

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

**Der Transfer von kardioprotektiven Eigenschaften mittels Effluat
aus ischämisch-präkonditionierten Langendorff-Herzen abhängig
von der Anzahl der präkonditionierenden Zyklen
– Eine Untersuchung im nativen Rattenherz**

Dissertation

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

vorgelegt von
Jan Mühlenbernd
2026

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

gez.: Jan Mühlenbernd

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

*Für
meinen Partner Kai Luca Richrath
und
meine Eltern Ute und Dr. med. Günther Mühlenbernd*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Feige K, Raupach A, Torregroza C, **Muehlenbernd J**, Stroethoff M, Bunte S, et al. (2020) Effluent from ischemic preconditioned hearts confers cardioprotection independent of the number of preconditioning cycles. PLoS ONE 15(12): e0243220.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243220>

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigsten Todesursachen dar. Als relevanteste Komplikation gilt der akute Myokardinfarkt. Zur Minimierung des Ausmaßes der myokardialen Nekrose ist in diesem Fall die zeitnahe Reperfusion die Therapie der Wahl. Eine ischämische Präkonditionierung (IPC) des Myokards wirkt kardioprotektiv und reduziert ebenfalls die Größe der Nekrose. Es ist möglich durch den Transfer von Effluat von ischämisch präkonditionierten Herzen zu nativen Herzen eine Kardioprotektion zu erwirken. Jedoch ist derzeit noch nicht abschließend geklärt, ob es einer gewissen Anzahl an IPC-Zyklen bedarf, damit kardioprotektive Mediatoren in das Effluat freigesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Ausmaß der Kardioprotektion des transferierten Effluats von ischämisch präkonditionierten Herzen abhängig von der Anzahl der präkonditionierenden Zyklen ist. Diese Fragestellung wurde experimentell an isolierten Herzen von jungen, männlichen Wistar-Ratten unter Anwendung des Langendorff-Modells untersucht. Der Versuch gliederte sich in zwei Teile: die Effluatgewinnung (Donor) und anschließend durch Transfer des Effluats die Prüfung der Kardioprotektion (Akzeptor). Die Donor-Herzen wurden mit modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert und durchliefen drei, jeweils fünfminütige, IPC-Zyklen mit je einer fünf Minuten dauernden Reperfusion im Anschluss an jede Ischämie. In den fünf Minuten vor dem ersten IPC-Zyklus und in den drei Reperfusionen wurde das koronare Effluat aufgefangen. Dieses Effluat wurde den Akzeptor-Herzen über eine zehnminütige Phase als Präkonditionierungsstimulus zugeführt, im Anschluss durchliefen sie eine 33-minütige Ischämie und eine 60-minütige Reperfusion. Für die Versuchsdurchführung wurden die Tiere in vier Gruppen (jeweils $n=5$) randomisiert. Es wurde entweder das Effluat nach einem, zwei oder drei IPC-Zyklen appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt Effluat, welches vor dem ersten IPC-Zyklus gewonnen wurde. Nachfolgend wurde mittels TTC-Färbung die Infarktgröße der Akzeptor-Herzen bestimmt. Mittels eines *two-way ANOVA* mit *Tukey's post hoc test* ($p < 0,05$) wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Die Daten wurden in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Die Infarktgröße bildete den primären Endpunkt. In den Versuchen betrug diese bei der Kontrollgruppe $54 \pm 12\%$. Die Applikation des IPC-Effluats induzierte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße, jedoch unabhängig von der Anzahl der durchlaufenen IPC-Zyklen (E_{IPC1} : $27 \pm 5\%$; E_{IPC2} : $35 \pm 7\%$; E_{IPC3} : $35 \pm 8\%$, jeweils $p < 0,05$ vs. Con). Überdies wurden die hämodynamischen Daten ausgewertet. Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf Herzfrequenz, linksventrikuläre Druckdifferenz (LVDP) und Koronarfluss (CF) fanden sich nicht. Lediglich in der Phase der Reperfusion unterschieden sich in allen Gruppen LVDP und CF signifikant von den Werten der *baseline*.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine signifikante Infarktgrößenreduktion durch das von IPC-Herzen gewonnene koronare Effluat vermittelt wurde. Dies ist unabhängig von der Anzahl der durchlaufenen IPC-Zyklen. Die erste fünfminütige Globalischämie stellte vermutlich einen so starken Stimulus für die Freisetzung von kardioprotektiven Mediatoren dar, dass das Effluat nach zwei weiteren Ischämien zu keiner weiteren Infarktgrößenreduktion führte. Klinisch besteht die Möglichkeit, diese Faktoren bereits nach einem Zyklus zum Schutz von Patienten mit hohem Risiko für einen Myokardinfarkt zu nutzen. Eine Untersuchung unter Berücksichtigung von Störfaktoren, wie Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen, welche die Reizschwelle zur Ausschüttung humoraler Faktoren anheben kann, sollte Ausgang für zukünftige Untersuchungen sein.

Summary

Cardiovascular diseases are the most common causes of death in Germany and worldwide. Its most relevant complication is the acute myocardial infarction. Until now, the first line therapy to minimize the extent of myocardial necrosis remains the timely reperfusion. Myocardial ischemic preconditioning (IPC) reduces by its cardioprotective effect the size of the necrosis. It is possible to achieve cardioprotection by transferring effluent from ischemic preconditioned hearts to native hearts. However, it is currently unknown whether a certain number of IPC cycles are required for cardioprotective mediators to be released into the effluent.

This work investigated whether the extent of cardioprotection of the effluent from ischemic preconditioned hearts depends on the number of preconditioning cycles. This question was investigated experimentally on isolated hearts from young male Wistar rats by using the Langendorff model. The experiment was divided into two parts: collecting effluent (donor) and testing cardioprotection by transferring the effluent to native rat hearts (acceptor). The donor hearts were perfused with modified Krebs-Henseleit buffer and passed three IPC cycles, each lasting five minutes, all followed by a five-minute reperfusion. Coronary effluent was collected in the five minutes before the first IPC cycle and during the three cycles of reperfusion. This effluent was transferred to the acceptor hearts for ten-minute period as a preconditioning stimulus, before hearts underwent 33 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion. For the experimental procedure, animals were randomized into four groups (n=5 each). Effluent was applied after either one, two or three IPC cycles. The control group received effluent obtained before the first IPC cycle. Subsequently, TTC staining was used to determine the infarct size of the acceptor hearts. Using a two-way ANOVA with Tukey's post hoc test ($p < 0.05$), statistical analysis was performed. Data were expressed as mean \pm standard deviation.

Infarct size was the primary endpoint. In the control group, infarct size was $54 \pm 12\%$. The application of the IPC effluent induced a significant reduction in infarct size, but independent of the number of IPC cycles performed (E_{IPC1} : $27 \pm 5\%$; E_{IPC2} : $35 \pm 7\%$; E_{IPC3} : $35 \pm 8\%$, each $p < 0.05$ vs. Con). In addition, the hemodynamic data were evaluated. No differences were found between groups in heart rate, left ventricular pressure difference (LVDP) and coronary flow (CF). Only in the phase of reperfusion LVDP and CF differed significantly from baseline values in all groups.

The results indicate that a significant infarct size reduction was mediated by the coronary effluent obtained from IPC hearts. This is independent of the number of IPC cycles completed. The first five-minute global ischemia presumably provided such a strong stimulus for the release of cardioprotective mediators that two further cycles of ischemia did not result in further infarct size reduction. Clinically, there is a possibility to use these factors, which already exist after one cycle, to protect patients at high risk for myocardial infarction. An investigation taking into account confounding factors, such as age, sex, and pre-existing diseases, which may raise the stimulus threshold for release of humoral factors, should be the starting point for future investigations.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>Area at risk</i> (Risikogebiet)
A _{2B} -AR	A _{2B} -Adenosinrezeptor
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BPZ	Ballonplatzierungszeit
Ca ²⁺	Calciumion
CF	Koronarfluss
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Creatininkinase
Con	Kontrollgruppe
dP	<i>developed pressure</i> (erzeugter Druck)
dP/dt _{Max}	Linksventrikuläre Kontraktionsgeschwindigkeit
dP/dt _{Min}	Linksventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit
DPZ	Dekapitations-Perfusions-Zeit
E _{IPC}	IPC-Effluat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Erk-1 / 2	<i>extracellular signal-regulated</i> Kinase 1 / 2
G	Gauge
GC	Guanylatzyklase
G _i -PCR	G _i -Protein-gekoppelte-Rezeptor
GSK3β	Glykogensynthasekinase 3β
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Wasserstoffion
HHU	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	Intraperitoneal
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPostC	Ischämische Postkonditionierung
I/R-Schaden	Ischämie-/Reperfusionsschaden
JAK	Januskinase
K ⁺	Kaliumion
KHK	Koronare Herzkrankheit
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LCA	linke Koronararterie
LDH	Laktatdehydrogenase
LVDP	Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz
LVP _{max}	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP _{min}	Linksventrikulärer frühdiaastolischer Druck
M	Molekülmasse
MAP	Mittlerer arterieller Druck
mK _{ATP}	mitochondrialen ATP-sensitiven K ⁺ -Kanäle
mPTP	Mitochondriale Permiabilitätstransitions-poren

MVO	Mikrovaskuläre Obstruktion
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Isotone Natriumchlorid-Lösung (0,9%)
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NHX	Na ⁺ -H ⁺ -Antiport
NO	Stickstoffmonoxid
PA-Tiere	Nicht-präkonditionierte Akzeptor-Tier
PC	die letzte Minute der Präkonditionierung
PD-Tiere	Präkonditionierte Donor-Tier
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PTCA	Perkutanen transluminalen Koronarangioplastie
Rep	Reperfusion
RIPC	Ischämische Fernpräkonditionierung
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPP	<i>Rate Pressure Product</i> (Herzfrequenz-Druck-Produkt)
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SPF	spezifisch pathogen-frei
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STAT-3	<i>Signal transducers and activators of transcription-3</i> (Signalüberträger- und Aktivator der Transkription 3)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ2
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Maßeinheiten

g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
µg	Mikrogramm
M	Mol
mM	Millimolar
µmol	Mikromolar
µm	Mikrometer
l	Liter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	1
1.2	Die Pathophysiologie der myokardialen Ischämie.....	2
1.2.1	Die myokardiale Ischämie und ihre Auswirkungen	2
1.2.2	Der myokardiale Reperfusionsschaden	3
1.3	Formen der ischämischen Konditionierung zur Kardioprotektion	8
1.3.1	Die ischämische Präkonditionierung	8
1.3.2	Weitere Formen der ischämischen Konditionierung	9
1.4	Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung.....	10
1.4.1	Trigger-Phase.....	10
1.4.2	Mediator-Phase	11
1.4.3	Endeffektoren	12
1.5	Der Transfer von ischämischer Präkonditionierung.....	12
1.6	Das isolierte Herz nach Langendorff	13
1.7	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methodik	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Versuchstiere	16
2.1.2	Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP).....	16
2.1.3	Medikamente	17
2.1.4	Chemikalien.....	17
2.1.5	Gase	18
2.1.6	Geräte.....	19
2.1.7	Langendorff-Anlage	20
2.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.9	Software.....	23
2.2	Methodik.....	23
2.2.1	Präparation der Rattenherzen.....	23
2.2.2	Isolierte, retrograde Perfusion an der Langendorff-Anlage.....	24
2.2.3	Induktion einer globalen Ischämie am isolierten Langendorff-Herzen....	27
2.2.4	Gewinnung von Kontroll- und IPC-Effluat aus Rattenherzen.....	27
2.2.5	Untersuchung des protektiven Einflusses des Effluats.....	28
2.2.6	Färbung der Herzen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	30
2.2.7	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Einfluss der Effluate auf die Infarktgrößen	33
3.2	Einfluss der Effluate auf die Hämodynamik	33
3.2.1	Die erhobenen hämodynamischen Parameter.....	33
3.2.2	Herzfrequenz	34
3.2.3	Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz (LVDP)	35

3.2.4	Koronarfluss	37
3.3	Einfluss der Effluat auf die ischämische Kontraktur	39
3.4	Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte	39
4	Diskussion	40
4.1	Beantwortung der Fragestellung	40
4.2	Diskussion von Material und Methodik.....	41
4.2.1	Versuchsaufbau – Die Langendorff-Anlage.....	41
4.2.2	Versuchstiere	43
4.2.3	Krebs-Henseleit-Puffer (KHP)	44
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	46
4.3.1	Infarktgrößenreduktion	46
4.3.2	Hämodynamik	47
4.3.3	Ischämische Kontraktur	48
4.3.4	Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte	51
4.4	Untersuchung des kardioprotektiven Einflusses des Effluats	51
4.4.1	Stimulation durch die ischämischen Präkonditionierung	51
4.4.2	Transfer der Kardioprotektion mittels koronarem Effluat.....	52
4.5	Limitationen der Arbeit	53
5	Schlussfolgerung und klinischer Ausblick.....	55
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Membranständige Ionentransporter in Kardiomyozyten.....	3
Abbildung 2: Einfluss des Reperfusionsschadens auf die finale Infarktgröße	4
Abbildung 3: Mechanismen des myokardialen Reperfusionsschadens.....	7
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Langendorff-Anlage	24
Abbildung 5: Versuchsablauf der Gewinnung von Kontroll- und IPC-Effluat	28
Abbildung 6: Versuchsablauf der Untersuchung des Einflusses der Effluat.....	30
Abbildung 7: Planimetrische Darstellung eines Rattenherzens nach TTC-Färbung .	32
Abbildung 8: Einfluss der Effluat auf die Infarktgrößen	33
Abbildung 9: Herzfrequenzen	35
Abbildung 10: Linksventrikuläre Blutdruckamplitude (LVDP)	36
Abbildung 11: Koronarfluss	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers	17
Tabelle 2: Medikamente	17
Tabelle 3: Chemikalien	18
Tabelle 4: Gase	19
Tabelle 5: Geräte	19-20
Tabelle 6: Langendorff-Anlage	20-21
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	21-22
Tabelle 8: Software	23
Tabelle 9: Herzfrequenzen	34
Tabelle 10: Linksventrikuläre Blutdruckamplitude (LVDP)	36
Tabelle 11: Koronarfluss	37
Tabelle 12: Ischämische Kontraktur	39
Tabelle 13: Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte	39

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit (KHK), sind für das Gesundheitssystem von entscheidender Bedeutung, da sie sowohl deutschland- als auch weltweit zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter zählen (1-4). Durch den demographischen Wandel in Deutschland und in der EU (5) steigt die Zahl der altersbedingten chronischen Krankheiten und somit auch das individuelle Krankheitsrisiko (6). Dies führt zu einer Zunahme der kardiovaskulären Erkrankungen und zu einem Anstieg der Begleiterkrankungen, welche beispielsweise als Risikofaktoren einen negativen Einfluss auf die kardiovaskulären Erkrankungen selbst und somit folglich auch auf die Mortalität haben können (6).

Als „Spitze des Eisbergs KHK“ kann in diesem Zusammenhang der Myokardinfarkt als akutes Ereignis gesehen werden (7). Unter diesem versteht man eine ischämische Myokardnekrose, welche durch eine hochgradige Stenose oder einen Koronararterienverschluss, zumeist basierend auf einer vorbestehenden KHK, bedingt wird (8). Ursächlich ist häufig die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques, welcher eine Thrombozytenaggregation und eine intraluminale Thrombose eines Koronargefäßes zur Folge hat (9). Begünstigend für die Entwicklung eines akuten Myokardinfarktes wirken kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Nikotinabusus (10). Adipositas, Diabetes mellitus und Bewegungsmangel gehören zu den weiteren, vornehmlich lebensstilbedingten, Risikofaktoren (11). Zu den unveränderbaren Risikofaktoren zählt man Alter, Geschlecht und genetische Disposition (11). Therapeutisch nimmt die zeitnahe Revaskularisation weiterhin eine zentrale Rolle ein. Hier stehen neben der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) mit anschließender Stent-Implantation, die systemische Fibrinolyse oder ein Koronararterienbypass zur Verfügung (12).

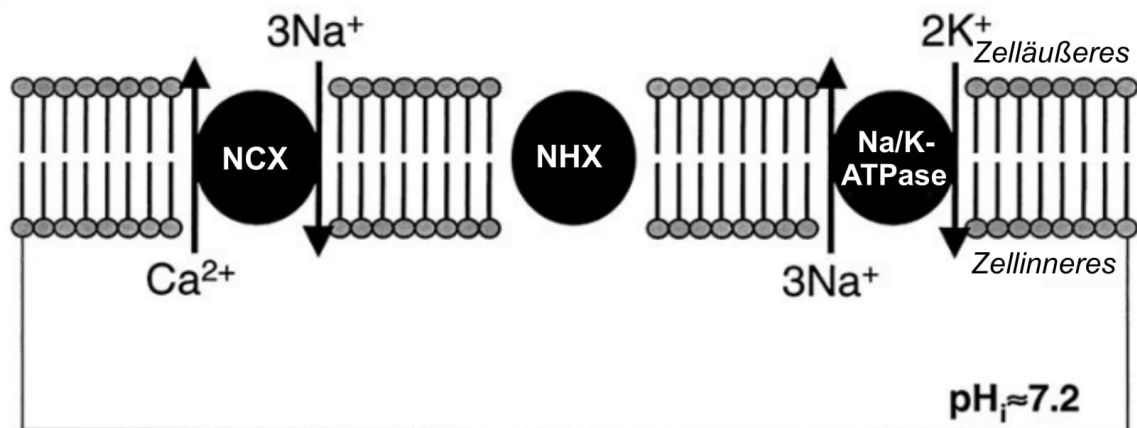
1.2 Die Pathophysiologie der myokardialen Ischämie

1.2.1 Die myokardiale Ischämie und ihre Auswirkungen

Durch die akute Okklusion einer Koronararterie wird in dem entsprechenden Versorgungsgebiet (*area at risk*, *AAR*) eine myokardiale Ischämie ausgelöst. Bei einer länger bestehenden Ischämie (> 20-40 Minuten) kommt es durch das sogenannte „*Wavefront*-Phänomen“ zu einem sich wellenförmig fortbewegenden nekrotischen Zelluntergang des Myokards. Dieser beginnt subendokardial und breitet sich über transmural nach subepikardial aus (13-15).

Die abrupte myokardiale Sauerstoff- und Nährstoffminderversorgung führt in den Kardiomyozyten zu verschiedenen biochemischen und metabolischen Störungen (16). Die Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien resultiert in einer Adenosintriphosphat (ATP) -Erschöpfung (17). Anstatt durch oxidative Phosphorylierung wird nun ATP durch die anaerobe Glykolyse bereitgestellt. Dies geschieht jedoch nicht in ausreichender Menge, weshalb der ATP-Mangel fortbesteht. Durch die Akkumulation von Stoffwechselprodukten, wie Adenosindiphosphat (ADP), Phosphat und Laktat, bildet sich in der Zelle eine metabolische Azidose mit einem pH-Wert von <7,0 (18). Die anfallenden Wasserstoffionen (H^+) werden im Austausch gegen Natrium (Na^+) aus der ischämischen Herzmuskelzelle mittels Na^+-H^+ -Antiport (NHX) befördert (siehe Abb. 1B mittig). Hierdurch und durch die wegen der ATP-Depletion sistierende Na^+/K^+ -ATPase (siehe Abb. 1B rechts) kommt es zu einer Na^+ -Überladung (16, 19). Schlussendlich sorgt dies für eine inverse Aktivierung des Na^+-Ca^{2+} -Austauschers (NCX), welcher intrazelluläres Na^+ durch extrazelluläres Calcium (Ca^{2+}) ersetzt (siehe Abb. 1B links) und somit eine Ca^{2+} -Überladung bedingt (16, 18). Der Funktionsverlust der Na^+/K^+ -ATPase hat außerdem einen intrazellulärer Kalium (K^+) -Mangel und eine osmotische Schwellung mit direkter Schädigung der Kardiomyozyten zur Folge (18).

A) Nicht-ischämischer Kardiomyozyt



B) Ischämischer Kardiomyozyt

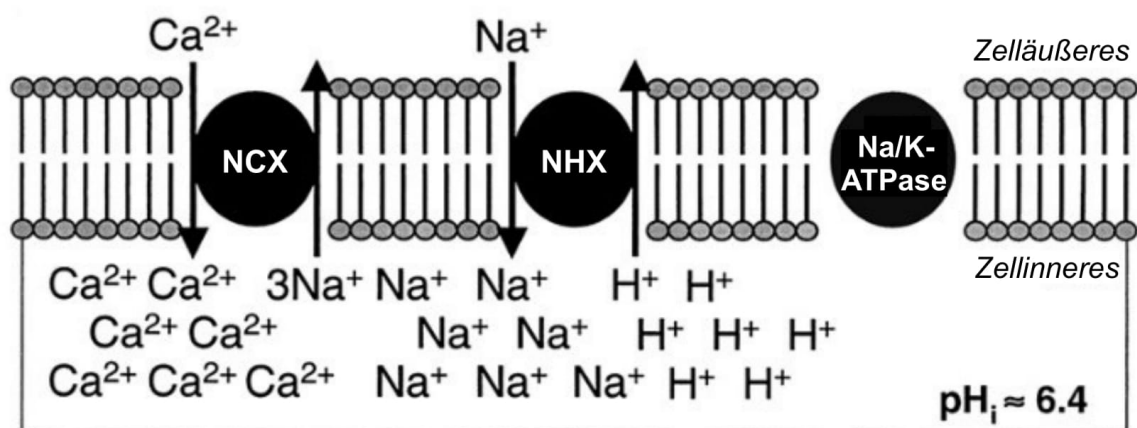


Abbildung 1: Membranständige Ionentransporter in Kardiomyozyten

Im nicht-ischämischen Kardiomyozyten (A) ist der Na⁺-H⁺-Antiporter (NHX) aufgrund der wenig anfallenden Wasserstoffionen kaum aktiv. Die 3Na⁺-2K⁺-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺-K⁺-Pumpe) befördert unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) drei Natriumionen (Na⁺) aus der Zelle heraus bei gleichzeitigem Einstrom von Kaliumionen (K⁺). Aufgrund der Na⁺-Differenz zwischen Zellinnerem und -äußeren tauscht der Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (NCX) intrazelluläres Ca²⁺ gegen extrazelluläres Na⁺. Während einer ischämischen Azidose (B) fallen aufgrund der anaeroben Glykolyse hingegen vermehrt H⁺ an und wegen der ATP-Depletion sistiert die Na⁺/K⁺-ATPase. Dies führt zu einer Akkumulation von H⁺ in der Zelle, welche mittels NHX gegen Na⁺ getauscht werden. Hieraus resultiert eine Na⁺-Überladung, aufgrund welcher durch den NCX Na⁺ aus der Zelle hinaus- und Ca²⁺ in die Zelle hineinströmt. Es folgt schlussendlich eine Ca²⁺-Überladung. Abbildung modifiziert nach Avkiran et al. 2002 (20).

