

**Die Kinetik der RNase-1 in der ischämischen Präkonditionierung bei
kardiovaskulären Eingriffen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Flicker, Luisa
aus Mosbach

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Universitätsklinikum Gießen
Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Böning

Gutachter: Prof. Dr. Timm Bauer

Tag der Disputation: 18.06.2024

Gewidmet meinen Eltern, meinen Großeltern und Max

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stellenwert der Herzchirurgie.....	1
1.1.1	<i>Kardiovaskuläre Erkrankungen</i>	1
1.1.2	<i>Operative Behandlung</i>	1
1.2	Ischämie-Reperfusionsschaden.....	3
1.2.1	<i>Bedeutung</i>	3
1.2.2	<i>Pathomechanismus Ischämie-Reperfusionsschaden</i>	4
1.2.3	<i>Prävention des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Kardiochirurgie</i>	9
1.3	Ischämische Konditionierung.....	11
1.3.1	<i>Bedeutung</i>	11
1.3.2	<i>Entwicklung</i>	11
1.3.3	<i>Mögliche Signalwege</i>	13
1.3.4	<i>RNase-1 als Mediator</i>	15
1.3.5	<i>Aktuelle Studienlage</i>	16
1.4	Fragestellung.....	18
2	Material und Methodik	19
2.1	Studiendesign.....	19
2.2	Studienpopulation.....	19
2.3	Chirurgische Daten.....	20
2.4	Studienablauf.....	21
2.5	Analyse der Proben.....	23
2.5.1	<i>Allgemein</i>	23
2.5.2	<i>RNA-Isolation und -Quantifizierung</i>	23
2.5.3	<i>TNF-α Bestimmung</i>	24
2.5.4	<i>Bestimmung der RNase-1-Aktivität</i>	26
2.6	Statistische Analyse.....	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Vergleich vier vs. sechs Zyklen RIPC.....	30
3.1.1	<i>RNA</i>	30
3.1.2	<i>RNase-1</i>	31
3.1.3	<i>TNF-α</i>	31
3.2	Kinetik der RNase-1.....	32
3.3	Kinetik der eRNA.....	35
3.4	Kinetik des TNF- α	37
4	Diskussion	41
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	41
4.1.1	<i>Kinetik der RNase-1 während der RIPC</i>	41
4.1.2	<i>Kinetik des TNF-α während der RIPC</i>	42
4.1.3	<i>Kinetik der eRNA während der RIPC</i>	43
4.1.4	<i>Transkardialer Gradient</i>	44
4.1.5	<i>Postoperative Kinetik der RNase-1</i>	45
4.2	Limitationen und Ausblick.....	46
	Zusammenfassung	49
	Summary	50
	Abkürzungsverzeichnis	51
	Abbildungsverzeichnis	52
	Tabellenverzeichnis	53
	Literaturverzeichnis	54
	Anhang	75
	Anhang 1: Aufklärungsbogen.....	75
	Anhang 2: Ethikantrag.....	79
	Anhang 3: Lizenzen.....	80

Publikationsverzeichnis	81
Ehrenwörtliche Erklärung.....	82
Danksagung.....	83

1 Einleitung

1.1 Stellenwert der Herzchirurgie

1.1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Die weltweite Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen nimmt stetig zu und hat sich in den letzten 30 Jahren fast verdoppelt (Roth et al., 2020). Mit steigender Prävalenz wächst auch die Mortalität durch Herz-Kreislaufkrankungen, die global die häufigste Todesursache darstellen (WHO, 2021). Es starben im Jahr 2019 ca. 18,6 Millionen Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung. Dazu zählen beispielsweise hypertensive Herzerkrankungen, Kardiomyopathien, ischämische Herzerkrankungen sowie Schlaganfälle und intrazerebrale Blutungen. Davon bilden die ischämischen Herzerkrankungen mit 49,2 % aller durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten Tode weltweit den mit Abstand größten Anteil. Neben der Zunahme der Mortalität lässt sich eine deutliche Steigerung des Anteils der mit Behinderung bzw. mit Krankheit gelebten Jahre verzeichnen. Zurückzuführen sind diese steigenden Werte auf ebenso zunehmende Risiken für Herz-Kreislaufkrankungen, die sich aus metabolischen, umwelt- und verhaltensbedingten Faktoren zusammensetzen. Dazu zählen unter anderem ein hoher systolischer Blutdruck, Hypercholesterinämie, Adipositas, Hyperglykämie, wenig körperliche Aktivität sowie Tabak- und Alkoholmissbrauch.

Auch in Deutschland stellen die Herz-Kreislaufkrankungen noch vor den Krebserkrankungen mit 331 211 Verstorbenen im Jahr 2019 die Haupttodesursache dar.

1.1.2 Operative Behandlung

Einige Herzerkrankungen können neben der medikamentösen Therapie durch kardiologische Interventionen, beispielsweise die perkutane Koronarintervention (PCI), oder durch herzchirurgische Eingriffe behandelt werden (Bangalore et al., 2020).

Allein im Jahr 2021 wurden trotz der COVID-19-Pandemie in Deutschland 161 261 herzchirurgische Operationen durchgeführt (Beckmann et al., 2022). Dazu zählen unter anderem Bypass-Operationen, Eingriffe an den Herzklappen, kongenitale Herzoperationen sowie Herzschrittmacher- und Defibrillatoren-Eingriffe und Operationen an der herznahen Aorta (Beckmann et al., 2022).

Eine große Gruppe der herzchirurgischen Eingriffe machen dabei die arteriellen oder venösen Koronararterienbypass-Operationen (CABG) aus (Beckmann et al., 2022).

Durch diese Art von Eingriff wird eine Reperfusion der ischämischen Anteile des Herzens ermöglicht (Golabchi et al., 2012). Die Summe aus der Gruppe der isolierten CABG und der CABG in Kombination mit anderen herzchirurgischen Eingriffen entspricht mit 36 122 Fällen ungefähr einem Viertel aller Eingriffe. Dabei handelt es sich in 27 947 Fällen um isolierte CABG. Sowohl die kombinierten als auch die isolierten Eingriffe wurden zum Großteil (97,4 % der kombinierten und 76,1 % der isolierten) mithilfe einer extrakorporalen Zirkulation durch die Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt (Beckmann et al., 2022).

Neben den CABG bilden die Herzklappen-Operationen die zweite große Gruppe herzchirurgischer Eingriffe. Von den 36 714 Herzklappen-Operationen im Jahr 2021 wurde ca. die Hälfte mit HLM durchgeführt. Dabei wurden 19 242 Herzklappen kathetergestützt eingesetzt (Beckmann et al., 2022).

Sowohl bei der Behandlung der Herzklappen als auch im Kontext von ischämischen Herzerkrankungen ist in den letzten Jahren eine Zunahme der Interventionen bei sinkender Tendenz der chirurgischen Eingriffe zu verzeichnen (Andresen, 2021; Beckmann et al., 2022). Dies beruht sicherlich auf der weniger invasiven und daher leichter durchführbaren Natur der interventionellen Eingriffe (Caldonazo et al., 2022). Außerdem stellen die Interventionen eine Behandlungsoption für Patientengruppen mit einem hohen Operationsrisiko dar (Deb et al., 2013). Die Zunahme der PCI im Vergleich zur CABG beispielsweise zeichnet sich jedoch nicht nur durch positive Effekte aus, sondern auch durch eine höhere Notwendigkeit sekundärer Eingriffe nach PCI als nach CABG (Deb et al., 2013). Außerdem konnte in der Orbita-Studie bei Patienten und Patientinnen mit einer 1-Gefäß-KHK kein signifikanter Vorteil der PCI im Vergleich zu einer Scheinbehandlung gezeigt werden, was auf eine Überversorgung mittels PCI hindeutet (Al-Lamee et al., 2018).

Empfohlen wird die PCI vor allem bei einfachen Koronarerkrankungen mit niedrigem SYNTAX-Score (Deb et al., 2013; Neumann et al., 2019). Letzterer beschreibt dabei die Komplexität der koronaren Herzerkrankungen (Andresen, 2021). Die demografische Entwicklung in Deutschland zeigt jedoch ein stetig steigendes Alter der Patienten und Patientinnen sowie einen damit einhergehenden höheren Anteil an Begleiterkrankungen, was zu einem komplexeren perioperativen Risikoprofil führt (Beckmann et al., 2022). Vor allem diese Patientengruppe, die sich durch multiple Vorerkrankungen sowie Mehrgefäßerkrankungen und eine erhöhte Komplexität der einzelnen koronaren Läsionen auszeichnet, profitiert von einer chirurgischen Behandlung mit einem besseren Outcome

(Deb et al., 2013; Head et al., 2018). Das spiegelt sich in der genannten Patientengruppe in Form einer geringeren Gesamtmortalität in Langzeitbeobachtungen sowie in einem geringeren Schlaganfall- und Myokardinfarkttrisiko nach CABG in Relation zur PCI wider (Farkouh et al., 2019).

Dementsprechend ist gemäß der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology bei einer stabilen koronaren Herzkrankheit mit einem hohen SYNTAX-Score die CABG der PCI vorzuziehen (Neumann et al., 2019). Am Beispiel der ischämischen Herzerkrankungen wird dadurch trotz sinkender Fallzahlen die Relevanz der kardiochirurgischen Therapie verdeutlicht.

1.2 Ischämie-Reperfusionsschaden

1.2.1 Bedeutung

Ein Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) entsteht durch die Reperfusion eines zunächst minderperfundierte Versorgungsgebiets. Beispiele dafür sind die Behandlung akuter Gefäßverschlüsse in Form eines akuten Myokardinfarkts (AMI) und eines Schlaganfalls mittels Thrombolyse, Angioplastie und operativer Revaskularisierungen. Der IRI spielt außerdem eine bedeutsame Rolle bei vielen routinemäßigen gefäßchirurgischen Operationen sowie Organtransplantationen und Operationen mit HLM. Er kann ebenso durch schwere Traumata sowie im Kreislaufchock entstehen (Dorweiler et al., 2007). Während der Ischämie-Phase erleidet ein Teil der Zellen einen irreversiblen Zelltod, ein Teil bleibt definitiv lebensfähig und ein anderer Teil potenziell lebensfähig (Dorweiler et al., 2007). Letzterer muss geschützt werden, um möglichst viele vitale Zellen zu erhalten (Collard, 2001; Dorweiler et al., 2007). In der Intention, das Ausmaß des Zellschadens gering zu halten und somit den maximal realisierbaren Erhalt der Organfunktion zu gewährleisten, wird die Reperfusion nach einer Organischämie schnellstmöglich angestrebt. Es wurde jedoch auch erschlossen, dass die Wiederherstellung des Blutflusses, nicht nur positive Effekte mit sich bringt, obwohl sie notwendig ist. Die Reperfusion kann die am betroffenen Organ durch die Ischämie verursachten Schäden verschlimmern und über unterschiedliche Signalwege zusätzlich zu Gewebeschäden in entfernten Organen führen.

Eine CABG stellt als eine Reperfusionsoption bei myokardialer Ischämie ein Beispiel für den IRI dar. Dabei lässt sich durch den Eingriff einerseits die akute lokale Ischämie beheben und eine Reperfusion des betroffenen Areals erreichen. Auf der anderen Seite

wird bei der CABG mit HLM durch das Abklemmen der Aorta das Herz vom systemischen Kreislauf entkoppelt und dadurch vorübergehend eine globale myokardiale Ischämie mit darauffolgender Reperfusion erzeugt. Paradoxe Weise entsteht nicht nur durch die Behandlung des Gefäßverschlusses, sondern auch durch die Behandlungsmethode ein IRI, dessen Ausmaß aus genannten Gründen möglichst gering gehalten werden muss (Hausenloy et al., 2012).

1.2.2 Pathomechanismus Ischämie-Reperfusionsschaden

Der IRI setzt sich aus einem komplexen Netz an multifaktoriellen Schädigungen zusammen. Dazu gehören einerseits intrazelluläre Reaktionen wie die Calcium (Ca^{2+})-Erhöhung im Zytoplasma, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Erhöhung der Durchlässigkeit von Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPT), andererseits extrazelluläre Reaktionen, die unter anderem durch eRNA und TNF- α vermittelt werden (Fischer et al., 2012). Diese Mechanismen können zu einem Zelluntergang durch Apoptose, Autophagie sowie Nekrose und Nekroptose führen (Kalogeris et al., 2012).

Während der Ischämie kommt es zu einer Abnahme der Energieproduktion in der Atmungskette der Mitochondrien (de Groot & Rauen, 2007). Die oxidative Phosphorylierung wird gehemmt, was in einem Abfall des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) mündet. Die sauerstoffabhängigen Zellen sind dann auf die anaerobe Glykolyse angewiesen, die den Energiebedarf aber nur teilweise decken kann (de Groot & Rauen, 2007; Hoffman et al., 2004). Infolgedessen kommt es durch die Ansammlung von Laktat, Protonen (H^+) und Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu einem Abfall des pH-Werts (Kalogeris et al., 2012). Um die Azidose zu kompensieren, werden H^+ -Ionen im Austausch gegen Natriumionen (Na^+) über den Na^+/H^+ -Austauscher aus der Zelle transportiert. Das ansteigende Na^+ kann wegen des bestehenden ATP-Mangels nicht durch den Austausch gegen Kalium (K^+) mittels Na^+/K^+ -ATPase eliminiert werden. Diese Aufgabe übernimmt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die Ca^{2+} -Konzentration steigt intrazellulär an (de Groot & Rauen, 2007; Karmazyn, 1999). Außerdem sind die Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen sowie sarkoplasmatischen Retikulums durch eine veränderte Aktivität ihrer Calcium-ATPase sowie durch vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} über die Ryanodin-Rezeptoren beeinträchtigt. Dies führt zusätzlich zu steigenden Ca^{2+} -Spiegeln im Zytoplasma (Talukder et al., 2009). Durch die Beseitigung der H^+ -Ionen bei der Reperfusion kommt es zu einem Anstieg des Protonengradienten und daraus folgend

zu einem weiteren Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration (Talukder et al., 2009). Die hohen Ca^{2+} -Konzentrationen stellen eine der Komponenten der Zellschädigung durch IRI dar und lösen verschiedene Folgereaktionen aus. Zum einen werden intrazelluläre Enzyme wie Proteasen und Endonukleasen aktiviert, die intrazelluläre Proteine abbauen und proapoptotische Signalkaskaden einleiten (Seal & Gewertz, 2005). Zum anderen werden die Ca^{2+} -Ionen bedingt durch die hohen Konzentrationen entlang des elektrochemischen Gradienten durch den Ca^{2+} -Uniporter in die Mitochondrien transportiert (Bernardi & Petronilli, 1996). Hier tragen sie während der Reperfusion-Phase gemeinsam mit der erhöhten Produktion von ROS in Kombination mit dem wieder steigenden pH-Wert zu einer Öffnung der MPT an der Innenmembran der Mitochondrien bei (Bauer & Murphy, 2020; Halestrap, 2004; Ong & Gustafsson, 2012). Dadurch fließen Stoffe mit geringem Molekulargewicht wie Wasser (H_2O) entlang des kolloidosmotischen Drucks in die Mitochondrien und die Zelle schwillt an. Die äußere Mitochondrienmembran kann reißen und den Zelltod auslösende Proteine freisetzen. Durch die nun frei durchlässige innere Mitochondrienmembran wird der elektrochemische Gradient zerstört und ATP hydrolysiert, was zu einer Aktivierung abbauender Enzyme führt. Schließen sich die Poren nicht, resultiert eine Nekrose. Auch bei sich wieder schließenden Poren ist der Untergang durch Apoptose möglich. Außerdem können Organell- und Zellschwellungen in der Ruptur der Plasmamembran auftreten und extrazelluläre Entzündungsreaktionen auslösen (Ong & Gustafsson, 2012). Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt darüber hinaus zu einer Hyperkontraktur der Kardiomyozyten, was im Zelltod mündet (Yellon & Hausenloy, 2007). Zudem ziehen die hohen Ca^{2+} -Spiegel eine Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus nach sich, der die Adhäsion der Neutrophilen im betroffenen Gebiet und somit einen oxidativen Burst fördert (Sha'afi & Naccache, 1985). Das Zusammenspiel aus vermehrten ROS und steigendem intrazellulärem Ca^{2+} -Spiegel kann die kontraktile Leistung der Myofibrillen der Kardiomyozyten beeinträchtigen und zu einer potenziell reversiblen mechanischen Funktionsstörung beitragen. Diese sogenannte myokardiale Betäubung begünstigt auch die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Kloner et al., 1998).

Die ROS beim IRI entstehen nicht nur durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, sondern unter anderem auch durch den Energiemangel, hervorgerufen über den Abbau von ATP zu Hypoxanthin und die Umwandlung des Enzyms Xanthin-Dehydrogenase in die Xanthin-Oxidase (Maxwell & Lip, 1997; Schaffer et al., 1983). Im Zuge der

Reperfusion beschleunigt die Xanthin-Oxidase die Umwandlung von Sauerstoff und Hypoxanthin zu ROS (Collard, 2001; Maxwell & Lip, 1997).

Auch die ROS selbst leiten unterschiedliche Signalwege ein. Vermutet wird, dass sie für die Induktion elektrophysiologischer Störungen verantwortlich sind, die zu ventrikulären Arrhythmien führen (Hearse & Tosaki, 1987).

Darüber hinaus können sie mit allen Komponenten der Zellen reagieren und direkte Schäden an Lipiden, Proteinen und der DNA anrichten, die einen Verlust der Zellintegrität, der Enzymfunktion und der genomischen Stabilität zur Folge haben.

Zusätzlich führen ROS über die Aktivierung des Komplementsystems zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren. Diese verändern die vaskuläre Homöostase und können lokale sowie systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen. Es kommt zu einer Verstärkung der Chemotaxis sowie zu einer Leukozytenaktivierung und zur Produktion von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Der spezifische Transkriptionsfaktor ‚nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells‘ (Nf κ B) wird einerseits durch die ROS, andererseits durch das Komplementsystem aktiviert und fördert zusätzlich die Leukozyten-Adhäsion sowie die Genexpression der Zytokine (Collard, 2001; Förstermann et al., 2017; Hensley et al., 2000; Schreck et al., 1992; Zhao et al., 2022).

Die beschriebenen Signalwege sind in Abbildung 1 veranschaulicht.

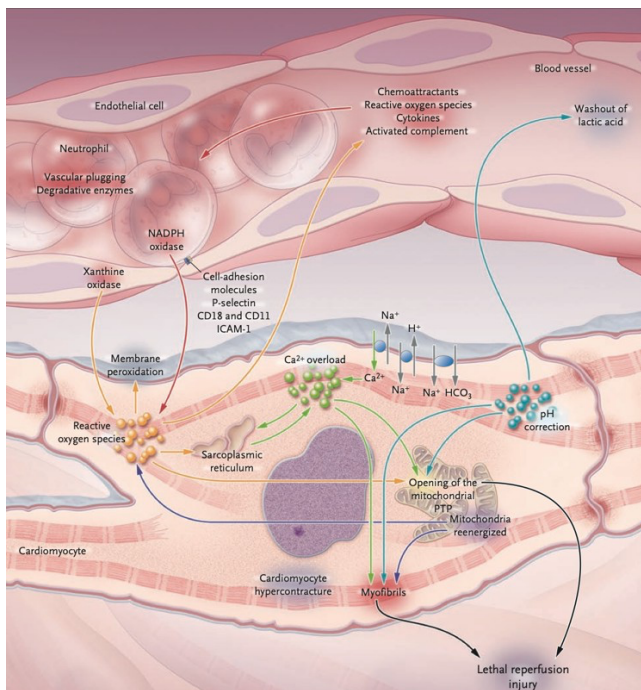


Abbildung 1 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusion-Schadens
Quelle: Yellon & Hausenloy, 2007, S. 1125

Neben den intrazellulären Reaktionen gibt es extrinsisch auf die Kardiomyozyten einwirkende Faktoren. Im Rahmen einer gewebeschädigenden Situation, wie sie beim IRI vorliegt, werden große Mengen intrazelluläre Bestandteile aus den Zellen freigesetzt (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Zerneck & Preissner, 2016). Dazu gehören auch die extrazellulären Ribonukleinsäuren (eRNA). Sie setzen sich aus verschiedenen Formen von Ribonukleinsäuren (RNA) zusammen und beinhalten alle Arten der RNA, die sich in der extrazellulären Flüssigkeit befinden. Die Zusammensetzung hängt von dem betroffenen Zelltyp, dem auslösenden Stimulus sowie der Art der Zellverletzung und dem pathophysiologischen Kontext ab (Zerneck & Preissner, 2016). Eine eRNA weist unter physiologischen Bedingungen eine geringe Plasmakonzentration auf, die durch Gewebeschäden drastisch ansteigen kann (Fischer et al., 2014; Zerneck & Preissner, 2016). Die freigesetzte eRNA wirkt dann einerseits protektiv als Alarmsignal des Wirts und führt zu Abwehrreaktionen, andererseits löst sie eine Reihe bereits bekannter Signalwege aus, die am IRI beteiligt sind (Fischer & Preissner, 2013).

Dazu zählt unter anderem die Ödementstehung durch Erhöhung der Permeabilität in Endothelzellen an den betroffenen Gefäßen (Fischer et al., 2007). Dabei kommt es zu einer Interaktion der polyanionischen RNA mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Dieser bindet sich an das Neuropilin-1 Protein, das als Korezeptor zur Phosphorylierung des VEGF-Rezeptor-2 dient. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, was die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} verursacht. Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel führt dann zu einer Steigerung der parazellulären Permeabilität (Fischer et al., 2007, 2009). Des Weiteren wird die Hyperpermeabilität durch eine Umstrukturierung der Tight-Junction-Proteine sowie der Proteine des Zytoskeletts bedingt (Fischer et al., 2007; Kevil et al., 2000; Pedram et al., 2002).

Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt zudem zu einer Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen. Diese setzen vasoaktive Substanzen wie den von-Willebrand-Faktor (vWF) oder p-Selektin frei, was zur Entstehung vaskulärer Thrombosen und Entzündungsreaktionen beiträgt (Fischer et al., 2009).

Diese prokoagulatorischen Eigenschaften der eRNA zeigen sich außerdem in der Fähigkeit, Kontaktphasenproteine zu aktivieren. Dazu gehören die Gerinnungsfaktoren VII, XI und XII. Die eRNA stellt eine natürliche Fremdoberfläche dar und dient dadurch als Kofaktor zur Aktivierung der Proteasen. Dies fördert die Blutgerinnung mit Auswirkungen auf eine pathologische Thrombusbildung (Kannemeier et al., 2007; Nakazawa et al., 2005).

Weiterhin wirkt die eRNA prothrombotisch durch die Fähigkeit, eine der Heparin-induzierten der Thrombozytopenie (HIT) ähnliche Reaktion auszulösen. Dabei binden sich die an der Oberfläche der eRNA exponierten negativ geladenen Phosphatreste an das Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF4) und bilden einen Komplex, der mit Immunglobulin G reagieren kann. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten, was mitunter thrombembolische Ereignisse auslöst (Jaax, 2013).

Zusätzlich werden durch die Freisetzung von eRNA im Rahmen von Gewebeschäden über unterschiedliche Signalwege Entzündungsreaktionen hervorgerufen. Die eRNA ist in der Lage, das VEGF/VEGF-Rezeptor-2-System zu aktivieren. Hier wird nicht nur, wie oben beschrieben, die Hyperpermeabilität gefördert, sondern es sind auch eine verstärkte Adhäsion sowie Transmigration von Leukozyten zu beobachten. Außerdem bewirkt sie eine Mobilisation proinflammatorischer Substanzen aus Monozyten. Dafür wird unter anderem der NF κ B aktiviert, der im Zellkern die Transkription entzündungsrelevanter Gene wie TNF- α induziert. Die Freisetzung von TNF- α erfolgt zusätzlich über die Aktivierung des TNF- α converting enzyme (TACE) durch die eRNA. TNF- α wirkt synergistisch zur eRNA, indem es ebenfalls die Adhäsion und die Transmigration der Leukozyten fördert (Fischer et al., 2012).

Hohe TNF- α -Spiegel fördern im Sinne eines Circulus vitiosus durch positive Rückkopplung eine zusätzliche Freisetzung von eRNA aus den Zellen (Simseyilmaz et al., 2014). Paradoxerweise wirken im Gegensatz dazu niedrige Spiegel von TNF- α sogar protektiv auf das Myokard. Diese Werte werden jedoch im Rahmen der durch die eRNA bedingten Freisetzung überschritten und spielen beim IRI keine Rolle (Skyschally et al., 2007).

Das Zusammenspiel aus eRNA und TNF- α dient als Stimulus zur Bildung von ROS. Zudem wird die Möglichkeit, die freien Radikale zu eliminieren, durch eine Verringerung antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase oder Peroxiredoxin-3 erschwert.

