

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Pathophysiologie

**Kardioprotektion durch herzferne Konditionierung –
Speziesübergreifende humorale Übertragung eines
protektiven Stimulus von einem Schwein als Donor auf
ein isoliert perfundiertes Rattenherz als Bioassay**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

**Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

Vorgelegt von

Christiane Ulrike Schulte

aus Herne

2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. medic. A. Skyschally
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Thielmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. August 2016

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G (2015):

Across-species transfer of protection by remote ischemic preconditioning with species-specific myocardial signal transduction by RISK and SAFE pathways

Circulation Research 117(3):279-288

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306878

1	EINLEITUNG	5
1.1	Myokardiale Ischämie/Reperfusion.....	5
1.2	Kardioprotektion.....	5
1.3	Intrazelluläre Signaltransduktion bei Kardioprotektion.....	7
1.4	Speziesübergreifende Übertragung der Kardioprotektion / Tiermodelle.....	8
1.5	Zielsetzung.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Geräte.....	10
2.1.2	Chemikalien.....	11
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	12
2.1.5	Antikörper.....	14
2.2	Methoden.....	15
2.2.1	Plasmapräparation nach RIPC am narkotisierten Schwein.....	15
2.2.2	Isoliert perfundiertes Rattenherz nach Langendorff.....	16
2.2.2.1	Experimentelle Präparation.....	16
2.2.2.2	Versuchsprotokolle.....	16
2.2.2.3	Infarktgröße.....	18
2.2.3	Western Blot Analyse der Myokardproben.....	18
2.2.4	Statistik.....	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Infarktgrößenreduktion durch RIPC am Schwein.....	20
3.2	Das isoliert perfundierte Rattenherz nach Langendorff als Bioassay.....	20
3.2.1	Infarktgrößen und Hämodynamik ohne Plasmainfusion.....	20
3.2.2	Infarktgrößen und Hämodynamik mit Plasmainfusion.....	21
3.2.3	Western Blot Analyse in Rattenherzen mit Plasmainfusion.....	22
4	DISKUSSION	24
5	ZUSAMMENFASSUNG	27
6	LITERATURVERZEICHNIS	28
7	ANHANG	33
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	33
7.2	Tabellen.....	36
7.3	Abbildungen.....	38
8	DANKSAGUNG	43
9	LEBENS LAUF	44

1 Einleitung

1.1 Myokardiale Ischämie/Reperfusion

Der akute Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Ursachen für Tod und Erwerbsunfähigkeit in industrialisierten Gesellschaften. Ein akuter Verschluss einer großen epikardialen Koronararterie für mehr als 20-40 min führt zwangsläufig zum Myokardinfarkt. Der Infarkt breitet sich dabei im Zeitverlauf von zentralen Arealen im Endokard in Richtung des Epikards und der Randzonen des ischämischen Myokardareals aus (Reimer & Jennings, 1979). Ausschlaggebend für die finale Infarktgröße und die damit verbundene Prognose des Patienten (Sobel *et al.*, 1972) sind die Größe des Risikoareals, die Dauer der Ischämie, die kollaterale Restdurchblutung im Risikoareal während der Ischämie, die Temperatur und auch im geringen Umfang die hämodynamische Situation (Ibáñez *et al.*, 2015). Der zeitliche Verlauf der Infarktausbreitung ist stark spezieabhängig. Bei kleinen Nagetieren mit einer hohen Herzfrequenz und einer geringeren Kollateraldurchblutung ist die endgültige Infarktgröße bereits nach 30 min Ischämie erreicht. Bei größeren Säugern, einschließlich dem Menschen, ist die zeitliche Ausbildung des Myokardinfarktes wesentlich langsamer und kann bis zu Stunden dauern (Schaper *et al.*, 1988).

Die einzige Maßnahme gegen eine weitere Ausbreitung des Myokardinfarktes während der Ischämie ist die möglichst rasche Wiederherstellung der Durchblutung, die sogenannte Reperfusion. Allerdings induziert auch die Reperfusion selbst weitere zum Teil irreversible Myokardschäden durch zusätzliche Nekrose (Matsumura *et al.*, 1998) und mikrovaskuläre Perfusionsstörungen (Kloner *et al.*, 1974). Die finale Infarktgröße ist somit die Summe eines Ischämie- und eines Reperfusionsschadens (Skyschally *et al.*, 2008).

1.2 Kardioprotektion

Durch kardioprotektive Manöver wird der Myokardschaden und somit die finale Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion reduziert. Murry *et al.* (1986) konnten im Tiermodell am Hund zeigen, dass vier kurze je 5 min dauernde Koronarklusionen mit jeweils anschließend 5 min Reperfusion unmittelbar vor einer 40 min andauernden Ischämie mit nachfolgender Reperfusion die Infarktgröße reduzieren. Diese ischämische Präkonditionierung (IP) konnte in allen bislang untersuchten Spezies, auch beim Menschen, nachgewiesen werden (Skyschally *et al.*, 2008). Allerdings ist die klinische Relevanz von IP aufgrund der zeitlichen Vorgabe des Manövers, d.h. vor einer Myokardischämie, nur bei wenigen klinischen Szenarien, wie z.B. bei elektiven perkutanen koronaren Interventionen oder vor Koronararterien-Bypass-Operationen, möglich (Heusch, 2013). Kardioprotektion durch ischämische Postkonditionierung (PoCo), mehrfach wiederholte kurze Unterbrechungen der Durchblutung unmittelbar am Beginn der Reperfusion, wurde 2003 von Zhao *et al.* in einem experimentellen Modell am Hund beschrieben. PoCo hat durch die Zeitigkeit der Anwendung mit Beginn der Reperfusion eine hohe klinische Relevanz und

konnte erfolgreich auf Patienten mit akutem Myokardinfarkt übertragen werden (Staat *et al.*, 2005). Allerdings birgt PoCo durch die zusätzlichen mechanischen Manipulationen an einem bereits geschädigten Koronargefäß das Risiko einer koronaren Mikroembolisation und konnte sich deshalb nicht im klinischen Alltag etablieren (Heusch, 2013).

Im Vergleich zu IP und PoCo ist Kardioprotektion durch herzferne Konditionierung, im englischen Sprachgebrauch als *Remote Ischemic PreConditioning* (RIPC) bezeichnet, in der klinischen Situation einfach und risikoarm anzuwenden. Ein kardioprotektives RIPC Manöver besteht aus wiederholten kurzen Episoden von Ischämie/Reperfusion an einem herzfernen Organsystem (Gho *et al.*, 1996; Pell *et al.*, 1998) oder an einer Extremität (Kharbanda *et al.*, 2002) kurz vor einer länger andauernden myokardialen Ischämie. Auch dieses kardioprotektive Manöver wurde erfolgreich in allen bislang untersuchten Spezies (Heusch *et al.*, 2015), einschließlich dem Menschen (Ovize *et al.*, 2013), nachgewiesen. Durch wiederholte kurze Inflation/Deflation einer Blutdruckmanschette am Oberarm wurde die Infarktgröße, gemessen an der Troponin I Freisetzung, bei Patienten nach einer Koronararterien-Bypass-Operation (Hausenloy *et al.*, 2007; Thielmann *et al.*, 2010) oder nach einer perkutanen koronaren Intervention (Davies *et al.*, 2013) reduziert. Nach einer Koronararterien-Bypass-Operation wurde der Schutz durch RIPC auch in der Gesamtmortalität und in der Inzidenz kardialer und zerebrovaskulärer Ereignisse im Folgezeitraum von bis zu vier Jahren nachgewiesen (Thielmann *et al.*, 2013). Ähnlich positive Ergebnisse wurden bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beobachtet, wenn diese während der Ischämie aber noch vor der Reperfusion einem RIPC Manöver unterzogen wurden (Bøtker *et al.*, 2010; Sloth *et al.*, 2014). In zwei großen multizentrischen Studien zum Schutz durch RIPC bei Koronararterien-Bypass-Operationen (ERICCA; Hausenloy *et al.*, 2015 und RIPHeart; Meybohm *et al.*, 2015) konnte allerdings kein protektiver Effekt hinsichtlich einer Infarktgrößenreduktion bzw. verbesserter Prognose durch RIPC nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür liegt darin, dass bei fast allen Patienten während der Koronararterien-Bypass-Operation Propofol als Narkose eingesetzt wurde. Unter Propofolnarkose kann die Infarktgröße durch RIPC nicht verringert werden (Kottenberg *et al.*, 2012; Bautin *et al.*, 2014). Bisher ist unklar, wie der schützende Stimulus von dem Organ oder der Extremität an der das RIPC Manöver durchgeführt wird, zum Zielorgan Herz gelangt. In der Literatur werden sowohl die neuronale (Kingma *et al.*, 2011) und/oder humorale (Shimizu *et al.*, 2009) Übertragung als auch eine Interaktion zwischen beiden Wegen (Lim *et al.*, 2010) diskutiert. Experimentelle Befunde zur neuronalen Übertragung des Stimulus sind nicht konsistent. An der Ratte konnte mit dem neuronalen Antagonisten Hexamethonium die Kardioprotektion durch RIPC inhibiert werden (Gho *et al.*, 1996). Dieser Befund wurde von Weinbrenner *et al.* (2002) nicht bestätigt. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der humoralen Übertragung eines kardioprotektiven RIPC Stimulus.

1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion bei Kardioprotektion

Die beteiligten Signalwege der Kardioprotektion innerhalb des ischämisch/reperfundierten Myokards sind im Detail noch nicht vollständig geklärt. Allen Signalwegen gemeinsam ist, dass sie von Triggern aktiviert und über Mediatoren an einen Endeffektor übermittelt werden (Heusch, 2015). In der aktuellen Literatur werden drei intrazelluläre Signalkaskaden diskutiert, die an der Kardioprotektion beteiligt sind:

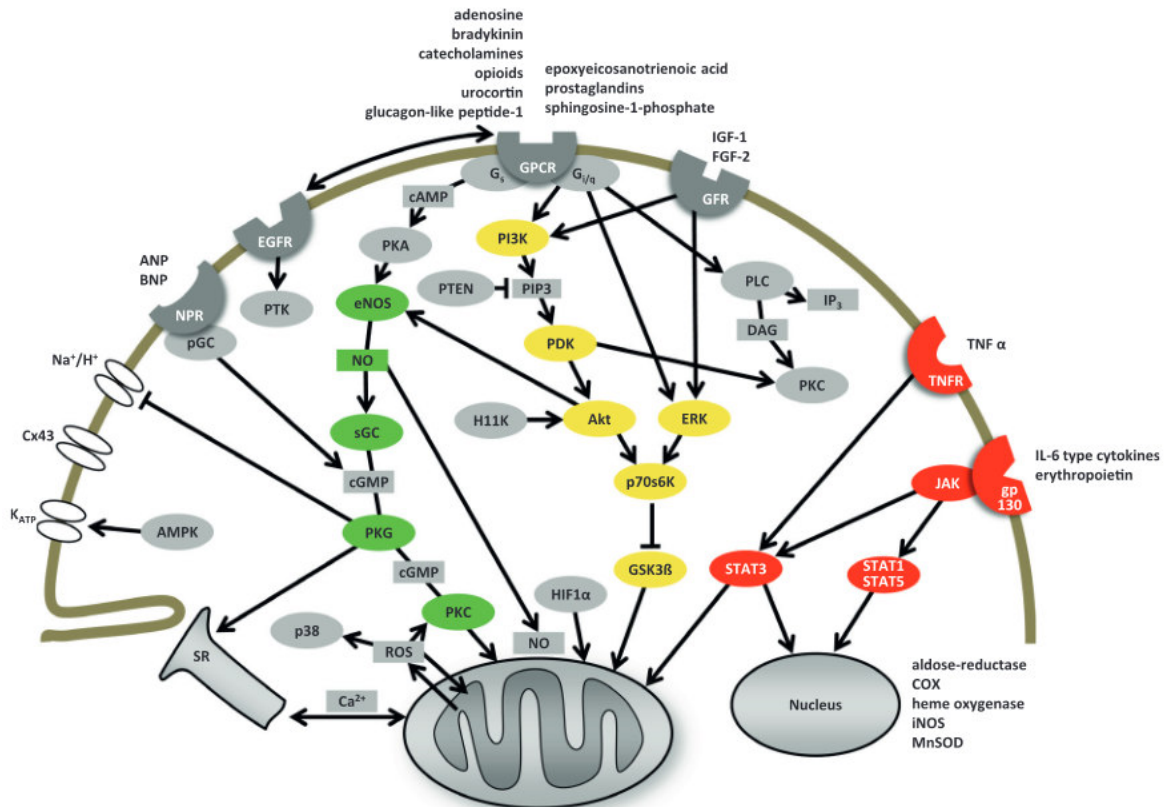


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kardioprotektiven Signaltransduktion (Heusch, 2015)

