

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

Pyk2-abhängige Wiederherstellung der endothelabhängigen Organprotektion in insulinresistenten NZO-Mäusen

Dissertation

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

vorgelegt von
Katerina Despina Askeridis-Zader

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Ralf Erkens

Zweitgutachter: Prof. Dr. Johannes Stegbauer

Für Johanna, mein Licht im Dunklen.
Für Oma, meine Wurzeln in der Erde.
Für Mama, meine Zuflucht vor dem Sturm.
Für Papa, meinen Willen jeden Schritt.
Für Amanda, meinen Kompass dieser Reise.
Für Torben, meinen Gefährten, mein Glück.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Erkens R, Duse DA, Brum A, et al. Inhibition of proline-rich tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischaemic preconditioning in type 2 diabetes. *Br J Pharmacol.* 2024;181(21):4174-4194. doi:10.1111/bph.16483

Zusammenfassung

Hintergrund: Diabetes mellitus Typ 2 (DM II) verschlechtert das *Outcome* nach akutem Myokardinfarkt und hebt die kardioprotektive Wirkung der herzfernen ischämischen Präkonditionierung (rIPC) auf. Eine der Ursachen dafür ist eine dysfunktionale endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) mit konsekutiv reduzierter Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). In diabetischen *New Zealand Obese* Mäusen (NZO) wurde eine endotheliale Dysfunktion und ein Verlust des rIPC-Signals aufgrund einer eNOS-Inhibition durch die *proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2) festgestellt. Mittels pharmakologischer Pyk2-Inhibition konnten die endotheliale Funktion sowie das rIPC-Signal wiederhergestellt werden. Hypothese: Durch rIPC freigesetzte kardioprotektive Botenstoffe sind mittels Plasma transferierbar, im diabetischen Phänotyp nicht vorhanden, jedoch durch Pyk2-Inhibition wiederherstellbar. Methoden: Thorakale Aortensegmente von C57BL/6J-Mäusen (BL6) wurden mit nativem und präkonditioniertem Plasma gesunder BL6- und diabetischer NZO-Mäuse mit und ohne Pyk2-Inhibition für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die endothelabhängige und -unabhängige Funktion in Vasoreaktivitätsstudien im Organbad untersucht. In einem translationalen Ansatz wurden Segmente thorakaler Aorten von BL6-Mäusen mit humanem nativem und präkonditioniertem Plasma von Diabetikern und Nicht-Diabetikern inkubiert und anschließend die Funktion *ex-vivo* im Organbad getestet. Ergebnisse: Nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma zeigten Aorten eine bessere endothelabhängige Dilatationsfunktion als mit nativem BL6-Plasma. Im Vergleich bestand kein Unterschied nach Inkubation mit präkonditioniertem oder nativem NZO-Plasma. Aortensegmente zeigten eine verbesserte endothelabhängige Dilatation nach Inkubation in präkonditioniertem NZO-Plasma nach pharmakologischer Pyk2-Inhibition. Nach Inkubation mit präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma zeigten Aorten ebenfalls eine Besserung der endothelvermittelten Dilatation. Dies konnte mit präkonditioniertem Diabetiker-Plasma nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassung: Die von rIPC freigesetzten menschlichen und murinen kardioprotektiven Botenstoffe können durch das Plasma auf murine Aorten transferiert werden. Präkonditioniertes Plasma diabetischer Menschen und Mäuse zeigt keine protektiven Eigenschaften. In diabetischen NZO-Mäusen kann das protektive rIPC-Signal durch Pyk2-Inhibition wiederhergestellt werden, was Pyk2 zu einem potenziellen medikamentösen *Target* gegen die im DM II vermittelte endotheliale Dysfunktion macht.

Abstract

Background: Type 2 diabetes mellitus (DM II) worsens the outcome after acute myocardial infarction and abolishes the cardioprotective effects of remote ischemic preconditioning (rIPC). Among other contributing factors, a dysfunctional endothelial nitric oxide synthase (eNOS) leads to a consequent decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO). In diabetic New Zealand Obese (NZO) mice, endothelial dysfunction and loss of rIPC signaling due to eNOS inhibition by proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) were detected. Pharmacologic Pyk2 inhibition restored endothelial function and rIPC signaling. **Hypothesis:** Cardioprotective messengers released by rIPC are transferable via plasma, not present in the diabetic phenotype, but can be restored by Pyk2 inhibition. **Methods:** Thoracic aortic segments from C57BL/6J mice (BL6) were incubated for one hour with native and preconditioned plasma from healthy BL6 and diabetic NZO mice with and without Pyk2 inhibition. Subsequently, endothelium dependent and independent function was investigated in vasoreactivity studies in the organ bath. In a translational approach, segments of thoracic aortas from BL6 mice were incubated with native and preconditioned human plasma from diabetic and non-diabetic patients. Afterwards the function was tested ex-vivo in the organ bath. **Results:** After incubation with preconditioned BL6 plasma, aortas showed better endothelium-dependent dilation than with native BL6 plasma. Comparatively, there was no difference inbetween incubation with preconditioned or native NZO plasma. Aortic segments incubated with preconditioned plasma of NZO that had previously received a Pyk2 inhibitor showed improved endothelium dependent dilation. After incubation with preconditioned non-diabetic plasma, aortas showed an improvement in endothelium-mediated dilation as well. This effect could not be demonstrated with preconditioned diabetic plasma. **Summary:** Human and murine cardioprotective messengers released by rIPC can be transferred to murine aortas through plasma. Preconditioned plasma from diabetic humans and mice shows no protective properties. In diabetic NZO mice protective rIPC signaling can be restored by Pyk2 inhibition, making Pyk2 a potential drug target against DM-mediated endothelial dysfunction.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
AEG	<i>glycation end-products</i>	KCl	Kaliumchlorid
Akt	Proteinkinase B	NO	Stickstoffmonoxid
ATP	Adenosintriphosphat	Nox2	NADPH-Oxidase 2
BL6	C57BL/6J	NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
Ca ²⁺	Calcium-Ion	NZO	New Zealand Obese
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	O ₂	Sauerstoffmolekül
CPTIO	2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5- tetramethylimidazolin-1- oxyl-3-oxid	PCI	perkutane Koronarintervention
DAPT	duale antithrombozytäre Therapie	PHE	Phenylephrin
DM I/II	Diabetes mellitus Typ 1/2	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat (PIP2)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	Pyk2	Proline-Rich-Tyrosine- Kinase-2
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>	rIPC	herzferne ischämische Präkonditionierung
FAK	<i>Fokal Adhesion Kinase</i>	Ser1177	Serin 1177
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	SNP	Natriumnitroprussid
IPC	ischämische Präkonditionierung	STEMI	ST-Hebungsinfarkt
I/R	Ischämie/Reperfusion	Thr495	Threonin 495
IRS	Insulinrezeptor	Tyr657	Tyrosin 657
		VEGF	Vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Heterozelluläre Kommunikation und Organoprotektion – Rolle der herzfernen ischämischen Präkonditionierung	1
1.2	Entstehung des rIPC-Signals und vaskuläre Funktion.....	2
1.3	Einfluss von Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion auf die heterozelluläre Kommunikation	5
1.4	Transfer von Wirkung.....	7
1.5	Ziele der Arbeit.....	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Materialliste	10
2.2	Versuchstiere	14
2.3	Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung	14
2.4	Aortenringversuche im Organbad.....	15
2.4.1	Organbadprotokoll.....	15
2.4.2	Transfer von murinem Plasma.....	16
2.4.3	Transfer von humanem Plasma	17
2.5	Ausschlusskriterien.....	18
2.6	Statistische Datenauswertung	18
3	Ergebnisse	20
3.1	Präkonditioniertes Plasma von BL6-Mäusen verbessert die endothelabhängige Dilatationsfähigkeit thorakaler BL6-Aortensegmente	20
3.2	Präkonditioniertes Plasma von NZO-Mäusen ändert nicht die endothel-abhängige Dilatationsfähigkeit thorakaler BL6-Aortensegmente	22
3.3	Pyk2-Inhibition stellt die endothelabhängige Freisetzung von Signalmolekülen in diabetischen NZO-Mäusen wieder her.....	24
3.4	Die durch Plasma transferierbaren, endothelial freigesetzten Effekte sind NO- abhängig	29
3.5	Präkonditioniertes Plasma von Nicht-Diabetikern verbessert die endothel- abhängige Dilatationsfähigkeit der thorakalen BL6-Aortensegmente	32
3.6	Präkonditioniertes Plasma von Diabetikern hat keinen Einfluss auf die endothel- abhängige Dilatationsfähigkeit der thorakalen BL6-Aortensegmente	34
4	Diskussion	36
4.1	Relevanz des rIPC-Signals und Möglichkeiten des Transfers.....	36
4.2	Verlust der positiven Effekte der rIPC bei Diabetes mellitus.....	38
4.3	Wiederherstellung der herzfernen Organoprotektion durch Pyk2-Inhibition in diabetischen NZO-Mäusen.....	41
4.4	Bedeutung des eNOS- und NO-Metabolismus.....	44

4.5	Humoral vermitteltes Signal durch Transfer von humanem Plasma	46
4.6	Limitationen.....	48
4.7	Ausblick.....	49
4.8	Schlussfolgerungen.....	50
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	51

1 Einleitung

1.1 *Heterozelluläre Kommunikation und Organoprotektion – Rolle der herzfernen ischämischen Präkonditionierung*

Die ischämische Herzerkrankung stellt weltweit wie auch in Deutschland eine der drei häufigsten Todesursachen dar (1,2). Im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes kommt es durch eine Okklusion der Koronararterien zu einer Unterversorgung des Myokards mit Blut, Nährstoffen und Sauerstoff, was den Zelltod kardialer Myozyten verursacht (3). Dies kann durch eingeschränkte Regenerationsmöglichkeiten zu gravierenden Konsequenzen wie Herzinsuffizienz, ischämischer Kardiomyopathie oder Tod führen (4). Zwecks Diagnosestellung und konsekutiver Rekanalisation des okkludierten Gefäßes gilt die Koronarangiographie mit perkutaner Koronarintervention (PCI) als Behandlungsmethode der Wahl bei ST-Hebungsinfarkt (STEMI) sowie bei Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) (5–8). Paradoxerweise erleiden die ischämischen Gebiete des Myokards nach erfolgreicher Gefäßwiedereröffnung über das Ausmaß der akuten Ischämie hinaus einen Reperfusionsschaden (I/R) (9). Dieser entsteht durch Exposition gegenüber toxischen Metaboliten, welche im hypoxischen Areal gebildet wurden (9,10). Um den I/R-Schaden zu reduzieren besteht ein dringender Bedarf, neue therapeutische Ansätze additiv zur PCI zu entwickeln. Seit der standardgemäßen Einführung dieses Verfahrens in die klinische Praxis konnte zwar ein beachtlicher Rückgang der Mortalitätsrate nach Myokardinfarkt verzeichnet werden (5,11), dennoch verblieb diese über die letzten 10 Jahre weitgehend unverändert (12).

Murry *et al.* entdeckten 1986, dass das Myokard vor Eintreten eines Myokardinfarkts durch kurzzeitige Okklusion und Reperfusion eines Koronargefäßes Widerstandsfähigkeit gegenüber einem später eintretenden ischämischen Ereignis aufbaut (13). Dieses Manöver wird als ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet. In abgewandelter Form zur vereinfachten technischen Durchführung kam in weiteren experimentellen Studien die herzferne ischämische Präkonditionierung (rIPC) zur Anwendung. Bei dieser wird ein peripher gelegenes arterielles Gefäß mehrfach okkludiert und reperfundiert, noch bevor ein ischämisches Ereignis stattfand (14,15). Dies reduziert die Infarktgröße nach einem Ereignis, obwohl die präkonditionierte Region fernab des Herzens liegt (14,15). In einer

Vielzahl von Studien konnte ein solcher protektiver rIPC-Effekt in Tiermodellen nachgewiesen werden (16–18).

In mehreren frühen klinischen Studien mit kleineren Kollektiven wirkte sich ischämische Konditionierung am Oberarm protektiv auf den I/R-Schaden bei STEMI-Patienten nach PCI aus (19,20). Um diese Ergebnisse zu sichern, wurde die CONDI-2/ERIC-PPCI-Studie in 33 Zentren in vier Ländern durchgeführt (21). 5401 STEMI-Patienten wurden einfachverblindet und randomisiert entweder der Kontroll- oder Interventionsgruppe zugeteilt. Mittels einer automatisierten aufblasbaren Manschette erhielten die Patienten der Interventionsgruppe vier Zyklen des rIPC-Manövers, bestehend aus intermittierend durchgeführter fünfminütiger Ischämie und Reperfusion des Arms. Dabei konnte durch rIPC jedoch keine Reduktion der Mortalitäts- oder Herzinsuffizienzrate beobachtet werden. Ein nicht-repräsentatives Patientenkollektiv in klinischen Studien könnte als mögliche Erklärung der bislang gescheiterten Translation der rIPC in die klinische Praxis in Betracht kommen. Zum aktuellen Zeitpunkt beruht die Mehrzahl aller Daten zur Infarktreaktion auf Forschung an gesunden Modellen (22–24). Patienten sind hingegen multimorbide und nehmen eine Vielzahl von Medikamenten mit unterschiedlichen Interaktionen ein (22). Trotz der bisher herausfordernden Umsetzung des rIPC-Manövers in die klinische Praxis sprechen sich Experten in Kardioprotektionsstudien für die Weiterentwicklung dieses nicht invasiven und mit wenig Aufwand durchführbaren Verfahrens aus (22,25). Dieses könnte nicht nur additiv zur PCI Anwendung finden um I/R-Schaden zu reduzieren, sondern in Regionen mit unzureichender Verfügbarkeit von PCI die medizinische Versorgung verbessern (26). Um das Potential dieser Methode zu erörtern, Gründe des Scheiterns einer Translation in die klinische Praxis zu ermitteln und Fehlerquellen zu eliminieren, ist weitere Forschung bezüglich des Wirkmechanismus notwendig.

1.2 Entstehung des rIPC-Signals und vaskuläre Funktion

Zelluläre, neuronale wie auch humorale Übertragungswege sind als Entstehungsarten des organoprotektiven rIPC-Signals zu vermuten, der genaue Entstehungsmechanismus bleibt zum aktuellen Zeitpunkt jedoch noch unklar. Als zelluläre Komponenten, welche an der Generierung eines organoprotektiven Signals durch rIPC beteiligt sind, werden beispielsweise neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten beschrieben (27,28). Am Menschen konnte gezeigt werden, dass rIPC nach 24 Stunden zu anti-

inflammatorischen Modulationen der Leukozyten führt und eine Inhibition von Genen eintritt, welche unter anderem Proteine für Chemotaxis, Adhäsion, Migration, Exozytose und Apoptose kodieren (18,28). Die inflammatorische Immunantwort spielt eine tragende Rolle bei I/R-Schaden, wobei proinflammatorische Zellen rekrutiert werden, welche über Zytokinsekretion weitere Zellmigration induzieren und den Infarktschaden aggravieren (27). TNF- α , IL-6 oder IL-1 β sind als inflammatorische Signalmoleküle zu nennen (27,28). Ebenfalls werden durch die Immunantwort reaktive Sauerstoffspezies und Enzyme wie Myeloperoxidase oder Proteasen sekretiert, wodurch Gewebs- und Gefäßschäden induziert werden (28). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die tägliche Durchführung des rIPC-Manövers oberflächliche Änderungen an Monozyten von ihrer pro-inflammatorischen CCR2-Form zu ihrer anti-inflammatorischen Tie-2-positiven Form bewirkte. (27,29).

Die Beteiligung einer neuronalen Transduktion des rIPC-Signals konnte durch Ghossein *et al.* an Wistar-Ratten demonstriert werden, wobei die Applikation eines Ganglionblockers zur Aufhebung des protektiven rIPC-Signals am Herzen führte (30). Verschiedene Substanzen wie Adenosin, Bradikinin oder *Calcitonin Gene-Related Peptide* werden durch das rIPC-Signal freigesetzt und stimulieren afferente Neurone des Herzens (31). Eine Durchtrennung des Nervus femoralis oder des Rückenmarks führte im Kaninchenmodell zum Verlust der rIPC-Wirkung am Herzen (32). Dementgegen konnte demonstriert werden, dass ein komplett denerviertes Herz im Schweinemodell nach Transplantation eine Reduktion der Infarktgröße nach rIPC aufwies (28,33). Dies lässt vermuten, dass alternative Mechanismen bei der durch rIPC vermittelten Signaltransduktion eine Rolle spielen.

An der humoralen Übertragung des organoprotektiven Signals sind multiple Botenstoffe beteiligt, welche über die Blutbahn an ihren Wirkungsort gelangen, darunter Aminosäuren, Zytokine, Neuropeptide, Adenosin sowie weitere Substanzen (28). Unter anderem kommt es durch kurzzeitige Ischämie und Scherkräfte zur Aktivierung mechanosensitiver Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie im Inneren der Endothelzellen, was sowohl lokal als auch systemisch biochemische Signalkaskaden auslöst (14,34,35). Diese führen in den arteriellen Gefäßwänden zu Veränderungen der Vasomotion, Struktur und Genexpression (14,36). Eine Depolarisation der Zellmembran von Endothelzellen und eine Inhibition von Kaliumkanälen führen dabei zur Aktivierung von Kalziumkanälen (37). Der Ca²⁺-Einstrom in die Endothelzellen aktiviert die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (37). Diese setzt Stickstoffmonoxid (NO) bei der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin aus dem Endothel frei (17,38,39). NO unterdrückt die Plättchenaggregation, sowie die Leukozyten- und Monozytenadhäsion an das Endothel und moduliert vaskuläre

Entzündungsprozesse (40–43). Es fördert zudem die Proliferation und Migration von Endothelzellen und regt die Angiogenese an (32,33). All diese Effekte wirken sich vaso- und kardioprotektiv aus (9,42). Rassaf *et al.* beschreiben, dass NO und sein stabileres Oxidationsprodukt Nitrit nach rIPC über den Blutstrom zum Herzen gelangen und dort eine organoprotektive Wirkung entfalten (17). Dies führt im Langendorff-Modell zu einer signifikanten Reduktion der Infarktzone und schützt das Myokard vor I/R-Schaden. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend kann nicht nur von einem lokalen, sondern auch von einem entstehungsfernen Wirkungsort des rIPC-Signals ausgegangen werden. Oxidativer Stress, welcher durch myokardiale Ischämie und Reperfusion auftritt, vermindert jedoch die Bioverfügbarkeit von intrazellulärem NO und reduziert in der Konsequenz dessen kardioprotektive Effekte (9).

Trotz der zahlreichen positiven Eigenschaften von NO ist die Aufrechterhaltung eines Redoxgleichgewichts der Metabolite im Gefäßsystem notwendig. Eine zu hohe Konzentration des reaktiven NOs wirkt sich toxisch auf das Gewebe aus, beispielsweise durch die Bildung von Superoxidradikalen (44,45). Um einer ungehemmten NO-Produktion durch die eNOS entgegenzuwirken und das Redoxgleichgewicht zu erhalten, existieren verschiedene aktivierende wie auch hemmende Regulationsmechanismen, unter anderem durch die intrazelluläre Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen wie auch über Phosphorylierungen der eNOS (44,46,47). Beispielsweise bedingt Insulin eine eNOS-aktivierende Signalkaskade über Stimulation des Insulinrezeptors, eines Tyrosinkinaserzeptors (48). Durch den darüber ausgelösten metabolischen Signalweg wird über die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und ihr *Downstream Target* Proteinkinase B (Akt) eine Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 (Ser1177) bewirkt (49,50). Hingegen übt die *Proline-Rich-Tyrosine-Kinase-2* (Pyk2), welche unter anderem abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies, Insulin und Ca^{2+} aktiviert wird (50–52), durch Phosphorylierung an Tyrosin 657 (Tyr657) eine Inhibition der eNOS aus (44). Eine solche hemmende Phosphorylierung an Tyr657 wirkt sich dominant gegenüber einer aktivierenden Phosphorylierung an Ser1177 aus (44). Im gesunden Organismus handelt es sich bei Pyk2 um einen notwendigen Schutzmechanismus vor der Bildung von Superoxidradikalen und toxischen Metaboliten. Dieser protektive Mechanismus ist bei Diabetes mellitus (DM) jedoch gestört (53).

