often unrecognized in patients undergoing hip fracture surgery [online]. *The journal of trauma and acute care surgery*, 2013, **74**(4), 1087-1091. ISSN 2163-0755. Verfügbar unter: doi:10.1097/TA.0b013e3182827322
  13. MCALINDON, E., C. BUCCIARELLI-DUCCI, M.S. SULEIMAN und A. BAUMBACH. Infarct size reduction in acute myocardial infarction [online]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2015, **101**(2), 155-160. ISSN 1355-6037. Verfügbar unter: doi:10.1136/heartjnl-2013-304289
  14. LAROSE, E., J. RODES-CABAU, P. PIBAROT, S. RINFRET, G. PROULX, C.M. NGUYEN, J.-P. DERY, O. GLEETON, L. ROY, B. NOEL, G. BARBEAU, J. ROULEAU, J.-R. BOUDREAU, M. AMYOT, R. de LAROCHELLIERE und O.F. BERTRAND. Predicting late myocardial recovery and outcomes in the early hours of ST-segment elevation myocardial infarction traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, **55**(22), 2459-2469. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2010.02.033
  15. IBANEZ, B., G. HEUSCH, M. OVIZE und F. VAN DE WERF. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, **65**(14), 1454-1471. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2015.02.032
  16. BRAUNWALD, E. und R.A. KLONER. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? [online]. *The Journal of clinical investigation*, 1985, **76**(5), 1713-1719. ISSN 0021-9738. Verfügbar unter: doi:10.1172/JCI112160

17. REIMER, K.A. und R.B. JENNINGS. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1979, **40**(6), 633-644.
18. REIMER, K.A., J.E. LOWE, M.M. RASMUSSEN und R.B. JENNINGS. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs [online]. *Circulation*, 1977, **56**(5), 786-794. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.CIR.56.5.786
19. ZHAO, Z.-Q., J.S. CORVERA, M.E. HALKOS, F. KERENDI, N.-P. WANG, R.A. GUYTON und J. VINTEN-JOHANSEN. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2003, **285**(2), H579-88. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.01064.2002
20. HAUSENLOY, D.J. und D.M. YELLON. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [online]. *The Journal of clinical investigation*, 2013, **123**(1), 92-100. ISSN 0021-9738. Verfügbar unter: doi:10.1172/JCI62874
21. LADILOV, Y.V., B. SIEGMUND und H.M. PIPER. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *The American journal of physiology*, 1995, **268**(4 Pt 2), H1531-9.
22. TANI, M. und J.R. NEELY. Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange [online]. *Circulation research*, 1989, **65**(4), 1045-1056. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.RES.65.4.1045
23. CHEN, X., X. ZHANG, H. KUBO, D.M. HARRIS, G.D. MILLS, J. MOYER, R. BERRETTA, S.T. POTTS, J.D. MARSH und S.R. HOUSER. Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes [online]. *Circulation research*, 2005, **97**(10), 1009-1017. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.RES.0000189270.72915.D1
24. INSERTE, J., V. HERNANDO und D. GARCIA-DORADO. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury [online]. *Cardiovascular Research*, 2012, **96**(1), 23-31. ISSN 0008-6363. Verfügbar unter: doi:10.1093/cvr/cvs232
25. BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. mPTP Öffnung spannungsabhängig. *The Journal of biological chemistry*, 1992, **267**(13), 8834-8839.

26. SCHLUTER, K.D., G. JAKOB, M. RUIZ-MEANA, D. GARCIA-DORADO und H.M. PIPER. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *The American journal of physiology*, 1996, **271**(2 Pt 2), H428-34.
27. BEKKERS, S.C.A.M., S.K. YAZDANI, R. VIRMANI und J. WALTENBERGER. Microvascular Obstruction: Underlying Pathophysiology and Clinical Diagnosis [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, **55**(16), 1649-1660. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2009.12.037
28. BERNARDI, P. und F. DI LISA. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2015, **78**, 100-106. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.023
29. HEUSCH, G., K. BOENGLER und R. SCHULZ. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection [online]. *Basic research in cardiology*, 2010, **105**(2), 151-154. ISSN 0300-8428. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00395-009-0080-9
30. PETERSON, E.D., D. DAI, E.R. DELONG, J.M. BRENNAN, M. SINGH, S.V. RAO, R.E. SHAW, M.T. ROE, K.K.L. HO, L.W. KLEIN, R.J. KRONE, W.S. WEINTRAUB, R.G. BRINDIS, J.S. RUMSFELD und J.A. SPERTUS. Contemporary mortality risk prediction for percutaneous coronary intervention: results from 588,398 procedures in the National Cardiovascular Data Registry [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, **55**(18), 1923-1932. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2010.02.005
31. LUCA, G. de, H. SURYAPRANATA, J.P. OTTERVANGER und E.M. ANTMAN. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts [online]. *Circulation*, 2004, **109**(10), 1223-1225. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.CIR.0000121424.76486.20
32. BURNS, R.J., R.J. GIBBONS, Q. YI, R.S. ROBERTS, T.D. MILLER, G.L. SCHAER, J.L. ANDERSON und S. YUSUF. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, **39**(1), 30-36.
33. MILLER, T.D., T.F. CHRISTIAN, M.R. HOPFENSPIRGER, D.O. HODGE, B.J. GERSH und R.J. GIBBONS. Infarct size after acute myocardial infarction measured by quantitative tomographic 99mTc sestamibi imaging predicts subsequent mortality. *Circulation*, 1995, **92**(3), 334-341.
34. PFEFFER, M.A., J.M. PFEFFER, M.C. FISHBEIN, P.J. FLETCHER, J. SPADARO, R.A. KLONER und E. BRAUNWALD. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation research*, 1979, **44**(4), 503-512.
35. YELLON, D.M. und D.J. HAUSENLOY. Myocardial reperfusion injury [online]. *The New England journal of medicine*, 2007, **357**(11), 1121-1135. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMra071667