Proteinkinase B (AKT), Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Cyclooxygenase (COX), Connexin 43 (Cx 43), Diacylglycerol (DAG), epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), extrazellulär regulierte Kinase (ERK1/2), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), stimulatorisches/inhibitorisches G-Protein (G_s/G_{i/q}), G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), Glykoprotein130 (gp130), Glykogensynthase-Kinase-3 beta (GSK3β), Schwefelwasserstoff (H₂S), Hitzeshock-Protein 11 Kinase (H11K), Hypoxie-induzierter Faktor 1α (HIF1α), insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Inositoltrisphosphat (IP₃), Januskinase (JAK), ATP-abhängiger Kaliumkanal (K_{ATP}), Natrium/Protonen Austauscher (Na⁺/H⁺), natriuretischer Peptidrezeptor (NPR), Peroxisomproliferator-aktivierter-Rezeptor-gamma-Coaktivator (pGC), p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38), Stickstoffmonoxid (NO), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase G (PKG), Phospholipase C (PLC), Phosphatase und Tensin homolog (PTEN), Protein Tyrosin Kinase (PTK), Sauerstoffradikale (ROS), lösliche Guanylatcyclase (sGC), Sarcoplasmatisches Retikulum (SR), Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), Tumornekrosefaktor α (TNFα). Der NO/PKG Signalweg ist grün, der RISK Signalweg in gelb und der SAFE Signalweg in rot dargestellt.

1. Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G (NO/PKG) Signalweg (grün): Durch die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wird die NO-Bildung gesteigert, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) über die PKG führt (Cohen & Downey, 2007).
2. *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) Signalweg (gelb): Eine Aktivierung der parallel verlaufenden Mediatoren Proteinkinase B (AKT) und der extrazellulär regulierten Kinase

(ERK1/2) führt zu einer Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) (Hausenloy *et al.*, 2005).

3. *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) Signalweg (rot): Durch Zytokine, wie z.B. dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interleukine werden unter Mitwirkung der Januskinase (JAK) verschiedene Isoformen des *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) aktiviert (Lacerda *et al.*, 2009).

Alle drei Signalwege konvergieren letztendlich auf die Mitochondrien als potentielle Endeffektoren der Kardioprotektion. Unabdingbar für das Überleben eines Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion sind die erhaltene Mitochondrienfunktion und –integrität. Ein Hauptgrund für das Versagen der Mitochondrien nach Ischämie/Reperfusion ist die Öffnung der MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), die zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt und gleichzeitig das proapoptotische Cytochrom C freisetzt. Durch kardioprotektive Manöver wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der MPTP in der Reperfusion herabgesetzt (Heusch, 2015) und die Mitochondrienfunktion bleibt besser erhalten (Heusch *et al.*, 2011a).

In Tiermodellen ist eine Beteiligung sowohl des RISK als auch des SAFE Signalwegs an der Kardioprotektion seit langem etabliert. Eine Infarktgrößenreduktion nach Ischämie/Reperfusion wurde durch eine exogene Gabe der Rezeptoragonisten Bradykinin bei Mäusen oder Urocortin bei Ratten in Verbindung mit einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und von AKT und ERK1/2 in der frühen Phase der Reperfusion gezeigt (Bell & Yellon, 2003; Schulmann *et al.*, 2011). In kleinen Nagern (Mäuse, Ratten, Kaninchen) ist der RISK Signalweg auch bei der Kardioprotektion durch IP und PoCo involviert (Hausenloy *et al.*, 2005) und anscheinend unentbehrlich für die Kardioprotektion. Für die Kardioprotektion durch PoCo am Schwein ist RISK ohne Bedeutung (Skyschally *et al.*, 2009).

In STAT3-defizienten Mäusen konnte keine Infarktgrößenreduktion durch IP oder pharmakologische Kardioprotektion durch TNF α induziert werden (Smith *et al.*, 2004). Die STAT3 Aktivierung ist notwendig für die Kardioprotektion durch hypoxische Präkonditionierung in Kardiomyozyten der Maus (Suleman *et al.*, 2008) und an der Kardioprotektion durch PoCo ist STAT3 sowohl in Mäusen (Boengler *et al.*, 2008a) als auch in Schweinen (Heusch *et al.*, 2011a) kausal beteiligt. Welche Signalkaskaden bei der Kardioprotektion durch RIPC beteiligt sind, ist im Detail noch unklar.

1.4 Speziesübergreifende Übertragung der Kardioprotektion / Tiermodelle

In der Grundlagenforschung werden klinirelevante Tiermodelle immer dann eingesetzt, wenn klinische Studien nicht möglich sind oder die Ergebnisse durch Störfaktoren wie inhomogene Patientenkollektive, Komorbiditäten und/oder Komedikationen beeinflusst werden. Als klinirelevantes Tiermodell zur Untersuchung von Myokardischämie und –reperfusion ist das Schwein besonders gut geeignet. Das Schweineherz ist in seiner Größe, der Anatomie der

Koronararterien, der systemischen Hämodynamik und der Infarktentstehung und -ausbreitung mit dem menschlichen Herzen vergleichbar (Heusch *et al.*, 2011b). Ein Nachteil dieses Tiermodells sind allerdings die hohen Kosten. Ein weiteres etabliertes Tiermodell ist das isoliert perfundierte Rattenherz nach Langendorff (Langendorff, 1895). Trotz der vom Herzen großer Säuger abweichenden Koronaranatomie und der sehr unterschiedlichen Hämodynamik können auch in diesem Modell reproduzierbare Untersuchungen zu Ischämie/Reperfusion und Kardioprotektion durchgeführt werden. Ein Vorteil dieses Modells sind die geringeren Kosten hinsichtlich der Präparation und der geringere Bedarf an pharmakologischen Substanzen, wie z.B. spezifischen Signalwegblockern. In den vorliegenden Untersuchungen werden deshalb beide Modelle miteinander kombiniert. Am Schwein wird in Versuchen mit und ohne Kardioprotektion durch RIPC Plasma gewonnen, welches dann in einem isoliert perfundierten Rattenherz als Bioassay weiter untersucht wird. Ein wesentlicher Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass mit einer Plasmaprobe vom Schwein mehrere Versuche im Bioassay durchgeführt werden können. Somit kann ein und dieselbe Plasmaprobe im Bioassay zuerst nativ untersucht werden und danach durch den zusätzlichen Einsatz von signalwegspezifischen Blockern weiter charakterisiert werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Informationen über den durch RIPC induzierten und humoral übertragbaren kardioprotektiven Stimulus und dessen im Zielorgan Herz ausgelöste Signaltransduktion zu gewinnen. Plasma von Schweinen, entnommen nach einem erfolgreichen RIPC bzw. Placebo Manöver, wird im isoliert perfundierten Rattenherz als Bioassay auf eine spezieübergreifende Kardioprotektion hin untersucht. Danach wird unter Einsatz von signalwegspezifischen Inhibitoren die kausale Beteiligung des RISK und SAFE Signalwegs an der Kardioprotektion im Rattenherzen überprüft.

1. Etablierung eines isoliert perfundierten Rattenherzes nach Langendorff als Bioassay (reproduzierbare Infarktgrößen nach globaler Ischämie/Reperfusion und reproduzierbare Infarktgrößenreduktion durch IP)
2. Einsatz des Bioassays zum Nachweis eines spezieübergreifenden kardioprotektiven Stimulus im Plasma von Schweinen mit und ohne RIPC Manöver
3. Überprüfen der Beteiligung der RISK und SAFE Signalwege im Rattenherz durch den Einsatz von signalwegspezifischen Inhibitoren
4. Nachweis der kausalen Beteiligung von RISK und SAFE mittels Western Blot Analyse

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ChemoCam	Intas, Göttingen, DE
Flow Probe (Type 1N-HSE)	HSE Harvard Apparatus, March-Hugstetten, DE
Gel- und Blottingkammersystem Criterion™ XT	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gewebedispensierer Ultra-Turrax T10 Basic	IKA, Staufen, DE
Glasware (Wärmetauscher, Puffergefäße)	Glastechnische Werkstatt Verhees, Neuss, DE
Heizblock BT 130-1	HLC, Pforzheim, DE
Magnetrührplatte MR 3001	Heidolph, Schwabach, DE
Messdatenerfassung Powerlab 8/35	ADInstruments, Oxford, UK
Mikrotiterplatten-Leser iMark™	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Perfusionspumpe Aladdin	WPI, Sarasota, FL, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, DE
Reinstwasseranlage Milli-Q Advantage A 10	Millipore, Schwalbach, DE
Rollerpumpe Reglo Digital	Ismatec, Glattbrugg, DE
Scanner Epson Perfection 4870 Photo	Epson, Meerbusch, DE
TAM-A Plugsys Transducer (Type 705/1)	HSE Harvard Apparatus, March-Hugstetten, DE
TTFM Transit Time Flowmeter (Type 700)	HSE Harvard Apparatus, March-Hugstetten, DE
Vortex MS1 Minishaker	IKA, Staufen, DE
Waagen 770 P1000N	Kern, Balingen, DE Mettler, Gießen, DE
Wärmethermostat E100	LAUDA, Lauda-Königshofen, DE
Wasserbad Typ 1002	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Albumin-Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem, Darmstadt, DE
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO; C ₂ H ₆ OS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Applichem, Darmstadt, DE
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Applichem, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Kochsalzlösung (NaCl)	B. Braun, Melsungen, DE
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker, Center Valley, PA, USA
Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS; NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Serva, Oftringen, CH
Natrium-Heparin	Ratiopharm, Ulm, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Applichem, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial, Hallbergmoos, DE
Ponceau S-Lösung	Serva, Oftringen, CH
Probenpuffer XT (4x)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Proteinstandard Precision Plus	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Oftringen, CH
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Stattic (C ₈ H ₅ NO ₄ S)	Tocris, Bristol, UK
Super Signal West Femto Substrat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Base (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
U0126	Tocris, Bristol, UK
Wortmannin	Tocris, Bristol, UK

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Drei-Wege-Hähne	Smiths Medical, Grasbrunn, DE
Druckaufnehmer DPT-6000	Codan, Forstinning, DE
Filter-Papier für Western Blots	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
Gele Criterion™ XT (12% Bis-Tris)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MF-Millipore Membran Type HAWP 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Mikrotiterplatten 96 Wells	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE; Roth, Karlsruhe, DE Biozym, Balingen, DE
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Schläuche (Tygon und Silikon)	VWR, Radnor, PA, USA
Shandon™ Cryomatrix™	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
S-Monovetten® 9 ml Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE
Spritzenfilter 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zentrifugengefäße (15 ml, 50 ml)	Kisker, Steinfurt, DE

2.1.4 Puffer und LösungenPuffer und Lösungen für das isoliert perfundierte Rattenherz nach Langendorff

Perfusionspuffer:

modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP):

118,0 mmol/l	NaCl
4,7 mmol/l	KCl
1,6 mmol/l	MgSO ₄
1,2 mmol/l	KH ₂ PO ₄
5,6 mmol/l	Glucose
24,9 mmol/l	NaHCO ₃
2,0 mmol/l	Natriumpyruvat
2,0 mmol/l	CaCl ₂

in *Aqua dest.* gelöst

Erwärmt auf 37°C und durch Begasung mit Carbogengas (95% O₂ und 5% CO₂)

auf pH = 7,4 eingestellt

TTC-Färbelösung für die Infarktgrößenbestimmung am Rattenherz:

Natriumphosphat-Puffer:

0,1 mol/l Na₂HPO₄
0,1 mol/l NaH₂PO₄
1,25 mmol/l Dextran T 40
in *Aqua dest.* gelöst

Färbelösung:

60 mmol/l TTC gelöst in Natriumphosphat-Puffer

Inhibitor RISK Signalweg:

- Stammlösung Wortmannin: 10 mmol/l in DMSO, aliquotiert und bei -20°C gelagert
- Stammlösung U0126: 100 mmol/l in DMSO, aliquotiert und bei -20°C gelagert
- Gebrauchslösung Wortmannin + U0126: je 1 µmol/l in 1 l KHP

Inhibitor SAFE Signalweg

- Stammlösung Stattic: 100 mmol/l in DMSO, aliquotiert und bei -20°C gelagert
- Gebrauchslösung Stattic: 10 µmol/l in 1 l KHP

Puffer zur Herstellung von Proteinlysaten

Homogenisierungspuffer:

0,1 mol/l Tris
2% (w/v) SDS
in *Aqua dest.* gelöst

Puffer und Lösungen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Laufpuffer:

Stammlösung Towbinpuffer (10x):

0,25 mol/l Tris
1,9 mol/l Glycin
in *Aqua dest.* gelöst; pH = 8,3 – 8,5

Gebrauchslösung: 1% (w/v) SDS in 1x Towbinpuffer gelöst

Transferpuffer:

Gebrauchslösung: 20% (v/v) CH₃OH in 1x Towbinpuffer

Waschpuffer:

Stammlösung Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)-Puffer:

0,2 mol/l Tris

1,4 mol/l NaCl

in *Aqua dest.* gelöst; mit 3%iger HCl auf pH = 7,6 einstellen

Gebrauchslösung: 0,1% (v/v) Tween 20 in TBS (TBST)

Blockierlösung:

Gebrauchslösung: 5% (w/v) Milchpulver gelöst in TBST

Strippingpuffer:

Gebrauchslösung:

0,165 mol/l Tris

0,25 mol/l NaOH

in *Aqua dest.* gelöst

2.1.5 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper bei der Western Blot Analyse

Antikörper	Phosphorylierungs- stelle	Quelle	Größe (kDa)	Hersteller	Verdünnung in 5% BSA	Konzentration sekundärer Antikörper
pAKT	Serin ₄₇₃	Kaninchen	56	Cell Signalling	1:250	1:10.000
AKT	-	Kaninchen	56	Cell Signalling	1:1.000	1:20.000
pERK1/2	Tyrosin ₂₀₄	Kaninchen	44/42	Cell Signalling	1:1.000	1:20.000
ERK1/2	-	Kaninchen	44/42	Cell Signalling	1:1.000	1:20.000
pSTAT3	Tyrosin ₇₀₅	Maus	86	Cell Signalling	1:750	1:20.000
STAT3	-	Kaninchen	86	R&D Systems	1:1.000	1:20.000

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper bei der Western Blot Analyse

Antikörper	Abkürzung	Quelle	Hersteller	Verdünnung in 5% Milch
Peroxidase- konjugierter anti- Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen	Ziege	Cell Signalling	1:10.000 1:20.000
Peroxidase- konjugierter anti- Maus IgG	Anti-Maus	Pferd	Cell Signalling	1:20.000

2.2 Methoden

Im Rahmen des DFG Projekts „Zusammenfassende und translationale Analyse der kardioprotektiven Signaltransduktion bei Konditionierung“ (He 1320/18-3) wurden am Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen Akutversuche zu Ischämie/Reperfusion und Kardioprotektion durch RIPC an narkotisierten Schweinen durchgeführt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit habe ich Blutproben vom Schwein entnommen und das Plasma separiert. Diese Plasmaproben sind die Grundlage für die in der Zielsetzung unter Punkt 2.4 beschriebenen Aufgaben. Der Vollständigkeit halber werden in den Abschnitten 2.2.1 und 3.1 kurz die Versuche am Schwein und die daraus gewonnenen Ergebnisse beschrieben.

2.2.1 Plasmapräparation nach RIPC am narkotisierten Schwein

Die Versuche am Schwein wurden durch das Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen (G1240/11) genehmigt und die Durchführung der Tierversuche entsprach den Leitlinien der *National Institutes of Health* (85-23) in der revidierten Version von 1996.

Göttinger Minischweine (20 - 40 kg) wurden mit Flunitrazepam (0,4 mg/kg i.m.) sediert und mit Etomidat (0,3 mg/kg i.v.) und Sufentanil (1 µg/kg i.v.) anästhesiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere intubiert und mit 2% Isofluran in mit Sauerstoff angereicherter Luft beatmet. Eine *arteria carotis* wurde zur Abnahme von Blut aus der absteigenden thorakalen Aorta mit einem Teflonkatheter kanüliert.

Das linke Hinterbein des Versuchstiers wurde rasiert und mit einer Schlinge versehen. Durch Abbinden des Beins wurde die Blutzufuhr unterbrochen, erkennbar an der blassen Hautfarbe des Hinterbeins. Nach 5 min wurde die Schlinge wieder gelöst und das Hinterbein für 5 min reperfundiert. Die Reperfusion wurde durch den unmittelbaren Wechsel der Hautfarbe verifiziert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Für ein Placebo Manöver wurde die Schlinge angelegt, aber nicht zugezogen.

Eine Stunde nach einem RIPC oder Placebo Manöver wurden über den Teflonkatheter 100 - 120 ml arterielles Blut in Lithium-Heparin Blutentnahme Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde sofort bei 4°C für 10 min mit 800 g zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und erneut bei 4°C für 10 min mit 4500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und das Plasma bei -80°C gelagert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird Plasma, das nach einem RIPC bzw. Placebo Manöver gewonnen wurde, als RIPC Plasma bzw. Placebo Plasma bezeichnet. Nach der Blutentnahme wurde mit der weiteren Präparation fortgefahren.

Durch eine links-laterale Thorakotomie wurde das Herz freigelegt und distal des zweiten Diagonalastes wurde der *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie mit einem Seidenfaden umschlungen und anschließend für 60 min okkludiert. Nach 180 min Reperfusion wurde das Gefäß erneut verschlossen und zur Abgrenzung des Risikoareals wurden 5 ml Patentblau in den linken Vorhof injiziert. Das Schwein wurde in Narkose getötet und das Herz aus dem

Thorax entfernt, in fünf transversale Scheiben geschnitten und für 20 min bei 37°C in TTC-Färbelösung zur Abgrenzung von infarziertem und vitalem Myokard inkubiert. Die Schnittflächen des linken Ventrikels, des Risikoareals und des infarzierten Myokards wurden am Computer planimetrisch vermessen. Nach der Normalisierung auf das Herzscheibengewicht wurde das Risikoareal als prozentualer Anteil des linken Ventrikels und die Infarktgröße als prozentualer Anteil des Risikoareals berechnet. Die Infarktgrößenreduktion durch RIPC diente als Beleg für eine erfolgreiche Kardioprotektion.

2.2.2 Isoliert perfundiertes Rattenherz nach Langendorff

Die Versuche an der Ratte wurden durch das LANUV Nordrhein-Westfalen (B1322/12) genehmigt und die Durchführung der Tierversuche entsprach den Leitlinien der *National Institutes of Health* (85-23) in der revidierten Version von 1996.

2.2.2.1 Experimentelle Präparation

Männliche Lewis Ratten (250 – 400 g) wurden mit einer intraperitonealen Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital (400 mg/kg) und 2000 IU Heparin narkotisiert. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde der Thorax geöffnet und das Tier durch Durchtrennen der Aorta getötet. Das Herz wurde entnommen und sofort in 4°C kalte NaCl Lösung überführt. Anschließend wurde das Herz in die Langendorff Apparatur (siehe Abbildung 2) eingebracht und mit modifiziertem KHP (Abbildung 2 A) druckkonstant bei 65 – 67 mmHg retrograd perfundiert (Abbildung 2 J+K). Das linke

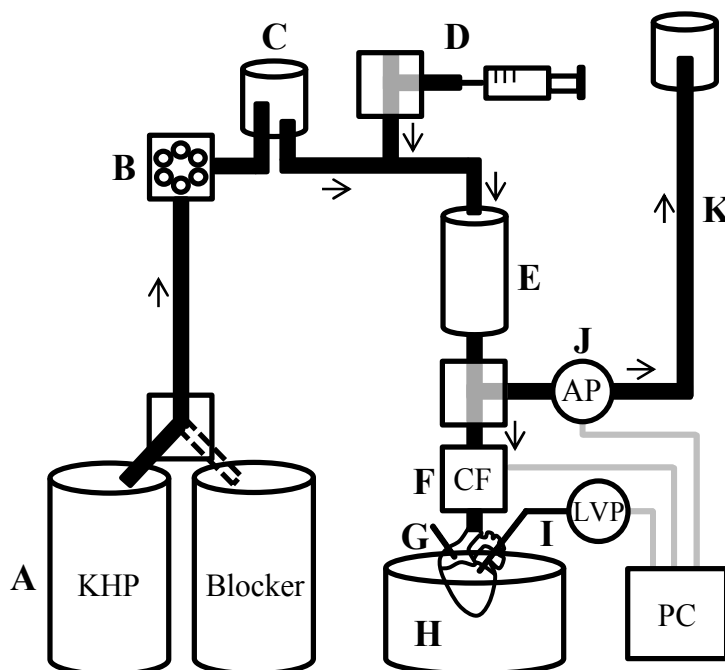


Abbildung 2: Schematische Skizze der Langendorff Apparatur:

A: Puffergefäße mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) oder Blockern mit Umschaltventil B: Rollerpumpe; C: Windkessel; D: Perfusorpumpe zur Plasmainfusion; E: Wärmetauscher; F: Ultraschall-Durchflussmesskopf zur Messung des Koronarflusses (CF); G: Pacer-Elektrode; H: Wärmebad; I: Latexballon zur Einstellung der Vorlast und Messung des linksventrikulären Durchs (LVP); J: Messung des Aortendrucks (AP); K: Steigrohr für die Perfusionsdruckkontrolle (135 cm Wassersäule)

Herzohr wurde entfernt und über den linken Vorhof wurde ein Latexballon in den linken Ventrikel eingeführt. Zur Vorlast des linken Ventrikels wurde der Ballon mit *Aqua dest.* bis zu einem minimalen diastolischen Druck von 5 – 15 mmHg gefüllt. Gleichzeitig wurde über den Ballon der links-ventrikuläre Druck gemessen (Abbildung 2 I). Über eine Elektrode am rechten Herzohr wurde die Herzfrequenz durch elektrische Stimulation kontrolliert (Abbildung 2 G). Die Herzfrequenz des isolierten

Herzens wurde direkt nach Einbringen in die Anlage, abhängig von der Spontanfrequenz, auf 350 – 400 Schläge pro Minute eingestellt und konstant gehalten. Der koronare Fluss wurde mit einem Ultraschall-Durchlaufflussmesskopf gemessen (Abbildung 2 F). Das Herz wurde während des gesamten Versuchs von 37°C warmen und mit Carbogen begasten KHP umspült (Abbildung 2 H). Vor dem Einsatz im Bioassay wurde das Plasma bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut bei 4°C für 10 min mit 4500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert. Das Plasma wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe dem Perfusat vor dem Wärmetauscher (Abbildung 2 D) in einer Verdünnung von 1:10 hinzugefügt. Um die Beteiligung des RISK Signalwegs zu überprüfen, wurde der PI3K Inhibitor Wortmannin (Wymann *et al.*, 1996) und der ERK1/2 Inhibitor U0126 (Favata *et al.*, 1998) verwendet. Die Inhibition des SAFE Signalwegs wurde mit dem STAT3 Inhibitor Stattic durchgeführt (Boengler *et al.*, 2008a; Boengler *et al.*, 2008b). Wortmannin und U0126 wurden zunächst in DMSO gelöst und anschließend in einer Konzentration von je 1 µmol/l in KHP verdünnt. Stattic wurde zunächst in DMSO gelöst und in 10 µmol/l eingesetzt. Die Inhibitoren wurden in einem zweiten Puffergefäß in KHP gelöst (Abbildung 2 A) und die Herzen wurden für 20 min vorbehandelt.