1.3 Einfluss von Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion auf die heterozelluläre Kommunikation

Zu den bedeutendsten kardiovaskulären Risikofaktoren zählen die arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinkonsum und DM (54). Patienten mit DM II haben ein höheres Mortalitätsrisiko und erleiden mehr perioperative Komplikationen als ein Vergleichskollektiv ohne DM (8,55). Da DM als relevanter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert wurde (56), sind Verfahren notwendig, um diese vulnerable Patientengruppe vor gravierenden Folgen eines akuten ischämischen Ereignisses zu schützen. Das kardioprotektive rIPC-Manöver bleibt jedoch bei DM ohne protektiven Effekt (57). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass STEMI-Patienten mit DM keine positive Modulation eines Infarktareals durch rIPC zeigen, im Gegensatz zu STEMI-Patienten ohne DM (21,37).

Verschiedene Faktoren, die als Teil des metabolischen Syndroms bei DM ausgeprägt sind, erweisen sich für das Versagen der rIPC als relevant, beispielsweise Hyperglykämie, Übergewicht, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie. Bislang wurde das Scheitern von rIPC jedoch größtenteils an Forschungsmodellen untersucht, welche diese multimorbide Patientengruppe nur unzureichend abbildeten (22). Häufig fand dabei eine isolierte Betrachtung der Auswirkungen einzelner Komponenten des DM statt. Dementsprechend konnte isoliert gezeigt werden, dass sowohl bei Hyperglykämie als auch bei Übergewicht ein Versagen von rIPC beobachtet werden konnte, unter anderem durch Produktion von Superoxiden und Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren (58,59). Ebenso konnten Endothelfunktionseinschränkungen durch das Vorliegen von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie nachgewiesen werden (50).

Trotz des Vorliegens einer Insulinresistenz bleiben manche Signalwege durch das Vorliegen einer selektiven Insulinrezeptor-Resistenz aktiv und werden im Rahmen von Hyperinsulinämie forciert aktiviert (35). Beispielsweise wird durch die Aktivierung des mitogenen Signalweges über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und *extracellular-signal regulated kinases* (Erk) die PYK2 aktiviert, welche die eNOS durch Phosphorylierung an Tyr657 hemmt (35). Zudem kommt es während Hyperinsulinämie und Insulinresistenz über PI3K und Akt zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase 2 (Nox2) (siehe Abbildung 1) (48,50). Die Enzyme der Nox-Familie spielen generell eine wichtige Rolle in Pathomechanismen bei DM, sowohl bei der diabetischen Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie als auch bei kardiovaskulären Komplikationen durch die Bildung toxischer

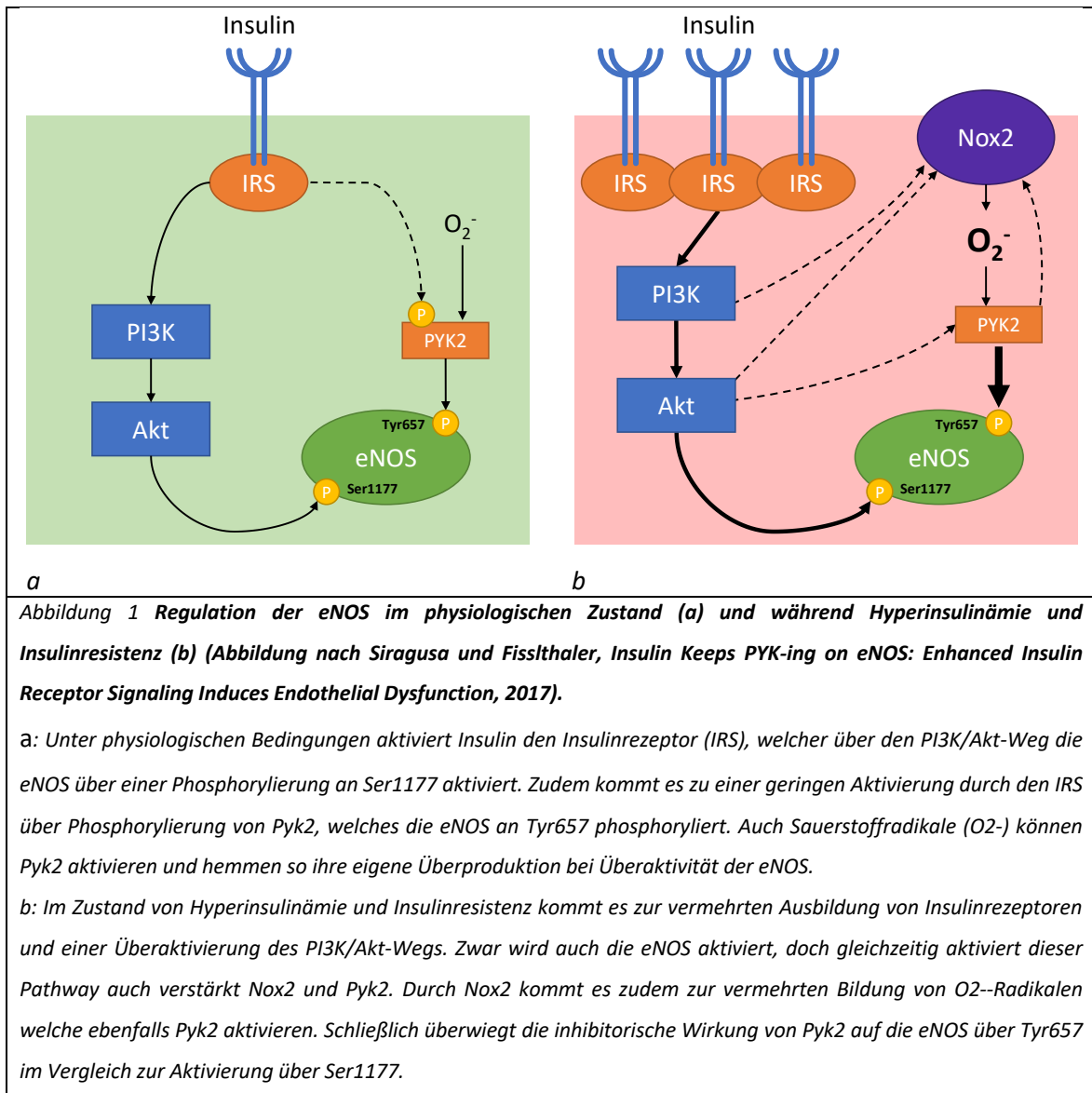


Abbildung 1 Regulation der eNOS im physiologischen Zustand (a) und während Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (b) (Abbildung nach Siragusa und Fisslthaler, *Insulin Keeps PYK-ing on eNOS: Enhanced Insulin Receptor Signaling Induces Endothelial Dysfunction*, 2017).

a: Unter physiologischen Bedingungen aktiviert Insulin den Insulinrezeptor (IRS), welcher über den PI3K/Akt-Weg die eNOS über einer Phosphorylierung an Ser1177 aktiviert. Zudem kommt es zu einer geringen Aktivierung durch den IRS über Phosphorylierung von Pyk2, welches die eNOS an Tyr657 phosphoryliert. Auch Sauerstoffradikale (O_2^-) können Pyk2 aktivieren und hemmen so ihre eigene Überproduktion bei Überaktivität der eNOS.

b: Im Zustand von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz kommt es zur vermehrten Ausbildung von Insulinrezeptoren und einer Überaktivierung des PI3K/Akt-Wegs. Zwar wird auch die eNOS aktiviert, doch gleichzeitig aktiviert dieser Pathway auch verstärkt Nox2 und Pyk2. Durch Nox2 kommt es zudem zur vermehrten Bildung von O_2^- -Radikalen welche ebenfalls Pyk2 aktivieren. Schließlich überwiegt die inhibitorische Wirkung von Pyk2 auf die eNOS über Tyr657 im Vergleich zur Aktivierung über Ser1177.

Superoxidradikale (60). Auch oxidativer Stress stellt einen starken Stimulus der Pyk2-Aktivierung dar (44,50).

Zusammenfassend überwiegen bei Hyperinsulinämie und Insulinresistenz die eNOS-inhibierenden Signale, wodurch die Vasodilatation durch NO eingeschränkt wird. Darauf aufbauend konnten Erkens *et al.* in *ex-vivo*-Vasoreaktivitätsstudien und durch Messungen flussmediierter Vasodilatation zeigen, dass eine Pyk2-Inhibition ein protektives rIPC-Signal wiederherstellen kann, obgleich dieses bei DM zuvor versagte (53). Für die Experimente der genannten Studie wurden *New Zealand Obese* (NZO) Mäuse genutzt, welche sich hinsichtlich der Ausprägung von Übergewicht, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz als realistisches Modell des DM II eignen (61–63). Unklar bleibt jedoch, über welche Transfermechanismen die durch Pyk2-Inhibition modulierten protektiven Effekte im kardiovaskulären System vermittelt werden.

1.4 Transfer von Wirkung

Anhand von Vasoreaktivitätsstudien ist es möglich, Signaltransduktion im kardiovaskulären System zu charakterisieren. Dabei ist das Organbad eine etablierte Methode, um zuverlässig im *ex-vivo*-Modell die Endothelfunktion isolierter Aortensegmente zu messen und mit der Funktion anderer Gefäße zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden Aortensegmente aus Versuchstieren isoliert. Diese werden auf zwei gegenläufige Drähte aufgehängt, wodurch sich eine Spannung messen lässt. In einem mit Puffer perfundierten Bad werden die Aortensegmente nachfolgend untersucht. Eine Konstriktionsreaktion der glatten Muskulatur wird durch die Applikation von Phenylephrin (PHE), einem Agonisten an $\alpha 1$ -Adrenozeptoren bewirkt (64). Durch die Applikation des Vasodilatators Acetylcholin (ACh) kann daraufhin eine endothelabhängige Dilatationsreaktion ausgelöst werden. Indem Acetylcholin an muskarinerge Rezeptoren der Endothelzellen bindet, werden G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) stimuliert, wodurch die Phospholipase C aktiviert wird (65). Diese spaltet das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu *Second Messenger*-Molekülen, die an das endoplasmatische Retikulum binden und vermehrte Ca^{2+} -Ausschüttung generieren (66). Die daraus resultierende Calmodulinaktivierung wird aktiviert und stimuliert die eNOS, sodass NO freigesetzt wird (67). Diese Änderung des Gefäßtonus wird registriert. Eine erneute Vasokonstriktion wird durch PHE eingeleitet, gefolgt von der Applikation von Sodiumnitroprussid (SNP) in das Organbad. SNP entfaltet als NO-Donor eine endothelunabhängige dilatative Wirkung und dient in Organbad-Experimenten als Kontrolle einer NO-medierten Reaktion (68).

Darauf basierend erforschten Alexander *et al.* die vaskuläre Funktion muriner Aorten bezüglich eines gestörten NO-Signalings nach Exposition mit Blutkonzentraten, die über eine längere Zeitspanne gelagert wurden (69). Dabei sollte sowohl ein möglicher Effekt als auch die zugehörige Transfersubstanz identifiziert werden. Ihre Hypothese war, dass die Lagerung von Blutprodukten zu einer erythrozytenvermittelten Störung der NO-modulierten Vasodilatation führt. In ihren Experimenten wurden Aorten von Wildtypmäußen gegenüber verschiedenen Substanzen exponiert: frische Vollblutkonzentrate, über 42 Tage gelagerte Vollblutkonzentrate sowie deren Plasmaüberstand. Aorten, welche im Organbad 42 Tage lang gelagertem Vollblut ausgesetzt waren, dilatierten signifikant schlechter als solche mit Zusatz von ungelagertem Vollblut. Dieser Effekt konnte bei isolierter Applikation von Erythrozyten in das Organbad reproduziert werden. Ein Aussetzen der Aorten gegenüber frischem Vollblut oder gelagertem Plasma führte nicht zu Dilatationsunterschieden. Die

Autoren folgerten, dass gelagerte Blutprodukte die Dilatationsfunktion der Aorten über den Erythrozytenanteil des Blutes einschränkten, was auf einer verringerten NO-Synthese basierte.

Zhou *et al.* wählten einen anderen Versuchsansatz, um eine Transfersubstanz und die dadurch vermittelten Effekte zu identifizieren (70). In Vasoreaktivitätsstudien wurde untersucht, ob Erythrozyten von Patienten mit DM II eine endotheliale Dysfunktion durch Hochregulation der Arginase induzieren. Dazu wurden Erythrozyten von Patienten mit DM II in Medium mit einem Hämatokrit von 45 % oder 10 % suspendiert. Aorten von Ratten wurden in einem Zellkulturinkubator in den Lösungen bei 37 °C und 5 % Carbogen für eine Stunde oder 18 Stunden inkubiert. Bei Inkubation über 18 Stunden und einem Hämatokrit von 45 % ließen sich signifikante Dilatationseinschränkungen nachweisen. Kein Effekt trat bei einem Hämatokrit von 10 % oder einer Inkubationszeit von einer Stunde auf. Inkubation mit Plasma von Diabetikern wies nach 18 Stunden Inkubation keinen Einfluss auf die Endothelfunktion auf. Demnach wurde die endotheliale Dysfunktion im DM II über eine Funktionseinschränkung der Erythrozyten vermittelt. Die Konzentration der Lösung wie auch die Inkubationsdauer waren von entscheidender Bedeutung für den Nachweis eines Effekts.

Zusammenfassend ermöglichen die von Alexander *et al.* und Zhou *et al.* vorgestellten Versuchsprotokolle eine Evaluation biologischer Signale über den Transfer von Blut- und Plasmabestandteilen von einem Spender auf einen Empfänger. Sowohl Auswirkungen humoral übertragbarer Faktoren als auch die Transfersubstanz können dadurch identifiziert werden. Bislang existiert allerdings noch kein etablierter Standard zur Untersuchung von Plasma- und Blutbestandteilen im Organbad.

1.5 Ziele der Arbeit

Folgende Ziele wurden für die vorliegende Arbeit definiert:

- 1) Etablierung eines *Bioassays*, um Effekte plasmatisch gelöster Signalmoleküle auf die endotheliale Funktion zu untersuchen
- 2) Untersuchung des Einflusses der diabetischen Stoffwechsellage auf die Signaltransduktion
- 3) Evaluation des Einflusses von Pyk2 durch endothelabhängige Signaltransduktion auf die Organoprotektion mittels pharmakologischer Inhibition eines Pyk2-abhängigen Signalwegs

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Geräte	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
Blutdruckmanschette	Welch Allyn, FlexiPort, Reusable Blood Pressure Cuff ADULT 11, 25-34cm	Welch Allyn GmbH, Hechingen, DE
Feinwaage	BP 210 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
Flowmeter	Flowmeter CM2	Uno BV, Zevenaar, NLD
Haken für das Organbad	Sup. Set for Rings 0,3 mm	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March, DE
Inkubator	Thermo Scientific Heraeus BBD6220 CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Isofluran Verdampfer	Isofluran Verdampfer	Uno BV, Zevenaar, NLD
Mikrowaage	L 2200 P	Sartorius AG, Göttingen, DE
Mikroskop	Leica MS 5	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
Mobiles Druckkalibrierungsgerät	KAL 84	Halstrup-Walcher GmbH, Kirchzarten, DE
Occluder	Vascular Occluder V0-8	DocXS Biomedical Products and Accessories, Ukiah, USA
Organbad	Glass Tissue Bath, 2 ml 73- 2273, jacketed, for Graz Organ Batg	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March, DE
Reinstwassersystem	Milli-Q Q-POD	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Spannungsmesser am Organbad	F30 Force Transducer Type 372	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March, DE

Geräte	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
Verstärkermodul	PowerLab 8/30	ADInstruments – Europe Head Office, Oxford, GB
Zentrifuge	Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE

Tabelle 1 **Materialliste Geräte.**

Chemikalien	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
Acetylcholinchlorid	Acetylcholine chloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Calciumchloriddihydrat	Calciumchlorid-Dihydrat krist. Zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Carbogen, 95 % O ₂ , 5 % CO ₂	Carbogen Lab	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE
2-(4-carboxy-phenyl)- 4,4,5,5- tetramethylimidazolin-1- oxyl-3-oxid (CPTIO) potassium salt	Carboxy-PTIO potassium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
D-Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Heparin-Natrium	Heparin Natrium 5.000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Isofluran	Isofluran-Piramal	Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Hallbergmoos, DE
Isotonische Kochsalzlösung	Isotonische Kochsalzlösung, Injektionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Homburg, DE
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid zur Analyse	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, DE

Chemikalien	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
Kaliumdihydrogenphosphat	Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, DE
Ketamin	Ketaset 100 mg/ml	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, DE
Magnesiumsulfat-hexahydrat	Magnesiumsulfate heptahydrate for analysis	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Sodium chloride	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat	Sodium hydrogen carbonate	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Phenylephrin	(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Pyk2-Inhibitor	PF-431396 hydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Natriumnitrit	Sodium nitrite	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Natrium-Nitroprussid	Sodium nitroprusside	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Xylazin	Rompun Injektionslösung	Bayer AG, Leverkusen, DE

Tabelle 2 **Materialliste Chemikalien.**

Allgemeine Verbrauchsmaterialien	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
1 ml Spritze	Omniflix-F Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
10 ml Spritze	Inject 10 ml / Luer Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
25 G Kanüle	BD Eclipse Needle 25G x 5/8	BD GmbH, Heidelberg, DE
Citratblutentnahme- röhrchen	BD Vacutainer, Plus Blood Collection Tubes 4,5 mL	BD GmbH, Heidelberg, DE
Filtermembran	Nitrocellulose (NC) Membrane 0,45 µm	GVS Großverbraucherspezialisten eG, Heidenheim, DE
Insulinspritze	Omnican F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Zellkulturplatte	Cellstar 12 Well Suspension Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

Tabelle 3 Materialliste Allgemeine Verbrauchsmaterialien.

Software	Produktbezeichnung	Firma, Stadt, Land
Excel	Office Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism	GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
LabChart	LabChart 8 Reader	ADInstruments – Europe Head Office, Oxford, GB
Word	Office Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabelle 4 Materialliste Software.

2.2 Versuchstiere

Als Wildtypmäuse wurden C57BL/6J (BL6) genutzt und aus der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen.

Als Mausmodell für DM wurden diabetische *New Zealand Obese* Mäuse (NZO) untersucht. Diese konnten freundlicherweise aus dem Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) in Düsseldorf bezogen werden (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani). Es wurden nur männliche Tiere genutzt, die das ganze Spektrum des DM II aufweisen (Übergewicht, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz). Alle Tiere wurden den Regularien entsprechend bei Standardraumtemperatur (19-21 °C) und -luftfeuchtigkeit (50-60 %) gehalten. Ein zwölfstündiger Tag- und Nacht-Zyklus wurde aufrechterhalten. Die Mäuse erhielten keimarmes und gesäuertes Trinkwasser sowie Standardtrockenfutter. Die Mausbehausungen entsprachen den aktuellen Tierschutzregularien.

Maustypen	Bezeichnung	Züchter
New Zealand Obese Maus	NZO/HILtJ	Deutsches Diabetes-Zentrum, Düsseldorf, DE
Wildtypmaus	C57BL/6J	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, FR

Tabelle 5 **Materialliste Maustypen.**

2.3 Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung

Für alle Versuche bestand ein gültiges Ethikvotum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Nummer ID2017034183 – 5903R.

Eine Tierversuchsgenehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen lag unter den Aktenzeichen 84-02.04.2014.A432 und 81-02.04.2020.A117 vor.

