

**Ischämische Fernkonditionierung zur Prophylaxe von  
Ischämie-Reperfusionsschäden des Myokards**

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

vorgelegt von Tolkmitt, Konstantin Jörg  
aus Chemnitz

Gießen 2019

Aus der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie,  
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Andreas Böning,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Böning

Gutachter: Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Tag der Disputation: 29.09.2020

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material .....	12
2.1	Chemikalien & Pharmaka .....	12
2.2	Laborgeräte & -materialien .....	14
2.3	Versuchsgeräte & -materialien zur Organperfusion .....	17
2.4	Versuchstiere .....	18
3	Methoden .....	19
3.1	RIPC + Präparation .....	19
3.2	O. Langendorff's isolierte Organperfusion .....	20
3.2.1	Aufbau des Langendorff-Apparates .....	21
3.2.2	Erythrozyten-Perfusat .....	23
3.2.3	Stabilisierungsphase .....	24
3.3	Blutkardioplegie nach Calafiore .....	25
3.4	Versuchsgruppen .....	26
3.4.1	(1) RIPC + Ischämie/Reperfusion .....	26
3.4.2	(2) <i>Sham</i> + Ischämie/Reperfusion .....	27
3.4.3	(3) RIPC + Perfusion .....	27
3.4.4	(4) <i>Sham</i> + Perfusion .....	27
3.4.5	(5) <i>Sham</i> + Blutkardioplegie nach Calafiore mit RNase 1 .....	28
3.4.6	(6) <i>Sham</i> + Blutkardioplegie nach Calafiore .....	28
3.5	Datenerfassung physiologischer Parameter .....	29
3.6	Datenerfassung biochemischer Parameter .....	31
3.6.1	Analyse des kardialen Metabolismus .....	31
3.6.2	Analyse der eRNA – RNase 1 – TNF- $\alpha$ – Achse .....	32
3.7	Elektronenmikroskopie und Stereologie .....	35
3.8	Statistik .....	37
4	Ergebnisse .....	38
4.1	Leistungsparameter .....	39

4.1.1	LVDP .....	39
4.1.2	dLVP/dt <sub>max</sub> .....	40
4.1.3	dLVP/dt <sub>min</sub> .....	41
4.1.4	CF .....	42
4.2	Metabolismus.....	43
4.2.1	Sauerstoffverbrauch.....	43
4.2.2	Laktatproduktion.....	44
4.3	eRNA – RNase 1 – TNF- $\alpha$ – Achse.....	45
4.3.1	RNA-Konzentration & RNase-Aktivität.....	45
4.3.2	TNF- $\alpha$ -Konzentration.....	46
4.4	Stereologie und Elektronenmikroskopie .....	46
4.4.1	CEI & V/S-Ratio .....	47
4.4.2	EM-Auswertung.....	48
5	Diskussion.....	50
6	Zusammenfassung.....	59
7	Summary.....	60
8	Abkürzungsverzeichnis .....	61
9	Literaturverzeichnis .....	66
10	Publikationsverzeichnis und Kongressbeiträge .....	80
11	Erklärung zur Dissertation.....	81
12	Danksagung .....	82
13	Lebenslauf.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 1 Einleitung

Was ist die Gemeinsamkeit eines akuten Organinfarkts, chirurgischer Eingriffe, Organtransplantationen und Traumata?

Alle genannten Geschehnisse gehen einher bzw. können einhergehen mit ischämischen Zelluntergangsprozessen, welche ein Infarktgebiet hinterlassen. Um die Größe des Infarktes zu verringern, ist eine zeitnahe und komplette Reperfusion des betroffenen Organs/Gewebes die effektivste Methode (Heusch und Rassaf, 2016). Paradoxerweise führt jedoch genau diese essentielle Intervention zu einer zusätzlichen Zellschädigung: dem sogenannten Reperfusionsschaden (Braunwald und Kloner, 1985; Piper et al., 1998).

Eine besondere Stellung nimmt dieser kombinierte Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) in der Kardiologie und Kardiochirurgie ein. So stehen die kardiovaskulären Krankheiten auf Platz 1 der jährlichen Todesfälle mit 17,9 Millionen Toten im Jahr 2016 weltweit. Dies entspricht einem Anteil von 31% aller Todesfälle. Von diesen 17,9 Millionen Toten starben wiederum 85% an den Folgen eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls (WHO, 2017). Der I/R-Schaden ist somit täglicher Bestandteil einer unüberschaubar großen Patientenkohorte weltweit. Zum einen natürlich im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes (AMI), welcher Ursache des Ischämie-Schadens ist und dessen Therapie, die perkutane Koronarintervention (PCI) bzw. die operative Koronarrevaskularisierung mittels arteriellem oder venösem Bypass, welche den Reperfusionsschaden setzt. Andererseits spielt in der Kardiochirurgie neben dem akuten lokalen I/R-Schaden, auch der akute globale I/R-Schaden eine wichtige Rolle. Dieser globale Schaden ist iatrogen bedingt durch das Ab- und Aufklemmen der Aorta zu Beginn bzw. am Ende des chirurgischen Eingriffes unmittelbar am Herzen. Dabei wird das Herz vom systemischen Blutkreislauf isoliert und ermöglicht so dem Operateur ein blutarmes, bewegungsfreies und sichereres (im Sinne einer Erleichterung durch bessere Sichtverhältnisse und die bessere Prävention von Luftembolien) Operieren (Hausenloy et al., 2012). Dieses janusköpfige Klemmungsmanöver ist letzten Endes eine Abwägung des entstehenden Schadens: zum einen wird Schaden vermieden durch ein verbessertes Operationsfeld, zum anderen entsteht Schaden durch die induzierte globale Ischämie und Reperfusion. Dieser globale I/R-Schaden kann durch Kardiomyozytenuntergang zum Herzstillstand oder zu Arrhythmien führen (Hausenloy et al., 2012).

Durch die Anwendung von kardioplegischen Lösungen, wie den Blutkardioplegien nach Calafiore bzw. Buckberg oder der kristalloiden

Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) nach Bretschneider wird das Herz zusätzlich zur Kreislaufisolierung in einen elektrochemischen Arrest versetzt. Das Aussetzen der elektrischen und mechanischen Aktivität führt zu einer erheblichen Minderung der Stoffwechselforgänge und zögert somit ischämische Schäden hinaus (Siewert und Stein, 2012). Trotz dieser Ischämiekardioprotektion kommt es vor allem bei Hochrisikopatienten zu einem relevanten, gefährlichen Ischämie- und Reperfusionsschaden (Hausenloy et al., 2012). Daher stellt sich die Frage, wie eine weitere Kardioprotektion durch Reduktion des I/R-Schadens erzielt werden kann.

Hierfür ist es wichtig, die Pathomechanismen sowohl der Ischämie- als auch der Reperusionsphase zu kennen:

Ausgangspunkt des myokardialen Schadens ist der ischämiebedingte Sauerstoffmangel, welcher zu einer Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung führt. Dies hat eine Umstellung von der aeroben zur anaeroben Glykolyse zur Folge. Das nun anfallende Laktat und die vonstatten laufende Hydrolyse von ATP (und somit ein Anstieg des anorganischen Phosphates) senken den intrazellulären pH-Wert (Dennis et al., 1991). Konsequenz dieser Azidose ist ein erhöhter  $\text{Na}^+$ -Einstrom über den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter bei gleichzeitiger Inhibierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufgrund des ATP-Mangels. Es kommt zu einer intrazellulären Ansammlung der Natriumionen mit dem Resultat der Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters und einer somit folgenden intrazellulären Kalziumüberladung (Ladilov et al., 1995). Gemeinsam mit dem Membranpotentialkollaps der inneren Mitochondrienmembran (resultierend aus dem Stopp der Atmungskette) und der Akkumulation anorganischen Phosphates löst die erhöhte Kalziumkonzentration eine Öffnung der Mitochondrienporen (mPTP = mitochondrial permeability transition pore) aus (Weiss et al., 2003; Heusch und Rassaf, 2016). Die erhöhte Permeabilität hat ein Anschwellen der Mitochondrien zur Folge, welche bis zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führen kann und es somit zur Freisetzung von Cytochrom C kommt, welches über den Caspase-Weg den programmierten Zelltod einleitet (Ibanez et al., 2015).

Mit dem Beginn der Reperfusion erfolgt auch wieder eine Sauerstoffzufuhr und somit eine Revitalisierung im Sinne einer Rückkehr zum aeroben Stoffwechsel mit mitochondrialer ATP-Produktion und einer pH-Normalisierung. In Kombination mit der intrazellulär erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt dies zu einer oszillierenden Aufnahme und Abgabe des Kalziums in bzw. aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch die ATP-abhängige Aktivierung der SERCA. Durch diese Oszillationen entstehen

Spitzenwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche in zellschädigenden Hyperkontraktionen resultieren (Siegmund et al., 1992; Ladilov et al., 1995; Schäfer et al., 2001).

Als weitere wichtige Säule des Reperfusionsschadens gilt die übermäßige Entstehung von ROS (reactive oxygen species) (Di Lisa und Bernardi, 2006), insbesondere dem Superoxidanion-Radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hypochlorige Säure ( $\text{HClO}$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) (Bagheri et al., 2016). Ihre überschießende Produktion erklärt sich durch die Sauerstoffrückkehr bei Ischämie-geschädigten Mitochondrien, insbesondere deren gestörte Elektronentransportkette (O'Rourke et al., 2005; Webster, 2012). In den Kardiomyozyten entsteht dadurch ein hohes Level an oxidativem Stress, der über mehrere Wege den Zelluntergang moduliert (Xia et al., 2016). Vor allem spielt ebenfalls die mPTP-Öffnung mit den bereits beschriebenen Konsequenzen eine wichtige Rolle (Weiss et al., 2003).

Neben dieser intrinsisch aktivierten Signalkaskade des I/R-Schadens haben auch extrinsisch auf die Kardiomyozyten einwirkende Modulatoren eine entscheidende Relevanz. So beschreiben Cabrera-Fuentes und Preissner 2014 körpereigene extrazelluläre RNA (eRNA) und das Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als wichtige Mediatoren des kardialen I/R-Schaden. Unter dem Überbegriff der eRNA fallen alle RNA-Formen, welche in extrazellulären Flüssigkeiten zirkulieren. Dazu zählen rRNA, lange nichtkodierende RNA, miRNA und mRNA (Zernecke und Preissner, 2016). Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration der körpereigenen eRNA sehr niedrig. Durch gewebeschädigende pathologischen Veränderungen, wie z.B. Hypoxie, steigt diese jedoch deutlich durch die Freisetzung aus geschädigten Zellen an (Fischer et al., 2014). Auf den I/R-Schaden bezogen bedeutet dies, dass die Ischämie-geschädigten Kardiomyozyten selber eRNA, besonders rRNA, freisetzen. Diese aktivieren das TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme), welches wiederum eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung via TNF- $\alpha$ -Shedding initiiert. Über die Bindung an TNF-Rezeptoren der Kardiomyozyten werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche zu einem Abfall an antioxidativen Enzymen, wie der Peroxidase 3 und den Superoxiddismutasen 1-3, bei gleichzeitigen massivem Anstieg an ROS mit folgender Mitochondrienschädigung, Zelluntergang und Kardiomyozytenfunktionsverlust führen (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Cabrera-Fuentes und Preissner, 2014). Interessanterweise gelten niedrige TNF- $\alpha$ -Konzentrationen sogar als kardioprotektiv (Skyschally et al., 2007). Jedoch sind die eRNA-getriggerten TNF- $\alpha$ -Mengen jenseits dieses Bereiches, da das freigesetzte TNF- $\alpha$  wiederum eRNA freisetzt und somit über diese positive Feedbackschleife einen Circulus vitiosus auslöst (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Cabrera-Fuentes und Preissner, 2014). Des Weiteren

besitzt die eRNA noch andere möglicherweise den I/R-Schaden mitregulierende Eigenschaften. Hierzu zählen die Fähigkeiten als prokoagulatorischer Kofaktor thrombotische Ereignisse zu fördern (Kannemeier et al., 2007), die Gefäßpermeabilität zu erhöhen mit anschließender Ödembildung (Fischer et al., 2007), sowie durch proinflammatorische Wirkung eine Leukozyten-Rekrutierung zu erzielen (Fischer et al., 2012).

Zusammenfassend lässt es sich sagen, dass dem I/R-Schaden ein hochkomplexer, noch nicht endgültig geklärt Pathomechanismus zugrunde liegt. Es sind dabei sowohl intra-, als auch extrazelluläre Signalwege involviert, in welchen die Mitochondrien eine zentrale Schlüsselrolle übernehmen und welche letzten Endes zu einem gemischten Schadensmuster aus Apoptose, Nekrose, Nekroptose und Autophagie führen (Heusch und Rassaf, 2016).

Bei der Erforschung neuer kardioprotektiver Strategien setzten 1986 Murry et al. einen fundamentalen Impuls. Sie beschreiben erstmals die ischämische Präkonditionierung (ischaemic preconditioning = IPC) als neuartiges Verfahren der Kardioprotektion. Dabei erzielten sie signifikant kleinere myokardiale Infarktareale nach 40-minütiger Okklusion des Ramus circumflexus der Arteria coronaria sinistra am Hundeherzen. Die Präkonditionierung wurde mittels 4 Zyklen kurzer, lediglich je 5-minütiger Ischämie- und Reperusionsphasen durch Okklusion und Öffnung des Ramus circumflexus vor der eigentlichen, langandauernden Ischämie durchgeführt.

Das interessante Prinzip dieses Verfahrens lautet somit, einen letalen I/R-Schaden durch vorangegangene Zyklen nicht letaler I/R-Schäden zu reduzieren. Dies ist wichtig zu betonen, da länger andauernde Konditionierungsphasen ( $\geq 10$  min) bereits zu einer hohen Mortalität führen und somit nur die nicht letalen I/R-Phasen einen Konditionierungseffekt erzielen (Murry et al., 1986). Dieser Konditionierungseffekt hält ungefähr für 2 h mit abnehmender Wirkung nach erfolgtem Konditionierungsmanöver an und bewirkt in dieser Zeit eine erhöhte myokardiale Resistenz gegenüber Ischämien (Walker und Yellon, 1992). Es handelt sich hierbei um die frühe bzw. klassische Präkonditionierung. Denn nach 12-24 h entwickelt das konditionierte Herz eine zweite Phase der erhöhten Resistenz: das sogenannte SWOP (= second window of protection) (Marber et al., 1993; Kuzuya et al., 1993). Diese zweite, späte Protektionsphase hält 72-96 h an, wobei die schützende Wirkung allerdings geringer ist als in der ersten, frühen Phase (Hausenloy et al., 2016).

Doch nicht nur vor einer letalen Ischämie durchgeführte Okklusions-Reperusions-Manöver führen zu einer Kardioprotektion, sondern auch

solche, die während der Reperfusion durchgeführt werden. Dieses Phänomen wird als ischämische Postkonditionierung (ischaemic postconditioning = IPost) bezeichnet. Ein wichtiger Unterschied zur Präkonditionierung ist hierbei die Dauer der Konditionierungszyklen, die bei der Postkonditionierung lediglich aus je 30 s Reokklusion und Reperfusion bestehen (Zhao et al., 2003). Das Prinzip der ischämischen Postkonditionierung beruht dabei auf dem Wissen der Existenz und Relevanz des Reperfusionsschadens, sowie der Annahme, diesen mit einer Modifikation der Art und Weise der Reperfusion beeinflussen zu können (Hausenloy et al., 2016). So konnte eine der ischämischen Präkonditionierung ebenbürtige Reduktion des myokardialen Infarktareals gezeigt werden (Zhao et al., 2003).

Beide genannten Konditionierungsverfahren besitzen gerade im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit eine entscheidende Krux: so implizieren beide Verfahren eine iatrogen induzierte Ischämie und Reperfusion direkt am Herzen und erfordern das Wissen über das betroffene Versorgungsgebiet.

Unabhängig von diesem Problem und daher eine Sonderrolle einnehmend ist eine weitere ischämische Konditionierungsvariante: die ischämische Fernkonditionierung (remote ischaemic conditioning = RIC). Auf den Erkenntnissen von IPC aufbauend, beschrieben Przyklenk et al. 1993 erstmals, dass nach IPC-Manöver am Ramus circumflexus, aber nachfolgender Okklusion des Ramus interventricularis (beide aus der Arteria coronaria sinistra entspringend), es trotzdem zu einer Verringerung des Infarktareals kommt. Es entwickelt also auch „fernes“, nicht zum Versorgungsgebiet der präkonditionierten Koronararterie dazugehöriges Myokard eine erhöhte Ischämieresistenz. Auf dieser Basis konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Kardioprotektion mittels ischämischer Fernkonditionierung nicht nur im Herzen an sich erzielt werden kann, sondern auch eine Triggerung über andere Organe möglich ist. So werden kardioprotektive Effekte durch eine ischämische Präkonditionierung der Niere (McClanahan et al., 1993), des Mesenteriums (Gho et al., 1996), der Skelettmuskulatur (Birnbauer et al., 1997) und der Leber (Noorbakhsh et al., 2015) vermittelt. Kharbanda et al. konnten 2002 weiterhin zeigen, dass es keines invasiven Eingriffes benötigt, um das RIC-Manöver durchzuführen. Sie induzierten die I/R-Zyklen in Skelettmuskulatur, indem sie eine Extremität via Tourniquet bzw. Blutdruckmanschette abschnürten und somit ebenfalls RIC-Effekte am Herzen erzielten. Diese Methode stellt eine wichtige Erkenntnis für die klinische Anwendbarkeit dar, da sie non-invasiv, einfach durchführbar und kostengering ist. Ein weiterer großer Vorteil ist die Anwendbarkeit von RIC sowohl als Prä- (RIPC), Per- (RIPerC), als auch Postkonditionierung (RIPostC). Ergo können

die kurzen, herzfernen I/R-Episoden vor (RIPC), während (RIPerC) und nach (RIPostC) einer myokardialen Ischämie angewendet werden (Heusch et al., 2015).

Die große, seit über 25 Jahren noch nicht vollends geklärte Frage ist jedoch, über welche Signalwege RIC seine Wirkung entfaltet. Es handelt sich um hochkomplexe Mechanismen, bei denen sowohl humorale, neuronale, als auch systemische/inflammationsmodulierende Faktoren eine Rolle spielen (Gill et al., 2015; Billah et al., 2019).

2002 stieß Baxter ein Umdenken bzgl. der Rolle der neutrophilen Granulozyten im myokardialen I/R-Schaden an. Er stellte dar, dass die These der Verschlechterung des Infarktgebietes durch die Neutrophileninfiltration während der Reperfusionphase nicht haltbar ist, sondern eher kausal, als Reaktion des Körpers und Teil des Heilungsprozesses zu betrachten sei. Albrecht et al. zeigten 2013 mittels Myeloperoxidaseaktivität als Marker, dass RIPC diese Neutrophileninfiltration ins Myokard sogar verstärkt und so unter anderem kardioprotektiv wirken könnte. Weiterhin zeigten sie einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine nach erfolgter Fernkonditionierung. Konträr zu diesen Erkenntnissen bewirkt RIPC ebenfalls antiinflammatorische Prozesse. Konstantinov et al. konnten 2004 auf genetischer Ebene nachweisen, dass RIPC bereits nach 15 min zu einer verminderten Genexpression in Leukozyten führt und im antiinflammatorischen Sinne die Zytokinsynthese, Apoptose, Exozytose, Chemotaxis, Zelladhäsion und -migration beeinflusst. Die immunmodulierende Wirkung von RIPC scheint somit ein komplexes Zusammenspiel aus pro- und antiinflammatorischen Stimuli zu sein.

Auch das Nervensystem scheint ein Signalweg zur Kardioprotektion aus der Distanz darzustellen. Durch Mediatoren, freigesetzt aus dem konditionierten Organ, oder direkt durch das Konditionierungsmanöver stimulierte, nozizeptive Afferenzen geben ein Signal über das Rückenmark, um vagale (parasymphatische) und sympathische Efferenzen zu aktivieren. Diese setzen wiederum protektiv-wirkende Moleküle direkt am Herzen frei (Heusch et al., 2015; Gill et al., 2015). Dass sowohl somatosensorische Nervenbahnen, das Rückenmark und das autonome Nervensystem beteiligt sind, zeigt sich durch den Verlust der RIPC-Kardioprotektion bei Ausschaltung eines dieser Systeme. Tierexperimentell konnte dies interventionell mittels Durchtrennung der jeweiligen Nervenbahnen, sprich des N. femoralis (Dong et al., 2004), des Rückenmarks bzw. des N. vagus (Donato et al., 2013), gezeigt werden. Aber auch durch medikamentöse Blockierung dieser Bahnen konnte ein solcher Effekt erzielt werden. Im Rückenmark gelang dies mittels Opioid-Rezeptorblocker Naloxon (Wong et al., 2012)

und durch den Ganglienblocker Hexamethonium konnten die autonomen Nervenbahnen blockiert werden (Gho et al., 1996). Die separate Antagonisierung von parasympathischen Fasern mithilfe des Parasympatholytikums Atropin (Donato et al., 2013) verhinderte ebenfalls die RIPC-Kardioprotektion. Und durch den  $\alpha_1$ -Blocker Prazosin bzw. den  $\beta$ -Blocker Timolol konnte der kardiale Sympathikus-Einfluss unterbrochen werden und somit eine Kardioprotektion durch Rückenmarksstimulation verringern (Southerland et al., 2007). Ein großer Kritikpunkt dieser Studien ist jedoch, dass sie alle lediglich an Nagetieren durchgeführt wurden. Im Schweinmodell konnte z.B. auch an einem denervierten Herzen RIPC erfolgreich durchgeführt werden (s.u.).

Die Theorie der humoralen Signalübertragung besagt, dass RIPC zu einer herzfernen Substanzfreisetzung führt, welche über den Blutkreislauf zum Herzen gelangen um dort eine protektive Wirkung zu entfalten (Gill et al., 2015). Dabei könnten die Mediatoren sowohl aus stimulierten nozizeptiven Nervenfasern, aus ischämisch konditionierten, herzfernen Organ oder aus dem Gefäßendothel in die Blutbahn freigesetzt werden. Dickson et al. zeigten erstmals 1999, dass die Übertragung von Blut aus dem koronaren Ausfluss eines ischämisch präkonditionierten Kaninchenherzens auf ein unkonditioniertes, isoliertes Kaninchenherz ebenfalls zu einer Kardioprotektion bei nachfolgender Ischämie führt. Dass ein humoraler Faktor auch bei RIPC durch Extremitäten-Abklemmung als Mediator zu betrachten ist, zeigten Konstantinov et al. 2005. Sie vollführten Herztransplantationen an Schweinen und konnten an den Empfängern, trotz transplantierten, denervierten Herzen erfolgreich eine RIPC-Kardioprotektion induzieren. Ein weiteres wichtiges Indiz für das Wirken zirkulierender Faktoren ist der Nachweis, dass sogar speziesübergreifend von Mensch zu Kaninchen eine Übertragung des RIPC-Effektes möglich ist. Hierbei wurde ein Dialysat aus Blutentnahmen konditionierter Probanden bei isolierten Kaninchenherzen und -kardiomyozyten angewendet (Shimizu et al., 2009). Bei der sich hieraus ergebenden Frage nach dem Mediator haben viele Studien eine Vielzahl an mögliche Botenstoffe untersucht. Doch keiner der erforschten, potentiellen Mediatoren konnte bisher das Phänomen RIC endgültig erklären (Heusch et al., 2015). Zu diesen in Betracht gezogenen Faktoren zählen unter anderem Stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) (Davidson et al., 2013), Stickstoffmonoxid (NO) (Rassaf et al., 2014), microRNA-144 (Li et al., 2014) und Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) (Basalay et al., 2016). Cabrera-Fuentes et al. zeigten 2015 in einer klinischen Studie, dass auch die vaskuläre RNase 1 als RIPC-Mediator fungieren könnte. Gemäß der Hypothese, dass der I/R-Schaden maßgeblich durch freigesetzte eRNA und TNF- $\alpha$  moduliert wird (s.o.), wurde der Effekt

der vaskulären RNase 1 als natürlicher Gegenspieler der eRNA deutlich. In der kleinen herzchirurgischen Patientenkohorte erzielte das RIPC-Manöver eine signifikante Erhöhung der RNase-Aktivität im Blut des Koronarsinus und der Radialarterie mit gleichzeitiger signifikanter Senkung der eRNA-Konzentration in beiden Messproben und relevanter Abnahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Koronarsinusblut. Die RNase 1 ist somit in der Lage, das letale Zusammenspiel von eRNA und TNF- $\alpha$  zu unterbinden (Cabrera-Fuentes et al., 2014; Cabrera-Fuentes et al., 2015). Jedoch war diese Studie mit 14 Patienten ohne RIPC, 6 mit *Sham*-RIPC und 6 mit RIPC zu klein, um klinische Unterschiede im Endergebnis feststellen zu können.