1.2.2 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Nach einer erfolgreichen Revaskularisation des betroffenen Stromgebietes gelangen Sauerstoff und Nährstoffe wieder in das vormals ischämische Gewebe. Ein Wiedereinsetzen der oxidativen Phosphorylierung ist möglich, sodass ATP wieder gebildet wird. Eine Reperfusion kann somit die endgültige Infarktgröße minimieren und trägt zu einem besseren

Outcome der Patienten bei (21). Jedoch hat die Reperfusion nicht ausschließlich protektive Eigenschaften. Die schützenden Mechanismen der Reperfusion werden dadurch reduziert, dass die Infarktgröße nach der Revaskularisation nicht nur von der Größe des ischämischen Schadens bestimmt wird, sondern dass die Reperfusion selbst einen erheblichen, irreversiblen Schaden induziert (15). Dies geschieht auf Basis des myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) (21). Aufgrund des I/R-Schadens gehen Zellen unter, welche kurz vor der Reperfusion noch vital gewesen sind. Der Anteil des Reperfusionsschadens an der finalen Infarktgröße kann bis zu 50% betragen (15) (siehe Abb. 2).

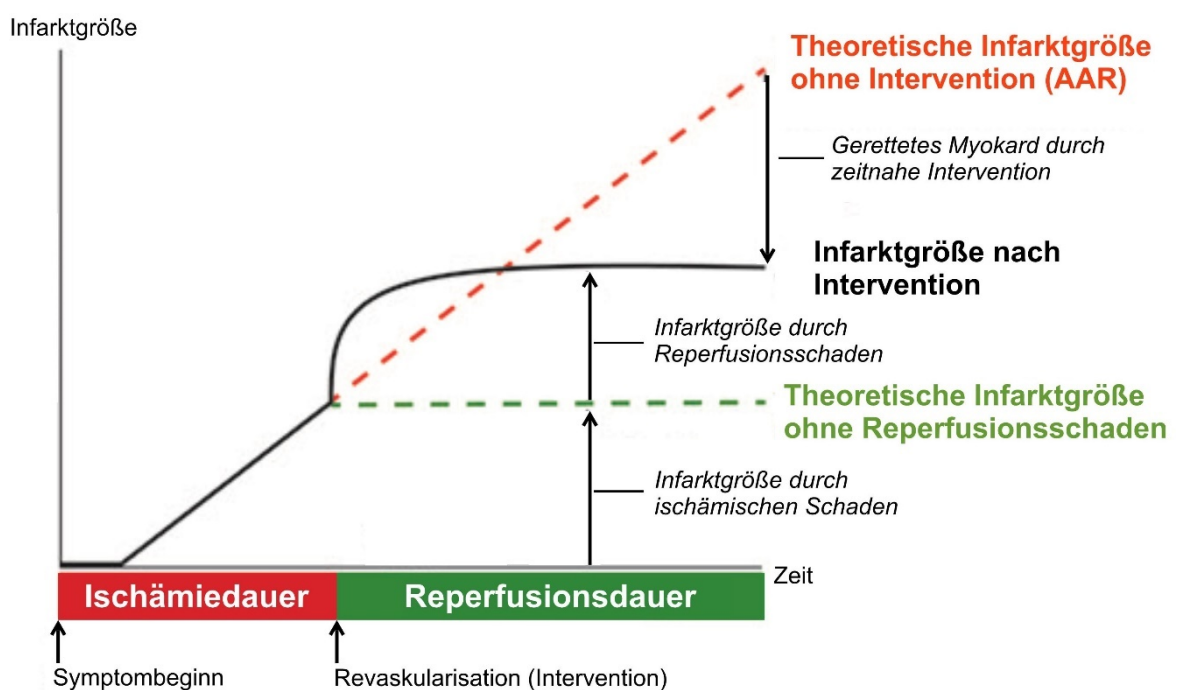


Abbildung 2: Einfluss des Reperfusionsschadens auf die finale Infarktgröße

In der Grafik wird die Zusammensetzung der finalen Infarktgröße aus ischämischem Schaden und Reperfusionsschaden dargestellt. Durch die unterbrochene rote Linie wird die theoretische Infarktgröße bei ausbleibender Revaskularisation (Intervention) visualisiert. Nach erfolgreicher Intervention erleidet nicht das ganze gefährdete Gebiet einen ischämischen Schaden. Hier dargestellt durch die schwarze Linie. Jedoch besteht die tatsächliche Infarktgröße (schwarze Linie) nicht nur aus der Infarktgröße durch den ischämischen Schaden (unterbrochene grüne Linie), sondern zusätzlich aus dem Reperfusionsschaden. Ziel kardioprotektiver Maßnahmen ist die Reduktion der finalen Infarktgröße durch eine Verminderung des Reperfusionsschadens. Abbildung modifiziert nach Hausenloy et al. 2013 (13).

Erstmals beschrieben Jennings et al. 1960 den myokardialen I/R-Schaden auf Grundlage ihrer Beobachtungen an Hundeherzen, welche als Modell zur koronaren Ligation dienten (21, 22).

Es werden vier Typen des myokardialen I/R-Schadens unterschieden. Hierbei handelt es sich um zwei reversible und zwei irreversible myokardiale Dysfunktionen. Zu den reversiblen Störungen zählen zum einen die **reperfusioninduzierten Arrhythmien** (ventrikuläre Arrhythmien), welche für gewöhnlich selbstlimitierend bzw. simpel zu behandeln sind (13). Aufgrund von oxidativem Stress und einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung kann zum anderen ein **myokardiales stunning**, welches in Kapitel 4.3.2 noch detaillierter besprochen wird, als reversible kontraktile Dysfunktion auftreten (21). Eine Erholung tritt nach Tagen bis Wochen ein (23). Im weiteren Verlauf ist ein Auftreten irreversibler Schädigungen möglich. Hierzu zählt die **mikrovaskuläre Obstruktion** (MVO), bei welcher laut Krug et al. eine Unfähigkeit vorliegt, ein vormals ischämisches Gebiet zu reperfundieren (24). Als ursächlich gelten Kapillarschäden, Mikroembolisationen, Schwellungen der Kardiomyozyten oder kapilläre Kompressionen von außen durch Endothelzellen (13). Als **letaler Reperfusionsschaden** wird der reperfusioninduzierte Untergang von Kardiomyozyten, welche am Ende der Ischämie noch vital waren, bezeichnet (13). Im Weiteren werden die Mediatoren beschrieben, welche zu einem letalen Reperfusionsschaden führen (siehe Abb. 3). Maßgebliche Mediatoren sind oxidativer Stress und eine zelluläre Ca^{2+} -Überladung, welche unter der Beteiligung von mitochondriale Permeabilitätstransitionsporen (mPTP) eine Hyperkontraktur bewirken (13).

Im Rahmen der Reperfusion wird das Gewebe nicht nur wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, sondern es werden auch Laktat und Protonen (aus der anaeroben Stoffwechsellage, siehe oben) herausgewaschen und der NHX, sowie der Na^+ - HCO_3^- -Symporter, aktiviert. Dies führt zu einem raschen Angleichen des pH-Wertes an physiologische Werte, während dieser in der akuten Ischämie auf Werte unter 7,0 fallen kann (13).

Durch die Wiederherstellung des Blutflusses wird die mitochondriale Atmungskette durch eine schnelle Erholung des aeroben Metabolismus wieder aktiviert. Dies führt durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativem Stress. Zudem werden ROS durch die endotheliale Xanthin- und die NADPH-Oxidase von neutrophilen Granulozyten gebildet (13, 19). Oxidantien sind in die direkte Schädigung von DNA, Proteinen, Lipiden und Zellmembranen involviert (17). ROS wirken außerdem chemotaktisch und führen zu einer inflammatorischen Reaktion, worauf hin neutrophile Granulozyten in das reperfundierte Gewebe einwandern (25, 26). Durch die NADPH-Oxidase der Neutrophilen werden weitere ROS gebildet und bewirken eine weitere Zellschädigung (17).

Die in der Ischämie begonnene Ca^{2+} -Überladung der Zelle wird in der Reperfusion noch einmal verstärkt. Das Auswaschen von H^+ vergrößert den Protonengradienten über die Zellmembran hinweg, sodass es zu einer Funktionszunahme des NHX kommt (20). Mittels einer inversen Funktion des NCX wird, wie zuvor erläutert, das intrazelluläre Na^+ gegen Ca^{2+} getauscht (17, 27). ROS-induzierte Schäden am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) führen zu einem vermehrten, intrazellulärem Freisetzen von Ca^{2+} (13).

Eine entscheidende Rolle kommt im Rahmen des letalen Reperfusionsschadens den mPTP zu. Hierbei handelt es sich um Ca^{2+} -induzierte, nicht-spezifische Poren, welche sich in der innere Mitochondrienmembran befinden und während der Ischämie aufgrund des niedrigen pH-Wertes geschlossen sind (28). Im Rahmen der Reperfusion öffnen die mPTP bei normalem pH-Wert, oxidativem Stress und Ca^{2+} -Überladung (29). Das Öffnen der mPTP führt zur Depolarisation der Mitochondrienmembran, Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, ATP-Depletion und schlussendlich zum Zelltod (13). Daneben führt ein Protoneneinstrom zum Aufbau eines osmotischen Gradienten, sodass Flüssigkeit den Protonen in die Mitochondrien folgt. Diese schwellen an, rupturieren und initiieren ihre Apoptose (17). Darüber hinaus ist die Hyperkontraktur der Myofibrillen von entscheidender Bedeutung, denn dadurch wird eine mechanische Ruptur der Muskelfasern induziert (19). Voraussetzung ist auch hier ein normalisierter pH-Wert und eine Ca^{2+} -Überladung (29).

Trotz der heute möglichen therapeutischen Versorgung mittels Thrombolyse und PTCA besteht Bedarf bei der Erforschung von kardioprotektiven Mechanismen. Eine schnelle Reperfusion ist hier allein nicht ausreichend. Die oben genannten Mechanismen des myokardialen I/R-Schadens bieten weitergehend mögliche Angriffspunkte zur Infarktgrößenreduktion. Einen Ansatz liefert hier unter anderem die ischämische Konditionierung des Myokards, die im Folgenden genauer vorgestellt wird.

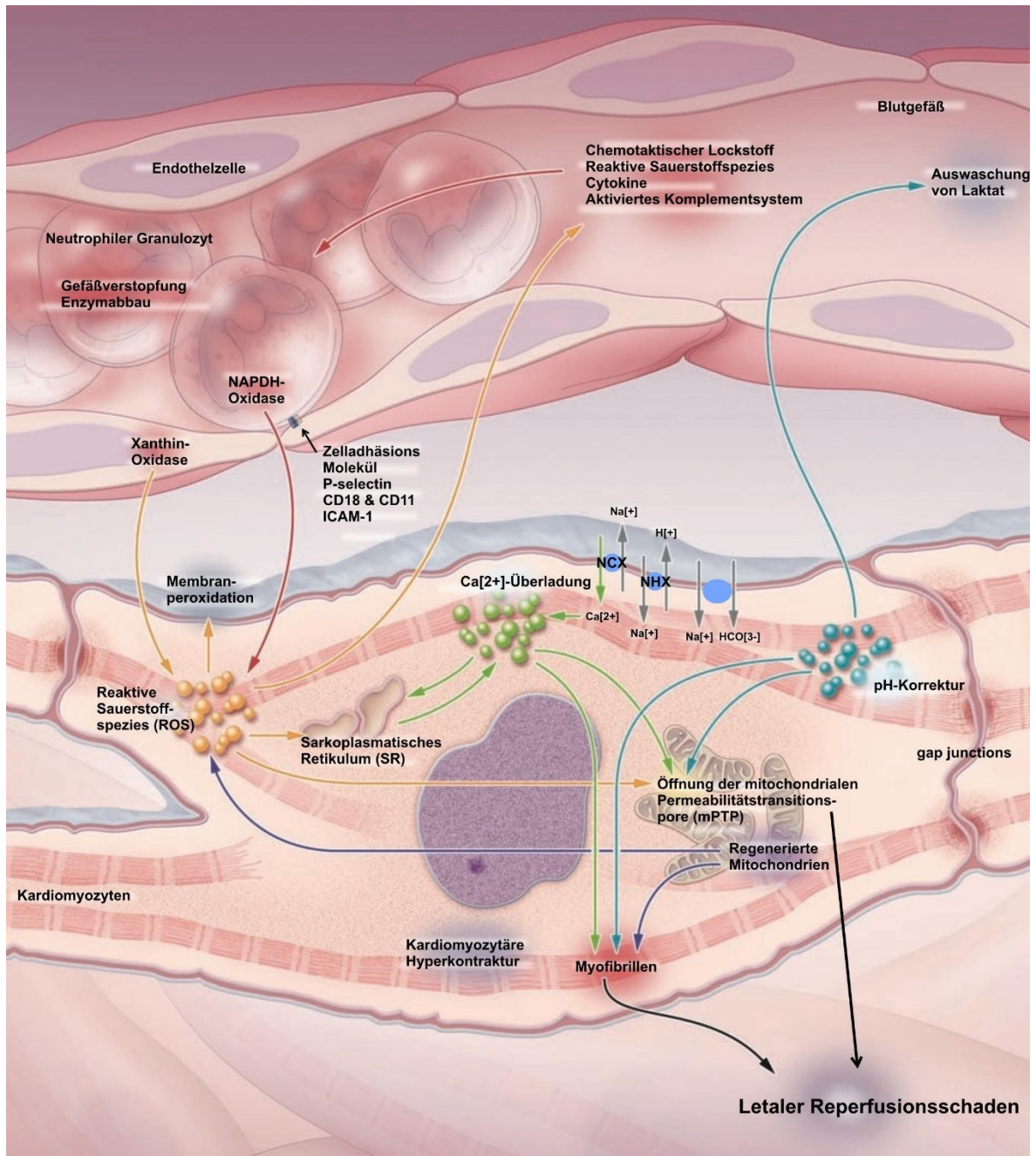


Abbildung 3: Mechanismen des myokardialen Reperfusionsschadens

Die Grafik stellt die biochemischen und metabolischen Veränderungen im postischämischen Kardiomyozyten dar. Hierzu zählen die Regeneration der Mitochondrien (lila), die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (orange), die schnelle pH-Korrektur durch Laktatauswaschung (türkis), die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung (hellgrün) und die Inflammation (rot). Diese Mechanismen interagieren miteinander und führen zum myokardialen Zelluntergang, indem sie die mitochondriale Permeabilitätsübergangspore (mPTP) öffnen und eine Hyperkontraktur verursachen. ROS werden in der Reperfusion durch die wiedereinsetzende oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien und die Xanthin-Oxidase der Endothelzellen gebildet. ROS wirken als chemotaktischer Lockstoff für neutrophile Granulozyten (Inflammation), welche durch die zelleigene NADPH-Oxidase ebenfalls ROS synthetisieren. ROS können direkten Zellschaden verursachen oder indirekt über eine Öffnung der mPTP die Zelle schädigen. Außerdem leiten sie eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ein, sodass es zu einem weiteren Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle kommt. Der verstärkte Austausch von H^+ gegen Na^+ mittels Na^+H^+ -Austauscher (NHX) zwecks pH-Ausgleich führt zu einem Anstieg des zellulären Na^+ . Dieses wird durch eine inverse Aktivität des $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) gegen Ca^{2+}

austauscht, weshalb es zu einer Verstärkung der Ca^{2+} -Überladung kommt. Diese führt bei Wiedereinsetzen der ATP-Synthese und pH-Normalisierung zu Zelluntergang durch Hyperkontraktionen. ROS und eine zelluläre Ca^{2+} -Überladung induzieren bei fehlender Inhibition durch einen sauren pH-Wert eine Öffnung der mPTP. Dieses führt zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und durch einem Protonen- und Flüssigkeitseinstrom final zur Zellschwellung und -ruptur.

Abbildung modifiziert nach Yellon et al. 2007 (29).

1.3 Formen der ischämischen Konditionierung zur Kardioprotektion

1.3.1 Die ischämische Präkonditionierung

Das Phänomen der ischämischen Konditionierung beschreibt einen endogenen Mechanismus, mit dem die Kardiomyozyten vor dem I/R-Schaden geschützt werden. Hierfür werden kurze, nicht-letale Ischämien ausgelöst, denen ebenfalls kurze Phasen der Reperfusion folgen. Wenn diese kurzen Ischämien und Reperfusionen vor, während oder nach einer langen Ischämie stattfinden, handelt es sich um ischämische Prä- (IPC), Per- oder Postkonditionierung (IPostC). Um einen ähnlichen protektiven Mechanismus zu erhalten, ist es außerdem möglich die kurzen Ischämiephasen auch an herzfernen Organen oder Geweben auszuführen. Dies wird *remote ischaemic preconditioning* (RIPC) genannt. Die Anzahl und Länge der Ischämien und Reperfusionen unterscheiden sich je nach Protokoll (30). Laut Iliodromitis et al. handelt es sich bei der IPC um einen der potentesten Mechanismen zum Schutz vor einem myokardialen Ischämieschaden (31). Ferner schützt die IPC vor einer postischämischen, kontraktilen Dysfunktion und reduziert I/R-induzierten Arrhythmien (32).

Erstmals wurde die IPC von Murry et al. im Jahre 1986 basierend auf ihren Beobachtungen an Hundeherzen beschrieben. Hierfür präkonditionierten Murry et al. die Herzen mit vier 5-minütigen Okklusionen des *Ramus circumflexus* der linken Koronararterie (LCA) mit anschließender Reperfusion von fünf Minuten. Auf diese Präkonditionierung folgte eine 40-minütige Ischämiephase (33). Murry et al. zeigten, dass die Infarktgröße der Interventionsgruppe nur 7,3% des myokardialen Gewebes ausmacht, lediglich ein Viertel des Infarktgebiets im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nicht nur in Hunden (33), wie von Murry et al. beschrieben, sondern auch in anderen Tierspezies (bspw. Schweinen, Affen, Schafen, Kälbern oder Nagetieren) inklusive des Menschen konnte ein Anhalt für kardioprotektive Wirkungen durch IPC, sei es durch eine direkte Infarktgrößenreduktion oder durch einen indirekten Nachweis mithilfe von Troponin oder anderen Biomarkern (30, 34, 35), demonstriert werden.

1.3.2 Weitere Formen der ischämischen Konditionierung

Neben der bereits beschriebenen IPC gibt es noch weitere, oben erwähnte Formen der ischämischen Konditionierung, welche hier jedoch zwecks der Übersichtlichkeit nur kurz umrissen werden. Der Einsatz der IPC ist limitiert, da die kardioprotektiven Mechanismen der IPC nur genutzt werden können, wenn die IPC-Zyklen definitionsgemäß vor der potentiell letalen Ischämie appliziert werden. Das Myokard kann lediglich bei geplanten Ischämiephasen (bspw. bei elektiven Interventionen) präkonditioniert werden. Um auch bei bereits ischämischen Herzen (bspw. bei einem akuten Myokardinfarkt) kardioprotektiv intervenieren zu können, beschrieben Zhao et al. im Jahr 2003 eine weitere Form der ischämischen Konditionierung: die IPostC. In ihrer Arbeit am Hundemodell folgte auf eine 60-minütige Ischämie eine Reperfusion von drei Stunden. Diese Reperfusion begann mit einer Intervention von drei Zyklen bestehend aus einer 30-sekündigen Reperfusion und anschließendem 30-sekündigen Verschluss des *Ramus interventricularis anterior* der LCA. In Bezug auf die Infarktgröße stellten Zhao et al. eine Reduktion von 44% fest (36). Durch den schnellen Wechsel von kurzen Reperfusionen und Ischämien zu Beginn der längeren Reperfusion ergaben sich Änderungen von Blutfluss und intrakoronarem Perfusionsdruck, welche zu einer Verringerung des Reperfusionsschadens führten. Dies wurde mit einer Nekroseverringerng, einer verminderten Creatin-Kinase- (CK-) und Laktatdehydrogenase- (LDH-) Aktivität sowie einer Reduktion von Gewebeödemen in Verbindung gebracht (36).

Eine weitere Form der ischämischen Konditionierung stellt die im Jahr 1993 von Przyklenk et al. erstbeschriebene RIPC dar. Mithilfe der RIPC wurden nicht nur Kardiomyozyten geschützt, die durch ihre Lage im arteriellen Stromgebiet direkt der IPC ausgesetzt waren, sondern es wurde auch entferntes (d.h. in einem anderen Stromgebiet liegend bzw. nicht im AAR), unbehandeltes Myokard vor dem I/R-Schaden bewahrt (37). Im Weiteren wurde auch gezeigt, dass nicht nur die myokardiale IPC, sondern auch die IPC von entfernten Organen und Geweben (bspw. Niere, Leber und Gehirn), natives Myokard schützte (30, 38). Dieser Schutz gegen den I/R-Schaden wurde ebenfalls durch eine IPC von Muskulatur am Oberarm oder Oberschenkel mittels nicht-invasiver Maßnahmen (bspw. durch die Benutzung einer Blutdruckmanschette) erreicht (39). Auch hier war, ähnlich der ursprünglichen ischämischen Konditionierung, eine ischämische Fernprä-, -per- und -postkonditionierung möglich (38).

1.4 Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung

1.4.1 Trigger-Phase

Im Jahr 2003 beschrieben Yellon und Downey die Begriffe Trigger, Mediatoren und Endeffektoren im Zusammenhang mit der IPC. Im Rahmen des IPC-Protokolls wurde der veränderte äußerliche Einfluss auf die Kardiomyozyten durch die IPC als Trigger gesehen. Der End-Effektor, als Folge mehrerer Signalkaskaden, war für die finale Protektion des Herzens verantwortlich. Alle Schritte zwischen Trigger und End-Effektoren beschrieben Yellon und Downey als Mediatoren (34).

Adenosin (40), Bradykinin (41) und Opioide (42) wurden von Yellon und Downey als endogene Triggersubstanzen bezeichnet, welche an spezifische G_i -Protein-gekoppelte-Rezeptoren (G_i -PCR) binden (43). Die Aktivierung der jeweiligen G_i -PCR bewirkte über spezifische Signalkaskaden die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (44, 45).

Opioide und Bradykinin, freigesetzt während der IPC-Zyklen, aktivierten mittels Matrix-Metalloproteinasen die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase, PI3K) (46), welche über nachgeschaltete Signalkaskaden durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (e-NOS) zu einer Produktion von endogenem Stickstoff (N_2) führten. Stickstoffmonoxid (NO) stimulierte die Guanylatzyklase (GC), mit der aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert wurde. cGMP stimulierte wiederherum die Proteinkinase G (PKG) (44). Ein weiterer Schritt in der IPC-Signalkaskade war die PKG-vermittelte Öffnung der mitochondrialen ATP-sensitiven K^+ -Kanäle (mK_{ATP}) (47). Diese befanden sich in der inneren Mitochondrienmembran (48). Durch die Öffnung der mK_{ATP} strömte K^+ in das Mitochondrieninnere, während H^+ dieses verließ. Es wurde angenommen, dass der H^+ -Ausstrom mittels der Komplexe I und/oder III zu einer verstärkten Bildung von ROS führte. Dies konnte jedoch lediglich bei anschließender Reperfusion und der damit verbundenen Reoxygenierung stattfinden. ROS konnte die PKC direkt aktivieren (43, 47). Anders als Opioide und Bradykinin konnte Adenosin die PKC ebenfalls direkt aktivieren und benötigte hierfür nicht PI3K, mK_{ATP} oder ROS. Adenosin band an den Adenosin- A_1 -Rezeptor, bei welchem es sich ebenfalls um einen G_i -PCR handelte; dieser führte zur PKC-Aktivierung (43).