2.4 Aortenringversuche im Organbad

2.4.1 Organbadprotokoll

Vasoreaktivitätsstudien wurden an thorakalen Aortenabschnitten von BL6 Mäusen durchgeführt. Zur Aortenentnahme wurden Mäuse mit Ketamin (100 mg pro kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg pro kg Körpergewicht) intraperitoneal narkotisiert. Mit einer stumpfen Pinzette und einer stumpfen Schere wurde die Oberhaut der Maus über dem Thorax entfernt. Anschließend wurde der Thorax mit einer stumpfen Schere eröffnet und Herz und Lungenflügel möglichst ohne Zug mit einer stumpfen Pinzette und einer spitzen Schere entnommen. Ösophagus und Trachea wurden entfernt. Bereits im Thorax wurde die Aorta an der apikalen Seite von möglichst viel Fett befreit. Die Aorta wurde ebenfalls ohne Zug aus dem Thorax gelöst und in einen mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer (Bestandteile in Tabelle 6 aufgeführt) befüllten *Monolayer* überführt. Daraufhin wurde die Aorta mit einer spitzen Pinzette von Fettgewebsüberständen freipräpariert. Der Anfang und das Ende der Aorta wurden abgetrennt und das Mittelstück in drei ca. 2 mm lange Segmente geteilt. In dem mit Perfusat gefüllten *Monolayer* wurden die Aortensegmente auf einen Metallhaken aufgefädelt und in das Organbad aufgehängt, ohne das Endothel der Aorta zu beschädigen. Schließlich konnte die Aorta in das Organbad eingelassen werden. Parallel wurden bis zu drei Segmente einer Mäuseaorta analysiert und deren Messwerte gemittelt.

Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurden die Chemikalien in Reinstwasser gelöst (siehe Tabelle 6) und über 15 Minuten mit Carbogen (95 % v/v Sauerstoff, 5 % v/v CO₂) begast. Daraufhin wurde Calciumchloriddihydrat (siehe Tabelle 6) hinzugegeben und für weitere 5 Minuten unter Begasung gelöst, bevor das Perfusat filtriert wurde.

Chemikalie	Menge
Natriumchlorid	6,9 g
Kaliumchlorid	0,3 g
Magnesiumsulfathexahydrat	0,2 g
Natriumhydrogencarbonat	2,09 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,16 g
Glucose	1,8 g
Calciumchloriddihydrat	0,37 g

Tabelle 6 Chemikalien zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers.

Der hergestellte Krebs-Henseleit-Puffer wurde in ein 38 °C warmes Wasserbad gestellt und mit Carbogen begast. Mit dem Programm *LabChart 8* wurde das Organbad-System mittels eines geeichten 1 g Gewichts auf 0 mN und auf 10 mN kalibriert.

Es folgte der Funktionstest des Endothels, wofür die Aorta zunächst auf 5 mN vorgespannt wurde. Dieser Vorgang wurde nach 15 Minuten wiederholt. 45 Minuten nach Beginn der Kalibrierung wurde die Spannung auf 10 mN erhöht. Nach jedem der drei Arbeitsschritte wurde der Puffer jeweils erneuert. Nach der Kalibrierungsphase wurden 80 nM KCl hinzugegeben und gewartet, bis ein Plateau erreicht wurde (20 Minuten). Die Bäder wurden im Anschluss mit Puffer gewaschen, bis 10 mN wieder erreicht waren. Ein Bolus 0,2 µM PHE wurde in die Bäder pipettiert, wodurch eine Vasokonstriktion ausgelöst wurde. Diese Konzentration basierte auf einer zuvor errechneten mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) (53,71). Daraufhin wurde der endothelabhängige Vasodilatator ACh in die Bäder mit einer Wirkkonzentration von 0,1 nM bis zu 10 µM auftitriert. Nach erneutem Erreichen der Anfangsspannung (10 mN) durch mehrmaliges Wechseln des Puffers wurde ein zweites Mal PHE als Verdünnungsreihe appliziert. So bestanden steigende Konzentrationen innerhalb der Bäder von 0,1 nM bis zu 10 µM. Als Kontrolle wurde SNP als endothelunabhängiger NO-Donor in Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 µM hinzugegeben.

2.4.2 *Transfer von murinem Plasma*

Über 35 Minuten wurden die Mäuse insgesamt mit Isofluran in Narkose versetzt, während die Maus fixiert mit der Schnauze durch einen Schlauch spontan atmete. Mit 3 mg/m³ Isofluran wurde die Narkose bei BL6 initiiert und mit 1,5 mg/m³ Isofluran aufrechterhalten. Aufgrund des höheren Fettgewebsanteils bei NZO-Mäusen und folglich höherer Diffusionsrate in das Fettgewebe wurde die initiale Isoflurandosis bei NZO-Mäusen auf 4 mg/m³ erhöht und bei 2,5 mg/m³ erhalten.

Mäusen, die das rIPC-Manöver vor Plasmaentnahme erhielten, wurde am linken Bein über der Arteria femoralis ein Okkluder angebracht. Im Takt von fünf Minuten wurde die Manschette viermal auf 300 mmHg aufgepumpt und nach fünf Minuten abgelassen, sodass es zu vier Phasen der Ischämie und Reperfusion kam. In der letzten Phase der Reperfusion wurde mit einer auf Eis gelegten, mit Heparin beschichteten Spritze 1 ml Vollblut aus dem Herzen der Maus entnommen. Mäuse der Kontrollgruppe erhielten die gleiche Narkosetiefe und -dauer.

In den Versuchen, in denen eine Pyk2-Inhibition stattfand, wurde eine Lösung aus dem Pyk2-Inhibitor PF-431396 hydrate, dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und NaCl angesetzt. In einer 10 % DMSO-Lösung betrug die Endkonzentration des Pyk2-

Inhibitors 11 nMol/L. 15 Minuten bevor das rIPC-Manöver durchgeführt wurde, wurden einer Spendermaus 100 µl dieser Lösung intraperitoneal appliziert. Als Kontrollgruppe wurden Versuche bei alleiniger Injektion von 10 % DMSO-Lösung durchgeführt.

Das gewonnene Vollblut wurde in einem Eppendorfreagenz bei 37 °C und 3000 x g für drei Minuten zentrifugiert und der Plasmaüberstand abpipettiert. Das Plasma wurde im Verhältnis von drei Anteilen Plasma zu zwei Anteilen Puffer auf eine physiologische Konzentration gebracht. In den Versuchen, in denen der NO-Scavenger CPTIO genutzt wurde, waren 300 µM CPTIO in der Suspension der Zellkulturplatte enthalten.

Für die Inkubation wurde die Lösung aus Plasma und Puffer zu der Aorta einer BL6 in eine Zellkulturplatte gegeben und bei 37 °C über eine Stunde bei 5 % CO₂ und 95 % O₂ inkubiert. Daraufhin folgte die Präparation in einem *Monolayer* mit 4 °C kaltem Krebs-Henseleit-Puffer.

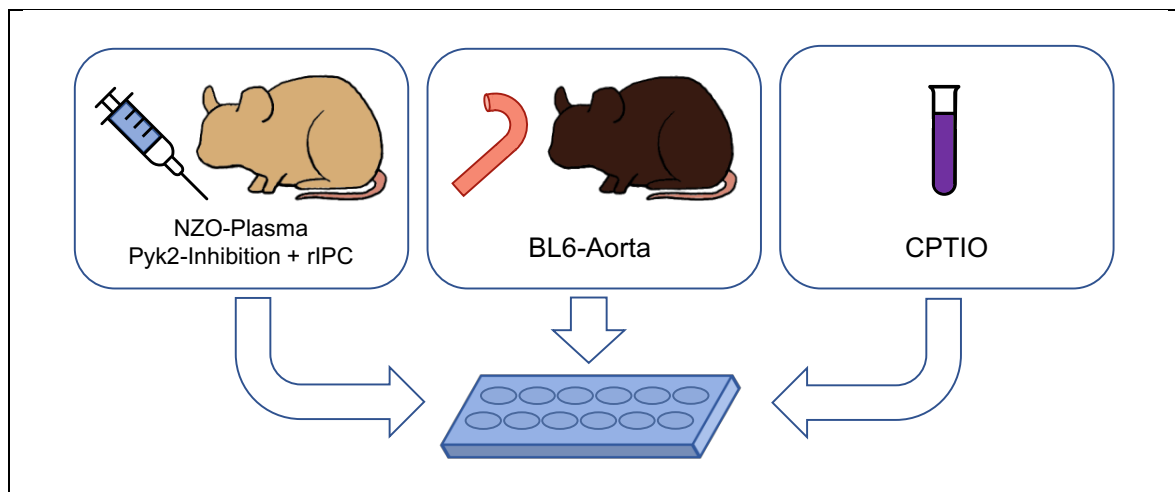


Abbildung 2 Durchführung des Inkubationsprotokolls von NZO-Plasma nach Pyk2-Inhibition und NO-Scavenging (eigene Abbildung). Zunächst werden 11 nM des Pyk2-Inhibitors in 100 µl einer 10 % DMSO gelöst und der NZO-Maus 15 Minuten vor Durchführung des rIPC-Manövers appliziert. Aus dieser Maus wird folgend Plasma gewonnen, welches im Verhältnis von drei Anteilen Plasma und zwei Anteilen Puffer gelöst wird. Die Plasma-Puffer-Lösung enthielt in den Versuchen mit NO-Scavenging 300 µM CPTIO. Darin wird eine BL6-Aorta für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Carbogen inkubiert.

2.4.3 Transfer von humanem Plasma

In die Untersuchung einbezogen wurden männliche Patienten der Universitätsklinik Düsseldorf mit bekanntem DM II, einem HbA1c von 5,9 bis 7,9 und im Alter zwischen 70 und 85 Jahren. Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Probanden zwischen 20 und 50 Jahren, wobei Ausschlusskriterien chronische Erkrankungen sowie chronische Medikamenteneinnahme waren.

Alle Probanden spendeten sowohl unbehandelt als auch nach Durchführung des rIPC-Manövers Vollblut. Dafür wurde eine Blutdruckmanschette in vier Zyklen alle fünf Minuten auf 200 mmHg aufgepumpt und wieder abgelassen. Den Probanden wurde Blut mittels eines Citrat-Blutentnahmeröhrchens entnommen, welches bei 37 °C und 3000 g für drei Minuten zentrifugiert wurde. Das so erhaltene Plasma wurde im Verhältnis von 3:2 mit Puffer gelöst. In dieser Lösung wurden die Aorten unter gleichen Bedingungen wie in den Versuchen mit murinem Plasma inkubiert und die Endothelfunktion im Organbad analysiert.

2.5 Ausschlusskriterien

Zeigten Aortensegmente nicht den physiologischen S-förmigen Kurvenverlauf bei der ACh-Reaktion, sondern einen L-förmigen Verlauf, wurden sie nicht in die Auswertung einbezogen. Aorten wurden ebenfalls nicht einbezogen, wenn ein negativer Prozentsatz in der ACh-Reaktion auftrat oder unter SNP-Applikation keine Reaktion, eine Konstriktion oder eine übermäßige Dilatation verzeichnet wurde. Der *Cut-off* wurde dafür bei -50 % Relaxation gesetzt. Manche Aortensegmente wurden ungewollter mechanischer Belastung ausgesetzt, weswegen keine Vergleichbarkeit mehr gewährleistet war. Aortensegmente wurden entfernt, wenn das Aufhängen mehr als drei Versuche benötigte, wenn Zug auf den zuvor geeichten Messapparat beispielsweise beim Pipettieren ausgeübt wurde oder wenn Einstellungsfehler oder sich lösende Verstopfungen der Begasungsschläuche zu einer starken Begasung führten. Diese Vorfälle wurden im Logbuch protokolliert und die betroffenen Aortensegmente entfernt.

2.6 Statistische Datenauswertung

Die Aufzeichnung der Rohdaten wurde mit dem Programm *LabChart 8* durchgeführt. Während der Durchführung der Experimente im Organbad wurden Zeitpunkt und Wirkstoff protokolliert. Die Messwerte wurden anhand dieser Kommentare in *Microsoft Excel 2013* eingetragen und analysiert. PHE wurde in Prozent der maximalen Konstriktion unter KCl angegeben. Die Dilatation unter ACh wurde in Prozent der maximalen PHE-medierten Kontraktion angegeben. Wurde die maximale Dilatation vor der letzten pipettierten Konzentration ACh erreicht und eine Konstriktionsreaktion setzte aufgrund der Bildung vasoaktiver Prostaglandine ein, wurde das zuvor bestimmte Maximum ebenfalls für die

folgenden Konzentrationen angegeben. Die SNP-Werte wurden auf die maximale Konstriktion unter PHE bezogen.

Abbildungen der Mittelwerte und SEM wurden mit *GraphPad Prism 5.0* erstellt. Um statistische Unterschiede zwischen Daten bei ACh, PHE und SNP festzustellen, wurden zweifaktorielle ANOVA sowie Sidak Post-hoc-Tests durchgeführt. Zur Datenanalyse der Spannung unter KCl wurden t-Tests durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Präkonditioniertes Plasma von BL6-Mäusen verbessert die endothelabhängige Dilatationsfähigkeit thorakaler BL6-Aortensegmente

Zunächst sollten die Auswirkungen des Inkubationsprotokolls auf die Gefäßfunktion analysiert werden. Die vasoreaktive Funktion von unbehandelten BL6-Aorten sowie BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma wurde verglichen (siehe Abbildung 3).

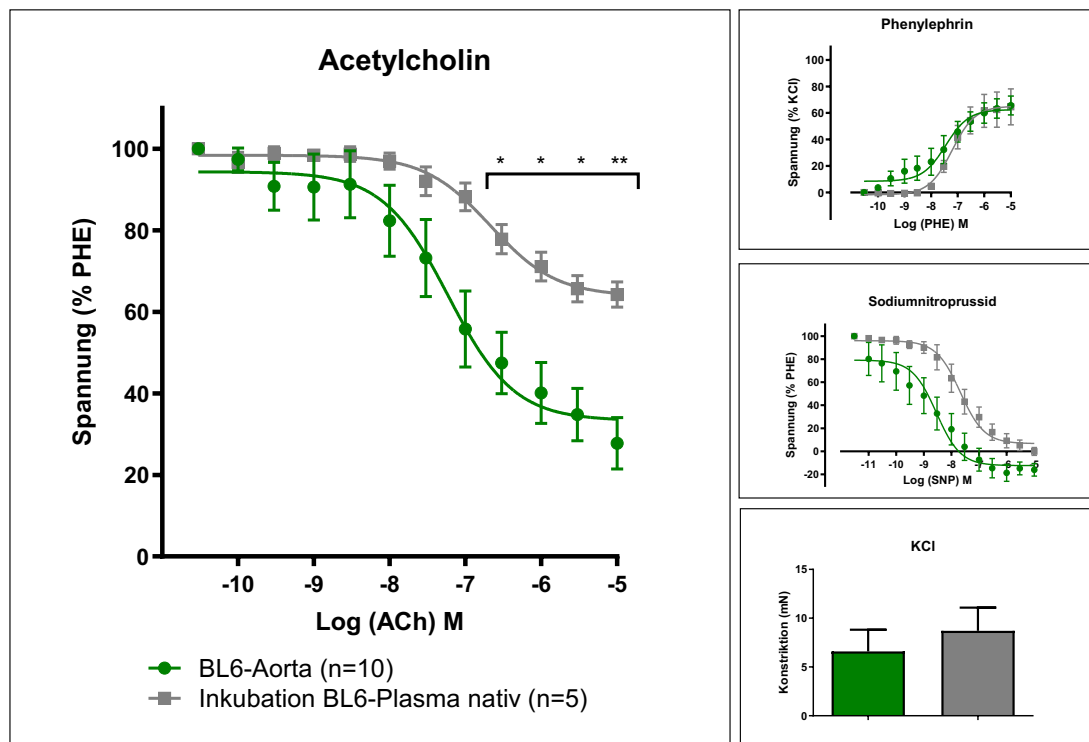


Abbildung 3 Dosiswirkungskurven von unbehandelten BL6-Aorten und BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Es zeigten sich signifikante Dilatationsunterschiede unter ACh zwischen nativen BL6-Aorten und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma ($p = 0,0001$). Es bestand eine stärkere maximale Dilatation nativer BL6-Aorten als die von Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma ($72 \% \pm 6$ versus $36 \% \pm 3$; $n_{\text{BL6 Aorta}} = 10$ versus $n_{\text{BL6 Plasma nativ}} = 5$). Dabei zeigten Sidak Post-hoc-Tests eine signifikant stärkere Reaktion bei ACh-Konzentrationen von 300 nM bis 10 μ M.

In der Konstriktionsreaktion unter PHE lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosiswirkungskurven nativer BL6-Aorten und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma vor (maximale Dilatation $66 \% \pm 7$ versus $65 \% \pm 14$; $n_{BL6 \text{ Aorta}} = 10$ versus $n_{BL6 \text{ Plasma nativ}} = 5$).

In der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP konnten keine signifikanten Dilatationsunterschiede zwischen unbehandelten BL6-Aorten und Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma festgestellt werden ($116 \% \pm 6$ versus $100 \% \pm 4$; $n_{BL6 \text{ Aorta}} = 10$ versus $n_{BL6 \text{ Plasma nativ}} = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar. Aus diesem Experiment ging hervor, dass nach dem Inkubationsprotokoll eine Einschränkung der Dilatationsfunktion auftrat. Da diese sich jedoch für alle inkubierten Aorten gleich verhalten wird, ist von einer Vergleichbarkeit der Versuchsdurchläufe auszugehen. Folgend wurde die vasoreaktive Funktion von BL6-Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem sowie nicht-präkonditioniertem BL6-Plasma verglichen (siehe Abbildung 4).

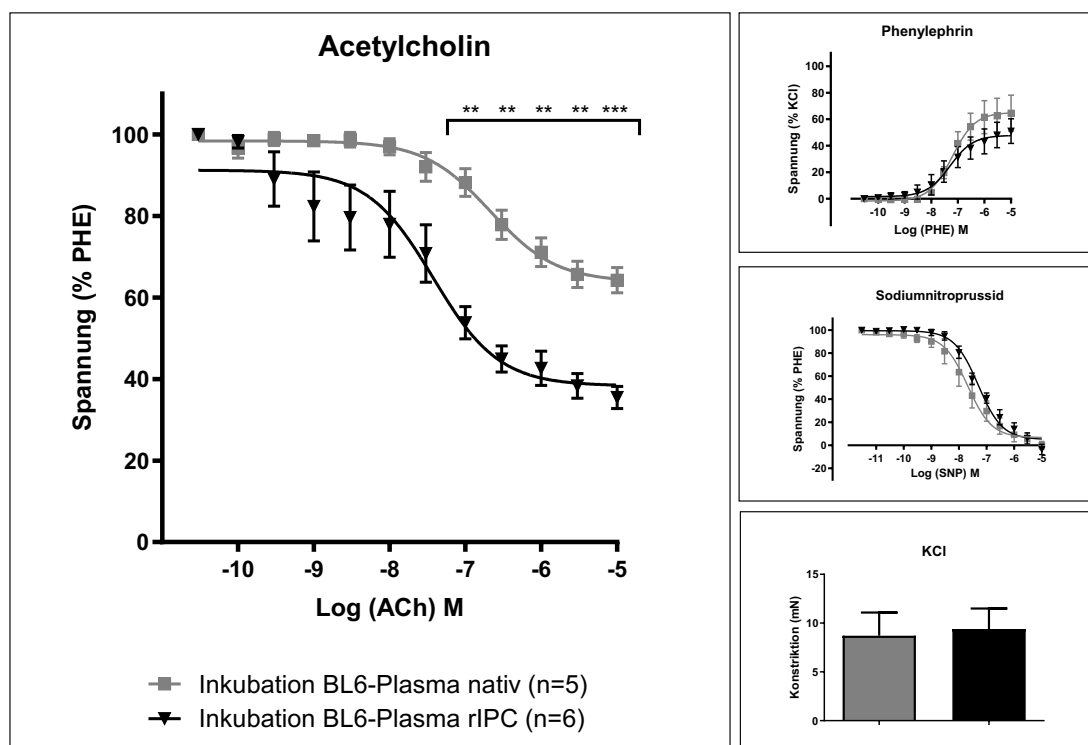


Abbildung 4 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma und BL6-Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Es zeigten sich signifikante Dilatationsunterschiede unter ACh zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma ($p = 0,0001$). Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma zeigten eine verbesserte Dilatationsfunktion zu Inkubation mit nativem BL6-Plasma ($65 \% \pm 3$ versus $36 \% \pm 3$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$ versus $n_{\text{BL6 Plasma nativ}} = 5$). Es ließen sich signifikante Unterschiede bei einer Dosis von 100 nM bis 10 μM zu der Gruppe mit präkonditioniertem Plasma verzeichnen.