36. KÜBLER, W. und M. HAASS. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. *Heart (British Cardiac Society)*, 1996, **75**(4), 330-333.
37. LOTZ, C., J. STUMPNER und T.M. SMUL. Sevoflurane as opposed to propofol anesthesia preserves mitochondrial function and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury [online]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2020, **129**, 110417. ISSN 0753-3322. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.biopha.2020.110417
38. SMIT, K.F., G.T.M.L. OEI, D. BREVOORD, E.S. STROES, R. NIEUWLAND, W.S. SCHLACK, M.W. HOLLMANN, N.C. WEBER und B. PRECKEL. Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo [online]. *Anesthesiology*, 2013, **118**(1), 95-104. ISSN 0003-3022. Verfügbar unter: doi:10.1097/ALN.0b013e3182751300
39. HOFLAND, J., A. OUATTARA, J.-L. FELLAHI, M. GRUENEWALD, J. HAZEBROUCQ, C. ECOFFEY, P. JOSEPH, M. HERINGLAKE, A. STEIB, M. COBURN, J. AMOUR, B. ROZEC, I.d. LIEFDE, P. MEYBOHM, B. PRECKEL, J.-L. HANOUS, L. TRITAPEPE, P. TONNER, H. BENHAOUA, J.P. ROESNER, B. BEIN, L. HANOUS, R. TENBRINCK, A.J.J.C. BOGERS, B.G. MIK, A. COIFFIC, J. RENNER, M. STEINFATH, H. FRANCKSEN, O. BROCH, A. HANEYA, M. SCHALLER, P. GUINET, L. DAVIET, C. BRIANCHON, S. ROSIER, J.-J. LEHOT, H. PAARMANN, J. SCHÖN, T. HANKE, J. ETEL, S. OLSSON, S. KLOTZ, A. SAMET, G. LAURINENAS, A. THIBAUD, M. CRISTINAR, O. COLLANGES, F. LEVY, R. ROSSAINT, A. STEVANOVIC, G. SCHAELE, C. STOPPE, N.A. HAMOU, S. HARIRI, A. QUESSARD, A. CARILLION, H. MORIN, J. SILLERAN, D. ROBERT, A.-S. CROUZET, K. ZACHAROWSKI, C. REYHER, S. IKEN, N.C. WEBER, M. HOLLMANN, S. EBERL, G. CARRIERO, D. COLLACCHI, A. DI PERSIO, O. FOURCADE, S. BERGT und A. ALMS. Effect of Xenon Anesthesia Compared to Sevoflurane and Total Intravenous Anesthesia for Coronary Artery Bypass Graft Surgery on Postoperative Cardiac Troponin Release [online]. An International, Multicenter, Phase 3, Single-blinded, Randomized Noninferiority Trial. *Anesthesiology*, 2017, **127**(6), 918-933. ISSN 0003-3022. Verfügbar unter: doi:10.1097/ALN.0000000000001873
40. TANAKA, K., J.R. KERSTEN und M.L. RIESS. Opioid-induced cardioprotection [online]. *Current pharmaceutical design*, 2014, **20**(36), 5696-5705. ISSN 1381-6128. Verfügbar unter: doi:10.2174/1381612820666140204120311
41. KAMENSHCHIKOV, N.O., I.A. MANDEL, Y.K. PODOKSENOV, Y.S. SVIRKO, V.V. LOMIVOROTOV, S.L. MIKHEEV, B.N. KOZLOV, V.M. SHIPULIN, A.A. NENAKHOVA und Y.J. ANFINOGENOVA. Nitric oxide provides myocardial protection when added to the cardiopulmonary bypass circuit during cardiac surgery [online]. Randomized trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2019, **157**(6), 2328-2336.e1. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jtcvs.2018.08.117
42. CAIMMI, P.P., C. MOLINARI, F. UBERTI, E. MICALIZZI, G. VALENTE, D.A.S.G. MARY, G. VACCA und E. GROSSINI. Intracoronary levosimendan prevents myocardial ischemic damages and activates

- survival signaling through ATP-sensitive potassium channel and nitric oxide [online]. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 2011, **39**(4), e59-67. ISSN 1010-7940. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.ejcts.2010.11.044
43. YOU, Z., L. HUANG, X. CHENG, Q. WU, X. JIANG und Y. WU. Effect of milrinone on cardiac functions in patients undergoing coronary artery bypass graft [online]. A meta-analysis of randomized clinical trials. *Drug design, development and therapy*, 2016, **10**, 53-58. ISSN 1177-8881. Verfügbar unter: doi:10.2147/DDDT.S77464
44. PIOT, C., P. CROISILLE, P. STAAT, H. THIBAUT, G. RIOUFOL, N. MEWTON, R. ELBELGHITI, T.T. CUNG, E. BONNEFOY, D. ANGOULVANT, C. MACIA, F. RACZKA, C. SPORTOUCH, G. GAHIDE, G. FINET, X. ANDRÉ-FOUËT, D. REVEL, G. KIRKORIAN, J.-P. MONASSIER, G. DERUMEAUX und M. OVIZE. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction [online]. *The New England journal of medicine*, 2008, **359**(5), 473-481. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa071142
45. LANDONI, G., V.V. LOMIVOROTOV, C. NIGRO NETO, F. MONACO, V.V. PASYUGA, N. BRADIC, R. LEMBO, G. GAZIVODA, V.V. LIKHVANTSEV, C. LEI, A. LOZOVSKIY, N. DI TOMASSO, N.A.R. BUKAMAL, F.S. SILVA, A.E. BAUTIN, J. MA, M. CRIVELLARI, A.M.G.A. FARAG, N.S. UVALIEV, C. CAROLLO, M. PIERI, J. KUNSTÝŘ, C.Y. WANG, A. BELLETTI, L.A. HAJJAR, E.V. GRIGORYEV, F.E. AGRÒ, H. RIHA, M.R. EL-TAHAN, A.M. SCANDROGLIO, A.M. ELNAKERA, M. BAIOCCHI, P. NAVALESI, V.A. SHMYREV, L. SEVERI, M.A. HEGAZY, G. CRESCENZI, D.N. PONOMAREV, L. BRAZZI, R. ARNONI, D.G. TARASOV, M. JOVIC, M.G. CALABRÒ, T. BOVE, R. BELLOMO und A. ZANGRILLO. Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery [online]. *The New England journal of medicine*, 2019, **380**(13), 1214-1225. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa1816476
46. LIKHVANTSEV, V.V., G. LANDONI, D.I. LEVIKOV, O.A. GREBENCHIKOV, Y.V. SKRIPKIN und R.A. CHERPAKOV. Sevoflurane Versus Total Intravenous Anesthesia for Isolated Coronary Artery Bypass Surgery With Cardiopulmonary Bypass [online]. A Randomized Trial. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 2016, **30**(5), 1221-1227. ISSN 1053-0770. Verfügbar unter: doi:10.1053/j.jvca.2016.02.030
47. SMIT, K.F., D. BREVOORD, S. de HERT, B.A. de MOL, R.P. KERINDONGO, S. VAN DIEREN, W.S. SCHLACK, M.W. HOLLMANN, N.C. WEBER und B. PRECKEL. Effect of helium pre- or postconditioning on signal transduction kinases in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery [online]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, **14**(1), 294. ISSN 1479-5876. Verfügbar unter: doi:10.1186/s12967-016-1045-z