Bei der RNase 1 handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym der RNase A-Superfamilie, da sie in Homologie zur pankreatischen bovinen RNase A steht (Beintema, 1998). Im Menschen wird sie dementsprechend auch übermäßig im Pankreas exprimiert. Aber auch in vielen anderen Geweben findet die Expression von RNase 1 statt, wobei die Ovarien und die Testes ebenfalls mit einem stärkeren Ausmaß zu erwähnen sind (Futami et al., 1997). Des Weiteren existiert im Blutplasma eine Konzentration von ca. 400  $\mu\text{g/l}$  zirkulierender RNase 1 (Weickmann et al., 1984), welche durch die konstitutive Sekretion durch Gefäßendothelzellen (Landré et al., 2002) aufrechterhalten wird. Besonders die Endothelzellen der großen und mittleren Gefäße exprimieren die vaskuläre RNase 1. In diesen Endothelzellen wird sie außerdem gemeinsam u.a. mit dem von-Willebrand-Faktor und P-Selectin in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und per Exozytose in die Blutzirkulation freigesetzt. Der Abgabemechanismus wird getriggert durch prokoagulatorische bzw. proinflammatorische Reize wie z.B. Thrombin, VEGF oder eRNA (Fischer et al., 2011). Dies erklärt auch den Anstieg der RNase-Aktivität durch RIPC via Extremitäten-I/R. Die kurzen, nicht letalen I/R-Zyklen induzieren durch die Hypoxie die Freisetzung proinflammatorischer Faktoren wie eRNA, welche wiederum zur Degranulation der Weibel-Palade-Körperchen führen und somit die Plasmakonzentration der zirkulierenden vaskulären RNase 1 auf ein therapeutisches Maß bringen. Die damit verbundene klinische Relevanz bzw. das protektive Potenzial in Hinblick auf das kardiovaskuläre System konnte bereits in verschiedenen Tierexperimenten gezeigt werden. So führt eine RNase 1-Behandlung zur Reduktion der kardialen Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion im *in vivo* Mäuse-Modell und im *ex vivo* Langendorff-Rattenherz. Untermauert wird dieser kardioprotektive Effekt durch eine verminderte ROS-Produktion und LDH-Aktivität (Cabrera-Fuentes et al., 2014). Des Weiteren konnte mittels RNase 1-Behandlung die Bildung artherosklerotische Plaques (Simsekylmaz et al., 2014) und arterieller Thromben (Kannemeier et al., 2007) in

Mäusen signifikant verringert werden. Auch der Gefäßverschluss durch venöse Thrombosen konnte durch eine Vorbehandlung mit RNase 1 in Ratten vermindert werden und in einem Schlaganfallmodell sowohl die zerebrale Infarkt- als auch Ödemgröße verringern (Fischer et al., 2007). Eine weitere ausschlaggebende Eigenschaft für die therapeutische Anwendbarkeit ist die Nicht-Toxizität gegenüber körpereigener Zellen, da diese ubiquitär über zytosolische RNase-Inhibitoren (RI) verfügen (Gaur et al., 2001).

Neben der ungeklärten Fragestellung nach dem Signalweg vom peripheren Organ zum Herzen, ist ebenfalls die intrakardiale Signaltransduktion von RIC noch nicht vollends gewiss. Heusch fasste 2015 zusammen, dass die Studiendaten vor allem eine Vielzahl an bedeutenden Unterschieden zwischen den verschiedenen Spezies diesbezüglich zeigen. Dies macht es schwer, eindeutige Erkenntnisse zu erheben. Jedoch scheinen besonders Stickstoffmonoxid (NO), die Proteinkinase C (PKC) und der RISK (reperfusion injury salvage kinase)-Signalweg als intrakardiale Mediatoren zu fungieren und mit den Mitochondrien als Zielstruktur und Effektor zu interagieren (Heusch, 2015; Heusch et al., 2015).

Neben der tierexperimentellen Grundlagenforschung zur Klärung der angesprochenen Fragen über die Signalmechanismen, existieren auch bereits eine Vielzahl an klinischen Anwendungsversuchen von RIC in der Herzchirurgie wie auch in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts. Jedoch fielen alle Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien gesamt betrachtet sehr durchwachsen bzw. neutral aus (Heusch und Rassaf, 2016). So konnten ernüchternder Weise keine der Daten den Erwartungen und der Euphorie aus den vielversprechenden tierexperimentellen Ergebnissen gerecht werden. Viele der kleineren *Proof of concept*-Studien, mit bis zu 162 Konditionierungseingriffen (Thielmann et al., 2013), konnten ebenfalls eine Reduzierung der Infarktgröße nach herzchirurgischen Interventionen mit RIC zeigen. Wobei die Infarktgröße anhand der Konzentration der Herzenzyme CK-MB (Choi et al., 2011), TnI (Thielmann et al., 2013; Hu et al., 2016) und TnT (Slagsvold et al., 2014) bzw. hsTnT (Candilio et al., 2015) bemessen wurde. Doch die einzigen großen Phase-III-Studien ERICCA (Hausenloy et al., 2015) und RIPHeart (Meybohm et al., 2015) blieben in ihrem Ergebnis neutral. Die Verlaufsuntersuchung der RIPHeart-Studie nach einem Jahr zeigte sich diesbezüglich kongruent (Meybohm et al., 2018). Beide Studien hatten zum Ziel das klinische Outcome als primären Endpunkt von Patienten mit unterlaufener herzchirurgischer Intervention mit RIPC zu untersuchen. Die möglichen Gründe für die neutralen Ergebnisse der großen Studien und die unterschiedlichen Ergebnisse der kleinen Studien lassen sich als allgemeine Probleme der momentanen klinischen

Forschung zu RIC zusammenfassen. Ein Hauptkritikpunkt ist dabei die Heterogenität der Studien in vielen Aspekten, beginnend bei einem breiten Anwendungsspektrum von RIC mit gleichzeitiger Diskrepanz bzgl. Ein- und Ausschlusskriterien bei ein und derselben Intervention (Heusch und Rassaf, 2016). Sowohl in ERICCA, als auch in RIPHeart wurden Patienten einbezogen, bei denen entweder nur eine CABG oder eine CABG mit gleichzeitiger Herzklappenchirurgie durchgeführt wurde (Hausenloy et al., 2015; Meybohm et al., 2015). Vor allem die zusätzliche herzchirurgische Intervention zur Herzklappenversorgung stellt eine mögliche Störquelle für die Enddaten dar. Zum einen wird ein additiver Anstieg der Herzenzyme erzeugt und zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der RIC-Effekt durch die Intervention unterbunden wird (Heusch und Rassaf, 2016). In den weiteren *Proof of concept*-Studien wurde RIC zudem entweder nur bei CABG-Patienten (Karuppasamy et al., 2011; Lucchinetti et al., 2012; Slagsvold et al., 2014), nur bei Herzklappenoperationen (Hu et al., 2016; Pinaud et al., 2016), bei kinderherzchirurgischen Eingriffen (Cheung et al., 2006; Luo et al., 2011) oder aber auch vor der Behandlung eines akuten STEMI (Bøtker et al., 2010) bzw. vor einer elektiven PCI (Hoole et al., 2009; Liu et al., 2014) angewendet. Des Weiteren herrscht in den klinischen Studien eine Heterogenität bzgl. der Messung des Herzinfarktareals (s.o.) und auch im Durchführungsprotokoll des Konditionierungsmanövers. Wobei letzteres auch der fehlenden Datenlage von Phase-II-Studien geschuldet ist (Heusch und Rassaf, 2016). Ein weiterer schwerwiegender Kritikpunkt an ERICCA und RIPHeart ist die fast ausschließliche Anwendung von Propofol für die Narkose der Patienten. Studiendaten weisen darauf hin, dass Propofol im Gegensatz zu volatiler Anästhesie die Wirkung von RIC unterbindet (Kottenberg et al., 2012; Kottenberg et al., 2014). Bunte et al. (2019) zeigten diesbezüglich, dass dieser Wirkmechanismus auf einer Inhibition der Freisetzung von humoralen Faktoren beruht. Die Anästhesie scheint ohnehin ein bedeutsamer Konditionierungsmodulator zu sein. Sowohl inhalative Narkotika wie Isofluran (Swyers et al., 2014), als auch Medikamente wie Opiode (Headrick et al., 2015) haben bereits selbst einen konditionierenden Effekt auf das Herz. Es könnte sogar sein, dass diese Kardioprotektion durch RIC nicht mehr gesteigert werden kann (Lucchinetti et al., 2012). Nicht zuletzt spielen auch Faktoren wie Patientenalter, Komorbiditäten und Komedikation eine wichtige Rolle, die die Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen erschweren (Anttila et al., 2016; Heusch und Rassaf, 2016).

Trotz dieser Ernüchterungen der ersten großen klinischen Studien zu RIC mit allen genannten Schwierigkeiten und Problemen des Studiendesigns, ist das Thema RIC

immer noch präsent und hochaktuell. So lässt sich zum einen auf den bis ins Detail eruierten und analysierten Fehlern aufbauen, zum anderen ist das Feld der Anwendungsmöglichkeiten von RIC nicht nur auf das Herz mit kardiochirurgischen und kardiologischen Interventionen beschränkt. Im Gegenteil: in den letzten Jahrzehnten ist das Forschungsgebiet der Anwendung der ischämische Fernkonditionierung stetig expandiert. Es erstreckt sich mittlerweile auf die Nephro-, Neuro-, Pulmo-, Hepato- und Pankreasprotektion (Le Page und Prunier, 2015; Sogorski et al., 2017). Sei es im Sinne der Vermeidung von Kollateralschäden im Zuge großer Operationen oder angiologischer Interventionen, im Rahmen chirurgischer Eingriffe wie Ektomien direkt am zu schützenden Organ, bei Organtransplantationen oder sogar in der rekonstruktiven Mikrochirurgie (Sogorski et al., 2017). Des Weiteren hat das Thema RIC auch Einzug gehalten in Forschungsgebiete zur Therapie des hämorrhagischen Schocks (Dai et al. 2019) oder aber auch der Sportmedizin im Rahmen einer Leistungssteigerung (Tomschi et al., 2018).

Um sowohl die Anwendungsgebiete als auch -kriterien zu optimieren ist es von großer Bedeutung den noch offenen Fragen bzgl. Signalwegen, Mediatoren und Wirkungsweise nachzugehen und diesbezüglich Grundlagenforschung zu betreiben, zu welcher auch diese Arbeit ihren Beitrag leisten möchte.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es an die Ergebnisse von Cabrera-Fuentes et al. 2015 zum Zusammenspiel von eRNA und RNase 1 nach RIPC anzuknüpfen und diese tierexperimentell zu überprüfen. Des Weiteren soll das RIPC-Verfahren mit der etablierten Kardioprotektion mittels Blutkardioplegie nach Calafiore verglichen werden.

Im Detail sollen folgenden Fragestellungen eruiert werden:

1. Lässt sich nach erfolgtem RIPC-Manöver ein signifikanter RNase 1-Anstieg, im Sinne einer Mediator-Funktion, tierexperimentell bestätigen?
2. Induziert RIPC im isolierten Herz nach Langendorff Vorteile bzgl. der Leistungsparameter im Vergleich zu nicht präkonditionierten Herzen?
3. Induziert RIPC im isolierten Herz nach Langendorff Vorteile bzgl. der Metabolismusparameter im Vergleich zu nicht präkonditionierten Herzen?
4. Gibt es signifikante Unterschiede bzgl. Leistungsparameter, Metabolismus oder stereologischer und elektronenmikroskopischer Auswertung zwischen RIPC und der Blutkardioplegie nach Calafiore?

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien & Pharmaka

Acetyliertes Bovines Serum Albumin (Albumin, Acetylated from bovine serum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
BSA (Bovine Serum Albumin) Fraction V pH 7,0	GE Healthcare Bio-Sciences Austria GmbH A-4061 Pasching
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Carbogen 5% CO <sub>2</sub> 95% O <sub>2</sub>	Praxair Deutschland GmbH D-40476
D-(+)-Glucose wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
EDTA- Dinatriumsalz Dihydrat (Titerkomplex III)	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Epon	Fluka Chemie AG CH-9471 Buchs
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Fettsäure-freies BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Gentamicin-ratiopharm 160 mg/2 ml SF	Ratiopharm GmbH D-89079 Ulm
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH D-89079 Ulm
HEPES buffer solution, 1 M in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Insuman Rapid 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH D-65926 Frankfurt
Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH D-85716 Unterschleißheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe

Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Kaliumchlorid 14,90% Braun	B. Braun, Melsungen AG D-34209 Melsungen
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Lanthan(III)-chlorid Heptahydrat (Lanthanum(III) chloride heptahydrate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Magnesiumsulfat 50% Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH D-79114 Freiburg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
MPC Protein Precipitation Solution	Epicentre Madison WI USA 53719
Natriumchlorid (Sodium chloride)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Perchlorsäure, 70% (Perchloric acid, 70%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Phosphorsäure, 85%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Poly(C) (Polycytidylic acid potassium salt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89555 Steinheim
Proteinase K	Biozym Scientific GmbH D-31840 Hessisch Oldendorf
Qubit® RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham MA USA 02451

Rat TNF alpha ELISA Ready-Set-Go®	Affymetrix eBioscience San Diego Ca USA 92121
RNase A, DNase and protease-free (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham MA USA 02451
Temgesic Ampullen, 0,3 mg, Injektionslösung Wirkstoff: Buprenorphinhydrochlorid	Rickitt Benckiser Healthcare Ltd. UK – Hull, HU8 7DS
Tissue & Cell Lysis Solution	Epicentre Madison WI USA 53719
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
TWEEN® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Ultra Pure Water, sterile, suitable for HPLC	Biochrom GmbH D-12247 Berlin
Uranylacetat	Merck KGaA D-64293 Darmstadt

## 2.2 Laborgeräte & -materialien

Absaugpumpe egnell compact 25	Ameda B-1800 Vilvoorde Belgien
BGA Gerät Rapidlab 348	Siemens, D-65760 Eschborn
BioPhotometer plus	Eppendorf AG D-22339 Hamburg Hummelsbüttel
Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH D-72636 Frickenhausen
DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments GmbH D-63263 Neu Isenburg
EL808i Ultra Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc. D-74177 Bad Friedrichshall

Exsikkator Duran 2,4 l	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Filter/-halter Swinnex	EMD Millipore Headquarters Billerica, MA 01821
Fluovac	Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Gen5 2.01 All-In-One Microplate Reader Software	BioTek Instruments, Inc. D-74177 Bad Friedrichshall
Isofluranverdampfer	Völker GmbH D-24568 Kaltenkirchen
Lactat Photometer plus DP110	Diaglobal GmbH D-12555 Berlin
Magnetic Stirrer HI 190M	Hanna instruments Deutschland GmbH D-77694 Kehl am Rhein
Magnetrührer yellow line yellow MAG HS 7	IKA-Werke GmbH & Co. KG D-79219 Staufen
Multiply®-Pro cup 0.5 ml, PP	Sarstedt AG & Co D-51588 Nümbrecht
NanoDrop 2000, Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham MA USA 02451
PC-60E Fingerpulsoximeter + Fingerclip Sensor Kinder für PC-60E	Creative Medical Shenzhen Creative Industry Co., Ltd Shenzhen, GD, 518054, China
pH-Meter WTW pH 530	WTW GmbH D-82362 Weilheim
Pipetten Eppendorf Research 1000	Eppendorf AG D-22339 Hamburg Hummelsbüttel
Pipetten Eppendorf Research 100	Eppendorf AG D-22339 Hamburg Hummelsbüttel
Pipetten Eppendorf Research 10	Eppendorf AG D-22339 Hamburg Hummelsbüttel
Präzisionswaage Kern EW	Kern & Sohn GmbH D-72336 Balingen

Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham MA USA 02451
RAWP02500   MF-Millipore Membran, Zellulosemischester, hydrophil, 1,2 µm, 25 mm, weiß, glatt	EMD Millipore Headquarters Billerica, MA 01821
RBS 35 Konzentrat (Reiniger)	Carl Roth GmbH + Co. KG D-76185 Karlsruhe
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co D-51588 Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co D-51588 Nümbrecht
ThermoLux Wärmeunterlage 17 x 17cm	Witte + Sutor GmbH D-71540 Murrhardt
Thermomixer pro	CellMedia GmbH & Co. KG D-06729 Elsteraue
Transmissionselektronenmikroskop Morgagni 268	FEI NL-5651 Eindhoven
Tuttnauer/Systec 2540 EL Autoklav	Tuttnauer Europe B.V. NL-4815 PR Breda
Ultramikrotom Reichert Ultracut E	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH D-35578 Wetzlar
UV-transparente Einmal-Küvetten	Sarstedt AG & Co D-51588 Nümbrecht
Veterinary Fluosorber	Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia NY USA 11716
Waage EMB 2200-0	Kern & Sohn GmbH D-72336 Balingen
Zentrifuge 4-16-K	Sigma D-37520 Osterode am Harz
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham MA USA 02451

### 2.3 Versuchsgeräte & -materialien zur Organperfusion

73-3757 Fiberoxygenator D150	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Aortenkanüle aus Edelstahl ID: 1,5 mm AD: 2,0 mm	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Brückenverstärker	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Druckaufnehmer Braun Combitrans	B. Braun, Melsungen AG D-34209 Melsungen
Effluat Funnel	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Isolated Heart ICH-SR Appartus Type: 844/1	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Latexballon Größe 5/6	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Pall Bluttransfusionsfilter SQ40SE	Pall GmbH D-63303 Dreieich
Perfusatbehälter, doppelwandig, 1,0 l	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Perfusor 11 plus	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Schlauchpumpe Ismatec Reglo digital ISM 834/230	Ismatec-IDEX Health & Science GmbH D-97877 Wertheim
Software HSE Isoheart W	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH D-79232 March-Hugstetten
Tygon Pumpenschläuche (ID: 3,18 mm)	Ismatec-IDEX Health & Science GmbH D-97877 Wertheim

Wärmepumpe Ecoline Lauda E100	Lauda Dr. R Wobser GmbH & Co. KG D-97922 Königshofen
-------------------------------	---

## 2.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 3 Monate alte männliche Ratten der Inzuchtlinie Lewis, LEW/OrlRj. Ihr Gewicht betrug  $390 \pm 42,5$  g. Gezüchtet und geliefert wurden sie von der Firma Fa. Janvier, CS 4105 Le Genest-Saint-Isle, F-53941 Saint- Berthevin Cedex. In Gießen wurden sie mit mindestens 14-tägiger Eingewöhnung vor Versuchsbeginn im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus- Liebig- Universität nach dem deutschen Tierschutzgesetz und den „Principles of laboratory animal care“ (National Institutes of Health 1985) gehalten. Hier erhielten sie freien Zugang zu Wasser und Futter.

Die Wahl des Versuchstieres fiel auf Ratten, da diese über genügend kardiales Gewebe für molekularbiologische und histologische Untersuchungen verfügen. Außerdem ermöglicht die Menge an Koronarsinusblut eine sehr gute Analyse der arteriovenösen Differenzen über das Myokard als Perfusionsstrecke. Beides wäre im Maus- Modell unzureichend gewesen. Die Entscheidung für den Rattenstamm Lewis, LEW/OrlRj ist damit begründet, dass so zunächst der Aspekt der interindividuellen genetischen Variabilität möglichst gering gehalten wurde.

### **3 Methoden**

Bei den Versuchen dieser Arbeit handelte es sich um eine Kombination eines kurzen Tierversuches (Durchführung RIPC oder *Sham*-RIPC) mit anschließender Herzentnahme und darauffolgender isolierter Organperfusion nach Langendorff. Im Langendorff-Apparat konnten Perfusion, Ischämie- und Reperfusion, sowie Kardioplegiezugaben reguliert werden.

Die Protokolle der Langendorff-Versuche bauten dabei auf etablierte Methoden und Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe auf (Böning et al., 2014; Böning et al., 2015).

#### **3.1 RIPC + Präparation**

Nach kurzer Eingewöhnungsphase im Labor und dem Wiegen, wurde den Ratten das angewärmte Schmerzmittel Buprenorphin (0,05 mg/kg KGW) subkutan mittels 26 G Nadel injiziert. Dies gewährleistete eine schmerzfreie Durchführung der ischämischen Fernkonditionierung, sowie der Tötung mit Organentnahme. Anschließend fand eine Inhalationsnarkotisierung der Tiere mit 2,5% Isofluran und 97,5% Sauerstoff in einem Exsikkator statt. Nach darauffolgender Lagerung in Bauchlage auf dem Präpariertisch, wurde die Narkose mithilfe einer Nasenmaske aufrechterhalten. Eine konstante Körpertemperatur wurde mittels einer Wärmeunterlage und Thermometerkontrolle gewährleistet.

Unter den genannten Bedingungen erfolgte das ischämische Fernkonditionierungsmanöver nach der etablierten Methode von Kharbanda et al. 2002. Hierfür wurde ein Tourniquet um den linken Hinterlauf der Ratte gelegt und möglichst weit proximal zugezogen. Mittels Pulsoximeter wurde an der Hinterpfote überprüft, ob die Abklemmung zur vollständigen Pulslöschung geführt hat. War dies nicht der Fall, so musste das Tourniquet fester zugezogen werden. Ansonsten wurde die Okklusion für 5 min beibehalten um eine nicht-letale Ischämie im Hinterlauf zu induzieren. Zeichen einer erfolgreich erzeugten Ischämie war außerdem die zyanotische Verfärbung der Rattenhinterpfote. Nach diesen 5 min Okklusion wurde das Tourniquet gelöst um eine 5-minütige Reperfusionsphase einzuleiten. Es erfolgte erneut eine Pulskontrolle via Pulsoximeter. Zudem fand eine sichtbare Normalfärbung der Hinterpfote statt. Dieser Ischämie-Reperfusions-Zyklus wurde 2-mal wiederholt.

In den Versuchstieren ohne RIPC fand anstelle der Ischämie-Reperfusionen-Zyklen eine Scheinphase (*Sham*) statt, in welcher die Ratten ohne jeglichen Eingriff 30 min bei fortlaufender Narkose und Wärmezufuhr auf dem Präpariertisch lagen.