In der Konstriktionsreaktion unter PHE lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosiswirkungskurven von Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma vor (maximale Dilatation $51 \% \pm 9$ versus $65 \% \pm 14$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$ versus $n_{\text{BL6 Plasma nativ}} = 5$).

In der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP konnten keine Unterschiede der Dosiswirkungskurven der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma und nativem BL6-Plasma festgestellt werden ($104 \% \pm 4$ versus $100 \% \pm 4$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$ versus $n_{\text{BL6 Plasma nativ}} = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Insgesamt zeigt sich eine Verbesserung der Endothelfunktion nach Inkubation mit präkonditioniertem Plasma von BL6-Mäusen, bestätigend für die Transferierbarkeit der plasmatisch gelösten Signalmoleküle freigesetzt aus dem Endothel durch rIPC.

3.2 Präkonditioniertes Plasma von NZO-Mäusen ändert nicht die endothel-abhängige Dilatationsfähigkeit thorakaler BL6-Aortensegmente

Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma und Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers wurden hinsichtlich ihrer vaskulären Funktion verglichen (siehe Abbildung 5).

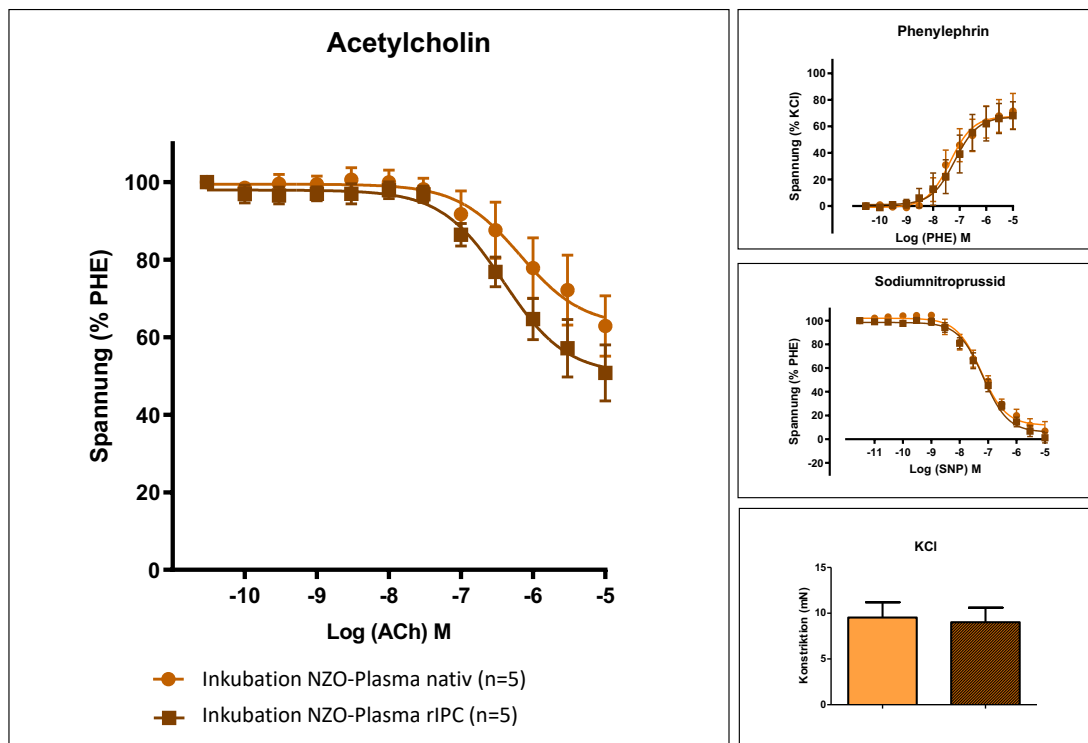


Abbildung 5 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma und BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; t-Test (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test (in obigen Abbildungen nicht signifikant).

In der endothelabhängigen Dilatationsreaktion unter ACh zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dilatationskurven von Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma im Vergleich zu Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma (maximale Dilatation 37 % $\pm$ 8 versus 49 % $\pm$ 7; n = 5).

In der Konstriktionsreaktion unter PHE stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosiswirkungskurven von Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma dar (maximale Konstriktion 71 % $\pm$ 13 versus 68 % $\pm$ 11; n = 5).

In der endothelabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosiswirkungskurven von Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma (maximale Dilatation 93 % $\pm$ 8 versus 99 % $\pm$ 4; n = 5).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die transferierbaren Signalmoleküle im diabetischen NZO-Mausmodell vom Endothel nicht freigesetzt werden, bestätigt durch die fehlende Verbesserung der Endothelfunktion nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma.

3.3 Pyk2-Inhibition stellt die endothelabhängige Freisetzung von Signalmolekülen in diabetischen NZO-Mäusen wieder her

Die Auswirkungen einer Pyk2-Inhibition auf die plasmatische Signalübertragung diabetischer NZO-Mäuse sollten untersucht werden. Die vaskuläre Funktion von Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition sowie Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma wurde verglichen (siehe Abbildung 6).

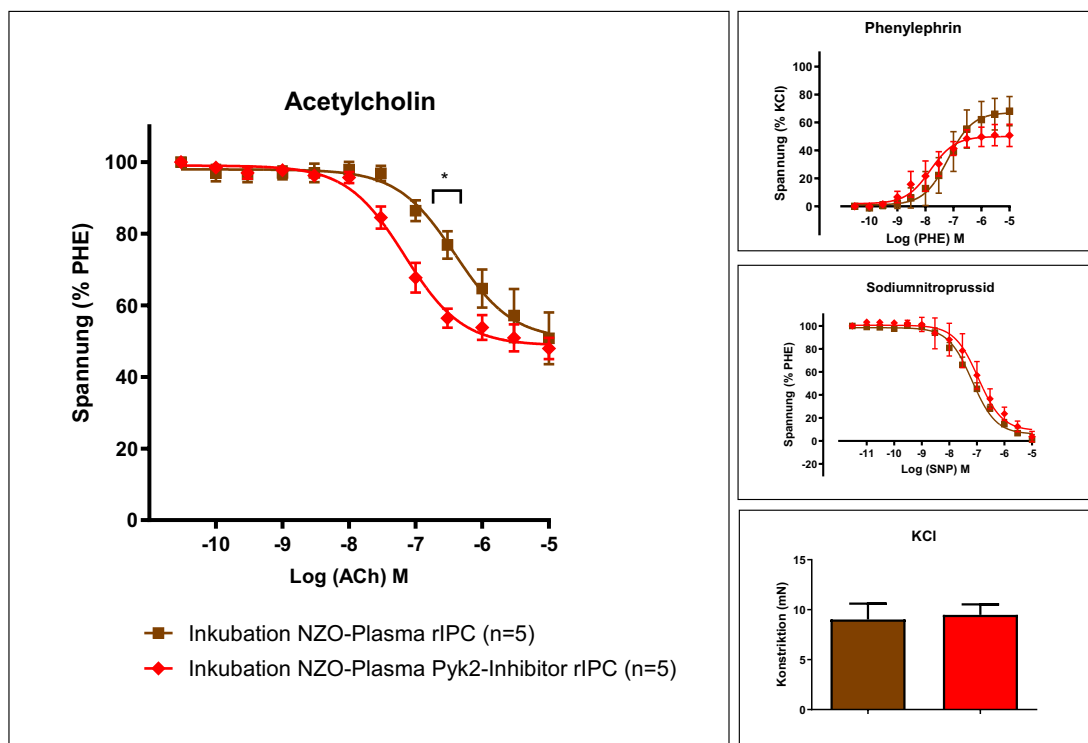


Abbildung 6 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers und BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers mit Pyk2-Inhibition (Abbildung modifiziert nach Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auf titrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Es konnten signifikante Unterschiede der Dosiswirkungskurven in der endothelabhängigen Reaktion von Aorten nach Inkubation in präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma gezeigt werden ($p < 0,0001$). In der endothelabhängigen Reaktion unter ACh zeigten Aorten nach Inkubation in präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition eine stärkere Dilatation als Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma ($52 \% \pm 3$ versus $49 \% \pm 7$; $n = 5$). Ein signifikanter Unterschied der Dosiswirkungskurven trat bei einer Konzentration von 300 nM auf.

In der Konstriktionsreaktion unter PHE lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma vor (maximale Konstriktion $51 \% \pm 8$ versus $68 \% \pm 11$; $n = 5$).

In der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion auf SNP stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma dar (maximale Dilatation $96 \% \pm 5$ versus $99 \% \pm 4$; $n = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Nachdem eine Verbesserung der Endothelfunktion durch Inkubation in präkonditioniertem Plasma diabetischer NZO mit Pyk2-Inhibition beobachtet werden konnte, war zu überprüfen, ob diese ein physiologisches Maß erreichte. So wurde die vasoreaktive Funktion von Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition sowie Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma verglichen (siehe Abbildung 7).

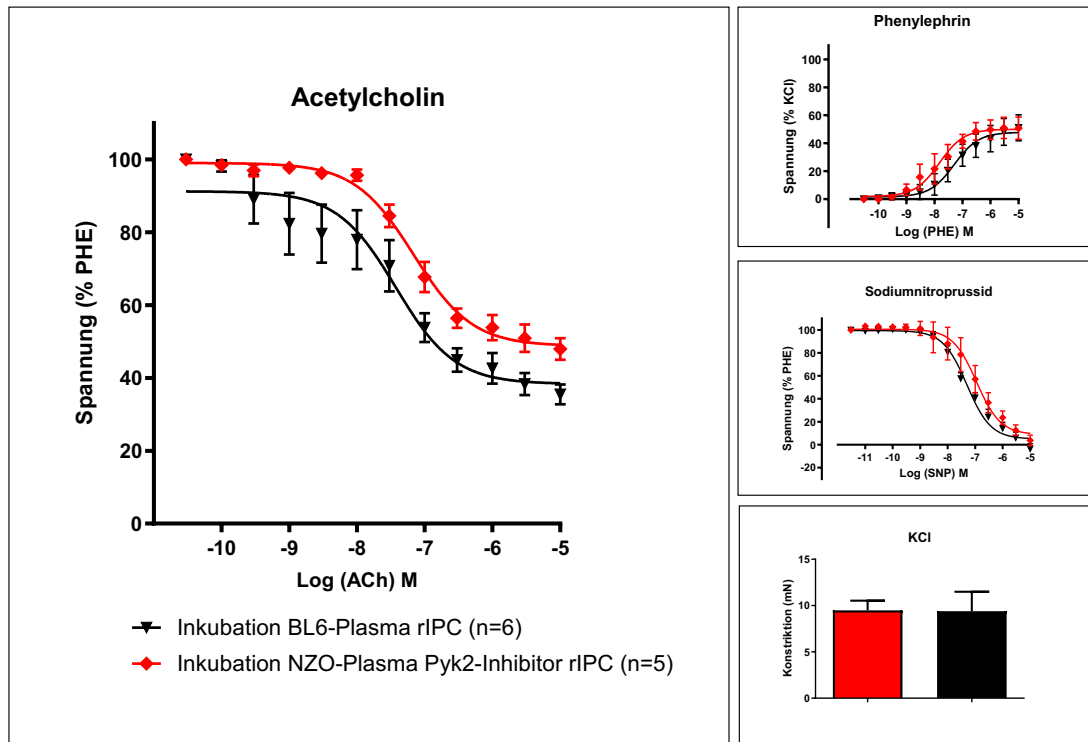


Abbildung 7 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers mit Pyk2-Inhibition und BL6-Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers (Abbildung modifiziert nach Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodianitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test (in obigen Abbildungen nicht signifikant).

In der endothelabhängigen Reaktion auf ACh zeigten sich keine signifikanten Dilatationsunterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma (maximale Dilatation 52 % $\pm$ 3 versus 65 % $\pm$ 3; $n_{\text{NZO Plasma Pyk2-Inh.}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$).

In der Konstriktionsreaktion unter PHE lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma vor (maximale Konstriktion 51 % $\pm$ 8 versus 51 % $\pm$ 9; $n_{\text{NZO Plasma Pyk2-Inh.}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$).

In der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion auf SNP stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma dar (96 % $\pm$ 5 versus 104 % $\pm$ 4; $n_{\text{NZO Plasma Pyk2-Inh.}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 6$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

DMSO wurde als Lösungsmittel des Pyk2-Inhibitors genutzt, weshalb untersucht werden sollte, ob das Lösungsmittel Einfluss auf die Endothelfunktion nimmt. Zwecks dessen wurde die vaskuläre Funktion von Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma und Plasma von BL6 mit DMSO-Injektion verglichen (siehe Abbildung 8).

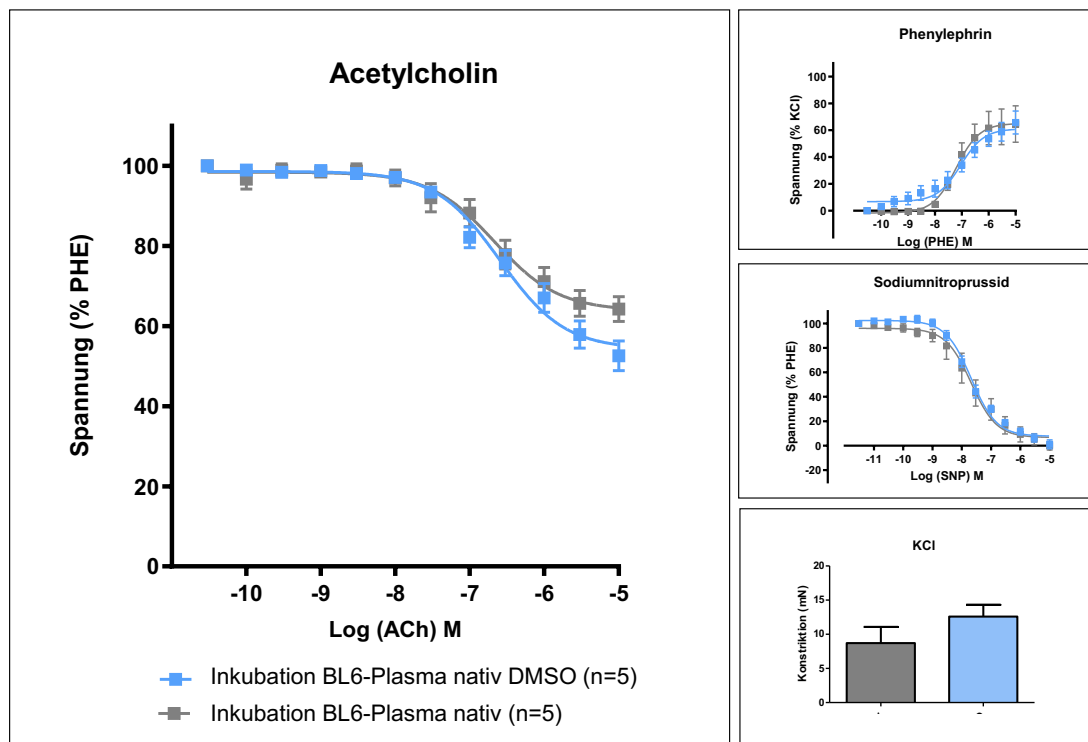


Abbildung 8 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma mit Zusatz des Lösungsmittels DMSO und BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test (in obigen Abbildungen nicht signifikant).

In der endothelabhängigen Reaktion unter ACh bestand kein Unterschied zwischen der Dilatation von Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma mit DMSO-Injektion zu Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma (maximale Dilatation 47 % $\pm$ 4 versus 36 % $\pm$ 3; n = 5).

In der Konstriktionsreaktion unter PHE lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma mit DMSO-Injektion und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma vor (maximale Konstriktion $66 \% \pm 9$ versus $65 \% \pm 14$; $n = 5$).

Bei der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP wurden keine signifikanten Unterschiede der Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma mit DMSO-Injektion und Aorten nach Inkubation mit nativem BL6-Plasma beobachtet (maximale Dilatation $99 \% \pm 4$ versus $100,08 \% \pm 3,5$; $n = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Folgend wurde die vaskuläre Funktion von Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit DMSO-Injektion verglichen mit Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma (siehe Abbildung 9).

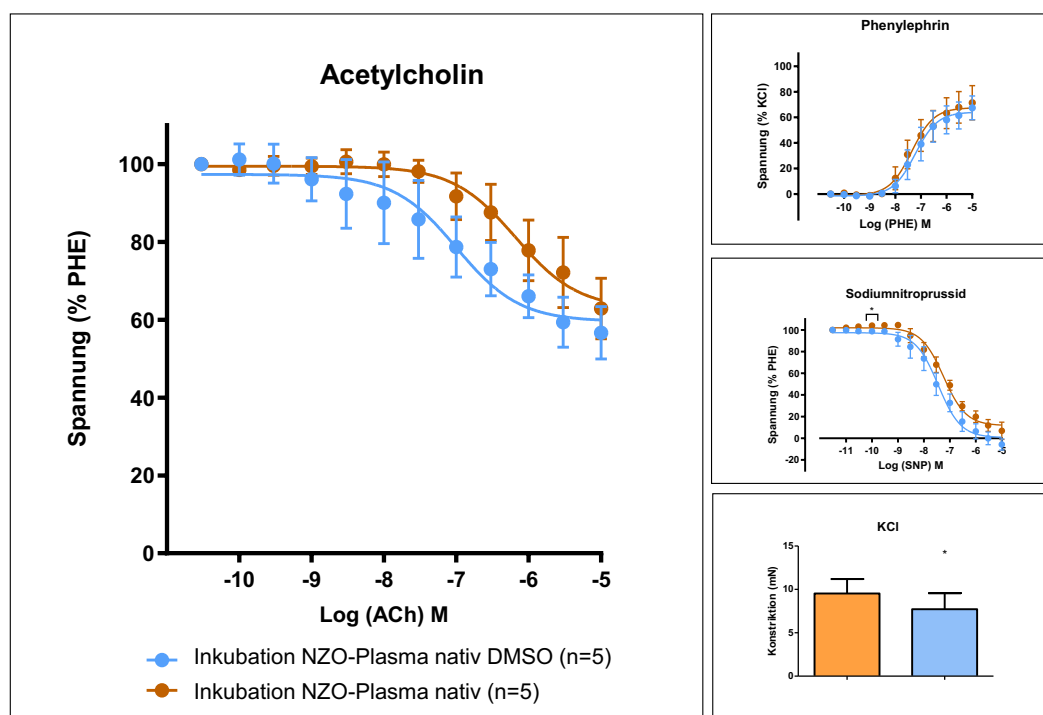


Abbildung 9 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit Zusatz des Lösungsmittels DMSO und BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

In der endothelabhängigen Reaktion unter ACh wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dilatationskurven der Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit DMSO-

Injektion und Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma ersichtlich (maximale Dilatation $43 \% \pm 7$ versus $37 \% \pm 8$; $n = 5$).

Bei der Konstriktionsreaktion unter PHE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit DMSO-Injektion und Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma (maximale Konstriktion $67 \% \pm 9$ versus $71 \% \pm 13$; $n = 5$).

In der endothelunabhängigen Reaktion unter SNP wurden keine signifikanten Unterschiede der Dilatationskurven von Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit DMSO-Injektion und Aorten nach Inkubation mit nativem NZO-Plasma festgestellt (maximale Dilatation $106 \% \pm 5$ versus $93 \% \pm 8$; $n = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl zeigte sich eine signifikant schwächere Konstriktion von Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit DMSO-Injektion verglichen zu nativem NZO-Plasma.

Insgesamt zeige sich eine Freisetzung der endothelialen, organprotektiven Signalmoleküle in diabetischen NZO-Mäusen durch Pyk2-Inhibition. Diese konnten erfolgreich durch Plasma auf die Endothelfunktion der BL6-Aorten transferiert werden. Ein physiologisches Maß der Gefäßfunktion konnte erreicht werden.

3.4 Die durch Plasma transferierbaren, endothelial freigesetzten Effekte sind NO-abhängig

Der NO-Scavenger CPTIO wurde Aorten zur Inkubation mit BL6-Plasma nach Durchführung von rIPC beigelegt, um eine NO-Abhängigkeit der beobachteten Modulation der Endothelfunktion durch rIPC zu testen. Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO wurden mit Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma hinsichtlich ihrer vaskulären Funktion verglichen (siehe Abbildung 10).