Die Mechanismen, über die die ROS zum Zelluntergang führen, stellen sich analog zu den bereits erläuterten intrazellulären Signalwegen dar (Cabrera-Fuentes et al., 2014).

Neben den bereits genannten Folgen kann der IRI auch zu einer mikrovaskulären Obstruktion führen (Krug et al., 1966). Zur Entstehung tragen einige der bereits genannten Signalwege bei. Zusätzlich zu der ödembedingten Kapillarkompression spielen die Freisetzung thrombogener und vasoaktiver Substanzen sowie eine Verstopfung der Gefäße durch neutrophile Granulozyten eine Rolle (Ito, 2006; Kloner et al., 1980; Luo & Wu, 2006). Dabei kommt es zu der Unfähigkeit, die zuvor ischämische

Region zu reperfundieren, was sich in einem reduzierten koronaren Blutfluss zeigt (Iwakura et al., 1996). Dies kann zu einer Vergrößerung des Infarktareals, zu einer Verringerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie zu einem ungünstigen Remodelling führen (Wu et al., 1998), in schweren Fällen sogar zu intrakardialen Blutungen (Ganame et al., 2009).

1.2.3 Prävention des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Kardiochirurgie

Wie oben dargelegt, kommt dem IRI und seinen Folgen in der Kardiochirurgie eine große Bedeutung zu. Deshalb ist es besonders relevant, das Herz zu schützen, um die Beeinträchtigung seiner Funktion und somit die Morbidität sowie die Mortalität möglichst gering zu halten. Dies bedarf insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Erwähnung, dass das Risikoprofil für perioperative Myokardverletzungen und Infarkte stetig zunimmt. Erklären lässt sich dies unter anderem mit dem steigenden Alter der Patienten und Patientinnen sowie den damit einhergehenden zunehmenden Komorbiditäten sowie den immer komplexer werdenden Koronarerkrankungen, die längere Ischämiezeiten erfordern (Hausenloy et al., 2012).

Bis heute sind die komplexen Signalwege des IRI nicht vollständig geklärt. Um das Outcome der Patienten und Patientinnen zu verbessern, wird jedoch stetig daran gearbeitet, die Pathophysiologie des IRI tiefergehend zu verstehen und basierend auf neuen Erkenntnissen weitere therapeutische Möglichkeiten zu entdecken und umzusetzen.

Nachdem 1953 erstmals eine erfolgreiche kardiochirurgische Operation unter Verwendung eines extrakorporalen Kreislaufs von Dr. Gibbon durchgeführt worden war, entdeckten Melrose et al. 1955 einen Ansatz zur Kardioprotektion während kardiochirurgischer Eingriffe unter Einsatz einer HLM (Gibbon & Hill, 1982; Melrose et al., 1955). Dabei handelt es sich um die pharmakologische Stilllegung des vom systemischen Kreislauf abgekoppelten Herzens, was als Kardioplegie bezeichnet wird. Diese wurde erstmals durch die Injektion von Kaliumcitrat in die Koronararterien erzeugt (Melrose et al., 1955). Dadurch kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran, was dafür sorgt, dass Aktionspotentiale nicht weitergeleitet werden und ein reversibler diastolischer Herzstillstand zustande kommt (Chambers & Fallouh, 2010). Im Laufe der Jahre wurden die Kardioplegien hinsichtlich Zusammensetzung, Dosierung, Temperatur und der geeigneten Verabreichungswege weiterentwickelt (Ghiragosian et al., 2022).

Gegenwärtig zur Durchführung der Kardioplegie verwendete Lösungen sind unter anderem die blutbasierten Kardioplegielösungen nach Calafiore und Buckberg. Dabei findet die Membranstabilisierung der Blutkardioplegien nach Buckberg und Calafiore über eine kaliumreiche extrazelluläre Lösung statt (Buckberg, 1987; Calafiore et al., 1995).

Eine Kardioplegie nach Buckberg besteht aus drei Phasen. Die erste Phase dient der Induktion der Asystolie und wird je nach präoperativem Zustand des oder der Patienten oder Patientin kalt oder warm verabreicht. In der zweiten Phase ist zur Aufrechterhaltung der Asystolie bei abgeklemmter Aorta im 20-Minuten-Takt für je zwei Minuten zu perfundieren. Während der letzten Phase kommt es kurz vor Öffnung der Aortenklammer zur Verabreichung des sogenannten Hot-Shot, der insbesondere der Verminderung des IRI dient (Buckberg, 1987).

Die ebenso auf Blut basierende Kardioplegie nach Calafiore wird intermittierend, antegrad und warm verabreicht (Calafiore et al., 1995).

Allen Kardioplegielösungen gemeinsam ist das Ziel, den Metabolismus zu reduzieren und somit den Sauerstoffbedarf sowie die ATP-Erschöpfung des Myokards zu verringern und damit mehr Zeit bis zur Entstehung irreversibler Schäden zu gewinnen (Buckberg et al., 1977; Chambers & Fallouh, 2010).

Eine weitere Option, den durch den Eingriff erzeugten IRI zu umgehen, ist, die Operation am schlagenden Herzen und ohne HLM durchzuführen. Dabei entfallen die Notwendigkeit der Kardioplegie sowie die Entkopplung des Herzens vom systemischen Kreislauf und den damit verbundenen akuten globalen IRI (Hausenloy et al., 2012).

Wie oben erläutert, werden herzchirurgische Operationen in Deutschland dennoch überwiegend unter Verwendung der HLM durchgeführt (Beckmann et al., 2022). Durch die Entkopplung und Stilllegung des Herzens sind dem Chirurgen oder der Chirurgin eine bessere Sicht und damit ein präziseres Arbeiten möglich (Hausenloy et al., 2012). Die Off-pump-Operationen weisen im Vergleich mehr unvollständige Revaskularisierungen und damit eine höhere Notwendigkeit an Wiederholungseingriffen auf. Zudem zeigen On-pump-Operationen ein geringeres Risiko für Luftembolien sowie bessere Ergebnisse hinsichtlich der Mortalität in Langzeitstudien (Chikwe et al., 2018; Hausenloy et al., 2012; Shroyer et al., 2009). Da sich der IRI bei kardiochirurgischen Eingriffen durch die beschriebenen Maßnahmen nicht vollständig verhindern lässt, werden stetig weitere Maßnahmen zur Protektion des Myokards gesucht. Dazu gehört seit einigen Jahren auch das Konzept der ischämischen Konditionierung.

1.3 Ischämische Konditionierung

1.3.1 Bedeutung

Die ischämische Fernkonditionierung (RIPC) ist eine Technik, die in Studien angewandt wird, um den IRI sowohl bei kardiochirurgischen als auch bei interventionellen Eingriffen am Herzen zu minimieren (Davies et al., 2013; Thielmann et al., 2013). Dabei werden vor der schädigenden Myokardischämie an einer Extremität kurze Ischämie-Reperfusionsepisoden erzeugt. Die Ischämie entsteht durch eine vorübergehende Okklusion der peripheren Gefäße mittels Aufpumpens einer Blutdruckmanschette über 200 mmHg (Thielmann et al., 2013). Dadurch werden Signalwege aktiviert, die protektiv auf den IRI am Herzen wirken. Die Funktionsweise der Übertragung und die beteiligten Mediatoren sind dabei noch nicht gänzlich geklärt.

1.3.2 Entwicklung

Bevor das Prinzip der RIPC entwickelt wurde, versuchten Maroko et al. (1972) bereits 1972, die Größe von Ischämiearealen bei Myokardinfarkten zu reduzieren.

Dies konnte einige Jahre später durch die bahnbrechende Entdeckung des Prinzips der Präkonditionierung von Gefäßen durch Murry et al. (1986) erreicht werden. Sie beschrieben erstmals den Effekt der lokalen ischämischen Präkonditionierung, indem sie vor der langanhaltenden, potenziell letalen Ischämie zunächst subletale, intermittierende Ischämie-Reperfusionsepisoden (= Präkonditionierung) am selben Gefäß erzeugten. Diese Präkonditionierung erfolgte im Tiermodell an sieben Hundeherzen. Dafür wurden am Ramus circumflexus (RCX) der linken Koronararterie zunächst vier Zyklen einer jeweils fünfminütigen Okklusion gefolgt von einer fünfminütigen Reperfusion durchgeführt. Direkt danach war das Gefäß für 40 Minuten komplett verschlossen. Dabei zeigten sich unter ischämischer Präkonditionierung eine signifikante Reduktion des Ischämiegebiets auf 25 % im Vergleich zur Kontrollgruppe und somit eine deutliche Reduktion des IRI (Murry et al., 1986).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend führten Przyklenk et al. (1993) eine ähnliche Studie durch. Hier wurde erstmals eine intrakardiale Fernkonditionierung angewandt, somit nicht das später von der Ischämie betroffene Gefäß, sondern ein benachbartes konditioniert. Das Fernkonditionieren erfolgte am RCX nach dem gleichen Ablauf wie bei Murry et al. Die direkt darauffolgende Okklusion wurde jedoch am Ramus interventricularis anterior (RIVA) durchgeführt und dauerte 60 Minuten an. Danach

folgte für 4,5 Stunden eine Reperfusion. Auch hier zeigte sich ein signifikant kleineres Ischämieareal als bei der Kontrollgruppe (Przyklenk et al., 1993).

Damit konnte sowohl für die direkte Präkonditionierung als auch für die Konditionierung aus der Ferne ein unmittelbar nach der Durchführung bestehender Schutz des Myokards gegen den Zelluntergang nachgewiesen werden. Es zeigten sich ein maximaler Schutz nach zwei bis drei Stunden und eine Abnahme nach ca. vier Stunden. Außerdem wurde in weiteren Studien für beide Konditionierungsmethoden gezeigt, dass nach ca. 24 Stunden ein zweites, etwas weniger robustes Schutzfenster entsteht, das für zwei bis drei Tage anhält (Hausenloy, Barrabes, et al., 2016; Kuzuya et al., 1993; Lang & Kim, 2022; Murry et al., 1986). Durch die Erkenntnisse von Przyklenk et al. war bewiesen, dass die Konditionierung für die myokardiale Zytoprotektion nicht zwingend am betroffenen Gefäß stattfinden muss. Folgestudien belegen die Protektion durch RIPC nicht nur über intrakardial benachbarte Gefäße, sondern auch über eine interorgane Präkonditionierung beispielsweise der Mesenterialarterie (Gho et al., 1996) sowie von Gefäßen im Bereich der Niere (Takaoka et al., 1999) oder der Skelettmuskulatur (Birnbaum et al., 1997).

Alle bisher genannten Verfahren der Präkonditionierung zeigen jedoch den Nachteil der Invasivität und eine dadurch schwierige klinische Umsetzbarkeit.

Kharbanda et al. (2002) veröffentlichte später Ergebnisse einer nichtinvasiven, einfach durchführbaren und kostengünstigen RIPC. Die intermittierenden Ischämie-Reperfusionen-Episoden wurden durch das Aufpumpen einer Blutdruckmanschette auf 200 mmHg an den Extremitäten erreicht. Im Tiermodell konnte ebenso wie bei den invasiven Methoden eine Reduktion der myokardialen Ischämie gezeigt werden. Außerdem ließ sich in Versuchen an Patienten und Patientinnen eine Reduktion der endothelialen Dysfunktion nachweisen (Kharbanda et al., 2002).

Wie oben erläutert, trägt die Reperfusion neben der Ischämie wesentlich zum IRI bei. Ein solcher Reperfusionsschaden ist durch die Veränderung der Hydrodynamik beeinflussbar (Okamoto et al., 1986). Auf diesem Wissen basierend wurde von Zhao et al. (2003) eine weitere Möglichkeit der myokardialen Konditionierung getestet, die ischämische Postkonditionierung. Dabei wurden nach der Ischämie mehrere Zyklen von Perfusion und Okklusion durchgeführt. Diese dauerten allerdings nur jeweils 30 Sekunden an. Es konnte ein der ischämischen Präkonditionierung ähnliches Ergebnis erzielt werden (Zhao et al., 2003). Neben der direkten Präkonditionierung und der Konditionierung aus der Ferne ist die Postkonditionierung demnach eine weitere Möglichkeit, den IRI zu minimieren,

allerdings sind dafür im Gegensatz zur Präkonditionierung invasive Maßnahmen nötig (Heusch, 2015).

Trotz der zahlreichen Studien, die in den letzten 30 Jahren zu diesem Thema durchgeführt wurden, sind die komplexen Signalwege nach wie vor nicht vollständig geklärt.

1.3.3 Mögliche Signalwege

Wie durch den komplexen Pathomechanismus des IRI klar erkennbar ist, gibt es eine Vielzahl von potenziellen Angriffspunkten für die RIPC. Einen davon stellen die proinflammatorischen Mechanismen dar, die durch den IRI ausgelöst werden. Hier spielen vor allem die neutrophilen Granulozyten als Vermittler der späteren Phase des IRI eine große Rolle. Hier sind sie primär für die Entstehung von oxidativem Stress und von daraus resultierenden Organschäden verantwortlich (Tapuria et al., 2008). Konstantinov et al. (2004) zeigten in einer an Menschen durchgeführten Studie, dass nach RIPC am Unterarm die proinflammatorische Gentranskription in zirkulierenden Leukozyten unterdrückt wird. Dieser antiinflammatorische Effekt zeigt sich bereits nach 15 Minuten und nimmt dann weiter zu, bevor er nach ca. 24 Stunden nachlässt. Dadurch werden neben der Zytokinsynthese sowie der Chemotaxis auch die Adhäsion der Leukozyten und die Funktion der angeborenen Immunität gehemmt, was zu einer Reduktion der Apoptose und somit des IRI beiträgt (Konstantinov et al., 2004).

Zudem scheinen neuronale Signalwege an der Wirkung der RIPC beteiligt zu sein. Dabei kommt es durch die RIPC zu einer Aktivierung von Nozizeptoren, die periphere sensomotorische Nerven aktivieren. Diese können dann entweder in den humoralen Weg übergehen und einheitliche Moleküle ins Blut abgeben und/oder Signale über das Rückenmark aussenden. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung sowohl der sympathischen als auch der parasympathischen Efferenzen des Herzens, was zu einer lokalen Ausschüttung kardioprotektiver Substanzen führt (Heusch et al., 2015). Dass sowohl Sympathikus als auch Parasympathikus an der Übertragung beteiligt sind, konnte durch die medikamentöse Antagonisierung des jeweiligen Systems gezeigt werden (Donato et al., 2013; Southerland et al., 2007). Die Teilhabe sensomotorischer Nerven durch nozizeptive Stimulation war über die Stimulation des Nervus femoralis nachweisbar. Während eine elektrische Stimulation die Kardioprotektion fördert, ließ sich eine Aufhebung des positiven Effekts bei Durchtrennung des Nervs beobachten (Redington et al., 2012). Die spinale Beteiligung an der RIPC konnte ebenfalls durch die Aufhebung des protektiven Effekts mittels Ausschaltung der Signalübertragung im

Rückenmark nachgewiesen werden. Dies erfolgte einerseits mechanisch durch eine Durchtrennung des Rückenmarks von Mäusen, andererseits durch intrathekale Applikation von Naloxon (Jones et al., 2009; Wong et al., 2012). Umgekehrt konnte durch Stimulation der Rückenmarksbahnen eine Verringerung des IRI am Herzen nachgewiesen werden (Southerland et al., 2007).

Auch humorale Mediatoren nehmen im Rahmen der RIPC eine bedeutsame Rolle ein. Die humorale Hypothese besagt, dass der ischämische Stimulus zur Produktion von Substanzen führt, die in den Kreislauf gelangen und das Myokard erreichen, wo sie über den jeweiligen Rezeptor intrazelluläre Signalwege rekrutieren und eine prophylaktische Wirkung ausüben (Gill, 2015). Dass humorale Mediatoren involviert sind, wiesen schon von Dickson et al. (1999) nach. Damals wurde Blut aus dem koronaren Ausfluss eines mit RIPC behandelten Kaninchenherzens auf ein unkonditioniertes isoliertes Kaninchenherz übertragen. Hier konnte bei darauffolgender Ischämie eine Kardioprotektion nachgewiesen werden. Später erfolgte eine ähnliche Studie an Schweinen, in der präkonditioniertes Blut auf denervierte Herzen übertragen und so die These der humoralen Übertragung weiter bestätigt wurde (Konstantinov et al., 2005). Shimizu et al (2009) konnten zudem nachweisen, dass das von Menschen nach einer RIPC gewonnene Plasmadialysat auch Kaninchen myokardialen Schutz gewährt, was darauf hindeutet, dass die humoralen Substanzen spezieübergreifende Wirkungen haben. Eine Studie, die das Zusammenspiel des humoralen und des neuronalen Systems deutlich macht, führten Jensen et al. (2012) durch. Dabei wurde ebenfalls humanes Dialysat auf Kaninchenherzen übertragen. Das Besondere war, dass ein Teil der Probanden und Probandinnen unter einem Diabetes litt. Es zeigte sich, dass das Dialysat der Diabetiker und Diabetikerinnen nur dann protektiv war, wenn sie nicht unter einer peripheren Neuropathie litten, was die Vorstellung einer humoralen Übertragung eines neuronal freigesetzten Signalmoleküls nahelegt. Einige der an den humoralen Signalwegen beteiligten Mediatoren konnten bereits nachgewiesen werden. Dazu gehören der Stromal cell-derived factor-1 α , das Apolipoprotein A-I sowie das Hitzeschock-Protein-10 (Davidson et al., 2013; Kalakech et al., 2014). Trotz der zahlreichen erfassten beteiligten Mediatoren konnte das Phänomen der RIPC bisher nicht vollständig geklärt werden (Heusch, 2015).

1.3.4 RNase-1 als Mediator

Basierend auf dem oben erläuterten Ergebnis, dass die eRNA als ein frühes Alarmsignal für Gewebestress oder -schäden zur Entstehung des IRI beiträgt, war es naheliegend, dass auch die Ribonuklease (RNase) als ein natürlicher Gegenspieler bei der RIPC von Bedeutung ist (Garnett & Raines, 2022).

RNasen katalysieren den Abbau vieler RNA-Substrate und vermitteln dadurch eine Vielzahl biologischer Funktionen (Garnett & Raines, 2022). Die RNase-1 ist eine Ribonuklease vom Pankreas-Typ, die von Wirbeltieren exprimiert wird und in allen Gewebetypen nachweisbar ist (Beintema et al., 1988; Beintema & Kleinedam, 1998; Futami et al., 1997). Sie zeigt sich unter anderem für den Abbau von eRNA verantwortlich (Lu et al., 2018). Die im Serum nachweisbare Konzentration der RNase-1 ist vorwiegend durch die konsekutive Bildung in den vaskulären Endothelzellen bedingt (Barrabés et al., 2007; Landré et al., 2002). Zusätzlich akkumuliert die RNase-1 in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzelle, die durch proinflammatorische Mediatoren wie der frei zirkulierenden RNA zur Exozytose und somit unter anderem zur Freisetzung von RNase-1 angeregt werden (Fischer et al., 2011).

Cabrera et al. (2014) konnten zunächst an Tiermodellen zeigen, dass durch die Verabreichung von RNase-1 das kardiotoxische Zusammenspiel aus eRNA und TNF- α antagonisiert wird. Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde die RIPC an einer kleinen Studienpopulation durchgeführt, die sich einer CABG unterzog, und unter anderem die Kinetik von RNase-1, eRNA sowie TNF- α beobachtet. Die proinflammatorischen, bei der RIPC freigesetzten Mediatoren können die Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen bedingen, damit einhergehend einen Anstieg der Konzentration der RNase-1 sowohl im Blut der A. radialis als auch im Koronarsinus. Demgegenüber ließen sich aufgrund der protektiven Wirkung der RNase-1 abfallende Werte der eRNA an beiden Abnahmestellen sowie des TNF- α vorwiegend im Blut des Koronarsinus beobachten (Cabrera-Fuentes et al., 2015; Fischer et al., 2011). Über den Abbau der eRNA durch RNase-1 kann verhindert werden, dass diese sich an Proteine und Zellen bindet, was die oben erläuterten Pathomechanismen wie die Entstehung der ROS und die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α unterbricht und die Förderung des Zelltods verringert. Bestärkt wird die These dadurch, dass eine sehr niedrige Lactat-Dehydrogenase-Konzentration, ein allgemeiner Marker für den nekrotischen Zelltod, gemessen wurde (Cabrera-Fuentes et al., 2015, 2014). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der RNase-1 als Mediator für

die RIPC stellte sich die Studie aufgrund der kleinen Studienpopulation als nicht ausreichend aussagekräftig heraus.

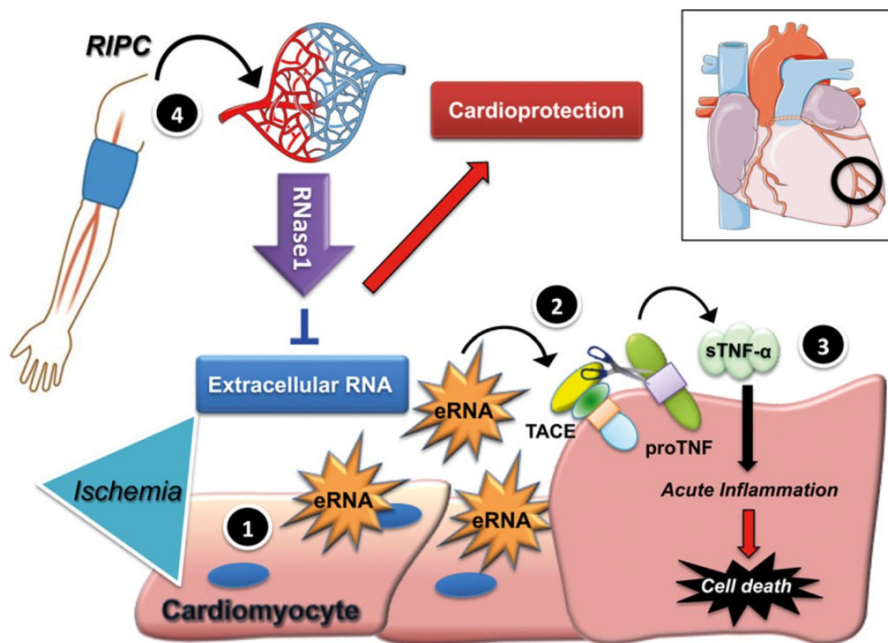


Abbildung 2 RNase-1 als Mediator der RIPC
Quelle: Cabrera-Fuentes et al., 2015, S. 736

1.3.5 Aktuelle Studienlage

Die oben beschriebenen vielversprechenden Ergebnisse in Tiermodellen ermutigten zur Durchführung einer Vielzahl von Proof-of-Concept-Studien, um die Wirksamkeit von RIPC auch am Menschen zu belegen. Diese erfolgten meist an kleinen Patientenkohorten (Heusch & Rassaf, 2016). Der Einfluss von RIPC wurde dabei nicht anhand des klinischen Outcomes, sondern durch Bestimmung von je nach Studie unterschiedlichen Surrogatendpunkten wie Troponin I und CK-MB bestimmt (Ali et al., 2010; Thielmann et al., 2013). Die meisten der so durchgeführten Studien zeigen ein positives Ergebnis bezüglich Minderung der Infarktgröße. Darauf folgten jedoch keine adäquaten Phase-II-Studien zur Entwicklung eines einheitlichen und optimalen Umsetzungsprotokolls für die RIPC. Die einzigen bisher durchgeführten Phase-III-Studien sind die ERICCA-Studie sowie die RIP-HEART-Studie (Heusch & Rassaf, 2016). Der Erfolg des RIPC wurde dabei im Gegensatz zu vielen kleineren Studien hauptsächlich am klinischen Outcome als primärem Endpunkt bemessen (Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Heusch & Rassaf, 2016; Meybohm et al., 2015).

Beide konnten den von zuvor durchgeführten Studien suggerierten protektiven Effekt der RIPC jedoch nicht bestätigen und zeigten ein neutrales Ergebnis (Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Meybohm et al., 2015).