Nach dieser 30-minütigen Konditionierungs- bzw. Scheinphase erfolgte als nächstes die Überprüfung des erloschenen Cornealreflexes mit darauffolgender Tötung des Versuchstieres durch Genickbruch. Hierzu wurde den Ratten bei fixiertem Kopf und leicht angehobenem Hinterkörper ruckartig am Schwanz gezogen. Nach sofortiger Umlagerung auf den Rücken, wurde das Abdomen eröffnet, das Diaphragma durchtrennt und das Herz entnommen. Dieses wurde unmittelbar in ca. 4 °C kalte NaCl-Lösung gegeben. Somit konnten Ischämie-Schäden in Grenzen gehalten werden (Sutherland und Hearse, 2000) während das Herz von eventuell noch anliegenden Strukturen wie Lunge, Herzbeutel, Thymus etc. getrennt wurde und der Aortenstumpf für die Langendorff-Apparatur präpariert wurde. Das isolierte Organ konnte anschließend unter reduziertem Druck an der Aortenkanüle befestigt werden. Von der Organentnahme bis zur Reperfusion über die Aortenkanüle verging maximal 1 min, sodass eine mögliche ischämische Präkonditionierung durch die Präparation ausgeschlossen werden konnte (Awan et al., 1999). Anschließend erfolgte noch das Einsetzen eines Latexballons in den linken Ventrikel. Dieser wurde durch den während der Präparation eröffneten linken Vorhof in die linke Herzkammer vorgeschoben und ermöglichte eine konstante Messung der Druckverhältnisse während der Versuche (s.u.).

Parallel zur Herzpräparation wurde das in den Thorax fließende Blut mithilfe einer Spritze aufgefangen. Im Idealfall konnten so 5 ml Rattenblut gewonnen werden, welche anschließend 20 min bei 4 °C und 1600 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

Alle genannten Durchführungsschritte wurden unter den Bedingungen des Tierschutzgesetzes, nach genehmigtem Tierversuchantrag (GI 20/29 Nr. 90/2014) durchgeführt.

Sowohl die Tiertötung als auch die Herzpräparation führte Frau M. Heep, Technische Assistentin der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie aus.

### **3.2 O. Langendorff's isolierte Organperfusion**

Das Verfahren der Perfusion isolierter Rattenherzen ist auf den deutschen Physiologen Oscar Langendorff (1853-1908) zurückzuführen. Im Jahre 1895 beschrieb dieser erstmals eine Methode für die isolierte Perfusion von Säugetierherzen

(Langendorff, 1895). Die Versorgung des Myokards und somit auch die Aufrechterhaltung der Herzfunktion werden durch eine retrograde Perfusion gewährleistet. Hierbei wird eine Kanüle in den präparierten Aortenstumpf eingeführt. Der entstehende Perfusionsdruck führt physiologisch zu einem Verschluss der Aortenklappe, sodass die Sinus aortae freigelegt werden und die Koronararterien perfundiert werden können.

### **3.2.1 Aufbau des Langendorff-Apparates**

Der Kern der Langendorff-Anlage ist die Organkammer, in welcher das präparierte Rattenherz an einer Kanüle mithilfe einer Bindfaden-Ligatur aufgehängt wird. Um das Herz auf Körpertemperatur zu halten, besteht die Organkammer aus doppelwandigem Plexiglas, durch welches kontinuierlich 38 °C warmes Wasser gepumpt wird. Auf gleiche Art und Weise wird auch das Perfusat im Perfusatbehälter temperiert.

Ausgehend vom Perfusatbehälter, werden mittels Schlauchsystem und Rollerpumpe zwei Kreisläufe versorgt. Der eine dient der Begasung des Perfusats und der andere ist für die Perfusion des Herzens zuständig. Aufgrund der Wahl für ein Erythrozyten-Perfusat (s.u.), wurde für die Begasung ein Fiberoxygenator/ Membran-Oxygenator verwendet. Denn dieser ermöglicht eine schonende Zugabe des Carbogens zum Perfusat. Somit können Schäden der Erythrozyten durch Aufschäumen verhindert werden (Sutherland und Hearse, 2000). Außerdem ist in diesen Kreislauf ein Bluttransfusionsfilter mit eingeschaltet, dieser fängt mit seiner Porengröße von 40 µm mögliche Verunreinigungen und Mikroaggregate ab. Nach Filtrierung und Begasung wird das Perfusat wieder in den Perfusatbehälter geleitet, wo es sich mit dem restlichen Perfusat vermischt und erneut in die Kreisläufe aufgenommen wird.

Der zweite Kreislauf befördert das Perfusat mittels Rollerpumpe zum isolierten Herzen. Bevor es jedoch das Organ erreicht, muss es den Aortenblock der Anlage passieren. Dieser beinhaltet einen verstellbaren Widerstand, bestehend aus einer Teflon-Membran, Manometer und Druckspritze, zum Einstellen des konstanten Perfusionsdruckes von 70 mmHg. Mittels diese Perfusionsvariante wird den Koronargefäßen die Fähigkeit der Autoregulation des Tonus gelassen, welche immens wichtig ist für Ischämie-Reperfusionsexperimente wie diese (Liao et al., 2012). Des Weiteren befinden sich im Aortenblock eine Blasenfalle, ein Absperrhahn zum Einstellen des Ischämie- bzw. (Re-)Perfusionszustandes und Zugänge zum Zuführen der Kardioplegielösung (s.u.), bzw. zur Entnahme präkardialer Perfusatproben.

Nach dem Aortenblock erreicht das Perfusat das an der Aortenkanüle aufgehängte Rattenherz und die Koronargefäße werden perfundiert. Über den Sinus coronarius sammelt sich das Perfusat im rechten Vorhof und kann über die Öffnungen der Präparation abtropfen. Anschließend ist die Entnahme postkardialer Proben möglich und das Perfusat gelangt mittels Schlauch-Rollerpumpen-System wieder zum Perfusatbehälter. Ist der Absperrhahn zugedreht, existiert ein Rückfuhr-Bypass im Aortenblock.

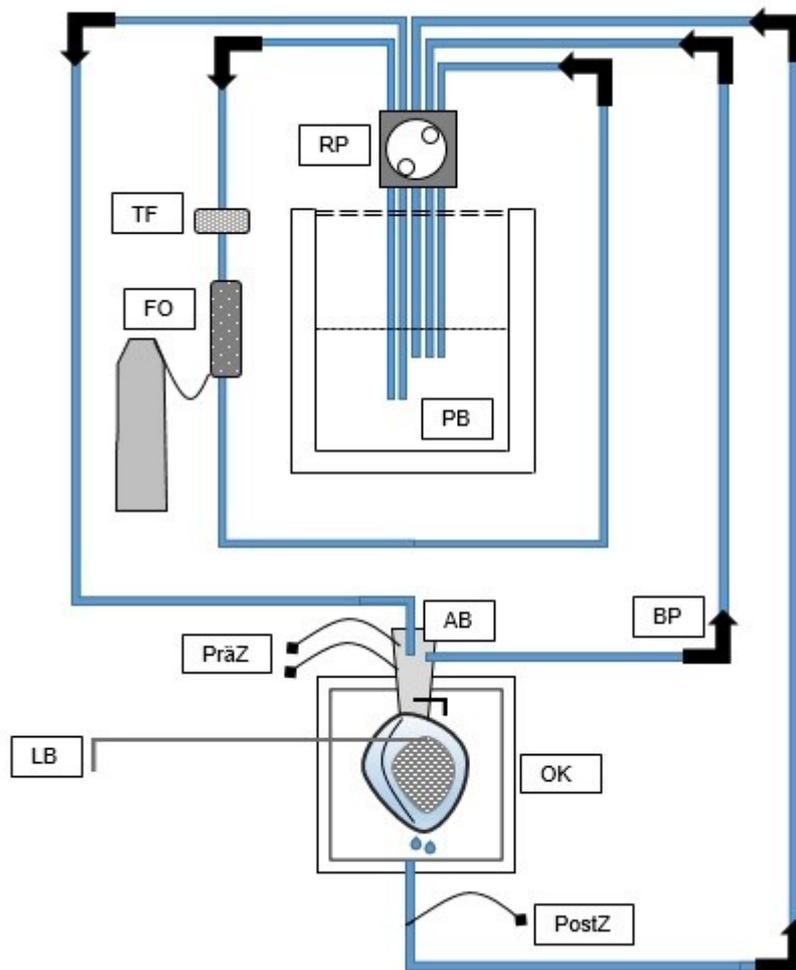


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Langendorff-Apparates. AB = Aortenblock, BP = Bypass bei geschlossenem Sperrhahn, FO = Fibrinogen-Generator mit Carbogen-Zufuhr, LB = Latexballon zur Druckmessung, OK = Organkammer, PB = Perfusatbehälter, PräZ = präkardiale Zugänge zur Probenentnahme und Kardioplegie-Zugabe, PostZ = postkardialer Zugang, RP = Rollerpumpe, TF = Transfusionsfilter

### 3.2.2 Erythrozyten-Perfusat

Bei dem verwendeten Erythrozyten-Perfusat handelt es sich um eine 1:1 Mischung eines bovinen Erythrozyten-Konzentrates mit einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer. Der Nachteil der aufwendigen Herstellung des Erythrozyten-Perfusates wird durch deutliche Vorteile gegenüber einer Elektrolyt-Lösung als Langendorff-Perfusat überwogen. So werden durch die physiologischere Zusammensetzung des Erythrozyten-Perfusats weniger Ödeme und eine stabilere Perfusionsphase erzielt. Dadurch beträgt der Verlust der Myokardfunktion nur noch ca. 5% pro Stunde (Sutherland und Hearse, 2000).

#### 3.2.2.1 Ansetzen der Puffer-Lösung

Die Puffer-Lösung wurde stets in größeren Mengen auf Vorrat angesetzt. Zunächst wurden in 2,5 l destilliertem Wasser 20,25 g NaCl und 8,1 g Glucose gelöst und folgend diese Lösung über eine Fritte mit Carbogen begast. Anschließend wurden weitere 505 ml destilliertes Wasser mit 6,8 g NaHCO<sub>3</sub> angesetzt und der ersten Lösung hinzugefügt. Die Carbogen-Begasung blieb weiterhin erhalten. Des Weiteren wurden der Lösung je 50 ml CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O- (149,37 mM), KCl- (231,36 mM), MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O- (77,49 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- (78,63 mM) und EDTA · 2 Na · 2 H<sub>2</sub>O-Lösung (32,80 mM) beigemischt. Danach erfolgte bei fortlaufender Begasung noch eine Filtrierung durch eine Membran mit einer Porengröße von 1,2 µm und die Abfüllung in Vorratsflaschen. Diese wurden bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 3.2.2.2 Aufbereitung des Rinderblutes

Wöchentlich erfolgte die Abholung von frischem Rinderblut vom Schlachthof und dessen Aufbereitung. Um die Koagulation des Blutes zu vermeiden, wurde 1 l des Blutes mit 1,5 ml Heparin-Natrium-25000 versetzt. Die Aufbereitung des Blutes bestand aus folgenden Schritten: (1) 5 min Zentrifugieren mit 1500 x g bei 4 °C und ohne Bremse, (2) anschließend Absaugen und Verwerfen des Überstandes, (3) danach Waschen des Erythrozyten-Konzentrates mit 0,9%iger NaCl-Lösung mit 2 Wiederholungen (Auffüllen des Behälters mit der NaCl-Lösung und Wiederholung der Schritte (2) und (3)). Zur Lagerung wurde das Erythrozyten-Konzentrat 1:1 mit 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt, pro 500 ml mit 15 mg Gentamycin versetzt und daraufhin über einen Transfusionsfilter mit 40 µm Porengröße in Vorratsflaschen abgefüllt. Gelagert wurde das Erythrozyten-Konzentrat maximal 1,5 Wochen im Kühlschrank bei 8 °C.

### 3.2.2.3 Ansetzen des Erythrozyten-Perfusats

Das Perfusat der Untersuchungsreihe wurde stets direkt vor dem Versuchsstart angesetzt. Hierfür wurden zunächst ca. 500 ml des Erythrozyten-NaCl-Gemisches gemäß den 3 Schritten der Blutaufbereitung (s.o.) bearbeitet. Der einzige Unterschied hierbei war, dass anstatt 0,9%iger NaCl-Lösung die angesetzte Puffer-Lösung verwendet wurde. Zeitgleich wurden 250 ml der Puffer-Lösung mit 5 g bovinem Serumalbumin (BSA) und 1 I.E. Insulin angesetzt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des bovinen Serumalbumins kam ein Magnetrührer zum Vermischen zum Einsatz. Außerdem musste eine Bicarbonat-Lösung, bestehend aus 1,3 g  $\text{NaHCO}_3$  und 100 ml Puffer-Lösung angesetzt werden, welche der pH-Korrektur des Perfusates diente. Nach erfolgreicher Durchführung der genannten Schritte, wurden nun das gewaschene Erythrozyten-Konzentrat 1:1 mit dem angesetzten BSA-Puffer im Perfusatbehälter vermischt und zusätzlich 10-15 ml Bicarbonat-Lösung hinzugegeben. So erreichte man einen Baseline-Hämoglobin-Wert von  $6,6 \pm 1,2$  g/dl im Perfusat. Durch die Begasung mit Carbogen stellte sich nach ungefähr 30 min der gewünschte pH-Wert von 7,33-7,40 ein.

### 3.2.3 Stabilisierungsphase

Nach durchgeführter Konditionierung bzw. Scheinkonditionierung, Herzentnahme, Präparation und Aufhängung in den Langendorff-Apparat erfolgte zunächst eine Stabilisierungsphase des isolierten Herzens. Sie stellt die Zwischenphase von der Herzaufhängung bis zum offiziellen Protokollbeginn des Langendorff-Versuches dar und nahm eine Zeit von  $15,4 \pm 3,2$  min in Anspruch. Zweck dieser Phase war die Stabilisierung des Herzens nach Stressexposition durch die Entnahme aus dem Organismus und die Anpassung an die veränderten Druckverhältnisse und das veränderte Perfusat.

Das Herz galt als stabil, sobald der LVDP-Wert eine konstante Tendenz aufwies. Bei Erreichen dieses Zustandes („*steady state*“) wurden für 30 s die vom Rattenherz abgehenden Perfusattropfen gezählt und zur Volumenbestimmung aufgefangen. Hochgerechnet auf eine Minute konnte somit der Baseline-Wert des koronaren Flusses (CF) berechnet werden. Anschließend wurde die Organkammer zum Schutz und Temperierung geschlossen. Eine CF-Bestimmung zu späteren Zeitpunkten wurde durch erneutes Abzählen der Tropfen und Berechnung mittels Dreisatz durchgeführt. Dies geschah unter der Annahme eines konstanten Tropfenvolumens. Es ermöglichte die

Wahrung der Umgebungsbedingungen des Herzens, da die Organkammer nicht erneut eröffnet werden musste.

Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt des „*steady state*“ die erste Entnahme der prä- und postkardialen Perfusatprobe (ca. 5 ml) durchgeführt.

### **3.3 Blutkardioplegie nach Calafiore**

Die Anwendung der Blutkardioplegie nach Calafiore (BCP) in 2 Versuchssarmen erlaubt den direkten Vergleich dieses fest etablierten myokardprotektiven Verfahrens mit dem noch nicht im Klinikalltag etabliertem RIPC-Verfahren.

Unter Kardioplegie versteht man den „in situ Stillstand des Herzens“ (Berchtold et al., 2008). Bretschneider et al. ordneten außerdem alle Maßnahmen, welche die Widerstandsfähigkeit des Herzens gegenüber einer kompletten Ischämie verbessern diesem Begriff zu (Bretschneider et al., 1984). Somit dienen kardioplegische Lösungen ebenfalls der Myokardprotektion. Im Gegensatz zu RIPC werden sie jedoch schon seit langem routinemäßig im Klinikalltag eingesetzt. Ihre Wirkung einen diastolischen Herzstillstand zu induzieren, beruht bei den meisten kardioplegischen Lösungen auf deren hohem Kaliumanteil, welcher zu einer Depolarisation der Kardiomyozyten führt. Diese elektrische und mechanische Inaktivität führt zu einer starken Reduktion der myokardialen Stoffwechselprozesse und verzögert somit das Einsetzen von irreversiblen Ischämieschäden (Siewert und Stein, 2012).

Laut Cordell war es die Forschungsgruppe um Will Camp Sealy, welche in den 1950er Jahren den Begriff der „Kardioplegie“ erstmalig benutzten und etablierten. Sie arbeiteten dabei mit einer Lösung, welche mit Kalium, Magnesium und Neostigmin angereichert war, um in Kombination mit Hypothermie einen Herzstillstand zu erzeugen (Cordell, 1995).

Die in dieser Arbeit verwendete kardioplegische Lösung entspricht der Blutkardioplegie nach Calafiore, wobei statt Blut das Erythrozyten-Perfusat verwendet wurde. Den Grundstein für den „Durchbruch der Blutkardioplegie“, wie ihn Podesser bezeichnet, legten Follette und Buckberg Ende der 1970er Jahre mit ihrer Forschung (Follette et al., 1978; Podesser et al., 1996). Die besondere Stellung der Blutkardioplegie ist darin begründet, dass das Blut bereits über ein Puffersystem verfügt und die Erythrozyten sowohl Sauerstoff transportieren, als auch Radikale abfangen (Podesser et al., 1996). 1994 veröffentlichten Calafiore et al. eine Publikation über eine antegrade, intermittierende, warme, hyperkaliämische Blutkardioplegie. Diese

verglichen sie mit einer antegraden, intermittierenden, kalten, kristallinen Kardioplegie, wobei sie signifikante Vorteile bezüglich Mortalität und Morbidität zugunsten ihrer Blutkardioplegie feststellten (Calafiore et al., 1994). Auf dieser Methode aufbauend, führten 1998 Caputo et al. Untersuchungen durch, bei denen sie die Blutkardioplegie noch durch Magnesium-Zugabe modifizierten. Dadurch erzielten sie eine Verbesserung des Substrathaushaltes in der frühen Reperfusionphase (Caputo et al., 1998). Diese modifizierte Kardioplegie-Methode stellt die Grundlage für die heutige etablierte Anwendung der Blutkardioplegie nach Calafiore. Diese weitläufige Etablierung war ausschlaggebend für den Entschluss der Anwendung in dieser Arbeit. So kam die Calafiore-Kardioplegie in 2 Versuchssarmen zum Einsatz (s.u.). Hierbei wurden zunächst 10 ml KCl (14,9%) mit 2 ml  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  gemischt und auf 37 °C erwärmt. Für die initiale Kardioplegie-Zugabe wurden 20 ml des Erythrozyten-Perfusates mit 150 µl der angesetzten Elektrolytlösung in die Perfusorspritze gegeben. Zudem wurde eine Bolusgabe von 150 µl der Elektrolytlösung vorbereitet, welche zu Beginn der ersten Kardioplegie-Gabe über einen Dreiwegehahn zusätzlich appliziert wurde. Via Perfusor wurde die eigentliche Blutkardioplegie dem Langendorff-System auf Höhe des Aortenblocks hinzugegeben. Diese Perfusion erfolgte über 2 min bei 1,3facher Perfusionsgeschwindigkeit (bezogen auf dem in „*steady state*“ gemessenen koronaren Fluss).

Für die nachfolgenden Kardioplegie-Gaben wurde eine neue Calafiore-Lösung mit 42 ml Perfusat und 225 µl Elektrolyt-Lösung angesetzt. Nach der Initialgabe erfolgte alle 20 min eine Perfusion mit der neu angesetzten Kardioplegie über 2 min mit dem im „*steady state*“ ermittelten Perfusionsfluss.

### **3.4 Versuchsgruppen**

Die Versuchsreihen teilten sich in 6 Gruppen auf. Davon erhielten 2 Gruppen die ischämische Fernkonditionierung (RIPC) und 4 die Scheinkonditionierung (*Sham*). Im Langendorff-Versuch unterteilten sich diese nochmals in 2 Ischämie/Reperfusiongruppen, 2 Perfusiongruppen und 2 Blutkardioplegiegruppen.

#### **3.4.1 (1) RIPC + Ischämie/Reperfusion**

In diesem Versuchsarm erfuhren die Ratten die ischämische Fernkonditionierung vor der Organentnahme. Nach erfolgter Stabilisierungsphase wurde der Absperrhahn im

Aortenblock der Anlage abgedreht und so eine globale Ischämie induziert. Diese wurde über 90 min aufrechterhalten. Im Anschluss wurde das Herz für weitere 90 min reperfundiert.

In der Reperfusionphase erfolgte nach 10 min und 90 min erneute prä- und postkardiale Entnahmen des Perfusates, sowie eine CF-Bestimmung. Der Zeitpunkt nach 10 min wurde dabei als Vergleichspunkt für den Start der Reperfusionphase erachtet, da in den ersten Minuten der unmittelbaren Reperfusion alle Herzparameter starken Schwankungen unterliegen.

### 3.4.2 (2) Sham + Ischämie/Reperfusion

Der Versuchsablauf erfolgte identisch zu (1), jedoch wurde bei den Ratten dieses Versuchsaumes lediglich eine Scheinkonditionierung durchgeführt.

Dieser Versuchsarm stellt die „worst case“-Kontrolle dar: trotz 90-minütiger globaler Ischämie wurde kein Myokardprotektionsverfahren angewendet.

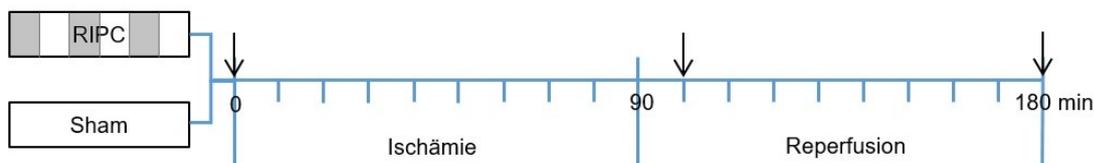


Abbildung 2: Versuchsprotokoll der Gruppen (1) und (2). Pfeil →: Zeitpunkt der Probenentnahme und CF-Bestimmung.

### 3.4.3 (3) RIPC + Perfusion

Nach ischämischer Vorkonditionierung, Organentnahme und Stabilisierungsphase erfolgte lediglich eine Perfusionsphase über 90 min mit analoger Probenentnahme und CF-Bestimmung zur Reperfusionphase von (1) und (2).

### 3.4.4 (4) Sham + Perfusion

Das Protokoll dieses Versuchsaumes entsprach dem von Gruppe (3), jedoch nur mit Scheinkonditionierung im Vorfeld.

Ohne Ischämiephase oder andere Eingriffe stellt diese Gruppe die „no damage“-Kontrolle dar.

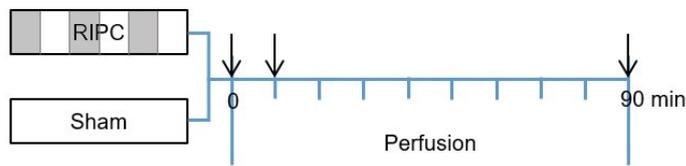


Abbildung 3: Versuchsprotokoll der Gruppen (3) und (4). Pfeil →: Zeitpunkt der Probenentnahme und CF-Bestimmung.

### 3.4.5 (5) Sham + Blutkardioplegie nach Calafiore mit RNase 1

Diese Versuchsgruppe wurde lediglich Scheinkonditioniert. Nach der Stabilisierung des Herzens erfolgte ebenfalls eine Ischämiephase. Zu Beginn dieser wurde unmittelbar die Initialgabe BCP und der Elektrolytbolus via Perfusor appliziert. Vier weitere BCP-Gaben wurden im Abstand von 20 min dem Langendorff-System injiziert. Die BCP-Ansetzung erfolgte in diesem Versuchsarm nach o.g. Protokoll mit zusätzlich 1,0 µg/ml boviner RNase A, um einen möglichen Zusatznutzen zu überprüfen. Bovine RNase A und humane RNase 1 sind zu 70% homolog zueinander (Beintema et al., 1984).

Die Netto-Ischämiezeit betrug wie in (1) und (2) 90 min. Jedoch wurden die 2 min BCP-Zufuhr jeweils exklusiv dazu gerechnet, so dass die Bruttozeit der Ischämie 100 min betrug.

10 min nach der letzten BCP-Gabe wurde ebenfalls eine 90-minütige Reperfusionphase begonnen, in welcher die Probenentnahmen und CF-Bestimmungen gemäß den anderen Protokollen erfolgte.