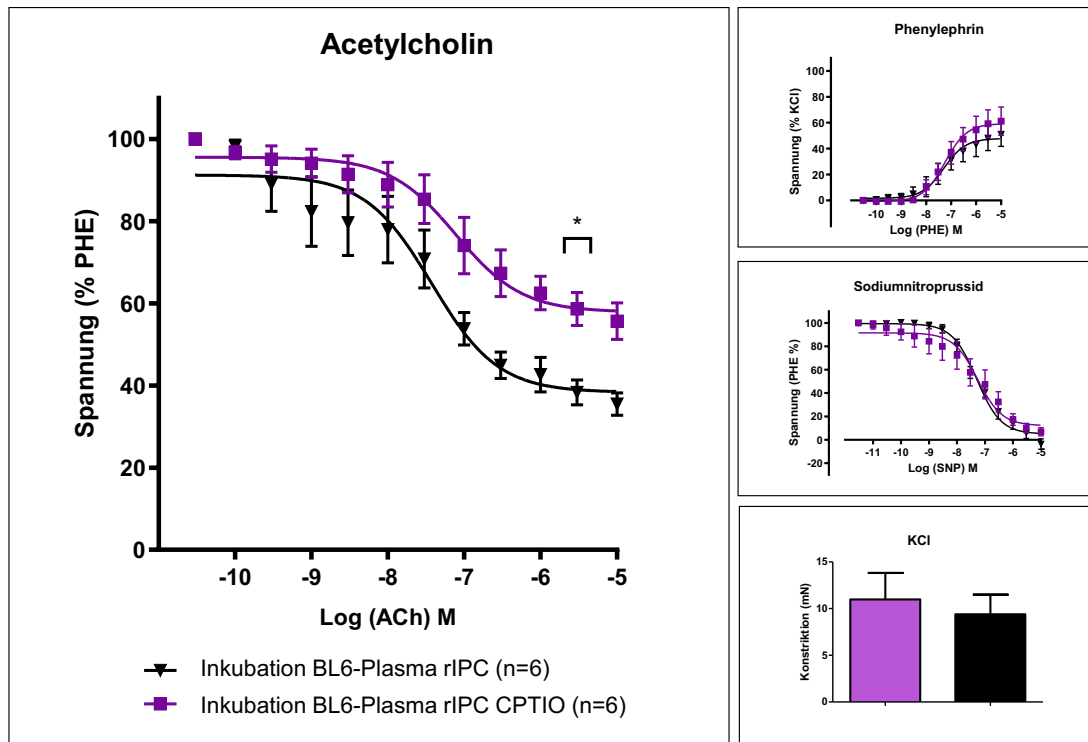


Abbildung 10 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers und BL6-Aorten nach Inkubation mit BL6-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers mit NO-Scavenging durch CPTIO (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

In der endothelabhängigen Reaktion auf ACh zeigten sich signifikante Unterschiede der Dilatationskurven von Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma ($p = 0,0275$). Es zeigte sich eine schwächere maximale Dilatation der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO verglichen mit Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma (maximale Dilatation $44 \% \pm 5$ versus $65 \% \pm 3$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma CPTIO}} = 6$). Im Sidak Post-hoc-Test ergab sich bei einer Konzentration von 3 μ M eine signifikant schwächere Dilatation der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO.

In der Konstriktionsreaktion unter PHE ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma nachweisen (maximale Konstriktion $61 \% \pm 11$ versus $51 \% \pm 9$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma CPTIO}} = 6$).

In der endothelunabhängigen Dilatation unter SNP stellten sich keine Unterschiede zwischen den Dosis-Wirkungskurven der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma mit CPTIO-Zusatz und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma dar (maximale Dilatation $93 \% \pm 4$ versus $104 \% \pm 4$; $n_{\text{BL6 Plasma rIPC}} = 5$ versus $n_{\text{BL6 Plasma CPTIO}} = 6$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Um zu testen, ob die Modulation der Endothelfunktion nach Inkubation im Rahmen der Pyk2-Inhibition von NZO-Mäusen nach Durchführung des rIPC-Manövers NO-moduliert war, wurde CPTIO als NO-Scavenger genutzt. Verglichen wurde die vaskuläre Funktion von Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition unter CPTIO und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition (siehe Abbildung 11).

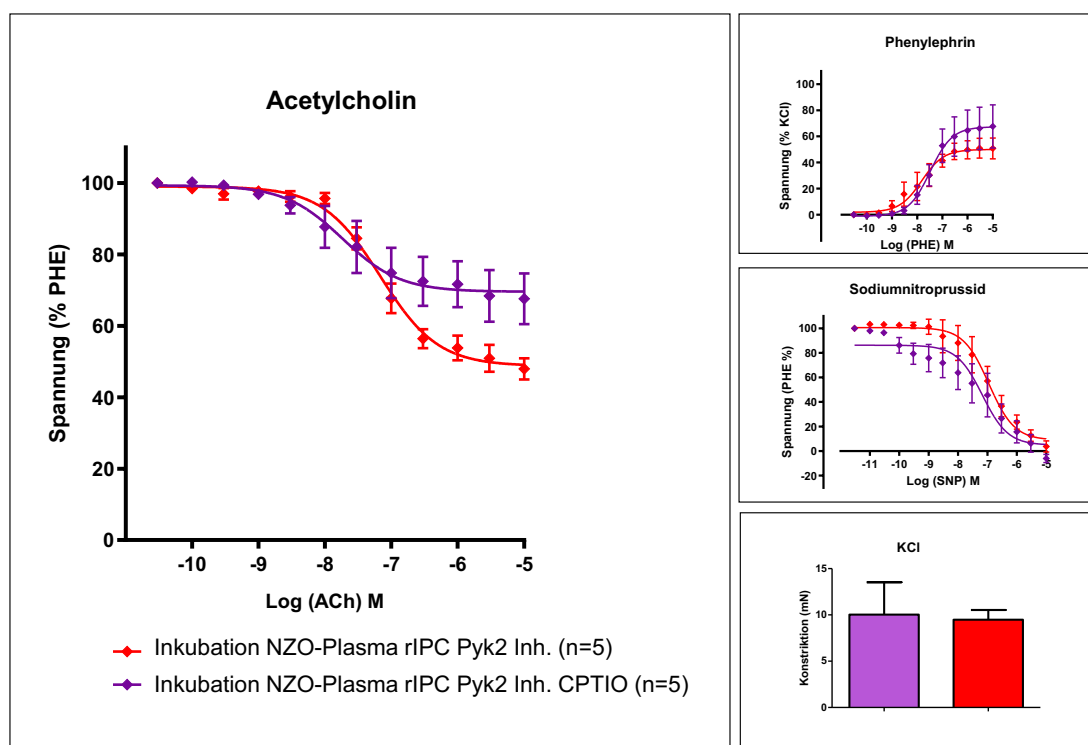


Abbildung 11 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers mit Pyk2-Inhibition und BL6-Aorten nach Inkubation mit NZO-Plasma mit Durchführung des rIPC-Manövers mit Pyk2-Inhibition bei NO-Scavenging durch CPTIO (Teile der abgebildeten Daten wurden veröffentlicht in Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SEM; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test (in obigen Abbildungen nicht signifikant).

In der endothelabhängigen Reaktion unter ACh zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einer schwächeren Dilatation der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition unter CPTIO verglichen mit Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition (maximale Dilatation $32 \% \pm 7$ versus $52 \% \pm 3,0$; $n = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter PHE konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosiswirkungskurven der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition unter CPTIO und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition festgestellt werden (maximale Konstriktion $68 \% \pm 17$ versus $51 \% \pm 8$; $n = 5$).

Bei der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP-Einfluss konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition unter CPTIO und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition festgestellt werden (maximale Dilatation $106 \% \pm 3$ versus $96 \% \pm 5$; $n = 5$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Insgesamt konnte eine NO-Abhängigkeit der durch rIPC freigesetzten Signalmoleküle bei BL6 festgestellt werden. Ein Transfer des organprotektiven Signals im Plasma war in Anwesenheit des NO-Scavengers CPTIO nicht mehr nachweisbar.

3.5 Präkonditioniertes Plasma von Nicht-Diabetikern verbessert die endothelabhängige Dilatationsfähigkeit der thorakalen BL6-Aortensegmente

In einem translationalen Ansatz wurden die Effekte des präkonditionierten humanen Plasmas auf thorakale BL6-Aortensegmente untersucht. Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma wurden hinsichtlich ihrer vaskulären Funktion verglichen mit Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma (siehe Abbildung 12).

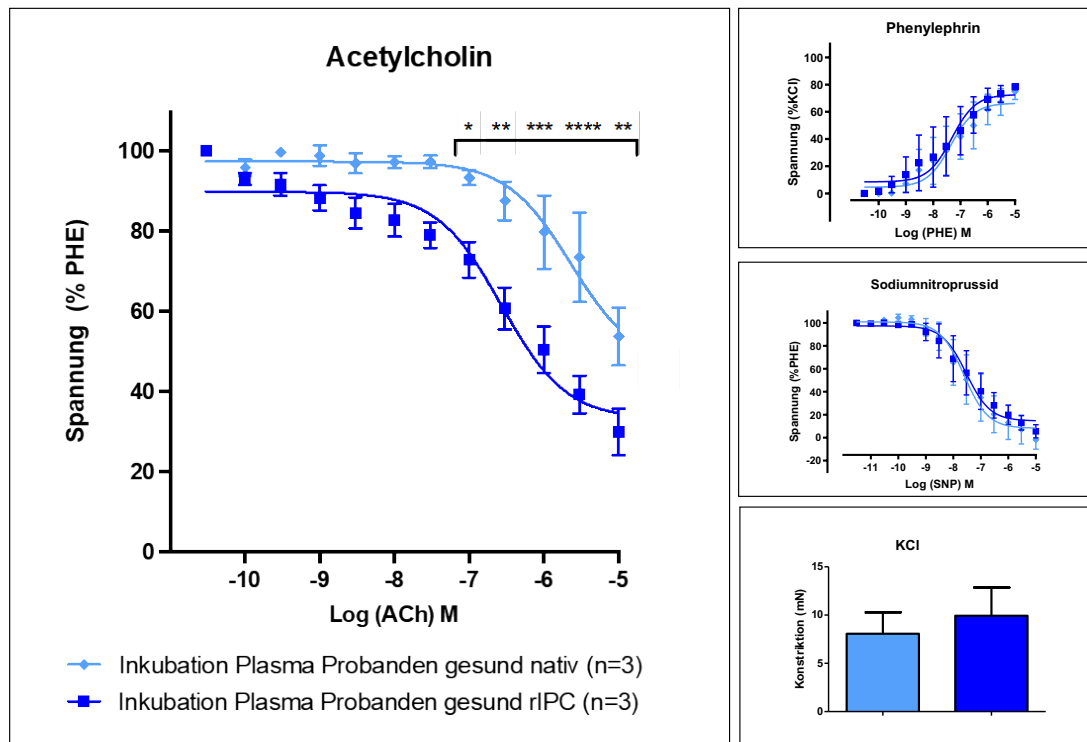


Abbildung 12 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma und BL6-Aorten nach Inkubation mit Nicht-Diabetiker-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers (Abbildung modifiziert nach Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SD; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Versuchsdurchführung durch Dr. med. Dragos Duse, Auswertung durch Dr. med. Dragos Duse und durch Katerina Despina Askeridis-Zader.

In der endothelabhängigen Dilatationsreaktion unter ACh stellten sich signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen dar ($p = 0,0028$). Es zeigte sich eine schwächere maximale Dilatation der Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma als bei den Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma ($46 \% \pm 7$ versus $70 \% \pm 6$; $n = 3$). Sidak Post-hoc-Tests zeigten eine schwächere Dilatation der Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma bei Konzentrationen zwischen 100 nM bis 10 μ M.

In der Konstriktionsreaktion unter PHE stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma dar (maximale Konstriktion $75 \% \pm 6$ versus $78 \% \pm 2$; $n = 3$).

In der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit nativem Nicht-Diabetiker-Plasma und

Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma gezeigt werden (maximale Dilatation $102 \% \pm 8$ versus $94 \% \pm 6$; $n = 3$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

3.6 Präkonditioniertes Plasma von Diabetikern hat keinen Einfluss auf die endothelabhängige Dilatationsfähigkeit der thorakalen BL6-Aortensegmente

Die Auswirkungen des rIPC-Manövers auf die Endothelfunktion nach Inkubation mit Plasma von Diabetikern wurden getestet. Verglichen wurden Aorten nach Inkubation mit nativem Diabetiker-Plasma und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Diabetiker-Plasma (siehe Abbildung 13).

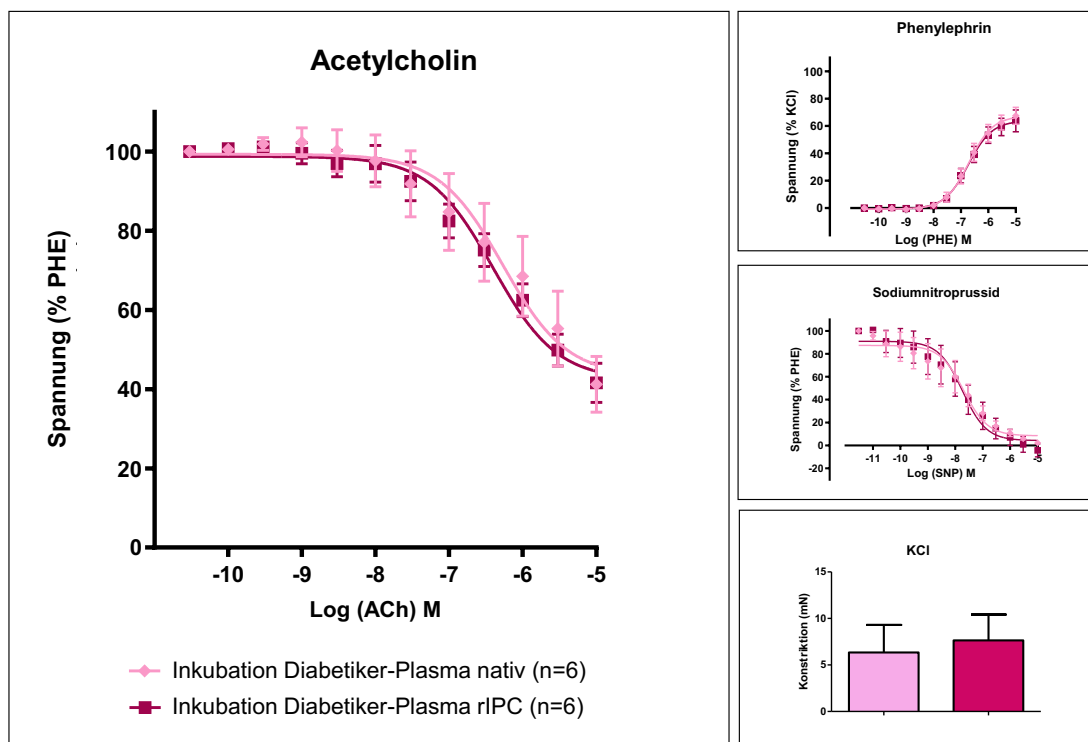


Abbildung 13 Dosiswirkungskurven von BL6-Aorten nach Inkubation mit nativem Diabetiker-Plasma und BL6-Aorten nach Inkubation mit Diabetiker-Plasma nach Durchführung des rIPC-Manövers (Abbildung modifiziert nach Erkens et al., *Inhibition of proline-rich-tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischemic preconditioning in type 2 diabetes*, 2024). Auftitrierung von Acetylcholin (ACh) 0,1 nM bis 10 μ M, Phenylephrin (PHE) 0,1 nM bis 10 μ M und Sodiumnitroprussid (SNP) 0,01 nM bis 10 μ M, logarithmische Darstellung. Bolus-Gabe von 80 nM Kaliumchlorid (KCl), Konstriktion in mN. Mittelwerte $\pm$ SD; zweifaktorielle ANOVA (ACh, PHE, SNP) und t-Test (KCl), Sidak Post-hoc-Test (in obigen Abbildungen nicht signifikant).

Bei der endothelabhängigen Reaktion unter ACh zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit nativem Diabetiker-Plasma und Aorten

nach Inkubation mit präkonditioniertem Diabetiker-Plasma (maximale Dilatation $59 \% \pm 7$ versus $58 \% \pm 5$; $n = 6$).

In der Reaktion auf PHE wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konstriktionskurven der Aorten nach Inkubation mit nativem Diabetiker-Plasma und präkonditioniertem Diabetiker-Plasma ersichtlich (maximale Konstriktion $67 \% \pm 6$ versus $64 \% \pm 8$; $n = 6$).

In der endothelunabhängigen SNP-Reaktion stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorten nach Inkubation mit nativem Diabetiker-Plasma und Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem Diabetiker-Plasma dar (maximale Dilatation $98 \% \pm 1$ versus $104 \% \pm 6$; $n = 6$).

In der Konstriktionsreaktion unter KCl stellten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Gruppen dar.

Insgesamt zeigte sich wie im diabetischen murinen Modell ein Verlust der durch das Plasma transferierbaren, endothel-abhängigen Signalmoleküle in diabetischen humanen Probanden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Bedeutung plasmatisch abhängiger Mediatoren für die heterozelluläre Kommunikation innerhalb des kardiovaskulären Systems sowie die Bedeutung von Pyk2 für die Regulation der endothelialen Funktion innerhalb des kardiometabolischen Kontinuums.

Insbesondere: 1) wurde ein *Bioassay* etabliert, um die Effekte von plasmatisch gelösten Signalmolekülen auf die endotheliale Funktion zu untersuchen; 2) wurden die Effekte einer diabetischen Stoffwechsellage auf die Signaltransduktion evaluiert und 3) durch pharmakologische Inhibition eines Pyk2-abhängigen Signalweges der Einfluss der Pyk2-vermittelten endothelabhängigen Signaltransduktion auf die Organprotektion untersucht.

4.1 Relevanz des rIPC-Signals und Möglichkeiten des Transfers

Seit der breitflächigen Einführung von PCI blieb die Rate schwerwiegender Komplikationen nach akutem Myokardinfarkt wie Herzinsuffizienz, ischämischer Kardiomyopathie oder Tod konstant (12). Lediglich minimale Änderungen im Post-Myokardinfarkt-Regime wie die Umstellung der dualen antithrombozytären Therapie (DAPT) auf ASS/Prasugrel oder ASS/Ticagrelor haben eine geringe Verringerung der Re-STEMI-Raten zur Folge gehabt (72). Trotz beeindruckender Investitionen in die kardiovaskuläre Forschung bleiben starke Effekte auf die Verbesserung der Mortalitätsraten nach kardiovaskulären Ereignissen aus (73,74). Neue Verfahren müssen entwickelt werden, um gravierende Folgen eines Myokardinfarkts abzuwenden und um die Organfunktion nach I/R-Schaden zu erhalten. An dieser Stelle werden Hoffnungen in das rIPC-Manöver gesetzt, welches Vorteile durch einfache Durchführbarkeit und Kosteneffektivität bietet (23).

Die Prognose nach hypoxischem Schaden durch Myokardinfarkt wird maßgeblich durch die Infarktgröße limitiert, welche in Versuchsmodellen deutlich durch rIPC reduziert wurde (75). Dennoch waren die bisherigen Ergebnisse von rIPC für das klinische *Outcome* ernüchternd, wie in der CONDI-2/ERIC-PPCI-Studie dargestellt wurde (21). Demnach hatte das rIPC-Manöver in einem Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten keinen Effekt auf das klinische *Outcome* von STEMI-Patienten. In Anbetracht dieser Ergebnisse ergibt sich die Frage, weshalb sich die Tierversuchsdaten der rIPC am Menschen nicht reproduzierbar darstellten. In der Analyse der Patientenkollektive zeigte sich, dass Patienten der CONDI-2/ERIC-PPCI-Studie eine vergleichsweise kurze Ischämiezeit (Median = 3 Stunden), eine

geringe 1-Jahres-Mortalität von 2,7 % und in 96 % aller Fälle ein geringes Risikoprofil (Killip-Klasse 1) aufwiesen (21,24). Demzufolge könnte eine Präselektion von Studienprobanden mit geringem Risikoprofil zu einer Verschleierung eines zusätzlichen protektiven Effektes geführt haben (24). Aktuell fehlen Studien an realistischen Modellen, da die meisten Daten an jungen gesunden Tieren erhoben wurden, während durch einen Myokardinfarkt betroffene Patienten vorwiegend multimorbide sind und eine Polypharmazie besteht (22,23). Weitere Erkenntnisse soll die gegenwärtig laufende randomisierte multizentrische RIP-HIGH-Studie erbringen, in welche nur STEMI-Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risikoprofil (Killip-Klasse ≥ 2) eingeschlossen werden, um Erkenntnisse zum prognostischen Nutzen von ischämischen Konditionierungsverfahren in Kombination mit PCI zu liefern (ClinicalTrials.gov ID NCT04844931) (24,26).