48. GRECO, M., G. LANDONI, G. BIONDI-ZOCCAI, L. CABRINI, L. RUGGERI, N. PASCULLI, V. GIACCHI, J. SAYEG, T. GRECO und A. ZANGRILLO. Remifentanil in cardiac surgery [online]. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 2012, **26**(1), 110-116. ISSN 1053-0770. Verfügbar unter: doi:10.1053/j.jvca.2011.05.007
49. CRISAFULLI, A., F. MELIS, F. TOCCO, G. PITTAU, L. LORRAI, T. GORI, D. MANCARDI, A. CONCU und P. PAGLIARO. Delayed preconditioning-mimetic actions of exercise or nitroglycerin do not affect haemodynamics and exercise performance in trained or sedentary individuals [online]. *Journal of sports sciences*, 2007, **25**(12), 1393-1401. ISSN 0264-0414. Verfügbar unter: doi:10.1080/02640410601128914
50. JANSSENS, S.P., J. BOGAERT, J. ZALEWSKI, A. TOTH, T. ADRIAENSSENS, A. BELMANS, J. BENNETT, P. CLAUS, W. DESMET, C. DUBOIS, K. GOETSCHALCKX, P. SINNAEVE, K. VANDENBERGHE, P. VERMEERSCH, A. LUX, Z. SZELID, M. DURAK, P. LECH, K. ZMUDKA, P. POKREISZ, P. VRANCKX, B. MERKELY, K.D. BLOCH und F. VAN DE WERF. Nitric oxide for inhalation in ST-elevation myocardial infarction (NOMI) [online]. A multicentre, double-blind, randomized controlled trial. *European heart journal*, 2018, **39**(29), 2717-2725. ISSN 1522-9645. Verfügbar unter: doi:10.1093/eurheartj/ehy232
51. BEHMENBURG, F., L. TREFZ, M. DORSCH, M. STRÖTHOFF, A. MATHES, A. RAUPACH, A. HEINEN, M.W. HOLLMANN, M.M. BERGER und R. HUHN. Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-sensitive Potassium (mBKCa) Channels [online]. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 2018, **32**(5), 2142-2148. ISSN 1053-0770. Verfügbar unter: doi:10.1053/j.jvca.2017.11.048
52. ZANGRILLO, A., G. BIONDI-ZOCCAI, A. MIZZI, G. BRUNO, E. BIGNAMI, C. GERLI, V. de SANTIS, L. TRITAPEPE und G. LANDONI. Levosimendan reduces cardiac troponin release after cardiac surgery [online]. A meta-analysis of randomized controlled studies. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 2009, **23**(4), 474-478. ISSN 1053-0770. Verfügbar unter: doi:10.1053/j.jvca.2008.11.013
53. MURRY, C.E., R.B. JENNINGS und K.A. REIMER. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, **74**(5), 1124-1136.
54. YELLON, D.M. und D.J. HAUSENLOY. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning [online]. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2005, **2**(11), 568-575. ISSN 1743-4297. Verfügbar unter: doi:10.1038/ncpcardio0346
55. HAUSENLOY, D.J., J.A. BARRABES, H.E. BOTKER, S.M. DAVIDSON, F. DI LISA, J. DOWNEY, T. ENGSTROM, P. FERDINANDY, H.A. CARBRERA-FUENTES, G. HEUSCH, B. IBANEZ, E.K. ILIODROMITIS, J. INSERTE, R. JENNINGS, N. KALIA, R. KHARBANDA, S. LECOUR, M. MARBER, T. MIURA, M. OVIZE, M.A. PEREZ-PINZON, H.M. PIPER, K. PRZYKLENK, M.R. SCHMIDT, A.

- REDINGTON, M. RUIZ-MEANA, G. VILAHUR, J. VINTEN-JOHANSEN, D.M. YELLON und D. GARCIA-DORADO. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery [online]. *Basic research in cardiology*, 2016, **111**(6), 70. ISSN 0300-8428. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00395-016-0588-8
56. MARBER, M.S., D.S. LATCHMAN, J.M. WALKER und D.M. YELLON. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 1993, **88**(3), 1264-1272.
57. HAUSENLOY, D.J. und D.M. YELLON. Ischaemic conditioning and reperfusion injury [online]. *Nature reviews. Cardiology*, 2016, **13**(4), 193-209. ISSN 1759-5002. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrcardio.2016.5
58. STAAT, P., G. RIOUFOL, C. PIOT, Y. COTTIN, T.T. CUNG, I. L'HUILLIER, J.-F. AUPETIT, E. BONNEFOY, G. FINET, X. ANDRE-FOUET und M. OVIZE. Postconditioning the human heart [online]. *Circulation*, 2005, **112**(14), 2143-2148. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.558122
59. THIBAUT, H., C. PIOT, P. STAAT, L. BONTEMPS, C. SPORTOUCH, G. RIOUFOL, T.T. CUNG, E. BONNEFOY, D. ANGOULVANT, J.-F. AUPETIT, G. FINET, X. ANDRE-FOUET, J.C. MACIA, F. RACZKA, R. ROSSI, R. ITTI, G. KIRKORIAN, G. DERUMEAUX und M. OVIZE. Long-term benefit of postconditioning [online]. *Circulation*, 2008, **117**(8), 1037-1044. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729780
60. LONBORG, J., H. KELBAEK, N. VEJLSTRUP, E. JORGENSEN, S. HELQVIST, K. SAUNAMAKI, P. CLEMMENSEN, L. HOLMVANG, M. TREIMAN, J.S. JENSEN und T. ENGSTROM. Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance [online]. *Circulation. Cardiovascular interventions*, 2010, **3**(1), 34-41. ISSN 1941-7640. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.109.905521
61. HEUSCH, G., H.E. BØTKER, K. PRZYKLENK, A. REDINGTON und D. YELLON. Remote Ischemic Conditioning [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, **65**(2), 177-195. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2014.10.031
62. PRZYKLENK, K., B. BAUER, M. OVIZE, R.A. KLONER und P. WHITTAKER. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion [online]. *Circulation*, 1993, **87**(3), 893-899. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.CIR.87.3.893
63. MCCLANAHAN, T.B., B.S. NAO, L.J. WOLKE, B.J. MARTIN, T.E. MERTZ und K.P. GALLAGHER, Hg. *Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits: FEDERATION*

- AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA, 1993. 7. ISBN 0892-6638.
64. GHO, B.C.G., R.G. SCHOEMAKER, M.A. VAN DEN DOEL, D.J. DUNCKER und P.D. VERDOUW. Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue [online]. *Circulation*, 1996, **94**(9), 2193-2200. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.CIR.94.9.2193
  65. BIRNBAUM, Y., S.L. HALE und R.A. KLONER. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*, 1997, **96**(5), 1641-1646.
  66. KHARBANDA, R.K., U.M. MORTENSEN, P.A. WHITE, S.B. KRISTIANSEN, M.R. SCHMIDT, J.A. HOSCHTITZKY, M. VOGEL, K. SORENSEN, A.N. REDINGTON und R. MACALLISTER. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, 2002, **106**(23), 2881-2883.
  67. SCHMIDT, M.R., M. SMERUP, I.E. KONSTANTINOV, M. SHIMIZU, J. LI, M. CHEUNG, P.A. WHITE, S.B. KRISTIANSEN, K. SORENSEN, V. DZAVIK, A.N. REDINGTON und R.K. KHARBANDA. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2007, **292**(4), H1883-90. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00617.2006
  68. PRZYKLENK, K. und P. WHITTAKER. The Future of Remote Ischemic Conditioning: New Perspectives After ERICCA and RIPHeart [online]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2017, **22**(4), 295-296. Verfügbar unter: doi:10.1177/1074248417710151
  69. BØTKER, H.E., R. KHARBANDA, M.R. SCHMIDT, M. BØTTCHER, A.K. KALTOFT, C.J. TERKELSEN, K. MUNK, N.H. ANDERSEN, T.M. HANSEN, S. TRAUTNER, J.F. LASSEN, E.H. CHRISTIANSEN, L.R. KRUSELL, S.D. KRISTENSEN, L. THUESEN, S.S. NIELSEN, M. REHLING, H.T. SØRENSEN, A.N. REDINGTON und T.T. NIELSEN. 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 [online]. *The Lancet*, 2010, **375**(9716), 727-734. ISSN 01406736. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0140-6736(09)62001-8
  70. SLOTH, A.D., M.R. SCHMIDT, K. MUNK, R.K. KHARBANDA, A.N. REDINGTON, M. SCHMIDT, L. PEDERSEN, H.T. SØRENSEN und H.E. BØTKER. Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention [online]. *European heart journal*, 2014, **35**(3), 168-175. ISSN 1522-9645. Verfügbar unter: doi:10.1093/eurheartj/eh369
  71. PORTO, I., J.B. SELVANAYAGAM, W.J. VAN GAAL, F. PRATI, A. CHENG, K. CHANNON, S. NEUBAUER und A.P. BANNING. Plaque volume and occurrence and location of periprocedural

- myocardial necrosis after percutaneous coronary intervention: insights from delayed-enhancement magnetic resonance imaging, thrombolysis in myocardial infarction myocardial perfusion grade analysis, and intravascular ultrasound [online]. *Circulation*, 2006, **114**(7), 662-669. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593210
72. HOOLE, S.P., P.M. HECK, L. SHARPLES, D.P. DUTKA und N.E.J. WEST. Coronary stent length predicts PCI-induced cardiac myonecrosis [online]. *Coronary artery disease*, 2010, **21**(5), 312-317. ISSN 1473-5830. Verfügbar unter: doi:10.1097/MCA.0b013e32833bdf18
73. GIBLETT, J.P. und S.P. HOOLE. Remote Ischemic Conditioning in Elective PCI? [online]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2017, **22**(4), 310-315. Verfügbar unter: doi:10.1177/1074248417702479
74. HOOLE, S.P., P.M. HECK, L. SHARPLES, S.N. KHAN, R. DUEHMKE, C.G. DENSEM, S.C. CLARKE, L.M. SHAPIRO, P.M. SCHOFIELD, M. O'SULLIVAN und D.P. DUTKA. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial [online]. *Circulation*, 2009, **119**(6), 820-827. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809723
75. DAVIES, W.R., A.J. BROWN, W. WATSON, L.M. MCCORMICK, N.E.J. WEST, D.P. DUTKA und S.P. HOOLE. Remote ischemic preconditioning improves outcome at 6 years after elective percutaneous coronary intervention: the CRISP stent trial long-term follow-up [online]. *Circulation. Cardiovascular interventions*, 2013, **6**(3), 246-251. ISSN 1941-7640. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.112.000184
76. HAUSENLOY, D.J., L. CANDILIO, R. EVANS, C. ARITI, D.P. JENKINS, S. KOLVEKAR, R. KNIGHT, G. KUNST, C. LAING, J. NICHOLAS, J. PEPPER, S. ROBERTSON, M. XENOU, T. CLAYTON und D.M. YELLON. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery [online]. *The New England journal of medicine*, 2015, **373**(15), 1408-1417. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa1413534
77. MEYBOHM, P., B. BEIN, O. BROSTEANU, J. CREMER, M. GRUENEWALD, C. STOPPE, M. COBURN, G. SCHAELTE, A. BÖNING, B. NIEMANN, J. ROESNER, F. KLETZIN, U. STROUHAL, C. REYHER, R. LAUFENBERG-FELDMANN, M. FERNER, I.F. BRANDES, M. BAUER, S.N. STEHR, A. KORTGEN, M. WITTMANN, G. BAUMGARTEN, T. MEYER-TRESCHAN, P. KIENBAUM, M. HERINGLAKE, J. SCHÖN, M. SANDER, S. TRESKATSCH, T. SMUL, E. WOLWENDER, T. SCHILLING, G. FUERNAU, D. HASENCLEVER und K. ZACHAROWSKI. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery [online]. *The New England journal of medicine*, 2015, **373**(15), 1397-1407. ISSN 1533-4406. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa1413579
78. CHEUNG, M.M.H., R.K. KHARBANDA, I.E. KONSTANTINOV, M. SHIMIZU, H. FRNDOVA, J. LI, H.M. HOLTBY, P.N. COX, J.F. SMALLHORN, G.S. VAN ARSDELL und A.N. REDINGTON. Randomized

- controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans [online]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, **47**(11), 2277-2282. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacc.2006.01.066
79. HAUSENLOY, D.J., P.K. MWAMURE, V. VENUGOPAL, J. HARRIS, M. BARNARD, E. GRUNDY, E. ASHLEY, S. VICHARE, C. DI SALVO, S. KOLVEKAR, M. HAYWARD, B. KEOGH, R.J. MACALLISTER und D.M. YELLON. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial [online]. *Lancet (London, England)*, 2007, **370**(9587), 575-579. ISSN 0140-6736. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0140-6736(07)61296-3
80. THIELMANN, M., E. KOTTENBERG, P. KLEINBONGARD, D. WENDT, N. GEDIK, S. PASA, V. PRICE, K. TSAGAKIS, M. NEUHÄUSER, J. PETERS, H. JAKOB und G. HEUSCH. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial [online]. *Lancet (London, England)*, 2013, **382**(9892), 597-604. ISSN 0140-6736. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0140-6736(13)61450-6
81. BAUTIN, A.E., M.M. GALAGUDZA, S.V. DATSENKO, D.M. TASHKHANOV, A.O. MARICHEV, A.I. BAKANOV, E.I. MALAIA, A.V. NAÏMUSHIN, V.E. RUBINCHIK und M.L. GORDEEV. Effects of remote ischemic preconditioning on perioperative period in elective aortic valve replacement. *Anesteziologija i reanimatologija*, 2014, (3), 11-17.
82. BOSNJAK, Z.J. und Z.-D. GE. The application of remote ischemic conditioning in cardiac surgery [online]. *F1000Research*, 2017, **6**, 928. ISSN 2046-1402. Verfügbar unter: doi:10.12688/f1000research.11018.1
83. KHARBANDA, R.K. Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo [online]. *Circulation*, 2002, **106**(23), 2881-2883. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.CIR.0000043806.51912.9B
84. JONES, W.K., G.-C. FAN, S. LIAO, J.-M. ZHANG, Y. WANG, N.L. WEINTRAUB, E.G. KRANIAS, J.E. SCHULTZ, J. LORENZ und X. REN. Peripheral Nociception Associated With Surgical Incision Elicits Remote Nonischemic Cardioprotection Via Neurogenic Activation of Protein Kinase C Signaling [online]. *Circulation*, 2009, **120**(11 suppl 1), S1-S9. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843938
85. GROSS, E.R., A.K. HSU, T.J. URBAN, D. MOCHLY-ROSEN und G.J. GROSS. Nociceptive-induced myocardial remote conditioning is mediated by neuronal gamma protein kinase C [online]. *Basic Research in Cardiology*, **108**(5), 381. ISSN 1435-1803. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00395-013-0381-x

86. REDINGTON, K.L., T. DISENHOUSE, S.C. STRANTZAS, R. GLADSTONE, C. WEI, M.B. TROPAK, X. DAI, C. MANLHIOT, J. LI und A.N. REDINGTON. Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors [online]. *Basic Research in Cardiology*, **107**(2), 241. ISSN 1435-1803. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00395-011-0241-5
87. STEENSRUD, T., J. LI, X. DAI, C. MANLHIOT, R.K. KHARBANDA, M. TROPAK und A. REDINGTON. Pretreatment with the nitric oxide donor SNAP or nerve transection blocks humoral preconditioning by remote limb ischemia or intra-arterial adenosine [online]. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2010, **299**(5), H1598-H1603. ISSN 1522-1539. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00396.2010
88. DONATO, M., B. BUCHHOLZ, M. RODRÍGUEZ, V. PÉREZ, J. INSERTE, D. GARCÍA - DORADO und R.J. GELPI. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning [online]. *Experimental Physiology*, 2013, **98**(2), 425-434. ISSN 1469-445X. Verfügbar unter: doi:10.1113/expphysiol.2012.066217
89. SOUTHERLAND, E.M., D.M. MILHORN, R.D. FOREMAN, B. LINDEROTH, M.J.L. DEJONGSTE, J.A. ARMOUR, V. SUBRAMANIAN, M. SINGH, K. SINGH und J.L. ARDELL. Preemptive, but not reactive, spinal cord stimulation mitigates transient ischemia-induced myocardial infarction via cardiac adrenergic neurons [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2007, **292**(1), H311-7. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00087.2006
90. MASTITSKAYA, S., N. MARINA, A. GOURINE, M.P. GILBEY, K.M. SPYER, A.G. TESCHEMACHER, S. KASPAROV, S. TRAPP, G.L. ACKLAND und A.V. GOURINE. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones [online]. *Cardiovascular Research*, 2012, **95**(4), 487-494. ISSN 0008-6363. Verfügbar unter: doi:10.1093/cvr/cvs212
91. KONSTANTINOV, I.E., J. LI, M.M. CHEUNG, M. SHIMIZU, J. STOKOE, R.K. KHARBANDA und A.N. REDINGTON. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism [online]. *Transplantation*, 2005, **79**(12), 1691-1695. ISSN 0041-1337. Verfügbar unter: doi:10.1097/01.tp.0000159137.76400.5d
92. DICKSON, E.W., W.A. PORCARO, R.A. FENTON, S.O. HEARD, C.P. REINHARDT, F.P. RENZI und K. PRZYKLENK. "Preconditioning at a distance" in the isolated rabbit heart [online]. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 2000, **7**(4), 311-317. ISSN 1069-6563. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1553-2712.2000.tb02228.x
93. SHIMIZU, M., M. TROPAK, R.J. DIAZ, F. SUTO, H. SURENDRA, E. KUZMIN, J. LI, G. GROSS, G.J. WILSON, J. CALLAHAN und A.N. REDINGTON. Transient limb ischaemia remotely preconditions