2.2.2.2 Versuchsprotokolle

Alle isoliert perfundierten Herzen wurden zunächst einer 20 minütigen Stabilisierungsphase unterzogen. Anschließend wurde eines der in Abbildung 3 schematisch dargestellten Protokolle durchgeführt:

- a:** Zeitkontrolle: 150 min Normoperfusion (n=5)
- b:** Ischämie/Reperfusion: 30 min globale Ischämie mit anschließender 120 minütiger Reperfusion (n=5)
- c:** IP: dreimal je 3 min globale Ischämie gefolgt von 3 min Reperfusion, danach wie **b** (n=5)
- d:** Plasmainfusion: Infusion von RIPC oder Placebo Plasma 8 min vor der globalen Ischämie und in den ersten 5 min der Reperfusion (RIPC n=13, Placebo n=11)
- e:** Plasmainfusion unter RISK Blockade (RISK-BL): 20 minütige Infusion von Wortmannin und U0126, danach wie **d** (jeweils n=5)
- f:** Plasmainfusion unter SAFE Blockade (SAFE-BL): 20 minütige Infusion von Stattic, danach wie **d**. Anders als in **e** wurde Stattic bis zum Versuchsende gegeben. (jeweils n=4)

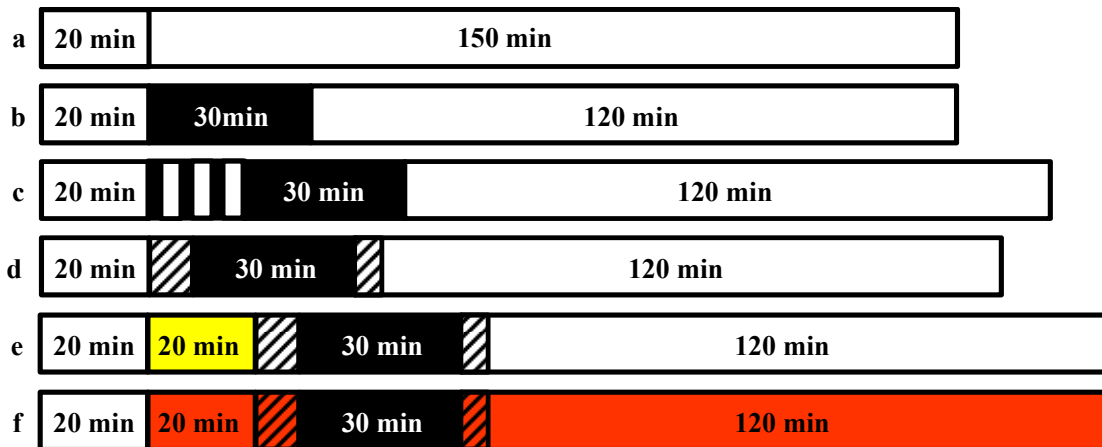


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle

Weißer Balken: Normoperfusion, schwarzer Balken: globale Ischämie, schraffierter Balken: Plasmainfusion, gelb: RISK Blockade, rot: SAFE Blockade

a: Zeitkontrolle; b: Ischämie/Reperfusion; c: Ischämische Präkonditionierung; d: Plasmainfusion; e: Plasmainfusion unter RISK Blockade; f: Plasmainfusion unter SAFE Blockade

2.2.2.3 Infarktgröße

Nach 120 min Reperfusion wurde das Rattenherz aus der Anlage entfernt, die Herzspitze (50 – 70 mg) wurde abgeschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Das restliche Herz (600 – 900 mg) wurde in Cryomatrix eingebettet, für 10 min bei -20°C eingefroren, in 5 – 6 transversale Scheiben geschnitten und in TTC-Färbepuffer bei 37°C für 20 min gefärbt. Die Scheiben wurden gewogen, von beiden Seiten fotografiert und am Computer mit der Software Corel PHOTO-PAINT 12 planimetrisch ausgewertet. Die Masse des infarzierten Myokards wurde durch Normalisierung auf das Herzscheibengewicht bestimmt und die Infarktgröße als prozentualer Anteil des linken und rechten Ventrikels angegeben.

2.2.3 Western Blot Analyse der Myokardproben

Die Herzspitzen wurden im gefrorenen Zustand mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt und sofort für 10 – 30 s mit einem Dispergierer homogenisiert. Die Proben wurden für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend für 10 min bei 16200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration des Überstandes wurde nach Lowry (Lowry *et al.*; 1951) bestimmt.

Für die Auftrennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Schägger *et al.*; 1987) wurden je Spur 30 μg Protein eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde mit 12%igen Gelen bei 200 V für 50 min durchgeführt. Anschließend wurden die separierten Proteine bei 100 V für 90 min auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels Ponceau-Färbung wurde der Proteintransfer qualitativ überprüft. Zur Unterdrückung von unspezifischen Banden wurde die Membran für 60 min in Blockierlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Membran mit einem in BSA gelöstem Primärantikörper, der spezifisch gegen eines der zu untersuchenden Zielproteine gerichtet ist, bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit einem in Blockierlösung gelösten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Der

Sekundärantikörper bindet an speziesspezifische Bereiche des Primärantikörpers. Nach Zugabe des Substrats führt die enzymatische Aktivität der Peroxidase des Sekundärantikörpers zu einer Oxidation von Luminol. Die bei dieser Reaktion entstandene Lumineszenz ist proportional zu der durch den Primärantikörper markierten Proteinmenge. Die Lumineszenz wurde mit einer CCD-Kamera detektiert und mit der Software LabImage1D quantifiziert.

Da die Menge an phosphoryliertem Protein sehr gering ist, wurden die Membranen zuerst auf die Phospho-Formen von AKT, ERK1/2 und STAT3 untersucht. Anschließend wurden alle Antikörperbindungen auf der Membran durch *Strippen*, mit einem stark alkalischen Puffer bei 55°C für 10 min, entfernt. Danach wurden die Gesamtformen der Proteine detektiert und quantifiziert. Die Lumineszenzsignale der Phospho-Formen wurden auf die Lumineszenzsignale der jeweiligen Gesamtformen eines Proteins normalisiert. Es wurden nur Proben, die sich gemeinsam auf einem Gel befunden haben, miteinander verglichen.

2.2.4 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Infarktgrößen wurden mit einer *one-way* ANOVA analysiert. Hämodynamik und Protein-Phosphorylierung wurden per *two-way ANOVA for repeated measures* analysiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen Mittelwerten wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Infarktgrößenreduktion durch RIPC am Schwein

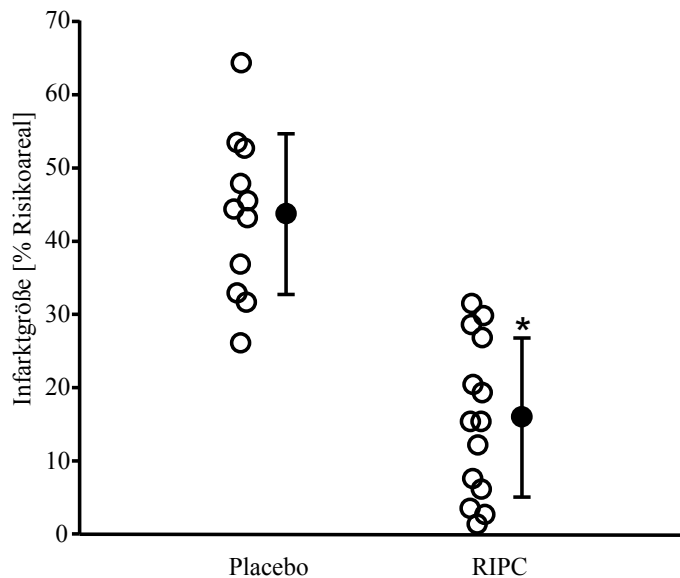


Abbildung 4: Infarktgrößen im Schwein: offene Symbole: individuelle Datenpunkte; geschlossene Symbole: Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. Placebo

In Abbildung 4 sind die Infarktgrößen der Schweine dargestellt, von denen das Plasma im Bioassay getestet wurde. Nach einem Placebo Manöver beträgt die Infarktgröße 43 ± 11 %. Das RIPC Manöver reduziert die Infarktgröße auf 16 ± 11 %. Damit ist sichergestellt, dass alle RIPC Plasmaproben nach einem erfolgreichen Schutzmanöver entnommen wurden.

3.2 Das isoliert perfundierte Rattenherz nach Langendorff als Bioassay

3.2.1 Infarktgrößen und Hämodynamik ohne Plasmainfusion

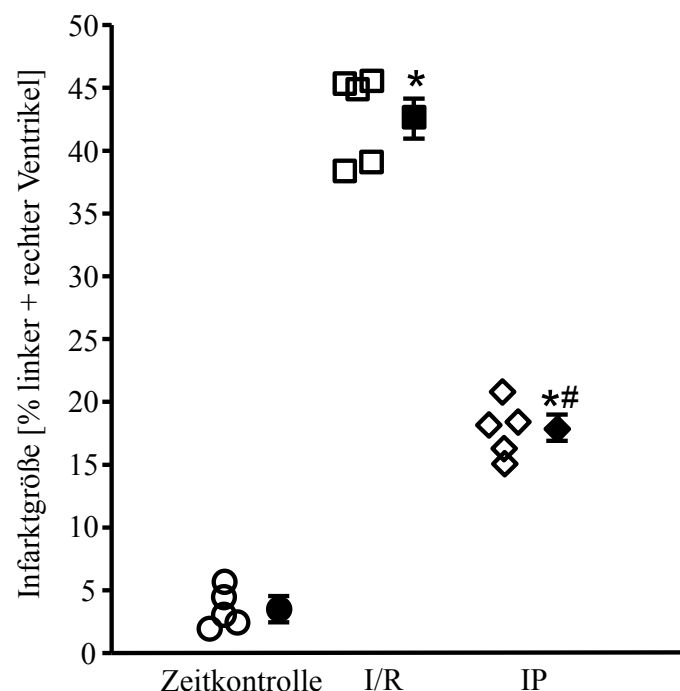


Abbildung 5: Infarktgrößen der Rattenherzen ohne Plasmainfusion: offene Symbole: individuelle Datenpunkte; geschlossene Symbole: Mittelwert \pm Standardabweichung; I/R: Ischämie/Reperfusion; IP: Ischämische Präkonditionierung * $p < 0,05$ vs. Zeitkontrolle; # $p < 0,05$ vs. I/R

Die Infarktgrößen ohne Plasmainfusion sind in Abbildung 5 dargestellt. Nach dreistündiger Normoperfusion beträgt die Infarktgröße $3,5 \pm 1,5$ %. Nach 30 min Ischämie mit anschließend 120 min Reperfusion wurde eine Infarktgröße von $43 \pm 3,6$ % gemessen. IP reduziert den Infarkt auf $18 \pm 2,2$ %.