Um mögliche Vermischungseffekte der Kardioplegielösung mit dem zirkulierenden Perfusat während der Reperfusionphase auszuschließen, wurde die vom Herzen abtropfende Blutkardioplegie verworfen.

### 3.4.6 (6) Sham + Blutkardioplegie nach Calafiore

Dieser Versuchsarm verlief nach demselben Protokoll wie (5). Die Blutkardioplegie nach Calafiore wurde jedoch nicht mit RNase versetzt.

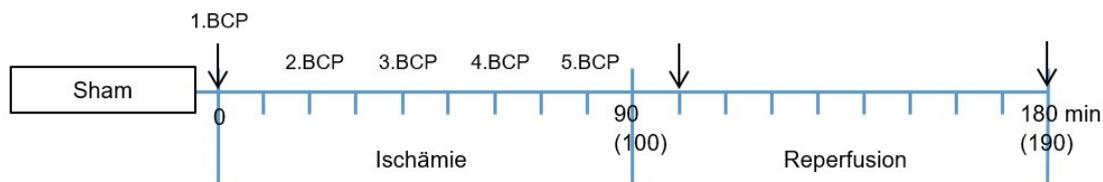


Abbildung 4: Versuchsprotokoll der Gruppen (5) und (6). Pfeil →: Zeitpunkt der Probenentnahme und CF-Bestimmung.

### 3.5 Datenerfassung physiologischer Parameter

Die heutigen Langendorff-Apparate ermöglichen eine direkte, zeitgleiche, digitale Aufzeichnung physiologischer Parameter. Dafür sind spezielle Messumwandler/Transducer, Brückenverstärker und die HSE Isoheart Software von Nöten. Somit erhält man eine kontinuierliche Datenerfassung auf einem Computer.

Mithilfe des Latexballons, welcher nach dem Anhängen des Herzens in den linken Ventrikel geschoben wurde, konnten die Herzfrequenz, systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck sowie die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit des linken Ventrikels gemessen werden. Grundlage für ein erfolgreiches Messen der Parameter waren die richtige Größe des Ballons (Größe 5/6) und ein luftblasenfreies Befüllen mit destilliertem Wasser, um einen enddiastolischen Druck von 10-15 mmHg einstellen zu können. Diese Bedingungen erfüllten den Zweck, dass sich der Latexballon der Ventrikelwand genau anpasste und somit auch dessen Kontraktionen.

Aus der Differenz des systolischen und diastolischen linksventrikulären Drucks wurde der „left ventricular developed pressure“ (LVDP) berechnet. Dieser dient als Maß für die Herzkraft (Dhein, 2005).

Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit des linken Ventrikels ( $dLVP/dt_{max}$ ) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ( $dLVP/dt_{min}$ ) werden berechnet über die erste Ableitung des LVDP nach der Zeit. Die Werte des  $dLVP/dt_{max}$  können als Maß für die Inotropie angesehen werden. Sie beschreiben daher die systolische Herzfunktion. Zur Beschreibung der diastolischen Herzfunktion dient der  $dLVP/dt_{min}$ , da er ein Maß für die Lusitropie des Herzens ist (Dhein, 2005).

Zwei weitere wichtige Messgrößen sind der koronare Perfusionsdruck (CPP) und der koronare Fluss (CF). Anhand dieser Parameter lässt sich eine Aussage über den

Gefäßwiderstand und somit über die Autoregulation des Gefäßtonus der Koronararterien treffen. Der Gefäßwiderstand lässt sich zum einen mithilfe des Ohm'schen Gesetzes beschreiben:

$$R = \frac{\Delta P}{\phi}$$

*R = Widerstand,  $\Delta P$  = Druckdifferenz = CPP und  $\phi$  = koronarer Fluss*

Zum anderen lässt sich auch das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz anwenden:

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

*$\eta$  = Viskosität des Perfusates,  $L$  = Länge des Gefäßes und  $r$  = Radius des Gefäßes*

Aufgrund der druckkonstanten Perfusion (s.o.) ergibt sich aus der ersten Gleichung eine indirekte Proportionalität des Gefäßwiderstandes und des koronaren Flusses:

$$R \sim \frac{1}{\phi}$$

Vernachlässigt man in der zweiten Gleichung alle konstanten (als konstant angenommenen) Variablen, so erhält man ebenfalls ein indirektes Proportionalitätsverhältnis zwischen dem Gefäßwiderstand und der 4. Potenz des Gefäßradius:

$$R \sim \frac{1}{r^4}$$

Setzt man nun diese beiden Proportionalitätsverhältnisse gleich, ergibt sich folgende Beziehung:

$$\frac{1}{\phi} \sim \frac{1}{r^4} = \phi \sim r^4$$

Der koronare Fluss verhält sich proportional zur 4. Potenz des Gefäßradius. Dementsprechend lässt sich anhand der ermittelten Werte für den koronaren Fluss auf den Gefäßtonus schließen (Dhein, 2005).

Wie bereits erwähnt, wurde der CF durch Auszählen der Perfusattropfen ermittelt. Ein Flowmeter konnte aufgrund des Erythrozyten-Perfusates nicht angewendet werden.

Der CPP wurde manuell auf 70 mmHg eingestellt (s.o.) und zusätzlich ebenfalls mittels Software aufgezeichnet.

Weiterhin gibt es ein Messelement im Aortenblock zur Bestimmung der Perfusatemperatur. Diese wurde auch kontinuierlich erfasst.

### 3.6 Datenerfassung biochemischer Parameter

#### 3.6.1 Analyse des kardialen Metabolismus

Mithilfe eines BGA-Gerätes wurden die entnommenen prä- und postkardialen Perfusat-Proben zu den jeweiligen Zeitpunkten auf pH, pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> und cHb untersucht. Die präkardialen Proben entsprechen hierbei dem durch die Koronararterien fließenden arteriellen, oxygenierten Blut. Und die postkardialen Proben gleichen dem sich im Koronarsinus ansammelnden venösen, sauerstoffarmen Blut. Anhand dieser Daten konnte der myokardiale Sauerstoffverbrauch (M $\dot{V}$ O<sub>2</sub>) bestimmt werden:

$$M\dot{V}O_2 \left[ \frac{\text{ml O}_2}{\text{min}} \right] = (C_aO_2 \left[ \frac{\text{ml O}_2}{\text{dl}} \right] - C_vO_2 \left[ \frac{\text{ml O}_2}{\text{dl}} \right]) \cdot CF \left[ \frac{\text{ml}}{\text{min}} : 100 \right]$$

$$C_xO_2 \left[ \frac{\text{ml O}_2}{\text{dl}} \right] = cHb \left[ \frac{\text{g}}{\text{dl}} \right] \cdot 1,34 \frac{\text{ml O}_2}{\text{g}} \cdot S_xO_2 [\% : 100] + P_xO_2 [\text{mmHg}] \cdot 0,003 \frac{\text{ml O}_2}{\text{dl} \cdot \text{mmHg}}$$

$C_xO_2$  = Sauerstoffgehalt im Perfusat,  $cHb$  = Hämoglobin-Konzentration,  $S_xO_2$  = Sauerstoffsättigung im Perfusat,  $P_xO_2$  = Sauerstoffpartialdruck im Perfusat

Die in der Sauerstoffgehaltsformel verwendeten Konstanten stehen zum einen für die Hüfner-Zahl ( $1,34 \frac{\text{ml O}_2}{\text{g}}$ ), welche das maximale Sauerstoffvolumen angibt, welches von 1 g Hämoglobin gebunden werden kann. Zum anderen steht die zweite Konstante für die Löslichkeit von Sauerstoff in 37 °C warmem Blut (Gutierrez und Theodorou, 2012).

Weiterhin wurden die Perfusatproben mittels Laktat-Photometer auf deren Laktatkonzentration untersucht. Gemeinsam mit dem dazugehörigen, ermittelten koronaren Fluss wurde die myokardiale Laktatproduktion (M $\dot{n}$ Lac) mit folgender Formel berechnet:

$$M\dot{n}Lac \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = (cLac_{\text{ven}} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] - cLac_{\text{art}} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]) \cdot CF \left[ \frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

$cLac_x$  = Laktatkonzentration

Gemeinsam mit den Daten des myokardialen Sauerstoffverbrauchs lassen sich aus den arterio-venösen Unterschieden Rückschlüsse auf den Energieumsatz und Zellstoffwechsel der Kardiomyozyten schließen. Während der  $\dot{M}V_{O_2}$  Auskunft über den aeroben Metabolismus, sprich der Substratverwertung via Citratzyklus und Atmungskette gibt, dient der Laktatdatensatz als Indiz für einen anaeroben Metabolismus der Kardiomyozyten (Gutierrez und Theodorou, 2012). Eine Besonderheit des Herzens ist, dass es je nach Versorgungslage sowohl als Laktatkonsument, als auch als Laktatproduzent fungieren kann (Weiße, 2001).

Nach erfolgten Messungen wurden die Perfusatproben 20 min bei 4 °C und 1600 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und bei -80 °C zur Lagerung eingefroren.

### **3.6.2 Analyse der eRNA – RNase 1 – TNF- $\alpha$ – Achse**

#### *3.6.2.1 RNase-Aktivitätsbestimmung*

Die Messung der RNase-Aktivität basiert auf dem photometrischen Nachweis von Nukleotiden, welche durch die enzymatische Substratspaltung der Nukleinsäure Poly:C durch die vorhandenen RNasen entstanden sind. Grundlage dieser Durchführung ist die von Zimmermann et al. 1965 beschriebene Methode. So wurden in Triplikaten jeweils 50  $\mu$ l der Plasmaproben bzw. 1  $\mu$ l rekombinante bovine RNase A als Positivkontrolle mit RNase-Puffer auf 150  $\mu$ l aufgefüllt. Als Negativkontrollen wurden 150  $\mu$ l RNase-Puffer ohne Zusatz von RNase verwendet. Diese Ansätze wurden mit 100  $\mu$ l Poly:C (c = 1 mg/ml) vermengt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Proben mit 100  $\mu$ l Fettsäure-freiem BSA (c = 10 mg/ml) und 250  $\mu$ l einer Lösung aus 6% Perchlorsäure und 20 mM Lanthanchlorid versetzt und auf Eis für 15 min inkubiert. Dieser Schritt diente dem Ausfällen von unverdauter Poly:C. Danach erfolgte für weitere 15 min eine Zentrifugation der Proben bei 16000 x g und 4 °C. Mithilfe des Photometers wurde in den Überständen die Optische Dichte/Extinktion bei 260 nm gemessen, mit welcher die RNase-Aktivität anhand folgender Formel berechnet werden konnte:

$$\text{RNase-Aktivität } \left[ \frac{\text{U}}{\text{min}} \right] = \text{OD} \cdot F \cdot \frac{2,5}{t_{\text{ink}} [\text{min}]}$$

$$\text{OD} = \text{Optische Dichte}, F = \text{Faktor} = \frac{\text{Gesamtvolumen } [\mu\text{l}] = V(\text{Poly:C}) + V(\text{RNase-Puffer}) + V(\text{Probe})}{V(\text{Probe}) [\mu\text{l}]} = \frac{250 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}} = 5,$$

$t_{\text{ink}} = \text{Inkubationszeit} = 5 \text{ min}$

<b>RNase-Puffer</b>	
Tris	50 mM
NaCl	130 mM
EDTA	2 mM
Acetyliertes BSA	0,1 mg/ml
pH	8,0

*Tabelle 1: Zusammensetzung des RNase-Puffers*

### 3.6.2.2 RNA-Isolation und -Quantifikation

Um die RNA-Konzentration in den Plasmaproben bestimmen zu können musste die Gesamt-RNA zunächst von den restlichen Bestandteilen des Plasmas isoliert werden. Hierfür wurden 100  $\mu\text{l}$  der Plasmaproben mit 1  $\mu\text{l}$  Proteinase K und 400  $\mu\text{l}$  Gewebe- und Zell-Lyse-Lösung den Proben hinzugefügt und für 15 min bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Dies diente zur Lyse von ggf. noch vorhandenen Zellen in den Plasmaproben sowie der Proteolyse. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde den Proben je 450  $\mu\text{l}$  MPC Protein-Ausfällungsreagenz hinzugefügt und für 10 s gevortext. Danach erfolgten zwei Waschgänge, bei welchen die Proben bei 10000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurden und anschließend der Überstand vom Niederschlag getrennt wurde. Dem zweifach gewaschenen Überstand wurde als nächstes 600  $\mu\text{l}$  Isopropanol hinzugefügt und das Röhrchen ca. 30 Mal gewendet um eine vorsichtige Durchmischung und damit eine Ausfällung der RNA zu erreichen. Um die RNA zu pelletieren, wurden im nächsten Schritt die Proben erneut bei 10000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Überstehendes Isopropanol wurde abgegossen und stattdessen 500  $\mu\text{l}$  75%iges Ethanol zum Waschen hinzugefügt und erneut unter selben Bedingungen (s.o.) zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach letztem Vergießen des Überstandes, wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet, danach in 31  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert.

Zur fluorometrischen Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde das Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden 10 µl Probe bzw. Standardlösung mit 190 µl Arbeitslösung versetzt und für 10 s gevortext. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im Fluorometer gemessen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

### 3.6.2.3 *TNF- $\alpha$ -Bestimmung*

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration von Plasma- und Perfusatproben wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Hierfür wurde das Rat TNF alpha ELISA Ready-Set-Go®-Set (Affymetrix eBioscience) verwendet. Die Durchführung erfolgte exakt dem Protokoll des Herstellers.

Das Verfahren beruht dabei auf dem „Sandwich-Prinzip“. Dies bedeutet, dass TNF- $\alpha$  nachgewiesen wird indem es sowohl von einem „Fänger-Antikörper“ als auch von einem „Detektions-Antikörper“ (an verschiedenen Epitopen) gebunden wird. Dabei ist der „Fänger-Antikörper“ fest an eine Mikrotiterplatte gebunden und bindet wiederum spezifisch in der Probe vorhandenen TNF- $\alpha$ . Der in einem weiteren Schritt hinzugegebene zweite Antikörper bildet nun einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex aus. Die Konjugation des zweiten Antikörpers mit Biotin ermöglicht durch die weiteren Zugaben des Enzyms Avidin-HRP (horseradish peroxidase) und des Substrates Tetramethylbenzidin eine Farbreaktion, welche durch Phosphatsäure gestoppt wird und anschließend bei 450 nm photometrisch quantifiziert werden konnte. Die Absorptionsänderung ist hierbei proportional zur TNF- $\alpha$ -Konzentration (Key, 2007).

Wiederholte Waschvorgänge mit einem Waschpuffer aus 1x PBS, 0,05% TWEEN® 20 als Zwischenschritte ermöglichten das Auswaschen überschüssiger, nicht gebundener Antikörper und Substrate.

Vor der TNF- $\alpha$ -Messung wurde die Proteinkonzentration der Proben spektralphotometrisch bei 280 nm mithilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt, um alle Proben auf eine einheitliche, vergleichbare Konzentration anpassen zu können.

<b>1x PBS (Phosphate buffered saline)</b>	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
pH	7,4
Autoklaviert	

*Tabelle 2: Zusammensetzung von 1x PBS*

### **3.7 Elektronenmikroskopie und Stereologie**

Nach Beendigung der Langendorff-Versuche wurde der linke Ventrikel der isolierten Herzen vom Organ getrennt und immersionsfixiert in 1,5% Glutaraldehyd/ 1,5% Paraformaldehyd in 0,15 M HEPES-Puffer. Für die erfolgreiche Fixierung wurde das Gewebe für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die fixierten Proben wurden anschließend zur Vorbereitung für die transmissionselektronenmikroskopischen und stereologischen Analyse an das Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover) geschickt, wo sie von Herrn Prof. Dr. med. Christian Mühlfeld und Frau Dr. rer. nat. Julia Schipke bearbeitet wurden.

Nach dem dort angewandten Protokoll wurden die Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie in Osmiumtetroxid postfixiert, mit halbgesättigtem Uranylacetat kontrastiert, anschließend in aufsteigender Acetonreihe entwässert und in Epon eingebettet (Schipke et al., 2015). Aus den so entstandenen Eponblöckchen wurden mittels Ultramikrotom Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 70 nm geschnitten, welche elektronenmikroskopisch untersucht werden konnten. Die Probenaufarbeitung und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgten nach dem SURS-Prinzip („systemic uniform random sampling“) (Mayhew, 1991). Dies ermöglichte allen Probenabschnitten die Chance, in die Analyse einbezogen zu werden.

Die stereologische Auswertung der Schnitte dient der Übertragung der zweidimensionalen Informationen in Auskünfte über die Dreidimensionalität des untersuchten Gewebes (Gundersen et al., 1988). Hierfür wurde auf die angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder ein Punkteraster projiziert und alle Punkte, die auf der zu ermittelnden Zellstruktur lagen, ausgezählt (Weibel, 1979). Konkret wurden Punkte auf Myofibrillen (P(Mf)), Mitochondrien (P(Mi)), Zellkerne (P(Nuc)) und

Sarkoplasma (P(SP)) gezählt. Die Summe der Punkte auf den Einzelkompartimenten wurde als Gesamtpunktwert für die Myozyten (P(Myo)) berechnet und dient als Maß für das Referenzvolumen. Mithilfe dieser Werte konnte die Volumendichte  $V_V$  der jeweiligen Zellkompartimente errechnet werden, also der Volumenanteil einer Struktur am Referenzraum der Kardiomyozyten:

$$V_V(x/Myo) [\cdot 100\%] = \frac{P(x)}{P(Myo)}$$

$x = Mf/Mi/Nuc/SP$

(Weibel, 1979; Mühlfeld et al., 2006)

Außerdem wurde die Oberflächendichte der Mitochondrien ( $S_V(Mi/Myo)$ ) bestimmt. Hierzu nutzte man ein Linienraster und zählte die Schnittpunkte der Linien mit den Mitochondrien (Intersections  $I(Mi)$ ).  $P(Myo)$  ergab sich aus der Anzahl an Endpunkten der Testlinien, die sich auf Myozyten befanden. Gewertet wurde jedoch nur ein Punkt pro Linie.

$$S_V(Mi/Myo) \left[ \frac{1}{\mu m} \right] = \frac{2 \cdot I(Mi)}{P(Myo) \cdot L [\mu m]}$$

$L = \text{Länge einer Testlinie} = 1,6 \mu m$

(Mühlfeld et al., 2010)

Anhand der so erlangten Werte konnten anschließend zwei Parameter zur Beurteilung des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens erhoben werden. Zum einen der CEI (cellular edema index), welcher eine Aussage über die Myozytenschwellung liefert (DiBona und Powell, 1980):

$$CEI = V_V(Mi/Myo) + \frac{V_V(SP/Myo)}{V_V(Mf/Myo)}$$

(Mühlfeld et al., 2006)

Zum anderen aber gibt das Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Mitochondrien (V/S-Ratio(Mi)) Aufschluss über die Ischämie-bedingte Mitochondrienschwellung (Schmiedl et al., 1990):

$$V/S\text{-Ratio}(Mi) [\mu m] = \frac{V_V(Mi/Myo)}{S_V(Mi/Myo) \left[ \frac{1}{\mu m} \right]}$$

Beide Parameter steigen mit dem Grad der ischämischen Herzschädigung (Mühlfeld et al., 2006; Murry et al., 1990; Gorge et al., 1991).

### **3.8 Statistik**

Alle vorliegenden Daten wurden zur statistischen Analyse mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 (Version 5.01) ausgewertet.

Der statistische Unterschied von 2 Gruppen wurde dabei mittels Zweistichproben-t-Test überprüft. In Abhängigkeit von vorhandener Normalverteilung, wurde der Vergleich von mehr als 2 Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Analysis of variance = ANOVA) und anschließendem Tukey's Post-hoc-Test oder Kruskal-Wallis-Statistik mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test durchgeführt. Die Normalverteilung wurde durch den D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test überprüft.

Als signifikant wurde ein Wert von  $p \leq 0,05$  gewertet.

Die Daten der Grafiken sind als Mittelwerte (MW) + Standardfehler (SF) angegeben.

#### **4 Ergebnisse**

Sowohl die Werte für die Leistungsparameter als auch die des Metabolismus wurden für alle Versuchssarme zu 3 verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen. Der „Baseline“-Wert entspricht dem Ausgangswert zum Zeitpunkt nach der Stabilisierungsphase und vor der Ischämie. Um individuelle und initiale Unterschiede zwischen den Herzen zu korrigieren, wurden alle Folgewerte zur Baseline in Prozent normiert.

Der Zeitpunkt „Start Reperfusion“ entspricht auf der Zeitachse bereits erfolgten 10 min Reperfusion. Diese Zeitkarenz ist der Tatsache geschuldet, dass das Herz eine erneute Stabilisierungsphase zur Normalisierung der Herzfunktion benötigt.

Als letzter Vergleichspunkt dienen die gemessenen Endwerte nach 90 min Reperfusion.

## 4.1 Leistungsparameter

### 4.1.1 LVDP

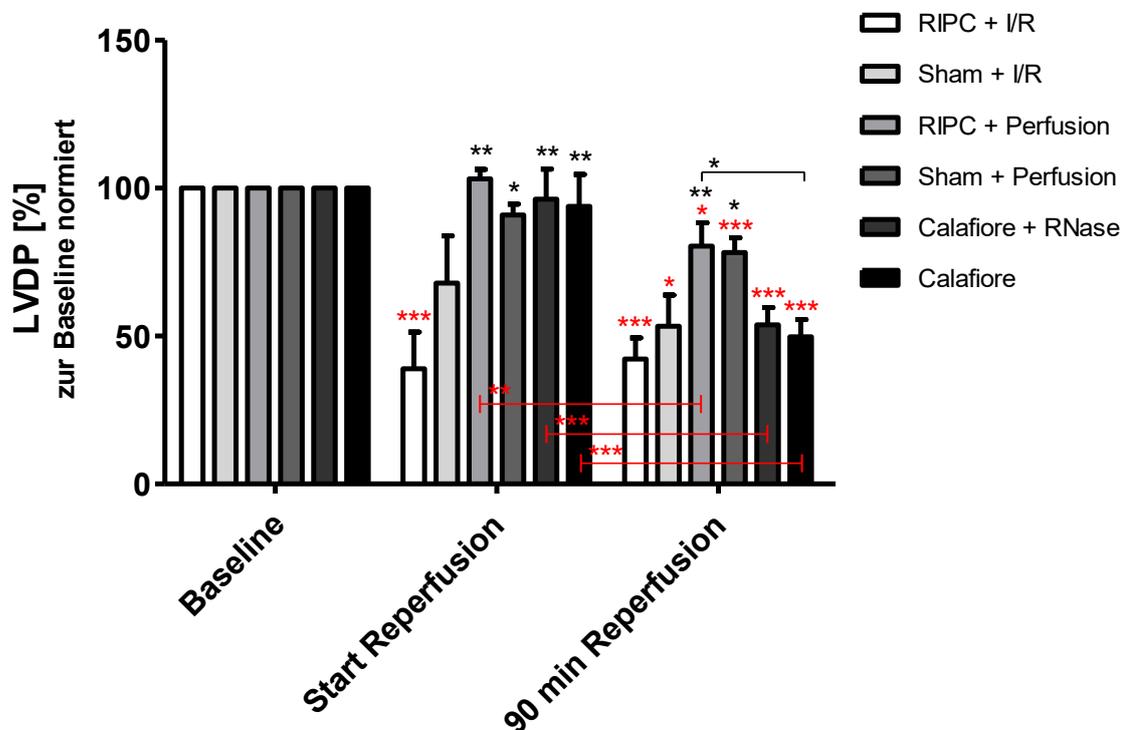


Abbildung 5: Vergleich des LVDP der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF,  $n = 8$  ( $n = 9$  „RIPC + I/R“ und „Calafiore“),  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ , einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RIPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

Im Vergleich des LVDP, als Maß für die Herzkraft, ist festzustellen, dass nach 90 min Reperfusion (mit oder ohne Ischämiephase) alle Gruppen eine signifikante Verschlechterung zur Baseline aufweisen. Im Gruppenvergleich weisen zum Endzeitpunkt die „no damage“-Kontrollen (= Perfusionsgruppen) signifikant bessere Werte auf als die Gruppe „RIPC + I/R“.