Dabei kann eine Vielzahl von möglicherweise Einfluss nehmenden Faktoren diskutiert und eine große Divergenz zwischen den verschiedenen Studien festgestellt werden. Nicht nur die Endpunkte zur Bestimmung der Wirkung von RIPC waren unterschiedlich gewählt, sondern auch die Art des durchgeführten Eingriffs variierte. Beide Phase-III-Studien schlossen Patienten und Patientinnen sowohl mit isolierter CABG als auch mit CABG in Kombination mit Eingriffen an den Herzklappen ein (Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Meybohm et al., 2015), wobei das zusätzliche Trauma durch den Klappeneingriff zu einem schlechteren Outcome führen kann (Heusch & Rassaf, 2016). Im Gegensatz dazu wurden in vielen Proof-of-Concept-Studien auch die Effekte des RIPC bei isolierten CABG, Kinderherz-Operationen, akutem ST-Hebungs-Infarkt oder elektiver PCI beschrieben (Cheung et al., 2006; Davies et al., 2013; Karuppasamy et al., 2011; White et al., 2015). Anders als in den Laborstudien zeigen Patienten und Patientinnen, die sich einer CABG unterziehen, ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil bedingt durch Faktoren wie ein hohes Alter, Diabetes und eine Hyperlipidämie, was Einfluss auf die Ergebnisse des RIPC nimmt (Ferdinandy et al., 2014). Eine weitere Ursache für das neutrale Ergebnis der Phase-III-Studien stellt die Form der Anästhesie dar, denn es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von RIPC unter einer Propofol-Narkose im Vergleich zur volatilen Anästhesie abgeschwächt ist (Kottenberg et al., 2012). Dabei wurden in der ERICCA Studie 90 %, in der RIP-Heart Studie sogar 100 % der Narkosen auf Propofol basierend durchgeführt (Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Meybohm et al., 2015). Außerdem zeigten sich Unterschiede in den jeweiligen Ein- und Ausschlusskriterien, was das Ergebnis der RIPC ebenfalls erheblich beeinflussen kann (Heusch & Rassaf, 2016).

Die genannten und weitere bekannte Störfaktoren können in zukünftige Überlegungen einbezogen werden, um darauf aufbauend ein optimiertes Durchführungsprotokoll für die RIPC zu entwickeln. Ansätze dafür sind beispielsweise einer Verlängerung der einzelnen Zyklen in der Konditionierungsphase und eine höhere Anzahl an Zyklen, um den Effekt der RIPC zu verstärken und gegebenenfalls eine signifikante Verbesserung des IRI zu erreichen.

1.4 Fragestellung

In Anbetracht der teilweise ernüchternden Ergebnisse einiger vorausgegangener Studien mit vier Zyklen RIPC ist das Ziel dieser Arbeit, daran anzuknüpfen und den Effekt von sechs anstelle von vier Zyklen RIPC anhand der Kinetik des eRNA/RNase-1-Systems zu untersuchen. Dabei soll zur Erhebung der Unterschiede die Kinetik der Parameter vor allem zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus sowie nach der RIPC betrachtet werden.

Insbesondere stehen folgende Punkte im Fokus:

1. Ist eine signifikante Steigerung der RNase-1-Aktivität während der RIPC, speziell zwischen dem vierten und sechsten Zyklus, zu beobachten?
2. Wie verändern sich die Konzentrationen der eRNA sowie des TNF- α während der RIPC?
3. Zeigt sich durch die Steigerung der RIPC-Zyklen eine Änderung im transkardialen Gradienten der verschiedenen Parameter kurz vor der Aortenklammung oder kurz nach der Reperfusion der Aorta?
4. Wie verhält sich die Aktivität der RNase-1 nach der Operation?

2 Material und Methodik

2.1 Studiendesign

Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen der RIPC-Studie an der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Gießen im Zeitraum vom 27.04.2020 bis zum 06.06.2020 erhoben. Zur Quantifizierung der Blutproben fand eine Kooperation mit dem biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen statt. Ziel der Studie ist die Überprüfung des Effekts von sechs Zyklen der ischämischen Präkonditionierung an einer Extremität auf die myokardiale Schädigung während Herz-Operationen unter Einsatz der HLM anhand der Kinetik von RNA, TNF- α und RNase-1.

Die Durchführung der Studie wurde von der zuständigen Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität unter dem AZ12/15 am 21.10.2019 genehmigt.

2.2 Studienpopulation

Während des Studienzeitraums wurden alle Patienten und Patientinnen der Abteilung für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen auf eine mögliche Teilnahme an der RIPC-Studie gescreent und 14 davon eingeschlossen. Die demografischen Daten der Patienten und Patientinnen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Demografische Daten

Die Werte in der Tabelle sind als Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung oder n in (%) angegeben.
n = Anzahl der Patienten und Patientinnen; BMI = Body-Mass-Index; PCI = Perkutane Koronarintervention;
LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Parameter	Patienten und Patientinnen (n = 14)
Alter	66.3 \pm 9.9
BMI (kg/m ²)	28.6 \pm 5.5
Männlich, n (%)	10 (71,4)
Weiblich, n (%)	4 (28,6)
Arterieller Hypertonus, n (%)	14 (100)
Periphere arterielle Verschlusskrankheit, n (%)	1 (7,1)
Diabetes mellitus, n (%)	5 (35,7)

Nierenerkrankung, n (%)	1 (7,1)
Hyperlipidämie, n (%)	14 (100)
Akuter Myokardinfarkt, n (%)	2 (14,3)
Zustand nach Myokardinfarkt, n (%)	3 (21,4)
Vorherige PCI, n (%)	4 (28,6)
Zustand nach Schlaganfall, n (%)	1 (7,1)
Linksventrikuläre Funktion	
LVEF >50 %, n (%)	6 (42,9)
LVEF 30–50 %, n (%)	7 (50)
LVEF <30 %, n (%)	1 (7,1)
Dringlich, n (%)	2 (14,3)
Elektiv, n (%)	12 (85,7)

Das Hauptkriterium für den freiwilligen Einschluss in die Studie stellte die Notwendigkeit einer kardiochirurgischen Operation unter Verwendung der HLM dar. Dazu zählen neben der Bypass-Operation auch Herzklappen-Operationen sowie kombinierte Eingriffe. Weitere verbindliche Einschlusskriterien der Studie waren Volljährigkeit und eine schriftliche Einverständniserklärung nach einem ausführlichen ärztlichen Aufklärungsgespräch mindestens 24 Stunden vor der Operation.

Ausgeschlossen wurden Patienten und Patientinnen die sich nicht ausreichend aufklären ließen. Gründe hierfür waren beispielsweise neurologische Erkrankungen bzw. eine nicht vorhandene Geschäftsfähigkeit. Weitere Ausschlusskriterien bildeten Operationen ohne Verwendung der HLM und die ärztliche Entscheidung, dass eine Teilnahme an der Studie nicht vertretbar ist, sowie ein Abbruch auf Wunsch des oder der Patienten oder Patientin.

2.3 Chirurgische Daten

Die Herzoperation wurde gemäß den Einschlusskriterien in allen Fällen unter Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation durchgeführt. Alle zehn Patienten und Patientinnen, bei denen eine isolierte CABG stattfand, erhielten eine Blutkardioplegie nach Calafiore. Bei den vier Patienten und Patientinnen mit kombinierten Eingriffen wurde die Kardioplegie nach Buckberg inklusive eines Hot Shots angewandt. Die Blutkardioplegie war ca. alle 20 Minuten zu wiederholen. Art und Anzahl der Operation sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Durchgeführte Operationen

Art der Operation	RIPC (n = 14)
CABG,	n 10
CABG + Aortenklappenersatz,	n 1
Mitralklappenersatz + Trikuspidalklappenrekonstruktion,	n 1
CABG + Ersatz der Aorta ascendens,	n 1
CABG + Mitralklappenrekonstruktion,	n 1

2.4 Studienablauf

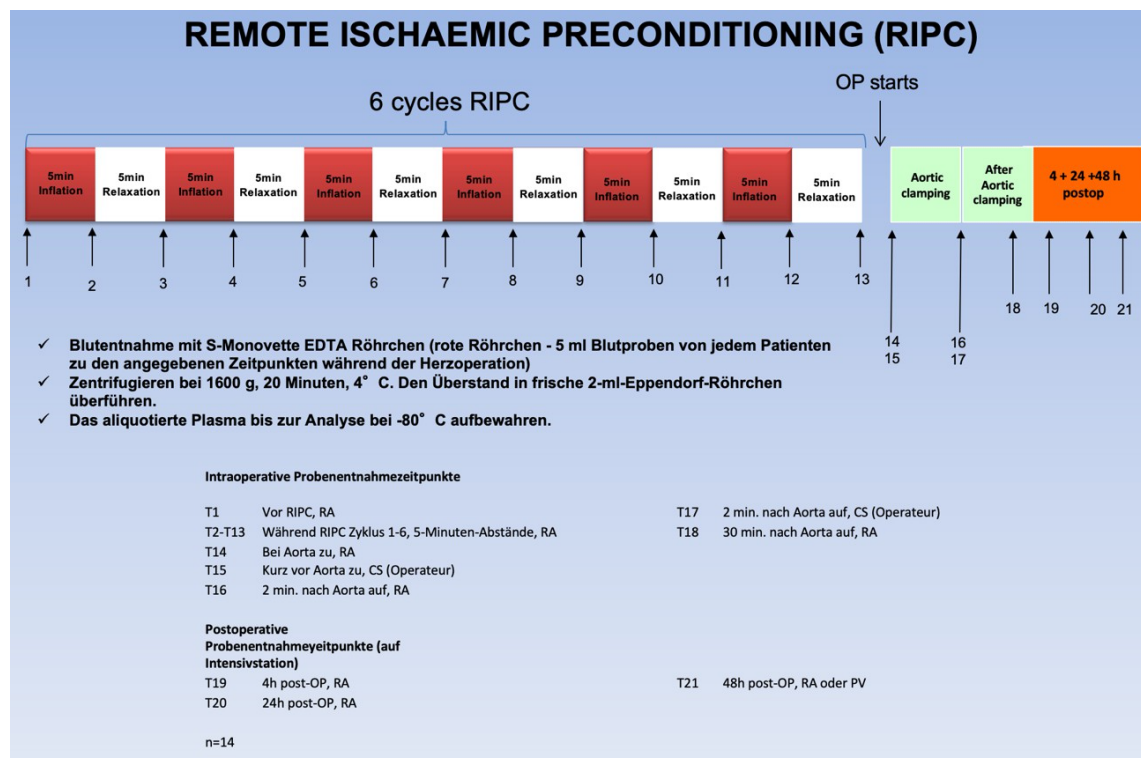


Abbildung 3 Studienablauf der RIPC

T: Zeitpunkt der Blutentnahme

RA: Radialarterie, CS: Koronarvenensinus, PV: Periphere Vene

n: Anzahl der Probanden und Probandinnen

Quelle: eigene Darstellung

Nach Erfüllen der oben genannten Einschlusskriterien wurden bei 14 Patienten und Patientinnen gemäß einem auf Abbildung 3 erkennbaren Schema zu 19 Zeitpunkten 21 verschiedene Blutproben mit S-Monovetten-EDTA-Röhrchen entnommen.

Abgesehen von den aus dem Koronarvenensinus (CS) entnommenen Blutproben zum Zeitpunkt der Aortenklammung und -öffnung (T15, T17) erfolgten alle intraoperativen

Blutentnahmen sowie die Blutentnahmen auf der Intensivstation durch den von der Anästhesie standardmäßig gelegten Zugang aus der Radialarterie (RA).

Fand die Verlegung auf eine Normalstation allerdings innerhalb der ersten 48 Stunden postoperativ statt, wurde ab diesem Zeitpunkt Blut aus einer peripheren Vene (PV) verwendet.

Die ischämische Präkonditionierung entstand durch Okklusion einer Extremitätenarterie. Dafür wurde den Patienten und Patientinnen eine Blutdruckmanschette an einer individuell gewählten Extremität angelegt. Die Wahl erfolgte dabei den jeweiligen Operationsbedingungen angepasst. Nach dem in Abbildung 3 erkennbaren Schema wurde diese über sechs Zyklen zunächst für jeweils fünf Minuten auf Werte über dem systolischen Blutdruck (ca. 220 mmHg) aufgepumpt und im Anschluss für fünf Minuten relaxiert. Insgesamt dauerten die sechs Zyklen aus Inflation und Relaxation 60 Minuten. Die Zeit zwischen dem Ende des letzten Zyklus und dem Hautschnitt betrug weniger als 30 Minuten.

Da dieses Prozedere von den Patienten und Patientinnen als sehr unangenehm empfunden werden kann, wurde zuvor die Narkose durch die Anästhesie eingeleitet. Das Narkoseschema bestand aus Morphin (10 bis 20 mg p. o.) zur Prämedikation und einer ausgewogenen Anästhesie als Kombination aus intravenösen (Propofol, Sufentanil) und flüchtigen (Isofluran, Sevofluran) Narkosemitteln.

Die erste Blutentnahme (T1) erfolgte direkt nach Einleitung der Narkose vor Beginn der Präkonditionierung als Baseline. Alle weiteren Blutentnahmen (T2 bis T13) fanden dann über eine Stunde nach jedem fünfminütigen Zyklus von Inflation sowie Relaxation statt. Der Zeitpunkt T9 entspricht dabei der Blutentnahme nach vier Zyklen, T13 nach sechs Zyklen. Diese beiden Zeitpunkte wurden zum Vergleich des Effekts von sechs statt vier Zyklen verwendet. Die darauffolgenden Blutentnahmen wurden zum Zeitpunkt der Aortenklammung sowie -öffnung jeweils aus dem Koronarsinus durch den oder die Chirurgen oder Chirurgin (T15, T17) sowie zum selben Zeitpunkt aus dem arteriellen Zugang (T14, T16) entnommen. Zu diesen beiden Zeitpunkten konnten dadurch die transkardialen Gradienten von eRNA, TNF- α und RNase-1 berechnet werden. Postoperativ erfolgten die Blutentnahmen nach 30 Minuten sowie nach vier, 24 und 48 Stunden, um die Dynamik der Parameter über diesen Zeitraum bestimmen zu können.

2.5 Analyse der Proben

2.5.1 Allgemein

Die Vollblutproben wurden nach Abnahme schnellstmöglich bei 1600 g und 4 °C für 20 Minuten mit der Zentrifuge Hettich Rotina 46R zentrifugiert, der Überstand war in drei 2-ml-Eppendorfgefäße zu pipettieren und bei -80 °C bis zur Quantifizierung einzufrieren. In das für die RNA-Analyse vorgesehene Gefäß wurde zusätzlich ein RNase-Inhibitor (1 µl pro 500 µl Probe) gegeben, um den Abbau der vorhandenen eRNA zu verhindern. In der Intention, die Proben nicht zu schädigen, wurden diese vor der Analyse möglichst langsam und vorsichtig auf Raumtemperatur erwärmt.

2.5.2 RNA-Isolation und -Quantifizierung

Zur RNA-Quantifizierung erfolgte zunächst die Isolierung der RNA von den restlichen Plasmabestandteilen. Dazu wurde 1 µl Proteinkinase K (50 µg/µl) in 400 µl Gewebe- und Zell-Lyse-Lösung gelöst und zu 100 µl Plasmaproben pipettiert. Die Zusammensetzung war daraufhin zu mischen und 15 Minuten bei 65 °C unter Schütteln zu inkubieren, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation auf Eis. Zur Entfernung von verbleibenden Zelltrümmern wurden 250 µl MPC-Protein-Ausfällungsreagenz hinzugefügt und die Proben zehn Sekunden lang gemischt. Anschließend erfolgten zwei Waschvorgänge, bei denen die Proben für zehn Minuten bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert wurden. Der Überstand war jeweils in ein sauberes Eppendorfgefäß zu überführen.

Die Nukleinsäure wurde ausgefällt, indem 600 µl Isopropanol hinzukamen, die Proben vorsichtig 30- bis 40-mal gewendet und erneut zehn Minuten bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert wurden. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgesaugt. Um die RNA-Pellets zu konsolidieren, wurden sie zweimal mit je 500 µl 75%igem Ethanol wie zuvor beschrieben erneut zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und die RNA 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Anschließend war die RNA in jeder Probe mit 21 µl RNase-Reinstwasser zu lösen und vor der Quantifizierung 20 Minuten auf Eis zu inkubieren.

Die Quantifizierung erfolgte fluorometrisch unter Verwendung des Kits Qubit RNA HS Assay von Thermo Fisher Scientific nach den Herstellerangaben. Das Kit wurde auf Raumtemperatur erwärmt und gemäß Abbildung 4 verwendet. Für jede Probe waren 199 µl Quanti Buffer mit 1 µl Quanti Reagent zu mischen, um eine Arbeitslösung herzustellen. Die Konzentrationsdaten wurden anhand der Beziehung zwischen den beiden während der Kalibrierung verwendeten Standards generiert. Hierfür waren 10 µl

jeder der beiden Standards (S1 = 0 ng/ μ l RNA und S2 = 10 ng/ μ l RNA) mit 190 μ l Arbeitslösung zu mischen und zwei Minuten lang bei Raumtemperatur zu inkubieren. Von den zu messenden Proben wurden 20 μ l mit 180 μ l Arbeitslösung gemischt und ebenfalls zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um Messfehler zu minimieren, erfolgten alle Messungen im Duplikat.

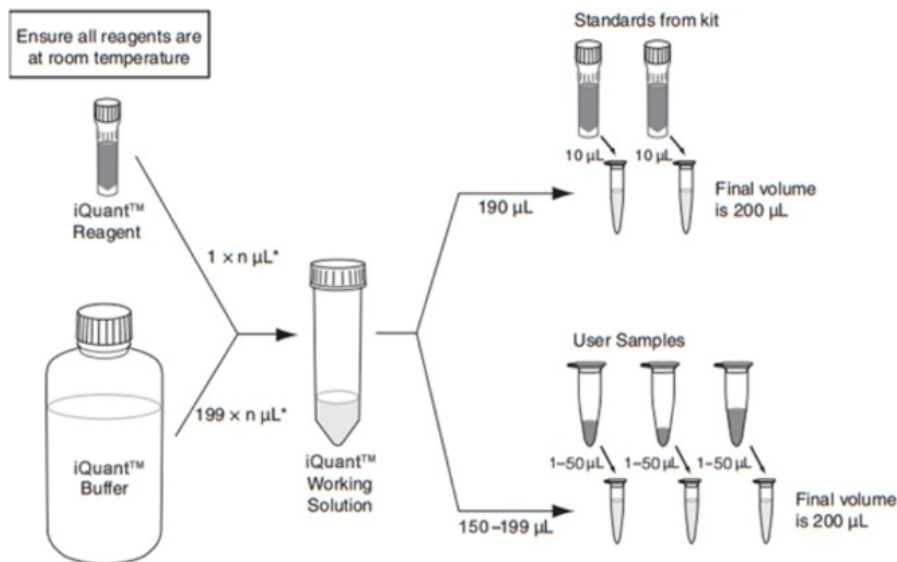


Abbildung 4 Quantifizierung der RNA

Quelle: Bedienungsanleitung Qubit™ RNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, 2020, S. 6

2.5.3 TNF- α Bestimmung

Die Bestimmung des TNF- α -Spiegels erfolgte mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dafür kam das Set Human TNF alpha Uncoated ELISA von Thermo Fisher Scientific gemäß der Anleitung zum Einsatz.

Zunächst wurden nach dem Sandwich-Prinzip 100 μ l des Fänger-Antikörpers nach einer 1:250-Verdünnung mit Coating Buffer in jede Vertiefung der Corning™ Costar™ 9018 ELISA-Platte gegeben, die Platte wurde verschlossen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Reste waren dann abzupipettieren und es folgten drei Waschgänge mit mindestens 250 μ l Waschpuffer. Die Inkubationszeit des Puffers betrug dabei ca. eine Minute. Danach wurden weitere unspezifische Bindungen auf der ELISA-Platte mittels 200 μ l einer phosphatgepufferten Lösung (ELISA/ELISAPOT-Verdünnung) blockiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde die Standardlösung durch Zugabe von destilliertem Wasser mit vorsichtigem Schwenken und einer Inkubationszeit von 30 Minuten hergestellt. Sie enthielt eine TNF- α -Konzentration von 500 pg/ml.

Die Verdünnungslösung in den Wells der ELISA-Platte wurde abpipettiert und die Wells wurden einmal mit Waschpuffer gewaschen.

Um eine Standardkurve zu erstellen, waren in die ersten beiden Vertiefungen A1/A2 der ELISA-Platte 200 µl der zuvor hergestellten Standardlösung zu geben. In alle anderen Vertiefungen wurden zunächst 100 µl der Verdünnungslösung vorgelegt, danach je 100 µl aus A1/A2 in B1/B2 gegeben und gut durchmischt, im Anschluss 100 µl aus B1/B2 entnommen, in C1/2 überführt und erneut gut durchmischt. Dieser Vorgang wurde bis F1/2 fünfmal wiederholt, um immer weitere Verdünnungen zu erreichen. Dies ist mit Blick auf Abbildung 5 an der abnehmenden Intensität der Farbe gut zu erkennen.

Ab G1/2 wurde mit dem Probenplasma vom Zeitpunkt T1 im Duplett gestartet. Dafür waren in beide Vertiefungen je 100 µl Probenplasma sowie 100 µl der Verdünnungslösung zu pipettieren. Dies wurde für die anderen Zeitpunkte T2 bis T21 in fortlaufender Reihenfolge ebenso durchgeführt. Dabei entspricht das T2-Duplett den Wells A3/4, das T3-Duplett den Wells B3/4. Diese Systematik setzt sich in ähnlicher Weise fort. Da die ELISA-Platte genügend Wells aufweist, konnten pro Platte die Proben von zwei Patienten und Patientinnen analysiert werden.

Die Platten wurden dann wieder verschlossen und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

Währenddessen waren durch Verdünnung mit Coating Buffer im Verhältnis 1:250 die Detektionsantikörper vorzubereiten. Nach der Inkubationszeit wurden, wie oben beschrieben, die Reste abpipettiert und fünf Waschvorgänge durchgeführt, danach 100 µl der vorbereiteten Detektionsantikörper in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde verschlossen und eine Stunde lang inkubiert. Um das Sandwich aus Fänger-Antikörper, TNF- α sowie Detektionsantikörper sichtbar zu machen, war während der Inkubationszeit Streptavidin-horseradish Peroxidase (Streptavidin-HRP) mittels Verdünnungslösung im Verhältnis 1:100 vorzubereiten. Sie stellt die Enzymaktivität für den Nachweis bereit. Die Reste wurden wieder abpipettiert und es folgten erneut fünf Waschvorgänge. Danach wurden 100 µl Streptavidin-HRP in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wurde verschlossen und 30 Minuten inkubiert, dann wieder abpipettiert und gewaschen. Im Anschluss waren in jede Vertiefung 100 µl einer Lösung aus Tetramethylbenzidin zu geben, die als Substrat von HRP je nach TNF- α -Konzentration eine blaue Farbe erzeugt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung beendet, wodurch es zu einem Farbwechsel nach Gelb (siehe Abbildung 5) kam. Danach wurden die Proben in einem Photometer mit einer Wellenlänge von 450 nm analysiert.

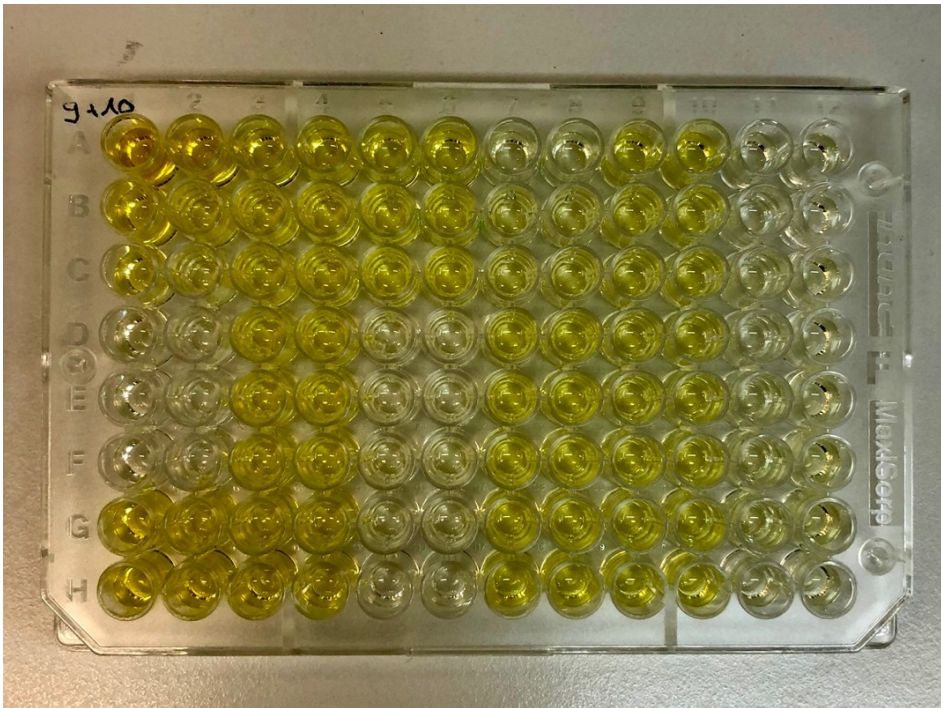


Abbildung 5 ELISA-Platte der TNF- α -Analyse

Die Wells A1/2 enthalten eine Standardlösung mit $c = 500$ pg/ml. Diese Standardlösung wird, wie im Text beschrieben, bis F1/2 immer weiter verdünnt, um eine Standardkurve erstellen zu können. In den Wells G1/2 bis C7/8 befinden sich die Plasmaproben der Zeitpunkte T1 bis T21 des oder der ersten Patienten oder Patientin, in D7/8 bis H11/12 die Plasmaproben des oder der zweiten Patienten oder Patientin.