1.4.2 Mediator-Phase

Zwei Signalwege mit besonderer Bedeutung für die Mediator-Phase sind der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)- und der *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)-Signalweg. Beide wirken kardioprotektiv durch Einflussnahme auf die Mitochondrien (Endeffektor).

Eine zentrale Rolle als Mediator nimmt der RISK-Signalweg ein, der durch die Adenosin_{2B}-Adenosinrezeptor (A_{2B}-AR)-Ligandenbindung während der Reperfusion aktiviert wurde (49). Die Aktivierung der PKC bewirkte nach Philipp et al. durch Phosphorylierung eine gesteigerte Affinität des A_{2B}-AR für endogenes Adenosin bei einer ursprünglich geringen Affinität (50). Nach Yang et al. führte das Sensibilisieren der A_{2B}-AR zu einer Aktivierung der *survival*-Kinasen, welche im Verlauf zu einer Hemmung der mPTP führten (44). Wichtige Schritte des RISK-Signalweges waren die PI3K-Akt und die p42/p44 *extracellular signal-regulated* Kinase 1 und 2 (Erk-1/2) (51). Hausenloy et al. publizierten 2005, dass durch eine Phosphorylierung dieser Kinasen während der Reperfusion die IPC-induzierte Kardioprotektion induziert wurde. Überdies zeigten sie, dass eine Inhibition dieser Phosphorylierung in der Frühphase der Reperfusion eine Aufhebung des IPC-induzierten Schutzes bewirkte (52). Der RISK-Signalweg initiierte mittels eNOS eine Produktion von N₂, welcher die Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β) phosphorylierte, wodurch diese inaktiviert wurde (43, 44).

Ein weiterer Signalweg in der Mediator-Phase ist der SAFE-Signalweg, erstbeschrieben durch Lecour et al. im Jahr 2009 (53). Die Bindung des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) an den TNF-Rezeptor Typ2 (TNFR2) führte zu einer Phosphorylierung der Januskinase (JAK). Dadurch wurde wiederum *Signal transducers and activators of transcription-3* (STAT-3) phosphoryliert. Lacerda et al. gingen im Weiteren davon aus, dass durch STAT-3 mittels Phosphorylierung auch GSK3 β inaktiviert wurde (54) und STAT-3 den Spiegel der ROS beeinflusste (55). Lecour et al. zeigten erstmals, dass so Kardioprotektion durch TNF- α unabhängig von den Kinasen Akt und Erk 1/2 aus dem RISK-Signalweg vermittelt werden konnte. Die TNF-induzierte und die klassische IPC bewirkten eine Phosphorylierung von STAT-3 und wirkten somit auf GSK3 β . Dies geschah RISK-unabhängig, sodass der SAFE-Signalweg nach Lecour et al. eine Alternative zum RISK-Signalweg darstellte (56). Beide wirkten auf den gleichen Endeffektor und wiesen bereits beschriebene Überschneidungen auf (57).

1.4.3 Endeffektoren

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erläutert, stellten die mPTP eine wichtige Zielstruktur im Rahmen der Kardioprotektion durch IPC dar. Nach bisherigen Erkenntnissen wurde den mPTP somit eine entscheidende Rolle als Endeffektor des RISK- (58, 59) und SAFE-Signalweges zugesprochen (60). Die beiden oben beschriebenen Signalwege führten zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung der GSK3 β . Die Inaktivierung der GSK3 β verhinderte die Öffnung der mPTP während der Reperfusion (44, 61).

1.5 Der Transfer von ischämischer Präkonditionierung

Die RIPC-induzierte Kardioprotektion wird den humoralen Faktoren, welche durch den ischämischen Reiz ins Blut freigesetzt werden, zugeschrieben (62). Dickson et al. publizierten, dass sich die protektiven Effekte der IPC mittels einer Blutaustauschtransfusion von einem präkonditionierten Donor-Tier (PD-Tiere) auf ein nicht-präkonditioniertes Akzeptor-Tier (PA-Tiere) transferieren lassen (63). Nicht nur die Infarktgrößen der PD-Tiere waren signifikant kleiner als die Infarktgrößen der Kontrollgruppe, sondern auch bei den PA-Tieren war eine signifikante Reduktion des Infarktgewebes messbar (63). Fernerhin präsentierten Dickson et al. in einer weiteren Publikation, dass Fernprotektion durch einen humoralen Trigger, freigesetzt in das Koronareffluat, initiiert wurden. Eine Applikation von IPC-Effluat bewirkte in Nativherzen eine mit IPC-Herzen vergleichbare Kardioprotektion (64).

In den nachfolgenden Jahren untersuchten mehrere Forschungsgruppen, welche Signalwege durch die Applikation des Effluats aktiviert werden. Huffman et al. demonstrierten 2008 erstmals die Beteiligung des JAK-STAT-Signalweges (d.h. SAFE-Signalweg) (65). Breivik et al. postulierten hingegen, dass das IPC-Effluat seinen kardioprotektiven Einfluss über den PI3K/Akt-abhängigen RISK-Signalweg vermittelt, indem es durch die präischämische Applikation von IPC-Effluat zu einer Erhöhung der Akt-Phosphorylierung kommt (66). Nach Skyschally et al. ist die Signaltransduktion jedoch stark spezieabhängig. Beispielsweise interagieren der RISK- und der SAFE-Signalweg in Rattenherzen sehr ausgeprägt, sodass eine Blockierung eines Signalweges die protektive Wirkung beider aufhebt (67).

Neben der Untersuchung der durch Effluat angestoßenen Signalwege wurden die humoralen Faktoren detaillierter untersucht. Serejo et al. erläuterten, dass es sich bei den potentiellen humoralen Faktoren um thermolabile, hydrophobe und proteinartige Stoffe mit einem

Molekulargewicht von mehr als 3,5 kDa handelt. Sie schlossen so unter anderem Adenosin (267,24 Da), Opioiden (500-800 Da) und Bradykinin (1060,22 Da) als humorale Faktoren aus. Das Molekulargewicht des möglichen kardioprotektiven Faktors wurde zwischen 3,5 und 8 kDa angenommen (68). Durch das Einfrieren und das anschließende Auftauen der humoralen Faktoren wurden ihre kardioprotektiven Eigenschaften nicht aufgehoben (62). Breivik et al. vermuteten die Masse der humoralen Faktoren unter bzw. nah an 30 kDa (66). Maciel et al. war es möglich zu demonstrieren, dass die humoralen Faktoren in zwei Fraktionen des koronaren Effluats vorliegen: einer mit einer Masse von <3 kDa und einer zweiten mit einer Masse zwischen 5 und 10 kDa. Beide wirkten kardioprotektiv durch Infarktgrößenreduktion (69). In der zweiten Gruppe wurden mit 14 Peptiden potentielle Kandidaten als Mediatoren identifiziert, unter anderem das HSP10-Protein (69).

1.6 Das isolierte Herz nach Langendorff

Die noch heute verwendete, jedoch modifizierte Methode zur isolierten Perfusion eines Säugtierherzens geht auf den Physiologen Oscar Langendorff zurück, welcher 1895 erstmals seinen Versuchsaufbau beschrieb (70).

In Langendorffs Versuch wurde ein Tier, dessen Herz zur Entnahme bestimmt war, mit Chloroform sediert. Der Tod trat durch ein gezieltes Verbluten aus den Karotiden ein. Anschließend wurde eine Kanüle so in die *Aorta ascendens* eingeführt, dass ihre Spitze zwischen den Taschen der Aortenklappe und dem Abgang des *Truncus brachiocephalicus* platziert wurde. Somit fand eine Perfusion entgegen der physiologischen Flussrichtung statt. Ein Injektionsdruck, der dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) der Versuchstierspezies entspricht, führte zu einem Verschluss der aortalen Semilunarklappen. Hierdurch blieb der Ventrikel zur Aorta hin verschlossen. Das injizierte Perfusat konnte somit nur in die Koronararterien fließen. Von dort gelangte es in physiologischer Weise über den *Sinus coronarius* in den rechten Vorhof. Dort verließ es ohne Widerstand das Herz als Ausfluss an der Stelle, an der *in vivo* die *Venae cavae* in den rechten Vorhof mündeten. Bei Langendorff handelte es sich bei dem Perfusat um Blut, welches durch Verbluten aus den Karotiden gewonnen, defibriniert, durch Glaswolle filtriert und gewärmt wurde (71).

Durch diesen Versuchsaufbau ist es möglich, die Physiologie des Herzens ohne Einflüsse anderer Organe, des Körperkreislaufes oder neurohumoraler Faktoren zu untersuchen (72). Somit bieten isoliert-perfundierte Herzen einen validen Prüfstand für Studien zu

metabolischen oder pharmakologischen Interventionen (72). Außerdem können leicht pathologische Zustände durch Sauerstoffentzug (Anoxie, verschiedene Schweregrade der Hypoxie), Veränderungen des Durchflusses oder des Injektionsdrucks hergestellt werden, sodass das Langendorff-Modell bis heute noch immer in der Grundlagenforschung eingesetzt wird (72, 73).

Der hier beschriebene Aufbau bezieht sich auf den von Oscar Langendorff durchgeführten Versuchsaufbau. Für die hier vorliegende Arbeit wurde dieser in modifizierter Weise verwendet. Dies ist im Kapitel 2.2 erläutert und illustriert.

1.7 Ziele der Arbeit

Seit der Erstbeschreibung im Jahr 1986 gilt die IPC als einer der stärksten endogenen Mechanismen zur Kardioprotektion. Die Kardioprotektion wird durch humorale Faktoren vermittelt, welche im Rahmen des Transfers von Effluat auch in nativen Herzen kardioprotektiv wirken können. Die Zusammensetzung der humoralen Faktoren und die induzierten Signalwege konnten bis heute nicht endgültig geklärt werden. Da in den Publikationen von Dickson et al. ausschließlich gepooltes Effluat aus mehreren IPC-Zyklen verwendet wurde, konnte bis heute auch kein möglicher Unterschied in den kardioprotektiven Eigenschaften von Effluat einzelner IPC-Zyklen gezeigt werden. Deshalb soll in dieser Arbeit der Fokus auf dem unterschiedlichen Ausmaß der Kardioprotektion in Abhängigkeit der durchlaufenen IPC-Zyklen liegen.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit folgenden Fragen:

1. Induziert transferiertes IPC-Effluat aus Donor-Herzen eine Infarktgrößenreduktion in unbehandelten naiven Herzen?
2. Unterscheidet sich die kardioprotektive Potenz des transferierten Effluats (EIPC1, EIPC2, EIPC3) abhängig vom Abnahmezeitpunkt oder ist die kardioprotektive Wirkung von IPC-Effluat bereits nach einem einzelnen Präkonditionierungszyklus maximal?

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Unter der Referenznummer O27/12 (Datum: 05/2012) lag eine Anzeigengenehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT, Leiter: Prof. Dr. Sager) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) vor. Basierend auf dieser Genehmigung wurden für die experimentellen Versuche 20 männliche Wistar-Ratten (Fa. Janvier, Laval, Frankreich), welche zu Versuchsbeginn ein Alter von zwei bis drei Monaten und ein Körpergewicht von 250g bis 350g hatten, verwendet. Die Versuchstiere wurden regelmäßig tierärztlich begutachtet. Für die Versuche wurden ausschließlich gesunde Tiere verwendet.

Den Tieren wurde nach ihrem Eintreffen in der ZETT bei einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus mindestens acht Tage Zeit zur Akklimatisation gegeben. Die Räume waren spezifisch-pathogenfrei (SPF) und wurden konstant klimatisiert, sodass eine Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ erreicht wurde. Die Wistar-Ratten wurden zu drei bis fünf Tieren in einem Käfig auf Cosypet®-Einstreu (Fa. JELU-WERK, Josef Ehrler GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) gehalten. Als Futtermittel wurde den Tieren Alleinfuttermittel zur Mauszucht (energiereich, 10mm Pellets, autoklavierbar; Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum* gereicht. Überdies wurde entkeimtes und angesäuertes Wasser *ad libitum* eingesetzt. Ein pH-Wert von 3 wurde mittels Zugabe von Salzsäure erreicht.

2.1.2 Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP)

Die isolierten Rattenherzen wurden retrograd mit einem modifizierten Bicarbonat-Puffer nach Krebs und Henseleit perfundiert, welcher in seiner Zusammensetzung das Blutplasma imitierte. Der Puffer wurde täglich frisch aus *Aqua bidestillata* und den unten genannten Chemikalien (siehe Tabelle 1) hergestellt. Während der Experimente wurde der Puffer konstant auf 37°C gewärmt und kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) versetzt, sodass sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die korrekte Zusammensetzung wurde mittels Blutgasanalyse (BGA) vor Verwendung überprüft.

Substanz	Summenformel	Menge [g] pro 5l	Molekülmasse (M) [g/mol]	Molarität [mM]
Natriumchlorid	NaCl	34,48	58,44	118
Kaliumchlorid	KCl	1,751	74,55	4,7
Magnesiumsulphatheptahydrat	MgSO ₄ +7 H ₂ O	1,479	246,48	1,2
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	0,817	136,09	1,2
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	10,501	84,01	25
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,731	292,2	0,5
Glucose (D(+)-Glucose)	C ₆ H ₁₂ O ₆	9,909	180,16	11
Laktat (L(+)-Natriumlactate)	C ₃ H ₅ NaO ₃	0,561	112,1	1
Calciumchlorid	CaCl ₂	1,249	110,99	2,52

Tabelle 1: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers

l = Liter; g = Gramm; mol = Mol; mM = Millimolar

2.1.3 Medikamente

Nachfolgend wurden die eingesetzten Medikamente dargestellt. Es wurde aus diesen Medikamenten eine gewichtsadaptierte Injektionslösung zur intraperitonealen (i.p.) Applikation hergestellt. Dies wird im Folgenden in Kapitel 2.2.1 erläutert. Die Lösung wirkte sedierend und antikoagulatorisch. Das NaCl diente als Trägerlösung.

Heparin-Natrium (25.000 I.E./ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 2047217
Pentobarbital (16g/100ml)	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Ingelheim am Rhein, Deutschland Artikelnr. 798-594
NaCl 0,9% Isotonische Kochsalzlösung 500ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH Bad Homburg, Deutschland Artikelnr.: B23042A

Tabelle 2: Medikamente

I.E. = Internationale Einheit; ml = Milliliter; g = Gramm

2.1.4 Chemikalien

Zur Herstellung des modifizierten KHP aus Kapitel 2.1.2 wurden die nachstehenden Chemikalien verwendet und in den zuvor beschriebenen Mengenverhältnissen vermischt. Zudem wurden die nachstehenden Chemikalien zur Herstellung des Redox-Farbstoffes Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC), des Trishydroxymethylaminomethan-(TRIS)-Puffers und der Fixierlösung auf Formaldehydbasis (siehe Kapitel 2.2.6) genutzt. Um den pH-Wert aus Kapitel 2.2.6 einzustellen, wurde das pH-Meter mit zwei Pufferlösungen kalibriert.

Natriumchlorid (NaCl)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 27810.295
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1049360500
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO₄+7 H₂O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: P027.1
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 104873
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 8551.1
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 8040.3
Glucose (D(+)-Glucose)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: A997.2
Laktat (L(+)-Natriumlactate)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: A1004.0100
Calciumchlorid (CaCl₂)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1023780500
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Summenformel: C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄ Molekulargewicht: 334,79 g/mol	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 37130.02
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) Summenformel: C ₄ H ₁₁ NO ₃ Molekulargewicht: 121,14 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: 5429.3
Formaldehyd 37% (Formaldehydlösung)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1.04002.2500
Salzsäure 37%	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnr.: 1000321Z324416
Pufferlösung pH 4,01	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG Weilheim, Deutschland Artikelnr.: 108700
Pufferlösung pH 7,00±0,02	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Artikelnr.: P713.1

Tabelle 3: Chemikalien

g = Gramm; mol = Mol

2.1.5 Gase

Zur Oxygenierung des KHP wurde diesem Carbogen über eine Glasfritte zugeführt (siehe Kapitel 2.2.2). Das enthaltene Kohlenstoffdioxid diente der Einstellung des pH-Werts auf 7,4 bei einer Temperatur von 37°C. Um einen Kontakt mit dem Sauerstoff aus der Raumluft zu vermeiden, wurde das Herz während der Globalischämie in mit Stickstoff begastem KHP eingelegt (siehe Kapitel 2.2.3).

Carbogen 5% Kohlendioxid (CO ₂), 95% Sauerstoff (O ₂)	Carbogen Lab Linde AG, Pullach, Deutschland
Stickstoff (N₂) Reinheit ≥99,999%	Stickstoff 5.0 Linde AG, Pullach, Deutschland

Tabelle 4: Gase

2.1.6 Geräte

Nachstehend wurden die Geräte aufgeführt, welche im Rahmen der Versuchsdurchführung genutzt wurden. Diese erstreckten sich von der Herstellung des KHP (siehe Kapitel 2.1.2), über die Präparation der Versuchstiere (siehe Kapitel 2.2.1) und die Herstellung der TTC-Färbelösung (siehe Kapitel 2.2.6) bis zur planimetrischen Auswertung der Herzscheiben (siehe Kapitel 2.2.6).

Kleintierguillotine	UGO BASILE S.R.L. Biological Research Apparatus, Comerio VA, Italien Modell 7950, Serien-Nr.: 04501212070
Blutgasanalysegerät	ABL800 FLEX Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland Artikelnr.: 989-963
Präzisionswaage Wägebereich 230g, Ablesbarkeit 0,1mg	LA 230S Analysenwaage Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Artikelnr.: 33313
Laborwaage Wägebereich 200g, Ablesbarkeit 0,01g	Scout Pro SPU202 Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA Artikelnr.: 10162802
Präzisionswaage Wägebereich 1000g, Ablesbarkeit 0,1g	KERN 440-45N KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Magnet-Heizrührer	MR Hei-Tec Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland Artikelnr.: HEID_10002
pH-Meter	Digital pH-Meter 646 Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland Artikelnr.: 162222028856
pH-Meter-Sensor	In-Lab® Expert pro-ISM Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland Artikelnr.: 30014096
Digitalthermometer	GTH 1160 Digitalthermometer Greisinger electronic, Regenstauf, Deutschland
Skalpellgriff	Skalpellgriff, 135mm, Nr. 4, unsteril, wiederverwendbar B. Braun AESCULAP AG, Tuttlingen, Deutschland Artikelnr.: BB084R

Flachbettscanner	CanoScan LiDE700F Canon, Krefeld, Deutschland
-------------------------	--

Tabelle 5: Geräte

g = Gramm; mg = Milligramm; mm = Millimeter

2.1.7 Langendorff-Anlage

Die für diesen Versuchsaufbau verwendete Langendorff-Anlage wurde in Kapitel 2.2.2 beschrieben und in Abbildung 4 dargestellt. Nachfolgend wurden die einzelnen Bestandteile der Langendorff-Anlage aufgeführt.

Spritzenpumpe	Perfusor® Space B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 8713030
Spritzenpumpe	Perfusor® fm B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 8713820
Schlauchpumpe	MINIPULS 3 Peristaltic Pumps Gilson International B.V., Limburg (Lahn), Deutschland Artikelnr.: GFAM00051
Aufsatz für Schlauchpumpe	Pump Head, R2 Two Channel Gilson International B.V., Limburg (Lahn), Deutschland Artikelnr.: F117800
Schlauch für Schlauchpumpe	Tubing, 3.18 mm I.D. PVC, Black/ White Gilson International B.V., Limburg (Lahn), Deutschland Artikelnr.: F117949
Umwälzthermostat	Julabo ME-6 Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland Artikelnr.: 9162506
Offener Wasserbaderhitzer	Julabo EC-5 Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad	GFL Wasserbad Typ 1001 Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Burgwedel (ehemals H-Vinnhorst), Deutschland Artikelnr.: 10386177
Laborglasflasche 5000ml	DURAN® Protect Laborflasche 5000ml DWK Life Sciences GmbH, Wertheim (M), Deutschland Artikelnr.: 21 805 73 57
Laborglasflasche 2000ml	DURAN® Original Laborflasche DWK Life Sciences GmbH, Wertheim (M), Deutschland Artikelnr.: 21 801 63 57
Laborglasflasche 500ml	DURAN® Original Laborflasche DWK Life Sciences GmbH, Wertheim (M), Deutschland Artikelnr.: 21 801 44 59

Perfusatschlauch ID: 6,0mm; OD: 9,0mm; Wall: 1,5mm	TYGON, Flexible plastic tubing Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: ACF1S1504-C
Perfusatschlauch ID: 5,0mm; OD: 8,0mm; Wall: 1,5mm	Tube VERSILIC 5x8 mm Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich Artikelnr.: 760420-10
Druckaufnehmer	BP Transducer/Cable Kit AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich Artikelnr.: MLT1199
Brückenverstärker	Bridge Amp AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich Artikelnr.: FE221-1255
PowerLab	PowerLab 4/26 AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich
Brückenverstärker	Bridge Amp ML110 AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich Artikelnr.: 5480
PowerLab	PowerLab 8/30 AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich
Metall-Dreiwegehahn	neoLab Metall-Dreiwegehahn m. LL-Anschlüssen neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 26286
Metall-Aortenkanüle OD: 2,0mm	Aortic Metal Cannula with Luer Taper for Small Rat Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA Artikelnr.: 73-2868

Tabelle 6: Langendorff-Anlage

ml = Milliliter; mm = Millimeter

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Während der Versuchsdurchführung wurden verschiedene Verbrauchsmaterialien benötigt, bei welchen es sich zumeist um Einwegartikel aus dem klinischen Alltag handelte.