Trotz zahlreicher Publikationen konnte der genaue Wirkmechanismus des rIPC-Signals bislang nicht gänzlich geklärt werden. Zelluläre, neuronale und humorale Reizweiterleitung werden diskutiert (17,27,30). Als Teil des Immunsystems sind zelluläre Faktoren von entscheidender Bedeutung bei I/R-Schaden (27). Durch rIPC konnten jedoch nach 24 Stunden anti-inflammatorische Änderungen der Leukozyten und eine Inhibition von Genen nachgewiesen werden, welche Proteine für Chemotaxis, Adhäsion, Migration, Exozytose, Apoptose und Weiteres kodieren (18,28). Auch neuronale Signalleitung ist am rIPC-Signal beteiligt, wobei die Aufhebung des protektiven rIPC-Effekts an Wistar-Ratten durch Applikation eines Ganglionblockers gezeigt werden konnte (30). Dennoch konnte in Schweineherzen nach Transplantation mit kompletter Denervierung ein positiver rIPC-Effekt nachgewiesen werden, was auf Beteiligung weiterer Mechanismen schließen lässt (28,33). Dabei ist die humorale Signalleitung zur Übermittlung des rIPC-Signals zu nennen. Multiple Botenstoffe, welche über die Blutbahn an ihren Wirkungsort gelangen sind dabei involviert, darunter Aminosäuren, Zytokine, Neuropeptide, Adenosin oder NO (28). Um weitere Ansatzpunkte zur Verbesserung der Translation des rIPC-Manövers in die klinische Praxis zu identifizieren, ist weitere Forschung zum genauen Wirkmechanismus der rIPC notwendig.

Geeignet zur weiteren Erforschung des humoralen rIPC-Signalwegs sind Vasoreaktivitätsstudien wie von Alexander *et al.* (69) und Zhou *et al.* (70), bei denen isoliert die Effekte selektierter Blutkomponenten untersucht werden können. Bisher konnte jedoch noch kein Standard für Transferexperimente im Organbad etabliert werden. In dieser Arbeit wurde daher basierend auf den Inkubations-Experimenten von Zhou *et al.* ein Versuchsaufbau etabliert, um die humorale Übertragung von Signalmolekülen über das

Plasma zu untersuchen. In den Experimenten dieser Arbeit konnte durch BL6-Plasma ein protektives rIPC-Signal humoral übermittelt werden. Es zeigte sich eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation der Aorten nach Inkubation in präkonditioniertem BL6-Plasma verglichen mit nativem BL6-Plasma. Dieser protektive Effekt nach fünf Zyklen des rIPC-Manövers ist am ehesten auf einen plasmatisch transferierbaren endothelialen Faktor zurückzuführen. Bei einem solchen Faktor könnte es sich um das endothelgenerierte NO handeln. Rassaf *et al.* konnten zeigen, dass es nach Durchführung des rIPC-Manövers zu einem massiven Anstieg zirkulierenden NOs im Plasma kommt, woraufhin auch kardiale NO-Spiegel steigen und ein Infarktschaden begrenzt werden kann (17). Ein vergleichbarer protektiver Faktor könnte die beobachteten Effekte in den Versuchen dieser Arbeit bedingt haben.

Nach Inkubation stellte sich eine signifikant stärkere endothelabhängige Dilatationsreaktion unbehandelter Aorten im Vergleich mit Aorten nach Inkubation mit nativem Plasma dar. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der endothelunabhängigen Dilatationsreaktion unter SNP. Dies deutet darauf hin, dass die Inkubation zu einer messbaren Abnahme der Endothelfunktion führte, während die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur intakt blieb. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist eine inkubationsbedingte milde Hypoxie über 60 Minuten und eine damit einhergehende Verschlechterung der endothelabhängigen Dilatationsfunktion (76). Die Vergleichbarkeit der Endothelfunktion innerhalb der verschiedenen Versuchsdurchläufe blieb jedoch erhalten, da alle Aorten den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt waren.

Während der Inkubation mit präkonditioniertem Plasma kam ein protektiver Effekt auf die Gefäßfunktion der Aorten zur Darstellung. Anders als im gesunden Organismus bleibt ischämische Präkonditionierung jedoch im Zustand von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz, wie er bei DM auftritt, ohne kardioprotektive Wirkung, was zahlreiche Studien an Nagetieren (25,57,77–79) sowie am Menschen (21,37) demonstrieren. Noch zu diskutieren bleibt, weshalb es zu diesem Verlust des kardioprotektiven Signals bei DM kommt.

4.2 Verlust der positiven Effekte der rIPC bei Diabetes mellitus

DM zeichnet sich durch Insulinresistenz und Hyperinsulinämie sowie eine endotheliale Dysfunktion aus (80–83). Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion ist das Endothel nicht in der Lage, NO in physiologischen Konzentrationen zu produzieren. Dadurch zeigen sich

Patienten deutlich anfälliger für kardiovaskuläre Erkrankungen (48). Realistische Modelle des DM können helfen, pathologische Signalwege zu identifizieren, um neue Therapien zum Erhalt der vaskulären Gesundheit und Funktion bei DM zu entwickeln.

Als ein solches realistisches Modell des DM wurden NZO-Mäuse in den Versuchen dieser Arbeit genutzt. Diese Mäuse prägen diätabhängig mit höherer Wahrscheinlichkeit einen manifesten DM II aus (84). Zudem zeichnen sie sich durch Übergewicht, Hyperlipidämie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz aus (61–63). In den Versuchen dieser Arbeit stellte sich keine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation nach Inkubation von Aortensegmenten mit präkonditioniertem NZO-Plasma dar. Dies kontrastiert mit dem signifikanten protektiven Effekt, welcher nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma auftrat. Als Ursache für das Scheitern des Transfers eines humoralen protektiven rIPC-Signals kommen verschiedene Komponenten des DM wie Hyperglykämie, Übergewicht, diabetische Neuropathie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz in Betracht. Der hyperglykämische Zustand kann zum Verlust des rIPC-Signals bei DM beitragen (85–87). Beispielsweise beobachteten Feige *et al.* an humanem Plasma im Langendorff-Modell, dass ein protektiver rIPC-Effekt auf Infarktgröße durch kurze Perioden von Hyperglykämie verringert wurde und durch längere Hyperglykämie vollständig ausblieb (58). Unter anderem kommt es durch Hyperglykämie vermehrt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, was zu Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren und zu Zelltod führen kann (58,88). Die vermehrte Bildung von *glycation end-products* (AGEs) im Rahmen von Hyperglykämie durch irreversible Reaktionen von Proteinen, Lipiden oder Nucleinsäuren mit Kohlenhydraten trägt ebenfalls zur Unterdrückung von eNOS-Expression, verringerter NO-Produktion und erhöhtem oxidativem Stress bei (89). Unter anderem kommt es durch Aktivierung des RAGE-Rezeptors durch AGEs zur Aktivierung von NF- κ B, Cytokinen und Chemokinen, welche proinflammatorisch wirken (90). In den Versuchen dieser Arbeit wurden NZO-Mäuse als Modell des DM II gewählt, welche ebenfalls an Hyperglykämie leiden. Möglicherweise könnte künftig das Transferversagen eines protektiven rIPC-Signals mittels NZO-Plasmas durch Induktion von Normoglykämie realisiert werden.

In Einklang mit den Versuchen dieser Arbeit stellten Feige *et al.* bei Hyperglykämie ein Versagen der Signalgenerierung des rIPC-Manövers fest (58). Dementgegen beschrieben Torregroza *et al.* ein Versagen der Signalweiterleitung bei DM am Empfänger (91). Es gelang ihnen ein kardioprotektives Signal durch Plasmatransfer von Ratten mit Hyperglykämie sowie DM I an gesunden Rattenherzen im Langendorff-Modell wiederherzustellen. Kein protektiver Effekt konnte hingegen an diabetischen Herzen

realisiert werden. Ein genauer Mechanismus für die fehlerhafte Signalleitung konnte nicht klar definiert werden, dennoch wurden eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies, reduzierter Mitochondrienfunktion sowie Einschränkungen des PI3K-Signalwegs bei Hyperglykämie in Betracht gezogen. Torregroza *et al.* folgerten, dass die Generierung eines protektiven Signals bei DM möglich, die Weiterleitung hingegen gestört ist. Dieser Effekt konnte in den Versuchen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Trotz des Transfers diabetischen NZO-Plasmas auf eine gesunde Empfängeraorta konnte kein protektives Signal nach rIPC festgestellt werden.

Eine weitere Komponente mit Einfluss auf das Scheitern von rIPC bei DM ist Übergewicht (92,93), wovon auch NZO-Mäuse betroffen sind (61). Es konnte gezeigt werden, dass NZO-Mäuse in perivaskulärem Gewebe durch Gefäßumbau und Adipozytenhypertrophie vermehrt Superoxide und inflammatorische Signale produzieren, was die Dilatationsfunktion der Gefäße einschränkt (59). Eine Gewichtsreduktion und Reduktion pathologischer Adipozyten könnte perspektivisch zu einer Besserung der Gefäßfunktion führen und ein rIPC-Signal wiederherstellen. Beispielsweise konnte an *Zucker fatty* Ratten, einem Rattenmodell für DM II, gezeigt werden, dass das rIPC-Manöver bei übergewichtigen Ratten versagte, bei schlanken Ratten hingegen zu einer Infarktgrößenreduktion führte (93). Unter anderem wurde dieser Effekt auf vermehrte Expression von Exosomen zurückgeführt, welche sich bei Übergewicht eingeschränkt zeigte.

Die Entwicklung einer diabetischen Neuropathie wirkt sich ebenfalls negativ auf die Generierung eines protektiven rIPC-Signals aus (94). Im Langendorff-Modell wurden Kaninchenherzen mit Plasma von Diabetikern mit und ohne Ausprägung von Polyneuropathie untersucht. Dabei zeigte sich, dass Plasma von Diabetikern ohne Neuropathie einen protektiven Effekt auf die Herzen ausübte, welcher bei Plasma von Diabetikern mit Polyneuropathie ausblieb. Dies spricht für eine partielle Beteiligung neuronaler Faktoren am Fehlschlagen des rIPC-Manövers bei DM.

Auch Hyperinsulinämie und Insulinresistenz werden als mögliche Ursachen für das Scheitern der Generierung des protektiven Signals bei DM diskutiert (siehe Abbildung 14a). Eine selektive Insulinrezeptor-Resistenz bedingt die verstärkte Aktivierung von eNOS-inhibierenden Signalen. Beispielsweise findet durch Aktivierung des mitogenen Signalwegs über MAPK und Erk eine Pyk2-Aktivierung statt (35). Ebenfalls kommt es im Zustand von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie durch Überstimulation des PI3K/Akt-Signalwegs zur vermehrten Generation von Superoxiden durch Nox2, welche ebenfalls Pyk2 aktivieren (48,50). Folglich wird durch Pyk2 eine Hemmung der eNOS mit Reduktion der NO-

Produktion sowie eine reduzierte Vasodilatation ausgelöst (44). In diesem Zusammenhang stellt die NZO-Maus ein geeignetes Modell des DM dar, da sie verglichen mit BL6-Mäusen eine erhöhte Pyk2-Aktivität mit gesteigerter Anzahl inhibierender eNOS-Phosphorylierungen aufweist (53). Eine Möglichkeit, um auf diese pathologisch veränderten Signalwege einzuwirken und ein protektives rIPC-Signal zu regenerieren, könnte die Pyk2-Inhibition sein.

Zusammenfassend schränken verschiedene Faktoren die Signalübertragung des rIPC-Manövers ein, darunter Hyperglykämie, Übergewicht, diabetische Neuropathie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz. Während viele Studien diese Komponenten des DM separat behandeln, vereint das in dieser Arbeit genutzte Modell der NZO-Maus das gesamte Spektrum des DM und ist somit gut geeignet, die Zustände des diabetischen Patienten zu simulieren (61–63). Dies ermöglicht die Erforschung von Pathomechanismen bei DM unter realistischeren Bedingungen, wodurch neue potenzielle Ansatzpunkte für Therapien identifiziert werden können. Ferner wird in Zusammenschau der Daten ersichtlich, dass unter bestimmten Voraussetzungen ein grundsätzliches Vermögen der Übermittlung eines kardioprotektiven Signals im diabetischen Organismus besteht. Solche Voraussetzungen zu schaffen und pathologische Signalwege positiv zu beeinflussen, kann in Zukunft zur Entwicklung neuer Therapien beitragen, um die Gefäßfunktion bei DM zu verbessern und die kardiovaskuläre Widerstandsfähigkeit gegenüber I/R-Schaden zu stärken.

4.3 Wiederherstellung der herzfernen Organoprotektion durch Pyk2-Inhibition in diabetischen NZO-Mäusen

Pyk2 ist im gesunden Organismus in die physiologische Hemmung der eNOS eingebunden, um die schädliche Bildung von Superoxidradikalen zu verhindern (44). Bei DM ist diese Funktion jedoch durch verstärkte Aktivierung von Pyk2 gestört, wodurch die NO-Produktion eingeschränkt wird (35,50). Auf Basis dessen wurde in dieser Arbeit an NZO-Mäusen eine Pyk2-Inhibition vor Präkonditionierung durchgeführt, um eine Regeneration der Dilatationsfunktion zu überprüfen. Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass durch eine Pyk2-Inhibition ein protektives rIPC-Signal generiert und humoral via NZO-Plasma auf eine Empfängeraorta übertragbar war. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Erkens *et al.*, welche ebenfalls eine Wiederherstellung des kardio- und vasoprotektiven rIPC-Signals nach Pyk2-Inhibition in Vasoreaktivitätsstudien, dem Langendorff-Modell und in der FMD feststellen konnten (53). Ursächlich für die

beobachtete Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation in den Experimenten der Arbeitsgruppe wie auch in den Versuchen dieser Arbeit ist am ehesten die ausbleibende Hemmung der eNOS durch Pyk2 und die damit einhergehende NO-Produktion (siehe Abbildung 14b). Die in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen weiterführend die humorale Übertragbarkeit dieses nach Pyk2-Inhibition generierten vasoprotektiven Signals über das Plasma als Transfersubstanz.

Um auszuschließen, dass die beobachteten protektiven Effekte der Pyk2-Inhibition von einer Interaktion mit dem vom Hersteller angegebenen Lösungsmittel DMSO herrühren (95), wurde dieses in einem Kontrollversuch separat BL6- und NZO-Mäusen appliziert. Mit BL6-Plasma ließen sich keine Interaktionseffekte feststellen. Nach Inkubation der Aorten in NZO-Plasma mit vorheriger DMSO-Applikation fanden sich trotz fehlender Unterschiede der endothelabhängigen Reaktion geringe Differenzen in der Reaktion auf KCl, weshalb hier keine klare Aussage in Bezug auf Interaktionseffekte getätigt werden kann.

Trotz der genannten vasoprotektiven Effekte einer Pyk2-Inhibition sollte angemerkt werden, dass Pyk2 auch in unterstützende Signalwege des Kardiometabolismus eingebunden ist (96–98), welche durch eine Inhibition wegfallen. Entgegen der Daten dieser Studie beobachteten Matsui *et al.*, dass die endothelabhängige Dilatation von Pyk2-*Knock-out*-Aorten verglichen mit Wildtyp-Aorten aufgrund einer reduzierten NO-Konzentration deutlich eingeschränkt war (96). Bei Pyk2-*Knock-out* bestanden in ihren Versuchen unter *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Stimulation eine geringere Akt-Aktivierung und Ca²⁺-Mobilisation, was zu einer verringerten eNOS-Aktivierung mit konsekutiver endothelialer Dysfunktion führte. Zudem ist Pyk2 eine Komponente im Regulationsmechanismus des Redoxgleichgewichts und eingebunden in Prozesse der Angiogenese sowie in die Reorganisation des Zytoskeletts (96,98,99).

Verschiedene Hypothesen können die Diskrepanz der Daten von Matsui *et al.* und dieser Arbeit erklären. Anders als bei den Pyk2-*Knock-out*-Mäusen von Matsui *et al.* zeigte die Pyk2-Inhibition von NZO in den Versuchen dieser Arbeit einen protektiven Effekt. Dies könnte auf eine dauerhafte Pyk2-Überaktivierung im Rahmen der selektiven Insulinresistenz und Hyperinsulinämie bei DM zurückzuführen sein (35,50). Eine Pyk2-Inhibition könnte eine Verschiebung der dysbalancierten Signaltransduktion zu physiologischer Pyk2-Aktivierung bedingen. Dem gegenüber ist zu diskutieren, ob es durch einen vollständigen Verlust der protektiven Effekte von Pyk2 zu Dilatationseinschränkungen kommen kann. In den Versuchen dieser Arbeit wurde kein vollständiges Gen-*Knock-out*, sondern eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle von Pyk2 durchgeführt (100), wodurch eine

Restaktivität von Pyk2 nicht auszuschließen ist. Dadurch könnten protektive Effekte von Pyk2 erneut zum Tragen kommen. Indes ist zu beachten, dass keine reine Selektivität des Pyk2-Inhibitors PF-431396 hydrate für Pyk2 besteht, da auch die strukturell ähnliche *Fokal Adhesion Kinase* (FAK) gehemmt werden kann ($IC_{50_{Pyk2}} = 11 \text{ nM}$; $IC_{50_{FAK}} = 2 \text{ nM}$). (95,101). Andere Gruppen führten jedoch auf, dass eine FAK-Aktivierung I/R-Schaden reduzierte (53,102), wobei eine FAK-Inhibition die Wirksamkeit von Konditionierungsverfahren einschränkte (53,103). Die Wiederherstellung des protektiven rIPC-Signals ist daher vermutlich nicht auf eine FAK-Inhibition zurückzuführen. Auch die Unterschiede der Effektdauer könnten die beobachteten Differenzen der Auswirkung einer Pyk2-Inhibition zwischen den Versuchen von Matsui *et al.* und dieser Arbeit erklären. In den Versuchen dieser Arbeit wurde ein kurzfristiger Effekt nach pharmakologischer Inhibition untersucht, während bei den Pyk2-*Knock-out*-Mäusen möglicherweise eher langfristige Effekte bestehen, welche die Angiogenese oder das Zytoskelett betreffen (96,99,104).

Es lässt sich folgern, dass physiologischerweise ein Gleichgewicht von Aktivierung und Inhibition der Pyk2 besteht. Bei DM mit Ausprägung von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie wird die Signalkette pathologisch verändert, was zu endothelialer Dysfunktion führt. Ein Eingreifen in diesen veränderten Signalweg könnte physiologische Zustände wiederherstellen und neue Möglichkeiten für die pharmakologische Behandlung endothelialer Dysfunktion bei DM schaffen. Im murinen Modell der NZO, welche das gesamte Spektrum des DM abbilden, war es möglich, das humoral transferierbare rIPC-Signal durch Pyk2-Inhibition wiederherzustellen.