Quelle: eigene Darstellung

2.5.4 Bestimmung der RNase-1-Aktivität

Die Bestimmung der RNase-1-Aktivität beruht auf der Messung der Menge der durch die RNase in den Proben abgebaute Nukleinsäure Poly:C. Die entstehende Menge an Nukleotiden wird dann durch Messung der optischen Dichte photometrisch bestimmt. Sie spiegelt die Aktivität des Enzyms wider.

Um Fehlmessungen zu minimieren, erfolgte auch hier jede Analyse im Duplikat.

Alle Schritte bis zur photometrischen Auswertung erfolgten auf Eis.

In einer ersten Reihe von Eppendorfgefäßen wurden $149 \mu\text{l}$ RNase-Puffer Gebrauchslösung (s. u.) mit jeweils $1 \mu\text{l}$ der Plasmaproben gemischt und als Positivkontrolle $149 \mu\text{L}$ RNase-Puffer mit $1 \mu\text{l}$ reiner RNase A ($c = 10$ mg/ml), als Negativkontrolle $150 \mu\text{l}$ RNase-Puffer verwendet. Zu allen Proben waren dann $100 \mu\text{L}$ Poly:C (s.u.) hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext, fünf Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

Anschließend galt es, in einer neuen Reihe von Eppendorfgefäßen $250 \mu\text{l}$ einer Mischung aus Lanthan(III)-Chlorid und Perchlorsäure (s. u.) mit $100 \mu\text{l}$ einer Lösung aus fatty acid free Bovine Serum Albumin (BSA) (s. u.) zu mischen. Die Zusammensetzung wurde gevortext und auf Eis gestellt.

Danach wurden je 100 µl der ersten Reihe in die Eppendorfgefäße der zweiten Reihe pipettiert, gevortext und wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der nicht durch die RNase verdauten Poly:C. Danach wurden die Proben für 15 Minuten mit 16 000g und bei 4 °C zentrifugiert. Es waren 100 µl des Überstands in Messküvetten zu pipettieren und mithilfe des Eppendorf BioPhotometer Plus (Model Nr. 6132, Programm: Protein 280) die optische Dichte sowie die Extinktion bei 280 nm zu messen. Dabei wurde die Negativkontrolle vor und die Positivkontrolle nach Analyse der Proben gemessen. Die RNase Aktivität ergab sich anhand der folgenden Formel:

$$F = \frac{OD_{280} \cdot V_{\text{Probe}}}{OD_{280} \cdot V_{\text{Probe}} - OD_{280} \cdot V_{\text{RNase-Puffer}}}$$

$$F = \text{Faktor} = \frac{\text{Gesamtvolumen}(\mu\text{l}) = V(\text{Poly:C}) + V(\text{RNase - Puffer}) + V(\text{Probe})}{V(\text{Probe})(\mu\text{l})}$$

t_{ink} = Inkubationszeit, OD = Optische Dichte

Benötigte Lösungen

RNase-Puffer

Tabelle 3 Zusammensetzung RNase-Puffer-Stammlösung

3,030 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane MW 121,14
3,800 g NaCl MW 58,44
0,372 g EDTA MW 372,2

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt und die Lösung auf 500 ml aufgefüllt. Die RNase-Puffer Stammlösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zum Gebrauch wurden 49,5 ml der Stammlösung mit 500 µl acetyliertem BSA gemischt (c = 100 µg/ml).

Acetylierte BSA-Lösung

Tabelle 4 Zusammensetzung acetylierte BSA-Lösung

3 mg acetyliertes BSA
300 µl steriles Wasser

Die Lösung hatte eine Konzentration von c = 10 mg/ml und wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Fatty acid free BSA-Lösung

Tabelle 5 Zusammensetzung fatty acid free BSA-Lösung

50 mg fBSA
5 ml steriles Wasser

Die Lösung hatte eine Konzentration von $c = 10 \text{ mg/ml}$ und wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Poly:C-Lösung

Tabelle 6 Zusammensetzung Poly:C-Lösung

0,04 g Poly:C
40 ml steriles Wasser

Die Lösung hatte eine Konzentration $c = 1 \text{ mg/ml}$ und wurde in 10 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

Lanthan(III)-Chlorid-Perchlorsäure-Lösung

Tabelle 7 Zusammensetzung Lanthan(III)-Chlorid-Perchlorsäure-Lösung

0,3714 g Lanthan(III)-Chlorid (MW 371,37)
4,325 ml 70 % Perchlorsäure
45,675 ml steriles Wasser

Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.6 Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms Statistical Package for the Social Science (SPSS) Version 23.0 für Mac OS, das Erstellen der Grafiken mithilfe von GraphPad Prism Version 8.00 für Mac OS.

Diese statistische Auswertung umfasste gepaarte und ungepaarte Student's t-Tests sowie einseitige oder zweiseitige Varianzanalysen (ANOVA). Im Falle von festgestellten Unterschieden wurde der Tukey-Post-hoc-Test angewendet. Die Normalverteilung der Variablen ließ sich anhand des Kolmogorov-Smirnov- und des Shapiro-Wilk-Tests prüfen. Variablen, die einer Normalverteilung entsprachen, wurden als Durchschnittswerte (SD) dargestellt.

Kategorische Variablen waren mittels des Mann-Whitney-U-Tests und des Fisher-Tests zu vergleichen. Um Veränderungen zwischen den Gruppen von eRNA, RNase-1 und TNF- α zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde eine ANOVA mit

wiederholten Messungen verwendet. Der nichtparametrische Wilcoxon-Signed-Rank-Test diente dazu, die statistische Signifikanz von Unterschieden in gepaarten Datenproben zu ermitteln, wenn die Annahme der Normalverteilung verletzt worden war. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Bonferroni-Korrektur. Ein Vertrauensniveau von 95 % wurde festgelegt und statistische Signifikanz bei einem Wert von $p < 0,05$ (zweiseitiger Test) angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich vier vs. sechs Zyklen RIPC

3.1.1 RNA

Zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus der RIPC konnte, wie in Abbildung 6 anhand der Zeitpunkte T9 und T13 dargestellt, zwar ein leichter Anstieg der eRNA beobachtet werden, dieser war jedoch nicht signifikant ($p = 0,071$). Die Werte stiegen von 151,6 (SD: 44,2) ng/ml nach dem vierten Zyklus auf 181,8 (SD: 87,5) ng/ml nach dem sechsten Zyklus. Der Mittelwert der Differenz betrug -30,2 (SD: 43,3) ng/ml, das 95 % Konfidenzintervall (KI) reichte von -63,9 bis 3,6.

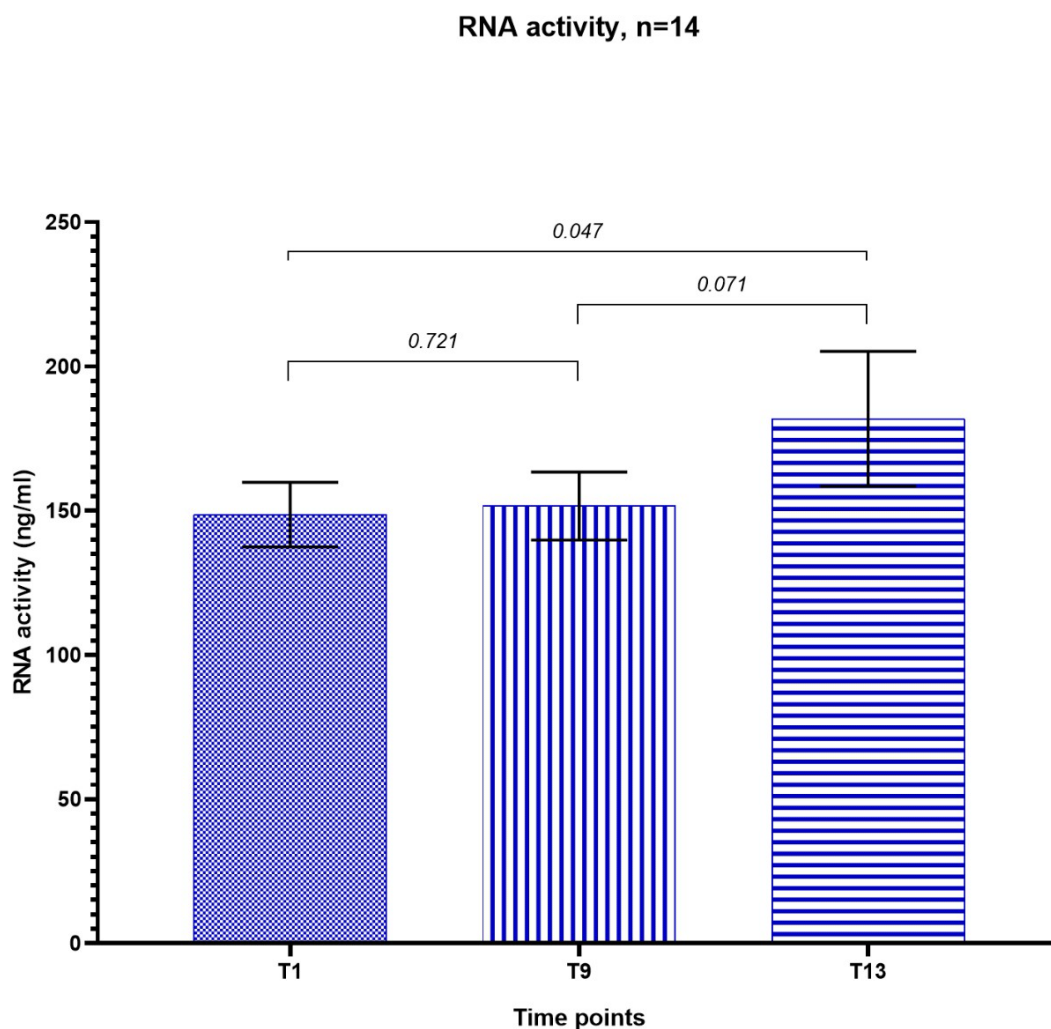


Abbildung 6 eRNA während RIPC
Quelle: eigene Darstellung

3.1.2 RNase-1

Für die Werte der RNase-1 konnte, wie anhand von Abbildung 7 erkennbar, ein signifikanter Anstieg zwischen dem vierten und sechsten Zyklus (T9 vs. T13) mit $p = 0,001$ beobachtet werden. Die Werte stiegen von 151,1 (SD: 42,6) U/ml auf 175,3 (SD: 41,2) U/ml. Der Mittelwert der Differenz betrug dabei - 24,2 (SD: 1,4), bei einem 95 % KI von -34,5 bis -13,8.

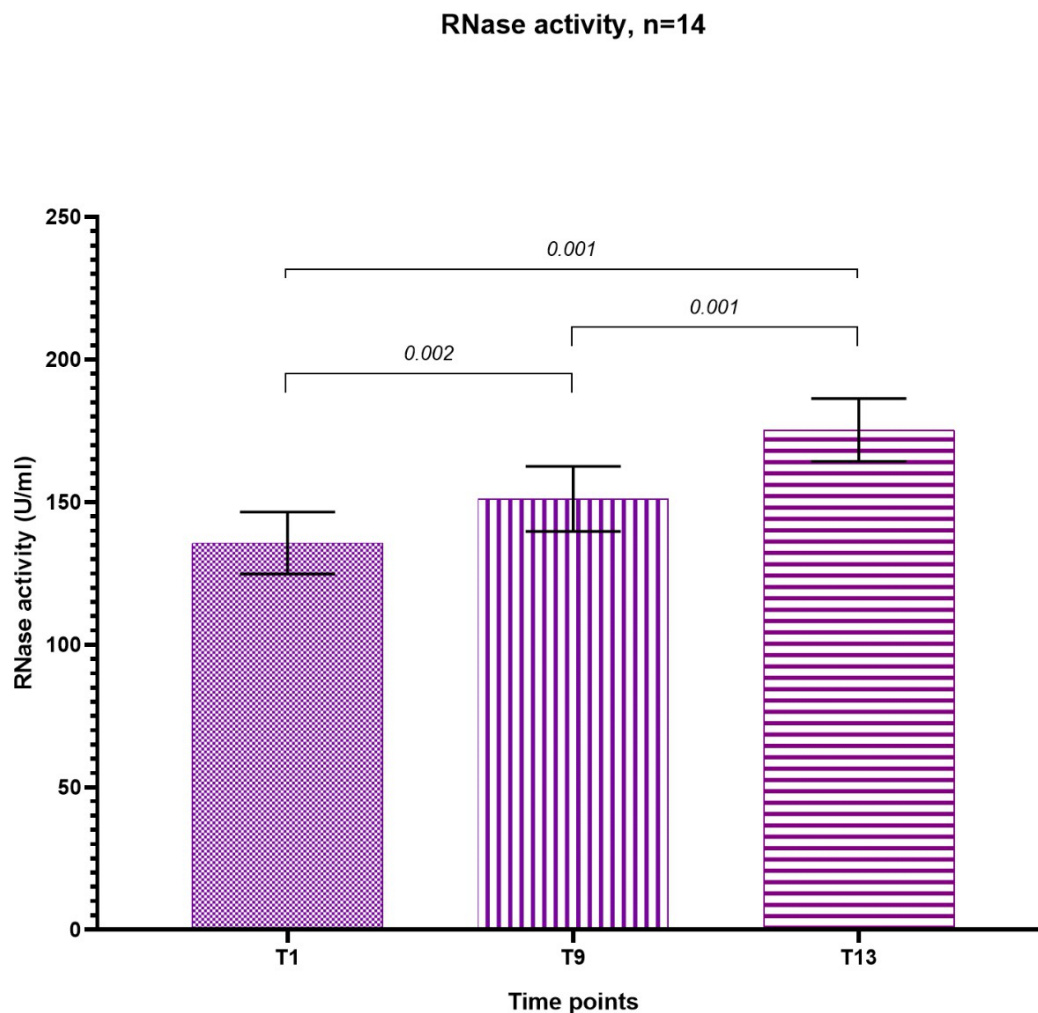


Abbildung 7 RNase-1 während RIPC
Quelle: eigene Darstellung

3.1.3 TNF- α

Die Entwicklung der Werte für TNF- α zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus (T9 vs. T13) lässt sich Abbildung 8 entnehmen. Hier ist eine gegenläufige Kinetik zu eRNA und RNase-1 sichtbar. Es zeigte sich ein moderater Abfall von 69,2 (SD: 46,4) pg/ml nach vier Zyklen auf 61,7 (SD: 46,7) pg/ml nach sechs Zyklen, der sich jedoch als nicht signifikant erwies ($p = 0,433$). Der Mittelwert der Differenz betrug hier 7,4 (SD: 0,3) pg/ml mit einem 95 %-KI von -10,9 bis 25,7.

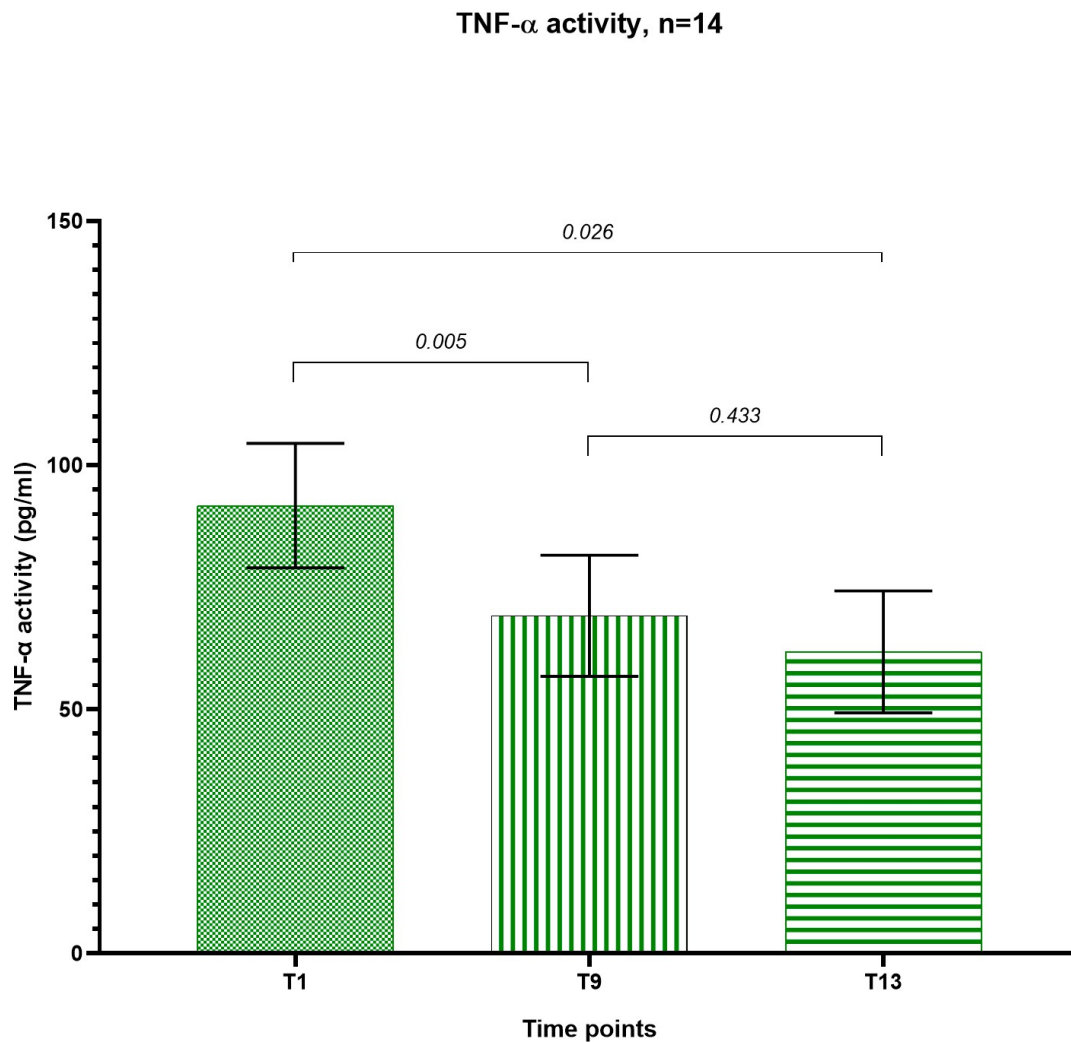


Abbildung 8 TNF- α während RIPC
Quelle: eigene Darstellung

3.2 Kinetik der RNase-1

Die Kinetik der RNase-1 während RIPC ist in Abbildung 9 zu erkennen. Es zeichnete sich bereits nach vier Zyklen der vor der Operation durchgeführten RIPC ein signifikanter Anstieg der RNase-1-Konzentration mit $p = 0,002$ ab (T1 vs. T9). Der Ausgangswert betrug 135,7 (SD: 40,6) U/ml und stieg auf 151,1 (SD: 42,7) U/ml an. Die mittlere Differenz belief sich auf -15,5 (SD: 2,1) U/ml und das 95 %-KI reichte von -22,3 bis -8,7. Wie der Trend nach vier Zyklen bereits vermuten ließ, war nach sechs Zyklen ebenso ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Ausgangswerten mit $p = 0,001$ erkennbar (T1 vs. T13). Der Wert der Baseline entspricht 135,7 (SD: 40,6) U/ml und stieg nach sechs Zyklen auf 175,3 (SD: 41,2) U/ml. Die mittlere Differenz betrug dabei -39,6 (SD: 0,6) U/ml mit einem 95 %-KI von -51,0 bis -28,3. Wie oben erwähnt, ist auch der Anstieg

der Konzentration zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus der RIPC signifikant ($p = 0,001$).

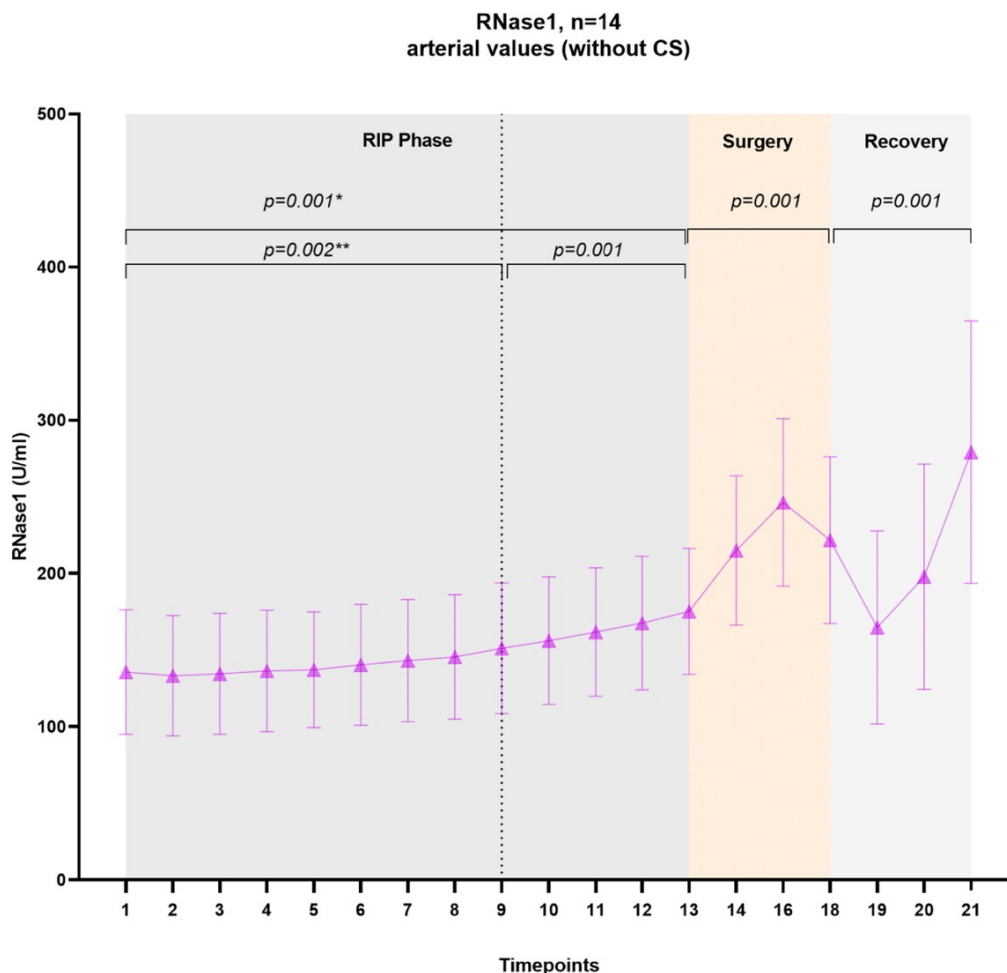


Abbildung 9 Kinetik der RNase-1

* = nach sechs Zyklen ** = nach vier Zyklen

Quelle: eigene Darstellung

Die RNase-1 zeigt mit $p = 0,001$ ebenso einen signifikanten Anstieg zwischen dem Ende der RIPC und dem Beginn der Operation (T13: 175,3 (SD 41,2) U/ml vs. T14: 215,1 (SD :48,7) U/ml; mittlere Differenz: -39,8 (SD: 15,9) U/ml; 95 %-KI -49,0 bis -30,5).

Wie sich Abbildung 9 darüber hinaus entnehmen lässt, zeigte sich auch während der Operation (T13 vs. T18) ein signifikanter Anstieg der Konzentration der RNase-1 im peripheren Blut ($p = 0,001$). Ausgangswert für diese Berechnung war der Wert nach der RIPC (175,3 (SD: 41,2) U/ml). Dieser wurde mit der Konzentration 30 Minuten nach Öffnen der Aortenklammer verglichen (221,8 (SD: 54,4) U/ml). Die mittlere Differenz betrug -46,5 (SD: 13,2) U/ml und das 95 %-KI reichte von -60,9 bis -31,9. Nach der Operation stiegen die Werte im beobachteten Zeitraum bis 48 Stunden nach dem Eingriff von 221,8 (SD 54,4) U/ml (T18) weiter auf 279,2 (SD: 85,6) U/ml (T21) mit $p = 0,001$ (mittlere Differenz: -57,7 (SD 42,6) U/ml; 95 %-KI -82,1 bis -32,9) (siehe Abbildung 9).

Damit ist die Aktivität der RNase-1 48 Stunden postoperativ höher als nach Ende der RIPC.