Zum Zeitpunkt der Reperfusionsfrühphase fällt auf, dass „RIPC + I/R“ als einzige Gruppe bereits eine signifikante Verschlechterung zur Baseline aufweist und ebenfalls zu den „no damage“-Kontrollen im Gruppenvergleich. Auch die Calafiore-Gruppen zeigen einen signifikanten Vorteil gegenüber dieser Gruppe.

Aus dieser Abbildung wird weiterhin erkenntlich, dass die RIPC-Gruppen gegenüber ihren Sham-Gruppen nicht besser sind.

#### 4.1.2 dLVP/dt<sub>max</sub>

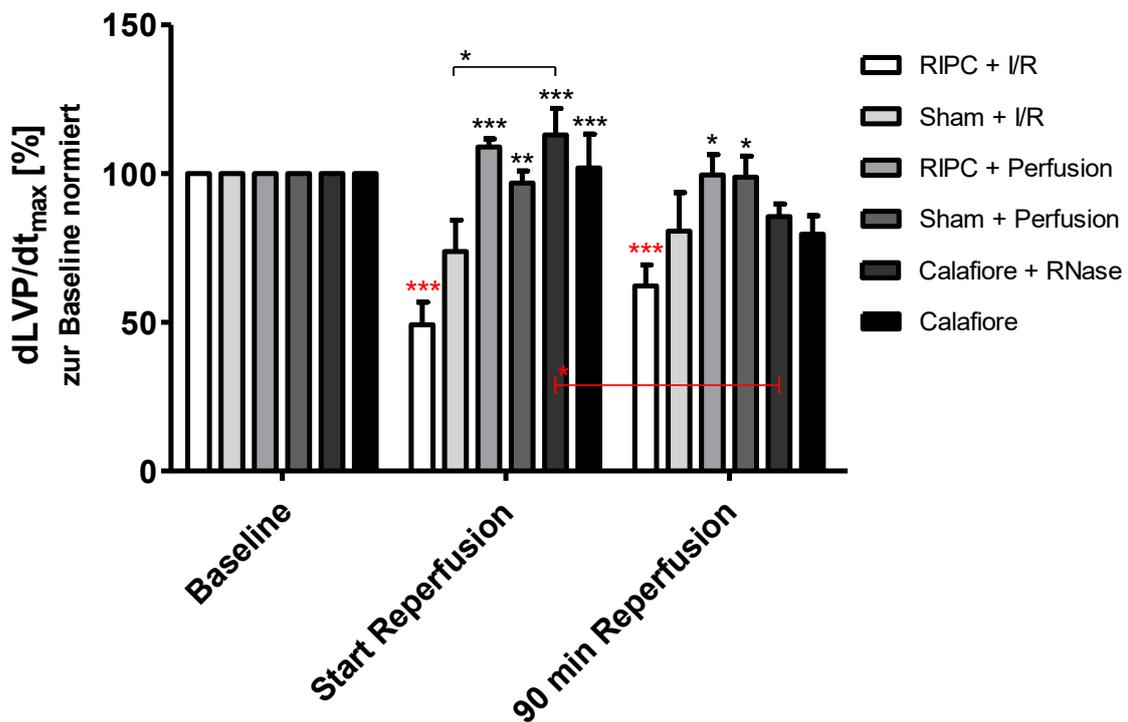


Abbildung 6: Vergleich des dLVP/dt<sub>max</sub> der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF, n = 8 (n = 9 „RPC + I/R“ und „Calafiore“), \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001, einfaktorielles ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

Die isolierten Herzen des „RPC + I/R“-Versuchsarms bilden die schlechteste Gruppe bzgl. des dLVP/dt<sub>max</sub>, dem Maß für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit. So sind sie die einzige Gruppe, welche sowohl zu Beginn der Reperfusion als auch zum Endpunkt sich signifikant zur Baseline verschlechtert hat. Zwar findet sich kein relevanter Unterschied zum Sham-Pendant zu beiden Zeitpunkten, aber in der Frühphase der Reperfusion weisen die anderen Gruppen einen besseren Wert auf und nach 90 min Reperfusion sind erneut beide Perfusions-Gruppen signifikant besser.

#### 4.1.3 dLVP/dt<sub>min</sub>

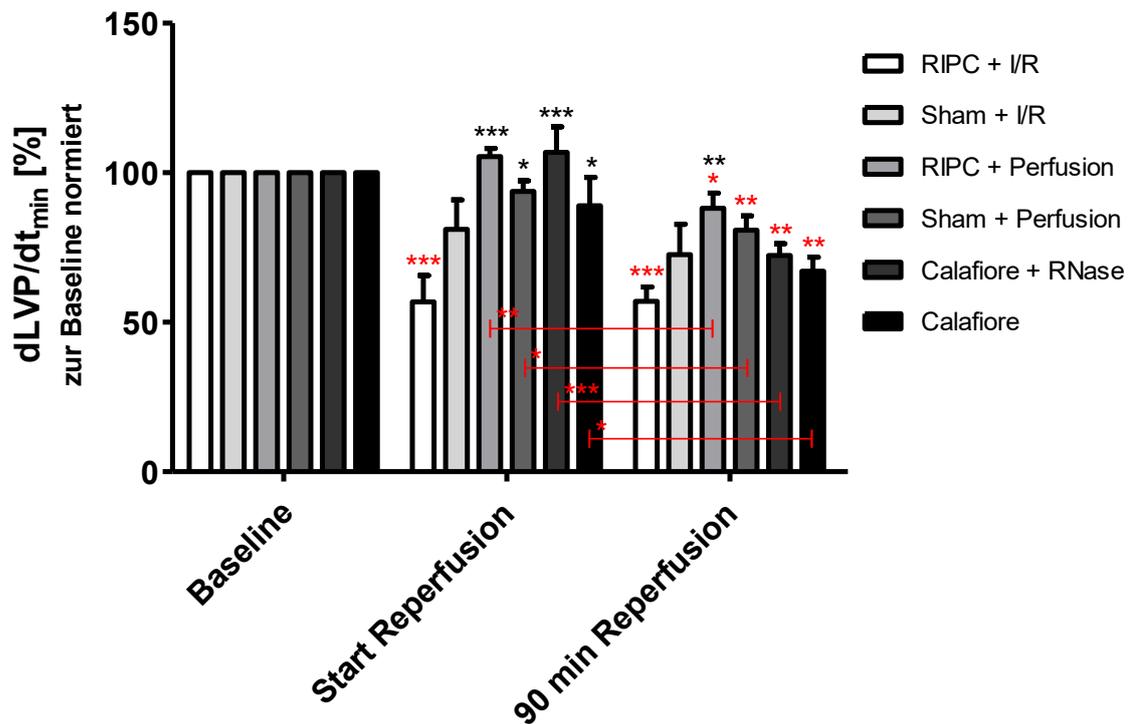


Abbildung 7: Vergleich des dLVP/dt<sub>min</sub> der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF, n = 8 (n = 9 „RIPC + I/R“ und „Calafiore“), \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001, einfaktorielles ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RIPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

Ein ähnliches Bild bzgl. der ersten beiden Parameter ergibt sich auch bei der Betrachtung der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, des dLVP/dt<sub>min</sub>. So zeigen in der Frühphase der Reperfusion wieder die Perfusions- und die Calafiore-Gruppen einen signifikant besseren Wert als die „RIPC + I/R“-Gruppe. Nach 90 min Reperfusion ist dieser Vorteil nur noch bei der dazugehörigen „no damage“-Kontrolle zu sehen. Weiterhin zeigt die „RIPC + I/R“-Gruppe erneut zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Verschlechterung zur Baseline.

Es lassen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den RIPC-Gruppen und den Sham-Gruppen, sowie zwischen Calafiore mit RNase und ohne RNase feststellen.

#### 4.1.4 CF

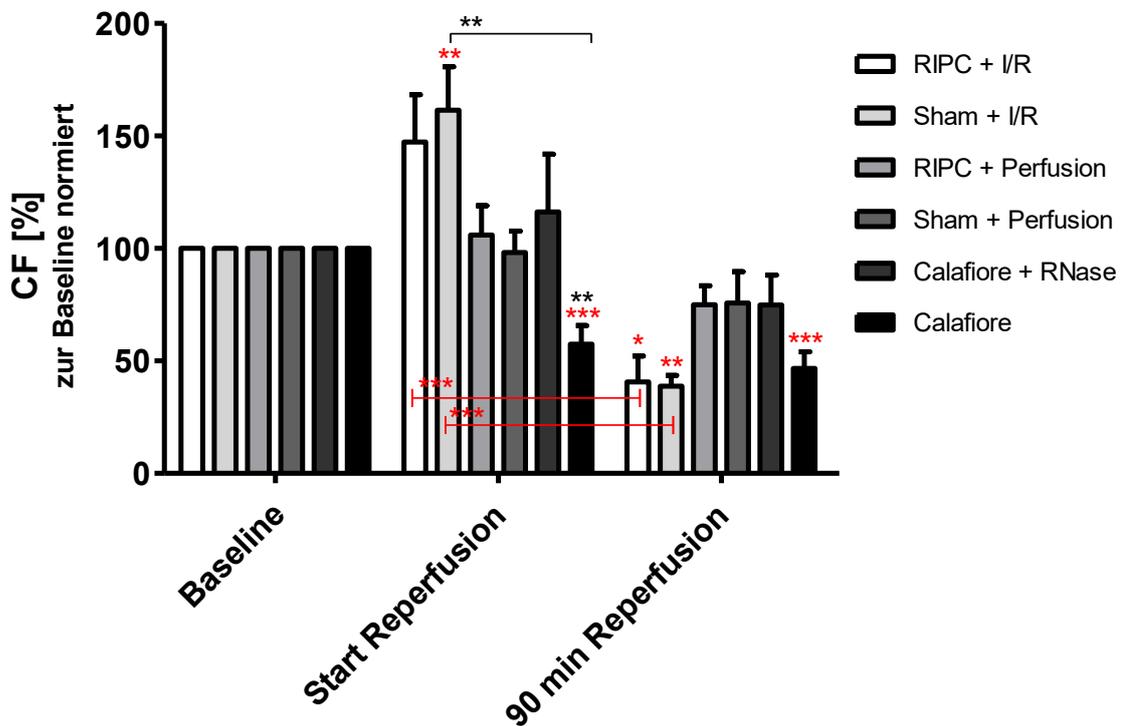


Abbildung 8: Vergleich des CF der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF,  $n = 8$  ( $n = 9$  „RIPC + I/R“ und „Calafiore“),  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ , einfaktorielles ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RIPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

Bei der Beurteilung des koronaren Flusses fällt auf, dass es nur in der Frühphase relevante Unterschiede zwischen den Versuchsarmen gibt. So unterscheidet sich lediglich die „Calafiore“-Gruppe signifikant von den Ischämie-Gruppen.

Im zeitlichen Verlauf ist zu vermerken, dass die Ischämie-Gruppen zu Beginn der Reperfusion einen erhöhten CF aufweisen (mit signifikantem Unterschied zur Baseline bei „Sham + I/R“), aber nach 90 min beide Gruppen sich signifikant sowohl zur Baseline, als auch zum Start der Reperfusion verschlechtert haben. Interessanter Weise bleibt der koronare Fluss bei den Perfusions-Gruppen und bei „Calafiore + RNase“ ohne relevante Veränderung im Verlaufe des gesamten Langendorff-Versuches.

## 4.2 Metabolismus

### 4.2.1 Sauerstoffverbrauch

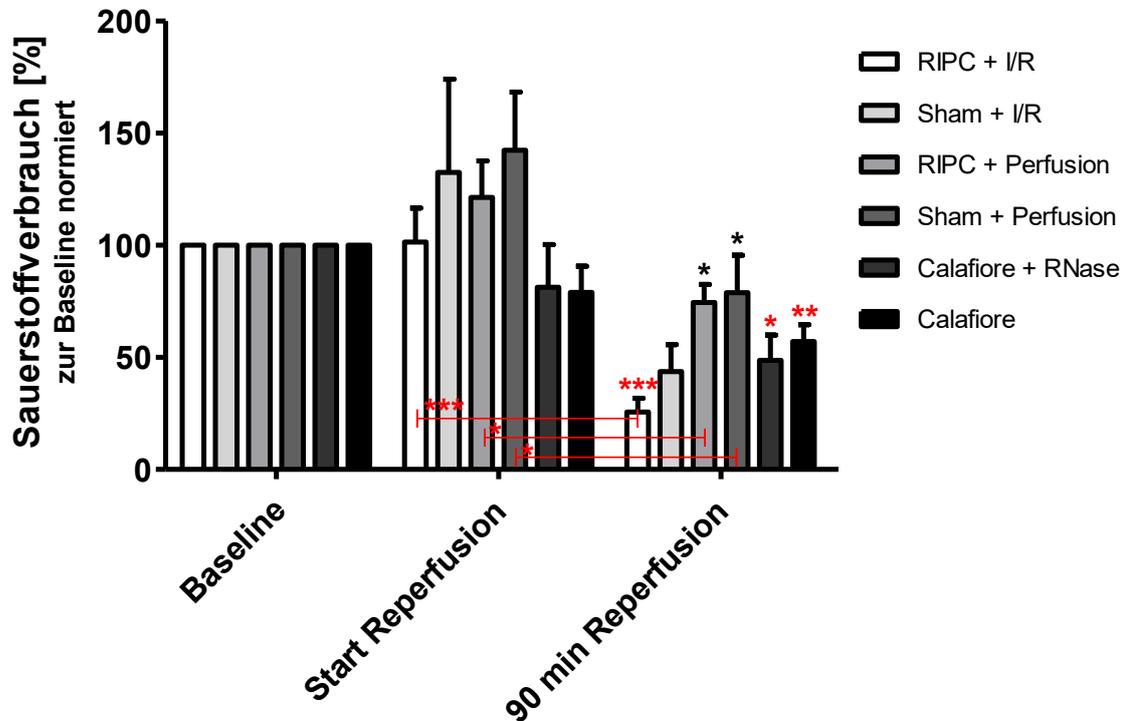


Abbildung 9: Vergleich des Sauerstoffverbrauchs der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF,  $n = 8$  ( $n = 9$  „Calafiore“),  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ , einfaktorielles ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RIPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

Zu Reperfusionsbeginn gibt es noch keinerlei relevante Unterschiede zwischen den Gruppen oder zur Baseline. Am Ende der Reperfusion hat sich wieder die „RIPC + I/R“-Gruppe signifikant zur Baseline verschlechtert und unterscheidet sich signifikant zu den „no-damage“-Kontrollen. Auch die Calafiore-Gruppen haben sich nach 90 min im Sauerstoffverbrauch verschlechtert.

Auch in Bezug auf diesen Metabolismus-Faktor gibt es keine Unterschiede in den Zweiergruppen RIPC/Sham und Calafiore mit/ohne RNase.

## 4.2.2 Laktatproduktion

Die Werte für die Laktatproduktion wurden nicht in Prozent zur Baseline normiert, da aufgrund von 0-Werten in der Baseline die nötige Rechenoperation nicht durchgeführt werden konnte.

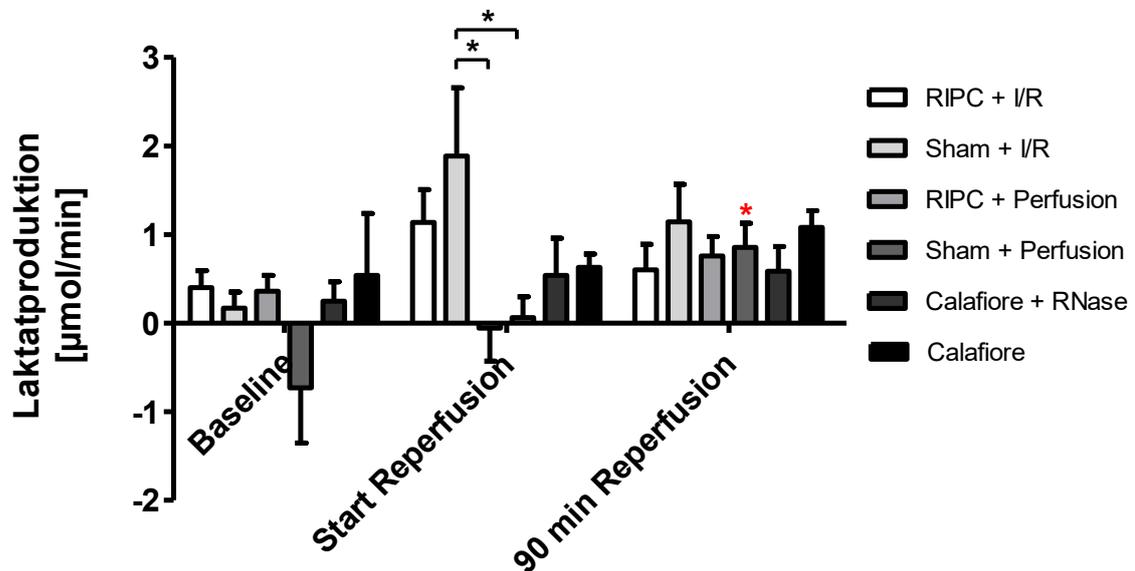


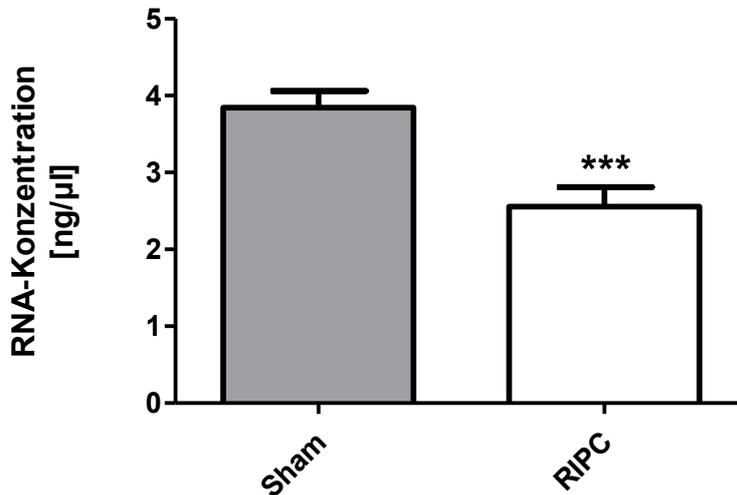
Abbildung 10: Vergleich der Laktatproduktion der isolierten Herzen im Langendorff-Versuch, Darstellung der MW und SF,  $n = 8$  ( $n = 9$  „RIPC + I/R“ und „Calafiore“),  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ , einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc-Test. \*signifikante Unterschiede zu „RIPC + I/R“ zu einem Zeitpunkt. \*signifikante Unterschiede zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

In der Frühphase der Reperfusion weisen die Ischämie-Gruppen eine höhere Laktatproduktion als die Perfusion-Gruppen auf, mit einem signifikanten Unterschied zwischen „Sham + I/R“ und den „no-damage“-Kontrollen. Dieser ist am Ende jedoch nicht mehr vorhanden. Im zeitlichen Vergleich zeigt lediglich die Gruppe „Sham + Perfusion“ nach 90 min eine relevante Veränderung zur Baseline. Die isolierten Herzen dieser Gruppe haben sich vom Laktatkonsumenten, zum Laktatproduzenten gewandelt.

### 4.3 eRNA – RNase 1 – TNF- $\alpha$ – Achse

#### 4.3.1 RNA-Konzentration & RNase-Aktivität

A)



B)

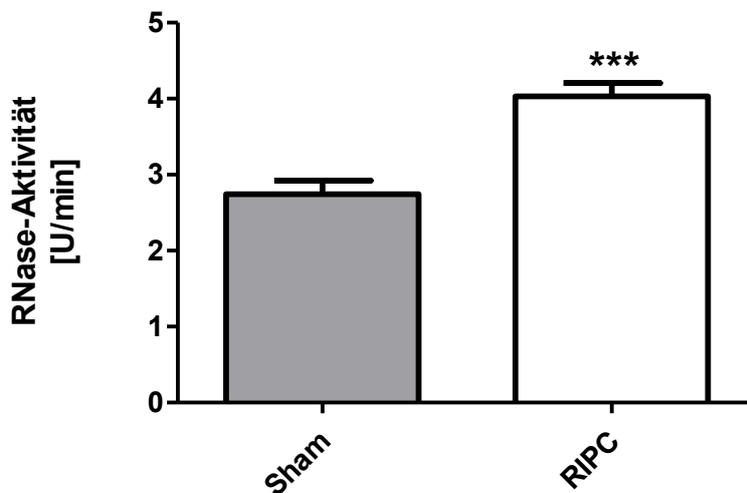


Abbildung 11: RNA-Konzentration (A) und RNase-Aktivität (B) in Rattenplasma mit (RIPC) und ohne (Sham) Präkonditionierung, Darstellung MW und SF,  $n = 6$  (A),  $n = 5$  (B), \*\*\* $p \leq 0,001$ ,  $t$ -Test.

Erwartungsgemäß wiesen Ratten, welche der 30-minütigen RIPC-Präkonditionierung unterzogen wurden, eine hochsignifikant geringere RNA-Konzentration und somit auch eRNA-Konzentration im Plasma auf als die Ratten der Scheinkonditionierung (Sham) (A). Gleichzeitig war die RNase-Aktivität in diesen Ratten deutlich erhöht im Gegensatz

zur Sham-Gruppe (B). Diese Datenkonstellation dient als Beweisgrundlage, dass das RIPC-Manöver erfolgreich durchgeführt wurde.

#### 4.3.2 TNF- $\alpha$ -Konzentration

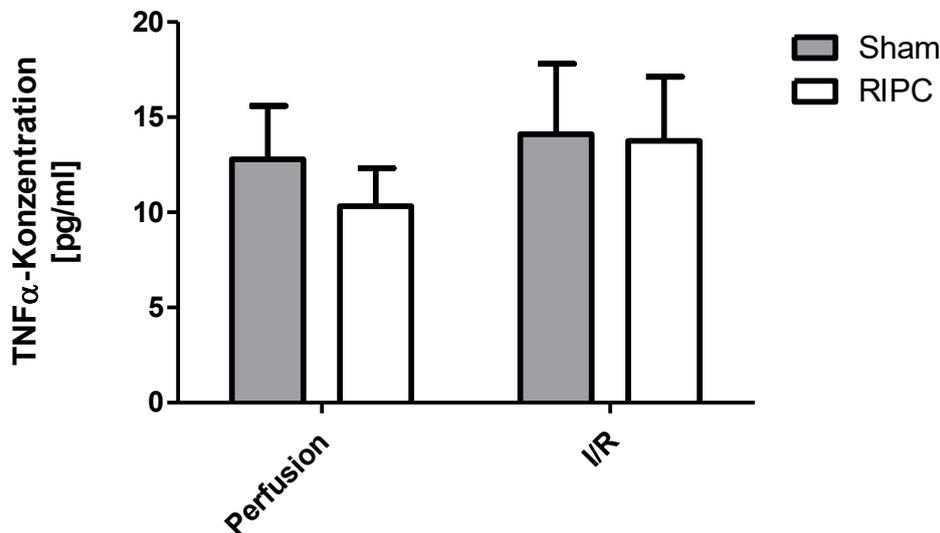


Abbildung 12: TNF- $\alpha$ -Konzentration in postkardialen Perfusatproben nach 90 min Re-/Perfusion, Darstellung MW und SF,  $n = 6$ , Kruskal-Wallis-Statistik mit Dunn's Post-hoc-Test

Entgegen der Erwartung, dass die TNF- $\alpha$ -Konzentration äquivalent zur RNA-Konzentration geringer in den RIPC-Gruppen als in den Sham-Gruppen ist, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den RIPC- und Sham-Gruppen festgestellt werden. Dies gilt sowohl für die Perfusionsgruppen als auch für die Ischämie-Reperfusionen.