Die hämodynamischen Daten der Herzen ohne Plasmainfusion sind in Tabelle 3 (siehe Seite 36) aufgeführt. In den Zeitkontrollversuchen wurden die Messzeitpunkte analog zu Protokollen mit Ischämie/Reperfusion gewählt. Während der

Stabilisierungsphase gibt es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Dreistündige Normoperfusion hat nur einen minimalen Einfluss auf den mittleren Koronarfluss ($12 \pm 3,7$ ml/min nach Stabilisierung vs. $11 \pm 3,0$ ml/min analog zum Zeitpunkt Reperfusion 30 min) und den maximal entwickelten Druck im linken Ventrikel (84 ± 25 mmHg nach Stabilisierung vs. 82 ± 22 mmHg analog zum Zeitpunkt Reperfusion 30 min). Während der 30 minütigen globalen Ischämie sinkt der Ventrikeldruck auf 0 mmHg ab. Nach 30 min Reperfusion haben präkonditionierte Herzen im Vergleich zur I/R Gruppe sowohl einen höheren Koronarfluss (IP $12 \pm 1,2$ ml/min vs. I/R $4,7 \pm 2,3$ ml/min) als auch einen höheren entwickelten linken Ventrikeldruck (IP 76 ± 24 mmHg vs. I/R 27 ± 17 mmHg).

3.2.2 Infarktgrößen und Hämodynamik mit Plasmainfusion

In Abbildung 6 sind die Infarktgrößen aller Herzen mit Plasmainfusion dargestellt. Die Infarktgröße nach 30 min Ischämie mit der Infusion von Placebo Plasma beträgt $38 \pm 4,7$ % und bleibt unter RISK oder SAFE Blockade unverändert (Placebo Plasma + RISK-BL $41 \pm 2,6$ %, Placebo Plasma + SAFE-BL $41 \pm 0,4$ %). Die Infusion von RIPC Plasma reduziert die Infarktgröße nach 30 min Ischämie auf $25 \pm 5,1$ %. Unter RISK Blockade und unter SAFE Blockade ist der kardioprotektive Effekt von RIPC Plasma aufgehoben (RIPC Plasma + RISK-BL $42 \pm 2,7$ %, RIPC Plasma + SAFE-BL $44 \pm 1,1$ %).

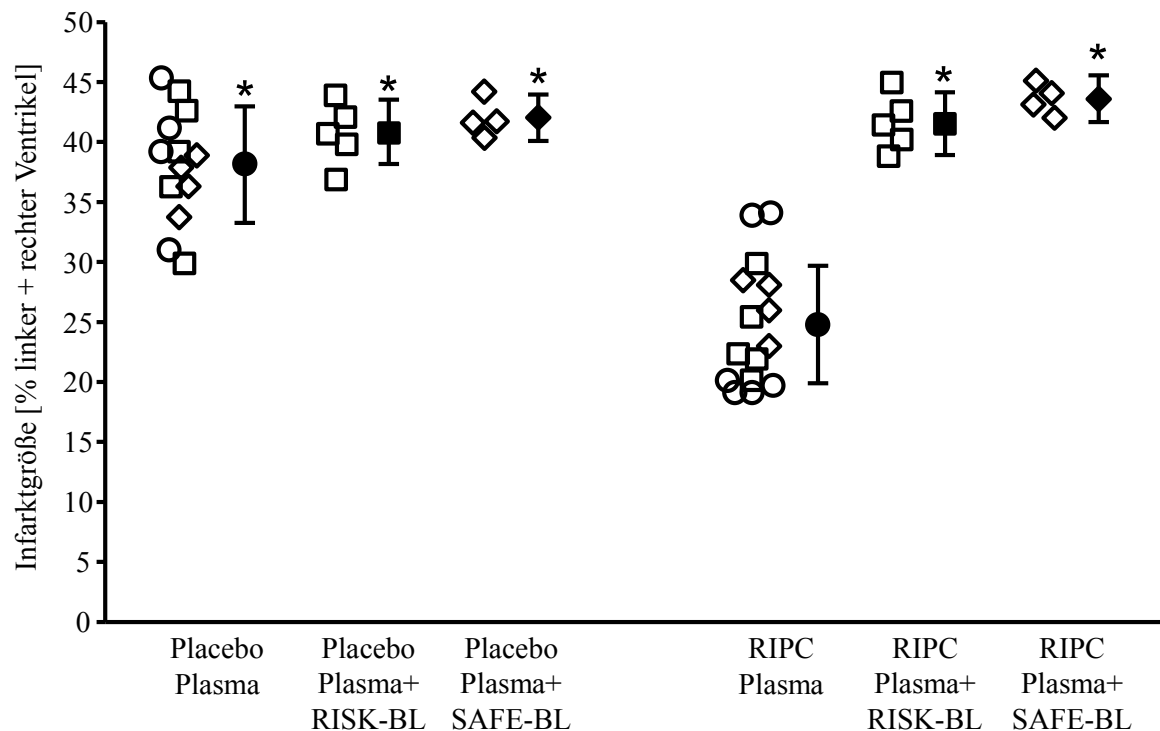


Abbildung 6: Infarktgrößen der isoliert perfundierten Rattenherzen mit Plasmainfusion: RISK-BL: Infusion von RIPC oder Placebo Plasma unter RISK Blockade; SAFE-BL: Infusion von RIPC oder Placebo Plasma unter SAFE Blockade; offene Symbole: individuelle Datenpunkte; geschlossene Symbole: Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. RIPC Plasma

Die hämodynamischen Daten der Herzen mit Plasmainfusion sind in Tabelle 4 (siehe Seite 37) aufgeführt. Während der Stabilisierungsphase gibt es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Vorbehandlung mit RISK oder SAFE Inhibitoren hat keinen Einfluss auf den koronaren Fluss oder den maximal entwickelten Ventrikeldruck. Ebenso hat die Infusion von Plasma keinen Einfluss auf den koronaren Fluss (Stabilisierung $13 \pm 1,6$ ml/min vs. $13 \pm 1,8$ ml/min nach Placebo Plasma bzw. $13 \pm 1,5$ ml/min vs. $13 \pm 2,5$ ml/min nach RIPC Plasma) und den entwickelten linksventrikulären Druck (Stabilisierung 88 ± 22 mmHg vs. 80 ± 27 mmHg nach Placebo Plasma bzw. 82 ± 18 mmHg vs. 71 ± 20 mmHg nach RIPC Plasma). In allen Gruppen bleiben der Koronarfluss und der maximal entwickelte linksventrikuläre Druck in der Reperfusion unter dem Eingangswert nach Stabilisierung. In der Reperfusion unter SAFE Blockade ist der Koronarfluss verringert (Placebo Plasma $9,0 \pm 1,6$ ml/min vs. $5,3 \pm 2,0$ ml/min unter SAFE Blockade; RIPC Plasma $8,6 \pm 1,6$ ml/min vs. $4,7 \pm 0,7$ ml/min unter SAFE Blockade).

3.2.3 Western Blot Analyse in Rattenherzen mit Plasmainfusion

Nach 120 min Reperfusion war die Menge von phosphoryliertem AKT und phosphoryliertem ERK1/2, normalisiert auf das jeweilige Gesamtprotein, nach RIPC Plasmainfusion höher als nach Placebo Plasmainfusion. Unter RISK Blockade ist die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 gegenüber RIPC verringert (Abbildung 7). Die RISK Blockade hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 11, siehe Seite 41). Die Phosphorylierung von STAT3, normalisiert auf das Gesamtprotein, war nach RIPC Plasmainfusion gegenüber der Placebo Plasmainfusion erhöht. Unter SAFE Blockade ist die Phosphorylierung von STAT3 gegenüber RIPC verringert (Abbildung 7). Die SAFE Blockade hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 (Abbildung 11, siehe Seite 41). Bilder der Originalmembranen und der Chemilumineszenzaufnahmen befinden sich im Anhang (Abbildung 8 - 10, siehe Seite 38 - 40).

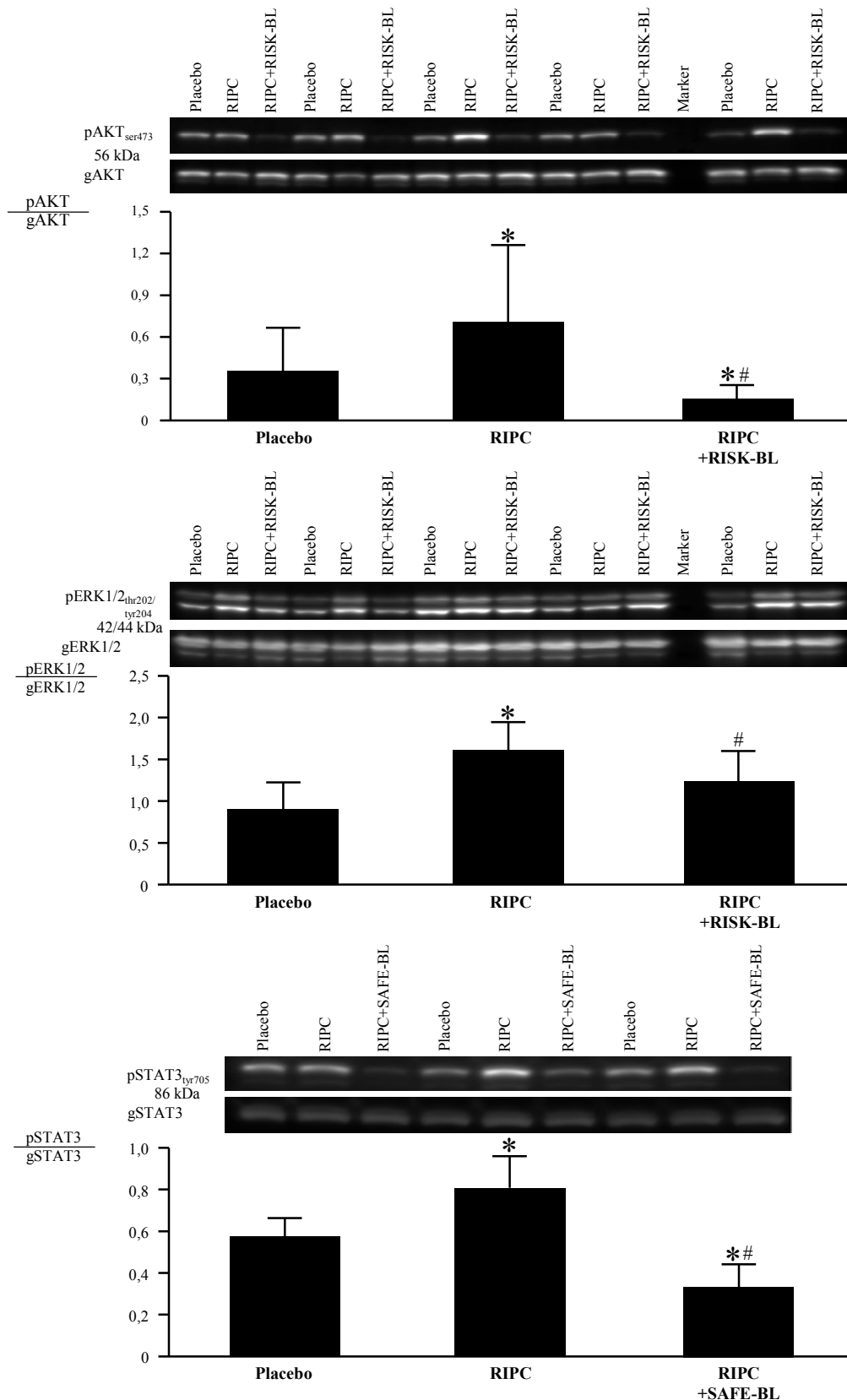


Abbildung 7: Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und STAT3 in isoliert perfundierten Rattenherzen mit Plasmainfusion: nach Infusion von RIPC oder Placebo Plasma unter RISK Blockade (RISK-BL) n=5 bzw. SAFE Blockade (SAFE-BL) n=3; oben: Immunoreaktivität des phosphorylierten AKT Signals bei Ser₄₇₃ und des Gesamtproteins; mitte: Immunoreaktivität der phosphorylierten ERK Signale bei Thr₂₀₂ und Tyr₂₀₄ und der Gesamtproteine; unten: Immunoreaktivität des phosphorylierten STAT3 Signals bei Tyr₇₀₅ und des Gesamtproteins; die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung; *p<0,05 vs. Placebo; #p<0,05 vs. RIPC

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über den durch RIPC induzierten und humoral übertragbaren kardioprotektiven Stimulus und dessen im Zielorgan Herz ausgelöste Signaltransduktion zu gewinnen. Dazu wurde zunächst ein Bioassay basierend auf dem isoliert perfundierten Rattenherz nach Langendorff (Langendorff, 1895) entwickelt. Die Stabilität des Organpräparats in diesem Bioassay wurde mittels Zeitkontrollen überprüft. Die Infarktgrößen, die nach einem Ischämie/Reperfusion Protokoll mit und ohne Kardioprotektion durch IP gemessen wurden, belegen die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und erlauben eine Skalierung der später an Plasmaproben vom Schwein durchgeführten Messungen.