Fäden	Nicht resorbierbare Polyesterfäden Für den Veterinärmedizinischen Gebrauch Resorba, Nürnberg, Deutschland, Artikelnr.: 3252321
Dreiwegehahn	Discofix® C B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 16494 C
Spritzen 1ml	Omnifix®-F Luer Solo 1 ml Luer-Lock B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 9161406V
Spritzen 2ml	Injekt® Luer Solo 2ml B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4606027V

Spritzen 3ml	Omnifix® Luer Lock Solo 3ml B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4617022V
Spritzen 20ml	Omnifix® Luer Solo 20ml B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4617207V
Infusionspumpe-Leitung Innendurchmesser: 1,0mm, Länge 150cm	Original Perfusor® Line, Type IV-Standard-PE B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 8722935
Verschlussknoten, rot für Luer-Lock	Combi-Stopper B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4495101
Verschlussknoten, blau für Luer-Lock	Combi-Stopper B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4495152
Kanülen 23G Durchmesser 0,6mm, Länge: 30mm	Sterican® Einmalkanülen Gr. 14 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4657640
Kanülen 20G Durchmesser: 0,9mm, Länge: 40mm	Sterican® Einmalkanülen Gr. 1 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4657519
Kanülen 18G Durchmesser 1,2mm, Länge: 40mm	BD Blunt Fill Sicherheitsaufziehkanüle Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikelnr.: 303129
Skalpellklingen, Figur 21	Carbon Steel Skalpellklingen #21 B. Braun AESCULAP AG, Tuttlingen, Deutschland Artikelnr.: BB521
Aufziehkanüle	Mini-Spike® mit 0,45 µm BelüftungsfILTER B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Artikelnr.: 4550242
Röhre 15ml	Röhre 15ml, 120x17mm, PP Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Artikelnr.: 62.554.002
Röhre 50ml	Röhre 50ml, 114x28mm, PP Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Artikelnr.: 62.547.254
Kompresse	ES-Kompressen, 10x10 cm Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland Artikelnr.: 4078354
Rollenpflaster	Leukoplast® wasserfest, 5cm x 5m BSN medical, Hamburg, Deutschland Artikelnr.: 02324-00
Kabelbinder	SELFIT, 100x2,5 mm, Ø 2-24mm, rot SapiSelco s.r.l., Saonara (PD), Italien Artikelnr.: SEL.10.202R

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

ml = Milliliter; mm = Millimeter; cm = Zentimeter; G = Gauge; µm = Mikrometer; m = Meter

2.1.9 Software

Zur Aufzeichnung der hämodynamischen Daten wurde die Software „LabChart 8“ (siehe Kapitel 2.2.2) und für die planimetrische Auswertung die Software „Sigma Scan® Pro 5“ (siehe Kapitel 2.2.6) verwendet.

LabChart 8	LabChart® 8 AD Instruments Ltd, Oxford, Vereinigtes Königreich
Planimetrie-Software	Sigma Scan® Pro 5 Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Tabelle 8: Software

2.2 Methodik

2.2.1 Präparation der Rattenherzen

Die Untersuchung des kardioprotektiven Effekts von Effluat aus isolierten, ischämisch präkonditionierten Rattenherzen erfolgte mittels einer Langendorff-Anlage an ebenfalls isolierten, aber nativen Rattenherzen.

Den Versuchstieren wurde zur Sedierung eine gewichtsadaptierte Dosis von 80 mg/kg Pentobarbital und zur Antikoagulation 5000 I.E. Heparin injiziert. Als Trägerlösung fungierten 1,8 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung. Nach der intraperitonealen Injektion entfaltete die Narkose innerhalb von fünf Minuten ihre volle Wirkung. Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde mittels eines akustischen Reizes überprüft. Nach Ablauf der fünf Minuten und dem vollständigen Versiegen der tierischen Reflexe wurde das Versuchstier mithilfe einer Guillotine dekapitiert und der Thorax durch eine mediane Thorakotomie entlang des linken Randes des Sternums mittels Schere und Rippenspreizer eröffnet. Das Herz wurde von der Aorta, den weiteren Gefäßen und dem umliegenden Gewebe an der Herzbasis abgesetzt und aus dem Thorax geborgen.

Um eine ungewollte Luftembolie der Koronargefäße zwischen Exzision und dem Anbringen an der Langendorff-Anlage zu vermeiden, wurde das exzidierte Herz zur Überführung in ein Becherglas mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung getaucht.

2.2.2 Isolierte, retrograde Perfusion an der Langendorff-Anlage

Das Rattenherz wurde im Anschluss an die Präparation am Aortenstumpf gegriffen und mit diesem an der Aortenkanüle der Langendorff-Anlage (siehe Abb. 4) durch einen chirurgischen Knoten fixiert. Die Zeit zwischen Dekapitation und nun folgender Reperfusion, die sogenannte Dekapitations-Reperfusions-Zeit (DPZ), sollte bei allen Tieren konstant und kurz gehalten werden, um eine ungewollte Präkonditionierung in dieser Phase zu vermeiden. Die DPZ überschritt drei Minuten nicht.

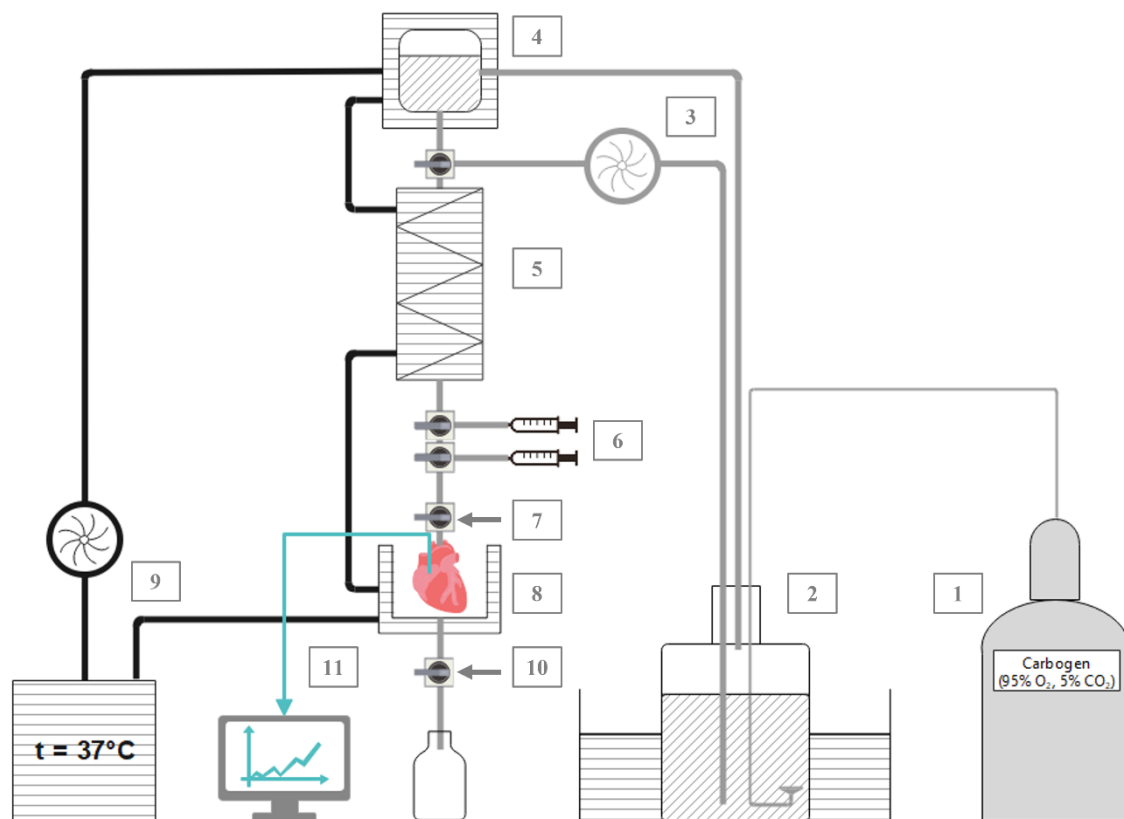


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Langendorff-Anlage

Hier zu sehen ist der schematische Aufbau der im Versuch verwendeten Langendorff-Anlage (nicht maßstabsgerecht): Der mit Carbogen (1) versetzte und im Wasserbad auf 37°C erwärmte Krebs-Henseleit-Puffer (2) wurde mittels einer Rollerpumpe (3) angesaugt und in die Langendorff-Anlage gepumpt. Über die in der Langendorff-Anlage entstehende Wassersäule wurde ein konstanter Druck von 80 mmHg erzeugt. Angesaugte Luftblasen entwichen über einen Luftfänger (4). Mittels eines Wärmetauschers (5) wurde der Puffer auch in der Anlage konstant auf 37°C gewärmt. Zwei Perfusoren (6) ermöglichten die kontinuierliche Applikation von Substanzen. Die Perfusion des Versuchsherzes wurde über einen Dreiwegehahn (7) an der Aortenkanüle gesteuert. Vor der Auskühlung durch die Umgebungsluft schützte ein Wärmeschild (8) das Herz. Für die Erwärmung des Luftfängers, des Wärmetauschers und des Wärmeschildes stand ein zweiter Warmwasserkreislauf mit einer Pumpe (9) zur Verfügung. Durch einen weiteren Dreiwegehahn (10) wurde der Abfluss des Effluats aus dem Wärmeschild gesteuert. Die hämodynamischen Daten wurden mittels eines im linken Ventrikel steckenden Druckaufnehmers gemessen und über eine PowerLab-Station digital aufgezeichnet (11).
Eigene Abbildung.

Durch die Langendorff-Anlage konnte nun eine druckkonstante, retrograde Perfusion gewährleistet werden. Der Druck, welcher von der Flüssigkeitssäule in der Langendorff-Anlage erzeugt wurde, simulierte den MAP und betrug 80mmHg. Durch diesen Druck schlossen sich die Aortenklappen und die Perfusion der Koronargefäße wurde sichergestellt. Zur Zufuhr der Pufferlösung in das Schlauchsystem der Langendorff-Anlage wurde eine peristaltischen Rollerpumpe (siehe Abb. 4, Nr. 3) verwendet. Als Perfusat diente der modifizierte KHP (siehe Kapitel 2.1.2), welcher in einem Wasserbad (siehe Abb. 4, Nr. 2) auf 37°C erwärmt und zur ausreichenden Oxygenierung kontinuierlich mit Carbogen (200 ml/min, siehe Abb. 4, Nr. 1) angereichert wurde. Vor Versuchsbeginn wurde seine Zusammensetzung mittels einer BGA kontrolliert. Durch das Erwärmen und das Zufügen von Carbogen wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Auch außerhalb des Pufferreservoirs wurde der Puffer mithilfe einer doppelwandigen Wärmekammer (siehe Abb. 4, Nr. 4), welche zugleich als Luftfänger diente, eines Wärmetauschers (siehe Abb. 4, Nr. 5) und eines doppelwandigen Wärmeschildes (siehe Abb. 4, Nr. 8), mit welchem das Herz vor einer Auskühlung durch die Raumluft geschützt wurde, kontinuierlich erwärmt. Diese Glasarmaturen wurden mittels einer Pumpe und eines offenen Wasserbaderhitzers (siehe Abb. 4, Nr. 9) mit erwärmtem Wasser (37°C) umspült.

Unmittelbar nach der Fixierung des Herzens an der Aortenkanüle und der sofortigen Reperfusion wurde ein Druckmesser (siehe Abb. 4, Nr. 11) in den linken Vorhof eingebracht. Hierfür wurde das linke Herzohr eröffnet und durch die entstandene Öffnung ein kleiner Katheter durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben. An der Spitze des Katheters befand sich ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Ballon. Über den Katheter bestand eine Verbindung zwischen dem Ballon und dem Druckaufnehmer. Das Volumen des Ballons war über einen zwischen Druckaufnehmer und Ballon befindlichen Dreiwegehahn mittels einer mit NaCl gefüllten Spritze veränderbar (aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 4 stark vereinfacht dargestellt). Zum Einsetzen wurde das Volumen des Ballons auf ein Minimum reduziert. Sobald sich die Katheterspitze im Ventrikel befand, wurde das Volumen des Ballons so vergrößert bis sich ein frühdiastolischer linksventrikulärer Druck (LVP_{min}) von 3-5 mmHg eingestellt. Die Zeit zwischen dem Beginn der retrograden Perfusion und dem Einbringen und korrekten Einstellens des Druckmessers in den linken Ventrikel wurde gemessen und als Ballonplatzierungszeit (BPZ) erfasst. Diese war nicht größer als fünf Minuten. Der Druckaufnehmer (ähnlich dem Druckaufnehmer einer arterielle Blutdruckmessung oder zur Messung des zentralvenösen Blutdruckes) war mit einem

PowerLab®-Modul der Firma ADInstruments verbunden, mit welcher eine Aufzeichnung und graphische Darstellung der mechanischen Herzaktivität im Programm LabChart® (AD-Instruments) sichergestellt wurde.

Der KHP, welcher durch die Langendorff-Anlage dem Herzen zugeführt wurde, durchströmte die Koronargefäße und verließ das Herz am Koronarvenensinus als koronares Effluat. Durch ein Ablassventil im Wärmeschild (siehe Abb. 4, Nr. 10), welches das Herz umgab, war ein Sammeln und anschließendes Wiegen des Effluats während des gesamten Versuchs zu festdefinierten Zeitpunkten möglich. Hierdurch wurde der momentane Koronarfluss des Herzens exakt ermittelt. Grundsätzlich wurde der für die Perfusion verwendete KHP nach einmaliger Verwendung verworfen.

Kurz vor der Aortenkanüle wurden zwei Dreiwegehähne angebracht, wodurch mittels zweier Spritzenpumpen (siehe Abb. 4, Nr. 6) Medikamente oder andere (ver-)flüssige Substanzen in den koronaren Kreislauf appliziert werden konnten. Jene Medikamente oder Substanzen wurden so in Hinblick auf ihren Einfluss auf die Kardioprotektivität in der Langendorff-Anlage einer Untersuchung unterzogen.

Zu fest definierten Zeitpunkten in der Einpendelungs- und Reperusionsphase wurden der Koronarfluss gemessen und die hämodynamischen Parameter erhoben, welche zur statistischen Auswertung mit aufgenommen wurden.

Die Herzfrequenz, der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVP_{max}), der LVP_{min} , die linksventrikuläre Druckdifferenz (LVDP), die linksventrikuläre Kontraktionsgeschwindigkeit (dP/dt_{Max}), die linksventrikuläre Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt_{Min}), der Koronarfluss (CF) und das *Rate Pressure Product* (RPP) wurden als hämodynamische Parameter betrachtet. Nicht mit in die Auswertung aufgenommen wurden arrhythmische Herzaktionen und Artefakte.

Als Ausdruck des myokardialen Schadens wurde die linksventrikuläre ischämische Kontraktur gewertet. Der maximale Druck (in mmHg), mit dem sich die ischämische Kontraktur darstellte, und der zugehörige Zeitpunkt (in Minuten ab Versuchsbeginn) wurde im Programm LabChart® gemessen und ausgewertet.

2.2.3 Induktion einer globalen Ischämie am isolierten Langendorff-Herzen

Zur Induktion der IPC wurde der Zufluss des KHP aus der Langendorff-Anlage zum Herzen unterbrochen, indem der Dreiwegehahn an der Aortenkanüle (siehe Abb. 4, Nr. 7) verschlossen wurde. Das doppelwandige Wärmeschild (siehe Abb. 4, Nr. 8) wurde mit auf 37°C temperiertem und mit Stickstoff begastem KHP (Ischämiepuffer) gefüllt. Dieser wurde vor der Ischämie in einem Vorratsbehälter und während der Ischämie in dem Wärmeschild mit Stickstoff versetzt, um das Einwirken von Sauerstoff aus der Raumluft zu unterbinden. Damit der Ischämiepuffer im Wärmeschild verblieb, wurde der Dreiwegehahn (siehe Abb. 4, Nr. 10) unterhalb des Wärmeschildes verschlossen.

2.2.4 Gewinnung von Kontroll- und IPC-Effluat aus Rattenherzen

Das koronare Effluat wurde zu den unten genannten Zeitpunkten gesammelt (siehe Abb. 5). Während der Reperfusion, welche sich an jeden IPC-Zyklus anschloss, wurde es aus dem *Sinus coronarius* der Herzen aufgefangen. Dieses Effluat wurde fortan als IPC-Effluat (E_{IPC1} , E_{IPC2} , E_{IPC3}) bezeichnet. In den fünf Minuten vor dem ersten IPC-Zyklus wurde Effluat des bis dahin nicht ischämisch präkonditionierten Herzens gewonnen, welches die Kontrollgruppe (Con) bildete.

Die Versuchsherzen durchliefen nach der Fixierung an der Aortenkanüle eine 20-minütige Einpendelungsphase, in welcher sich das Herz an die Bedingungen der Langendorff-Anlage anpasste. In den letzten fünf Minuten der Einpendelungsphase wurde das Con-Effluat der Herzen mithilfe eines gereinigten Becherglases aufgefangen. Es wurde darauf geachtet, dass der Ausfluss des Herzens in der Reperfusion vollständig und ohne Verunreinigungen aufgefangen wurde.

Im Anschluss an die Einpendelungsphase durchliefen die Herzen eine 30-minütige Phase der ischämischen Präkonditionierung (siehe Abbildung 5). Diese Phase begann mit einer 5-minütigen Ischämie (IPC1), in der der Zufluss mit KHP komplett unterbrochen wurde (Globalischämie). Während der Ischämie wurde das Wärmeschild mit Ischämiepuffer (siehe Kapitel 2.2.3) gefüllt.

Mit Ablauf der fünf Minuten wurde der Ischämiepuffer aus der Wärmekammer abgelassen und es schloss sich eine 5-minütige Reperfusion an, in der das Herz wieder mit oxygeniertem KHP aus der Langendorff-Anlage versorgt wurde. Das Effluat aus der ersten Reperfusion (E_{IPC1}) wurde mit einem gereinigten Becherglas über die gesamten fünf Minuten der Reperfusion hinweghin gesammelt, ohne dabei Verunreinigungen mitaufzufangen. Zu

Verunreinigungen zählten beispielsweise auch Beimengungen des Ischämiepuffers. Um diese zu verhindern, wurde der Ischämiepuffer 10 Sekunden vor Ablauf der 5-minütigen Ischämiephase aus der Wärmekammer abgelassen, damit zu Beginn der Reperfusion der Puffer vollständig abgeflossen war. Dieser Zyklus von Ischämie und Reperfusion mit Effluatgewinnung wurde zwei weitere Male wiederholt (IPC2 mit E_{IPC2} , IPC3 mit E_{IPC3}). Die Effluat wurden jeweils nach der 5-minütigen Gewinnungsphase gewogen, sodass Rückschlüsse auf das gesammelte Volumen möglich waren. Anschließend wurde das Effluat in mehrere beschriftete 15ml Röhren gefüllt und unverzüglich bei -80°C eingefroren. Für den kurzen Transport in den Tiefkühlschrank wurden die Proben auf Eis gelagert. Dieser Vorgang wurde nach jeder Effluatgewinnung wiederholt.

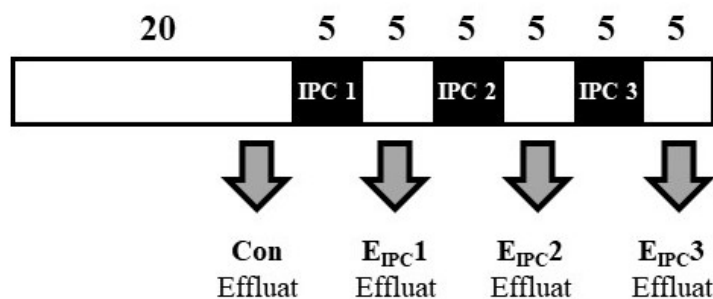


Abbildung 5: Versuchsablauf der Gewinnung von Kontroll- und IPC-Effluat

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Gewinnung der Effluat (Kontrollgruppe und drei IPC-Gruppen). Nach 15 Minuten der 20-minütigen Einpendelungsphase wurde über fünf Minuten hinweg der koronare Ausfluss (Con-Effluat) des Donor-Herzens aufgefangen. Es folgten drei 5-minütige Globalischämie mit anschließender Reperfusion und Effluatgewinnung (E_{IPC1} , E_{IPC2} , E_{IPC3}).

Eigene Abbildung.

IPC = ischämische Präkonditionierung; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

2.2.5 Untersuchung des protektiven Einflusses des Effluats

Für die Untersuchung des protektiven Einflusses des Effluats aus ischämisch präkonditionierten Herzen wurden vier Gruppen mit je fünf Tieren gebildet (je $n = 5$). Die drei IPC-Effluat wurden mit einer Kontrollgruppe (Con), welche Effluat aus den Herzen erhielt, die keinen IPC-Zyklus erfuhren, verglichen. Die Zuordnung zu den Gruppen wurde randomisiert durchgeführt. Die Gruppen unterschieden sich durch das ausgewählte Effluat (siehe Abb. 6). Die erste Gruppe stellte die Con dar. Die zweite Gruppe erhielt das Effluat E_{IPC1} , welches im vorherigen Versuchsteil nach einem durchlaufenen IPC-Zyklus aufgefangen

wurde. Der dritten Gruppe wurde das Effluat E_{IPC2} zugeführt. Die vierte Gruppe erhielt das Effluat E_{IPC3}.

Allen Herzen wurde nach einer Einpendelungsphase von 20 Minuten mittels eines mit der Langendorff-Anlage verbundenen Perfusors über 10 Minuten das Effluat unverdünnt appliziert. Die Flussrate wurde an den CF des Akzeptorherzens adaptiert. Ausschlaggebend dafür war der CF in der *baseline* (15. Minute nach Versuchsbeginn). Die Flussrate betrug bei jedem Herz 1% des gemessenen CF. Das Effluat wurde vor Beginn des Versuches aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) entnommen und schonend bei Raumtemperatur aufgetaut. Als das Effluat vollständig in flüssiger Form vorlag, wurde es in eine 20ml Luer-Lock-Spritze gefüllt.

Nach der 10-minütigen Effluatzufuhr via Spritzenpumpe begann die 33-minütige Globalischämie. Hierfür wurde die Zufuhr von KHP zu diesem Zeitpunkt durch das Umlegen des Dreiwegehahns an der Aortenkanüle (siehe Abb. 4, Nr. 7) unterbrochen und die Spritzenpumpen abgeschaltet. Die Wärmekammer wurde, wie im vorherigen Versuchsteil, mit Ischämiepuffer gefüllt und dieser kontinuierlich mit Stickstoff begast.

Nach der 33-minütigen Globalischämie begann die Koronarperfusion mit oxygeniertem KHP und der Ischämiepuffer aus der Wärmekammer wurde abgelassen. An die Ischämie schloss sich auch hier wieder eine Reperfusion von 60 Minuten an, in welcher keine der Gruppen eine Intervention erfuhr. Nach 60 Minuten Reperfusion endete dieser Versuch und die Herzen wurden von der Langendorff-Anlage gelöst. Anschließend wurden die Herzen gewogen, um das Herznassgewicht zu ermitteln. Danach wurden die Herzen in eine 3ml fassende Spritze gefüllt, bei -20°C eingefroren und bis zur Färbung gelagert.