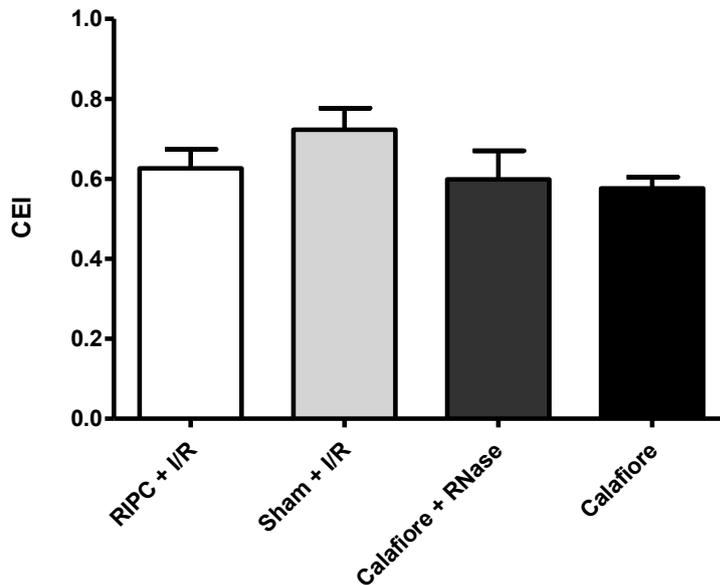
Im Plasma der Ratten nach 30 min Konditionierung konnte noch kein TNF- $\alpha$  detektiert werden.

#### 4.4 Stereologie und Elektronenmikroskopie

Die folgenden Daten wurden erhoben von Herrn Prof. Dr. med Christian Mühlfeld und Frau Dr. rer. nat. Julia Schipke aus dem Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover) und dürfen mit deren freundlicher Genehmigung in dieser Arbeit verwendet werden. Statistische und graphische Auswertung erfolgten wiederum aus eigener Hand.

#### 4.4.1 CEI & V/S-Ratio

A)



B)

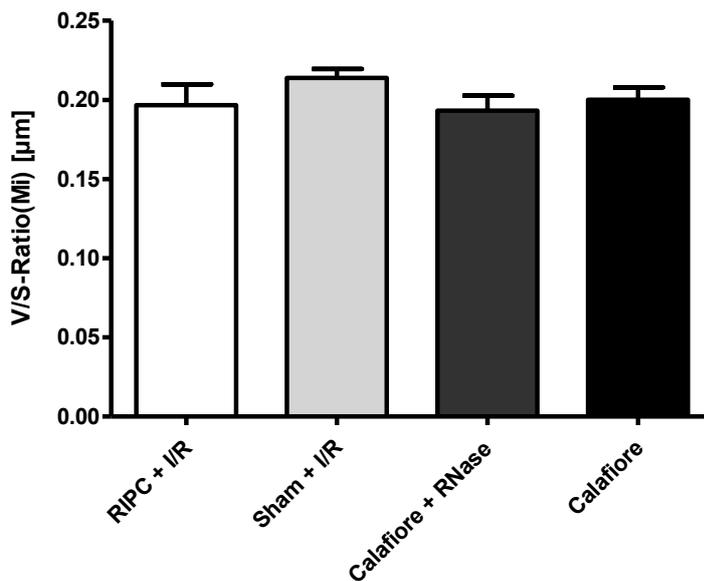


Abbildung 13: CEI (A) und V/S-Ratio (B) bestimmt aus linken Rattenherzventrikel nach erfolgtem Langendorff-Versuch, Darstellung MW und SF,  $n = 3$ , Kruskal-Wallis-Statistik mit Dunn's Post-hoc-Test

Im quantitativen Vergleich der Versuchsarme bzgl. des Ischämie-Reperfusionsschadens ist festzustellen, dass die Herzen aller untersuchten Gruppen eine annähernd gleiche Schädigung durch die Ischämie- und Reperfusionsphase hatten. Sowohl beim CEI (A), als auch bei der V/S-Ratio(Mi) (B) konnte, entgegen der Erwartung, keine der Myokardprotektionsverfahren einen Vorteil gegenüber der „worst case“-Gruppe

(Sham + I/R) erzielen. Auch untereinander gab es bei beiden Parametern keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.4.2 EM-Auswertung

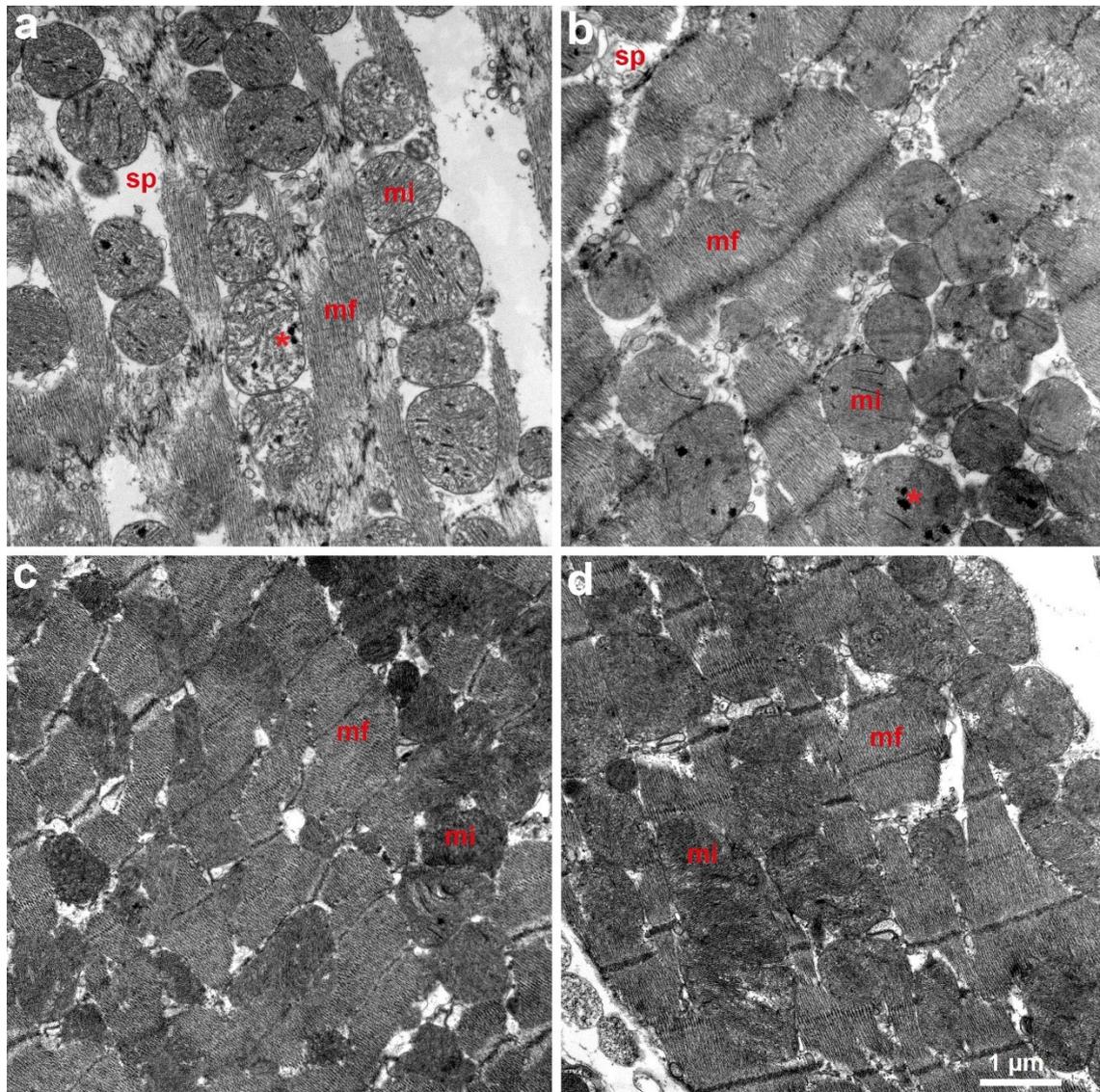


Abbildung 14: Übersicht repräsentativer elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Rattenherzventrikel: a) Sham + I/R, b) RIPC + I/R, c) Calafiore, d) Calafiore + RNase. Testlinienlänge = 1  $\mu$ m, sp = Sarkoplasma, mf = Myofibrille, mi = Mitochondrium, \* = Kalzium-Phosphat-Präzipitate. Vergrößerung: 14000 x.

Auch wenn bei der quantitativen Auswertung sich dies nicht belegen lässt, so kann trotzdem bei der qualitativen Beurteilung der Myokardproben gesagt werden, dass sich der Strukturzustand zwischen den Gruppen unterscheidet. Dabei weisen die Calafiore- (c) und Calafiore + RNase-Gruppe (d) den besten Strukturzustand der untersuchten

Gruppen auf. In der weiteren Rangfolge ist die Gruppe RIPC + I/R (b) besser einzustufen als Sham + I/R (a).

In den Abbildungen a) und b) fällt auf, dass sich elektronendichte Ablagerungen in den Mitochondrien befinden (\*). Dabei handelt es sich um Kalzium-Phosphat-Präzipitate, welche bei ischämischen Prozessen entstehen können (Herdson et al., 1965; Shen und Jennings, 1972b). Grund ist eine vermehrte Kalziumakkumulation infolge der Ischämie-bedingten Kalziumüberladung (s. Einleitung) (Shen und Jennings, 1972a; Ladilov et al., 1995; Webster, 2012). Interessanterweise sind diese Ablagerungen in den beiden Calafiore-Versuchsarmen c) und d) nicht zu finden.

## 5 Diskussion

Unter Berücksichtigung der eingangs gestellten Zielsetzungen dieser Arbeit lassen sich anhand der experimentellen Ergebnisse 2 Hauptaussagen treffen:

- 1) Das RIPC-Manöver induziert einen signifikanten Anstieg der vaskulären RNase-Aktivität im Kreislaufsystem bei gleichzeitiger Abnahme der eRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.
- 2) Das RIPC-Manöver erzeugt, im Vergleich zu nicht ischämisch präkonditionierten oder mit Blutkardioplegie geschützten Herzen, keine Verbesserung der Myokardprotektion im Langendorff-Versuch. Weder bei den Leistungs- oder Metabolismusparametern noch bei der stereologischen und elektronenmikroskopischen Auswertung finden sich Unterschiede.

Dieses ambivalente Verhältnis zwischen einem positiven Zusammenhang von RIPC mit einem möglichen Mediator, bei gleichzeitig unveränderten klinischen Ergebnissen spiegelt in gewissem Maße die aktuelle Forschungslage zur Fernkonditionierung des Herzens wider.

Das erste Hauptergebnis stellt die erfolgreiche Reevaluierung der Hypothese von Cabrera-Fuentes et al. 2015, dass die vaskuläre RNase 1 ein möglicher Mediator von RIPC sein könnte, dar. Dieser Zusammenhang wurde bisher alleinig in der Arbeit von Cabrera-Fuentes et al. überprüft, sodass die hier vorliegenden Ergebnisse dies in einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit experimentell bestätigen und eine kausale Beziehung zwischen RIPC und dem vaskulären eRNA/RNase-System nahelegen. Jedoch muss an dieser Stelle eindeutig gesagt werden, dass die RNase 1 als potentieller Mediator nicht alleinig den RIPC-Effekt erklären und modulieren kann. Gleich den anderen gehandelten Mediatoren wie Stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) (Davidson et al., 2013), Stickstoffmonoxid (NO) (Rassaf et al., 2014), microRNA-144 (Li et al., 2014) oder Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) (Basalay et al., 2016) wird auch die RNase 1 nur ein Teil eines komplexen, multifaktoriellen Prozesses sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Kontroll-Gruppe zwar nicht durch RIPC ischämisch präkonditioniert wurde, dies aber nicht bedeutet, dass keine Präkonditionierung stattgefunden hat. Die Kontroll-Gruppe erhielt ebenfalls 30 min Anästhesie mittels durchgehender Isofluran-Narkose und einmaliger Buprenorphin-Injektion und war somit einer Medikamenten-induzierten Präkonditionierung (*medication-induced preconditioning*, MIPC) ausgesetzt. Sowohl zu volatilen Anästhetika wie Isofluran (Swyers et al., 2014), als auch zu Opioiden wie Buprenorphin

(Kato und Foëx, 2002) sind präkonditionierende Wirkungen auf das Herz beschrieben. Prinzipiell deuten die Ergebnisse aber darauf hin, dass RIPC einen größeren Einfluss auf das eRNA/RNase-System hat als MIPC. Dies könnte bedeuten, dass dieser Effekt spezifisch für RIPC und nicht für MIPC ist. Jedoch ist durch das Ergebnis dieser Arbeit ein potentieller Einfluss von MIPC auf die RNase-Aktivität und eRNA-Konzentration nicht ausgeschlossen. Für eine abschließende Bewertung fehlen zurzeit noch Referenzwerte, welche Blutplasmalevels von eRNA und vaskulärer RNase zu den vermuteten kardial-präkonditionierenden Effekten führen und ob es lediglich einen zu erreichenden Schwellenwert gibt oder es proportional ansteigenden Effekte gibt.

Betrachtet man die zweite Hauptaussage, so muss gesagt werden, dass RIPC in dieser Arbeit keinen Benefit im Langendorff-Versuch erbracht hat, weder in der Perfusionsgruppe noch in der Ischämie/Reperfusion-Gruppe. Dies bedeutet jedoch nicht gleichzeitig, dass RIPC nicht erfolgreich war. Denn seit der Erstbeschreibung des RIPC-Effektes durch Przyklenk et al. im Jahr 1993 wurde die Wirkung von RIPC über eine Reduktion des Infarktgebietes nach erfolgter Ischämie und Reperfusion definiert. Tierexperimentell konnte dies bereits in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte durch histologische Aufarbeitung des Herzens in Schnitten mit darauffolgender Färbung des Infarktareals (Przyklenk et al., 1993; Kharbanda et al., 2002; Wong et al., 2012; Li et al., 2014) und durch die Bestimmung von Infarktmarkern wie Laktatdehydrogenase (LDH), Creatinkinase (CK) (Sharma et al., 2015; Randhawa und Jaggi, 2016) oder Troponin I (Teng et al., 2015). Schwerpunkt dieser Arbeit sollte aber nicht die Auswirkung auf das Infarktgebiet sein, sondern der Einfluss auf die kardialen Leistungs-/Hämodynamikparameter, auf den kardialen Metabolismus und auf Unterschiede auf elektronenmikroskopischer Ebene.

Der wissenschaftliche Vergleich der erhobenen Daten gestaltet sich schwer. Dies beginnt mit dem breiten Forschungsspektrum zu RIPC. Der Datenpool beinhaltet bereits Tierversuche zu einer Vielzahl von Spezies, beginnend bei Mäusen (Li et al., 2014; Rassaf et al., 2014), Ratten (Kristiansen et al., 2005; Behmenburg et al., 2016) und Kaninchen (Dickson et al., 1999; Donato et al., 2013), übergehend zu Hunden (Przyklenk et al., 1993), bis hin zu Versuchen im Schweinemodell (Kharbanda et al., 2002; Konstantinov et al., 2005). Auf die vielen speziestypischen Unterschiede und die somit erschwerte Übertragbarkeit untereinander und im Besonderen auf den Menschen wiesen bereits Heusch und Rassaf (2016) hin. Den beachtlichen Datenpool ergänzend, kommt außerdem die große Menge der ebenfalls schon vorhanden klinischen Studien am Menschen hinzu.

Betrachtet man lediglich die Studien, in denen gleichfalls Ratten als Versuchstiere verwendet wurden, so muss als nächstes zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-Experimenten differenziert werden. Die *in vivo*-Experimente bieten natürlich den großen Vorteil, dass sie den Organismus als Ganzes betrachten. Im Gegenzug müssen aber diverse Einschränkungen im Versuchsprotokoll hingenommen werden. So würde man für die Untersuchung einer globalen Ischämie, wie bei kardiochirurgischen Operationen, eine Herz-Lungenmaschine benötigen. Daher werden in den *in vivo*-Versuchen lediglich mit regionalen Ischämien, sprich mit Infarktmodellen durch Unterbindung der LCA bzw. LAD gearbeitet. Beispielhafte Studien sind die von Wong et al. (2012) und Behmenburg et al. (2016). In beiden wurden der MAP und die HF als Hämodynamikparameter untersucht und in beiden Untersuchungen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen RIPC und der Kontrollgruppe. Die *ex vivo*-Versuche, gleich der in dieser Arbeit angewendeten isolierten Herzperfusion nach Langendorff, ermöglichen wiederum gezielt den Einfluss des RIPC-Stimulus auf das Herz zu untersuchen. Dabei können einzelne Herzparameter detailliert gemessen werden. Die Tabelle 3 zeigt den direkten Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Daten mit den Ergebnissen anderer Autoren, die ebenfalls mit der Langendorff-Methode gearbeitet haben, um die Wirkung von über den Rattenhinterlauf applizierten RIPC zu untersuchen. Dabei wird deutlich, dass die Vergleichbarkeit der Daten durch die Heterogenität der Versuchsprotokolle erschwert wird. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Studien wider. Während der eine Teil der Studien einen Benefit von RIPC bzgl. der kardialen Leistungsparameter LVDP,  $dLVP/dt_{max}$ ,  $dLVP/dt_{min}$  und RPP (Kristiansen et al., 2005; Sharma et al., 2015; Singh et al., 2017) feststellen konnte, zeigen wiederum andere Studien, gleich dieser Arbeit, keine Vorteile (Davidson et al., 2013) bzw. lediglich einen einzelnen (Duan et al., 2012) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Daten sind jedoch dahingehend konform, dass RIPC keinen Einfluss auf den koronaren Fluss hat. Somit stimmen die in dieser Arbeit erhobenen Daten prinzipiell mit denen der anderen Studien überein.

Bei der Ergründung der Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse kommen mannigfaltige Möglichkeiten in Betracht. Hierbei kann an den bereits erwähnten Unterschieden der Versuchsprotokolle angesetzt werden (Tab. 3):

Baker et al. zeigten bereits im Jahr 2000, dass allein schon die Wahl des Rattenstamms Einfluss auf die myokardiale Resistenz gegenüber einem I/R-Schaden hat. Zwischen Lewis- und Wistar-Ratten ergaben sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Hämodynamikparameter LVDP, CF und HF, sowie bzgl. der Infarktgröße und der postischämischen LDH-Leckage. Sprague-Dawley-Ratten wurden jedoch nicht in dieser Studie mituntersucht.

<b>Studie</b>	<b>Rattenstamm</b>	<b>Anästhesie</b>	<b>Anzahl RIPC-Zyklen</b>	<b>Perfusat</b>	<b>Dauer Stabilisierungsphase</b>	<b>Dauer &amp; Art Ischämie</b>	<b>Dauer Reperfusion</b>	<b>Untersuchte Parameter</b>	<b>Zeitpunkte der Messung (Reperfusion)</b>	<b>Ergebnis</b>
<i>Tolkmitt</i>	Lewis ♂	2,5% Isofluran-Inhalationsnarkose + Buprenorphin (0,05 mg/kg KGW)	3x5 min	Erythrozyten-perfusat	Individuell: 15,4 ± 3,2 min	90 min, global	90 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub> , CF	10 min, 90 min	Keine sign. Unterschiede zu Sham
<i>Kristiansen et al. 2005</i>	Wistar ♂	Midazolam (0,25 mg/kg KGW) + Fentanyl/ Fluanison (0,5 mg/kg KGW)	4x5 min	Krebs-Henseleit-Puffer	40 min	45 min, regional (LCA)	120 min	LVDP, RPP, CF	5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min	LVDP, RPP: RIPC > Kontrolle (zu allen Zeitpunkten), CF: n.s.
<i>Duan et al. 2012</i>	Sprague-Dawley ♂	Pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)	3x5 min	Krebs-Henseleit-Puffer	20 min	30 min, global	60 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub> , CF, HF	10 min, 20 min, 30 min, 60 min	10 min: dLVP/dt <sub>max</sub> , RIPC > Kontrolle, Rest: n.s.
<i>Davidson et al. 2013</i>	Sprague-Dawley ♂	Pentobarbital (60 mg/kg, i.p.)	3x5 min	Krebs-Henseleit-Puffer	40 min	35 min, regional (LAD)	60 min	LVDP, CF, HF	?	Keine sign. Unterschiede zu Sham
<i>Sharma et al. 2015</i>	Wistar albino ♂, ♀	Thiopental (50 mg/kg, i.p.)	4x5 min	Krebs-Henseleit-Puffer	10 min	30 min, global	120 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub>	5 min, 30 min, 60 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub> : RIPC > Kontrolle (zu allen Zeitpunkten)
<i>Singh et al. 2017</i>	Wistar albino ?	Thiopental (50 mg/kg, i.p.)	4x5 min	Krebs-Henseleit-Puffer	10 min	30 min, global	120 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub>	5 min, 30 min, 60 min, 120 min	LVDP, dLVP/dt <sub>max</sub> , dLVP/dt <sub>min</sub> : RIPC > Kontrolle (zu allen Zeitpunkten)

**Tabelle 3: Übersicht vergleichbarer Studien mit angewandeter RIPC- und Langendorff- Methodik**

Zu den sicherlich weniger entscheidenden Unterschieden zwischen den Studien zählen die Art des Perfusates, die Länge der Stabilisierungs- und Reperfusionsphase sowie ob 3 oder 4 Zyklen RIPC durchgeführt wurden. 3 bzw. 4 Zyklen RIPC mit je 5 min Ischämie und Reperfusion entsprechen beide dem aktuellen wissenschaftlichen Standard. Johnsen et al. (2016) konnten dazu in einer Studie mit isolierten Mäuseherzen im Langendorff-Modell nachweisen, dass weniger als 3 Zyklen RIPC noch ineffektiv sind und mehr als 4 Zyklen keinen zusätzlichen Benefit mit sich bringen. Des Weiteren scheint auch das Geschlecht der Ratten den RIPC-Effekt nicht zu beeinflussen (Lieder et al., 2019).