Im zweiten Schritt wurde im Bioassay gut charakterisiertes Plasma von Schweinen, bei denen nachweislich Kardioprotektion durch RIPC induziert wurde, gemessen an der Infarktgrößenreduktion, untersucht. Plasma von Schweinen die einem Placebo Manöver unterzogen wurden dienten als Kontrolle. RIPC Plasma reduziert im Bioassay die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion, während Placebo Plasma keinen Einfluss auf die Infarktgröße hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Übertragung der Kardioprotektion vom Ort des RIPC Manövers (Hinterbein) zum Herzen hin auch humoral verläuft. Die speziesübergreifende Übertragung von Plasma (Schwein → Ratte) wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Bisher wurde die Kardioprotektion durch RIPC nur innerhalb der gleichen Spezies (Kaninchen; Dickson *et al.*, 1999) in Form von Vollblut übertragen. Bei speziesübergreifenden Untersuchungen wurde das Plasma zuvor dialysiert (Shimizu *et al.*, 2009; Rassaf *et al.*, 2014). Die Verwendung von Vollplasma hat demgegenüber den Vorteil, dass alle kardioprotektiven Faktoren ohne Einschränkung übertragen werden können.

Die Infarktgrößenreduktion im Bioassay durch RIPC Plasma, nicht aber durch Placebo Plasma, belegt, dass nach einem RIPC Manöver ein oder mehrere humorale Faktoren freigesetzt werden, die kardioprotektive Eigenschaften haben. Die Identifizierung eines solchen Faktors wäre ein attraktives Ziel für eine pharmakologisch induzierbare Infarktgrößenreduktion, z.B. bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder bei komplexen kardiovaskulären Interventionen, die einen Myokardschaden durch Ischämie/Reperfusion induzieren können. In der Literatur wird diskutiert, dass der oder die Faktoren kleiner als 15 kDa sind, da die Kardioprotektion erhalten bleibt, wenn das Plasma durch eine 12-14 kDa Membran dialysiert wird (Shimizu *et al.*, 2009). Darüber hinaus fokussieren sich einige Studien auf spezifische Faktoren wie z.B. Interleukin 10 (Cai *et al.*, 2012), den Stromal Cell-Derived Factor 1 (Davidson *et al.*, 2013), Apolipoprotein A (Hibert *et al.*, 2013), micro-RNA-144 (Li *et al.*, 2014), Nitrit (Rassaf *et al.*, 2014), RNase (Cabrera-Fuentes *et al.*, 2015) oder Exosomen (Vicencio *et al.*, 2015). Allerdings konnte noch kein eindeutiger Kandidat als möglicher kardioprotektiver Faktor nach RIPC bestimmt werden. Systematische Studien zur Identifizierung eines protektiven humoralen Faktors im Plasma auf der Basis von *Proteomics*

Untersuchungen waren bislang ebenfalls erfolglos (Heppostall *et al.*, 2012; Helgeland *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt um neue Informationen über den oder die kardioprotektiven Faktoren im RIPC Plasma zu gewinnen. Im Vordergrund stand nicht die Suche nach einem Einzelfaktor, sondern es wurde untersucht welche bekannten kardioprotektiven Signalwege durch den oder die Faktoren aktiviert werden und ob diese Aktivierung letztendlich kausal für den beobachteten Schutz ist. Im speziellen wurden die bei der Kardioprotektion an der Ratte bekannten Signalwege RISK (Hausenloy *et al.*, 2005) und SAFE (Lecour, 2009) untersucht, indem signalwegspezifische Inhibitoren eingesetzt wurden. Die Kardioprotektion durch RIPC Plasma war unter der Blockade von RISK oder SAFE aufgehoben. Bei diesen Untersuchungen kommt ein wesentlicher Vorteil des neu entwickelten Bioassays zum Tragen. Die Menge einer Plasmaprobe vom Schwein ist groß genug, um sie im Bioassay mehrfach ohne und mit Signalwegblockade zu testen. Damit ist immer sichergestellt, dass die kardioprotektiven Eigenschaften einer Probe tatsächlich durch eine Signalwegblockade aufgehoben werden.

Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass Infarktgrößenreduktion durch RIPC Plasma im Vergleich zum Placebo Plasma mit einer erhöhten Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und STAT3 einhergeht. Unter RISK bzw. SAFE Blockade war die Infarktgrößenreduktion durch RIPC Plasma aufgehoben und es war keine erhöhte Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und STAT3 mehr nachweisbar. Somit sind bei der Kardioprotektion durch RIPC Plasma der RISK und der SAFE Signalweg kausal beteiligt. Als mögliche Kritik an der Untersuchung der Proteinphosphorylierung muss allerdings angebracht werden, dass die Myokardproben zum Zeitpunkt 120 min Reperfusion entnommen wurden. Dies war notwendig um in einem Rattenherz gleichzeitig die Infarktgröße und die Proteinphosphorylierung zu messen. Möglicherweise ist die zu diesem Zeitpunkt gemessene erhöhte Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und STAT3 nicht repräsentativ für den Zeitpunkt in der Reperfusion, zu dem mutmaßlich der Schutz gegen Infarzierung stattfindet. Da der Myokardschutz durch PoCo innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion stattfinden muss (Ovize *et al.*, 2010) kann angenommen werden, dass sich auch in diesem Zeitraum der Reperfusionsschaden ausbildet. Somit müsste eine kardioprotektive Signalwegaktivierung auch in diesem Zeitraum nachgewiesen werden. Allerdings konnte Roubille *et al.* (2011) in Mäusen zeigen, dass PoCo auch noch nach 45 min Reperfusion kardioprotektiv ist. Somit ist die Abnahme der Myokardproben zum Zeitpunkt 120 min Reperfusion in der vorliegenden Untersuchung nicht optimal, aber es konnte trotzdem eine erhöhte Phosphorylierung innerhalb der untersuchten Signalkaskaden, als auch die effektive Blockade der entsprechenden Signalwege gezeigt werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass im eingesetzten Bioassay die Aktivierung des RISK Signalwegs gleichermaßen unabdingbar für den Schutz ist, wie auch die Aktivierung des SAFE Signalwegs. In der Literatur sind bereits Interaktionen zwischen RISK und SAFE Signalweg beschrieben worden (Hausenloy *et al.*, 2011). In der Ratte verhindert der SAFE Inhibitor AG490 die erhöhte Phosphorylierung von AKT und GSK3 β nach kombinierter Per/Postkonditionierung und die RISK

Inhibitoren Wortmannin und U0126 verhindern die erhöhte Phosphorylierung von STAT3 (Tamareille *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Interaktion zwischen den beiden Signalwegen beobachtet. Die Inhibition des RISK Signalwegs verhindert die vermehrte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2, hat jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3. Umgekehrt verhindert die Inhibition des SAFE Signalwegs die vermehrte Phosphorylierung von STAT3, hat aber keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT und ERK (Abbildung 11, siehe Seite 41). Dies deutet darauf hin, dass beide Signalwege parallel verlaufen und unabhängig voneinander sind. Die Tatsache dass im verwendeten Bioassay bereits die Blockade eines einzelnen Signalwegs die Kardioprotektion durch RIPC Plasma verhindern kann deutet darauf hin, dass möglicherweise die Aktivierung eines einzelnen Signalwegs alleine nicht ausreicht. Inwieweit dies zutrifft kann jedoch mit den Befunden dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Es ist bekannt, dass die involvierten Signalkaskaden beim Myokardschutz durch RIPC speziesabhängig sind. Die vorliegende Studie zeigt, dass in der Ratte eine Aktivierung des RISK und SAFE Signalwegs notwendig ist. In größeren Säugern und dem Menschen scheint dagegen die RISK Aktivierung für die Kardioprotektion nicht notwendig (Skyschally *et al.*, 2009; Heusch *et al.*, 2012; Skyschally *et al.*, 2015) zu sein. Hinsichtlich der Aktivierung des SAFE Signalwegs durch vermehrte Phosphorylierung von STAT finden sich ebenfalls deutliche Speziesunterschiede. In Patienten ist nach RIPC STAT5 und nicht STAT3 vermehrt phosphoryliert (Heusch *et al.*, 2012), wohingegen im Schwein (Skyschally *et al.*, 2015) und in der Ratte (Abbildung 12, siehe Seite 42) eine vermehrte Phosphorylierung von STAT3 und nicht von STAT5 vorliegt.

Der in dieser Arbeit etablierte Bioassay könnte in zukünftigen Versuchen dazu genutzt werden, um die an der Kardioprotektion durch RIPC beteiligten Faktoren weiter zu untersuchen. Denkbar wäre eine Eingrenzung der Größe des kardioprotektiven Faktors durch Dialyse. Des Weiteren könnte dieses Dialysat erhitzt oder in einen hydrophilen und hydrophoben Anteil getrennt werden, um anschließend die kardioprotektiven Eigenschaften dieser Fraktionen zu überprüfen. Es ist möglich, aus den Rattenherzen im Bioassay Kardiomyozyten und/oder Mitochondrien zu isolieren, um damit funktionelle Messungen durchzuführen und mögliche Zielkompartimente oder Endeffektoren zu identifizieren. Da Kardioprotektion durch RIPC auch am Patienten möglich ist (Thielmann *et al.*, 2013), könnte als nächster Schritt humanes Plasma im Bioassay untersucht werden. Darüber hinaus kann der Bioassay auf eine andere Spezies, z.B. das isolierte Herz einer Maus, abgewandelt werden. Bei Verwendung von Mäuseherzen könnten aufgrund des deutlich geringeren koronaren Flusses wesentlich mehr Einzelversuche je Plasmaprobe durchgeführt werden. Dies wäre auch bei der Untersuchung von humanem Plasma von Vorteil. Zudem gäbe es bei der Verwendung von Mäuseherzen auch die Möglichkeit genetisch veränderte Versuchstiere einzusetzen und so eine erweiterte Untersuchung der beteiligten Signalwege durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Die herzferne Konditionierung (engl. *Remote Ischemic PreConditioning*, RIPC) reduziert in allen bislang getesteten Spezies, inklusive dem Menschen, die Infarktgröße nach myokardialer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion, dem klassischen Szenario des akuten Herzinfarkts. Das RIPC Manöver wird durch mehrere kurze Episoden von Ischämie/Reperfusion an einem herzfernen Organ oder einer Extremität ausgelöst und der schützende Stimulus wird humoral auf das Herz übertragen.

Im Tierexperiment wurde an anästhesierten Schweinen ein RIPC Manöver (4 mal je 5 min Ischämie / 5 min Reperfusion am Hinterlauf) durchgeführt und der Schutz anhand der Infarktgrößenreduktion nach myokardialer Ischämie/Reperfusion verifiziert. Ein Placebo Manöver diente als Kontrolle. Zur Untersuchung des humoral übertragbaren Schutzfaktors wurde den Schweinen nach dem RIPC Manöver, bzw. dem Placebo Manöver, Blut entnommen und daraus das Plasma separiert. Zur Charakterisierung des möglicherweise im Plasma enthaltenen Schutzfaktors, wurde ein Bioassay basierend auf einem isoliert perfundierten Rattenherz nach Langendorff etabliert. Das Plasma wurde dazu dem Perfusionspuffer des isolierten Rattenherzens zugemischt.