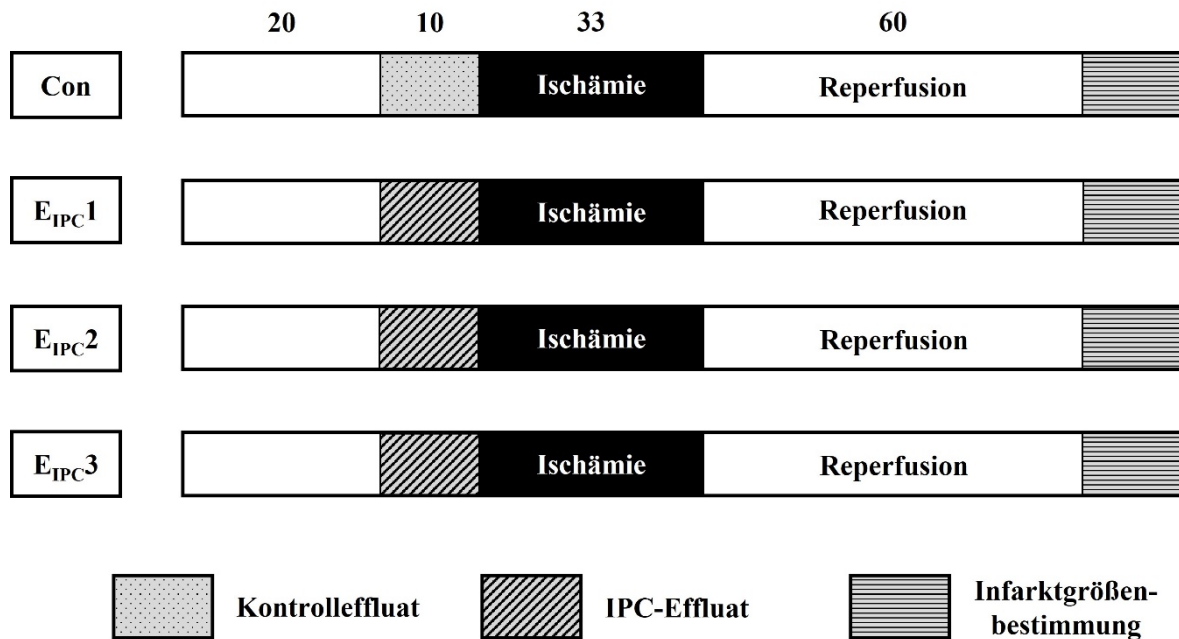


Abbildung 6: Versuchsablauf der Untersuchung des Einflusses der Effluate

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Untersuchung des protektiven Einflusses der Con- und IPC-Effluate (vier Gruppen, jeweils $n = 5$). Nach einer 20-minütigen Einpendelungsphase wurde den Akzeptor-Herzen über zehn Minuten entweder das Con- oder eins der drei möglichen IPC-Effluate (E_{IPC1}, E_{IPC2}, E_{IPC3}) appliziert. Anschließend durchliefen alle vier Gruppen eine globale Ischämie von 33 Minuten. Es folgte eine 60-minütige Reperfusion mit anschließender Infarktgrößenbestimmung durch TTC-Färbung und planimetrische Auswertung.

Eigene Abbildung.

n = Anzahl; Con = Kontrolle; IPC = ischämische Präkonditionierung; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen; TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid.

2.2.6 Färbung der Herzen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

Mithilfe des farblosen und wasserlöslichen Redox-Farbstoffes TTC ließ sich die metabolische Aktivität von Zellen oder Geweben nachweisen. Dies beruhte auf der Aktivitätsmessung von Dehydrogenasen (74). Das TTC diente in diesem Fall als Farbindikator, welcher ausschließlich vitales Gewebe anfärbte. Avitales Gewebe verbleib hingegen farblos. Diese Vitalfärbung basiert auf einer Redox-Reaktion, die nur in stoffwechselaktivem Gewebe stattfinden kann. Das TTC wurde in vitalem Gewebe durch membranständige Diaphorasen, welche NAD(P)H-Dehydrogenasen der Atmungskette als Elektronendonoren nutzen, zu rötlichem, wasserunlöslichem Formazan (Triphenylformazan) reduziert (74, 75). Gewebe, welches nicht mithilfe von TTC bzw. dem reduzierten Formazan angefärbt wurde, verblieb weiß und wurde als irreversibel geschädigt angesehen. Eine Inaktivierung der benötigten Dehydrogenasen erfolgte zeitnah nach dem Zelltod (75).

Die Herzen wurden im noch gefrorenen Zustand in acht gleichgroße, axiale Scheiben geschnitten, welche jeweils eine Dicke von etwa 2 mm aufwiesen. Begonnen wurde an der Herzspitze. Die so entstandenen Herzscheiben wurden mittels einer 0,75%igen TTC-Lösung in 1,41% TRIS-Puffer für 15 min gefärbt. Dies geschah in einem Wasserbad bei konstant 37°C und einem pH-Wert von 7,42.

Direkt im Anschluss an den Färbevorgang wurden die Herzen mittels einer 4%igen Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur von 20°C fixiert. Anschließend an die Fixierung wurden die Herzscheiben unter Zuhilfenahme eines hochauflösenden Foto- und Dokumentenscanners eingescannt und so digitalisiert. Die Herzscheiben wurden von der Herzspitze zur Herzbasis sortiert und immer die zur Herzbasis gerichtete Schnittkante auf die Glasscheibe des Scanners aufgelegt. Im nächsten Schritt trockneten die Herzscheiben für 7 Tage unter einem Abzug und anschließend wurde das Trockengewicht der acht Scheiben eines Herzens ermittelt.

Für die anschließende Planimetrie (siehe Abb. 7) der nun digitalisiert vorliegenden Herzscheiben wurde die Software SigmaScan© verwendet. Die Auswertung fand verblindet durch einen unabhängigen Untersucher statt. Das vitale Gewebe imponierte durch die TTC-Färbung rötlich eingefärbt, wohingegen sich das Infarktgewebe weißlich bis gräulich darstellte. Mittels der Software wurden nun die einzelnen Teile des linken Ventrikels, welche visuell als Infarktgewebe erkennbar waren, markiert und addiert. Danach wurde die Fläche des gesamten linken Ventrikels ausgemessen. Es ließ sich so ein Verhältnis aus der Summe der infarzierten Flächen zur gesamten Fläche des linken Ventrikels ermitteln. Dieser Quotient wurde als *AAR* bezeichnet. Um die durchschnittliche Infarktgröße des gesamten Herzens zu ermitteln, wurde der arithmetische Mittelwert aus den *AAR* jeder Herzscheibe gebildet.

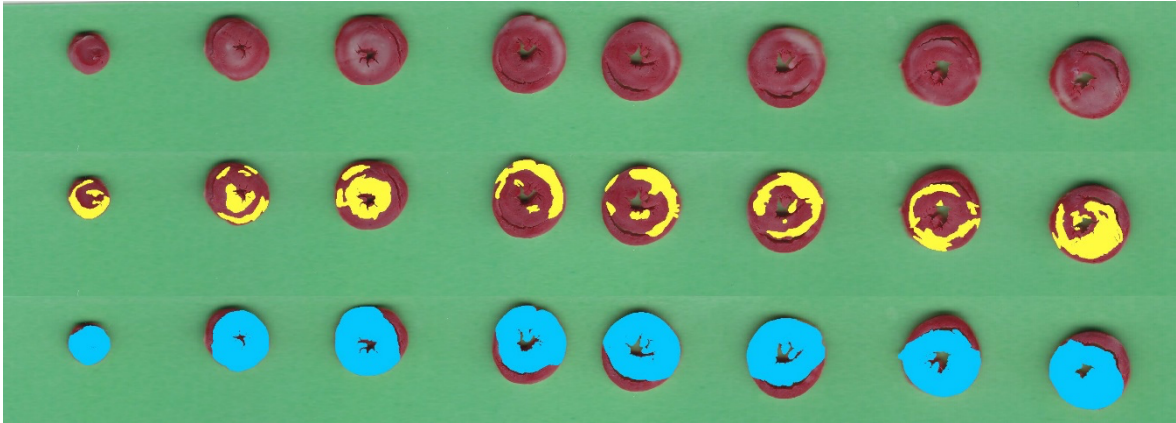


Abbildung 7: Planimetrische Darstellung eines Rattenherzens nach TTC-Färbung

Dargestellt ist hier der Ablauf einer Planimetrie beispielhaft an einem geschnittenen Rattenherz. Das Herz wurde hierfür in acht gleich dicke Scheiben geschnitten. Die zu untersuchende Seite war immer die Schnittfläche, welche der Herzbasis zugewandt war. Die Herzscheiben wurden immer von apikal (links) nach basal (rechts) sortiert. Bei allen drei Reihen handelte es sich um ein untersuchtes Herz. In der oberen Reihe sind die Herzscheiben noch ungekennzeichnet gezeigt. In der zweiten Reihe wurden die weißlichen (d.h. ischämischen) Areal des linken Ventrikels markiert (gelb). Das gesamte Areal des linken Ventrikels wurde in der dritten Reihe farbig gekennzeichnet (hellblau). Aus dem Verhältnis von addierter gelber zu hellblauer Fläche ließ sich die Infarktgröße für jede einzelne Herzscheibe prozentual berechnen und für das gesamte Herz summieren. Eigene Abbildung.

2.2.7 Statistische Auswertung

Als primärer Endpunkt der Versuche in dieser Arbeit galt die Infarktgröße. Mithilfe von GraphPad StatMate™ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) wurde die Gruppengröße mit $n = 5$ ermittelt. Hierdurch wurde eine Infarktgrößenreduktion von 25% bei einer Standardabweichung (SD) von 10% erkannt. Bei einer statistischen Power (Teststärke) von 80% und einem angenommenen alpha-Fehler von $\alpha < 0,05$ wurde diese Gruppengröße errechnet.

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism, Version 7.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Die Unterschiede der Infarktgröße wurden mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit Dunnett's post hoc test ausgewertet.

Die hämodynamischen Parameter dienten als sekundärer Endpunkt. Diese wurden durch eine zweifache ANOVA und anschließendem Tukey's post hoc test verglichen.

Die Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Ein Signifikanzniveau von 5% wurde angenommen ($p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Effluate auf die Infarktgrößen

In Abbildung 8 werden die Infarktgrößen der Kontrollgruppe und der IPC-Gruppen grafisch gegeneinander aufgetragen. Die Con-Infarktgröße betrug $54 \pm 12\%$ des AAR. Der Transfer von Effluat bewirkte in den Interventionsgruppen E_{IPC1} ($27 \pm 5\%$), E_{IPC2} ($35 \pm 7\%$) und E_{IPC3} ($35 \pm 8\%$) eine signifikante Infarktgrößenreduktion ($p < 0,05$ vs. Con).

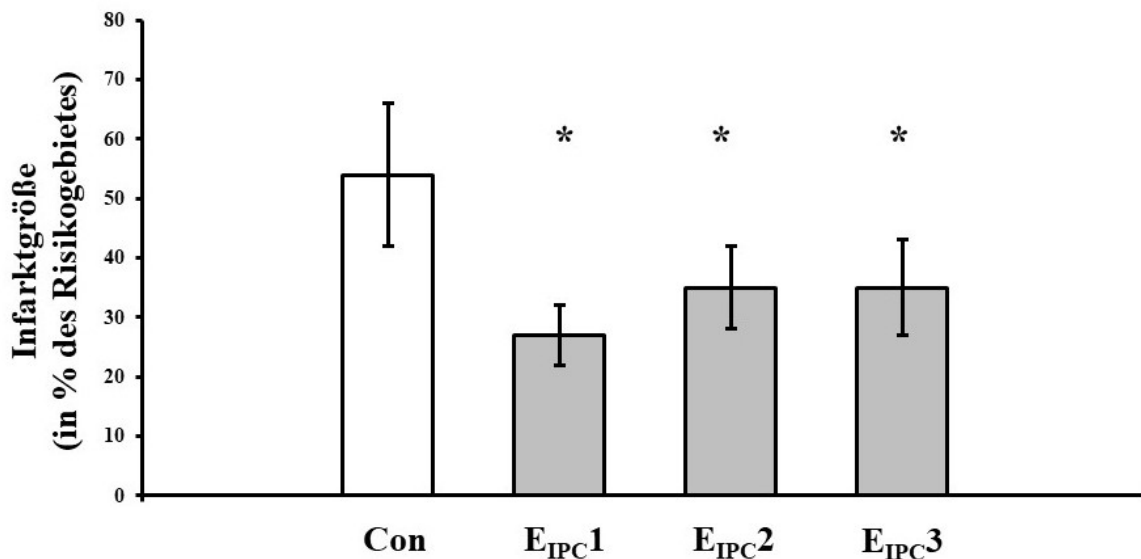


Abbildung 8: Einfluss der Effluate auf die Infarktgrößen

Dargestellt sind vier Gruppen (Con, E_{IPC1} , E_{IPC2} , E_{IPC3}), in denen die Rattenherzen randomisiert wurden (je $n = 5$). Primärer Endpunkt waren die Infarktgrößen. Die Kontrollgruppe erhielt ein Effluat (Con) eines Herzens, welches keinen IPC-Zyklus durchlief. Die Interventionsgruppen bekamen eines der drei möglichen IPC-Effluate (E_{IPC1} , E_{IPC2} , E_{IPC3}) appliziert. Der prozentuale Anteil von Infarktgebiet zu AAR stellte die Infarktgröße dar. Mittels TTC-Färbung und Planimetrie wurde die Infarktgröße bestimmt. Die Infarktgrößen der IPC-Effluat-Gruppen waren signifikant kleiner gegenüber der Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Eigene Abbildung.

Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen; n = Anzahl; vs. = versus.

* $p < 0,05$ vs. Con.

3.2 Einfluss der Effluate auf die Hämodynamik

3.2.1 Die erhobenen hämodynamischen Parameter

Die im Folgenden besprochenen hämodynamischen Daten umfassen die Herzfrequenz [min^{-1}], die LVDP [mmHg], sowie den CF [ml/min]. Diese Parameter wurden während der Versuche kontinuierlich erhoben. Für die Auswertung wurden Messwerte von vorher fest

definierten Zeitpunkten verwendet. Zu diesen Zeitpunkten zählten die *baseline* (15. Minute), die letzte Minute der Präkonditionierung (PC) (29. Minute), sowie die 30. (Rep30) und die 60. Minute (Rep60) der Reperfusion.

3.2.2 Herzfrequenz

Es zeigten sich bei der Herzfrequenz zu den beiden Messpunkten vor der Globalischämie (d.h. *baseline* und PC) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei Interventionsgruppen. Auch ließen sich bei den postischämisch erhobenen Herzfrequenzen bei allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den präischämischen Herzfrequenzen erkennen. Zwischen den Gruppen selbst war zudem kein signifikanter Unterschied festzustellen (siehe Tab. 9, siehe Abb. 9).

Herzfrequenz [min^{-1}]				
	<i>baseline</i>	PC	Rep(30)	Rep(60)
Con	307 ± 29	288 ± 43	296 ± 73	254 ± 41
E _{IPC1}	333 ± 70	330 ± 53	298 ± 48	236 ± 73
E _{IPC2}	290 ± 46	305 ± 36	251 ± 44	229 ± 91
E _{IPC3}	295 ± 24	278 ± 44	282 ± 36	272 ± 13

Tabelle 9: Herzfrequenzen

min = Minute; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

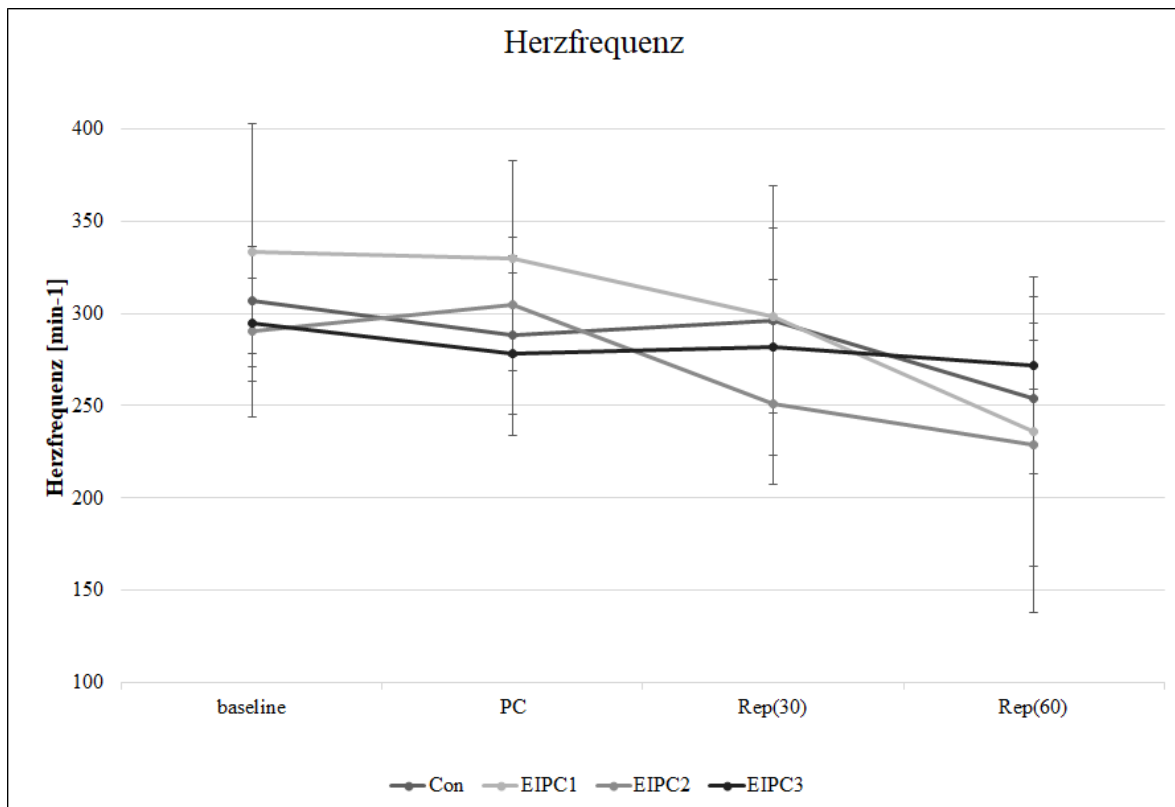


Abbildung 9: Herzfrequenzen

Zu allen Zeitpunkten des Versuchs wurde die Herzfrequenz der Langendorff-Herzen detektiert. Es waren keine signifikanten Unterschiede der Herzfrequenzen erkennbar.

Eigene Abbildung.

min = Minute; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

3.2.3 Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz (LVDP)

Nach der globalen Ischämie gab es in Bezug auf die linksventrikuläre Druckdifferenz sowohl bei der Kontroll- als auch bei den Interventionsgruppen während der Reperfusion signifikante Unterschiede zu der präischämischen Phase. Die postischämischen Werte waren alle signifikant niedriger als die präischämisch gemessenen Werte. Die postischämischen LVDP-Werte der vier Gruppen wiesen untereinander jedoch keinen signifikanten Unterschied auf (siehe Tab. 10, siehe Abb. 10).

Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz [mmHg]				
	baseline	PC	Rep(30)	Rep(60)
Con	121 ± 20	120 ± 20	19 ± 6*	27 ± 3*
E _{IPC1}	123 ± 34	123 ± 22	37 ± 40*	39 ± 26*
E _{IPC2}	139 ± 15	136 ± 13	39 ± 26*	22 ± 12*
E _{IPC3}	155 ± 53	154 ± 27	14 ± 5*	18 ± 4*

Tabelle 10: Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz (LVDP)

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

* $p < 0,05$ vs. baseline.

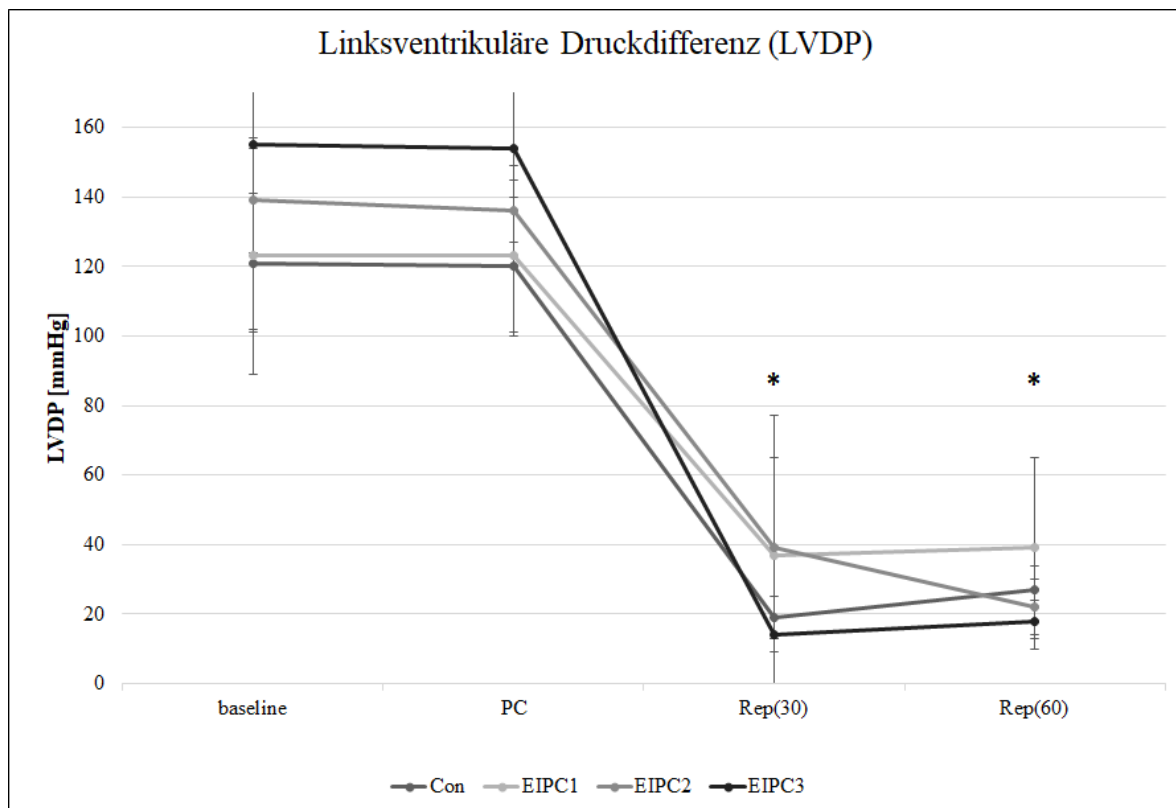


Abbildung 10: Linksventrikuläre Blutdruckdifferenz (LVDP)

Im Laufe des Versuchs fiel die LVDP in der Con- und allen drei Interventionsgruppen signifikant ab. Im Vergleich zu den präischämischen Werten waren die postischämischen Werte des LVDP signifikant niedriger. Eigene Abbildung.

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

* $p < 0,05$ vs. baseline.

3.2.4 Koronarfluss

Verglichen mit der *baseline* und PC war der Koronarfluss postischämisch in allen Gruppen zu beiden Messzeitpunkten signifikant niedriger. Ein signifikanter Unterschied, sowohl vor als auch nach der Ischämie, zwischen den einzelnen Gruppen lag zum gleichen Zeitpunkt jedoch nicht vor (siehe Tab. 11, siehe Abb. 11).

Koronarfluss [ml/min]				
	<i>baseline</i>	PC	Rep(30)	Rep(60)
Con	12 ± 1	11 ± 3	7 ± 1*	6 ± 1*
E _{IPC1}	15 ± 3	14 ± 3	8 ± 2*	7 ± 2*
E _{IPC2}	11 ± 2	10 ± 2	8 ± 2*	7 ± 2*
E _{IPC3}	15 ± 3	15 ± 3	7 ± 2*	6 ± 2*

Tabelle 11: Koronarfluss

ml = Milliliter; min = Minute; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

* *p* < 0,05 vs. *baseline*.