Die Werte im Koronarvenensinus vor Klemmen der Aorta im Vergleich zu Werten kurz nach Öffnen der Aorta (T15 vs. T17) sind in Abbildung 10 dargestellt und zeigen einen signifikanten Anstieg der RNase-1 während der Klemmzeit ($p = 0,002$). Dabei stiegen die Werte von 221,7 (SD: 53,9) U/ml auf 251,7 (SD: 59,9) U/ml (mittlere Differenz -30,0 (SD: 6,0) U/ml und 95 %-KI: -43,3 bis -16,8).

Auch im peripheren Blut war ein signifikanter Anstieg während der Klemmzeit (T14 vs. T16) von 215,1 (SD: 48,7) U/ml auf 246,4 (SD: 54,7) U/ml mit $p = 0,001$ (mittlere Differenz -31,3 (SD: 18,1) U/ml; 95 %-KI von - 41,8 bis - 20,9) zu erkennen (Abbildung 10). Der transkardiale Gradient zeigte sowohl vor Schluss der Aortenklemme (T14 vs. T15) mit $p = 0,158$ als auch nach Öffnung (T16 vs. T17) mit $p = 0,221$ keine signifikanten Unterschiede.

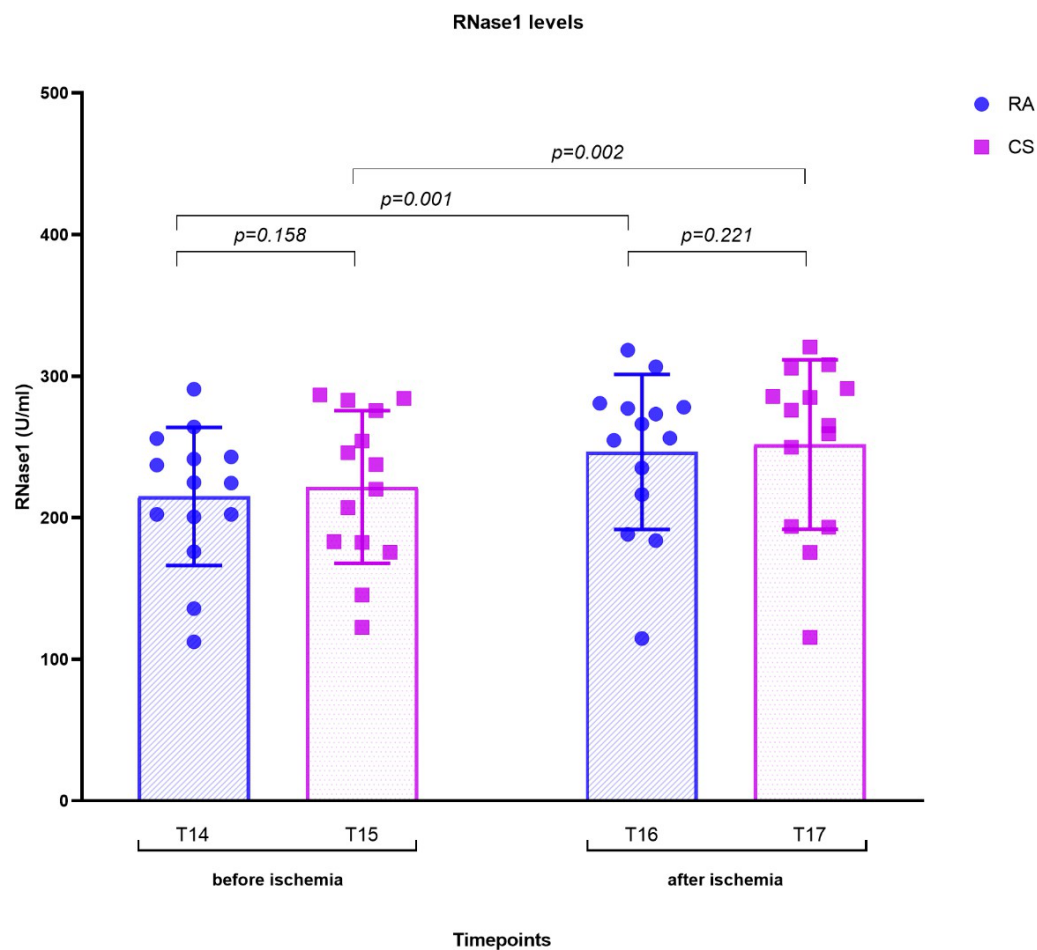


Abbildung 10 Transkardialer Gradient RNase-1
CS: Koronarvenensinus, RA: Radialarterie
Quelle: eigene Darstellung

3.3 Kinetik der eRNA

Wie oben beschrieben, konnte in der Kinetik der eRNA ein nicht signifikanter Anstieg zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus der RIPC festgestellt werden (T9 vs. T13). Die Kinetik der eRNA während der RIPC ist in Abbildung 11 dargestellt. Auch der Anstieg der eRNA nach vier Zyklen (T9) im Vergleich zum Ausgangswert (T1) zeigte sich mit $p = 0,721$ nicht signifikant. Die Ausgangskonzentration betrug dabei 148,6 (SD: 35,4) ng/ml und stieg nach dem vierten Zyklus leicht auf 151,6 (SD: 44,2) ng/ml an. Der Mittelwert der Differenz belief sich auf -3,0 (SD: 8,8) ng/ml und das 95 %-KI reichte von -40,5 bis 20,1. Der Anstieg nach sechs Zyklen (181,8 (SD: 87,6) ng/ml) im Vergleich zur Baseline (148,6 (SD: 35,4) ng/ml) war jedoch mit $p = 0,047$ signifikant (mittlere Differenz: -53,1 SD (87,0) ng/ml; 95 %-KI -115 bis 9,2).

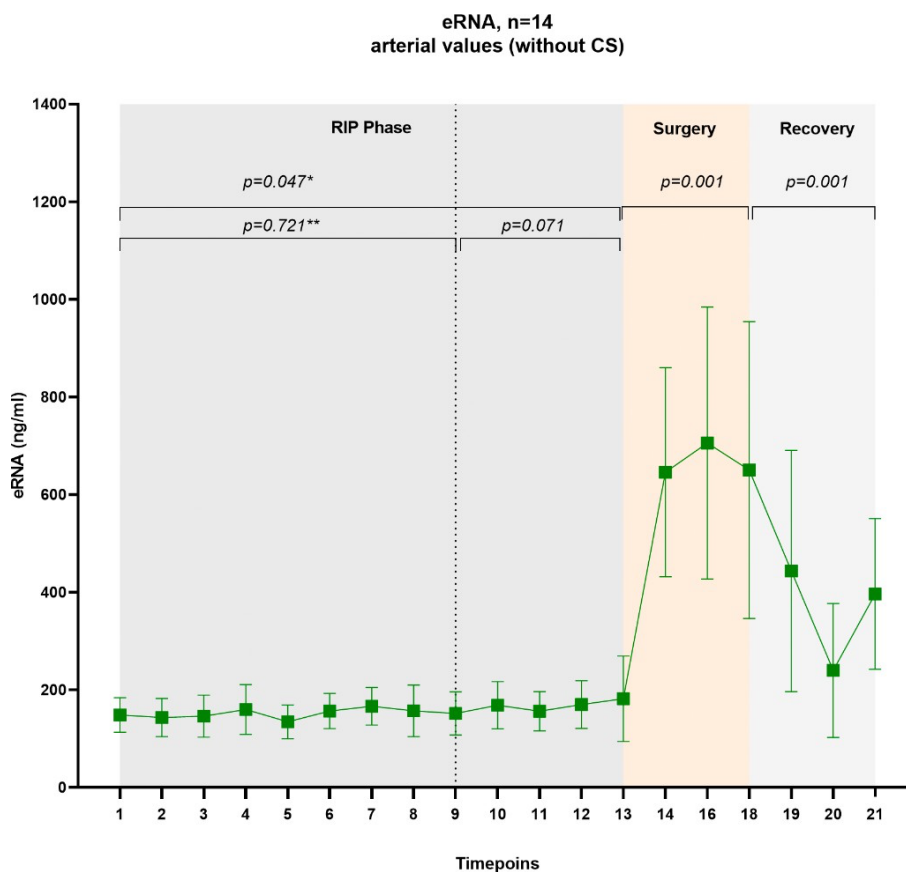


Abbildung 11 Kinetik der eRNA

* = nach sechs Zyklen ** = nach vier Zyklen

Quelle: eigene Darstellung

Wie Abbildung 11 veranschaulicht, kam es im Rahmen des Operationsbeginns zu einem deutlichen Anstieg der eRNA-Konzentration im peripher arteriellen Blut. Der Anstieg zwischen dem Ende der RIPC (T13) und dem Beginn der Operation (T14) war mit

$p = 0,001$ signifikant (81,8 (SD: 87,6) ng/ml vs. 645,9 (SD:214,1) ng/ml; mittlere Differenz: - 464,1 (SD 180,7) ng/ml; 95 %KI -568,5 bis -359,8).

Postoperativ erreichten die Werte nach 24 Stunden (T20) ihren Tiefpunkt bei 239,8 (SD: 137,4) ng/ml. Trotz der steigenden Tendenz nach 48 Stunden (T21) ist die Konzentration mit 396,5 (SD: 154,5) ng/ml im Vergleich zu den Werten direkt nach der Operation (T18) mit 650,4 (SD: 304,3) und $p = 0,001$ immer noch signifikant niedriger (mittlere Differenz: 253,9 SD 291,3 ng/ml; 95 %KI 137,7 bis 370,2).

Die Werte erreichten nach der Operation im Beobachtungszeitraum nicht das Ausgangsniveau.

Alle transkardialen Gradienten der eRNA sind in Abbildung 12 dargestellt. Sie wurden kurze Zeit vor (T14 vs. T15) und nach (T16 vs. T17) der Aortenklammung bestimmt. Es zeigten sich mit $p = 0,397$ bzw. $p = 0,683$ zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen in den peripher arteriellen Blutproben und der Probe aus dem Koronarvenensinus. Vor der Aortenklammung (T14 vs. T15) wurde in der peripheren Probe eine Konzentration von 645,9 (SD: 214,1) ng/ml und im Koronarvenensinus ein Wert von 673,5 (SD 266,7) ng/ml gemessen (mittlere Differenz - 27,5 (SD: 123,5) ng/ml; 95 %-KI -98,8 bis 43,8). Nach der Aortenklammung (T16 vs. T17) lagen die Werte peripher bei 705,9 (SD: 278,6) ng/ml und im Koronarvenensinus bei 701,5 (SD: 263,1) ng/ml (mittlere Differenz 4,4 (SD: 77,6) ng/ml, 95 %KI von -40,5 bis 49,2. Ebenso in Abbildung 12 dargestellt sind die Unterschiede der Werte vor und nach der Aortenklammung im peripher arteriellen Blut sowie im Koronarvenensinus. Dabei konnte weder peripher (T14 vs. T16) mit $p = 0,414$ noch in Proben des Koronarvenensinus (T15 vs. T17) mit $p = 0,397$ ein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

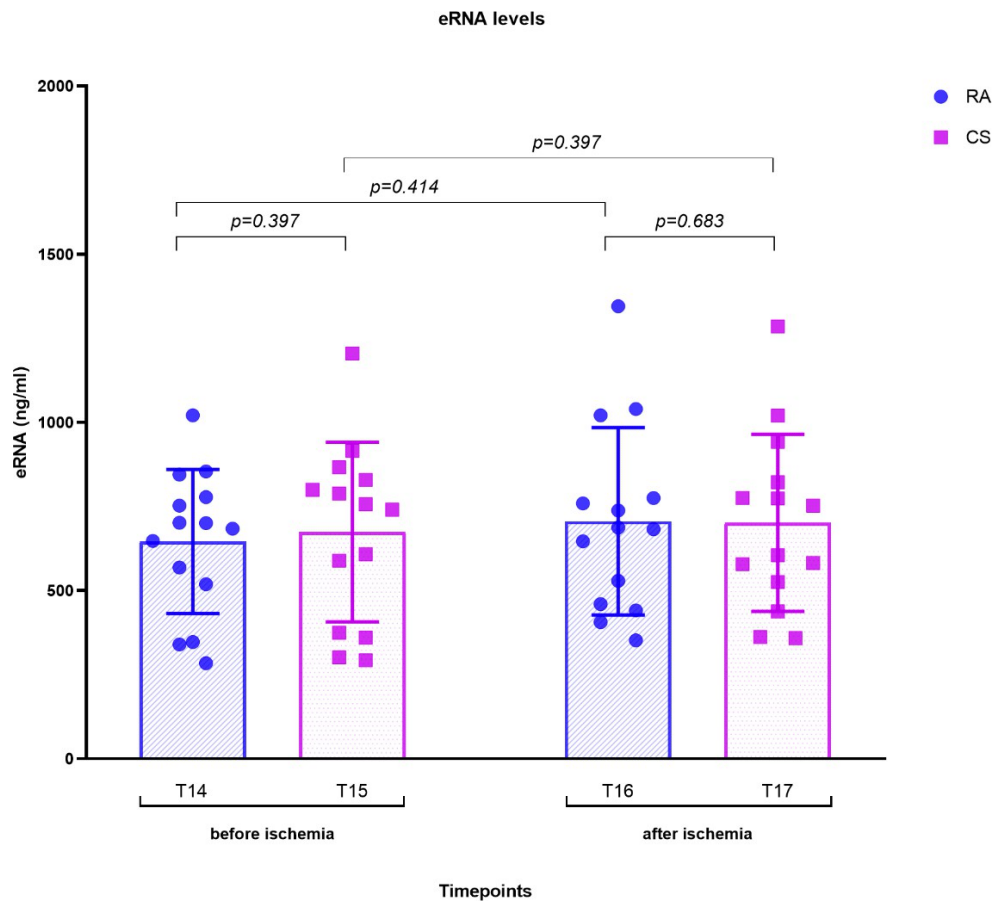


Abbildung 12 Transkardialer Gradient eRNA
 CS: Koronarvenensinus; RA: Radialarterie
 Quelle: eigene Darstellung

3.4 Kinetik des TNF- α

Die Kinetik des TNF- α weist einen der eRNA sowie der RNase-1 gegenläufigen Trend auf, was in Abbildung 13 veranschaulicht wird. Während die Konzentrationen von eRNA und RNase-1 unter RIPC eine steigende Tendenz zeigen, fallen die Werte des TNF- α .

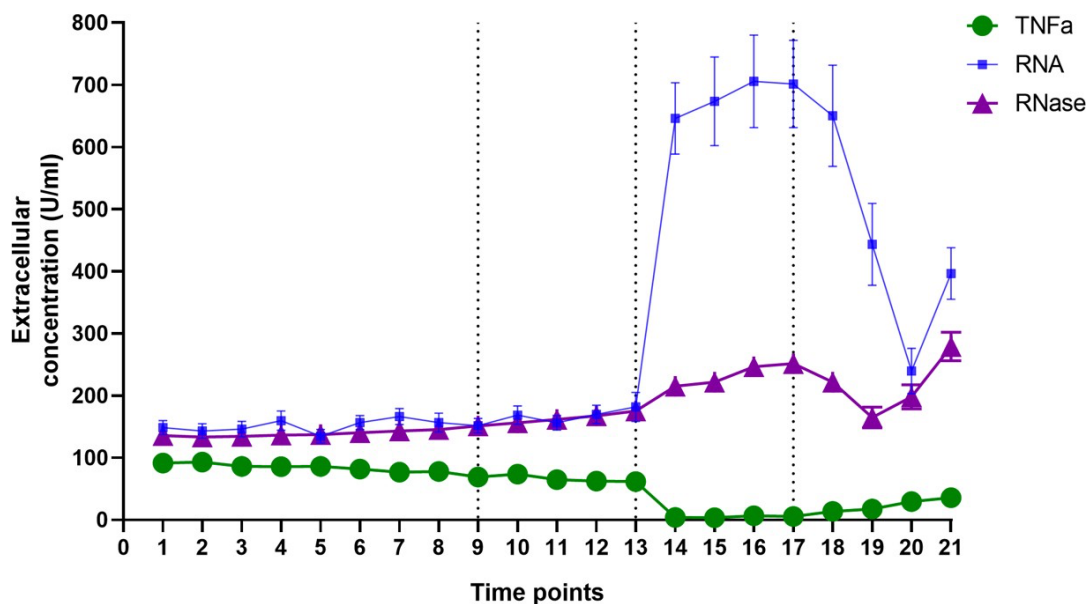


Abbildung 13 Kinetik aller Parameter
Quelle: eigene Darstellung

Eine isolierte Darstellung der Kinetik des TNF- α erfolgt in Abbildung 14. Zwischen dem Ausgangswert 91,7 (SD: 47,7) pg/ml (T1) und dem Wert nach vier Zyklen mit 69,2 (SD: 46,4) pg/ml (T9) zeigte sich bereits ein signifikanter Abfall ($p = 0,005$; mittlere Differenz: 22,6; 95 %-KI von -10,9 bis 25,7). Dieser konnte auch nach sechs Zyklen (T13) im Vergleich zum Ausgangswert (T1) nachgewiesen werden. Hier kam es zu einem Abfall von 91,7 (SD: 47,7) pg/ml auf 61,8 (SD: 46,7) pg/ml mit $p = 0,027$. Die mittlere Differenz betrug dabei 29,9, das 95 %-KI reichte von 7,6 bis 52,3. Der Abfall zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus war, wie oben bereits erwähnt, nicht statistisch signifikant (T9 vs. T13). Es konnte jedoch ein signifikanter Abfall des TNF- α -Spiegels zwischen Ende der RIPC (T13) und Beginn der Operation (T14) mit $p = 0,001$ beobachtet werden (61,8 (SD: 46,7) pg/ml vs. 4,1 (SD: 4,0) pg/ml; mittlere Differenz 57,6 (SD: 45,8) pg/ml 95 %-KI: 31,2 bis 84,1).

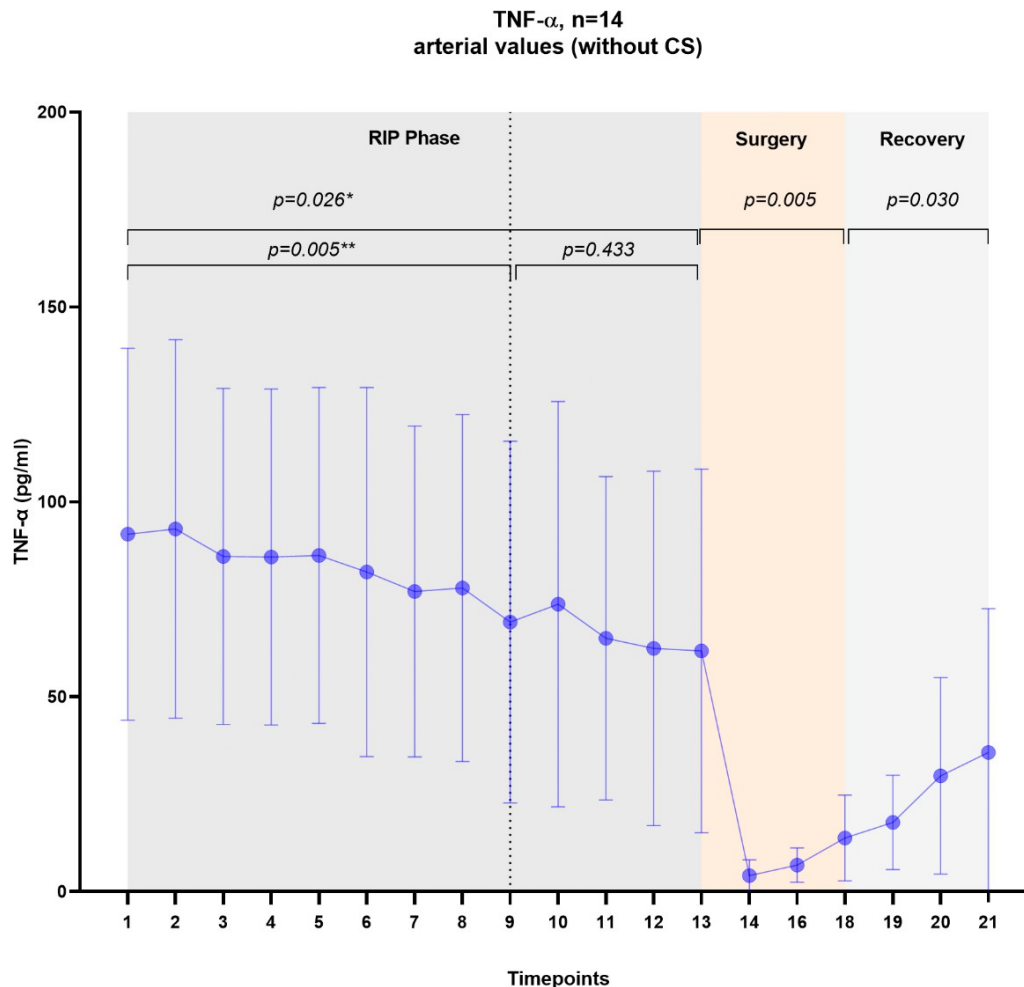


Abbildung 14 Kinetik des TNF- α
 * = nach sechs Zyklen; ** = nach vier Zyklen
 Quelle: eigene Darstellung

Während der Operation (T13 vs. T18) ließ sich eine weiterhin signifikante Reduktion der TNF- α -Konzentration ($p = 0,005$) messen (siehe Abbildung 14). Die Werte sanken von 61,8 (SD: 46,7) pg/ml auf 13,8 (SD: 11,0) pg/ml mit einer mittleren Differenz von 48,0 (SD: 35,7) pg/ml und einem 95 %-KI von 20,6 bis 75,7.

Vom Ende der Operation bis 48 Stunden postoperativ (T18 vs. T21) konnte mit $p = 0,03$ ein relevanter Anstieg beobachtet werden (13,8 (SD: 11,0) pg/ml vs. 35,7 (SD: 36,9) pg/ml), mit einer mittleren Differenz von -22,0 (SD: 38,39) pg/ml und einem 95 %-KI von -44,0 bis 0,1. Die Werte erreichten im Beobachtungszeitraum jedoch nicht den Ausgangswert von 91,7 (SD: 57,7) pg/ml (T1).

Der transkardiale Gradient der TNF- α -Konzentration zeigte sowohl vor der Aortenklammung (T14 vs. T15) mit $p = 0,388$ als auch nach der Öffnung (T16 vs. T17) mit $p = 0,084$ keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15). Die Konzentration kurz vor der Klemmung im Blut aus der peripheren Arterie betrug 4,1 (SD: 4,0) vs. 3,8 (SD:

4,4) pg/ml im Blut aus dem Koronarvenensinus. Dabei ergab sich eine mittlere Differenz von 0,3 (SD:0,4) pg/ml und ein 95 %-KI von -0,4 bis 1,1.

Nach der Klemmung zeigte sich peripher eine Konzentration von 6,8 (SD: 4,4) pg/ml vs. 5,7 (SD: 4,7) pg/ml im Koronarvenensinus. Der Mittelwert der Differenz betrug hier 1,1 (SD: 0,3) pg/ml, das 95 %-KI reichte von -0,1 bis 2,3.

Es kam jedoch zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α -Konzentration während der Aortenklemmung sowohl in den peripheren Proben als auch in den Proben aus dem Koronarvenensinus (Abbildung 15). Im peripheren Blut stieg die Konzentration von 4,1 (SD: 4,0) pg/ml auf 6,8 (SD: 4,4) pg/ml signifikant ($p = 0,007$) an (mittlere Differenz: -2,7 (SD: 2,9) pg/ml; 95 %-KI -4,3 bis -1,1). Im Koronarvenensinus stieg die Konzentration ebenso signifikant ($p = 0,016$) von 3,8 (SD: 4,4) pg/ml auf 5,7 (SD: 4,7) pg/ml (mittlere Differenz: -2,0 (SD:2,4) pg/ml; 95 %-KI -3,4 bis -0,6).