Es konnte gezeigt werden, dass das nach einem RIPC Manöver dem Schwein entnommenen Plasma die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion im Rattenherz reduziert. Nach Placebo entnommenes Plasma hatte keinen Einfluss. In einem innovativen Ansatz wurde danach nicht der schützende Faktor an sich, sondern die im Bioassay am Zielorgan Rattenherz ausgelöste kardioprotektive Signaltransduktion untersucht. Der Fokus lag dabei auf den für ihre Beteiligung an der Kardioprotektion im Rattenherz bekannten Signalkaskaden *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) und *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE). Durch Einsatz von spezifischen Signalweginhibitoren und nachgeschalteter Western Blot Analyse von Myokardproben wurde eine Beteiligung dieser Signalkaskaden am Schutz gegen Infarzierung untersucht.

Nach Infarktgrößenreduktion durch RIPC Plasma am Rattenherz waren die Proteinkinase B (AKT) und die extrazellulär regulierte Kinase (ERK1/2), die zentralen RISK Komponenten, und der *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), als zentrales Element der SAFE Kaskade, vermehrt phosphoryliert. Nach Blockade der erhöhten Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 oder STAT3 durch spezifische Signalweginhibitoren war auch die Infarktgrößenreduktion aufgehoben. Die durch RIPC Plasma induzierte RISK und SAFE Aktivierung ist deshalb kausal an der Infarktgrößenreduktion im isoliert perfundierten Rattenherz des Bioassay beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass durch ein RIPC Manöver ein bislang noch nicht genau bekannter Faktor freigesetzt wird, der im Myokard kardioprotektive Signalkaskaden aktiviert. Der hier etablierte Bioassay ist eine Möglichkeit humoral transferierbare kardioprotektive Faktoren weiter zu untersuchen und zu charakterisieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Bautin AE, Galagudza MM, Datsenko SV, Tashkhanov DM, Marichev AO, Bakanov A, Malaia E, Naimushin AV, Rubinchik VE, Gordeev ML. Effects of remote ischemic preconditioning on perioperative period in elective aortic valve replacement. *Anesteziol Reanimatol.* 2014;11-17
2. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:185-193
3. Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res.* 2008a;102:131-135
4. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure. *Pharmacol Ther.* 2008b;120:172-185
5. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kalltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sorensen HT, Redington AN, Nielsen TT. 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;375:727-734
6. Cabrera-Fuentes HA, Niemann B, Grieshaber P, Wollbrueck M, Gehron J, Preissner KT, Böning A. TNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015;48(5):732-737
7. Cai ZP, Parajulu N, Zheng X, Becker L. Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by upregulating interleukin-10. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:277
8. Cohen MV, Downey JM. Cardioprotection: spotlight on PKG. *Br J Pharmacol.* 2007;152:833-834
9. Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the sdf-1alpha/cxcr4 signalling axis. *Basic Res Cardiol.* 2013;108:377
10. Davies WR, Brown AJ, Watson W, McCormick LM, West NE, Dutka DP, Hoole SP. Remote ischemic preconditioning improves outcome at 6 years after elective percutaneous coronary intervention: The crisp stent trial long-term follow-up. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013;6:246-251
11. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi RF, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: Preliminary evidence. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* 1999;8(2):123-129
12. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 1998;273:18623-18632

13. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-200
14. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:69-75
15. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, Ashley E, Vichare S, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Keogh B, MacAllister RJ, Yellon DM. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: A randomized controlled trial. *Lancet*. 2007;370:575-579
16. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: Two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:893-907
17. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM & Investigators. Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2015;373:1408-17
18. Helgeland E, Breivik LE, Vaudel M, Svendsen OS, Garberg H, Nordrehaug JE, Berven FS, Jonassen AK. Exploring the human plasma proteome for humoral mediators of remote ischemic preconditioning - a word of caution. *PLoS One*. 2014;9:e109279
19. Hepponstall M, Ignjatovic V, Binos S, Monagle P, Jones B, Cheung MH, d'Udekem Y, Konstantinov IE. Remote ischemic preconditioning (ripc) modifies plasma proteome in humans. *PLoS One*. 2012;7:e48284
20. Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 2011a;109:1302-1308
21. Heusch G, Skyschally A, Schulz R. The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion – Ready for translation. *J Mol Cell Cardiol*. 2011b;50(6):951-63
22. Heusch G, Musiolik J, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, Thielmann M. STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans. *Circ Res*. 2012;110:111-115
23. Heusch G. Cardioprotection – chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*. 2013;381:166-175
24. Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon DM. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:177-195
25. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: Signal transduction in ischemic pre-, post- and remote conditioning. *Circ Res*. 2015;116:674-699
26. Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Lamon D, Furber A, Pinet F, Prunier F. Apolipoprotein a-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning. *PLoS One*. 2013;8(10):e77211
27. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1454-1471

28. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106:2881-3
29. Kingma JG, Jr., Simard D, Voisine P, Rouleau JR. Role of the autonomic nervous system in cardioprotection by remote preconditioning in isoflurane-anaesthetized dogs. *Cardiovasc Res.* 2011;89:384-391
30. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "No-Reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54(6):1496-1508
31. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, Heine T, Jakob H, Heusch G, Peters J. Protection by remote ischaemic preconditioning during coronary artery bypass grafting with isoflurane but not with propofol anesthesia - a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56:30-38
32. Lacerda L, Somers S, Opie HL, Lecour S. Ischemic postconditioning protects against reperfusion injury via the safe pathway. *Cardiovasc Res.* 2009;84:201-208
33. Langendorff O, Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch* 1985;61:291-332
34. Lecour S. Activation of the protective survivor activating factor enhancement (safe) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the risk path? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:32-40
35. Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, Wei C, Hu P, Kharbanda RK, Redington AN. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:423
36. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:651-655
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265
38. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 1998;97:795-804
39. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, Coburn M, Schaelte G, Böning A, Niemann B, Roesner J, Kletzin F, Strouhal U, Reyher C, Laufenberg-Feldmann R, Ferner M, Brandes I, Bauer M, Stehr SN, Kortgen A, Wittmann M, Baumgarten G, Meyer-Treschan T, Kienbaum P, Heringlake M, Schön J, Sander M, Treskatsch S, Smul T, Wolwender E, Schilling T, Fuernau G, Hasenclever & Zacharowski K. A multicenter trial of remote ischemic preconditioning for heart surgery. *New Engl J Med.* 2015;373:1397-1407
40. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136
41. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. Postconditioning and protection from reperfusion injury: Where do we stand? *Circ Res.* 2010;87:406-423
42. Ovize M, Thibault H, Przyklenk K. Myocardial conditioning: Opportunities for clinical translation. *Circ Res.* 2013;113:439-450

43. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1998;275 (5 Pt 2):H1542-7
44. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2014;114:1601-1610
45. Reimer KA, Jennings RB. The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* 1979;40(6):633-44
46. Roubille F, Franck-Miclo A, Covinhas A, Lafont C, Cransac F, Combes S, Vincent A, Fontanaud P, Sportouch-Dukhan C, Redt-Clouet C, Nargeot J, Piot C, Barrère-Lemaire S. Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation* 2011;124:1330-1336
47. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-79
48. Schaper W, Görge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Prog Cardiovasc Dis.* 1988;31:57-77
49. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(4):H1481-H1488
50. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: Evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond).* 2009;117:191-200
51. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz.* 2008;33(2):88-100
52. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: No causal role for risk activation. *Circ Res.* 2009;104:15-18
53. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-species transfer of protection by remote ischemic preconditioning with species-specific myocardial signal transduction by RISK and SAFE Pathways. *Circ Res.* 2015;117(3):279-88
54. Sloth AD, Schmidt MR, Munk K, Kharbanda RK, Redington AN, Schmidt M, Pedersen L, Sorensen HT, Bøtker HE. Improved long-term clinical outcomes in patients with st-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2014;35:168-175
55. Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, Sack MN. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004;63:611-616
56. Sobel BE, Bresnahan GF, Shell WE, Yoder RD. Estimation of infarct size in man and its relation to prognosis. *Circulation.* 1972;46:640-648

57. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit J-F, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112:2143-2148
58. Suleman N, Somers S, Smith R, Opie LH, Lecour SC. Dual activation of STAT-3 and akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2008;79:127-133
59. Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Risk and safe signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:1329-1339
60. Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, Raffelsieper C, Neuhaeuser M, Peters J, Jakob H, Heusch G. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:657-664
61. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, Price V, Tsagakis K, Neuhaeuser M, Peters J, Jakob H, Heusch G. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013;382:597-604
62. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, Zheng Y, Riquelme JA, Kearney J, Sharma V, Multhoff G, Hall AR, Davidson SM. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(15):1525-1536
63. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res*. 2002;55(3):590-601
64. Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol*. 1996;16:1722-1733
65. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H579-H588.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

	μg	Mikrogramm
	μm	Mikrometer
	$\mu\text{mol/l}$	Mikromol pro Liter
A	AKT	Proteinkinase B
	ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
	AP	Aortendruck (<i>aortic pressure</i>)
B	BL	Blocker
	BSA	Rinderserumalbumin
C	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
	CF_{mean}	mittlerer Koronarfluss (<i>mean coronary flow</i>)
D	DFG	Deutsche Förderungsgemeinschaft
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DP_{max}	maximaler entwickelter linker Ventrikeldruck (<i>maximal developed pressure</i>)
E	eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
	ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase
	<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
G	g	Gramm, Beschleunigung
	gAKT	Gesamtprotein AKT
	gERK1/2	Gesamtprotein EKR1/2
	gSTAT3	Gesamtprotein STAT3
	GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
I	IgG	Immunglobulin G
	i.m.	intramuskulär
	IP	Ischämische Präkonditionierung
	I/R	Ischämie und Reperfusion
	i.v.	intravenös
	IU	<i>international units</i>
J	JAK	Januskinase
K	kDa	Kilodalton
	kg	Kilogramm
	KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
L	l	Liter

M	LANUV	Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Verbraucherschutz
	LVP _{max}	maximaler linker Ventrikeldruck (<i>maximal left developed pressure</i>)
	mg	Milligramm
	min	Minute
	ml	Milliliter
	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
	mmol/l	Millimol pro Liter
	mol/l	Mol pro Liter
	MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
	N	n
NO		Stickstoffmonoxid
P	p	Irrtumswahrscheinlichkeit
	pAKT	Phosphoprotein AKT
	pERK1/2	Phosphoprotein ERK1/2
	pH	<i>pondus Hydrogenii</i> oder <i>potentia Hydrogenii</i>
	pSTAT3	Phosphoprotein STAT3
	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
	PKC	Proteinkinase C
	PKG	Proteinkinase G
	PoCo	Postkonditionierung (<i>postconditioning</i>)
	PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	RIPC	Herzferne Ischämische Präkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i>)
	RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
	RNA	Ribonukleinsäure
	SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement</i>
S	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	s	Sekunde
	STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
	T	TBS
TBST		Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween

	TNF α	Tumornekrosefaktor α
	TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
V	V	Volt
	v/v	<i>volume/volume</i>
	vs.	<i>Versus</i>
W	w/v	<i>weight/volume</i>
Z	z.B.	zum Beispiel

7.2 Tabellen

Tabelle 3: Hämodynamische Daten der isoliert perfundierten Rattenherzen ohne Plasmainfusion:
 CF_{mean}: mittlerer Koronarfluss; DP_{max}: maximaler entwickelter linker Ventrikeldruck; in den Zeitkontrollversuchen wurden die Messzeitpunkte analog zu Protokollen mit Ischämie/Reperfusion gewählt; Mittelwerte ± Standardabweichung; *p<0,05 vs. Stabilisierung