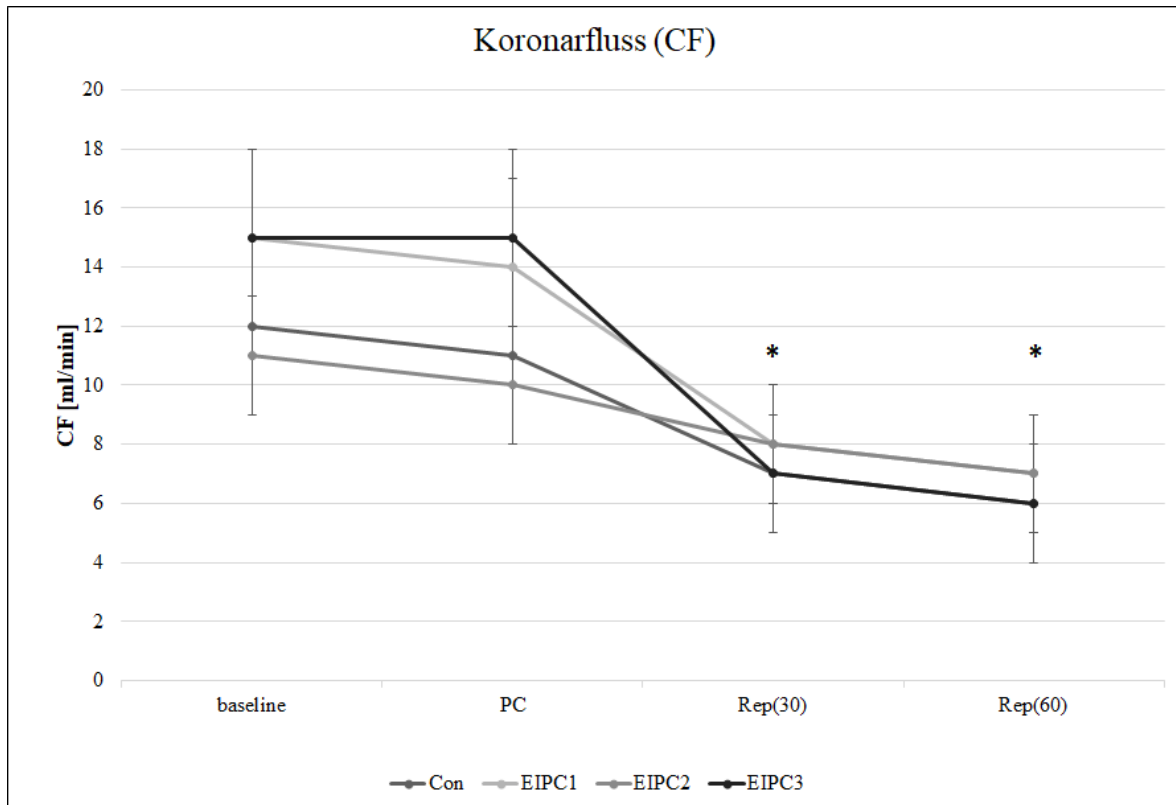


Abbildung 11: Koronarfluss

Während der präischämischen Phase des Versuches war kein signifikanter Unterschied der Koronarflüsse zu erkennen. Hingegen fand sich ein signifikanter Unterschied der beiden postischämischen CF-Werte im Vergleich zu den präischämischen. Zum jeweiligen Messzeitpunkt unterschied sich der CF der einzelnen Gruppe nicht signifikant.

Eigene Abbildung.

ml = Milliliter; min = Minute; PC = die letzte Minute der Präkonditionierung; Rep(30) = 30. Minute der Reperfusion; Rep(60) = 60. Minute der Reperfusion; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

** $p < 0,05$ vs. baseline.*

3.3 Einfluss der Effluat auf die ischämische Kontraktur

Zusätzlich zu den hämodynamischen Parametern wurden auch der Zeitpunkt und die Höhe der ischämischen Kontraktur erfasst. Auch hier unterschieden sich die beiden Parameter zwischen den vier Gruppen nicht signifikant (siehe Tab. 12).

	Zeitpunkt der maximalen ischämischen Kontraktur (min)	Höhe der maximalen ischämischen Kontraktur (mmHg)
Con	17 ± 1	55 ± 2
E _{IPC1}	16 ± 3	56 ± 4
E _{IPC2}	15 ± 1	60 ± 10
E _{IPC3}	15 ± 2	72 ± 6

Tabelle 12: Ischämische Kontraktur

min = Minute der Globalischämie; mmHg = Millimeter Quecksilbersäule; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

3.4 Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte

Neben der Infarktgröße wurden auch das Körpergewicht der Versuchstiere und das Herznassgewicht als weitere Parameter betrachtet (siehe Tab. 13). Zwischen der Con-Gruppe und den drei IPC-Gruppen bestand diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.

	Körpergewicht (g)	Herznassgewicht (g)
Con	290 ± 7	1,18 ± 0,02
E _{IPC1}	291 ± 40	1,27 ± 0,12
E _{IPC2}	265 ± 13	1,16 ± 0,06
E _{IPC3}	301 ± 10	1,19 ± 0,05

Tabelle 13: Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte

g = Gramm; Con = Kontrolle; E_{IPC1} = Effluat nach einem IPC-Zyklus; E_{IPC2} = Effluat nach zwei IPC-Zyklen; E_{IPC3} = Effluat nach drei IPC-Zyklen.

4 Diskussion

4.1 Beantwortung der Fragestellung

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Fragestellung auseinander, ob präischämisch verabreichtes Effluat von IPC-Rattenherzen in nativen Herzen zu einer Kardioprotektion führt. Zudem findet eine Untersuchung der kardioprotektiven Potenz des transferierten Effluats in Abhängigkeit vom Abnahmezeitpunkt statt.

Zunächst wurde im ersten Versuchsteil Con- und IPC-Effluat mithilfe der etablierten Langendorff-Anlage gewonnen. Dieses Effluat wurde im Anschluss nativen Herzen koronarflussadaptiert appliziert, bevor diese isoliert perfundierten Herzen von männlichen Wistar-Ratten eine 33-minütige Globalischämie durchliefen.

Die Fragen aus Kapitel 1.7 lassen sich wie folgt beantworten:

1. Das präischämisch transferierte Effluat der Donor-Herzen induziert in unbehandelten naiven Herzen eine Infarktgrößenreduktion.
2. Die kardioprotektive Potenz des transferierten Effluats unterscheidet sich nicht in Abhängigkeit vom Abnahmezeitpunkt (E_{IPC1} , E_{IPC2} , E_{IPC3}), sondern die kardioprotektive Wirkung von IPC-Effluat ist bereits nach einem einzelnen Präkonditionierungszyklus maximal.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass der Transfer von Effluat auch im hier beschriebenen Versuchsaufbau möglich war, jedoch keine Unterschiede der Kardioprotektion in Hinblick auf den Zeitpunkt der Effluatgewinnung ausgemacht werden konnten. Verglichen mit der Kontrollgruppe war eine signifikante Infarktgrößenreduktion bei allen IPC-Effluaten nachweisbar, wobei zwischen den IPC-Gruppen keine signifikante Reduktion festgestellt werden konnte.

4.2 Diskussion von Material und Methodik

4.2.1 Versuchsaufbau – Die Langendorff-Anlage

Als Versuchsaufbau wurde im Rahmen dieser Arbeit die Präparation nach Langendorff, ein in dieser Arbeitsgruppe der Klinik für Anästhesiologie etabliertes Modell, angewendet (76-81). Die Langendorff-Apparatur ist eine standardisierte und reproduzierbare Methode, welche sich darüber hinaus durch eine Zeit- und Kosteneffizienz auszeichnet (82).

Bei dem hier verwendeten Langendorff-Modell handelte es sich um ein isoliert-perfundiertes Säugetierherz, welches retrograd durch den verbliebenen Aortenstumpf mittels einer Perfusionslösung durchspült wurde. Auf Grund dieser Tatsache wird in der Literatur häufig verkürzt von einer retrograden Perfusion gesprochen (83). Jedoch ist lediglich der aortale Blutfluss im Vergleich zur Systole umgekehrt. Die Perfusion der Koronargefäße in der Diastole hingegen findet in physiologischer Flussrichtung statt. Ferner erzeugt die Langendorff-Anlage im aortalen Gefäßstumpf keinen Blutfluss, sondern simuliert den diastolischen Blutdruck, welcher einen Verschluss der Aortenklappe bewirkt (82).

Der zuvor beschriebene *in-vitro*-Versuchsaufbau mit dem isoliert-perfundierten Herzen weist im Vergleich zu *in-vivo*-Versuchen vielfältige Unterschiede auf. Zum einen gestaltet sich die isolierte Untersuchung eines Organs in einem fortbestehenden Gesamtorganismus schwer, da kontinuierliche Interaktionen mit Hormonen, anderen Organen bzw. Organsystemen oder mit dem autonomen Nervensystem unvermeidbar sind (84). Zum anderen ermöglichen *in-vitro*-Versuche ein hohes Maß an Reproduzier- und Vergleichbarkeit (85), sowohl zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen als auch zwischen unterschiedlichen Säugetierspezies (86). Zusätzlich erlaubt die Reproduzierbarkeit und die Kosteneffizienz sehr umfangreiche Studiengrößen (72, 85, 86). Dennoch muss aus ethischen Gründen und zunehmender Kritik an Tierversuchen beachtet werden, dass für jeden *in-vitro*-Versuch eine Tötung des Versuchstiers zwangsläufig in Kauf genommen werden muss (85, 87).

Neben dem verwendeten Modell nach Langendorff wurde die „*Working heart*“-Präparation nach Neely (88) etabliert (85). Bei dem „*Working heart*“ wird neben der aortalen Kanüle eine weitere Kanüle in den linken Vorhof eingeführt, welche diesen ebenfalls mit Perfusat versorgt. Dieses wird im Verlauf durch den linken Ventrikel und die Aortenklappe in die Aorta ausgeworfen. Eine Wassersäule simuliert die Nachlast. In der anschließenden Diastole werden die Koronargefäße, ähnlich dem Langendorff-Versuch, perfundiert (82, 88). Somit leistet der Ventrikel dieses isoliert-perfundierten Herzens eine Druck-Volumen-Arbeit,

weshalb das „*Working heart*“-Modell der Herzphysiologie näher kommt (85). Weiter ermöglicht dieses Modell durch die physiologische Alternation von Systole und Diastole die direkte Messung des kardialen Outputs (72, 82, 84). Im Vergleich zur Langendorff-Präparation ist das „*Working heart*“ wegen der äußeren Arbeit besser zur Untersuchung von metabolischen Veränderungen geeignet (86, 87). Insbesondere bei Versuchen zur Glukoseaufnahme, Laktatproduktion und zur Freisetzung von freien Radikalen besteht eine Überlegenheit (89). Andererseits verlangt die Implementierung einer zweiten Kanüle von den Untersuchenden ein höheres Maß an technischem Geschick (72, 82). Im Modell nach Neely wird der linke Vorhof mit Perfusat durchspült, weshalb eine Implantation eines Ballonkatheters zur exakten Kraft- und Zeitmessung nicht möglich ist (82, 85). Die Vorhofkanüle im „*Working heart*“-Modell benötigt eine suffiziente Perfusatversorgung, da sonst der kardinale Auswurf limitiert sein kann. Aus diesem Grund werden größere Mengen Pufferlösung benötigt. Ein zirkulierendes Puffersystem findet deswegen häufig Verwendung (72). Da jedoch im oben beschriebenen Versuch eine Entnahme des koronaren Effluats notwendig ist, könnte eine Wiederverwendung des Puffers neben einer Verunreinigung auch zu einer ungeplanten Präkonditionierung durch bereits enthaltene kardioprotektive Substanzen führen. Zusammenfassend präsentieren sich im Rahmen dieses Versuchs eher theoretische als praktische Vorteile der „*Working heart*“-Präparation verglichen mit den Langendorff-Herzen (82). Überdies stehen in diesem Versuch nicht metabolische Veränderungen im Vordergrund, sondern primär die Infarktgrößenreduktion und sekundär die Veränderung der hämodynamischen Parameter. Aus diesem Grund überwiegt die simplere Präparation bei vorteilhafter Reproduzierbarkeit und Kosteneffizienz.

Neben der „*Working heart*“-Präparation nach Neely existiert das „*Dual-perfusion*“-Modell nach Avkiran et al., welches durch den Einsatz einer neuen „Zwei-Lumen-Aortenkanüle“ eine unabhängige Perfusion der beiden koronaren Gefäßsysteme ermöglicht (90). Insbesondere bei Spezies mit ungenügenden Kollateralen der Koronargefäße, wie beispielsweise den in diesem Versuch verwendeten Ratten, illustrieren Clements-Jewery et al. auch eine isolierte Perfusion der einzelnen Stammgefäße als möglichen Versuchsaufbau. Als nachteilig wird der hohe technische Anspruch bei der Platzierung der Kanüle gesehen (82).

Basierend auf der ursprünglichen Beschreibung des Langendorff-Modells wird die koronare Perfusion mithilfe eines konstanten Drucks realisiert. Eine weitere Methode stellt die Perfusion durch einen konstanten Fluss dar. In beiden Varianten wird so der diastolische Blutdruck nachempfunden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wird die Perfusion mittels

eines konstanten Perfusionsdruck von 80mmHg hergestellt. Bei dieser findet eine autoregulatorische Anpassung der Koronargefäßperfusion durch den Gefäßtonus der glatten Muskulatur statt (72). Überdies handelt es sich bei der druckkonstanten Perfusion um eine kostengünstige und simpel realisierbare Perfusionsform, da aufgrund der Hydrostatik mittels der Wassersäule des Reservoirs kontinuierlich der Druck erzeugt wird (85, 86). Bei der exakten Applikation von Medikamenten oder anderen Substanzen erweist sich die volumenkonstante Perfusion hingegen als vorteilhafter, da wegen der festen, dem Koronarfluss entsprechenden Perfusionsrate der prozentuale Anteil der zu untersuchenden Stoffe leichter berechnet werden kann (82). Im zuvor beschriebenen Experiment (siehe Kapitel 2.2.5) findet die Applikation durch eine Anpassung an den präischämisch gemessenen Koronarfluss statt. Eine spätere Veränderung im laufenden Experiment findet nicht mehr statt. Einen weiteren Vorteil der flusskonstanten Perfusionsform stellt die geringere Menge des benötigten Perfusats dar, weil dieser lediglich für die Koronarperfusion und nicht für den hydrostatischen Druck benötigt wird (85, 86). Für eine exakte Koronarperfusion ist jedoch eine genaue Kenntnis der physiologischen Perfusion der jeweiligen Versuchstiere mit ihren spezifischen Gefäßbetten von enormer Bedeutung (72, 86). Einen praktischen Vorteil macht die Wassersäule der druckkonstanten Perfusion aus, denn hier kann diese automatisch als Luftfänger für kleine, akzidentiell beigemengte Luftblasen dienen. In der volumenkonstanten Form ist diese nicht zwangsläufig vorhanden (82). Unabhängig von der Wahl der verwendeten Perfusionsform ist eine konkrete Fluss- oder Druckeinstellung von entscheidender Bedeutung, da sonst – insbesondere bei salinen Pufferlösungen (siehe hierfür das Kapitel 4.2.3) – die Bildung eines kardialen Ödems droht (91).

4.2.2 Versuchstiere

In den meisten gegenwärtigen Publikationen finden Nagetierherzen - insbesondere von Ratten oder Mäusen - Verwendung, da sich diese durch eine einfache Handhabung (72) und niedrige Beschaffungs-, Haltungs- und Futterkosten auszeichnen. Weiter bieten sie die Möglichkeit der genetischen Manipulation (85). Hingegen verlangen Nagetiere aufgrund der geringen Größe vom Untersuchenden manuelles Geschick bei gleichzeitiger Abnahme der Vergleichbarkeit zu Herzen größerer Säugetieren (85). Im Rahmen des oben skizzierten Versuchsaufbaus dominierte jedoch die Kosteneffizienz und die hohe Reproduzierbarkeit bei Verwendung von Rattenherzen. Aus diesen Gründen wurden für diesen Versuchsaufbau Wistar-Ratten verwendet.

Bei der weiteren Wahl der Versuchstiere im Rahmen der IPC galt es potentielle *confounder* zu exkludieren. Zu diesen zählen neben Alter und Geschlecht auch bereits bestehende Vorerkrankungen mit entsprechender Begleitmedikation. Hier ist insbesondere eine Hyperglykämie mit der Manifestation eines Diabetes zu nennen. Deswegen wurden für diesen Versuchsaufbau Herzen von jungen und gesunden Wistar-Rattenmännchen verwendet. Mit zunehmendem Lebensalter steigt sowohl die Prävalenz als auch das Ausmaß und die Folgen der koronaren Herzkrankheit und der Myokardinfarkte (5, 6). Kardioprotektive Effekte der Präkonditionierung nehmen zudem mit steigendem Alter ab, wobei dessen Ursache aktuell noch unklar ist (92). Es wird vermutet, dass altersbedingt das Myokard die Fähigkeit auf Ischämien mittels mPTP-Regulation zu reagieren verliert, was einen Verlust der zelleigenen Kardioprotektion bewirkt (93). Aufgrund einer Östrogen-bedingten Toleranzerhöhung gegenüber des I/R-Schadens kann das weibliche Geschlecht die Wirkung der ischämischen Kardioprotektion reduzieren (94). Über eine Aktivierung des Östrogenrezeptors- α sind weibliche Herzen vor dem I/R-Schaden geschützt (95). Bei Verwendung von jungen Wistar Männchen wurden so der Einfluss von Alter und Geschlecht zugunsten der isolierten Untersuchung des kardioprotektiven Effekts exkludiert. Weiter wurden zu eben diesem Zweck Versuchstiere ohne Vorerkrankungen verwendet (96), um auch die Kardioprotektion des Effluats ohne den Einfluss von Komorbiditäten und Komedikationen bewerten zu können.

4.2.3 Krebs-Henseleit-Puffer (KHP)

Zur Perfusion nach Langendorff stehen sowohl Vollblut als auch kristalloide Lösungen zur Verfügung. Hierzu gehören neben dem verwendete KHP, auch die Ringer- und die Tyrode-Pufferlösung (97). Abweichend von ihrer ursprünglichen Zusammenstellung ist eine Modifikation des KHP durch Änderung einzelner Bestandteile möglich. So können den Perfusaten Der KHP, entwickelt 1932 von Hans Krebs und Kurt Henseleit, besteht ursprünglich aus: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2,52 mM CaCl₂ und 11 mM Glukose (C₆H₁₂O₆) (98). Durch diese Zusammensetzung sollen die Eigenschaften des Plasmas imitiert werden. Es existieren mehrere Modifikationen. So wurde für die Publikationen dieser Arbeitsgruppe EDTA und Laktat hinzugefügt (siehe hierfür Kapitel 2.1.2). Durch eine kontinuierliche Anreicherung mit Carbogen wurde ein pH-Wert von 7,4 bei einer Temperatur von 37°C etabliert.

Fehlende Zellbestandteile der salinen Perfusate bewirken eine verminderte Viskosität und führen durch erhöhten Koronarfluss zu stärkeren Scherkräften und Endothelschädigung (73).

Ein Zusatz von Erythrozyten kann veränderte Flusseigenschaften und eine Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität bewirken. Dieser Zusatz gestaltet sich jedoch wegen einer möglichen Hämolyse kosten- und zeitintensiver, ebenso störanfälliger (86). Wegen der limitierten Sauerstofftransportkapazität ist bei Verwendung von kristalloiden Lösungen ein hoher Sauerstoffpartialdruck ($pO_2 > 500$ mmHg) notwendig (72, 91). Kristalloide Perfusate besitzen im Vergleich zu anderen Perfusaten einen niedrigeren onkotischen Druck, welcher insbesondere bei einer druckkonstanten Perfusion die Ausbildung eines kardialen Ödems bewirken kann (72, 86, 91). Der Zusatz von Kolloiden (wie bspw. Albumin) ist möglich, führt jedoch zu einer Kostenintensivierung und bei Oxygenierung mittels Gasfritte zu einer ausgeprägten Schaumbildung (72, 87, 91). Eine Koronarflussnormalisierung und eine Vermeidung von Ödemen kann jedoch nicht sicher gestellt werden (87). Eine Oxygenierung ohne Sprudeln kann mittels eines Oxygenators realisiert werden (91).

Als Energiequelle der Kardiomyozyten können Fettsäuren ebenfalls zu einem Aufschäumen führen (72). Das Fehlen dieser macht einen vergleichsweise hohen Glukosegehalt nötig. Physiologisch liegt der Blutzucker bei männlichen Wistar-Ratten bei 125 mg/dl (99). Der Zuckergehalt des KHP wurde in der Literatur teilweise als diabetisch (86), teilweise als normoglykämisch (77) gewertet. Zur Vergleichbarkeit mit anderen Studien, in denen eine Konzentration von 11 mmol/l genutzt wurde (77), wurde auch in dieser Arbeit eine Glukosekonzentration von 11 mM als physiologisch angesehen. Bei fehlenden Plasmaproteinen sind die K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen fälschlicherweise zu hoch (73), da sie nicht in freier und gebundener Form vorliegen (100). Eine kontinuierlich inotrope Belastung wird durch die Ca^{2+} -Konzentration angenommen (72). Ca^{2+} -Konzentrationen von 1,2-1,8 mM (72) bzw. 1,2 mM und eine K^+ -Konzentration von 3-4 mM werden vorgeschlagen (73). Zur Ca^{2+} -Reduktion kann dem KHP, wie auch in dieser Arbeit, 0,5 mM EDTA beigelegt werden (100-104).

Neben dem KHP stellt der Tyrode-Puffer den zweiten Standardpuffer im isolierten Herzexperiment dar (105), welcher ebenso als blutisotonische Lösung zum Blutersatz dient (106). Der Tyrode-Puffer nutzt im Gegensatz zu Bicarbonat organische Puffer (bspw. HEPES, TRIS und PIPES) (107). Bicarbonatpuffer benötigen zur pH-Wert-Einstellung eine CO_2 -Zufuhr, in diesem Versuch mittels Carbogen (91). Eine Verwendung des Tyrode-Puffers ist jedoch im Rahmen der Kardioprotektion umstritten, da unter anderem HEPES zytoprotektive Eigenschaften zu geschrieben werden (108).