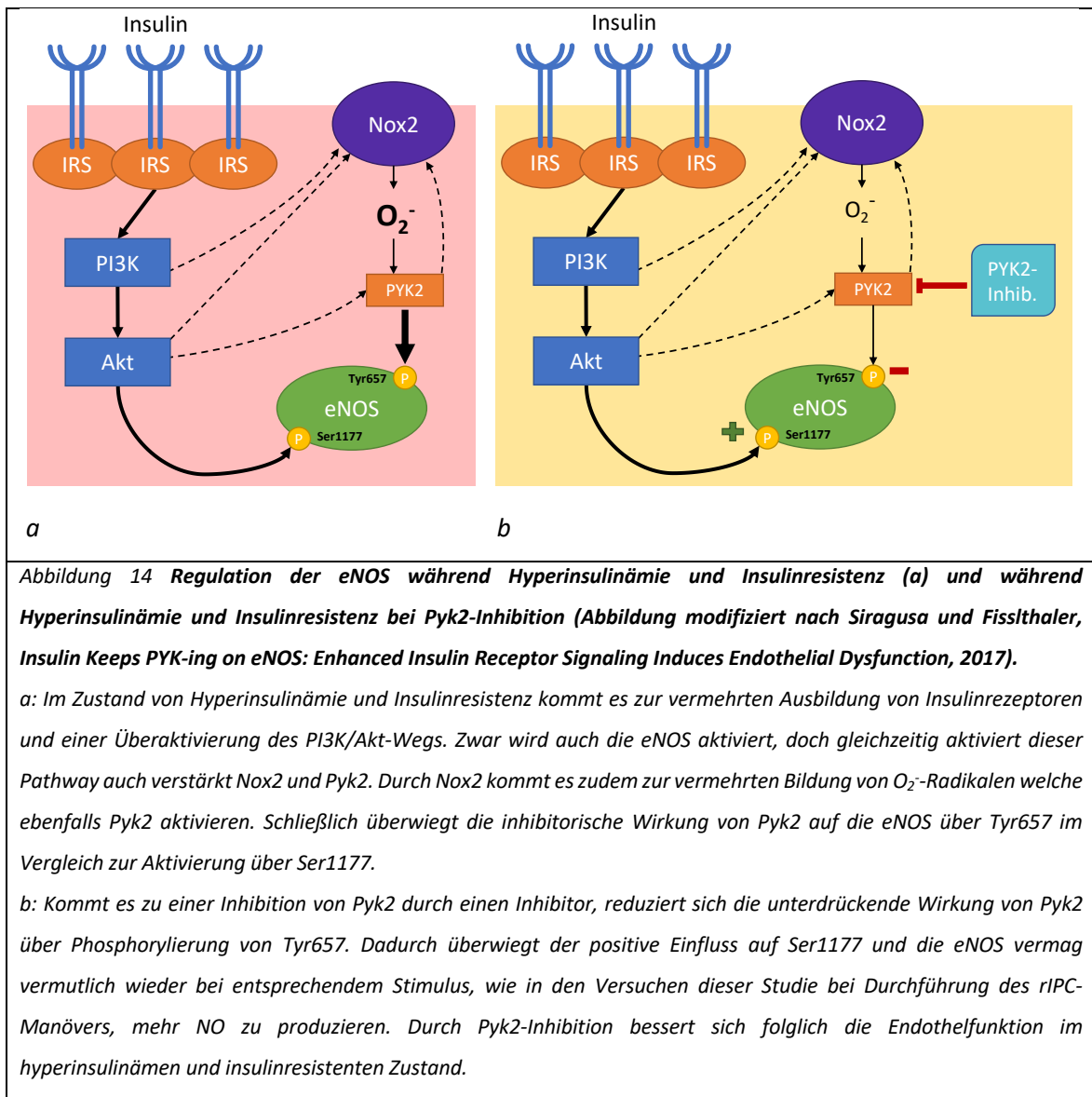


Abbildung 14 Regulation der eNOS während Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (a) und während Hyperinsulinämie und Insulinresistenz bei Pyk2-Inhibition (Abbildung modifiziert nach Siragusa und Fisslthaler, *Insulin Keeps PYK-ing on eNOS: Enhanced Insulin Receptor Signaling Induces Endothelial Dysfunction*, 2017).

a: Im Zustand von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz kommt es zur vermehrten Ausbildung von Insulinrezeptoren und einer Überaktivierung des PI3K/Akt-Wegs. Zwar wird auch die eNOS aktiviert, doch gleichzeitig aktiviert dieser Pathway auch verstärkt Nox2 und Pyk2. Durch Nox2 kommt es zudem zur vermehrten Bildung von O_2^- -Radikalen welche ebenfalls Pyk2 aktivieren. Schließlich überwiegt die inhibitorische Wirkung von Pyk2 auf die eNOS über Tyr657 im Vergleich zur Aktivierung über Ser1177.

b: Kommt es zu einer Inhibition von Pyk2 durch einen Inhibitor, reduziert sich die unterdrückende Wirkung von Pyk2 über Phosphorylierung von Tyr657. Dadurch überwiegt der positive Einfluss auf Ser1177 und die eNOS vermag vermutlich wieder bei entsprechendem Stimulus, wie in den Versuchen dieser Studie bei Durchführung des rIPC-Manövers, mehr NO zu produzieren. Durch Pyk2-Inhibition bessert sich folglich die Endothelfunktion im hyperinsulinämischen und insulinresistenten Zustand.

4.4 Bedeutung des eNOS- und NO-Metabolismus

Verschiedene Theorien zum Wirkmechanismus der rIPC werden diskutiert, darunter zelluläre, neuronale und humorale Signalleitung. Einen führenden Wirkmechanismus der rIPC zu identifizieren war bislang nicht möglich, obwohl eine Vielzahl von Studien Daten zu den multiplen Signalwegen liefert (17,27,30). Zur erfolgreichen Durchführung des humoralen rIPC-Signalwegs wurde zirkulierendes NO als relevanter Faktor im Blut identifiziert (17). Teils verantwortlich für die NO-Produktion ist die eNOS, welche unter anderem durch Scherkräfte aktiviert wird (37,39). Allerdings wird die eNOS bei DM durch forcierte Aktivierung von Pyk2 an Tyr657 gehemmt, wodurch die NO-Produktion zurückgeht (50). Eine Pyk2-Inhibition führte in den Experimenten dieser Arbeit zu einer

Verbesserung der Dilatationsfunktion durch humorale Übertragung von NZO-Plasma auf eine Empfängeraorta. Im Langendorff-Modell wiesen Erkens *et al.* eine Verringerung der Infarktgröße durch präkonditioniertes NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition nach (53). Ein NO-*Scavenging* mittels CPTIO hob diesen Effekt auf, woraus eine NO-Abhängigkeit abgeleitet werden konnte. Darauf aufbauend sollte der endothelunterstützende rIPC-Effekt in den Versuchen dieser Arbeit bei BL6- und NZO-Mäusen mit Pyk2-Inhibition bezüglich einer NO-Abhängigkeit überprüft werden.

Nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma zeigten Aortensegmente mit CPTIO eine verschlechterte endothelabhängige Dilatation im Vergleich zu Aorten mit präkonditioniertem BL6-Plasma. Es lässt sich folgern, dass die Verbesserung der endothelabhängigen Dilatation nach Präkonditionierung auf NO zurückzuführen war. Diese Ergebnisse untermauern die These, dass die protektive Wirkung von rIPC im gesunden Organismus humoral durch verstärkte NO-Produktion über das Plasma vermittelt wird (17). Es wurde ebenfalls ein NO-*Scavenging* bei Inkubation in präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2 durchgeführt. Dabei wurde erwartet, dass die beobachteten protektiven Effekte auf eine gesteigerte NO-Produktion im Rahmen der verringerten eNOS-Hemmung durch Pyk2 zurückzuführen wären. Die Applikation von CPTIO hätte somit eine Dilatationsverschlechterung bedingt. Indes zeigte sich nur eine deskriptive Tendenz einer reduzierten Dilatation der Aorten nach Inkubation mit präkonditioniertem NZO-Plasma unter CPTIO. Eine mögliche Erklärung des gering ausgeprägten Effekts des NO-*Scavengings* liefern Pieper und Siebeneich, welche die Wirkung von CPTIO bei Aorten diabetischer Ratten und Wildtypen verglichen (105). In der Studie wurde die Endothelfunktion der diabetischen Gruppe weniger stark inhibiert als die der Kontrollgruppe. Ursächlich wurde eine Konzentration von NO im höheren Lipidanteil des Gewebes der DM-Gruppe angenommen, da NO durch seine lipophilen Eigenschaften in der Lage ist, die Zellmembranen zu passieren und in lipidhaltiger Umgebung zu akkumulieren (105,106). Demzufolge wurde vermutet, dass ein eingeschränkter Zugang des hydrophilen CPTIOs zu NO bestand. Aus diesem Grund konnten die Effekte von NO nur geringfügig abgeschwächt werden. Um diesem Wirkungsverlust des NO-*Scavengers* vorzubeugen, empfahlen Pieper und Siebeneich ein lipidlöslicheres Nitronylnitroxid zu nutzen. In den Experimenten dieser Studie wurde nicht die Aorta, sondern das Plasma diabetischer NZO-Mäuse genutzt. Da NZO-Mäuse an Fettleibigkeit, Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie leiden (63), ist zu erwarten, dass sich NO im lipidhaltigen Anteil der Lösung befand und dadurch dem *Scavenging* durch das CPTIO entging. Für zukünftige

Versuche sollte bei diabetischen Gruppen eine lipophile Alternative zu CPTIO zum NO-*Scavenging* genutzt werden.

Zusammenfassend ließ sich eine NO-induzierte Verbesserung der Dilatationsfunktion bei gesundem Plasma nachweisen, wobei ein positiver Effekt der Pyk2-Inhibition auf die Dilatationsfähigkeit durch präkonditioniertes NZO-Plasma nur tendenziell NO zuzuweisen war. Es wird jedoch vermutet, dass der protektive rIPC-Effekt durch Nutzung eines anderen *Scavengers* aufgehoben werden könnte. Dies sollte in zukünftiger Forschung überprüft werden.

4.5 Humoral vermitteltes Signal durch Transfer von humanem Plasma

Das rIPC-Manöver bietet ein hohes Potenzial einen I/R-Schaden zu reduzieren und additiv zu PCI das *Outcome* nach einem akuten ischämischen Ereignis zu verbessern (19). Insbesondere in Ländern mit begrenztem Zugang zu PCI könnte die medizinische Versorgung der Bevölkerung durch Verfügbarkeit therapeutischer Konditionierungsverfahren verbessert werden. Häufig besteht dort bestenfalls ein Zugang zu weniger potenten thrombolytischen Verfahren (22), weshalb die Entwicklung kostengünstiger Behandlungsalternativen von Interesse ist. In kleineren klinischen Studien konnte bereits eine zusätzliche Reduktion der Infarktgröße durch additive rIPC zur Thrombolyse an STEMI-Patienten demonstriert werden (107). Indes war eine Translation dieser vielversprechenden Ergebnisse in die Praxis bislang nicht möglich (21). Um eine klinische Nutzbarkeit zu erzielen, ist die Translation vom Tiermodell zum Patienten von entscheidender Relevanz.

Aus den Experimenten dieser Arbeit mit BL6-Plasma geht hervor, dass die humorale Übertragung eines protektiven rIPC-Signals über das Plasma möglich war. Diese Befunde ließen sich durch Nicht-Diabetiker-Plasma reproduzieren. Aortensegmente zeigten nach Inkubation in präkonditioniertem Nicht-Diabetiker-Plasma eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Dilatationsreaktion. Die zuvor im gesunden murinen Modell beobachtete humorale Übertragung des rIPC-Signals war auch mit humanem Plasma gesunder Probanden realisierbar. Das rIPC-Manöver entfaltet seine Wirkung innerhalb des humoralen Signalwegs unter anderem über gesteigerte NO-Produktion durch die eNOS und deren endothelunterstützende Wirkung (17,53). In den Versuchen mit BL6-Plasma konnte eine Abhängigkeit des protektiven humoral vermittelten Signals von NO mittels NO-*Scavenging* festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass in den Versuchen dieser Arbeit mit

Nicht-Diabetiker-Plasma ebenfalls NO durch Präkonditionierung generiert und dieses humoral auf ein Empfängerorgan transferiert werden konnte. Zusammenfassend konnte mit murinem wie auch humanem Plasma eines gesunden Organismus ein protektives humoral vermitteltes Signal nach Durchführung des rIPC-Manövers nachgewiesen werden. Die in den Versuchen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit Plasma gesunder Mäuse und Menschen stehen dabei in starkem Kontrast zu denen mit Plasma diabetischer Mäuse und Menschen.

Im diabetischen Zustand konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein protektives rIPC-Signal nachgewiesen werden. Es war weder mittels Inkubation in NZO-Plasma noch in Diabetiker-Plasma möglich, ein protektives Signal nach Präkonditionierung humoral auf eine Empfängeraorta zu übertragen. Dies entspricht den Befunden aus der Literatur, wonach sich bei DM kein kardioprotektives Signal durch rIPC vermitteln ließ (21,91,108). Verschiedene Faktoren wie Hyperglykämie, Übergewicht, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz wirken sich dabei negativ auf die Gefäßfunktion aus und führen zu einem Versagen des rIPC-Signals (44,50,58,93). Im Rahmen von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz kommt es durch pathologische Veränderung von Signalkaskaden zu einer verstärkten Aktivierung von Pyk2, welche die eNOS durch Phosphorylierung hemmt und dadurch die NO-Produktion einschränkt (35,50). In den Versuchen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Pyk2-Regulation bei NZO-Mäusen gestört war und eine Pyk2-Inhibition vor Durchführung von rIPC die Endothelfunktion wiederherstellte. Ferner konnten keine signifikanten Dilatationseinschränkungen zwischen der endothelabhängigen Dilatation von Aortensegmenten nach Inkubation in präkonditioniertem NZO-Plasma mit Pyk2-Inhibition verglichen mit den Aortensegmenten nach Inkubation mit präkonditioniertem BL6-Plasma nachgewiesen werden. Dieser Befund zeigt die künftige Möglichkeit auf, die Endothelfunktion von Diabetikern zu schützen und darüber hinaus eine physiologische Dilatationsfunktion wiederherzustellen.

Durch die Ergebnisse dieser Studie konnte eine fehlerhafte humorale Signalleitung des rIPC-Signals festgestellt werden. Pyk2 konnte als Ansatzpunkt für eine medikamentöse Behandlung identifiziert werden, um ein humoral vermitteltes rIPC-Signal wiederherzustellen. Darauf basierend könnten neue Medikamente entwickelt werden, um die Endothelfunktion von Diabetikern zu verbessern und die Vulnerabilität gegenüber einem akuten ischämischen Ereignis zu reduzieren. Sollte es gelingen durch pharmakologische Pyk2-Inhibition positiv auf diesen pathologischen Signalweg am Menschen einzuwirken

und den humoralen Signaltransfer wiederherzustellen, könnte dies ein wichtiger Schritt sein, um den Transfer des rIPC-Manövers in die klinische Praxis zu ermöglichen.

4.6 Limitationen

Verschiedene Limitationen dieser Studie sind restriktiv zu betrachten. Bezüglich des Protokolls ist eine Einschränkung der Endothelfunktion der Aorten während der Inkubation zu nennen. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür könnte das Aussetzen der Aorten gegenüber milder Hypoxie sein. Zur Optimierung des Protokolls könnte beispielsweise eine direkte Begasung der Inkubationsplatte eingerichtet werden, um die Aorten vor Hypoxieschäden zu schützen. Es bestehen alternative Verfahren, bei welchen eine Inkubation umgangen und die unmittelbaren Effekte von Substanzen im Organbad evaluiert werden können. Beispielsweise wird in dem Organbadprotokoll von Bas *et al.* ein Entschäumer mit einem Silikonöl in den Puffer appliziert, wodurch Schaumbildung verhindert und eine Messung ermöglicht wird (109).

Des Weiteren ist einschränkend zu nennen, dass manche Aortensegmente bereits vor Applikation der letzten ACh-Konzentration konstringierten. Diese Reaktion ist am ehesten auf die Bildung vasoaktiver Prostaglandine zurückzuführen, welche möglicherweise durch eine Applikation von Indometacin hätte blockiert werden können (110).

Die Wahl der NZO-Maus als Modell des DM II in den Versuchen dieser Arbeit kann ebenfalls als limitierend diskutiert werden. Als komplexes Modell des DM II bilden NZO-Mäuse zwar die klinische Realität effektiv ab, eine konkrete Betrachtung des Effekts eines einzelnen Merkmals des DM ist jedoch nicht möglich.

Eine weitere methodische Limitation stellt die unvollständige Selektivität des Pyk2-Inhibitors PF-431396 dar, welcher ebenfalls hemmend auf FAK wirkt ($IC_{50_{Pyk2}} = 11 \text{ nM}$; $IC_{50_{FAK}} = 2 \text{ nM}$). Allerdings würde sich eine FAK-Inhibition eher einschränkend auf Konditionierungsverfahren auswirken (53,103), weshalb der protektive Effekt nach Applikation von PF-431396 am ehesten auf eine Pyk2-Inhibition zurückzuführen ist.

Limitierend zu nennen ist ebenfalls die eher geringe Gruppengröße von $n = 5$, die jedoch vergleichbar mit vorherigen Studien zum Plasma- oder Bluttransfer ist (17,70).

4.7 Ausblick

In den Versuchen dieser Arbeit wurden gesunde BL6-Aorten in diabetischem und gesundem Plasma inkubiert und die humorale Übertragung von Signalmolekülen über das Plasma wurde untersucht. In zukünftigen Versuchen sollte weiterführend die Signalübertragung am Empfängerorgan überprüft werden. NZO-Aorten sollten mit diabetischem und gesundem Plasma inkubiert werden, um festzustellen, ob ausschließlich eine Fehlfunktion der Generierung protektiver Signalmoleküle besteht oder ob ebenfalls eine eingeschränkte Wirksamkeit am Zielorgan vorhanden ist. Da das Plasma als Transfermedium identifiziert wurde, können Massenbestimmungen der enthaltenen Bestandteile eine genaue Identifikation der Botenstoffe ermöglichen. Auch sollten Langzeiteffekte der Pyk2-Inhibition auf die Endothelfunktion wie auch in Bezug auf Nebenwirkungen untersucht werden.

Um die Translation eines positiven Effekts der Pyk2-Inhibition vom murinen Modell zum Menschen zu ermöglichen, sollten struktur- und aktivitätsvergleichende Studien zwischen murinem und humanem Pyk2 durchgeführt werden. Es ist zu vermuten, dass geringfügige Differenzen zwischen humanem und murinem Pyk2 bestehen. Solche Unterschiede beeinflussen möglicherweise die Enzymaktivität oder Interaktionen mit anderen Proteinen. Eine vergleichende Analyse dieser Proteine sollte daher in der Zukunft durchgeführt werden.