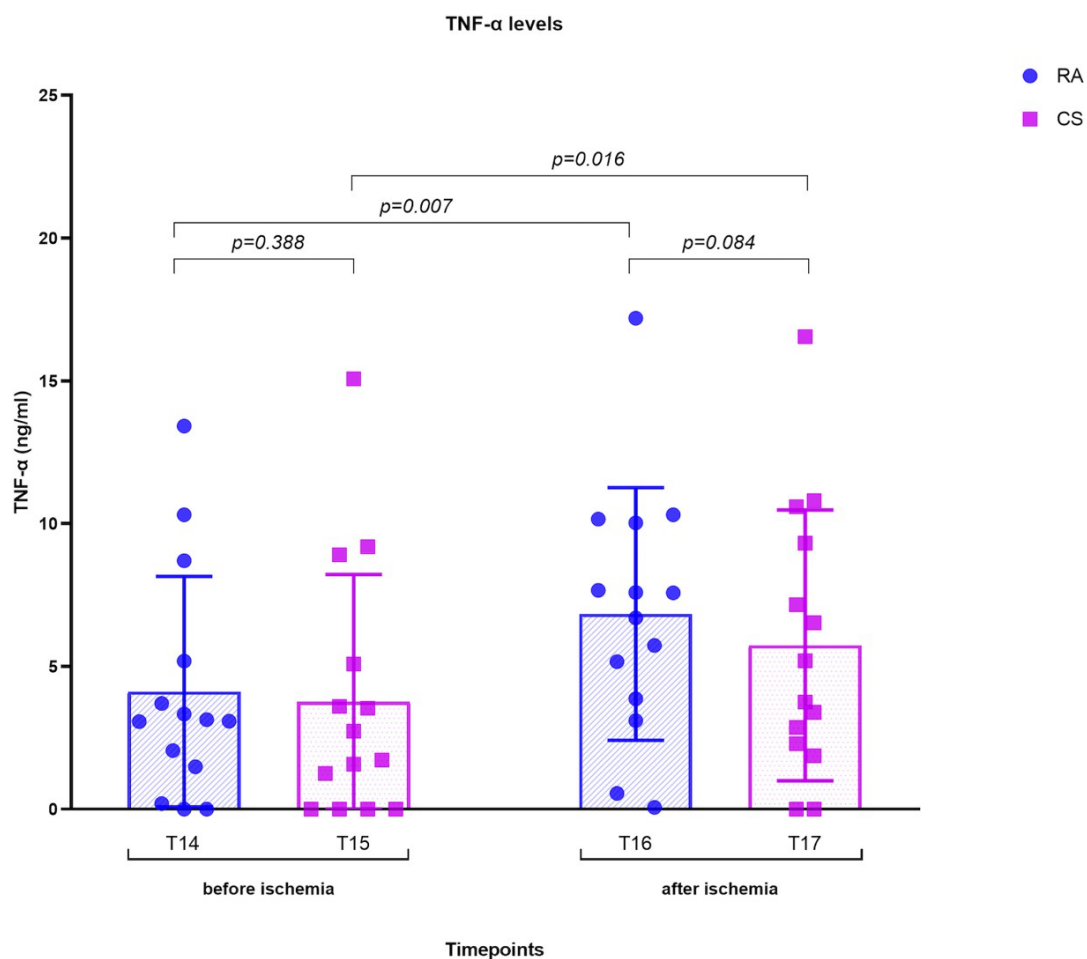


Abbildung 15 Transkardialer Gradient TNF- α
 CS: Koronarvenensinus; RA: Radialarterie
 Quelle: eigene Darstellung

4 Diskussion

Um die Auswirkungen von sechs Zyklen der ischämischen Fernkonditionierung auf das eRNA/RNase-1-System bei Patienten und Patientinnen zu untersuchen, die sich einer herzchirurgischen Operation mit Herz-Lungen-Maschine unterziehen, wurden Blutproben einer Patientenkohorte zu verschiedenen Zeitpunkten im Zuge der RIPC, der Operation und bis zu 48 Stunden postoperativ analysiert. Während dieses Zeitraums wurde die Dynamik des eRNA/RNase-1-Systems einschließlich TNF- α verfolgt. Ein besonderes Augenmerk galt der Veränderung der RNase-1-Aktivität zwischen dem vierten und dem sechsten RIPC-Zyklus sowie dem transkardialen Gradienten nach der Aortenreperfusion.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die Erhöhung der RIPC-Zyklen von vier auf sechs zu einer weiteren signifikanten Steigerung der RNase-1-Aktivität führt. Eine weitere bedeutsame Erkenntnis zeigt sich in der Angleichung des transkardialen Gradienten von eRNA und TNF- α nach der Öffnung der Aorta, was auf eine gesteigerte Reduktion schädlicher Parameter im CS während der Operation durch RNase-1 hinweist.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Kinetik der RNase-1 während der RIPC

Die Kinetik der RNase-1 während der RIPC lässt in der vorliegenden Studie bereits nach vier Zyklen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert erkennen. Mit dieser ersten Erkenntnis konnten zunächst die Ergebnisse von Cabrera et al. (2015) experimentell bestätigt werden, die erstmals den Effekt von RIPC auf das eRNA/RNase-1-System beschrieben, wobei die RNase-1 als natürlicher Gegenspieler der eRNA die Rolle des potenziell kardioprotektiven Mediators einnimmt.

In der hier durchgeführten Studie wurde die RIPC erstmals mit sechs anstelle der in zahlreichen vorausgegangenen Studien angewandten vier Zyklen durchgeführt (Cabrera-Fuentes et al., 2015; Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Meybohm et al., 2015; Thielmann et al., 2013). Zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus konnte weiterhin ein signifikanter Anstieg der RNase-1-Aktivität beobachtet werden, was den Zusammenhang zwischen RIPC und dem eRNA/RNase-1-System bekräftigt. Darüber hinaus vermag die gesteigerte RNase-1-Aktivität in ihrer Funktion als Mediator der RIPC-Signalwege den bereits zuvor in einigen Studien bestätigten Effekt der Myokardprotektion zu verstärken. Eine höhere Aktivität der RNase-1 könnte dabei einen intensivierten Abbau von

zirkulierender eRNA bewirken und dadurch weitere zum IRI beitragende Signalwege, beispielsweise die Freisetzung des TNF- α , hemmen (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Fischer et al., 2012). Dieser Effekt zeigt sich möglicherweise in einem verbesserten klinischen Outcome der Patienten und Patientinnen und widerlegt durch angepasste RIPC-Protokolle gegebenenfalls die ernüchternden Ergebnisse der Phase-III-Studien (Hausenloy, Candilio, et al., 2016; Meybohm et al., 2015).

Dabei muss bedacht werden, dass sich die Anzahl der Zyklen nicht beliebig steigern lässt, da dies auch mit einer erhöhten Narkosezeit einhergeht. Ob dabei der Effekt der Ausdehnung von vier auf sechs Zyklen bereits ausreicht, um die Myokardprotektion und somit das klinische Outcome signifikant zu verbessern, muss deshalb in prospektiv randomisierten Studien an zwei verschiedenen Kohorten getestet werden.

An dieser Stelle sei zudem erwähnt, dass die RNase-1 vermutlich nur Teil eines komplexen, nicht vollständig verstandenen Netzes an Signalwegen ist, die durch die RIPC ausgelöst werden. Wie oben aufgeführt, bestätigen bereits diverse Studien den Effekt von RIPC. Diese zeigten keinen einheitlichen Signalweg, sondern eine Vielzahl an möglichen Wirkmechanismen. Darunter fallen einerseits weitere humorale Mediatoren, andererseits neuronale und antiinflammatorische Signalwege (Davidson et al., 2013; Heusch, 2015; Konstantinov et al., 2004). Die RNase-1 allein kann den Effekt der RIPC nicht vollständig erklären, stellt jedoch aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens im Körper sowie der daraus resultierenden nicht vorhandenen Zytotoxizität gegen körpereigene Zellen eine bedeutsame therapeutische Option dar (Gaur et al., 2001).

4.1.2 Kinetik des TNF- α während der RIPC

Basierend auf den Ergebnissen früherer Studien lassen sich anhand des Anstiegs der RNase-1-Aktivität während der RIPC, insbesondere zwischen dem vierten und sechsten Zyklus, eine Verringerung der eRNA und, daraus resultierend, des TNF- α erwarten (Cabrera-Fuentes et al., 2015; Lu et al., 2018). In Bezug auf die Kinetik des TNF- α konnten die Ergebnisse von Cabrera et al. (2015) nach vier Zyklen erneut bestätigt werden. Auch nach dem sechsten Zyklus war in Bezug zum Ausgangswert ein signifikanter Abfall der Konzentration festzustellen. Der Unterschied zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus erwies sich dabei entgegen den Erwartungen als nicht signifikant. Dennoch ist, wie in Abbildung 13 ersichtlich, eine sinkende Tendenz zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen zunächst die Theorie, dass der TNF- α als Teil des

IRI-Signalwegs durch einen Anstieg der RNase-1-Aktivität im Rahmen der RIPC gemindert werden kann (Cabrera-Fuentes et al., 2015, 2014).

Das Absinken zwischen dem vierten und dem sechsten Zyklus trotz steigender RNase-1-Aktivität ist nicht signifikant. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Effekt der RNase-1 weniger stark zum Tragen kommt, wenn sich die Konzentrationen von TNF- α bereits auf einem relativ niedrigen Level befinden.

Da TNF- α nicht ausschließlich über die von eRNA ausgelösten Signalwege freigesetzt wird, ist trotz steigender RNase-1-Aktivität zunächst kein signifikanter Abfall mehr zu erkennen. Zusätzliche TNF- α freisetzende Signalwege, etwa über die ROS, können durch die gesteigerte Aktivität der RNase-1 zwar auch, aber gegebenenfalls nicht genauso effektiv verhindert werden (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Förstermann et al., 2017; Zhao et al., 2022). Um die ohnehin schon deutlich gesunkenen Konzentrationen von TNF- α durch die RIPC weiter zu minimieren, könnte eine signifikant höhere Enzymaktivität von RNase-1 erforderlich sein.

Zwischen dem Ende der sechs RIPC-Zyklen und kurz vor Beginn der Herzoperation ist erneut ein signifikanter Anstieg der RNase-1-Aktivität auf deutlich höhere Werte zu beobachten. Dabei zeigt sich ein signifikanter Abfall der TNF- α -Konzentration. Um festzustellen, ob dieser zusätzliche und verzögerte Anstieg der RNase-1 aufgrund der Erhöhung der Zyklen oder auch bei der Verwendung von vier RIPC-Zyklen auftritt, sollten Folgestudien mit verschiedenen Kohorten in Betracht gezogen werden.

4.1.3 Kinetik der eRNA während der RIPC

Wird die Kinetik der eRNA in Betracht gezogen, offenbart sich eine Diskrepanz zwischen den vorliegenden Ergebnissen und den Erkenntnissen, die der Studie von Cabrera et al. (2015) zugrunde liegen und als Basis für die aktuellen Experimente dienen. Während in der vorherigen Studie ein Abfall der eRNA während der RIPC beobachtet wurde, zeigt sich hier entgegen den Erwartungen eine tendenziell ansteigende Entwicklung. Nach vier Zyklen war noch keine wesentliche Veränderung erkennbar, jedoch zeichnete sich nach sechs Zyklen ein signifikanter Anstieg ab. Um eine Erklärung für diese zunächst gegensätzlich erscheinenden Ergebnisse darzulegen, erscheint die Betrachtung von anderen Studien sinnvoll, in denen die mögliche Beteiligung von microRNA (miRNA) als protektiver Mediator im Rahmen der RIPC diskutiert wird (Frey et al., 2018; Li et al., 2014; Pan et al., 2019; Slagsvold et al., 2014). Diese Studien konnten einen Anstieg spezifischer miRNA-Subtypen durch RIPC sowohl in Kardiomyozyten als auch im

Plasma nachweisen, was auf eine humorale Übertragung des protektiven Faktors hindeutet (Li et al., 2014; Zeng et al., 2017). Diese miRNA ist durch nicht eindeutig geklärte Mechanismen vor dem Abbau durch RNase geschützt (Diehl et al., 2012; Li et al., 2014). In Anbetracht der Erkenntnisse könnte der beobachtete Anstieg der eRNA in den hier vorliegenden Ergebnissen auf eine gesteigerte Freisetzung der protektiven miRNA hindeuten, die mit der Anzahl der durchgeführten RIPC-Zyklen zunimmt. Gleichzeitig sorgt der bereits diskutierte Anstieg der RNase-1 für den Abbau der zytotoxisch wirkenden eRNA, worauf der trotz steigender eRNA-Konzentration sinkende TNF- α -Spiegel hindeutet. In weiterführenden Studien könnte dahingehend eine Differenzierung der eRNA in ihre Subtypen sinnvoll sein.

4.1.4 Transkardialer Gradient

Im Rahmen der zweiten großen Fragestellung dieser Studie wurde der Konzentrationsgradient der verschiedenen Parameter zwischen RA und CS zum Zeitpunkt der Aortenklammung und Aortenöffnung evaluiert. In der vorausgegangenen Studie zeigte sich bei Öffnen der Aorta trotz vorausgegangener RIPC mit vier Zyklen eine signifikante höhere Konzentration von TNF- α und eRNA im CS als in der RA. Dieser transkardiale Gradient bestand zum Zeitpunkt der Aortenklammung noch nicht und kann als Zeichen einer durch die Operation gesteigerten myokardialen Gewebeschädigung mit Freisetzung von eRNA interpretiert werden, die dann im Zusammenspiel mit Zytokinen wie TNF- α die Entstehung des IRI mitbedingt. Hohe Spiegel an Zytokinen wie TNF- α im CS im Rahmen kardiochirurgischer Operationen konnten bereits in früheren Studien während der ischämischen Phase nachgewiesen werden (Cabrera-Fuentes et al., 2015; Wan et al., 1996). In der gleichen Studie maßen Cabrera et al. 2015 in der RIPC-Gruppe im Vergleich zur Gruppe ohne RIPC sowohl im CS als auch in der RA zum Zeitpunkt der Aortenöffnung deutlich niedrigere Werte von TNF- α und eRNA, was eine Reduktion der schädigenden Mediatoren des IRI während der Operation durch RIPC zeigte. Dies war ein weiterer Hinweis auf den bereits in einigen Studien berichteten positiven Effekt der RIPC (Ali et al., 2010; Cabrera-Fuentes et al., 2015; Thielmann et al., 2013).

Daran anknüpfend wurde in der hier vorliegenden Studie durch zwei zusätzliche RIPC-Zyklen ein Angleichen der Werte sowohl von eRNA als auch von TNF- α zwischen myokardialem Ein- und Ausfluss am Ende der Operation beobachtet. Eine naheliegende Begründung dafür könnte die durch die beiden zusätzlichen RIPC-Zyklen bedingte

erhöhte RNase-1-Aktivität sein, wodurch die Konzentrationen der schädigenden eRNA sowie des TNF- α im Myokard verringert werden und die Protektion verbessert wird. Neben der gesteigerten Enzymaktivität könnten auch die in Tabelle 8 dargestellten signifikant längeren Klemmzeiten von Bedeutung sein. Durch eine längere Wirkdauer der RNase-1 wird möglicherweise mehr eRNA abgebaut und der TNF- α -Spiegel gesenkt.

Tabelle 8 Daten der Operationen
EKZ: Extrakorporale Zirkulation

	vier Zyklen (Cabrera 2015)	sechs Zyklen	p-Wert
OP-Dauer, min	170 (SD: 62)	207 (SD:46)	0,084
EKZ, min	74 (SD: 369)	101,5 (SD:44)	0,082
Klemmzeit, min	36 (SD:12)	67,5 (SD:39)	0,010

Während in der Kinetik der eRNA weder peripher noch im Koronarvenensinus eine signifikante Änderung zwischen Klemmung und Öffnung der Aorta zu beobachten war, zeigte die RNase-1-Aktivität an beiden Abnahmestellen einen signifikanten Anstieg. Das verdeutlicht nochmals die in früheren Studien berichtete Antagonisierung der schädlichen eRNA durch RNase und bekräftigt die Vermutung, dass die durch sechs Zyklen RIPC gesteigerte RNase-1-Aktivität den IRI weiter begrenzen kann (Cabrera-Fuentes et al., 2015, 2014).

4.1.5 Postoperative Kinetik der RNase-1

Nach einem initialen Abfall der RNase-1-Aktivität vier Stunden nach der Operation war im weiteren postoperativen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität zu verzeichnen. Dieser übertraf die Werte aller vorherigen Messzeitpunkte. Der Befund korreliert mit der Entdeckung des sogenannten Second Window of Protection (SWOP). Das SWOP beschreibt ein zweites, nach ca. 24 Stunden auftretendes Zeitfenster, in dem das Myokard vor dem IRI geschützt ist. Es erstreckt sich über eine Dauer von zwei bis drei Tagen. Einige der beteiligten Mediatoren, darunter die Januskinase 1 und 2, der NFkB sowie die Proteinkinase C, wurden bereits detektiert. Der gesamte Mechanismus und vor allem die tatsächlich schützende Wirkung am Myokard selbst sind noch nicht geklärt (Hausenloy & Yellon, 2010; Kuzuya et al., 1993). Alle Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Studie gewonnen werden konnten, deuten auf eine Beteiligung der RNase-1 an diesem Prozess hin. In weiteren Studien könnte untersucht werden, ob der RNase-1-Anstieg im SWOP nach sechs Zyklen signifikant höher ist als nach vier und damit durch Erhöhung der Zyklen eine verbesserte Myokardprotektion

erwirkt werden kann. Darüber hinaus zeigt sich, dass die RNase-1-Aktivität nach 48 Stunden höher ist als nach Abschluss des sechsten RIPC-Zyklus, was darauf hindeutet, dass die RIPC mit sechs Zyklen im SWOP möglicherweise wirksamer ist als unmittelbar vor dem Eingriff. Um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen, sind weitere Studien an verschiedenen Kohorten erforderlich. Dies könnte insbesondere bei geplanten ischämischen Ereignissen, wie elektiven PCI oder geplanten Herzoperationen, von Nutzen sein und in der klinischen Praxis eine attraktive Alternative zur Fernkonditionierung unmittelbar vor dem Eingriff darstellen. Es ist jedoch zu beachten, dass die RIPC-Zyklen von den Patienten als schmerzhaft empfunden werden können und es möglicherweise einer Sedierung bedarf.

4.2 Limitationen und Ausblick

In der durchgeführten Studie wurde aufgrund der geringen Anzahl an Teilnehmern und Teilnehmerinnen sowie der damit verbundenen geringen Wahrscheinlichkeit eines klinischen Nutzens ein longitudinales Studiendesign angewandt. Die Parameter einer einzelnen Kohorte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht und miteinander verglichen. Dadurch konnten die Unterschiede zwischen dem vierten und sechsten Zyklus der RIPC sowie das Verhalten der Parameter nach dem sechsten Zyklus gut illustriert werden. Das angewandte Studiendesign erlaubt jedoch keinen Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen nach der RIPC. Vor diesem Hintergrund wird für zukünftige Forschung zu diesem Thema ein randomisiertes kontrolliertes Studiendesign empfohlen, bei dem es mindestens zwei zu vergleichende Kohorten zu berücksichtigen gilt. Dabei sollten nicht nur die involvierten Mediatoren eingebunden sein, sondern insbesondere auch das klinische Outcome ist zu inkludieren, um die vielversprechenden Ergebnisse der RIPC mit sechs Zyklen abschließend und fundiert zu bewerten. Eine Erhöhung der Teilnehmerzahl ist in dieser Hinsicht zur Verbesserung der Aussagekraft der Studie ratsam.

Des Weiteren sollte eine Überarbeitung der Einschlusskriterien in Erwägung gezogen werden. Die in dieser Studie eingeschlossenen Studienteilnehmer und -teilnehmerinnen unterzogen sich neben isolierten CABG auch Kombinationseingriffen. Dies kann problematisch sein: Von Heusch und Rassaf (2016) wurde berichtet, dass die im Rahmen der Kombinationseingriffe durchgeführten Herzklappen-Operationen neben der ischämischen zu einer zusätzlichen traumatischen Gewebeschädigung führen, die den Effekt des RIPC negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte die Wirkung der RIPC

bei isolierten CABG unter anderem von Karuppasamy et al. (2011) nachgewiesen werden. Im Kontext folgender RIPC-Studien wäre es deshalb zu einer deutlicheren Darstellung des RIPC-Effekts sowie hinsichtlich einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse sinnvoll, lediglich Probanden und Probandinnen aufzunehmen, die sich einer isolierten CABG unterziehen.

Dass das Narkoseregime den Effekt des RIPC beeinflusst und Propofol den protektiven Effekt mindert, wurde bereits in früheren Studien belegt (Kottenberg et al., 2012). In der hier beschriebenen Studie wurde Propofol lediglich in der Einleitungsphase der Narkose eingesetzt. Aufgrund der langsamen Eliminationszeit von Propofol besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Effekt der RIPC dennoch beeinflusst wurde (Dinis-Oliveira, 2018). Um den maximalen Nutzen der RIPC zu erzielen, könnte daher der Einsatz einer vollständig volatilen Anästhesie in Erwägung gezogen werden.

Es ist zu beachten, dass trotz sorgfältiger Probenanalyse Fehler auftreten können. Um mögliche Fehlerquellen zu minimieren, wurden in dieser Studie alle Analysen im Duplikat durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Vermutung aus früheren Studien, dass das eRNA/RNase-1-System an der RIPC beteiligt ist, und lassen darauf schließen, dass sechs RIPC-Zyklen einen stärkeren protektiven Effekt haben als vier (Cabrera-Fuentes et al., 2015). Die RNase-1 als körpereigener Schutzfaktor stellt einen geeigneten Parameter dar, allerdings ist sie höchstwahrscheinlich nur einer der vielen Mediatoren in einem komplexen Netzwerk von Signalwegen, die für die Wirkung der RIPC verantwortlich sind. Um die Mechanismen dieser Regulation und den Einfluss von sechs anstelle von vier RIPC-Zyklen besser zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich.

Für ein besseres Verständnis der Dynamik der im Plasma zirkulierenden RNA im Zusammenhang mit der RNase-1 wäre es sinnvoll, die eRNA in verschiedene Subtypen zu differenzieren. Vor allem sollte der Anteil schädlicher RNA im Verhältnis zu den als protektiv beschriebenen miRNA-Subtypen, die durch spezifische Mechanismen vor RNase geschützt sind, genauer betrachtet werden (Frey et al., 2018; Li et al., 2014). Hierdurch könnte eine bessere Abschätzung des protektiven Effektes der RNase-1 in Bezug auf die eRNA vollzogen werden.

Die Daten zeigen anhand der postoperativen Kinetik der RNase-1 eine weitere potenzielle Einsatzform der RIPC im SWOP. Obwohl dieses Zeitfenster in früheren Studien als kardioprotektiv, aber weniger robust als der Schutz unmittelbar nach der RIPC angesehen wurde, deuten die hier erzielten Ergebnisse auf eine verbesserte Myokardprotektion im

SWOP durch sechs RIPC-Zyklen hin (Hausenloy & Yellon, 2010). Dies könnte eine zusätzliche Option für die Myokardprotektion vor elektiven Eingriffen wie Herzoperationen oder PCI darstellen und sollte in zukünftigen Studien bei vorhersehbaren ischämischen Ereignissen als attraktive Alternative zur RIPC unmittelbar vor dem Eingriff in Betracht gezogen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Ergebnisse die Rolle des eRNA/RNase-1-Systems als bedeutsamen Wirkmechanismus der RIPC bestärken. Durch die Erhöhung der Zyklenzahl lässt die Kinetik der Parameter im Beobachtungszeitraum eine Verringerung des IRI sowie einen verbesserten klinischen Outcome für Patienten und Patientinnen erwarten, die sich einer herzchirurgischen Operation unter extrakorporaler Zirkulation unterziehen. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind jedoch weiterführende prospektiv randomisierte Studien mit einer höheren Anzahl an Probanden und Probandinnen notwendig. Dabei sollte der Unterschied zwischen vier und sechs RIPC-Zyklen zusätzlich in Bezug auf das Ausmaß des Myokardschadens sowie den klinischen Outcome an unterschiedlichen Kohorten beurteilt werden. Um den Effekt der RNase-1 auf die im Plasma zirkulierende RNA besser beurteilen zu können, wäre in zukünftigen Studien, wie bereits erwähnt, außerdem eine Differenzierung der RNA in verschiedene Subtypen sinnvoll. Zudem stützen die Daten die Annahme in Bezug auf einen erheblich verbesserten Effekt der RIPC mit sechs Zyklen im SWOP. Auch diesbezüglich ist ein Vergleich mit vier Zyklen als Gegenstand weiterer Forschungsprojekte anzuregen und zu befürworten.

Zusammenfassung

Die Methode der Fernischämiekonditionierung (RIPC) wurde bereits in zahlreichen vorangegangenen Studien angewandt, um die Ischämie-Reperfusionsschädigung (IRI) zu minimieren. Diese tritt während herzchirurgischer Eingriffe und anderer Verfahren auf und hat zum Ziel, die postoperativen Ergebnisse bei Patienten und Patientinnen zu verbessern. Es wurde nachgewiesen, dass der eRNA/RNase-1-Signalweg in die Steigerung der Ischämietoleranz durch RIPC involviert ist. Dabei führt die verstärkte Freisetzung von RNase-1 als natürlicher Gegenspieler der schädlichen eRNA, die unter anderem durch TNF- α den IRI fördert, zu einer Verringerung des Myokardschadens.

Da bisherige Untersuchungen zur RIPC lediglich vier Zyklen von Ischämie und Reperfusion an den Extremitäten beinhalteten und unterschiedliche Ergebnisse lieferten, wurden in dieser Studie die Auswirkungen von sechs Zyklen auf den eRNA/RNase-1-Signalweg bei Patienten und Patientinnen untersucht, die sich einer Herzoperation unterzogen.