Die entscheidenderen Faktoren sind eher die angewendete Anästhesie und die Dauer der globalen bzw. regionalen kardialen Ischämie. Hier ergeben sich in den Protokollen erhebliche Unterschiede von bis zu 60 min Ischämiedifferenz im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten 90 min. Walker und Yellon (1992) sehen in der zunehmenden Länge des ischämischen Insults eine wichtige Variable für den Protektionsverlust der ischämischen Präkonditionierung. Zwar beschreiben sie dies nur für IPC, eine Anwendbarkeit auf RIPC erscheint aber durchaus plausibel. Hierbei berichten sie von einem Verlust der Kardioprotektion am Hundeherzen nach einer Erhöhung der Ischämiezeit von 60 auf 90 min. Daraus resultieren sie, dass die Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung „nicht absolut ist, den Zelltod verzögert, aber nicht verhindert“. Somit müsste man selbstkritisch hinterfragen, ob die in dieser Arbeit verwendete Ischämiezeit von 90 min ursächlich für die fehlende Kardioprotektion bzgl. der gemessenen Parameter sein kann. Andererseits baut diese Arbeit auf ein bereits etabliertes Protokoll der eigenen Arbeitsgruppe auf (Böning et al., 2014; Böning et al., 2015) und orientiert sich an einer möglichst klinisnahen Umsetzung der herzchirurgischen Operationsbedingungen. Hierzu gehört neben dem verwendeten Erythrozyten-Perfusat auch die globale kardiale Ischämie durch Aortenklemmung sowie deren Dauer von bis zu mehreren Stunden. Die nähere Orientierung zur Klinik spiegelt sich ebenso wider im Anästhetika-Vergleich der Studien. Das von Kristiansen et al. (2005) verwendete Medikament „Hypnorm“, ein Kombinationspräparat aus dem Opioid Fentanyl und dem typischen Antipsychotikum Fluanison, ist beispielsweise ausschließlich in der Veterinärmedizin in Gebrauch und entbehrt somit eine Übertragung auf die humane Kardiochirurgie. Bei Barbituraten wie Pentobarbital (Duan et al., 2012; Davidson et al., 2013) oder Thiopental (Sharma et al., 2015; Singh et al., 2017) handelt es sich zwar um potentielle intravenöse Narkotika, die in der Humanmedizin bei der Narkoseeinleitung zum Einsatz kommen können, doch vor allem in der Kardiochirurgie finden sie definitiv keine routinemäßige Verwendung. Dies liegt nicht zuletzt an ihrer

kardiovaskulär-depressiven Wirkung. Lediglich das Benzodiazepin Midazolam (Kristiansen et al., 2005), in seiner Rolle der Prämedikation in der Narkoseeinleitung bzw. präoperativen Sedierung, erfüllt die Kriterien eines klinikrelevanten, routinegebräuchlichen Medikamentes. Im Gegensatz zu den benannten Studien und deren verwendeten Anästhetika, wurden die in dieser Arbeit gewählten Medikamente wegen ihres Einsatzes bei herzchirurgischen Operationen am Menschen ausgewählt. Neben dem Opioid Buprenorphin kommen auch volatile Narkotika wie Isofluran zum regelmäßigen Einsatz. Studiendaten weisen sogar auf einen Zusatznutzen von volatilen Narkotika im Vergleich zur total intravenösen Anästhesie (TIVA) bei herzchirurgischen Eingriffen hin. So konnte beispielsweise in der Meta-Analyse von Zangrillo et al. (2015) gezeigt werden, dass die Verwendung volatiler Anästhetika zu einer Reduktion der Mortalität im Langzeitvergleich mit TIVA-gestützten Herzoperationen führt. Dies ist unter anderem ein wegweisender Hinweis dafür, welche bedeutsame Rolle auch die Wahl der Anästhesie spielt. Wie bereits erwähnt, besitzen verschiedene Medikamente bereits eigene präkonditionierende Wirkungen und mögliche beeinflussende Interaktionen mit den Signalwegen von RIPC erscheinen durchaus denkbar. Hierbei ist vor allem die Tatsache wichtig, dass aufgrund der schmerzhaften Applikation von RIPC mittels Tourniquet-Abbindung einer Extremität in jedem Falle eine analgesierende/narkotisierende Medikamentensubstitution erfolgen muss und somit medikamentöse Wechselwirkungen mit RIPC, sei es im Sinne eigener konditionierender Effekte oder möglicherweise negierender Effekte, nicht vermieden werden können. Ebenso ist denkbar, dass RIPC keinen zusätzlichen myokardialen Schutz zu einer schon bestehenden Medikamenten-induzierten Präkonditionierung mehr leisten kann. Diese Hypothese wird von den Daten dieser Arbeit gestützt, da wie bereits erwähnt die Kontrollgruppe als präkonditioniert durch Isofluran-Narkose und Buprenorphin angesehen werden kann. Darüber hinaus konnte in der eigenen Arbeitsgruppe auch gezeigt werden, dass Rattenherzen im selben Versuchsprotokoll signifikant schlechtere LVDP-Werte nach 90 min Ischämie und nach 90 min Reperfusion im Vergleich zur Medikamenten-präkonditionierten Sham-Gruppe aufwiesen, nachdem sie keinerlei Präkonditionierung unterzogen wurden, sondern lediglich eine Organentnahme nach Tiertötung stattfand (Tolkmitt et al., 2018). Neben diesen Ergebnissen, lässt auch ein signifikant verbesserter CF nach 90 min Ischämie auf eine erfolgreiche Myokardprotektion durch MIPC Rückschlüsse ziehen. Diese Hypothese des fehlenden zusätzlichen Benefits von RIPC bei Isofluran-Narkose ist auch bereits ein klinisch beschriebenes Phänomen. In einer randomisierten klinischen Studie mit 55 Patienten, welche sich einer „On-Pump“ koronaren Bypassoperation unterzogen haben, konnten Lucchinetti et al. (2012) zeigen, dass RIPC nicht den kardioprotektiven Effekt von

Isofluran steigerte. Die Effektstärke wurde dabei zum einen anhand der kardialen Biomarker hscTnT, cTnT und NT-proBNP gemessen und zum anderen anhand klinischer Endpunkte nach 6 Monaten wie die Rehospitalisierungsrate und kardiovaskuläre Komplikationen. Diese Daten sind durchaus mit den aus dieser Arbeit erhobenen funktionellen und strukturellen Parametern der Rattenherzen vergleichbar, da das Troponin T (hscTnT, cTnT) als Marker für den kardialen Zelluntergang und das natriuretische Peptid (NT-proBNP) als indirekter Parameter für die Pumpfunktion des Herzens angesehen werden. Andererseits bescheinigt die Meta-Analyse von Zangrillo et al. (2015) eine zusätzliche Kardioprotektion der Kombination Isofluran-Narkose plus RIPC im Sinne einer Mortalitätsreduktion der Patienten im Gegensatz zu einer alleinigen Isofluran-Narkose.

Weiter ausgehend von dieser Non-Profit-Hypothese von RIPC zu einer Isofluran-Präkonditionierung, wäre somit auch ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse der vergleichbaren Studien (Tab. 3) gegeben. So könnte eine sich in den Leistungsparametern widerspiegelnde Myokardprotektion damit erklärbar sein, dass keine Medikamenten-induzierte Präkonditionierung durch die Anästhesie der Ratten stattgefunden hat und somit das RIPC-Manöver die bekannte protektive Wirkung entfalten konnte und im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Effekt sichtbar wurde. Denn während die Isofluran-induzierte Konditionierung sehr gut und aktuell erforscht ist, ist die Datenlage zu einer möglichen Barbiturat-induzierten Myokardkonditionierung kontrovers (Kato und Foëx, 2002). Es liegt somit die Vermutung nah, dass die mit Barbituraten durchgeführten Tierversuche keine relevante Beeinflussung durch MIPC hatten. Dahingegen ist bekannt, dass der präkonditionierende Wirkmechanismus von volatilen Anästhetika wie Isofluran über den Einfluss auf mitochondriale, ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K^+_{ATP}$ -Kanäle) getriggert wird. Dabei erfolgt vor allem Proteinkinase C-vermittelt eine Sensibilisierung dieser  $K^+_{ATP}$ -Kanäle mit einer erhöhten Öffnungsrate. Dies ermöglicht wiederum den Mitochondrien, das bei einer Ischämie anfallende Kalzium besser zu regulieren und somit eine verbesserte myokardiale Kontraktilität in der Reperfusion zu gewährleisten (Swyers et al., 2014). Gleich dem Mechanismus bei RIPC, sind bei MIPC durch volatile Anästhetika die Mitochondrien Zielstruktur und Effektor zugleich und spielen somit eine zentrale Rolle im Signalweg. Vielleicht ist in dieser Ähnlichkeit der Präkonditionierungsmechanismen auch das Fehlen eines additionalen Protektionseffektes begründet. Es kann zu keiner Steigerung der Präkonditionierung kommen, da bereits die Mitochondrien als Zielorganell durch das erste Konditionierungsverfahren ausgelastet und nicht weiter stimulierbar sind.

Auch die Daten der durch Blutkardioplegie geschützten Rattenherzen und deren Vergleich mit den anderen Versuchsgruppen erbringen interessante Erkenntnisse. So zeigten sich im Vergleich mit der RIPC + I/R-Gruppe signifikant bessere Werte der Leistungsparameter LVDP,  $dLVP/dt_{max}$  und  $dLVP/dt_{min}$  (Abb. 5, 6, 7) zu Beginn der Reperfusionphase nach erfolgter globaler Ischämie. Dieser postischämische Erhalt der kardialen Funktion gleicht dabei den Werten der „no damage“-Perfusionsgruppen zum selben Zeitpunkt. Betrachtet man den direkten Vergleich der beiden Calafiore-Gruppen (Abb. 5 - 10), so ergibt sich kein signifikanter Zusatznutzen durch die Zugabe von RNase zur Blutkardioplegie. Jedoch lässt sich anhand der kardialen Leistungsparameter eine Tendenz erkennen, die möglicherweise doch auf einen Benefit hinweisen. Diese Tendenzen sind bei LVDP,  $dLVP/dt_{max}$  und  $dLVP/dt_{min}$  (Abb. 5, 6, 7) sowohl zum Start und am Ende der 90 min Reperfusion im geringen Maße zu sehen und bzgl. des CF (Abb. 8) zu beiden Zeitpunkten sehr deutlich, jedoch ohne statistische Relevanz in diesem angewendeten One-way-ANOVA-Testverfahren zum Vergleich mit den anderen Gruppen. Nichtsdestotrotz erscheint dies ein Hinweis auf eine Interaktion der applizierten RNase mit den Koronargefäßen zu sein. Das direktproportionale Verhältnis des CF zur 4. Potenz des Gefäßradius weist daher darauf hin, dass durch die RNase-Wirkung die Koronargefäße offengehalten werden. Immerhin ist der CF der Calafiore + RNase-Gruppe nach 90 min Reperfusion noch nicht signifikant gesunken im Vergleich zu Calafiore ohne RNase. In einem anderen Testverfahren mit lediglich den beiden Calafiore-Gruppen bei ansonsten gleichbleibenden Daten und Zeitpunkten, erweist sich sogar die Calafiore + RNase-Gruppe als signifikant besser ( $p \leq 0,01$ ) zum Beginn der Reperfusion (Daten nicht gezeigt). Mit einer größeren Gruppenstärke oder vielleicht auch einer höheren RNase-Konzentration in der Blutkardioplegie würden die angedeuteten Tendenzen möglicherweise eindeutiger ausfallen. Ein weiteres Indiz für einen Effekt einer RNase-Applikation auf den CF unter kardialer Ischämie findet sich in der Studie von Stieger et al. (2017). In einem *in vivo* Myokardinfarkt-Experiment im Maus-Modell konnten sie zeigen, dass eine wiederholte venöse RNase-Injektion (50 µg/kg) 30 min, 3 Std. und 6 Std. nach induzierte LAD-Ligatur (*left anterior descending coronary artery*) zu einem besseren Erhalt des koronaren Blutflusses 24 h nach Ligatursetzung führt. Dabei konnten sie mittels kontrastmittelgestützter Mikro-CT-Angiographie eine verbesserte kollaterale Perfusion um das Infarktgrenzgebiet nachweisen, indem sie den durchschnittlichen Gefäßdurchmesser pro Areal bestimmten. Hierbei ist besonders wichtig, dass die Autoren darauf hinweisen, dass die besser perfundierten Kollateralgefäße unter RNase-Einfluss kein Resultat einer Angiogenese sind, sondern Bestandteil eines bereits vorhandenen Mikrogefäßnetzwerkes.

Mit Hinblick auf eine klinische Anwendung der gewonnenen Ergebnisse muss natürlich festgehalten werden, dass der Transfer der Daten eines Tierexperimentes auf den Menschen nur bedingt möglich ist. Trotzdem ebnet sie richtungsweisende Wege für weiterführende Versuche. Neben den Hinweisen darauf, dass Medikamenten-induzierte Präkonditionierung wie in diesem experimentellen Setting möglicherweise nicht weiter durch RIPC gesteigert werden kann, bietet vor allem das eRNA/RNase-System noch viel Forschungspotential. Zerneck und Preissner (2016) wiesen bereits darauf hin, dass dieses System einen steigenden Einfluss auf die Therapiemodalitäten der kardiovaskulären Erkrankungen erhalten wird. In diesem Zusammenhang könnte das RIPC-Manöver, sprich die intermittierende Abklemmung einer Extremität, eine effektive Methode sein, um den zirkulierenden Gehalt vaskulärer RNase 1 (als eRNA-Antagonist) für therapeutische Zwecke zu erhöhen. Weitere systematische Studien müssten diesbezüglich eruieren, welche RNase-Konzentrationen therapeutisch notwendig sind und welche therapeutischen Zeitfenster für das RIPC-Manöver bedeutsam sind.

## 6 Zusammenfassung

Die ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) ist eine sowohl experimentell als auch bereits klinisch genutzte Technik, um einen Ischämie-Reperfusionsschaden an Organen, insbesondere am Herzen, zu reduzieren. In den beiden größten herzchirurgischen Studien, die prospektiv-randomisiert RIPC und Nicht-RIPC verglichen, konnten lediglich neutrale Ergebnisse bezüglich des Patienten-Outcomes gezeigt werden. Trotzdem ist die Thematik RIPC noch aktuell, da zum einen der hochkomplexe Wirkmechanismus von RIPC am Herzen noch nicht vollends geklärt ist, und zum anderen tierexperimentelle Studien auf eine vielversprechende Anwendung zum Erhalt anderer Organe hindeuten. Um die klinische Anwendung zu optimieren, ist es außerdem wichtig zu verstehen, weshalb kein RIPC-Benefit in den genannten Studien festzustellen war.

Ein Teil der komplizierten RIPC-Signalkaskade ist das vaskuläre eRNA/RNase-System, wobei das RIPC-Manöver zu einer Erhöhung der Ischämie-protectiven RNase 1 führt, welche als natürlicher Gegenspieler zu extrazellulärer RNA (eRNA) fungiert. eRNA scheint TNF- $\alpha$ -mediert den Zelluntergang zu triggern und somit das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens zu vergrößern.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Effekte von RIPC (3 x 5 min Hinterbein-Ischämie mit je 5 min Reperfusion nach jedem Zyklus) auf Ratten mittels isolierter Organperfusion in einem Langendorff-Apparat (je 90 min Ischämie und Reperfusion) getestet. RIPC wurde dabei anhand von Hämodynamik, Metabolismus und Strukturerehalt mit dem etablierten Kardioprotektionsverfahren der Calafiore-Blutkardioplegie verglichen. Passend zu den erwähnten klinischen Studien konnte auch hier RIPC keinen zusätzlichen Benefit und somit keine signifikant besseren hämodynamischen, metabolischen oder strukturellen Ergebnisse im Vergleich zu den Kontroll-, als auch den Calafiore-Gruppen liefern. Ebenso stimmig konnte jedoch auch ein signifikanter Anstieg der RNase-Aktivität im Plasma bei gleichzeitig signifikanter Reduktion der eRNA-Konzentration im Plasma festgestellt werden.

Eine klinische Übertragbarkeit auf den Menschen ist ohne Frage nur mit großer Vorsicht zu formulieren. Jedoch weisen die Ergebnisse auch auf ein Grundproblem der RIPC-Praktikabilität hin: bereits bestimmte Analgetika und Anästhetika bewirken einen präkonditionierenden Effekt bzw. haben eine inhibierende Wirkung auf den RIPC-Signalweg. So ist nicht auszuschließen, dass RIPC unter bestimmter Analgesie/Anästhesie keinen zusätzlichen Benefit zu MIPC erreichen kann.

## 7 Summary

Remote ischemic remote preconditioning (RIPC) is a technique used experimentally as well as clinically to reduce ischemia-reperfusion injury to organs, particularly the heart. However, the two largest cardiac surgery trials yielded only neutral results in terms of patient outcomes. Nonetheless, RIPC is still a topic of contemporary interest, as the highly complex mechanism of RIPC and its signaling pathways have not yet been fully elucidated, and animal studies also indicate RIPC being a promising application to conserve other organs. In order to optimize the clinical application, it is also important to understand why no RIPC benefit was found in the mentioned clinical trials.

Part of the complicated RIPC signaling cascade is the vascular eRNA / RNase system. The RIPC maneuver leads to increased levels of the ischemia-protective RNase 1, which acts as a natural antagonist to extracellular RNA (eRNA). The latter seems to trigger cell death via TNF- $\alpha$  and thus to regulate the extent of ischemia-reperfusion injury.

In the present work, the effects of RIPC (3 x 5 min hindlimb ischemia with 5 min reperfusion after each cycle) on rats were tested by isolated organ perfusion in a Langendorff apparatus (90 min ischemia and reperfusion each). RIPC was compared with the established cardioprotection procedure of the Calafiore-blood cardioplegia comparing hemodynamics, metabolism and structure preservation of the heart. In line with the clinical trials mentioned above, RIPC was unable to provide any additional benefit regarding hemodynamic, metabolic or structural results compared to the control and Calafiore groups. Equally consistent, however, was a significant increase in plasma RNase activity with a concomitant significant reduction of eRNA concentration in plasma.

Whether these experimental results can be transferred in a clinical sense to humans has to be viewed with great carefulness. However, the results also point to a basic problem of RIPC practicability: certain analgesics and anesthetics already have a preconditioning effect or have an inhibitory effect on the RIPC signaling pathway. Thus, it cannot be ruled out that RIPC under certain analgesia/anesthesia cannot achieve any additional benefit to MIPC.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

%	<i>Prozent</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
µmol	<i>Mikromol</i>
·OH	<i>Hydroxyl-Radikal</i>
AMI	<i>akuter Myokardinfarkt</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BCP	<i>Blutkardioplegie</i>
BGA	<i>Blutgasanalyse</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
c	<i>Konzentration</i>
Ca <sup>2+</sup>	<i>Calciumion</i>
CABG	<i>coronary artery bypass graft</i>
CaCl <sub>2</sub>	<i>Calciumchlorid</i>
C <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	<i>arterieller Sauerstoffgehalt</i>
CEI	<i>cellular edema index</i>
CF	<i>koronarer Fluss</i>
cHb	<i>Hämoglobinkonzentration</i>
CK	<i>Creatinkinase</i>
CK-MB	<i>Craetinkinase Myokardtyp</i>
cLac <sub>art</sub>	<i>arterielle Laktatkonzentration</i>
cLac <sub>ven</sub>	<i>venöse Laktatkonzentration</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
CPP	<i>koronarer Perfusionsdruck</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
cTnT	<i>kardiales Troponin T</i>
C <sub>v</sub> O <sub>2</sub>	<i>venöser Sauerstoffgehalt</i>
dl	<i>Deziliter</i>
dLVP/dt <sub>max</sub>	<i>maximale Kontraktionsgeschwindigkeit des linken Ventrikels</i>
dLVP/dt <sub>min</sub>	<i>maximale Relaxationsgeschwindigkeit des linken Ventrikels</i>
DNase	<i>Desoxyribonuklease</i>

EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERICCA	<i>Effect of Remote Ischaemic preConditioning on clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery Bypass Graft surgery</i>
eRNA	<i>extrazelluläre Ribonukleinsäure</i>
F	<i>Faktor</i>
g	<i>Gramm</i>
<i>g</i>	<i>Erdbeschleunigung</i>
G	<i>Gauge</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptid 1</i>
h	<i>Stunde</i>
H <sup>+</sup>	<i>Wasserstoffion</i>
H <sub>2</sub> O	<i>Wasser</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HCIO	<i>hypochlorige Säure</i>
HEPES	<i>Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure</i>
HF	<i>Herzfrequenz</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hscTnT	<i>high sensitivity cardiac Troponin T</i>
hsTnT	<i>high sensitivity Troponin T</i>
HTK	<i>Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat</i>
I	<i>Intersections</i>
I.E.	<i>Internationale Einheit</i>
i.p	<i>intraperitoneal</i>
I/R	<i>Ischämie-Reperfusion</i>
IPC	<i>ischaemic preconditioning</i>
IPost	<i>ischaemic postconditioning</i>
K <sup>+</sup>	<i>Kaliumion</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
KGW	<i>Körpergewicht</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
l	<i>Liter</i>
L	<i>Länge</i>
LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i>
LCA	<i>left coronary artery</i>

LDH	<i>Laktatdehydrogenase</i>
LVDP	<i>left ventricular developed pressure</i>
M	<i>Molar</i>
MAP	<i>mean aortic pressure</i>
Mf	<i>Myofibrillen</i>
mg	<i>Milligramm</i>
MgSO <sub>4</sub>	<i>Magnesiumsulfat</i>
Mi	<i>Mitochondrien</i>
microRNA-144	<i>microRibonukleinsäure 144</i>
min	<i>Minute</i>
miRNA	<i>microRibonukleinsäure</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mM	<i>Millimolar</i>
mmHg	<i>Millimeter-Quecksilbersäule</i>
MñLac	<i>myokardiale Laktatproduktion</i>
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
Myo	<i>Myozyten</i>
MVO <sub>2</sub>	<i>myokardialer Sauerstoffverbrauch</i>
n	<i>Anzahl</i>
N.	<i>Nervus</i>
n.s.	<i>nicht signifikant</i>
Na <sup>+</sup>	<i>Natriumion</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaHCO <sub>3</sub>	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NT-proBNP	<i>N-terminal pro-brain natriuretic peptide</i>
Nuc	<i>Zellkern</i>
O <sub>2</sub>	<i>Sauerstoff</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>Superoxidanion-Radikal</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
p	<i>Überschreitungswahrscheinlichkeit</i>
P	<i>Punkte</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	<i>perkutane Koronarintervention</i>
pg	<i>Pikogramm</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
pO <sub>2</sub>	<i>Sauerstoffpartialdruck</i>
Poly(C)	<i>Polycytidylic acid potassium salt</i>
r	<i>Radius</i>
R	<i>Widerstand</i>
RI	<i>Ribonuklease-Inhibitor</i>
RIC	<i>remote ischaemic conditioning</i>
RIPC	<i>remote ischaemic preconditioning</i>
RIPerC	<i>remote ischaemic perconditioning</i>
RIPHeart	<i>Remote Ischaemic Preconditioning for Heart Surgery</i>
RIPostC	<i>remote ischaemic postconditioning</i>
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RNase	<i>Ribonuklease</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPP	<i>rate pressure product</i>
rRNA	<i>ribosomale Ribonukleinsäure</i>
s	<i>Sekunde</i>
SDF-1 $\alpha$	<i>Stromal cell derived factor 1 alpha</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase</i>
SF	<i>Standardfehler</i>
sign.	<i>signifikant</i>
SO <sub>2</sub>	<i>Sauerstoffsättigung</i>
SP	<i>Sarkoplasma</i>
STEMI	<i>ST-Hebungs-Myokardinfarkt</i>
SURS	<i>systematic uniform random sampling</i>
S <sub>v</sub>	<i>Oberflächendichte</i>
SWOP	<i>second window of protection</i>
TACE	<i>TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
t <sub>ink</sub>	<i>Inkubationszeit</i>
TIVA	<i>total intravenöse Anästhesie</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
TnI	<i>Troponin I</i>
TnT	<i>Troponin T</i>

TRIS	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
U	<i>Unit</i>
V	<i>Volumen</i>
V/S-Ratio	<i>Volumen-Oberflächen-Verhältnis</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
$V_v$	<i>Volumendichte</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\Delta P$	<i>Druckdifferenz</i>
$\eta$	<i>Viskosität</i>
$\phi$	<i>Fluss</i>

## 9 Literaturverzeichnis

- Albrecht M, Zitta K, Bein B, Wennemuth G, Broch O, Renner J, et al. Remote ischemic preconditioning regulates HIF-1 $\alpha$  levels, apoptosis and inflammation in heart tissue of cardio-surgical patients: a pilot experimental study. *Basic Res Cardiol* 2013; 108 (1): 314. DOI: 10.1007/s00395-012-0314-0.
- Anttila V, Haapanen H, Yannopoulos F, Herajärvi J, Anttila T, Juvonen T. Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials. *Scand Cardiovasc J* 2016; 50 (5-6): 355–361. DOI: 10.1080/14017431.2016.1233351.
- Awan MM, Taunyane C, Aitchison KA, Yellon DM, Opie LH. Normothermic Transfer Times up to 3 Min Will Not Precondition the Isolated Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31 (3): 503–511. DOI: 10.1006/jmcc.1998.0881.
- Bagheri F, Khori V, Alizadeh AM, Khalighfard S, Khodayari S, Khodayari H. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci* 2016; 165: 43–55. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.013.
- Baker JE, Konorev EA, Gross GJ, Chilian WM, Jacob HJ. Resistance to myocardial ischemia in five rat strains: is there a genetic component of cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1395-H1400.
- Basalay MV, Mastitskaya S, Mrochek A, Ackland GL, Gutierrez del Arroyo A, Sanchez J, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning. *Cardiovasc Res* 2016; 112 (3): 669–676. DOI: 10.1093/cvr/cvw216.
- Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002; 97 (4): 268–275. DOI: 10.1007/s00395-002-0366-7.
- Behmenburg F, Heinen A, Vom Bruch L, Hollmann MW, Huhn R. Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017; 31 (4): 1223-1226. DOI: 10.1053/j.jvca.2016.07.005.
- Beintema JJ. Introduction: the ribonuclease A superfamily. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54 (8): 763–765. DOI: 10.1007/s000180050204.
- Beintema JJ, Wietzes P, Weickmann JL, Glitz DG. The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem* 1984; 136 (1): 48–64.