4.8 *Schlussfolgerungen*

Patienten mit DM II zeigen ein schlechteres *Outcome* nach Myokardinfarkt verglichen mit Nicht-Diabetikern. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, Verfahren zu entwickeln, welche die Prognose dieser Patienten nach einem solchen ischämischen Ereignis verbessern. Das kardioprotektive rIPC-Manöver konnte diesbezüglich in Modellen vielversprechende Ergebnisse aufweisen und befindet sich aktuell in detaillierter Testung in der klinischen Praxis. Es wurde ein *Bioassay* entwickelt, um mittels Plasmatransfer die Übertragung eines rIPC-generierten kardioprotektiven Signals auf ein externes Empfängerorgan zu realisieren und den Transfermechanismus zu untersuchen. Im Gegensatz zu gesunden BL6 und Nicht-Diabetikern verblieb das rIPC-Manöver bei diabetischen NZO und Diabetikern ohne protektive Wirkung auf die Endothelfunktion. Durch pharmakologische Pyk2-Inhibition bei NZO-Mäusen konnte das Bildungsvermögen protektiver Faktoren des Endothels jedoch wiederhergestellt werden. Dieses regenerierte Signal war humoral über das Plasma auf ein Empfängerorgan übertragbar. So konnte Pyk2 als bedeutsamer Modulator der rIPC-assoziierten fernen Organoprotektion validiert werden und stellt somit ein zukünftiges Target zur Entwicklung von Behandlungsstrategien endothelialer Dysfunktion im humanen Kardiometabolismus dar.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Deutsche Herzstiftung. Deutscher Herzbericht 2021. 2022; Available from: <https://herzstiftung.de/service-und-aktuelles/publikationen-und-medien/herzbericht>
3. Anderson HV (“Skip”), Masri SC, Abdallah MS, Chang AM, Cohen MG, Elgendy IY, et al. 2022 ACC/AHA Key Data Elements and Definitions for Chest Pain and Acute Myocardial Infarction: A Report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Data Standards. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2022. 819–858 p.
4. Tajabadi M, Goran Orimi H, Ramzgouyan MR, Nemati A, Deravi N, Beheshtizadeh N, et al. Regenerative strategies for the consequences of myocardial infarction: Chronological indication and upcoming visions. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2022;146(December 2021):112584. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112584>
5. Stefan Agewall (Norway), Manuel J. Antunes (Portugal), Chiara Bucciarelli-Ducci (UK), Héctor Bueno (Spain), Alida L. P. Caforio (Italy), Filippo Crea (Italy), John A. Goudevenos (Greece), Sigrun Halvorsen (Norway), Gerhard Hindricks (Germany), Adnan Kastr PW (Czech R. ESC pocket guidelines STEMI 2017. 2017; Available from: <https://theloadstar.com/air-cargo-2020-a-combination-of-luck-and-strategy-to-sort-the-best-from-the-rest/>
6. Fokkema ML, James SK, Albertsson P, Akerblom A, Calais F, Eriksson P, et al. Population Trends in Percutaneous Coronary Intervention: 20-Year Results From the SCAAR (Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry). *J Am Coll Cardiol*. 2013 Mar 26;61(12):1222–30.
7. Collet J-P, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevationThe Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* [Internet]. 2021 Apr 7 [cited 2023 Aug 14];42(14):1289–367. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
8. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevationThe Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* [Internet]. 2018 Jan 7 [cited 2023 Aug 14];39(2):119–77. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
9. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121–35.
10. Bibli S-I, Zhou Z, Zukunft S, Fisslthaler B, Andreadou I, Szabo C, et al. Tyrosine

phosphorylation of eNOS regulates myocardial survival after an ischaemic insult: Role of PYK2. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2018 Sep 11];113(8):926–37. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvx058>

11. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: A quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2003 Jan 4 [cited 2022 Nov 21];361(9351):13–20. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673603121137/fulltext>
12. World Health Organization. Hypertensive heart disease - Trends in cause-specific mortality by sex for a selected country or area and age-group [Internet]. WHO Mortality Database. 2022. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
13. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* [Internet]. 1986 Nov [cited 2019 Mar 31];74(5):1124–36. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
14. Erkens R, Suvorava T, Kramer CM, Diederich LD, Kelm M, Cortese-Krott MM. Modulation of Local and Systemic Heterocellular Communication by Mechanical Forces: A Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep 11];26(16):917–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27927026>
15. Rossello X, He Z, Yellon DM. Myocardial Infarct Size Reduction Provided by Local and Remote Ischaemic Preconditioning: References Values from the Hatter Cardiovascular Institute. *Cardiovasc Drugs Ther* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Nov 20];32(2):127. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5958157/>
16. Erkens R, Suvorava T, Sutton TR, Fernandez BO, Mikus-Lelinska M, Barbarino F, et al. Nrf2 Deficiency Unmasks the Significance of Nitric Oxide Synthase Activity for Cardioprotection. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2018;2018:1–15. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8309698/>
17. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning. *Circ Res*. 2014;114(10):1601–10.
18. Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2023 Dec 7];130(5):1326–32. Available from: <http://www.jtcvs.org/article/S0022522305011736/fulltext>
19. D’Ascenzo F, Moretti C, Omedè P, Cerrato E, Cavallero E, Er F, et al. Cardiac remote ischaemic preconditioning reduces periprocedural myocardial infarction for patients undergoing percutaneous coronary interventions: a meta-analysis of randomised clinical trials. *EuroIntervention* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 27];9(12):1463–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24755386/>
20. Ejiri K, Miyoshi T, Kohno K, Nakahama M, Doi M, Munemasa M, et al. Protective Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Myocardial Damage After Percutaneous Coronary Intervention in Stable Angina Patients With Complex

- Coronary Lesions — Subanalysis of a Randomized Controlled Trial —. *Circ J* [Internet]. 2018 Jun 25 [cited 2022 Oct 27];82(7):1788–96. Available from: https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr_e/ctr_view.
21. Hausenloy DJ, Kharbanda RK, Møller UK, Ramlall M, Aarøe J, Butler R, et al. Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2019 Oct 19;394(10207):1415–24.
 22. Heusch G. Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2020;17(12):773–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>
 23. Bell RM, Basalay M, Bøtker HE, Beikoghli Kalkhoran S, Carr RD, Cunningham J, et al. Remote ischaemic conditioning: defining critical criteria for success—report from the 11th Hatter Cardiovascular Workshop. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2022;117(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00395-022-00947-2>
 24. Hausenloy DJ. Translating cardiac remote ischemic conditioning for patient benefit - challenges and opportunities. *Cond Med*. 2021;4(3).
 25. Wider J, Przyklenk K. Ischemic conditioning: the challenge of protecting the diabetic heart. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2014;4(5):383–38396.
 26. Remote Ischemic Conditioning With Local Ischemic Postconditioning in High-Risk ST-elevation Myocardial Infarction (RIP-HIGH) [Internet]. [cited 2025 Jan 12]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04844931>
 27. Hummitzsch L, Zitta K, Fritze L, Monnens J, Vollertsen P, Lindner M, et al. Effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) and chronic remote ischemic preconditioning (cRIPC) on levels of plasma cytokines, cell surface characteristics of monocytes and in-vitro angiogenesis: a pilot study. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2021;116(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00901-8>
 28. Donato M, Bin EP, D’Annunzio V, Gelpi RJ. Myocardial remote ischemic preconditioning: from cell biology to clinical application. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Nov 5];476(10):3857–67. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-021-04192-4>
 29. Yang J, Balkaya M, Beltran C, Heo JH, Cho S. Remote Postischemic Conditioning Promotes Stroke Recovery by Shifting Circulating Monocytes to CCR2+ Proinflammatory Subset. *J Neurosci* [Internet]. 2019 Sep 25 [cited 2023 Dec 7];39(39):7778–89. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/39/39/7778>
 30. Gho BCG, Schoemaker RG, Van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* [Internet]. 1996 Nov 1 [cited 2019 Apr 1];94(9):2193–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901671>
 31. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: Underlying mechanisms and clinical application [Internet]. Vol. 79, *Cardiovascular Research*. 2008 [cited 2024 Feb 25]. p. 377–86. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/79/3/377/610360>

32. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 Dec 3];98(2):425–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/expphysiol.2012.066217>
33. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005;79(12):1691–5.
34. Johnson BD, Mather KJ, Wallace JP. Mechanotransduction of shear in the endothelium: Basic studies and clinical implications [Internet]. Vol. 16, *Vascular Medicine*. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2011 [cited 2019 Apr 1]. p. 365–77. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1358863X11422109>
35. Erkens R, Totzeck M, Brum A, Duse D, Bøtker HE, Rassaf T, et al. Endothelium-dependent remote signaling in ischemia and reperfusion: Alterations in the cardiometabolic continuum. *Free Radic Biol Med*. 2021;165(December 2020):265–81.
36. Zhang Y, Topper JN, Komuves LG, Yang R-B, Spriggs F, Wasserman SM, et al. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics*. 2002;12(1):13–23.
37. Billah M, Ridiandries A, Allahwala U, Mudaliar H, Dona A, Hunyor S, et al. Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: Search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection. *Oncotarget*. 2019;10(2):216–44.
38. Buga G, Gold M, Fukuto J, Ignarro L. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*. 1991;17(2):187–93.
39. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664–6.
40. Mellion BT, Ignarro LJ, Myers CB, Ohlstein EH, Ballot BA, Hyman AL, et al. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Mol Pharmacol*. 1983;23(3):653–64.
41. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1991 Jun 1 [cited 2018 Oct 3];88(11):4651–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675786>
42. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2013 Nov 30 [cited 2018 Oct 3];35:175–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860313003182?via%3Dihub>
43. Peng HB, Spiecker M, Liao JK. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF-beta1. *J Immunol*

- [Internet]. 1997 Sep 1 [cited 2018 Oct 3];159(5):2418–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278333>
44. Fisslthaler B, Loot AE, Mohamed A, Busse R, Fleming I. Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase activity by Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circ Res* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2018 Sep 11];102(12):1520–8. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.108.172072>
 45. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: How, where and why? *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(12):939–50.
 46. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Dec 6];284(1):R1–12. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00323.2002>
 47. Long Y, Xia J yi, Chen S wei, Gao C lin, Liang G nan, He X mei, et al. ATP2B1 gene silencing increases insulin sensitivity through facilitating Akt activation via the Ca²⁺/calmodulin signaling pathway and Ca²⁺-associated eNOS activation in endothelial cells. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 6];13(9):1203–12. Available from: <http://www.ijbs.com/v13p1203.htm>
 48. Viswambharan H, Yuldasheva NY, Sengupta A, Imrie H, Gage MC, Haywood N, et al. Selective Enhancement of Insulin Sensitivity in the Endothelium in Vivo Reveals a Novel Proatherosclerotic Signaling Loop. *Circ Res*. 2017;120(5):784–98.
 49. Abel ED, O’Shea KM, Ramasamy R. Insulin resistance: Metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2068–76.
 50. Siragusa M, Fisslthaler B. Insulin Keeps PYK-ing on eNOS: Enhanced Insulin Receptor Signaling Induces Endothelial Dysfunction. *Circ Res*. 2017;120(5):748–50.
 51. Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(2):208–15.
 52. Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Byron KL, Samarel AM, Lucchesi PA. Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1998;83(8):841–51.
 53. Erkens R, Duse DA, Brum A, Chadt A, Becher S, Siragusa M, et al. Inhibition of proline-rich tyrosine kinase 2 restores cardioprotection by remote ischaemic preconditioning in type 2 diabetes. *Br J Pharmacol*. 2024;181(21):4174–94.
 54. Visseren F, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021;42(34):3227–337.
 55. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2012;11(1):1. Available from: *Cardiovascular Diabetology*
 56. Strain WD, Paldánus PM. Diabetes, cardiovascular disease and the

- microcirculation. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2018;17(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0703-2>
57. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the Diabetic Heart, The Importance of Akt Phosphorylation. *Diabetes*. 2005;54(8):2360–4.
 58. Feige K, Roth S, Pembele RM, Galow A, Koenig S, Stroethoff M, et al. Influence of Short and Long Hyperglycemia on Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning — A Translational Approach. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):14557.
 59. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension*. 2009;54(6):1384–92.
 60. Gorin Y, Block K. Nox as a target for diabetic complications. *Clin Sci*. 2013;125(8):361–82.
 61. Radavelli-Bagatini S, Blair AR, Proietto J, Spritzer PM, Andrikopoulos S. The New Zealand obese mouse model of obesity insulin resistance and poor breeding performance: Evaluation of ovarian structure and function. *J Endocrinol*. 2011;209(3):307–15.
 62. Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG. Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology*. 1997;138(10):4234–9.
 63. Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P, et al. A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(3):195–202.
 64. Muramatsu I, Ohmura T, Kigoshi S, Hashimoto S, Oshita M. Pharmacological subclassification of $\alpha 1$ -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1990;99(1):197–201.
 65. Evellin S, Nolte J, Tysack K, Dorp F Vom, Thiel M, Oude Weernink PA, et al. Stimulation of phospholipase C- ϵ by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(19):16805–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112024200>
 66. Zuccolo E, Laforenza U, Negri S, Botta L, Berra-Romani R, Faris P, et al. Muscarinic M5 receptors trigger acetylcholine-induced Ca²⁺ signals and nitric oxide release in human brain microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):4540–62.
 67. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):532–41.
 68. Steinberg H 0, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated Skeletal Muscle Vasodilation Is Nitric Oxide Dependent A Novel Action of Insulin to Increase Nitric Oxide Release Key words: euglycemic hyperinsulinemic clamp * leg blood flow * methacholine chloride * sodium nitroprusside * vascular resi. *J*

- Clin Investig [Internet]. 1994;94(3):1172–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295191/pdf/jcinvest00021-0270.pdf>
69. Alexander JT, El-Ali AM, Newman JL, Karatela S, Predmore BL, Lefer DJ, et al. Red blood cells stored for increasing periods produce progressive impairments in nitric oxide-mediated vasodilation. *Bone*. 2014;23(1):1–7.
 70. Zhou Z, Mahdi A, Tratsiakovich Y, Zahorán S, Kövamees O, Nordin F, et al. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(7):769–80.
 71. Erkens R, Kramer CM, Lückstädt W, Panknin C, Krause L, Weidenbach M, et al. Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;89:906–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.409>
 72. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2018;53(1):34–78.
 73. Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Mehr als fünf Millionen Euro für... Deutsches Ärzteblatt [Internet]. 2023 [cited 2025 Jan 16]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/144928/Herz-Kreislauf-Erkrankungen-Mehr-als-fuenf-Millionen-Euro-fuer-Forschung>
 74. Eschenhagen T. Presstext DGK 4/2012. 2012.
 75. Heusch G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ Res* [Internet]. 2015 Feb 13 [cited 2023 Dec 3];116(4):674–99. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
 76. Lewis NCS, Bain AR, Wildfong KW, Green DJ, Ainslie PN. Acute hypoxaemia and vascular function in healthy humans. *Exp Physiol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Dec 10];102(12):1635–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28901662/>
 77. Kristiansen SB, Pælestik KB, Johnsen J, Jespersen NR, Pryds K, Hjortbak MV, et al. Impact of hyperglycemia on myocardial ischemia-reperfusion susceptibility and ischemic preconditioning in hearts from rats with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2019;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0872-7>
 78. Katakam PVG, Jordan JE, Snipes JA, Tulbert CD, Miller AW, Busija DW. Myocardial preconditioning against ischemia-reperfusion injury is abolished in Zucker obese rats with insulin resistance. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(2):920–6.
 79. Hausenloy DJ, Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM. Glimepiride treatment facilitates ischemic preconditioning in the diabetic heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2013;18(3):263–9.
 80. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves

- endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000;43(11):1435–8.
81. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* [Internet]. 1993 Dec [cited 2018 Oct 2];88(6):2510–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080489>
 82. Streit U, Reuter H, Bloch W, Wahlers T, Schwinger RHG, Brixius K. Phosphorylation of myocardial eNOS is altered in patients suffering from type 2 diabetes. *J Appl Physiol* [Internet]. 2013 May 15 [cited 2018 Oct 3];114(10):1366–74. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00011.2011>
 83. Williams SB, Cusco JA, Roddy M a, Johnstone MT, Creager M a. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1996 [cited 2018 Oct 2];27(3):567–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200806>
 84. Dreja T, Jovanovic Z, Rasche A, Kluge R, Herwig R, Tung YCL, et al. Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome. *Diabetologia*. 2010;53(2):309–20.
 85. Baranyai T, Nagy CT, Koncsos G, Onódi Z, Károlyi-Szabó M, Makkos A, et al. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14(1):1–10.
 86. Whittington HJ, Babu GG, Mocanu MM, Yellon DM, Hausenloy DJ. The diabetic heart: Too sweet for its own good? *Cardiol Res Pract*. 2012;1(1).
 87. Penna C, Andreadou I, Aragno M, Beauloye C, Bertrand L, Lazou A, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br J Pharmacol*. 2020;177(23):5312–35.
 88. Kehl F, Krolkowski JG, Weihrauch D, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. N-Acetylcysteine Restores Isoflurane-induced Preconditioning against Myocardial Infarction during Hyperglycemia. *Anesthesiology* [Internet]. 2003 Jun 1;98(6):1384–90. Available from: <https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/98/6/1384/39403/N-Acetylcysteine-Restores-Isoflurane-induced>
 89. Ren X, Ren L, Wei Q, Shao H, Chen L, Liu N. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):1–12.
 90. Feng L, Zhu MM, Zhang MH, Wang RS, Tan X Bin, Song J, et al. Protection of glycyrrhizic acid against AGEs-induced endothelial dysfunction through inhibiting RAGE/NF- κ B pathway activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2013;148(1):27–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.035>
 91. Torregroza C, Gnaegy L, Raupach A, Stroethoff M, Feige K, Heinen A, et al. Influence of hyperglycemia and diabetes on cardioprotection by humoral factors

- released after remote ischemic preconditioning (RIPC). *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):1–14.
92. Song X, Xu H, Feng Y, Li X, Lin M, Cao L. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against liver ischemic reperfusion injury: Particularly in diet-induced obese mice. *Int J Biol Sci*. 2012;8(10):1345–62.
 93. Wider J, Undyala VVR, Whittaker P, Woods J, Chen X, Przyklenk K. Remote ischemic preconditioning fails to reduce infarct size in the Zucker fatty rat model of type-2 diabetes: role of defective humoral communication. *Basic Res Cardiol*. 2018 May 1;113(3):16.
 94. Jensen RV, Støttrup NB, Kristiansen SB, Bøtker HE. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(5):1–9.
 95. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. PF-431396 hydrate $\geq 98\%$ (HPLC) - Product Information [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 9]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/pz0185>
 96. Matsui A, Okigaki M, Amano K, Adachi Y, Jin D, Takai S, et al. Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function. *Circulation*. 2007;116(9):1041–51.
 97. Lang D, Glukhov A V., Efimova T, Efimov IR. Role of Pyk2 in cardiac arrhythmogenesis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2011;301(3):975–83.
 98. Miller BA, Wang JF, Song J, Zhang XQ, Hirschler-Laszkiewicz I, Shanmughapriya S, et al. Trpm2 enhances physiological bioenergetics and protects against pathological oxidative cardiac injury: Role of Pyk2 phosphorylation. *J Cell Physiol*. 2019;234(9):15048–60.
 99. Shen CJ, Raghavan S, Xu Z, Baranski JD, Yu X, Wozniak MA, et al. Decreased Cell Adhesion Promotes Angiogenesis in Pyk2-dependent Manner. *Immunity*. 2011;317(13):1860–71.
 100. Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase a activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(11):1054–66.
 101. Han S, Mistry A, Chang JS, Cunningham D, Griffor M, Bonnette PC, et al. Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design. *J Biol Chem*. 2009;284(19):13193–201.
 102. Cheng Z, Dimichele LA, Hakim ZS, Rojas M, MacK CP, Taylor JM. Targeted focal adhesion kinase activation in cardiomyocytes protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(4):924–33.
 103. Perricone AJ, Bivona BJ, Jackson FR, Heide RSV. Conditional knockout of myocyte focal adhesion kinase abrogates ischemic preconditioning in adult murine

- hearts. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(5):1–12.
104. Okigaki M, Davis C, Falascat M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, et al. Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10740–5.
 105. Pieper GM, Siebeneich W. Use of a Nitronyl Nitroxide to Discriminate the Contribution of Nitric Oxide Radical in Endothelium-Dependent Relaxation of Control and Diabetic Blood Vessels 1. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(1):138–47.
 106. Singh RJ, Hogg N, Mchaourab HS, Kalyanaraman B. Physical and chemical interactions between nitric oxide and nitroxides. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1201(3):437–41.
 107. Yellon DM, Ackbarkhan AK, Balgobin V, Bulluck H, Deelchand A, Dhuny MR, et al. Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size in STEMI patients treated by thrombolysis. *J Am Coll Cardiol [Internet].* 2015;65(25):2764–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2015.02.082>
 108. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Preconditioning the diabetic human myocardium. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6 B):1740–6.
 109. Bas M, Kirchhartz N, Hochfeld J, Tüllmann C, Kumpf S, Suvorava T, et al. Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(4).
 110. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache J Head Face Pain [Internet].* 2016 Feb 1 [cited 2020 May 3];56(2):436–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/head.12769>

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Erkens bedanken, ohne dessen umfassende Betreuung der Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls gilt mein Dank meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Dr. Stegbauer für seinen fortwährenden Beistand und das Mittragen des Projekts.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kelm für die Möglichkeit im kardiologischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf zu forschen und mich weiterzuentwickeln.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Duse für sein Mitwirken an dem Experiment mit humanem Plasma von Nicht-Diabetikern bedanken.

Ich danke Katrin Paul-Krahe für ihre Zuversicht, während sie mir den Umgang mit dem Organbad beibrachte.

Danke an Stefanie Becker für ihre tatkräftige Hilfe bei Problemen und Scherben im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden – Danke von Herzen.