- through a humoral mechanism acting directly on the myocardium [online]. Evidence suggesting cross-species protection. *Clinical science (London, England : 1979)*, 2009, **117**(5), 191-200. ISSN 0143-5221. Verfügbar unter: doi:10.1042/CS20080523
94. HEINEN, A., F. BEHMENBURG, A. AYTULUN, M. DIERKES, L. ZERBIN, W. KAISERS, M. SCHAEFER, T. MEYER-TRESCHAN, S. FEIT, I. BAUER, M.W. HOLLMANN und R. HUHN. The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent [online]. *Journal of Translational Medicine*, 2018, **16**(1), 112. ISSN 1479-5876. Verfügbar unter: doi:10.1186/s12967-018-1480-0
95. TOOMBS, C.F., S. MCGEE, W.E. JOHNSTON und J. VINTEN-JOHANSEN. Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia [online]. *Circulation*, 1992, **86**(3), 986-994. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.cir.86.3.986
96. RASSAF, T., M. TOTZECK, U.B. HENDGEN-COTTA, S. SHIVA, G. HEUSCH und M. KELM. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning [online]. *Circulation research*, 2014, **114**(10), 1601-1610. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303822
97. OBA, T., H. YASUKAWA, T. NAGATA, S. KYOGOKU, T. MINAMI, M. NISHIHARA, H. OHSHIMA, K. MAWATARI, S. NOHARA, J. TAKAHASHI, Y. SUGI, S. IGATA, Y. IWAMOTO, H. KAI, H. MATSUOKA, M. TAKANO, H. AOKI, Y. FUKUMOTO und T. IMAIZUMI. Renal Nerve-Mediated Erythropoietin Release Confers Cardioprotection During Remote Ischemic Preconditioning [online]. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 2015, **79**(7), 1557-1567. ISSN 1346-9843. Verfügbar unter: doi:10.1253/circj.CJ-14-1171
98. GIRICZ, Z., Z.V. VARGA, T. BARANYAI, P. SIPOS, K. PÁLÓCZI, Á. KITTEL, E.I. BUZÁS und P. FERDINANDY. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014, **68**, 75-78. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.004
99. MINGHUA, W., G. ZHIJIAN, H. CHAHUA, L. QIANG, X. MINXUAN, W. LUQIAO, Z. WEIFANG, L. PENG, Z. BIMING, Y. LINGLING, W. ZHENZHEN, X. JIANQING, B. HUIHUI, W. XIAOZHONG und C. XIAOSHU. Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring miR-24 [online]. *Cell death & disease*, 2018, **9**(3), 320. ISSN 2041-4889. Verfügbar unter: doi:10.1038/s41419-018-0274-x
100. RANDHAWA, P.K. und A.S. JAGGI. Opioids in Remote Ischemic Preconditioning-Induced Cardioprotection [online]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2017, **22**(2), 112-121. Verfügbar unter: doi:10.1177/1074248416660621

101. TAKAOKA, A., I. NAKAE, K. MITSUNAMI, T. YABE, S. MORIKAWA, T. INUBUSHI und M. KINOSHITA. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits [online]. Effects of "remote preconditioning". *Journal of the American College of Cardiology*, 1999, **33**(2), 556-564. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0735-1097(98)00559-2
102. MCINTOSH, V.J. und R.D. LASLEY. Adenosine receptor-mediated cardioprotection [online]. Are all 4 subtypes required or redundant? *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2012, **17**(1), 21-33. Verfügbar unter: doi:10.1177/1074248410396877
103. TOTA, B., A.M. QUINTIERI und T. ANGELONE. The Emerging Role of Nitrite as an Endogenous Modulator and Therapeutic Agent of Cardiovascular Function [online]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, **17**(18), 1915-1925. Verfügbar unter: doi:10.2174/092986710791163948
104. TSANG, A., D.J. HAUSENLOY und D.M. YELLON. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2005, **289**(1), H2-7. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00091.2005
105. HEUSCH, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning [online]. *Circulation research*, 2015, **116**(4), 674-699. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348
106. HAUSENLOY, D.J., A. TSANG und D.M. YELLON. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning [online]. *Trends in cardiovascular medicine*, 2005, **15**(2), 69-75. ISSN 1050-1738. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tcm.2005.03.001
107. SIVARAMAN, V., D.J. HAUSENLOY, A.M. WYNNE und D.M. YELLON. Preconditioning the diabetic human myocardium [online]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2010, **14**(6B), 1740-1746. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00796.x
108. HAQ, S., G. CHOUKROUN, H. LIM, K.M. TYMITZ, F. DEL MONTE, J. GWATHMEY, L. GRAZETTE, A. MICHAEL, R. HAJJAR, T. FORCE und J.D. MOLKENTIN. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure [online]. *Circulation*, 2001, **103**(5), 670-677. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.cir.103.5.670
109. LIU, G.S., J. THORNTON, D.M. VAN WINKLE, A.W. STANLEY, R.A. OLSSON und J.M. DOWNEY. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 1991, **84**(1), 350-356.
110. GOTO, M., Y. LIU, X.M. YANG, J.L. ARDELL, M.V. COHEN und J.M. DOWNEY. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circulation research*, 1995, **77**(3), 611-621.

111. SCHULTZ, J.E., A.K. HSU und G.J. GROSS. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation research*, 1996, **78**(6), 1100-1104.
112. YAO, Z. und G.J. GROSS. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs [online]. *The American journal of physiology*, 1993, **264**(6 Pt 2), H2221-5. ISSN 0002-9513. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.1993.264.6.H2221
113. BANERJEE, A., C. LOCKE-WINTER, K.B. ROGERS, M.B. MITCHELL, E.C. BREW, C.B. CAIRNS, D.D. BENSARD und A.H. HARKEN. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circulation research*, 1993, **73**(4), 656-670.
114. LIU, Y., A. TSUCHIDA, M.V. COHEN und J.M. DOWNEY. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1995, **27**(3), 883-892.
115. BAINES, C.P., M. GOTO und J.M. DOWNEY. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1997, **29**(1), 207-216. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1006/jmcc.1996.0265
116. LIU, Y., W. DONG GAO, B. O'ROURKE und E. MARBAN. Synergistic Modulation of ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Currents by Protein Kinase C and Adenosine [online]. Implications for Ischemic Preconditioning. *Circulation research*, 1996, **78**(3), 443-454. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/01.RES.78.3.443
117. BELL, R. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart [online]. The role of PI3K, Akt and eNOS. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2003, **35**(2), 185-193. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0022-2828(02)00310-3
118. GOMEZ, L., M. PAILLARD, H. THIBAUT, G. DERUMEAUX und M. OVIZE. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion [online]. *Circulation*, 2008, **117**(21), 2761-2768. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066
119. LU, G., M. ASHRAF und K.H. HAIDER. Insulin-like growth factor-1 preconditioning accentuates intrinsic survival mechanism in stem cells to resist ischemic injury by orchestrating protein kinase  $\alpha$ -erk1/2 activation [online]. *Antioxidants & redox signaling*, 2012, **16**(3), 217-227. ISSN 1557-7716. Verfügbar unter: doi:10.1089/ars.2011.4112
120. KARDAMI, E., K. DETILLIEUX, X. MA, Z. JIANG, J.-J. SANTIAGO, S.K. JIMENEZ und P.A. CATTINI. Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection [online]. *Heart failure reviews*, 2007, **12**(3-4), 267-277. ISSN 1382-4147. Verfügbar unter: doi:10.1007/s10741-007-9027-0