- Berchtold R, Bruch H-P (Hrsg.), Trentz O (Hrsg.). Chirurgie. 6., aktualisierte Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
- Billah M, Ridiandries A, Allahwala U, Mudaliar H, Dona A, Hunyor S, et al. Circulating mediators of remote ischemic preconditioning: search for the missing link between non-lethal ischemia and cardioprotection. *Oncotarget* 2019; 10 (2): 216-244. DOI: 10.18632/oncotarget.26537.
- Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic Preconditioning at a Distance. Reduction of Myocardial Infarct Size by Partial Reduction of Blood Supply Combined With Rapid Stimulation of the Gastrocnemius Muscle in the Rabbit. *Circulation* 1997; 96 (5): 1641–1646. DOI: 10.1161/01.CIR.96.5.1641.
- Böning A, Hagmüller S, Heep M, Rohrbach S, Niemann B, Mühlfeld C. Is warm or cold calafiore blood cardioplegia better? Hemodynamic, metabolic, and electron microscopic differences. *Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 62 (8): 683–689. DOI: 10.1055/s-0034-1383722.
- Böning A, Rohrbach S, Kohlhepp L, Heep M, Hagmüller S, Niemann B, et al. Differences in ischemic damage between young and old hearts — Effects of blood cardioplegia. *Exp Gerontol* 2015; 67: 3–8. DOI: 10.1016/j.exger.2015.04.012.
- Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Böttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010; 375 (9716): 727–734. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)62001-8.
- Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76 (5): 1713–1719.
- Bretschneider HJ, Gebhard MM, Preusse CJ. Cardioplegia. Principles and problems. In: Nicholas Sperelakis (Hrsg.). Physiology and Pathophysiology of the Heart. Springer US (Developments in Cardiovascular Medicine) 1984: 605–616.
- Bunte S, Behmenburg F, Eckelskemper F, Mohr F, Stroethoff M, Raupach A, et al. Cardioprotection by Humoral Factors Released After Remote Ischemic Preconditioning Depends on Anesthetic Regimen. *Crit Care Med* 2019; 47 (3): e250-e255. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003629.

- Cabrera-Fuentes HA, Niemann B, Grieshaber P, Wollbrueck M, Gehron J, Preissner KT, et al. RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection†. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; 48 (5): 732–737. DOI: 10.1093/ejcts/ezu519.
- Cabrera-Fuentes HA, Preissner KT. Abstract 20396: Induction of Ischemia-Reperfusion Injury by Extracellular RNA: A case for Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) - Shedding. *Circulation* 2014; 130 (Suppl 2): A20396-A20396.
- Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Simseyilmaz S, Kostin S, Inserte J, Saffarzadeh M, et al. RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor-alpha in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2014; 112: 1110–1119. DOI: 10.1160/TH14-08-0703.
- Calafiore AM, Teodori G, Di Giammarco G, Bosco G, Mezzetti A, Lapenna D, et al. Intermittent antegrade cardioplegia: warm blood vs cold crystalloid. A clinical study. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1994; 35 (6 Suppl 1): 179–184.
- Candilio L, Malik A, Ariti C, Barnard M, Di Salvo C, Lawrence D, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing cardiac bypass surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart* 2015; 101 (3): 185–192. DOI: 10.1136/heartjnl-2014-306178.
- Caputo M, Bryan AJ, Calafiore AM, Suleiman M-S, Angelini GD. Intermittent antegrade hyperkalaemic warm blood cardioplegia supplemented with magnesium prevents myocardial substrate derangement in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 14 (6): 596–601. DOI: 10.1016/S1010-7940(98)00247-4.
- Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized Controlled Trial of the Effects of Remote Ischemic Preconditioning on Children Undergoing Cardiac Surgery: First Clinical Application in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (11): 2277–2282. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.01.066.
- Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang K-S, Seo YH, Ahn KR, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: A randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 142 (1): 148–154. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.11.018.
- Cordell AR. Milestones in the development of cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1995; 60 (3): 793–796. DOI: 10.1016/0003-4975(95)00570-B.

- Dai W, Shi J, Carreno J, Hale SL, Kloner RA. Improved Long-term Survival with Remote Limb Ischemic Preconditioning in a Rat Fixed-Pressure Hemorrhagic Shock Model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2019; 33: 139-147. DOI: 10.1007/s10557-019-06860-6.
- Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, et al. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signalling axis. *Basic Res Cardiol* 2013; 108 (5): 377. DOI: 10.1007/s00395-013-0377-6.
- Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23 (9): 1077–1086.
- Dhein S. The Langendorff Heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M (Hrsg.). *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Berlin: Springer; 2005: 155–172.
- Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovasc Res* 2006; 70 (2): 191–199. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.01.016.
- DiBona DR, Powell WJ. Quantitative correlation between cell swelling and necrosis in myocardial ischemia in dogs. *Circ res* 1980; 47 (5): 653–665. DOI: 10.1161/01.RES.47.5.653.
- Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, et al. Rabbit heart can be “preconditioned” via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277 (6): H2451-H2457.
- Donato M, Buchholz B, Rodriguez M, Perez V, Inserte J, Garcia-Dorado D, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2013; 98 (2): 425–434. DOI: 10.1113/expphysiol.2012.066217.
- Dong JH, Liu YX, Ji ES, He RR. Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2004; 56 (1): 41–46.
- Duan X, Ji B, Wang X, Liu J, Zheng Z, Long C, et al. Expression of MicroRNA-1 and MicroRNA-21 in Different Protocols of Ischemic Conditioning in an Isolated Rat Heart Model. *Cardiology* 2012; 122 (1): 36–43. DOI: 10.1159/000338149.
- Fischer S, Cabrera-Fuentes HA, Noll T, Preissner KT. Impact of extracellular RNA on endothelial barrier function. *Cell Tissue Res* 2014; 355 (3): 635–645. DOI: 10.1007/s00441-014-1850-8.

- Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007; 110 (7): 2457–2465. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040691.
- Fischer S, Grantzow T, Pagel JI, Tschernatsch M, Sperandio M, Preissner KT, et al. Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thromb Haemost* 2012; 108 (4): 730–741. DOI: 10.1160/TH12-03-0186.
- Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiyama A, et al. Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2011; 105 (2): 345–355. DOI: 10.1160/TH10-06-0345.
- Follette DM, Mulder DG, Maloney JV, Buckberg GD. Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia. Experimental and clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978; 76 (5): 604–619.
- Futami J, Tsushima Y, Murato Y, Tada H, Sasaki J, Seno M, et al. Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol* 1997; 16 (4): 413–419. DOI: 10.1089/dna.1997.16.413.
- Gaur D, Swaminathan S, Batra JK. Interaction of Human Pancreatic Ribonuclease with Human Ribonuclease Inhibitor. GENERATION OF INHIBITOR-RESISTANT CYTOTOXIC VARIANTS. *J Biol Chem* 2001; 276 (27): 24978–24984. DOI: 10.1074/jbc.M102440200.
- Gho BCG, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation* 1996; 94 (9): 2193–2200. DOI: 10.1161/01.CIR.94.9.2193.
- Gill R, Kuriakose R, Gertz ZM, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance. *Mol Cell Biochem* 2015; 402 (1-2): 41–49. DOI: 10.1007/s11010-014-2312-z.
- Gorge G, Chatelain P, Schaper J, Lerch R. Effect of increasing degrees of ischemic injury on myocardial oxidative metabolism early after reperfusion in isolated rat hearts. *Circ Res* 1991; 68 (6): 1681–1692. DOI: 10.1161/01.RES.68.6.1681.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96 (5): 379–394.

- Gutierrez JA, Theodorou AA. Delivery and Oxygen Consumption in Pediatric Critical Care. In: Lucking SE, Maffei FA, Tamburro RF, Thomas NJ (Hrsg.). *Pediatric Critical Care Study Guide*. London: Springer; 2012.
- Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol* 2016; 111 (6): 70. DOI: 10.1007/s00395-016-0588-8.
- Hausenloy DJ, Boston-Griffiths E, Yellon DM. Cardioprotection during cardiac surgery. *Cardiovasc Res* 2012; 94 (2): 253–265. DOI: 10.1093/cvr/cvs131.
- Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, et al. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 2015; 373 (15): 1408–1417. DOI: 10.1056/NEJMoa1413534.
- Headrick JP, See Hoe LE, Du Toit EF, Peart JN. Opioid receptors and cardioprotection – ‘opioidergic conditioning’ of the heart. *Br J Pharmacol* 2015; 172 (8): 2026–2050. DOI: 10.1111/bph.13042.
- Herdson PB, Sommers HM, Jennings RB. A Comparative Study of the Fine Structure of Normal and Ischemic Dog Myocardium with Special Reference to Early Changes Following Temporary Occlusion of a Coronary Artery. *Am J Pathol* 1965; 46 (3): 367–386.
- Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 2015; 116 (4): 674–699. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
- Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65 (2): 177–195. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.10.031.
- Heusch G, Rassaf T. Time to Give Up on Cardioprotection? *Circ Res* 2016; 119 (5): 676–695. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308736.
- Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study. *Circulation* 2009; 119 (6): 820–827. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809723.
- Hu Q, Luo W, Huang L, Huang R, Chen R, Gao Y. Multiorgan protection of remote ischemic preconditioning in valve replacement surgery. *J Surg Res* 2016; 200 (1): 13–20. DOI: 10.1016/j.jss.2015.06.053.

- Ibanez B, Heusch G, Ovize M, van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65 (14): 1454–1471. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.02.032.
- Johnsen J, Pryds K, Salman R, Løfgren B, Kristiansen SB, Bøtker HE. The remote ischemic preconditioning algorithm. Effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res Cardiol* 2016; 111 (2): 10. DOI: 10.1007/s00395-016-0529-6.
- Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (15): 6388–6393. DOI: 10.1073/pnas.0608647104.
- Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, Desai J, et al. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Res Cardiol* 2011; 106 (4): 511–519. DOI: 10.1007/s00395-011-0185-9.
- Kato R, Foëx P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: An update for anesthesiologists. *Can J Anesth* 2002; 49 (8): 777–791. DOI: 10.1007/BF03017409.
- Key G. ELISA/EIA/FIA. In: Raem AM, Rauch P (Hrsg.). *Immunoassays*. 1. Aufl. Heidelberg: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag; 2007: 51–69.
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, et al. Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation* 2002; 106 (23): 2881–2883. DOI: 10.1161/01.CIR.0000043806.51912.9B.
- Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MMH, Cherepanov V, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 2004; 19 (1): 143–150. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00046.2004.
- Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 2005; 79 (12): 1691–1695.

- Kottenberg E, Musiolik J, Thielmann M, Jakob H, Peters J, Heusch G. Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 147 (1): 376–382. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.01.005.
- Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, Heine T, Jakob H, Heusch G, et al. Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol – a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56 (1): 30–38. DOI: 10.1111/j.1399-6576.2011.02585.x.
- Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, Redington AN, et al. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288 (3): H1252-H1256. DOI: 10.1152/ajpheart.00207.2004.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72 (6): 1293–1299. DOI: 10.1161/01.RES.72.6.1293.
- Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995; 268 (4): H1531-H1539.
- Landré JBP, Hewett PW, Olivot J-M, Friedl P, Ko Y, Sachinidis A, et al. Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem* 2002; 86 (3): 540–552. DOI: 10.1002/jcb.10234.
- Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflugers Arch* 1895; (61): 291–332.
- Le Page S, Prunier F. Remote ischemic conditioning. Current clinical perspectives. *J Cardiol* 2015; 66 (2): 91–96. DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.01.009.
- Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2014; 109 (5): 423. DOI: 10.1007/s00395-014-0423-z.
- Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303 (2): 67. DOI: 10.1152/ajpheart.00333.2012.

- Lieder HR, Irmert A, Kamler M, Heusch G, Kleinbongard P. Sex is no determinant of cardioprotection by ischemic preconditioning in rats, but ischemic/reperfused tissue mass is for remote ischemic preconditioning. *Physiol Rep* 2019; 7 (12): e14146. DOI: 10.14814/phy2.14146.
- Liu Z, Wang Y-L, Xu D, Hua Q, Chu Y-Y, Ji X-M. Late Remote Ischemic Preconditioning Provides Benefit to Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70 (1): 437–442. DOI: 10.1007/s12013-014-9936-1.
- Lucchinetti E, Bestmann L, Feng J, Freidank H, Clanachan AS, Finegan BA, et al. Remote Ischemic Preconditioning Applied during Isoflurane Inhalation Provides No Benefit to the Myocardium of Patients Undergoing On-pump Coronary Artery Bypass Graft SurgeryLack of Synergy or Evidence of Antagonism in Cardioprotection? *Anesthesiology* 2012; 116 (2): 296–310. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318242349a.
- Luo W, Zhu M, Huang R, Zhang Y. A comparison of cardiac post-conditioning and remote pre-conditioning in paediatric cardiac surgery. *Cardiol Young* 2011; 21 (3): 266–270. DOI: 10.1017/S1047951110001915.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88 (3): 1264–1272. DOI: 10.1161/01.CIR.88.3.1264.
- Mayhew TM. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 1991; 76 (5): 639–665. DOI: 10.1113/expphysiol.1991.sp003533.
- McClanahan TB, Nao BS, Wolke LJ, Martin BJ, Mertz TE, Gallagher KP. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J* 1993; (7): A118.
- Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, et al. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med* 2015; 373 (15): 1397–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1413579.
- Meybohm P, Kohlhaas M, Stoppe C, Gruenewald M, Renner J, Bein B, et al. RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial Dysfunction, Postoperative Neurocognitive Dysfunction, and 1 Year Follow-Up. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e008077. DOI: 10.1161/JAHA.117.008077.

- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol* 2010; 19 (2): 65–82. DOI: 10.1016/j.carpath.2008.10.015.
- Mühlfeld C, Urru M, Rümelin R, Mirzaie M, Schöndube F, Richter J, et al. Myocardial ischemia tolerance in the newborn rat involving opioid receptors and mitochondrial k<sup>+</sup> channels. *Anat Rec* 2006; 288A (3): 297–303. DOI: 10.1002/ar.a.20315.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74 (5): 1124–1136. DOI: 10.1161/01.CIR.74.5.1124.
- Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990; 66 (4): 913–931. DOI: 10.1161/01.RES.66.4.913.
- Noorbakhsh M-F, Arab H-A, Kazerani H-R. Liver ischemia preconditions the heart against ischemia-reperfusion arrhythmias. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18 (1): 80–88.
- O'Rourke B, Cortassa S, Aon MA. Mitochondrial Ion Channels: Gatekeepers of Life and Death. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 303–315. DOI: 10.1152/physiol.00020.2005.
- Pinaud F, Corbeau J-J, Baufreton C, Binuani J-P, De Brux J-L, Fouquet O, et al. Remote ischemic preconditioning in aortic valve surgery: Results of a randomized controlled study. *J Cardiology* 2016; 67 (1): 36–41. DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.06.007.
- Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38 (2): 291–300. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00033-9.
- Podesser B, Zegner M, Weisser J, Koci G, Kunold A, Hallstrom S, et al. Vergleich dreier gängiger Kardioplegielösungen—Untersuchungen am isolierten Herzen zur Myokardprotektion während Ischämie und Reperfusion. *Acta Chir Austriaca* 1996; 28 (6):346–351. DOI: 10.1007/BF02616282.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87 (3): 893–899. DOI: 10.1161/01.CIR.87.3.893.
- Randhawa PK, Jaggi AS. Investigating the involvement of TRPV1 ion channels in remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2016; 390 (2): 117–126. DOI: 10.1007/s00210-016-1311-x.

- Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning Novelty and Significance. *Circ Res* 2014; 114 (10): 1601–1610. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303822.
- Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, et al. Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51 (2): 241–250. DOI: 10.1016/S0008-6363(01)00282-6.
- Schipke J, Roloff K, Kuhn M, Mühlfeld C. Systemic, but not cardiomyocyte-specific, deletion of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase A increases cardiomyocyte number in neonatal mice. *Histochem Cell Biol* 2015; 144 (4): 365–375. DOI: 10.1007/s00418-015-1337-z.
- Schmiedl A, Schnabel PA, Mall G, Gebhard MM, Hunneman DH, Richter J, et al. The surface to volume ratio of mitochondria, a suitable parameter for evaluating mitochondrial swelling. Correlations during the course of myocardial global ischaemia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 416 (4): 305–315.
- Sharma R, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Possible role of thromboxane A<sub>2</sub> in remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2015; 389 (1): 1–9. DOI: 10.1007/s00210-015-1186-2.
- Shen AC, Jennings RB. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1972a; 67 (3): 441–452.
- Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 1972b; 67 (3): 417–440.
- Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, et al. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci* 2009; 117 (5): 191–200. DOI: 10.1042/CS20080523.
- Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca<sup>2+</sup> overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; 263 (4): H1262–H1269.
- Siewert JR, Stein HJ. Chirurgie. Berlin: Springer; 2012.
- Simsekylimaz S, Cabrera-Fuentes HA, Meiler S, Kostin S, Baumer Y, Liehn EA, et al. Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation* 2014; 129 (5): 598–606. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002562.

- Singh A, Randhawa PK, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Exploring the Role of TRPV and CGRP in Adenosine Preconditioning and Remote Hind Limb Preconditioning-Induced Cardioprotection in Rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017; 31 (2): 133–143. DOI: 10.1007/s10557-017-6716-3.
- Singh B, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Investigations on the role of leukotrienes in remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection in rats. *Life sci* 2016; 152: 238–243. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.04.005.
- Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, et al. Bidirectional Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Coronary Microembolization. *Circ Res* 2007; 100 (1): 140–146. DOI: 10.1161/01.RES.0000255031.15793.86.
- Slagsvold KH, Rognmo Ø, Høydal M, Wisløff U, Wahba A. Remote Ischemic Preconditioning Preserves Mitochondrial Function and Influences Myocardial MicroRNA Expression in Atrial Myocardium During Coronary Bypass Surgery. *Circ Res* 2014; 114 (5): 851–859. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302751.
- Sogorski A, Harati K, Kapalschinski N, Daigeler A, Hirsch T, Lehnhardt M, et al. Remote ischemic Conditioning – endogene Gewebeprotektion und ihre Einsatzmöglichkeiten in der Chirurgie. *Zentralblatt für Chirurgie - Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 2017. DOI: 10.1055/s-0041-109326.
- Southerland EM, Milhorn DM, Foreman RD, Linderroth B, DeJongste MJL, Armour JA, et al. Preemptive, but not reactive, spinal cord stimulation mitigates transient ischemia-induced myocardial infarction via cardiac adrenergic neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292 (1): H311-H317. DOI: 10.1152/ajpheart.00087.2006.
- Stieger P, Daniel J-M, Thölen C, Dutzmann J, Knöpp K, Gündüz D, et al. Targeting of Extracellular RNA Reduces Edema Formation and Infarct Size and Improves Survival After Myocardial Infarction in Mice. *J Am Heart Assoc* 2017; 6 (6): e004541. DOI: 10.1161/JAHA.116.004541.
- Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 2000; (41): 613–627.
- Swyers T, Redford D, Larson DF. Volatile anesthetic-induced preconditioning. *Perfusion* 2014; 29 (1): 10–15. DOI: 10.1177/0267659113503975.
- Teng X, Yuan X, Tang Y, Shi J. Protective effects of remote ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8 (8): 12575–12583.

- Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 2012; 382 (9892): 597–604. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61450-6.
- Tolkmitt KJ, Simseyilmaz S, Schipke J, Mühlfeld C, Preissner KT, Böning A. Influence of Medication-Induced Preconditioning or Remote Ischemic Preconditioning on the Intrinsic Vascular Extracellular RNA/Ribonuclease System in Cardioprotection. *Thorac Cardiovasc Surg* 2018. DOI: 10.1055/s-0038-1675398.
- Tomschi F, Niemann D, Bloch W, Predel H-G, Grau M. Ischemic Preconditioning Enhances Performance and Erythrocyte Deformability of Responders. *Int J Sports Med* 2018; 39: 596-603. DOI: 10.1055/a-0631-2887.
- Walker DM, Yellon DM. Ischaemic preconditioning: from mechanisms to exploitation. *Cardiovas Res* 1992; 26 (8): 734–739. DOI: 10.1093/cvr/26.8.734.
- Webster KA. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol* 2012; 8 (6): 863–884. DOI: 10.2217/fca.12.58.
- Weibel ER. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. *New York, Academic Press Vol. 1* 1997.
- Weickmann JL, Olson EM, Glitz DG. Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res* 1984; 44 (4): 1682–1687.
- Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 2003; 93 (4): 292–301. DOI: 10.1161/01.RES.0000087542.26971.D4.
- Weiße KU. Bedeutung des myokardialen Laktatmetabolismus bei kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation unter Berücksichtigung hämodynamischer Effekte. Halle (Saale): Univ., Diss.; 2001.
- WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Online: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). 2017. [eingesehen am 21.06.2019]
- Wong GTC, Lu Y, Mei B, Xia Z, Irwin MG. Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sci* 2012; 91 (17-18): 860–865. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.08.037.

- Xia Z, Li H, Irwin MG. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *Br J Anaesth* 2016; 117 Suppl 2: ii44-ii62. DOI: 10.1093/bja/aew267.
- Zangrillo A, Musu M, Greco T, Di Prima AL, Matteazzi A, Testa V, et al. Additive Effect on Survival of Anaesthetic Cardiac Protection and Remote Ischemic Preconditioning in Cardiac Surgery. A Bayesian Network Meta-Analysis of Randomized Trials. *PLoS One* 2015; 10 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0134264.
- Zaugg M, Lucchinetti E, Clanachan A, Finegan B. Remote Ischemic Preconditioning Is Redundant in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery Who Are Already Protected by Volatile Anesthetics. *Circ Res* 2012; 110 (5): e42-e43. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.265116.
- Zernecke A, Preissner KT. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2016; 118 (3): 469–479. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307961.
- Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285 (2): H579-H588. DOI: 10.1152/ajpheart.01064.2002.
- Zimmerman SB, Sandeen G. A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem* 1965; (10): 444–449.

## 10 Publikationsverzeichnis und Kongressbeiträge

Tolkmitt KJ, Simseyilmaz S, Schipke J, Mühlfeld C, Preissner KT, Böning A. Influence of Medication-Induced Preconditioning or Remote Ischemic Preconditioning on the Intrinsic Vascular Extracellular RNA/Ribonuclease System in Cardioprotection. *Thorac Cardiovasc Surg* 2018. DOI: 10.1055/s-0038-1675398.

47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG), Leipzig, 18.02.2018:

Grundlagenforschung: Myokardprotektion

K. Tolkmitt, S. Simseyilmaz, J. Schipke, C. Mühlfeld, K. Preissner, A. Böning

Influence of medication-induced preconditioning (MIPC) or remote ischemic preconditioning (RIPC) on the intrinsic vascular eRNA/RNase system in cardioprotection

## 11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

## 12 Danksagung

*Meiner Familie und meinen Freunden zum Dank.*