Trotz verschiedener Pufferlösungen wurde in dieser Arbeit kongruent mit dem Vorgehen der Arbeitsgruppe KHP genutzt. Hiervon wurde eine gesteigerte Vergleichbarkeit sowohl innerhalb der Arbeitsgruppe als auch mit bereits vorliegenden Publikationen erwartet. Ansonsten überwogen die Vorteile von hoher Reproduzierbarkeit und kostengünstiger Anfertigung.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Infarktgrößenreduktion

Für diese Arbeit wurde die gemessene Infarktgrößenreduktion als primärer Endpunkt verwendet. Dieser drückt laut Lindsey et al. bei allen Studien, welche sich auf die Kardioprotektion fokussieren, die quantitative Beurteilung der Kardiomyozytenvitalität aus (109). Zur Ermittlung der Infarktgröße wurde eine Anfärbung der vitalen Kardiomyozyten mittels TTC und anschließender planimetrischer Auswertung genutzt. Diese Methode stellt den Goldstandard bei intakten Herzen, inklusive der für diese Arbeit verwendeten isoliert-perfundierten Herzen, dar (109, 110). Die Infarktgröße lässt sich somit im Verhältnis zum gesamten *AAR*, welches bei der induzierten Globalischämie der vollständige linke Ventrikel ist, ausdrücken.

Weitere Methoden zur Messung der kardiomyozytären Schädigung können sowohl die Auswertung hämodynamischer Daten (siehe hierfür Kapitel 4.3.2) als auch die Freisetzung von Biomarkern und Enzymen mit herzspezifischem Charakter sein. Eine Ermittlung der wahren Größe der kardialen Pathologie ist jedoch laut Opie et al. anhand solcher indirekten Indices, wie beispielsweise der Freisetzung der Creatininkinase (CK), nur selten möglich (111). Gleiches gilt für eine Abschätzung der Infarktgröße mittels von elektrokardiographischen Veränderungen (bspw. ST-Strecken-Erhöhungen), welche eher Entwicklungen der Ischämie und nicht die tatsächliche Infarktgröße widerspiegeln (111).

Hierauf basierend wurde die mittels TTC-Färbung ermittelte Reduktion der Infarktgröße als primärer Endpunkt und nachrangig die gemessene Hämodynamik als sekundärer Endpunkt ausgewertet.

4.3.2 Hämodynamik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Messung der Infarktgrößenreduktion gleichzeitig hämodynamische Parameter aufgezeichnet und ausgewertet. In allen Gruppen war eine signifikante Reduktion zwischen den präischämischen und den postischämischen Werten von LVDP und CF zu verzeichnen. Mithilfe der postischämischen Hämodynamik ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Con- und den IPC-Gruppen ableiten. Sowohl in anderen Publikationen der Arbeitsgruppe (112, 113), als auch in weiteren Studien (114) am isolierten Langendorff-Herzen präsentierte sich diese Tatsache auch.

Als ursächlich wird das in Kapitel 1.2.2 bereits erwähnte *myocardial stunning* vermutet. Unter diesem Begriff wurde das Phänomen im Jahr 1982 von Braunwald und Kloner erstbeschrieben (115). Hierbei handelt es sich um ein postischämisch vollständig reperfundiertes Myokard (116), welches durch eine akute globale oder regionale Ischämie induziert temporär und reversibel von einer kontraktilen Dysfunktion betroffen ist (117). Zuvor wurde angenommen, dass sich die myokardiale Funktion entweder sofort und vollständig erholt oder lediglich eine unvollständige Genesung aufgrund der langen Okklusion eintritt (118). Als Auslöser für das *myocardial stunning* gilt die ischämisch-bedingte Bildung von ROS mit Zellorganellenschädigung, sowie eine Ca^{2+} -Überladung und eine Entkoppelung von Erregung und Kontraktion (119). Somit handelt es sich beim *myocardial stunning* um eine subletale Form der ROS-vermittelten I/R-Schädigung (119). Laut Pomblum und Kollegen ist hingegen der Begriff des *cardiac stunning* präferiert zu nutzen, da durch diese Bezeichnung unterschiedliche Facetten des *stunning* inkludiert sind. Neben der myokardialen sind auch vaskuläre, endotheliale, metabolische, neuronale und elektrische Beeinträchtigungen sowie eine postischämische Entzündungsreaktion nachweisbar (120).

Ein Nebeneinander von einer irreversiblen Zellschädigung durch Nekrose und einem reversiblen Funktionsverlust im Sinne eines *myocardial stunning* ist außerdem möglich. Im reperfundierten Herzen können kontraktile Dysfunktionen sowohl durch den Verlust von vitalem Myokard als auch durch *myocardial stunning* auftreten (121). Lediglich beim letztgenannten ist eine zeitabhängige Erholung zu erwarten (121). Dies fügt sich in die in Kapitel 3.2 präsentierten Ergebnisse insoweit ein, als sowohl der LVDP als auch der CF in allen vier Gruppen in der Reperfusionphase im Vergleich zu den präischämischen Werten signifikant reduziert sind. Die Voraussetzung für diese Annahme ist, dass von einer Reduktion der hämodynamischen Werte durch Nekrose (Con-Gruppe) oder durch ein ausgeprägtes *myocardial stunning* (IPC-Gruppen) ausgegangen wird. Somit wird eine Ursächlichkeit im

Nebeneinander von irreversibler und reversibler Zellfunktion vermutet. Nach der 60-minütigen Reperfusion wiesen die hämodynamische Werte der IPC-Gruppen eine Differenz zu den präischämischen Werten auf. Dies spiegelte sich in den Beobachtungen von Ellis et al. wider, welche in ihren Versuchen darstellten, dass eine funktionale Wiederherstellung nach einem Myokardinfarkt in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen verlängert war (122, 123). Auch bei einer Verlängerung der Reperfusion auf 120 Minuten ist das *myocardial stunning* immer noch präsent (124). Einen Bezug zur ischämischen Präkonditionierung stellten im Jahr 1992 Ovize et al. her, indem sie zeigten, dass eine Präkonditionierung weder die kontraktilen Funktionen während einer reversiblen Ischämie erhält, noch ein postischämisches *myocardial stunning* verhindert. Sie vermuteten eine Unabhängigkeit des *myocardial stunning* von den Mechanismen der Präkonditionierung (125). Dass das Phänomen des *myocardial stunning* neben anderen Versuchsaufbauten auch im isoliert-perfundierten Herzen im Rahmen der Langendorff-Apparatur reproduzierbar war, präsentierte Heusch mittels verschiedener Vorstudien (121, 126-128).

Auch wenn es weiterhin nicht möglich ist, die Ursache der fehlenden Korrelation zwischen hämodynamischen Parametern und Infarktgrößenreduktion nachzuweisen, liefert das *myocardial stunning* eine plausible Hypothese. Wie gezeigt, kann dieses sowohl im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung als auch bei isoliert-perfundierten Rattenherzen auftreten und kann somit auch im oben beschriebenen Versuchsablauf als ursächlich angesehen werden.

4.3.3 Ischämische Kontraktur

Neben der Infarktgröße und der hämodynamischen Daten wurden im Rahmen dieser Untersuchung auch der Zeitpunkt und die Höhe der ischämischen Kontraktur der myokardialen Zellen aufgezeichnet und ausgewertet. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den vier Gruppen jedoch nicht festgestellt werden. Die ischämische Kontraktur, welche sich in einem Anstieg des LVP_{max} während einer globalen Ischämie präsentiert, gilt laut Lasley et al. als Maß für den myokardialen Schaden (129). Daneben wird üblicherweise die Akzeleration der ischämischen Kontraktur als Prädiktor einer schlechten postischämischen Funktion angesehen (130, 131). Aus diesem Grund fanden sowohl die Höhe als auch der Zeitpunkt der ischämischen Kontraktur in diesem Versuch Berücksichtigung.

Bereits in den ersten Sekunden einer myokardialen Ischämie durchläuft das Herz durch einen vollständigen Stillstand ein akutes kontraktiles Versagen. Nach wenigen Minuten bilden sich

neue Querbrücken zwischen den myokardialen Aktin- und Myosin-Filamenten aus und resultieren so in einem allmählichen Spannungsaufbau (130). Dieses Phänomen der ischämischen Kontraktur wurde erstmals 1972 von Cooley et al. bei Patienten nach einer Bypassoperation beschrieben. Sie nannten die Extremform der ischämischen Kontraktur des linken Ventrikels „*stone heart*“ (130, 132). Das selten auftretende Vollbild des *stone heart* ist irreversibel. Als Grund wird ein Verlust myokardialer Energiereserven, vornehmlich eine ATP-Defizienz der Myofilamente, angenommen (132, 133). Katz et al. stellten eine Analogie zum *Rigor mortis* der Skelettmuskulatur her. Die ATP-Bindung an Myosin führt zu einer Dissoziation der Verknüpfung zwischen Aktin und Myosin, in deren Folge eine muskuläre Relaxation eintritt. Durch das Fehlen von ATP lösen sich die Produkte der ATP-Hydrolyse und die Verbindungen zwischen Aktin und Myosin bleiben bestehen. Diese können nur dissoziieren, wenn – wie oben genannt – unverbrauchtes ATP zur Verfügung steht (134). In weitergehenden Studien wird eine Verringerung des mittleren ATP-Gehalts auf etwa 12 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht mit dem Einsetzen der Kontraktur assoziiert. Das Vollbild der ischämischen Kontraktur tritt bei einem ATP-Abfall von circa 3 bis 4 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht auf (135). Weiter wird die Rolle des intrazellulären Ca^{2+} bei der Ausbildung der ischämischen Kontraktur durch Störung der Ca^{2+} -Homöostase, bedingt durch ein Versagen energieintensiver zellulärer Pumpmechanismen, als weitere Hypothese präsentiert (135). Ca^{2+} wird eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Kontraktion und Entspannung der Myosin-Aktin-Komplexe zugesprochen und ein Fehlen von Ca^{2+} ist ursächlich für einen verzögerten Kontrakturbeginn, eine geringere Geschwindigkeit bei vermindertem Kontraktorausmaß (135). Das Fortschreiten und der Schweregrad einer Kontraktur der isoliert perfundierten Herzen im Sinne einer kardiomechanischen Veränderung und die Akkumulation von intrazellulärem Ca^{2+} sind somit eng miteinander verknüpft, denn ein intrazellulärer Ca^{2+} -Überschuss kann den ATP-Verbrauch steigern, was sich dann final in der Kontraktur darstellt (136). Andererseits existiert jedoch auch ein Dissens in verschiedenen Publikationen, ob die Ca^{2+} -Akkumulation Ursache oder Folge der mit der ischämischen Kontraktur verbundenen ATP-Defizienz ist (130, 137). Als Möglichkeiten der Prävention der ischämischen Kontraktur nannten MacGregor et al. zum einen die beta-adrenerge Blockade, welche jedoch das Einsetzen der ischämischen Kontraktur unter normothermen Bedingungen lediglich verzögerte und nicht verhinderte (138). Zum anderen konkludierten sie, dass eine moderate Hypothermie das Auftreten dieser Komplikation vollständig verhinderte (138).

Wie bereits erwähnt, gilt die IPC als am stärksten wirksamer Schutz vor u.a. postischämischer kontraktile Dysfunktion und soll somit die postischämische Kontraktilität erhalten (32). Lasley et al. stellten eine enge Verbindung von ischämischer Kontraktur und myokardialen Schaden her. Der Zeitpunkt der ischämischen Kontraktur wurde als Anhaltspunkt für die antiischämische Wirksamkeit von Interventionen gewertet (129). Darüber hinaus wurde der Beginn der ischämischen Kontraktur mit dem Beginn des irreversiblen Zellschadens gleichgesetzt (139). Diese Annahmen stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Lasley et al., denn paradoxerweise beschleunigte die IPC den Beginn der ischämischen Kontraktur bei einer postischämisch verbesserten Funktion (140). Die Arbeitsgruppe um Asimakis publizierte ähnliche Annahmen, indem sie zeigten, dass der intraventrikuläre-endischämische Druck in den IPC-Herzen im Vergleich zur Con-Gruppe höher war (141). Kolocassides et al. publizierten, dass obgleich der Intensivierung der ischämischen Kontraktur eine Präkonditionierung die postischämische kontraktile Erholung schützte. Sie stellten in der Folge den prädiktiven Wert des Kontrakturausmaßes als Index für den Ischämieschaden in Frage (130).

In der Literatur gibt es zum einen Publikationen, welche eine Verbindung zwischen der Höhe der ischämischen Kontraktur und einem späteren myokardialen Schaden sehen. Auf der anderen Seite wird in weiteren Abhandlungen auch eine Divergenz zwischen Kontrakturhöhe und myokardialen Schaden illustriert. Im Rahmen dieser Arbeit war kein signifikanter Zusammenhang nachweisbar. Im Gegensatz zu Publikationen, welche eine Verbindung oder Divergenz zwischen Kontraktur und myokardialen Schaden sahen, waren in den Untersuchungen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Sowohl zwischen den Kontroll- und Interventionsgruppen als auch unter den Interventionsgruppen an sich waren keine signifikanten Differenzen erkennbar. Lediglich eine leichte Progredienz der Kontrakturhöhe war zwischen der Con-Gruppe und der E_{IPC3}-Gruppe feststellbar. Diese war jedoch nicht signifikant. Der Zeitpunkt der Kontraktur war bei allen Versuchsgruppen ähnlich. Somit ließ sich auch in dieser experimentellen Untersuchung der Umstand bestätigen, dass der prädiktive Wert der ischämischen Kontraktur für die Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zu vernachlässigen war.

4.3.4 Körpergewichte der Versuchstiere und Herznassgewichte

Ergänzend zu den bereits diskutierten und im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte (Infarktgröße, hämodynamische Daten und ischämischen Kontraktur) wurden das Körpergewicht der Versuchstiere vor dem Versuch, sowie das Herznassgewicht im Anschluss an den Versuch ermittelt. Bei beiden untersuchten Parametern ergaben sich zwischen den vier Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Bei vergleichbaren Körpergewichten der Versuchstiere wurden somit im Rahmen dieses Experimentes gleiche Ausgangsvoraussetzungen geschaffen. Ferner gilt bei ähnlichem Herznassgewicht, dass eine Konstanz bei den erzeugten Herzscheiben für die planimetrische Auswertung gewährleistet war und so die Visualisierung der gleichen Strukturen ermöglicht wurde. Auch unter diesem Gesichtspunkt sorgte die Homogenität für eine Vergleichbarkeit während der Auswertung.

4.4 Untersuchung des kardioprotektiven Einflusses des Effluats

4.4.1 Stimulation durch die ischämischen Präkonditionierung

Bei dem für dieses Experiment verwendeten IPC-Versuchsprotokoll handelt es sich um ein sowohl in dieser Arbeitsgruppe (142, 143) als auch in der Wissenschaft (144, 145) verbreitetes und somit vergleichbares IPC-Versuchsprotokoll. Jedoch bleibt das Protokoll mit der stärksten möglichen kardioprotektiven Wirkung weiterhin unbekannt, da bis heute kein allgemeingültiges und standardisiertes Protokoll etabliert wurde, welches die genaue Anzahl und Länge der Ischämie-Reperfusionen vorgibt (146). Wever et al. sahen in Versuchsabläufen mit 2-3 Zyklen einer 4-5-minütigen Ischämie das optimale Protokoll, welches die bestmögliche Protektion vermittelte (147). Es existieren verschiedene IPC-Protokolle mit einer sehr unterschiedlichen Anzahl und Länge der Ischämie-Reperfusionen. Ein „traditionelles IPC-Protokoll“ (148) besteht zumeist aus drei bis vier 5-minütigen Ischämiezyklen mit anschließender 5-minütiger Reperfusion (143, 144, 148). Trotzdem kann sowohl die Anzahl der IPC-Zyklen zwischen einem und acht variieren (145, 149-151), als auch die Länge der präkonditionierenden Ischämien zwischen einer und zehn Minuten wechseln (142, 152).

Im Vergleich zur IPC konnte in der RIPC gezeigt werden, dass zur signifikanten Infarktgrößenreduktion mindestens vier, besser jedoch sechs Zyklen notwendig waren (150). Bereits eine 2-minütige Ischämie bewirkte im Rahmen der RIPC eine signifikante

Infarktgrößenreduktion, welche die gleiche Protektion erzielt wie eine 5-minütige Ischämiephase. Eine weitere Verlängerung auf insgesamt zehn Minuten führte zu einem Verlust der Protektion im Vergleich zu der Kontrollgruppe (150).

Rossello et al. untersuchten die Auswirkungen einer Globalischämie von 25, 35 oder 45 Minuten auf die Infarktgröße bei IPC-Herzen (vier Zyklen mit je fünf Minuten Ischämie und fünf Minuten Reperfusion) mit anschließend 180 Minuten Reperfusion. Lediglich in den Gruppen nach 25 und 45 Minuten dauernder Globalischämie war ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der IPC-Gruppe zu verzeichnen (153).

Fernerhin kontrovers debattiert wurde die notwendige Reperfusionsdauer. Neben dieser wurde ein Zusammenhang mit der vorangegangenen Zeit der Ischämie diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Ischämiezeit von 33 Minuten mit einer folgenden 60-minütigen Reperfusion gewählt. Redel et al. zeigten, dass die Infarktgröße sowohl von der Ischämie- als auch von der Reperfusionsdauer abhängt. Insbesondere bei einer Ischämiezeit von weniger als einer Stunde war die Infarktgröße nicht nur von der Ischämiezeit selber, sondern auch in bedeutendem Maße von der Reperfusionzeit bestimmt (154). Darüber hinaus publizierten Rossello et al., dass prolongierte Reperusionsphasen zu einer Zunahme des Infarktareals führen. Die Dauer ihrer maximalen Reperusionszeit belief sich auf 180 Minuten, welche Rossello et al. jedoch noch nicht als das erreichbare Maximum ansahen, da sich kein Plateau der Infarktgröße einstellte und sie somit annahmen, dass über die 180 Minuten hinaus eine weitere Größenzunahme möglich ist (153). Auf der anderen Seite wurde eine Reperusionsdauer von 60 Minuten nicht nur als notwendig, sondern auch als ausreichend bewertet um Rückschlüsse auf funktionelle Unterschiede und die Nekrosegröße ziehen zu können (155). In der vorliegenden Arbeit standen nicht die absoluten Infarktgrößen im Vordergrund, sondern die relative Reduktion des Nekroseareals wurde untersucht. Aus diesem Grund ließ sich die, im Vergleich zu den vorgenannten Publikationen, kurze Reperusionsphase durchaus rechtfertigen und war für das vorliegende Experiment sowie die Beantwortung der Fragestellung angemessen.

4.4.2 Transfer der Kardioprotektion mittels koronarem Effluat

Die Kardioprotektion mittels IPC wurde 1986 durch Murry et al. vorgestellt (33). Bei der IPC stellte das Herz sowohl Interventions- als auch im Verlauf das Zielorgan dar. Im Rahmen der RIPC wurden die Orte von Intervention und Wirkung voneinander getrennt, befanden sich jedoch weiterhin in einem Organismus (37). Beim Transfer von Plasma von RIPC-

Tieren wurde das Plasma den Organismus des Donor-Tieres entnommen, um im Akzeptor-Tier zu wirken. Sowohl bei der RIPC als auch beim RIPC-Plasma-Transfer wirkten jedoch Mediatoren aus unterschiedlichen Gewebestrukturen (156) auf die Kardiomyozyten ein. Aus diesem Grund wurde von Dickson et al. (63, 64) eine Methode im Sinne eines „Ein-Organ-Transfer-der-Kardioprotektion“ (156) etabliert. Mittels gepooltem IPC-Effluat der isoliert-perfundierten Donor-Herzen konnten sie erstmals die kardioprotektive Wirkung auf isoliert-perfundierte Akzeptor-Herzen übertragen (64). Im Rahmen dieser Studie wurde die Kardioprotektion mithilfe von Effluat vermittelt, welches nach drei IPC-Zyklen von je fünf Minuten während der sich anschließenden 10-minütigen Reperfusionen gesammelt und über 30 Minuten den Akzeptor-Herzen vor der 40-minütigen Ischämie transfundiert wurde. In nachfolgenden Studien wurde ebenfalls gepooltes Effluat, welches nach einer 5-minütigen Ischämie in der darauffolgenden 5-minütigen Reperfusion gesammelt wurde, appliziert (65, 66, 68, 69). Diese Applikation geschah entweder über eine Zeit von 10 (66) oder 15 Minuten (65, 69), oder es wurde ein festes Volumen von 150 ml transfundiert (68). Zwischen den genannten Versuchsprotokollen bestanden viele Ähnlichkeiten, u.a. in der Applikationsform. Allerdings unterschieden sich diese markant von dem Versuchsaufbau, welcher dieser Arbeit zugrunde lag, denn dort wurde immer gepooltes, d.h. über alle Reperfusionen gesammeltes und gemischtes, Effluat verwendet. Somit war mittels dieser Versuche keine Differenzierung der Wirkung in Abhängigkeit der Anzahl der durchlaufenen Ischämie-Reperfusionen möglich. Die vorliegende Studie ermöglicht die isolierte Betrachtung der kardioprotektiven Wirkung der Effluate jedes einzelnen Reperfusionenzyklus.

4.5 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind rein deskriptiv. Zur Durchführung der vorliegenden Studie wurden insgesamt 20 junge, männliche und gesunde Wistar-Ratten verwendet. Eine direkte Übertragung auf ein großes, menschliches Kollektiv ist somit nicht möglich. Einen unmittelbaren Gewinn durch kardioprotektive Eigenschaften aus koronarem Effluat wird es im späteren klinischen Alltag aufgrund der nicht vergleichbaren Kollektive wahrscheinlich nicht geben. Vielmehr werden jene vermehrt lebensälter, nicht ausschließlich männlichen Geschlechts sein und darüber hinaus noch Komorbiditäten mit entsprechenden Medikationen aufweisen. Überdies unterscheidet sich der menschliche Organismus durch verschiedenartige (patho-) physiologische Mechanismen von den Versuchstieren. Jedoch wurden in dieser Arbeit junge, männliche und gesunde Tiere eingesetzt, um mögliche

Störfaktoren auszuschließen und eine Vergleichbarkeit mit vorherigen Studien zu erreichen. Da die Daten dieser Arbeit in-vitro mithilfe der Langendorff-Anlage an isoliert-perfundierten Herzen erhoben wurden, sind die Ergebnisse durch den fehlenden systemischen Einfluss des Gesamtorganismus limitiert.

Außerdem fokussierte sich diese Arbeit auf die Darstellung eines potentiellen Unterschiedes in Bezug auf die Kardioprotektion des koronaren Effluats nach einer variablen Anzahl an IPC-Zyklen. Eine Untersuchung der Zusammensetzung und der angestoßenen Mechanismen in Abhängigkeit der durchlaufenen IPC-Zyklen fand nicht statt. Die Limitationen sind demnach mit der zuvor skizzierten Schwerpunktsetzung dieser Arbeit zu erklären.

5 Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

In den vergangenen Jahren gab es zahlreiche Studien, welche die Bedeutung von koronarem Effluat unter dem Aspekt der Protektion vor einem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden demonstrierten und auch die Eigenschaften der hierfür verantwortlichen humoralen Faktoren eingrenzten. Im Rahmen dieser Studien wurde jedoch ausschließlich gepooltes Effluat mehrerer Reperfusionszyklen verwendet. Mithilfe der Ergebnisse dieser Arbeit wird präsentiert, dass durch einen einzigen fünfminütigen IPC-Zyklus eine ausreichende Menge der kardioprotektiv wirkenden, humoralen Faktoren ausgeschüttet wird. Diese bewirken anschließend eine Infarktgrößenreduktion in den Herzen männlicher Ratten. Es zeigt sich keine Amplifizierung der kardioprotektiven Wirkung des Effluats mit einer Verstärkung der Infarktgrößenreduktion durch weitere IPC-Stimuli.