121. MOCANU, M.M., R.M. BELL und D.M. YELLON. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2002, **34**(6), 661-668. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1006/jmcc.2002.2006
122. HAUSENLOY, D.J., A. TSANG, M.M. MOCANU und D.M. YELLON. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2005, **288**(2), H971-6. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00374.2004
123. HAUSENLOY, D.J., H.L. MADDOCK, G.F. BAXTER und D.M. YELLON. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular research*, 2002, **55**(3), 534-543.
124. JUHASZOVA, M., D.B. ZOROV, S.-H. KIM, S. PEPE, Q. FU, K.W. FISHBEIN, B.D. ZIMAN, S. WANG, K. YTREHUS, C.L. ANTOS, E.N. OLSON und S.J. SOLLOTT. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore [online]. *The Journal of clinical investigation*, 2004, **113**(11), 1535-1549. ISSN 0021-9738. Verfügbar unter: doi:10.1172/JCI19906
125. JAVADOV, S.A., S. CLARKE, M. DAS, E.J. GRIFFITHS, K.H.H. LIM und A.P. HALESTRAP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart [online]. *The Journal of physiology*, 2003, **549**(Pt 2), 513-524. ISSN 0022-3751. Verfügbar unter: doi:10.1113/jphysiol.2003.034231
126. OLDENBURG, O., Q. QIN, T. KRIEG, X.-M. YANG, S. PHILIPP, S.D. CRITZ, M.V. COHEN und J.M. DOWNEY. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2004, **286**(1), H468-76. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00360.2003
127. BELLACOSA, A., J.R. TESTA, R. MOORE und L. LARUE. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer biology & therapy*, 2004, **3**(3), 268-275.
128. LECOUR, S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2009, **47**(1), 32-40. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.019
129. LACERDA, L., S. SOMERS, L.H. OPIE und S. LECOUR. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway [online]. *Cardiovascular research*, 2009, **84**(2), 201-208. ISSN 0008-6363. Verfügbar unter: doi:10.1093/cvr/cvp274

130. LECOUR, S. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2009, **46**(5), 607-609. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.yjmcc.2009.01.003
131. ZUURBIER, C.J., W.M.C. JONG, O. EERBEEK, A. KOEMAN, W.P. PULSKENS, L.M. BUTTER, J.C. LEEMANS und M.W. HOLLMANN. Deletion of the innate immune NLRP3 receptor abolishes cardiac ischemic preconditioning and is associated with decreased IL-6/STAT3 signaling [online]. *PloS one*, 2012, **7**(7), e40643. Verfügbar unter: doi:10.1371/journal.pone.0040643
132. BURGER, D., F. XIANG, L. HAMMOUD, X. LU und Q. FENG. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2009, **296**(1), H84-93. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00372.2008
133. HEUSCH, G., K. BOENGLER und R. SCHULZ. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria [online]. *Circulation*, 2008, **118**(19), 1915-1919. ISSN 0009-7322. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805242
134. HEUSCH, G., J. MUSIOLIK, E. KOTTENBERG, J. PETERS, H. JAKOB und M. THIELMANN. STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication [online]. *Circulation research*, 2012, **110**(1), 111-115. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259556
135. SMITH, R.M., N. SULEMAN, L. LACERDA, L.H. OPIE, S. AKIRA, K.R. CHIEN und M.N. SACK. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning [online]. *Cardiovascular research*, 2004, **63**(4), 611-616. ISSN 0008-6363. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cardiores.2004.06.019
136. HUFFMAN, L.C., S.E. KOCH und K.L. BUTLER. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2008, **294**(1), H257-62. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00769.2007
137. BOENGLER, K., A. BUECHERT, Y. HEINEN, C. ROESKES, D. HILFIKER-KLEINER, G. HEUSCH und R. SCHULZ. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice [online]. *Circulation research*, 2008, **102**(1), 131-135. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164699
138. BOLLI, R., A.B. STEIN, Y. GUO, O.-L. WANG, G. ROKOSH, B. DAWN, J.D. MOKKENTIN, S.K. SANGANALMATH, Y. ZHU und Y.-T. XUAN. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2011, **50**(4), 589-597. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.yjmcc.2011.01.002

139. WEGRZYN, J., R. POTLA, Y.-J. CHWAE, N.B.V. SEPURI, Q. ZHANG, T. KOECK, M. DERECKA, K. SZCZEPANEK, M. SZELAG, A. GORNICKA, A. MOH, S. MOGHADDAS, Q. CHEN, S. BOBBILI, J. CICHY, J. DULAK, D.P. BAKER, A. WOLFMAN, D. STUEHR, M.O. HASSAN, X.-Y. FU, N. AVADHANI, J.I. DRAKE, P. FAWCETT, E.J. LESNEFSKY und A.C. LARNER. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration [online]. *Science (New York, N.Y.)*, 2009, **323**(5915), 793-797. ISSN 0036-8075. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.1164551
140. GRIMLEY, P.M., F. DONG und H. RUI. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine & growth factor reviews*, 1999, **10**(2), 131-157.
141. YAMAURA, G., T. TUROCZI, F. YAMAMOTO, M.A.Q. SIDDIQUI, N. MAULIK und D.K. DAS. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2003, **285**(2), H476-82. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00079.2003
142. ALESHIN, A., R. ANANTHAKRISHNAN, Q. LI, R. ROSARIO, Y. LU, W. QU, F. SONG, S. BAKR, M. SZABOLCS, V. D'AGATI, R. LIU, S. HOMMA, A.M. SCHMIDT, S.F. YAN und R. RAMASAMY. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2008, **294**(4), H1823-32. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.01210.2007
143. GUAQUIL, V.H., D.W. GOLDE, D.L. BECKLES, E.J. MASCARENO und M.A.Q. SIDDIQUI. Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts [online]. *Free radical biology & medicine*, 2004, **37**(9), 1419-1429. ISSN 0891-5849. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.041
144. SKYSCHALLY, A., S. GENT, G. AMANAKIS, C. SCHULTE, P. KLEINBONGARD und G. HEUSCH. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways [online]. *Circulation research*, 2015, **117**(3), 279-288. ISSN 0009-7330. Verfügbar unter: doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306878
145. BRANDENBURGER, T., R. HUHN, A. GALAS, B.H. PANNEN, V. KEITEL, F. BARTHEL, I. BAUER und A. HEINEN. Remote ischemic preconditioning preserves Connexin 43 phosphorylation in the rat heart in vivo [online]. *Journal of Translational Medicine*, 2014, **12**, 228. ISSN 1479-5876. Verfügbar unter: doi:10.1186/s12967-014-0228-8
146. NATIONAL ACADEMIES PRESS (US). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th. Washington (DC), 2011. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. ISBN 0-309-15400-6.
147. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 1951, **193**(1), 265-275.

148. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259), 680-685.
149. TOWBIN, H., T. STAHELIN und J. GORDON. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 1992, **24**, 145-149.
150. TONG, H., K. IMAHASHI, C. STEENBERGEN und E. MURPHY. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circulation research*, 2002, **90**(4), 377-379.
151. HEINRICH, P.C., M. MÜLLER, L. GRAEVE und G. LÖFFLER, Hg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer, 2014. Springer-Lehrbuch. ISBN 9783642179716.
152. HEINEN, N.M., V.E. PÜTZ, J.I. GÖRGENS, R. HUHN, Y. GRÜBER, C. BARTHUBER, B. PRECKEL, B.H. PANNEN und I. BAUER. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning Exhibits a Signaling Pattern Different From Local Ischemic Preconditioning [online]. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2011, **36**(1), 45-53. ISSN 1073-2322. Verfügbar unter: doi:10.1097/SHK.0b013e31821d8e77
153. TSAI, B.M., M. WANG, K.L. MARCH, M.W. TURRENTINE, J.W. BROWN und D.R. MELDRUM. Preconditioning [online]. Evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2004, **21**(3), 195-209. ISSN 1073-2322. Verfügbar unter: doi:10.1097/01.shk.0000114828.98480.e0
154. LI, J., W. XUAN, R. YAN, M.B. TROPAK, E. JEAN-ST-MICHEL, W. LIANG, R. GLADSTONE, P.H. BACKX, R.K. KHARBANDA und A.N. REDINGTON. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of beta-catenin [online]. *Clinical science (London, England : 1979)*, 2011, **120**(10), 451-462. ISSN 0143-5221. Verfügbar unter: doi:10.1042/CS20100466
155. ZOLFAGHARI, P.S., B. PINTO, A. DYSON und M. SINGER. The metabolic phenotype of rodent sepsis [online]. Cause for concern? *Intensive Care Medicine Experimental*, 2013, **1**(1), 6. Verfügbar unter: doi:10.1186/2197-425X-1-6
156. DOBSON, G.P. Small animal model species are not created equal [online]. *Critical Care Medicine*, 2012, **40**(2), 711. ISSN 0090-3493. Verfügbar unter: doi:10.1097/CCM.0b013e31823c8965
157. HAOUZI, P. Murine models in critical care research\* [online]. *Critical Care Medicine*, 2011, **39**(10), 2290-2293. ISSN 0090-3493. Verfügbar unter: doi:10.1097/CCM.0b013e3182227550
158. HAUSENLOY, D.J., E.K. ILIODROMITIS, I. ANDREADOU, A. PAPALOIS, G. GRITSOPOULOS, M. ANASTASIOU-NANA, D.T. KREMASTINOS und D.M. YELLON. Investigating the Signal Transduction Pathways Underlying Remote Ischemic Conditioning in the Porcine Heart [online].

- Cardiovascular drugs and therapy*, 2012, **26**(2), 87-93. ISSN 0920-3206. Verfügbar unter:  
doi:10.1007/s10557-011-6364-y
159. HATTORI, R., N. MAULIK, H. OTANI, L. ZHU, G. CORDIS, R.M. ENGELMAN, M.A.Q. SIDDIQUI und D.K. DAS. Role of STAT3 in Ischemic Preconditioning [online]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2001, **33**(11), 1929-1936. ISSN 0022-2828. Verfügbar unter:  
doi:10.1006/jmcc.2001.1456
160. YAMAURA, G., T. TUROCZI, F. YAMAMOTO, M.A.Q. SIDDIQUI, N. MAULIK und D.K. DAS. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning [online]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2003, **285**(2), H476-82. ISSN 0363-6135. Verfügbar unter: doi:10.1152/ajpheart.00079.2003
161. CHEN, H., X.-Y. JING, Y.-J. SHEN, T.-L. WANG, C. OU, S.-F. LU, Y. CAI, Q. LI, X. CHEN, Y.-J. DING, X.-C. YU und B.-M. ZHU. Stat5-dependent cardioprotection in late remote ischaemia preconditioning [online]. *Cardiovascular research*, 2018, **114**(5), 679-689. ISSN 0008-6363. Verfügbar unter: doi:10.1093/cvr/cvy014
162. MARZO, F., A. LAVORGNA, G. COLUZZI, E. SANTUCCI, F. TARANTINO, T. RIO, E. CONTI, C. AUTORE, L. AGATI und F. ANDREOTTI. Erythropoietin in heart and vessels [online]. Focus on transcription and signalling pathways. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2008, **26**(3), 183-187. ISSN 0929-5305. Verfügbar unter: doi:10.1007/s11239-008-0212-3
163. WU, Q., T. WANG, S. CHEN, Q. ZHOU, H. LI, N. HU, Y. FENG, N. DONG, S. YAO und Z. XIA. Cardiac protective effects of remote ischaemic preconditioning in children undergoing tetralogy of fallot repair surgery [online]. A randomized controlled trial. *European Heart Journal*, 2018, **39**(12), 1028-1037. ISSN 0195-668X. Verfügbar unter: doi:10.1093/eurheartj/ehx030
164. HILDEBRANDT, H.A., V. KREIENKAMP, S. GENT, P. KAHLERT, G. HEUSCH und P. KLEINBONGARD. Kinetics and Signal Activation Properties of Circulating Factor(s) From Healthy Volunteers Undergoing Remote Ischemic Pre-Conditioning [online]. *JACC: Basic to Translational Science*, 2016, **1**(1-2), 3-13. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jacbs.2016.01.007
165. MÜTZE, J., J. ROTH, R. GERSTBERGER und T. HÜBSCHLE. Nuclear translocation of the transcription factor STAT5 in the rat brain after systemic leptin administration [online]. *Neuroscience Letters*, 2007, **417**(3), 286-291. ISSN 0304-3940. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neulet.2007.02.074
166. PAUKKU, K. und O. SILVENNOINEN. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5 [online]. *Cytokine & growth factor reviews*, 2004, **15**(6), 435-455. ISSN 1359-6101. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cytogfr.2004.09.001
167. JOHNSEN, J., K. PRYDS, R. SALMAN, B. LOFGREN, S.B. KRISTIANSEN und H.E. BOTKER. The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and

effector organ mass on efficacy of protection [online]. *Basic research in cardiology*, 2016, **111**(2), 10. ISSN 0300-8428. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00395-016-0529-6

168. D. R. ALESSI, M. ANDJELKOVIC, B. CAUDWELL, P. CRON, N. MORRICE, P. COHEN und B. A. HEMMINGS. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF - 1 [online]. *The EMBO journal*, 1996, **15**(23), 6541-6551. ISSN 0261-4189. Verfügbar unter: doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x