Insgesamt erhielten 14 Patienten sechs Zyklen mit jeweils fünfminütigen Phasen von Ischämie und Reperfusion an einer Extremität. Blutproben wurden sowohl intraoperativ nach jedem Zyklus als auch postoperativ zu festgelegten Zeitpunkten einer peripheren Arterie entnommen. Zusätzlich waren Proben zum Zeitpunkt der Aortenklammung und -öffnung sowohl peripher als auch aus dem Koronarvenensinus zu beziehen. Im Labor wurden die Proben hinsichtlich der Veränderungen von eRNA, TNF- α und der RNase-1-Aktivität analysiert. Die Einbeziehung von zwei zusätzlichen RIPC-Zyklen führte zu einer signifikanten weiteren Steigerung der RNase-1-Aktivität sowie zu einer Angleichung des transkardialen Gradienten von eRNA und TNF- α , was in einer verstärkten Reduktion schädlicher Parameter im Koronarvenensinus während der Operation mündete. Darüber hinaus zeigte sich zwischen 24 und 48 Stunden nach der Operation eine weitere signifikante Zunahme der RNase-1-Aktivität, die sogar die Werte am Ende der RIPC übertraf. Dies stützt die Annahme eines zweiten Schutzfensters (Second Window of Protection, SWOP) und weist auf die Beteiligung der RNase-1 hin. Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie den signifikant positiven Effekt der beiden zusätzlichen RIPC-Zyklen nachweisen. Um jedoch Schlüsse auf die Auswirkungen dieses laborchemisch nachgewiesenen Effekts auf das klinische Outcome ziehen zu können, sind weitere Studien erforderlich. Diese sollten verschiedene Patientengruppen berücksichtigen und klinische Parameter einbeziehen.

Summary

Remote ischemic conditioning (RIPC) is a technique employed in numerous prior studies to mitigate ischemia-reperfusion injury (IRI), a common occurrence during cardiac surgery and various other medical procedures, with the aim of enhancing postoperative outcomes for patients. Previous research has already established the involvement of the eRNA/RNase-1 pathway in enhancing ischemia tolerance through RIPC. This process entails an increased release of RNase-1, acting as a natural antagonist to the detrimental eRNA, which contributes to IRI via pathways like TNF- α , ultimately resulting in a reduction in myocardial damage.

Given that previous investigations into RIPC utilized only four cycles of ischemia and reperfusion on the extremities, yielding mixed results, our current study sought to explore the impact of six cycles on the eRNA/RNase-1 signaling pathway in patients undergoing cardiac surgery.

In this study, we performed six cycles, each consisting of five-minute phases of ischemia and reperfusion, on a single limb in 14 patients. Blood samples were collected both intraoperatively after each cycle and postoperatively at predefined intervals from a peripheral artery. Additionally, during aortic clamping and opening, blood samples were obtained from both peripheral and coronary sinus sources. These samples underwent laboratory analysis to assess the dynamics of eRNA, TNF- α , and RNase-1 activity.

Our results revealed a significant further increase in RNase-1 activity due to the inclusion of the two additional RIPC cycles. This resulted in the equalization of the transcardiac gradient of both eRNA and TNF- α , effectively reducing damaging parameters within the coronary sinus during surgery.

Furthermore, between 24 and 48 hours post-surgery, a notable increase in RNase-1 activity was observed, surpassing the levels measured at the conclusion of RIPC. This finding strengthens the hypothesis of the existence of a second window of protection (SWOP) and implies the involvement of RNase-1 in this phenomenon.

In conclusion, our study successfully demonstrated the significantly positive impact of the two additional RIPC cycles. Nevertheless, further investigations, incorporating diverse patient cohorts and clinical parameters, are imperative to draw conclusions regarding the translation of the laboratory-documented effect to clinical outcomes.

Abkürzungsverzeichnis

ATP.....	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CABG.....	Koronararterienbypass-Operation
CS.....	Koronarvenensinus
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eRNA.....	extrazelluläre Ribonukleinsäure
H ⁺	Proton
H ₂ O.....	Wasser
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HLM	Herz-Lungen-Maschine
K ⁺	Kalium
KI.....	Konfidenzintervall
miRNA	mikroRNA
MPT.....	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren
Na ⁺	Natriumion
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NfκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PCI.....	Perkutane Koronarintervention
PF4.....	Plättchenfaktor 4
PV.....	Periphere Vene
RA	Radialarterie
RCX.....	Ramus circumflexus
RIPC	Ischämische Fernkonditionierung
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA.....	Ribonukleinsäure
RNase.....	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Streptavidin-HRP.....	Streptavidin- Streptavidin-horseradish peroxidase
SWOP	second window of protection
TNF-α.....	Tumornekrosefaktor-α
VEGF.....	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusion-Schadens	6
Abbildung 2 RNase-1 als Mediator der RIPC	16
Abbildung 3 Studienablauf der RIPC	21
Abbildung 4 Quantifizierung der RNA	24
Abbildung 5 ELISA-Platte der TNF- α -Analyse.....	26
Abbildung 6 eRNA während RIPC	30
Abbildung 7 RNase-1 während RIPC	31
Abbildung 8 TNF- α während RIPC	32
Abbildung 9 Kinetik der RNase-1	33
Abbildung 10 Transkardialer Gradient RNase-1	34
Abbildung 11 Kinetik der eRNA.....	35
Abbildung 12 Transkardialer Gradient eRNA.....	37
Abbildung 13 Kinetik aller Parameter.....	38
Abbildung 14 Kinetik des TNF- α	39
Abbildung 15 Transkardialer Gradient TNF- α	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Demografische Daten	19
Tabelle 2 Durchgeführte Operationen	21
Tabelle 3 Zusammensetzung RNase-Puffer-Stammlösung	27
Tabelle 4 Zusammensetzung acetylierte BSA-Lösung.....	27
Tabelle 5 Zusammensetzung fatty acid free BSA-Lösung.....	28
Tabelle 6 Zusammensetzung Poly:C-Lösung.....	28
Tabelle 7 Zusammensetzung Lanthan(III)-Chlorid-Perchlorsäure-Lösung	28
Tabelle 8 Daten der Operationen.....	45

Literaturverzeichnis

- Ali, N., Rizwi, F., Iqbal, A., & Rashid, A. (2010). *Induced Remote Ischemic Preconditioning on Ischemia–Reperfusion Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass*. 20.
- Al-Lamee, R., Thompson, D., Dehbi, H.-M., Sen, S., Tang, K., Davies, J., Keeble, T., Mielewczik, M., Kaprielian, R., Malik, I. S., Nijjer, S. S., Petraco, R., Cook, C., Ahmad, Y., Howard, J., Baker, C., Sharp, A., Gerber, R., Talwar, S., ... Swallow, R. (2018). Percutaneous coronary intervention in stable angina (ORBITA): A double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 391(10115), 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32714-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32714-9)
- Andresen. (2021). *Deutscher Herzbericht 2020*. 71.
- Bangalore, S., Maron, D. J., Stone, G. W., & Hochman, J. S. (2020). Routine Revascularization Versus Initial Medical Therapy for Stable Ischemic Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Circulation*, 142(9), 841–857. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048194>
- Barrabés, S., Pagès-Pons, L., Radcliffe, C. M., Tabarés, G., Fort, E., Royle, L., Harvey, D. J., Moenner, M., Dwek, R. A., Rudd, P. M., De Llorens, R., & Peracaula, R. (2007). Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology*, 17(4), 388–400. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm002>
- Bauer, T. M., & Murphy, E. (2020). Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death. *Circulation Research*, 126(2), 280–293. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306>

- Beckmann, A., Meyer, R., Lewandowski, J., Markewitz, A., Blaßfeld, D., & Böning, A. (2022). German Heart Surgery Report 2021: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, *70*(05), 362–376. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1754353>
- Beintema, J. J., & Kleineidam, R. G. (1998). The ribonuclease A superfamily: General discussion. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *54*(8), 825–832. <https://doi.org/10.1007/s000180050211>
- Beintema, J. J., Schüller, C., Irie, M., & Carsana, A. (1988). Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *51*(3), 165–192. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(88\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0079-6107(88)90001-6)
- Bernardi, P., & Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: A critical appraisal. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *28*(2), 131–138. <https://doi.org/10.1007/BF02110643>
- Birnbaum, Y., Hale, S. L., & Kloner, R. A. (1997). Ischemic Preconditioning at a Distance: Reduction of Myocardial Infarct Size by Partial Reduction of Blood Supply Combined With Rapid Stimulation of the Gastrocnemius Muscle in the Rabbit. *Circulation*, *96*(5), 1641–1646. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1641>
- Buckberg, G. D. (1987). Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *93*(1), 127–139. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36485-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36485-2)
- Buckberg, G. D., Brazier, J. R., Nelson, R. L., Myron Goldstein, S., McConnell, D. H., & Cooper, N. (1977). Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *The*

- Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 73(1), 87–94.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)39985-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)39985-4)
- Cabrera-Fuentes, H., Ruiz-Meana, M., Simseyilmaz, S., Kostin, S., Insete, J., Saffarzadeh, M., Galuska, S., Vijayan, V., Barba, I., Barreto, G., Fischer, S., Lochnit, G., Ilinskaya, O., Baumgart-Vogt, E., Böning, A., Lecour, S., Hausenloy, D., Liehn, E., Garcia-Dorado, D., ... Preissner, K. (2014). RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- α in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 112(12), 1110–1119. <https://doi.org/10.1160/th14-08-0703>
- Cabrera-Fuentes, Niemann, B., Grieshaber, P., Wollbrueck, M., Gehron, J., Preissner, K. T., & Böning, A. (2015). RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 48(5), 732–737. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu519>
- Calafiore, A. M., Teodori, G., Mezzetti, A., Bosco, G., Verna, A. M., Giammarco, G. D., & Lapenna, D. (1995). Intermittent Antegrade Warm Blood Cardioplegia. *Ann Thorac Surg*.
- Caldonazo, T., Kirov, H., Riedel, L. L., Gaudino, M., & Doenst, T. (2022). Comparing CABG and PCI across the globe based on current regional registry evidence. *Scientific Reports*, 12(1), 22164. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25853-4>
- Chambers, D. J., & Fallouh, H. B. (2010). Cardioplegia and cardiac surgery: Pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*, 127(1), 41–52.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.001>
- Cheung, M. M. H., Kharbanda, R. K., Konstantinov, I. E., Shimizu, M., Frndova, H., Li, J., Holtby, H. M., Cox, P. N., Smallhorn, J. F., Van Arsdell, G. S., & Redington,

- A. N. (2006). Randomized Controlled Trial of the Effects of Remote Ischemic Preconditioning on Children Undergoing Cardiac Surgery. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(11), 2277–2282. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.01.066>
- Chikwe, J., Lee, T., Itagaki, S., Adams, D. H., & Egorova, N. N. (2018). Long-Term Outcomes After Off-Pump Versus On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting by Experienced Surgeons. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(13), 1478–1486. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.07.029>
- Collard, C. D. (2001). *Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury*. 94(6), 6.
- Davidson, S. M., Selvaraj, P., He, D., Boi-Doku, C., Yellon, R. L., Vicencio, J. M., & Yellon, D. M. (2013). Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 α /CXCR4 signalling axis. *Basic Research in Cardiology*, 108(5), 377. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0377-6>
- Davies, W. R., Brown, A. J., Watson, W., McCormick, L. M., West, N. E. J., Dutka, D. P., & Hoole, S. P. (2013). Remote Ischemic Preconditioning Improves Outcome at 6 Years After Elective Percutaneous Coronary Intervention: The CRISP Stent Trial Long-term Follow-up. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 6(3), 246–251. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.112.000184>
- de Groot, H., & Rauen, U. (2007). Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review. *Transplantation Proceedings*, 39(2), 481–484. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.12.012>
- Deb, S., Wijeyesundera, H. C., Ko, D. T., Tsubota, H., Hill, S., & Fremes, S. E. (2013). Coronary Artery Bypass Graft Surgery vs Percutaneous Interventions in Coronary

- Revascularization: A Systematic Review. *JAMA*, 310(19), 2086.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.281718>
- Dickson, E. W., Lorbar, M., Porcaro, W. A., Fenton, R. A., Reinhardt, C. P., Gysembergh, A., & Przyklenk, K. (1999). Rabbit heart can be “preconditioned” via transfer of coronary effluent. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(6), H2451–H2457.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.6.H2451>
- Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J. B. M., & Peter, K. (2012). Microparticles: Major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular Research*, 93(4), 633–644. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs007>
- Dinis-Oliveira, R. J. (2018). Metabolic Profiles of Propofol and Fospropofol: Clinical and Forensic Interpretative Aspects. *BioMed Research International*, 2018, 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2018/6852857>
- Donato, M., Buchholz, B., Rodríguez, M., Pérez, V., Inserte, J., García-Dorado, D., & Gelpi, R. J. (2013). Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning: Remote ischaemic preconditioning and parasympathetic nervous system. *Experimental Physiology*, 98(2), 425–434. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066217>
- Dorweiler, B., Pruefer, D., Andrasi, T. B., Maksan, S. M., Schmiedt, W., Neufang, A., & Vahl, C. F. (2007). Ischemia-Reperfusion Injury: Pathophysiology and Clinical Implications. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 33(6), 600–612. <https://doi.org/10.1007/s00068-007-7152-z>
- Farkouh, M. E., Domanski, M., Dangas, G. D., Godoy, L. C., Mack, M. J., Siami, F. S., Hamza, T. H., Shah, B., Stefanini, G. G., Sidhu, M. S., Tanguay, J.-F.,

- Ramanathan, K., Sharma, S. K., French, J., Hueb, W., Cohen, D. J., Fuster, V., Sharma, S. K., Zazif, T. N., ... Kaul, U. (2019). Long-Term Survival Following Multivessel Revascularization in Patients With Diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(6), 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.001>
- Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Baxter, G. F., & Schulz, R. (2014). Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacological Reviews*, 66(4), 1142–1174. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008300>
- Fischer, S., Cabrera-Fuentes, H. A., Noll, T., & Preissner, K. T. (2014). Impact of extracellular RNA on endothelial barrier function. *Cell and Tissue Research*, 355(3), 635–645. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1850-8>
- Fischer, S., Gerriets, T., Wessels, C., Walberer, M., Kostin, S., Stolz, E., Zheleva, K., Hocke, A., Hippenstiel, S., & Preissner, K. T. (2007). Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood*, 110(7), 2457–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040691>
- Fischer, S., Grantzow, T., Pagel, J. I., Tschernatsch, M., Sperandio, M., Preissner, K. T., & Deindl, E. (2012). Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thrombosis and Haemostasis*, 108(10), 730–741. <https://doi.org/10.1160/TH12-03-0186>
- Fischer, S., Nishio, M., Dadkhahi, S., Gansler, J., Saffarzadeh, M., Shibamiyama, A., Kral, N., Baal, N., Koyama, T., Deindl, E., & Preissner, K. (2011). Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 105(02), 345–355. <https://doi.org/10.1160/TH10-06-0345>

- Fischer, S., Nishio, M., Peters, S. C., Tschernatsch, M., Walberer, M., Weidemann, S., Heidenreich, R., Couraud, P. O., Weksler, B. B., Romero, I. A., Gerriets, T., & Preissner, K. T. (2009). Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *The FASEB Journal*, *23*(7), 2100–2109. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121608>
- Fischer, S., & Preissner, K. T. (2013). Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system: Mediators of defence and disease. *Hämostaseologie*, *33*(01), 37–42. <https://doi.org/10.5482/HAMO-13-01-0001>
- Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, *120*(4), 713–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
- Frey, U. H., Klaassen, M., Ochsenfarth, C., Murke, F., Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Klenke, S., Engler, A., Heusch, G., Giebel, B., & Peters, J. (2018). Remote ischaemic preconditioning increases serum extracellular vesicle concentrations with altered micro-RNA signature in CABG patients. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *aas.13296*. <https://doi.org/10.1111/aas.13296>
- Futami, J., Tsushima, Y., Yu Murato, Tada, H., Sasaki, J., Seno, M., & Yamada, H. (1997). Tissue-Specific Expression of Pancreatic-Type RNases and RNase Inhibitor in Humans. *DNA and Cell Biology*, *16*(4), 413–419. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.413>
- Ganame, J., Messalli, G., Dymarkowski, S., Rademakers, F. E., Desmet, W., Van De Werf, F., & Bogaert, J. (2009). Impact of myocardial haemorrhage on left ventricular function and remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, *30*(12), 1440–1449. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp093>

- Garnett, E. R., & Raines, R. T. (2022). Emerging biological functions of ribonuclease 1 and angiogenin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 57(3), 244–260. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.2004577>
- Gaur, D., Swaminathan, S., & Batra, J. K. (2001). Interaction of Human Pancreatic Ribonuclease with Human Ribonuclease Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24978–24984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102440200>
- Ghiragosian, C., Harpa, M., Stoica, A., Sânziana, F. O., Bălău, R., Hussein, H. A., Elena, G.-R. S., Neagoe, R. M., & Suciuc, H. (2022). Theoretical and Practical Aspects in the Use of Bretschneider Cardioplegia. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 9(6), 178. <https://doi.org/10.3390/jcdd9060178>
- Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., Van Den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D. (1996). Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation*, 94(9), 2193–2200. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2193>
- Gibbon, J. H., & Hill, J. D. (1982). Part I. The Development of the First Successful Heart-Lung Machine. *The Annals of Thoracic Surgery*, 34(3), 337–341. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(10\)62507-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(10)62507-6)
- Golabchi, A., Basati, F., Kargarfard, M., & Sadeghi, M. (2012). Can cardiac rehabilitation programs improve functional capacity and left ventricular diastolic function in patients with mechanical reperfusion after ST elevation myocardial infarction?: A double-blind clinical trial. *ARYA Atherosclerosis*, 8(3), 125–129.
- Halestrap, A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—A target for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 61(3), 372–385. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00533-9)
- Hausenloy, D. J., Barrabes, J. A., Bøtker, H. E., Davidson, S. M., Di Lisa, F., Downey, J., Engstrom, T., Ferdinandy, P., Carbrera-Fuentes, H. A., Heusch, G., Ibanez, B.,

- Iliodromitis, E. K., Inseste, J., Jennings, R., Kalia, N., Kharbanda, R., Lecour, S., Marber, M., Miura, T., ... Garcia-Dorado, D. (2016). Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: A 30 year voyage of discovery. *Basic Research in Cardiology*, *111*(6), 70. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0588-8>
- Hausenloy, D. J., Boston-Griffiths, E., & Yellon, D. M. (2012). Cardioprotection during cardiac surgery. *Cardiovascular Research*, *94*(2), 253–265. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs131>
- Hausenloy, D. J., Candilio, L., Evans, R., Ariti, C., Jenkins, D. P., Kolvekar, S., Knight, R., Kunst, G., Laing, C., Nicholas, J. M., Pepper, J., Robertson, S., Xenou, M., Clayton, T., & Yellon, D. M. (2016). Effect of Remote Ischaemic preconditioning on Clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery bypass graft surgery (ERICCA study): A multicentre double-blind randomised controlled clinical trial. *Efficacy and Mechanism Evaluation*, *3*(4), 1–58. <https://doi.org/10.3310/eme03040>
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2010). The Second Window of Preconditioning (SWOP) Where Are We Now? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *24*(3), 235–254. <https://doi.org/10.1007/s10557-010-6237-9>
- Head, S. J., Milojevic, M., Daemen, J., Ahn, J.-M., Boersma, E., Christiansen, E. H., Domanski, M. J., Farkouh, M. E., Flather, M., Fuster, V., Hlatky, M. A., Holm, N. R., Hueb, W. A., Kamalesh, M., Kim, Y.-H., Mäkikallio, T., Mohr, F. W., Papageorgiou, G., Park, S.-J., ... Kappetein, A. P. (2018). Mortality after coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention with stenting for coronary artery disease: A pooled analysis of individual patient data. *The Lancet*, *391*(10124), 939–948. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30423-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30423-9)

- Hearse, D. J., & Tosaki, A. (1987). Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: Protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circulation Research*, *60*(3), 375–383. <https://doi.org/10.1161/01.RES.60.3.375>
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., & Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(10), 1456–1462. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00252-5)
- Heusch, G. (2015). Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circulation Research*, *116*(4), 674–699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
- Heusch, G., Bøtker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A., & Yellon, D. (2015). Remote Ischemic Conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*, *65*(2), 177–195. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.031>
- Heusch, G., & Rassaf, T. (2016). Time to Give Up on Cardioprotection?: A Critical Appraisal of Clinical Studies on Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning*. *Circulation Research*, *119*(5), 676–695. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308736>
- Hoffman, J. W., Gilbert, T. B., Poston, R. S., & Silldorff, E. P. (2004). *Myocardial Reperfusion Injury: Etiology, Mechanisms, and Therapies*. 21.
- Ito, H. (2006). No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *3*(9), 499–506. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0632>
- Iwakura, K., Ito, H., Takiuchi, S., Taniyama, Y., Nakatsuchi, Y., Negoro, S., Higashino, Y., Okamura, A., Masuyama, T., Hori, M., Fujii, K., & Minamino, T. (1996). Alternation in the Coronary Blood Flow Velocity Pattern in Patients With No

- Reflow and Reperfused Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 94(6), 1269–1275. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.6.1269>
- Jaax, M. E. (2013). *Complex formation with nucleic acids and aptamers alters the antigenic properties of platelet factor 4*. 122(2), 10.
- Jensen, R. V., Støttrup, N. B., Kristiansen, S. B., & Bøtker, H. E. (2012). Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Research in Cardiology*, 107(5), 285. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0285-1>
- Jones, W. K., Fan, G.-C., Liao, S., Zhang, J.-M., Wang, Y., Weintraub, N. L., Kranias, E. G., Schultz, J. E., Lorenz, J., & Ren, X. (2009). Peripheral Nociception Associated With Surgical Incision Elicits Remote Nonischemic Cardioprotection Via Neurogenic Activation of Protein Kinase C Signaling. *Circulation*, 120(11_suppl_1). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843938>
- Kalakech, H., Hibert, P., Prunier-Mirebeau, D., Tamareille, S., Letournel, F., Macchi, L., Pinet, F., Furber, A., & Prunier, F. (2014). RISK and SAFE Signaling Pathway Involvement in Apolipoprotein A-I-Induced Cardioprotection. *PLoS ONE*, 9(9), e107950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107950>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Bd. 298, S. 229–317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kannemeier, C., Shibamiya, A., Nakazawa, F., Trusheim, H., Ruppert, C., Markart, P., Song, Y., Tzima, E., Kennerknecht, E., Niepmann, M., von Bruehl, M.-L., Sedding, D., Massberg, S., Gunther, A., Engelmann, B., & Preissner, K. T. (2007). Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood

- coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6388–6393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608647104>
- Karmazyn, M. (1999). The Role of the Myocardial Sodium-Hydrogen Exchanger in Mediating Ischemic and Reperfusion Injury: From Amiloride to Cariporidea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 874(1 HEART IN STRE), 326–334. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09248.x>
- Karuppasamy, P., Chaubey, S., Dew, T., Musto, R., Sherwood, R., Desai, J., John, L., Shah, A. M., Marber, M. S., & Kunst, G. (2011). Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: A strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Research in Cardiology*, 106(4), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0185-9>
- Kevil, C. G., Oshima, T., Alexander, B., Coe, L. L., & Alexander, J. S. (2000). H₂O₂-mediated permeability: Role of MAPK and occludin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(1), C21–C30. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.1.C21>
- Kharbanda, R. K., Mortensen, U. M., White, P. A., Kristiansen, S. B., Schmidt, M. R., Hoschtitzky, J. A., Vogel, M., Sorensen, K., Redington, A. N., & MacAllister, R. (2002). Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation*, 106(23), 2881–2883. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000043806.51912.9B>
- Kloner, R. A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. (1998). Medical and Cellular Implications of Stunning, Hibernation, and Preconditioning: An NHLBI Workshop. *Circulation*, 97(18), 1848–1867. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1848>

- Kloner, R. A., Rude, R. E., Carlson, N., Maroko, P. R., DeBoer, L. W., & Braunwald, E. (1980). Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: Which comes first? *Circulation*, *62*(5), 945–952. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.62.5.945>
- Konstantinov, I. E., Arab, S., Kharbanda, R. K., Li, J., Cheung, M. M. H., Cherepanov, V., Downey, G. P., Liu, P. P., Cukerman, E., Coles, J. G., & Redington, A. N. (2004). The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological Genomics*, *19*(1), 143–150. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00046.2004>
- Konstantinov, I. E., Li, J., Cheung, M. M., Shimizu, M., Stokoe, J., Kharbanda, R. K., & Redington, A. N. (2005). Remote Ischemic Preconditioning of the Recipient Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury of the Denervated Donor Heart via a Katp Channel-Dependent Mechanism: *Transplantation*, *79*(12), 1691–1695. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000159137.76400.5D>
- Kottenberg, E., Thielmann, M., Bergmann, L., Heine, T., Jakob, H., Heusch, G., & Peters, J. (2012). Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial: Anesthesia and remote ischemic preconditioning. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *56*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2011.02585.x>
- Krug, A., De Rochemont, W. D. M., & Korb, G. (1966). Blood Supply of the Myocardium after Temporary Coronary Occlusion. *Circulation Research*, *19*(1), 57–62. <https://doi.org/10.1161/01.RES.19.1.57>
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., & Tada, M. (1993). Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance

- to ischemia. *Circulation Research*, 72(6), 1293–1299.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.72.6.1293>
- Landré, J. B. P., Hewett, P. W., Olivot, J.-M., Friedl, P., Ko, Y., Sachinidis, A., & Moenner, M. (2002). Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1): Expression of Pancreatic-Type RNase by Endothelial Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86(3), 540–552.
<https://doi.org/10.1002/jcb.10234>
- Lang, J. A., & Kim, J. (2022). Remote ischaemic preconditioning – translating cardiovascular benefits to humans. *The Journal of Physiology*, 600(13), 3053–3067. <https://doi.org/10.1113/JP282568>
- Li, J., Rohailla, S., Gelber, N., Rutka, J., Sabah, N., Gladstone, R. A., Wei, C., Hu, P., Kharbanda, R. K., & Redington, A. N. (2014). MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 109(5), 423. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0423-z>
- Lu, L., Li, J., Moussaoui, M., & Boix, E. (2018). Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*, 9, 1012.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01012>
- Luo, A. K., & Wu, K. C. (2006). Imaging microvascular obstruction and its clinical significance following acute myocardial infarction. *Heart Failure Reviews*, 11(4), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s10741-006-0231-0>
- Maroko, R. (1972). Precordial S-T Segment Elevation Mapping: An Atraumatic Method for Assessing Alterations in the Extent of Myocardial Ischemic Injury. *The American Journal of CARDIOLOGY*.
- Maxwell, S. R. J., & Lip, G. Y. H. (1997). Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International*

- Journal of Cardiology*, 58(2), 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(96\)02854-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(96)02854-9)
- Melrose, D. G., Dreyer, B., Bentall, H. H., & Baker, J. B. E. (1955). ELECTIVE CARDIAC ARREST. *The Lancet*, 266(6879), 21–23. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(55\)93381-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(55)93381-X)
- Meybohm, P., Bein, B., Brosteanu, O., Cremer, J., Gruenewald, M., Stoppe, C., Coburn, M., Schaelte, G., Böning, A., Niemann, B., Roesner, J., Kletzin, F., Strouhal, U., Reyher, C., Laufenberg-Feldmann, R., Ferner, M., Brandes, I. F., Bauer, M., Stehr, S. N., ... Zacharowski, K. (2015). A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1397–1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413579>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Shibamiya, A., Song, Y., Tzima, E., Schubert, U., Koyama, T., Niepmann, M., Trusheim, H., Engelmann, B., & Preissner, K. T. (2005). Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochemical Journal*, 385(3), 831–838. <https://doi.org/10.1042/BJ20041021>
- Neumann, F.-J., Sousa-Uva, M., Ahlsson, A., Alfonso, F., Banning, A. P., Benedetto, U., Byrne, R. A., Collet, J.-P., Falk, V., Head, S. J., Jüni, P., Kastrati, A., Koller, A., Kristensen, S. D., Niebauer, J., Richter, D. J., Seferović, P. M., Sibbing, D., Stefanini, G. G., ... Henderson, R. (2019). 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*, 40(2), 87–165. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy394>

- Okamoto, F., Allen, B. S., Buckberg, G. D., Bugyi, H., & Leaf, J. (1986). STUDIES OF CONTROLLED REPERFUSION AFTER ISCHEMIA. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *92*(3), 613–620. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36512-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36512-2)
- Ong, S.-B., & Gustafsson, A. B. (2012). New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovascular Research*, *94*(2), 190–196. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr312>
- Pan, T., Jia, P., Chen, N., Fang, Y., Liang, Y., Guo, M., & Ding, X. (2019). Delayed Remote Ischemic Preconditioning Confers Renoprotection against Septic Acute Kidney Injury via Exosomal miR-21. *Theranostics*, *9*(2), 405–423. <https://doi.org/10.7150/thno.29832>
- Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2002). Deciphering Vascular Endothelial Cell Growth Factor/Vascular Permeability Factor Signaling to Vascular Permeability. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 44385–44398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202391200>
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993). Regional ischemic „preconditioning“ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, *87*(3), 893–899. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.87.3.893>
- Redington, K. L., Disenhouse, T., Strantzas, S. C., Gladstone, R., Wei, C., Tropak, M. B., Dai, X., Manlihot, C., Li, J., & Redington, A. N. (2012). Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Research in Cardiology*, *107*(2), 241. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0241-5>

- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *Journal of the American College of Cardiology*, *76*(25), 2985. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Schaffer, S. W., Roy, R. S., & McCormord, J. M. (1983). Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *European Heart Journal*, *4*(suppl H), 81–87. https://doi.org/10.1093/eurheartj/4.suppl_H.81
- Schreck, R., Albermann, K., & Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear Factor K β : An Oxidative Stress-Responsive Transcription Factor of Eukaryotic Cells (A Review). *Free Radical Research Communications*, *17*(4), 221–237. <https://doi.org/10.3109/10715769209079515>
- Seal, J. B., & Gewertz, B. L. (2005). Vascular Dysfunction in Ischemia-Reperfusion Injury. *Annals of Vascular Surgery*, *19*(4), 572–584. <https://doi.org/10.1007/s10016-005-4616-7>
- Sha'afi, R. L., & Naccache, P. H. (1985). Relationship between Calcium, Arachidonic Acid Metabolites, and Neutrophil Activation. In R. P. Rubin, G. B. Weiss, & J. W. Putney (Hrsg.), *Calcium in Biological Systems* (S. 137–145). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2377-8_16
- Shimizu, M., Tropak, M., Diaz, R. J., Suto, F., Surendra, H., Kuzmin, E., Li, J., Gross, G., Wilson, G. J., Callahan, J., & Redington, A. N. (2009). Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: Evidence suggesting cross-species protection. *Clinical Science*, *117*(5), 191–200. <https://doi.org/10.1042/CS20080523>

- Shroyer, A. L., McDonald, G. O., & Novitzky, D. (2009). On-Pump versus Off-Pump Coronary-Artery Bypass Surgery. *N Engl J Med*, 11.
- Simsekyilmaz, S., Cabrera-Fuentes, H. A., Meiler, S., Kostin, S., Baumer, Y., Liehn, E. A., Weber, C., Boisvert, W. A., Preissner, K. T., & Zerneck, A. (2014). Role of Extracellular RNA in Atherosclerotic Plaque Formation in Mice. *Circulation*, 129(5), 598–606. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002562>
- Skyschally, A., Gres, P., Hoffmann, S., Haude, M., Erbel, R., Schulz, R., & Heusch, G. (2007). Bidirectional Role of Tumor Necrosis Factor- α in Coronary Microembolization: Progressive Contractile Dysfunction Versus Delayed Protection Against Infarction. *Circulation Research*, 100(1), 140–146. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255031.15793.86>
- Slagsvold, K. H., Rognum, Ø., Høydal, M., Wisløff, U., & Wahba, A. (2014). Remote Ischemic Preconditioning Preserves Mitochondrial Function and Influences Myocardial MicroRNA Expression in Atrial Myocardium During Coronary Bypass Surgery. *Circulation Research*, 114(5), 851–859. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302751>
- Southerland, E. M., Milhorn, D. M., Foreman, R. D., Linderth, B., DeJongste, M. J. L., Armour, J. A., Subramanian, V., Singh, M., Singh, K., & Ardell, J. L. (2007). Preemptive, but not reactive, spinal cord stimulation mitigates transient ischemia-induced myocardial infarction via cardiac adrenergic neurons. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(1), H311–H317. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2006>
- Takaoka, A., Nakae, I., Mitsunami, K., Yabe, T., Morikawa, S., Inubushi, T., & Kinoshita, M. (1999). Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits:

- Effects of “remote preconditioning”. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(2), 556–564. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(98\)00559-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(98)00559-2)
- Talukder, M. A. H., Zweier, J. L., & Periasamy, M. (2009). Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovascular Research*, 84(3), 345–352. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp264>
- Tapuria, N., Kumar, Y., Habib, M. M., Amara, M. A., Seifalian, A. M., & Davidson, B. R. (2008). Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury—A Review. *Journal of Surgical Research*, 150(2), 304–330. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.12.747>
- Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Wendt, D., Gedik, N., Pasa, S., Price, V., Tsagakis, K., Neuhäuser, M., Peters, J., Jakob, H., & Heusch, G. (2013). Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet*, 382(9892), 597–604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61450-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61450-6)
- Wan, S., DeSmet, J.-M., Barvais, L., Goldstein, M., Vincent, J.-L., & LeClerc, J.-L. (1996). Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 112(3), 806–811. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(96\)70068-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(96)70068-5)
- White, S. K., Frohlich, G. M., Sado, D. M., Maestrini, V., Fontana, M., Treibel, T. A., Tehrani, S., Flett, A. S., Meier, P., Ariti, C., Davies, J. R., Moon, J. C., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2015). Remote Ischemic Conditioning Reduces Myocardial Infarct Size and Edema in Patients With ST-Segment Elevation

- Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 8(1), 178–188.
<https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.05.015>
- WHO. (2021, Juni 11). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wong, G. T. C., Lu, Y., Mei, B., Xia, Z., & Irwin, M. G. (2012). Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sciences*, 91(17–18), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.037>
- Wu, K. C., Zerhouni, E. A., Judd, R. M., Lugo-Olivieri, C. H., Barouch, L. A., Schulman, S. P., Blumenthal, R. S., & Lima, J. A. C. (1998). Prognostic Significance of Microvascular Obstruction by Magnetic Resonance Imaging in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 97(8), 765–772.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.8.765>
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *The New England Journal of Medicine*.
- Zeng, Y.-L., Zheng, H., Chen, Q.-R., Yuan, X.-H., Ren, J.-H., Luo, X.-F., Chen, P., Lin, Z.-Y., Chen, S.-Z., Wu, X.-Q., Xiao, M., Chen, Y.-Q., Chen, Z.-Z., Hu, J.-D., & Yang, T. (2017). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing miR-21 efficiently repair myocardial damage in rats. *Oncotarget*, 8(17), 29161–29173. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16254>
- Zernecke, A., & Preissner, K. T. (2016). Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 118(3), 469–479.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307961>
- Zhao, T., Wu, W., Sui, L., Huang, Q., Nan, Y., Liu, J., & Ai, K. (2022). Reactive oxygen species-based nanomaterials for the treatment of myocardial ischemia reperfusion

injuries. *Bioactive Materials*, 7, 47–72.

<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.006>

Zhao, Z.-Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(2), H579–H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>

Anhang

Anhang 1: Aufklärungsbogen

Standort Gießen

**Herz-, Kinderherz- und
Gefäßchirurgie**
Direktor: Prof. Dr. A. Boening
Rudolf-Buchheim-Sir. 7
35385 Gießen

Telefon: 06 41/985-44301
Telefax: 06 41/985-44309
Ambulanz: 0641/985-44318
andreas.boening@chiru.med.uni-
giessen.de
www.ukgm.de



PATIENTENINFORMATION ZU EINER KLINISCHEN STUDIE

„Die Kinetik der RNase 1 in der ischämischen Präkonditionierung bei kardiovaskulären Eingriffen“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Ihr Arzt hat bei Ihnen eine Erkrankung des Herzens oder der Gefäße festgestellt, so dass eine Herz- oder Gefäßoperation geplant ist. Bei Herz- oder Gefäßoperationen besteht trotz enormer Fortschritte bei der Narkoseführung und den modernen Operationstechniken für verschiedene Organe, wie das Herz, das Gehirn und die Niere, ein geringes Risiko, nach der Operation in ihrer Funktion beeinträchtigt zu werden.

In verschiedenen Studien wurde an herzchirurgischen Patienten, bei denen ein wiederholtes Aufpumpen einer automatischen Blutdruckmanschette in Fünf-Minuten-Zyklen am Oberarm nach der Narkoseeinleitung (Remote-Präkonditionierung) entweder eine Reduktion des Herzschadens nach der OP oder kein wesentlicher Effekt nachgewiesen.

Wie kommt diese Reduktion zustande? Wir vermuten, dass bei Durchblutungsstörungen im Arm Signale zu anderen Körperorganen gesendet werden, die „Vorsicht Durchblutungsstörungen!“ bedeuten könnten.

Zurzeit gibt es nur wenige Daten darüber, welche Signalkaskade nach diesen kurzzeitigen absichtlichen Durchblutungsänderungen eingeschaltet wird. Wir vermuten eine wesentliche Rolle des eRNA/RNase- Weges und möchten daher die RNase Spiegel im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Operation messen. Nach der neuen Behandlung mittels aufgepumpter Blutdruckmanschette für **6 Fünf-Minuten-Zyklen** (Remote-Präkonditionierung) wird zu 19 Zeitpunkten jeweils 5 ml Blut aus einem liegenden Zugangsweg entnommen.

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Sitz der Gesellschaft: Gießen
Amtsgericht Gießen HRB 6384
www.ukgm.de

Geschäftsführung:
Martin Menger (Vorsitzender)
Prof. Dr. Werner Seeger (Stv. Vors.)
Dr. Christiane Hinck-Kneip
Dr. Helger Thiemann
Dr. Gunther Weill
Prof. Dr. Jochen A. Werner

Aufsichtsratsvorsitzender:
Dr. Dr. Martin Siebert

Wir bitten Sie hiermit um Ihr Einverständnis, an dieser Untersuchung teilzunehmen und uns die erhobenen Daten zur Auswertung zur Verfügung zu stellen. Hierdurch können wir eventuell in Zukunft die Betreuung von Patienten, die sich einer Operation unterziehen müssen, weiter verbessern.

Risiken, die Ihnen durch die Studienteilnahme entstehen können:

Durch diese wissenschaftliche Untersuchung entsteht Ihnen nach menschlichem Ermessen kein zusätzliches Risiko, das über das übliche Risiko einer Vollnarkose für denselben Eingriff, bei derselben Grunderkrankung hinausgeht. Während der gesamten Zeit werden Sie von einem erfahrenen Anesthesisten betreut. Insbesondere hat ein wiederholtes Aufpumpen einer Blutdruckmanschette keine bekannten Risiken oder Nebenwirkungen. Da die Blutdruckmanschette in Narkose aufgepumpt wird, verursacht Ihnen diese Maßnahme auch keine Schmerzen.

Wir verpflichten uns unter allen Umständen zu folgenden Punkten:

1. Alle erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Ihre Daten werden nach Pseudonymisierung (Ihr Name wird durch einen Zahlencode ersetzt, die eine Entschlüsselung nahezu unmöglich macht) ausgewertet. Dazu ist Ihre Zustimmung notwendig.
2. Sie können jederzeit, auch nach Beginn der Studie, ohne Nennung von Gründen Ihre Zustimmung zurückziehen, ohne dass sich daraus Nachteile für Sie ergeben.
3. Ihre Zustimmung oder Ablehnung wird weder die Anästhesie noch die Operation in irgendeiner Weise beeinflussen.
4. Durch diese Studie wird Ihre perioperative Betreuung nicht beeinflusst. Das wiederholte Aufpumpen der Blutdruckmanschette am OP-Tag nimmt etwa 40 Minuten in Anspruch. **Da dies nach der Narkoseeinleitung startet, und somit parallel zu den notwendigen Operationsvorbereitungen durchgeführt wird, wird Ihre Narkose und Operation NICHT verlängert.** Die postoperative Therapie erfolgt nach klinischer Routine bei allen Patienten gleich.

Detaillierte Informationen zur Untersuchung von körpereigenem Material

Nach Artikel 1 und 2 des Grundgesetzes haben Sie ein so genanntes informationelles Selbstbestimmungsrecht. Das bedeutet für die Medizin, dass wir wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material nur durchführen dürfen, wenn Sie damit einverstanden sind und wenn wir Sie vorher darüber aufgeklärt haben. Diese Untersuchungen dienen der Erforschung von Krankheiten und der Entwicklung neuer Therapien und werden zum

Nutzen van Patienten durchgeführt, auch wenn Sie im Einzelfall persönlich keinen Vorteil davon haben.

Alle Untersuchungen unterliegen streng dem Datenschutz und der ärztlichen Schweigepflicht, sind also für Unbefugte nicht zugänglich. Behörden, Versicherungen und „interessierte Institutionen“ bekommen keine Auskunft. Da in der Medizin die Forschung in Netzwerken erfolgt, versenden wir die Proben eventuell auch an andere Labors und Institutionen. Auch dort wird der Datenschutz streng eingehalten. Aus der Teilnahme an dem Forschungsprojekt können Sie keine finanziellen Ansprüche ableiten. Die Proben werden 10 Jahre aufbewahrt und dann vernichtet.

Einverständniserklärung

„Die Kinetik der RNase 1 in der ischämischen Präkonditionierung bei kardiovaskulären Eingriffen“

Vor- und Zuname des Patienten: _____

Ich bin von _____ über die geplante Studie ausreichend mündlich und schriftlich informiert worden. Ziele, Methoden und die möglichen Risiken wurden mir ausführlich in verständlicher Form dargelegt. Ich habe die Patienteninformation gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, die Studie mit meinem Arzt zu besprechen und Fragen zu stellen. Alle meine Fragen und Bedenken wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich weiß, dass die Studienteilnahme freiwillig ist. Ich kann jederzeit ohne Angaben von Gründen meine Zusage zur Teilnahme zurückziehen und fordere, dass meine Daten aus der Studie gelöscht werden. Daraus werden keine Nachteile entstehen.

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Untersuchung meine Daten aufgezeichnet und pseudonymisiert (d.h. ohne Namensnennung) zur Auswertung der Ergebnisse verwendet werden. Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden strikt vertraulich gemäß dem Datenschutz behandelt. Einer wissenschaftlichen Auswertung der pseudonymisierten Daten und einer möglichen Veröffentlichung der Ergebnisse stimme ich zu. Meine Einwilligung bezieht sich auch auf die Erhebung und Verarbeitung von Gesundheitsdaten sowie der Kontaktaufnahme des Studienleiters zum behandelnden Hausarzt.

Ich gebe hiermit separat von der Entnahme der DNA-Probe meine freiwillige Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie. Ein Exemplar dieser Einwilligung und eine Kopie der Patienteninformation habe ich erhalten.

(Datum, Uhrzeit)

(Patient)

(Datum, Uhrzeit)

(Untersucher)

Zusätzlich bin ich damit einverstanden, dass meine Blutproben für Forschungszwecke verwendet werden. Ich übertrage sie zu diesem Zweck an die beteiligten Einrichtungen. Diese sind berechtigt, die Proben für 10 Jahre aufzubewahren und für Forschungszwecke, insbesondere der Analyse von weiteren Stoffwechselvorgängen, die mit dem Operationsergebnis und möglichen Komplikationen nach der Operation zusammenhängen könnten, zu verwenden.

(Datum, Uhrzeit)

(Patient)

(Datum, Uhrzeit)

(Untersucher)

Anhang 2: Ethikantrag



Ethik-Kommission Klinikstr. 29 (Alte Chirurgie), D-35385 Giessen

Prof. Dr. A. Böning
Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie
Rudolf-Buchheim-Str. 7
35392 Giessen

**ETHIK-KOMMISSION
am Fachbereich Medizin
Vorsitz: Prof. H. Tillmanns**

Klinikstr. 29 (Alte Chirurgie)
D-35385 Giessen
Tel.: (0641)99-42470 / 47660
ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de

Giessen, 13. November 2019
Dr. Kr./

AZ: 12/15

Titel: *Die Kinetik der RNase-1 in der ischämischen Präkonditionierung bei kardiovaskulären Eingriffen.*

Amendment vom 21.10.19:

1. Erweiterung der Remote Ischaemic Preconditioning-Zyklen von bisher 4 auf 6;
2. Erweiterung der Patientenzahl um 14 Patienten, bei denen ein herzchirurgischer Eingriff mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt wird.

Sehr geehrter Herr Prof. Böning,

nach Durchsicht der Unterlagen bestehen keine Einwände gegen die Erweiterung unter Beibehaltung des sonstigen, bereits positiv bewerteten Studienprotokolls für diese Studie.

Die Kommission hat einen formalen Kritikpunkt bzgl. der Patienteninformation und –Einwilligungserklärung: Es fehlt ein Hinweis auf das Lösrecht der Daten bei Widerruf der Einwilligung.

In der sicheren Annahme, daß der genannte Punkt berücksichtigt wird, stimmt die Kommission der Erweiterung ohne jeden Einwand zu und wünscht gutes Gelingen.

Prof. Dr. H. Tillmanns
Vorsitzender

Anhang 3: Lizenzen

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 30, 2023

This Agreement between Uniklinik Gießen – Luisa Flicker ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number 5618781254076

License date Aug 30, 2023

Licensed content publisher Oxford University Press

Licensed content publication European Journal of Cardio-Thoracic Surgery

Licensed content title RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection¹

Licensed content author Cabrera-Fuentes, Hector A.; Niemann, Bernd

Licensed content date Jan 5, 2015

Type of Use Thesis/Dissertation

Institution name

Title of your work Die Kinetik der RNase-1 in der ischämischen Präkonditionierung bei kardiovaskulären Eingriffen

Publisher of your work Uniklinik Gießen Herz-Kinderherz- und Gefäßchirurgie

Expected publication date Nov 2023

Permissions cost 0.00 EUR

Value added tax 0.00 EUR

Total 0.00 EUR

Title Die Kinetik der RNase-1 in der ischämischen Präkonditionierung bei kardiovaskulären Eingriffen

Institution name Uniklinik Gießen Herz-Kinderherz- und Gefäßchirurgie

Expected presentation date Nov 2023

Portions Figure 2

Uniklinik Gießen
Ulmer Dreieck 4

Requestor Location Gießen, 35392
Germany
Attn: Uniklinik Gießen

Publisher Tax ID GB125506730

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL.

- Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
- This permission covers the use of the material in the **English** language in the following territory: **world**. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
- This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc. that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
- No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission **must** be re-ordered with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
- The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society **must** be included in the credit line.
- For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding author of all Oxford University Press journal content can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org. Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
- If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photobook.
- While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
- This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
- Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
- Unless otherwise specified, inclusion under a Creative Commons license or any other Open Access license allowing onward reuse is prohibited.
- Where permission to translate has been agreed, the credit line and any copyright/disclaimer notices provided by OUP shall be included on the same page as the Material, translated into the language of the new work, except for trademark names.

Translated and reproduced by permission of Oxford University Press on behalf of the «Society Name», Translation Disclaimer: OUP and the «Society Name» are not responsible or in any way liable for the accuracy of the translation. The Licensee is solely responsible for the translation in this publication/reprint.

14. Other Terms and Conditions: v1.5

Questions? customerscare@copyright.com.

Publikationsverzeichnis

Böning, A., Flicker, L., Rodriguez-Montesinos, J., Cabrera-Fuentes, H. A., Preissner, K.

T., Niemann, B. & Taghiyev, Z. (2022). Remote ischemic preconditioning in patients undergoing cardiac surgery with six ischemic cycles. *Perfusion*, 38(7), 1418–1427. <https://doi.org/10.1177/02676591221115260>

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Giesen, 15.10.2023

Ort/Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Böning für die Bereitstellung des Themas und für die fortwährende Betreuung und Unterstützung während der Arbeiten zu dieser Dissertation bedanken. Ihre fachliche Expertise und Ihr Engagement haben mir nicht nur geholfen, die Dissertation anzufertigen, sondern mir auch wertvolle Einblicke in die Welt der Forschung und Wissenschaft vermittelt.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. med. Puvogel für die Rekrutierung der Patienten und Patientinnen sowie deren umfassende Aufklärung für die hier vorliegende Studie.

Für seine Unterstützung und Hilfe hinsichtlich der statistischen Themen möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. med. Taghiyev bedanken. Er hat dazu beigetragen, meine Forschungsergebnisse fundiert und aussagekräftig zu gestalten.

Ein herzliches Dankeschön geht zudem an das gesamte herzchirurgische Team für die Unterstützung bei der Entnahme der Blutproben aus dem Koronarvenensinus während der Operation.

Ebenso möchte ich der Anästhesieabteilung für die Bereitstellung der arteriellen Abnahmestelle danken.

Herrn Rodriguez gilt es für die Einweisung in die labortechnischen Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit zu danken.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie, meinem Freund sowie meinen Freunden und Freundinnen, die mich während der gesamten Zeit stets unterstützt habe