Unbeachtet blieben in dieser Arbeit die Zusammensetzung der verwendeten Effluate. Eine sich im Verlauf des Versuchs entwickelte veränderte Effluatzusammensetzung basierend auf dynamisch induzierten metabolischen Prozessen konnte so nicht entdeckt werden. Verschiedene humorale Faktoren, freigesetzt nach einer unterschiedlichen Anzahl an IPC-Zyklen, können in ihrer Kombination eine vergleichbare Infarktgrößenreduktion bewirken. Hier zeichnet sich ein Desiderat für weitere Untersuchungen des Plasmas heraus, beispielsweise besteht die Möglichkeit mittels Plasmaproteasom-Analysen einzelne Inhaltsstoffe bzw. humorale Faktoren in Qualität, Quantität und zeitlichem Verlauf detailliert aufzuschlüsseln.

Mithilfe dieser Erkenntnisse wäre es in Zusammenschau mit den bereits publizierten Untersuchungen möglich, in Hinsicht auf die Zusammensetzung von IPC-Effluaten und RIPC-Plasmen weitere Rückschlüsse auf die zeitliche Dynamik und die biochemischen Prozesse zu gewinnen. Die Kenntnis dieser Schlüsselstellen in der Wirkweise der humoralen Faktoren könnte eine Vergleichbarkeit zwischen dem tierischen und dem menschlichen Modell und einen Transfer von einem in-vitro- zu einem in-vivo-Versuch ermöglichen.

Bei einer Identifizierung der wirksamen Substanzen wäre in der Folge auch eine Synthetisierung unter laborchemischen und pharmakologischen Bedingungen denkbar und eine anschließende klinische Nutzbarkeit realisierbar. Eine Anwendung von einem oder mehreren Medikamenten, basierend auf den humoralen Faktoren, präventiv zur Risikominimierung, präischämisch als Primärprophylaxe bei elektiven Eingriffen oder postischämisch nach einem Infarktereignis im Rahmen der Sekundärprophylaxe ist vorstellbar. Um dies zu

verwirklichen, ist sowohl ein Kenntnis über die Dosierung als auch die Konservierung der Substanzen eine Grundvoraussetzung.

Darüber hinaus kann das gewählte Anästhesieverfahren genauso Einfluss auf die Infarktgrößenreduktion nehmen. Im Rahmen von IPC- und RIPC-Versuchen konnte bereits demonstriert werden, dass Narkotika, wie beispielsweise Propofol, den kardioprotektiven Effekt reduzieren oder gar eliminieren können. Zukünftige Untersuchungen des Transfers der durch humorale Faktoren vermittelten Kardioprotektion müssen auch den Einfluss des verwendeten Anästhesieregimes mitberücksichtigen und in vergleichender Weise gegenüberstellen. Ein perioperativer Einsatz von kardioprotektiven Medikamenten, basierend auf humoralen Faktoren, im Rahmen der Kardiologie oder Kardiochirurgie bedarf einer Untersuchung der Wechselwirkung dieser Medikamente mit standardmäßig eingesetzten Narkotika.

In vorangegangenen Publikationen wurden bereits die kardioprotektiven Mechanismen der ischämischen (Fern-) Präkonditionierung unter der Einwirkung von Störfaktoren (wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, Atherosklerose, Diabetes oder Hyperlipoproteinämie) untersucht. Diese Störfaktoren können ebenfalls eine Reduktion bis hin zu einem Verlust des kardioprotektiven Effekts bewirken. Auch die kardioprotektive Wirksamkeit von Koronareffluat durch humorale Faktoren sollte in weiteren Studien unter diesen Gesichtspunkten begutachtet werden.

Schlussendlich sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu dienen, weitere Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Ausschüttung von kardioprotektiven Substanzen in das IPC-Effluat zu gewinnen. In der Gesamtschau mit den bereits bestehenden Publikationen hinsichtlich der Effluatzusammensetzung wäre es möglich, IPC-Protokolle unter dem Aspekt ihrer Kardioprotektion zu optimieren. In ferner Zukunft wäre eine Übertragung von Erkenntnissen vom Labor in die Kliniken das große Ziel. Schlussendlich bedeutet eine Verringerung der Infarktgrößen sowohl im Tiermodell als auch im Menschen eine Reduktion von Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies hat dann eine erhöhte Überlebenschance der Betroffenen zur Folge.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Schmitz R, Jordan S, Müters S, Neuhauser H. Population-wide use of behavioural prevention and counselling programmes for lifestyle-related cardiovascular risk factors in Germany. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19(4):849-56.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg). Koronare Herzkrankheit. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012«. RKI, Berlin. 2014.
3. Schmidt J. Weltweit häufigste Todesursache: Überholt Krebs kardiovaskuläre Erkrankungen? *CardioVasc.* 2019;19(5):11-.
4. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie 12 Reihe 4. 2017.
5. Statistisches Bundesamt. Alter im Wandel. Ältere Menschen in Deutschland und der EU 2012 [Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Bevoelkerungsstand/Publikationen/Downloads-Bevoelkerungsstand/alter-im-wandel-0010017129004.pdf?__blob=publicationFile].
6. Nowossadeck E. Demografische Alterung und Folgen für das Gesundheitswesen. In: Robert Koch-Institut, editor. GBE kompakt 3(2) Berlin 2012.
7. Marx N, Altiok E, Brandenburg V, Stierle U, Schwabe K, Giannitsis E, et al. Herz. In: Braun J, Müller-Wieland D, Renz-Polster H, Krautzig S, editors. Basislehrbuch Innere Medizin. 6 ed. München: Elsevier; 2018. p. 26-181.
8. Herold G. Innere Medizin. Köln: Gerd Herold; 2017. 237-62 p.
9. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2551-67.
10. Heidrich J, Wellmann J, Hense HW, Siebert E, Liese AD, Löwel H, et al. Klassische Risikofaktoren für Herzinfarkt und Gesamtsterblichkeit in der Bevölkerung. *Zeitschrift für Kardiologie.* 2003;92(6):445-54.
11. Gehring J, Klein G. Risikofaktoren für Arteriosklerose und Herzinfarkt. Leben mit der koronaren Herzkrankheit. Munich: Urban und Vogel; 2015. p. 33-82.
12. 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 elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal.* 2017;39(2):119-77.
13. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
14. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56(5):786-94.
15. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz.* 2008;33(2):88-100.
16. Ramachandra CJA, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Lin YH, Hausenloy DJ. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection. *EBioMedicine.* 2020;57:102884.
17. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International review of cell and molecular biology.* 2012;298:229–317.
18. Jennings RB, Reimer KA. The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia. *Annual Review of Medicine.* 1991;42(1):225-46.

19. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1723-41.
20. Avkiran M, Marber MS. Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(5):747-53.
21. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012;16(3):123-32.
22. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
23. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(4):193-209.
24. Krug A, Du Mesnil de R, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res*. 1966;19(1):57-62.
25. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):481-97.
26. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):556-92.
27. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*. 2002;55(4):739-48.
28. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307 (Pt 1)(Pt 1):93-8.
29. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
30. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):334-41.
31. Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(5):629-37.
32. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res*. 1993;27(4):542-50.
33. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
34. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1113-51.
35. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342(8866):276-7.
36. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.
37. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-9.
38. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote Ischemic Conditioning. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(2):177-95.

39. 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.
40. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84(1):350-6.
41. Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;270(2):681-9.
42. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*. 1995;268(5 Pt 2):H2157-61.
43. Cohen MV, Downey JM. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *Br J Pharmacol*. 2015;172(8):1913-32.
44. Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24(3):225-34.
45. Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*. 1995;77(3):611-21.
46. Cohen MV, Philipp S, Krieg T, Cui L, Kuno A, Solodushko V, et al. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(4):842-51.
47. Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res*. 2005;97(4):329-36.
48. Akopova O. Mitochondrial KATP Channel Function under Hypoxia. 2018.
49. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007;12(3-4):217-34.
50. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):308-14.
51. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):448-60.
52. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):H971-6.
53. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(1):32-40.
54. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*. 2009;84(2):201-8.
55. Hadebe N, Cour M, Lecour S. The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res Cardiol*. 2018;113(2):9.
56. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 2005;112(25):3911-8.

57. Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012;26(3):227-37.
58. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):178-85.
59. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):414-9.
60. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):771-85.
61. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(6):70.
62. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, et al. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond).* 2009;117(5):191-200.
63. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis.* 1999;8(2):123-9.
64. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol.* 1999;277(6):H2451-7.
65. Huffman LC, Koch SE, Butler KL. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(1):H257-62.
66. Breivik L, Helgeland E, Aarnes EK, Mrdalj J, Jonassen AK. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(1):135-45.
67. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ Res.* 2015;117(3):279-88.
68. Serejo FC, Rodrigues LF, Jr., da Silva Tavares KC, de Carvalho AC, Nascimento JH. Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;49(4):214-20.
69. Maciel L, de Oliveira DF, Verissimo da Costa GC, Bisch PM, Nascimento JHM. Cardioprotection by the transfer of coronary effluent from ischaemic preconditioned rat hearts: identification of cardioprotective humoral factors. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(5):52.
70. Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci.* 1998;13:203-10.
71. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 1895;61(6):291-332.
72. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res.* 2000;41(6):613-27.

73. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;55(2):113-26.
74. 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid [Internet]. Thieme Gruppe. 2020 [cited 2020/04/29]. Available from: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-20-03075>.
75. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*. 1985;121(3):522-30.
76. Raupach A, Reinle J, Stroethoff M, Mathes A, Heinen A, Hollmann MW, et al. Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *J Clin Med*. 2019;8(4).
77. Torregroza C, Feige K, Schneider L, Bunte S, Stroethoff M, Heinen A, et al. Influence of Hyperglycemia on Dexmedetomidine-Induced Cardioprotection in the Isolated Perfused Rat Heart. *J Clin Med*. 2020;9(5).
78. 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). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):8880.
79. Bunte S, Behmenburg F, Eckelskemper F, Mohr F, Stroethoff M, Raupach A, et al. Cardioprotection by Humoral Factors Released After Remote Ischemic Preconditioning Depends on Anesthetic Regimen. *Crit Care Med*. 2019;47(3):e250-e5.
80. Stroethoff M, Goetze L, Torregroza C, Bunte S, Raupach A, Heinen A, et al. The Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Induces Cardioprotection that Requires MT2 Receptor Activation and Release of Reactive Oxygen Species. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020;34(3):303-10.
81. Torregroza C, Glashoerster CO, Feige K, Stroethoff M, Raupach A, Heinen A, et al. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
82. Clements-Jewery H, Curtis M. The Langendorff Preparation. 2013. p. 187-96.
83. Li H, Liu C, Bao M, Liu W, Nie Y, Lian H, et al. Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart. *J Cell Mol Med*. 2020;24(24):14619-25.
84. Berridge BR, Van Vleet JF, Herman E. Chapter 46 - Cardiac, Vascular, and Skeletal Muscle Systems. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, editors. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2013. p. 1567-665.
85. Olejnickova V, Novakova M, Provaznik I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Med Biol Eng Comput*. 2015;53(7):669-78.
86. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(6):940-50.
87. Schmitz-Spanke S, Seyfried E, Schwanke U, Korbmacher B, Sunderdiek U, Winter J, et al. [The isolated rabbit heart: comparison between five different modifications]. *Herz*. 2002;27(8):803-13.
88. Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol*. 1967;212(4):804-14.

89. Damerau W, Ibel J, Thürich T, Assadnazari H, Zimmer G. Generation of free radicals in Langendorff and working hearts during normoxia, hypoxia, and reoxygenation. *Basic Research in Cardiology*. 1993;88(2):141-9.
90. Avkiran M, Curtis MJ. Independent dual perfusion of left and right coronary arteries in isolated rat hearts. *Am J Physiol*. 1991;261(6 Pt 2):H2082-90.
91. Dhein S. The Langendorff Heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, editors. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 155-72.
92. Huhn R, Weber NC, Preckel B, Schlack W, Bauer I, Hollmann MW, et al. Age-related loss of cardiac preconditioning: impact of protein kinase A. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):116-21.
93. Liu L, Zhu J, Brink PR, Glass PS, Rebecchi MJ. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55(5):622-30.
94. Heinen A, Behmenburg F, Aytulun A, Dierkes M, Zerbin L, Kaisers W, et al. The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent. *J Transl Med*. 2018;16(1):112.
95. Booth EA, Obeid NR, Lucchesi BR. Activation of estrogen receptor-alpha protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H2039-47.
96. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:67.
97. Bretag AH. What is the solution? *Nature*. 1984;307(5947):116-.
98. Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klinische Wochenschrift*. 1932;11(18):757-9.
99. Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse [zitiert am 24.08.2021] [Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Düsseldorf, 2005, Verfügbar unter: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=3343>].
100. Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, Hearse DJ. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(11):867-78.
101. MacGowan GA, Du C, Cowan DB, Stamm C, McGowan FX, Solaro RJ, et al. Ischemic dysfunction in transgenic mice expressing troponin I lacking protein kinase C phosphorylation sites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(2):H835-43.
102. Neitzel AS, Carley AN, Severson DL. Chylomicron and palmitate metabolism by perfused hearts from diabetic mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003;284(2):E357-E65.
103. Peart J, Headrick JP. Intrinsic A(1) adenosine receptor activation during ischemia or reperfusion improves recovery in mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(5):H2166-75.
104. Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC. Myocardial ischemia/reperfusion injury in the inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Life Sci*. 1999;65(9):935-45.
105. Dvornikov A, Mi Y-C, Chan C-K. Transient Analysis of Force-Frequency Relationships in Rat Hearts Perfused by Krebs-Henseleit and Tyrode Solutions with Different [Ca²⁺]_o. *Cardiovascular Engineering and Technology*. 2012;3.
106. Hunnius C. Berlin, Boston: De Gruyter; 1992.
107. Fülöp L, Szigeti G, Magyar J, Szentandrassy N, Ivanics T, Miklós Z, et al. Differences in electrophysiological and contractile properties of mammalian cardiac

- tissues bathed in bicarbonate – and HEPES-buffered solutions. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2003;178(1):11-8.
108. Orita H, Fukasawa M, Hirooka S, Uchino H, Fukui K, Washio M. In vitro evaluation of phosphate, bicarbonate, and Hepes buffered storage solutions on hypothermic injury to immature myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1994;8(6):851-9.
 109. Lindsey ML, Bolli R, Jr. JMC, Du X-J, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018;314(4):H812-H38.
 110. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *American Heart Journal*. 1981;101(5):593-600.
 111. Opie LH. Myocardial infarct size. Part I. Basic considerations. *American Heart Journal*. 1980;100(3):355-72.
 112. Behmenburg F, Trefz L, Dorsch M, Ströthoff M, Mathes A, Raupach A, et al. Milrinone-Induced Postconditioning Requires Activation of Mitochondrial Ca(2+)-sensitive Potassium (mBK(Ca)) Channels. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018;32(5):2142-8.
 113. Frässdorf J, Huhn R, Niersmann C, Weber NC, Schlack W, Preckel B, et al. Morphine induces preconditioning via activation of mitochondrial K(Ca) channels. *Can J Anaesth*. 2010;57(8):767-73.
 114. Das A, Xi L, Kukreja RC. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29572-85.
 115. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66(6):1146-9.
 116. Bolli R. Myocardial 'stunning' in man. *Circulation*. 1992;86(6):1671-91.
 117. Vaidya Y, Cavanaugh SM, Dharmoon AS. Myocardial Stunning and Hibernation. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
 118. Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, Garcia-Dorado D, Guarnieri C, Heusch G, et al. "Myocardial stunning" remaining questions. *Cardiovasc Res*. 1998;38(3):549-58.
 119. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*. 1990;82(3):723-38.
 120. Pomblum VJ, Korbmacher B, Cleveland S, Sunderdiek U, Klocke RC, Schipke JD. Cardiac stunning in the clinic: the full picture. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010;10(1):86-91.
 121. Heusch G. Myocardial stunning and hibernation revisited. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(7):522-36.
 122. Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA. Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1983;1(4):1047-55.
 123. Kloner RA. Stunned and Hibernating Myocardium: Where Are We Nearly 4 Decades Later? *J Am Heart Assoc*. 2020;9(3):e015502.
 124. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. 1991;260(3 Pt 2):H796-804.
 125. Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation*. 1992;85(6):2247-54.
 126. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased

- myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res.* 1995;76(6):1036-48.
127. Taegtmeyer H, Roberts AF, Raine AE. Energy metabolism in reperfused heart muscle: metabolic correlates to return of function. *J Am Coll Cardiol.* 1985;6(4):864-70.
 128. du Toit EF, Opie LH. Role for the Na⁺/H⁺ exchanger in reperfusion stunning in isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(6):877-83.
 129. Lasley RD, Rhee JW, Van Wylen DG, Mentzer RM, Jr. Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(1):39-47.
 130. Kolocassides KG, Galiñanes M, Hearse DJ. Dichotomy of Ischemic Preconditioning. *Circulation.* 1996;93(9):1725-33.
 131. Kolocassides KG, Seymour AM, Galiñanes M, Hearse DJ. Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(5):1045-57.
 132. Cooley DA, Reul GJ, Wukasch DC. Ischemic contracture of the heart: "stone heart". *Am J Cardiol.* 1972;29(4):575-7.
 133. Katz AM, Tada M. The "stone heart": a challenge to the biochemist. *Am J Cardiol.* 1972;29(4):578-80.
 134. Katz AM, Tada M. The "stone heart" and other challenges to the biochemist. *Am J Cardiol.* 1977;39(7):1073-7.
 135. Hearse DJ, Garlick PB, Humphrey SM. Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention. *Am J Cardiol.* 1977;39(7):986-93.
 136. Henry PD, Schuchleib R, Davis J, Weiss ES, Sobel BE. Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. *Am J Physiol.* 1977;233(6):H677-84.
 137. Ventura-Clapier R, Veksler V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res.* 1994;74(5):920-9.
 138. MacGregor DC, Wilson GJ, Tanaka S, Holness DE, Lixfeld W, Silver MD, et al. Ischemic contracture of the left ventricle. Production and prevention. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1975;70(6):945-54.
 139. Ganote CE, Seabra-Gomes R, Nayler WG, Jennings RB. Irreversible myocardial injury in anoxic perfused rat hearts. *Am J Pathol.* 1975;80(3):419-50.
 140. Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RM, Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1993;27(4):565-70.
 141. Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G, Conti VR. Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):H887-94.
 142. Goergens JI, Heinen NM, Zoller J, Preckel B, Bauer I, Huhn R, et al. Influence of Hyperglycemia During Different Phases of Ischemic Preconditioning on Cardioprotection-A Focus on Apoptosis and Aggregation of Granulocytes. *Shock.* 2020;53(5):637-45.
 143. Raupach A, Feige K, Reiter C, Brandenburger T, Heinen N, Heinen A, et al. Remote ischemic preconditioning does not induce activation of Akt and STAT5 in the rat heart. *Exp Ther Med.* 2021;21(5):432.
 144. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil

- activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation*. 2001;103(12):1624-30.
145. Katakam PV, 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):R920-6.
 146. Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation*. 2007;84(4):445-58.
 147. Wever KE, Hooijmans CR, Riksen NP, Sterenborg TB, Sena ES, Ritskes-Hoitinga M, et al. Determinants of the Efficacy of Cardiac Ischemic Preconditioning: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142021.
 148. Cocking S, Wilson MG, Nichols D, Cable NT, Green DJ, Thijssen DHJ, et al. Is There an Optimal Ischemic-Preconditioning Dose to Improve Cycling Performance? *Int J Sports Physiol Perform*. 2018;13(3):274-82.
 149. Zografos TA, Katritsis GD, Tsiafoutis I, Bourboulis N, Katsivas A, Katritsis DG. Effect of one-cycle remote ischemic preconditioning to reduce myocardial injury during percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2014;113(12):2013-7.
 150. Johnsen J, Pryds K, Salman R, Løfgren B, Kristiansen SB, Bøtker HE. The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(2):10.
 151. Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*. 1999;276(4):H1229-35.
 152. Barbosa V, Sievers RE, Zaugg CE, Wolfe CL. Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts. *Am Heart J*. 1996;131(2):224-30.
 153. Rossello X, Hall A, Bell R, Yellon D. Characterization of the Langendorff Perfused Isolated Mouse Heart Model of Global Ischemia-Reperfusion Injury: Impact of Ischemia and Reperfusion Length on Infarct Size and LDH Release. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2015;21.
 154. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, Lange M, Eckle T, Eltzschig H, et al. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(1):84-93.
 155. Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One Hour Reperfusion is Enough to Assess Function and Infarct Size With TTC Staining in Langendorff Rat Model. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2009;23(4):327-31.
 156. Leung CH, Wang L, Nielsen JM, Tropak MB, Fu YY, Kato H, et al. Remote cardioprotection by transfer of coronary effluent from ischemic preconditioned rabbit heart preserves mitochondrial integrity and function via adenosine receptor activation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(1):7-17.

Danksagungen

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und ohne deren Unterstützung ich diese Promotionsschrift nicht hätte anfertigen können.

Für die Möglichkeit der experimentellen Forschung in seiner Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf möchte ich mich bei Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen** bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen** für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die durchgehende Unterstützung bei Fragen und Problemen als Arbeitsgruppenleiter. Des Weiteren danke ich Herrn **Prof. Dr. Dr. med. André Heinen** für seine Supervision.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ (UKD), im Besonderen bei Frau **Dr. med. Katharina Feige**, Frau **Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Annika Raupach** und Frau **Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer**, für die konstruktive Zusammenarbeit, die fortwährende Hilfsbereitschaft und die freundliche Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem meinen Mitdotorandinnen Frau **Dr. med. Kitti Maas**, Frau **Nicole Gaida** und Frau **Dr. med. Elif Karakurt** und meinen Mitdotoranden Herrn **Lukas Götze** und Herrn **Dr. med. Osameh Jalajel**, für die gute Zusammenarbeit, die Kollegialität und die gute Einarbeitung.

Herzlich möchte ich mich auch bei Frau **Julia Stangl M.A.** und Herrn **Timo Weber M.A.** für ihr gewissenhaftes Lektorat und ihre ehrlichen Rückmeldungen bedanken.

Meinen lieben **Freund:innen** möchte ich für ihre fortwährende Unterstützung danken, mit welcher sie mir immer zu Seite standen und den Rücken stärkten.

Mein herausragender Dank, der nur schwerlich in Worte zu fassen ist, gilt meinen geliebten Eltern, Frau **Ute Mühlenbernd** und Herrn **Dr. med. Günther Mühlenbernd**, und meinem geliebten Partner Herrn **Kai Luca Richrath** für ihre Ausdauer, ihre ewige Ruhe, ihre fortwährende Geduld und für ihren ständigen Rückhalt.