Protokoll	Zeitpunkt	CF _{mean} [ml/min]	DP _{max} [mmHg]
Ischämie/Reperfusion (n=5)	Stabilisierung	12 ± 3,1	77 ± 23
	Ischämie 5 min	0 ± 0*	0,2 ± 0,2*
	Ischämie 25 min	0 ± 0*	0,1 ± 0,1*
	Reperfusion 10 min	5,7 ± 2,5*	21 ± 17*
	Reperfusion 30 min	4,7 ± 2,3*	27 ± 17*
Präkonditionierung (n=5)	Stabilisierung	12 ± 1,4	75 ± 20
	Ischämie 5 min	0 ± 0*	0,7 ± 0,1*
	Ischämie 25 min	0 ± 0*	0,3 ± 0,4*
	Reperfusion 10 min	12 ± 1,0	56 ± 36
	Reperfusion 30 min	12 ± 1,2	76 ± 24
analog zu:			
Zeitkontrolle (n=5)	Stabilisierung	12 ± 3,7	84 ± 25
	Ischämie 5 min	12 ± 3,5	84 ± 25
	Ischämie 25 min	12 ± 3,3	82 ± 25
	Reperfusion 10 min	11 ± 3,4	81 ± 23
	Reperfusion 30 min	11 ± 3,0	82 ± 22

Tabelle 4: Hämodynamische Daten der isoliert perfundierten Rattenherzen mit Plasmainfusion:
 CF_{mean}: mittlerer Koronarfluss; DP_{max}: maximaler entwickelter linker Ventrikeldruck; Mittelwerte ± Standardabweichung; *p<0,05 vs. Stabilisierung; #p<0,05 vs. Placebo Plasma; †p<0,05 vs. RIPC Plasma

Protokoll	Zeitpunkt	CF _{mean}		DP _{max}	
		[ml/min]		[mmHg]	
Placebo Plasma (n=13)	Stabilisierung	13	± 1,6	88	± 22
	nach Plasma	13	± 1,8	80	± 27
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,4	± 0,2*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	0,3	± 0,1*
	Reperfusion 10 min	9,0	± 1,6*	28	± 21*
	Reperfusion 30 min	8,0	± 1,9*	32	± 20*
Placebo Plasma + Wortmannin/U0126 (n=5)	Stabilisierung	11	± 1,2	83	± 11
	nach Plasma	11	± 3,5	72	± 26
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,5	± 0,2*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	0,5	± 0,8*
	Reperfusion 10 min	6,5	± 1,7*#	25	± 21*
	Reperfusion 30 min	6,1	± 1,3*	29	± 22*
Placebo Plasma + Stattic (n=4)	Stabilisierung	12	± 1,4	102	± 2,7
	nach Plasma	11	± 2,5	90	± 1,2
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,8	± 0,5*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	1,7	± 1,1*
	Reperfusion 10 min	5,3	± 2,0*#	39	± 15*
	Reperfusion 30 min	4,5	± 2,1*#	31	± 23*
RIPC Plasma (n=15)	Stabilisierung	13	± 1,5	82	± 18
	nach Plasma	13	± 2,5	71	± 20
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,3	± 0,3*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	0,4	± 0,7*
	Reperfusion 10 min	8,6	± 1,6*	27	± 21*
	Reperfusion 30 min	8,1	± 2,0*	26	± 19*
RIPC Plasma + Wortmannin/U0126 (n=5)	Stabilisierung	12	± 1,1	75	± 19
	nach Plasma	12	± 0,7	68	± 19
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,1	± 0*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	0,3	± 0,4*
	Reperfusion 10 min	7,4	± 1,2*	18	± 18*
	Reperfusion 30 min	6,9	± 1,0*	21	± 24*
RIPC Plasma + Stattic (n=4)	Stabilisierung	12	± 1,2	90	± 11
	nach Plasma	13	± 1,1	82	± 9,8
	Ischämie 5 min	0	± 0*	0,2	± 0,1*
	Ischämie 25 min	0	± 0*	1,3	± 1,2*
	Reperfusion 10 min	4,7	± 0,7*†	19	± 8,5*
	Reperfusion 30 min	4,4	± 0,2*†	13	± 7,6*

7.3 Abbildungen

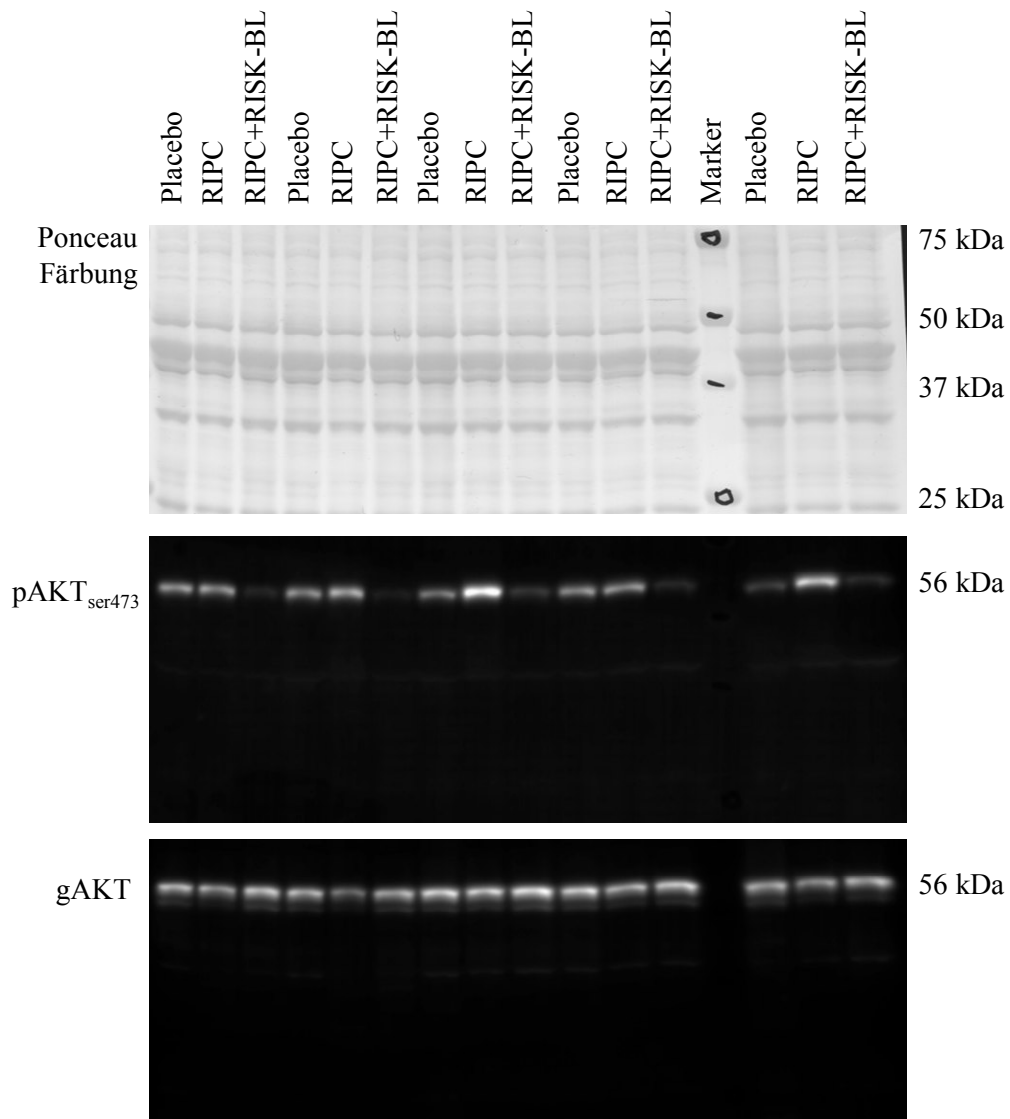


Abbildung 8: Western Blot Analyse von AKT: in Herzspitzen des isoliert perfundierten Rattenherzens nach Infusion von RIPC oder Placebo Plasma unter RISK Blockade (RISK-BL) n=5; oben: Ponceau Färbung der Western Blot Membran; mitte: Immunoreaktivität des phosphorylierten AKT Signals bei Ser₄₇₃; unten: Immunoreaktivität des Gesamtproteins

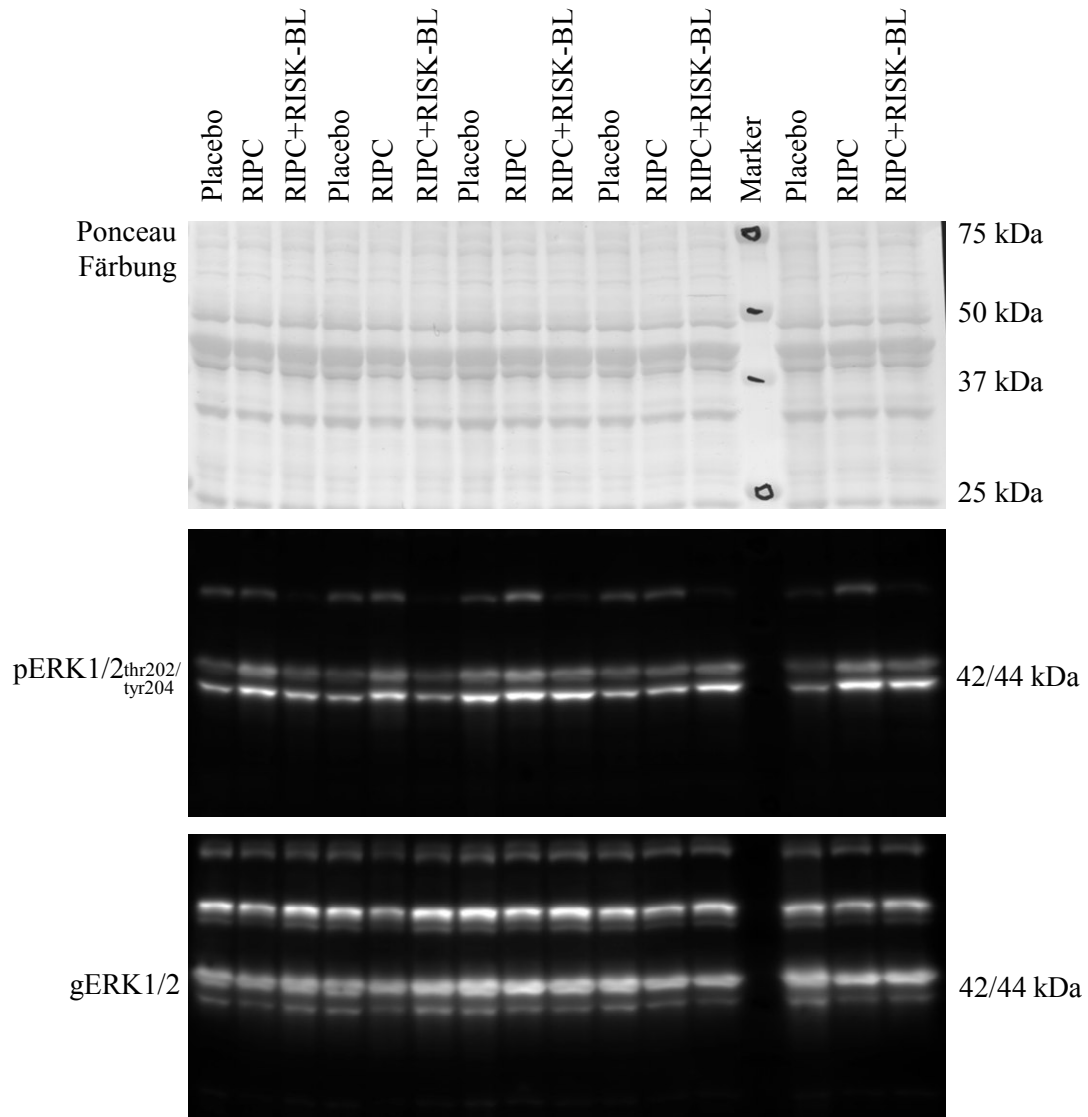


Abbildung 9: Western Blot Analyse von ERK1/2: in Herzspitzen des isoliert perfundierten Rattenherzens nach Infusion von RIPC oder Placebo Plasma unter RISK Blockade (RISK-BL) n=5; oben: Ponceau Färbung der Western Blot Membran; mitte: Immunoreaktivität der phosphorylierten ERK Signale bei Thr₂₀₂ und Tyr₂₀₄; unten: Immunoreaktivität der Gesamtproteine

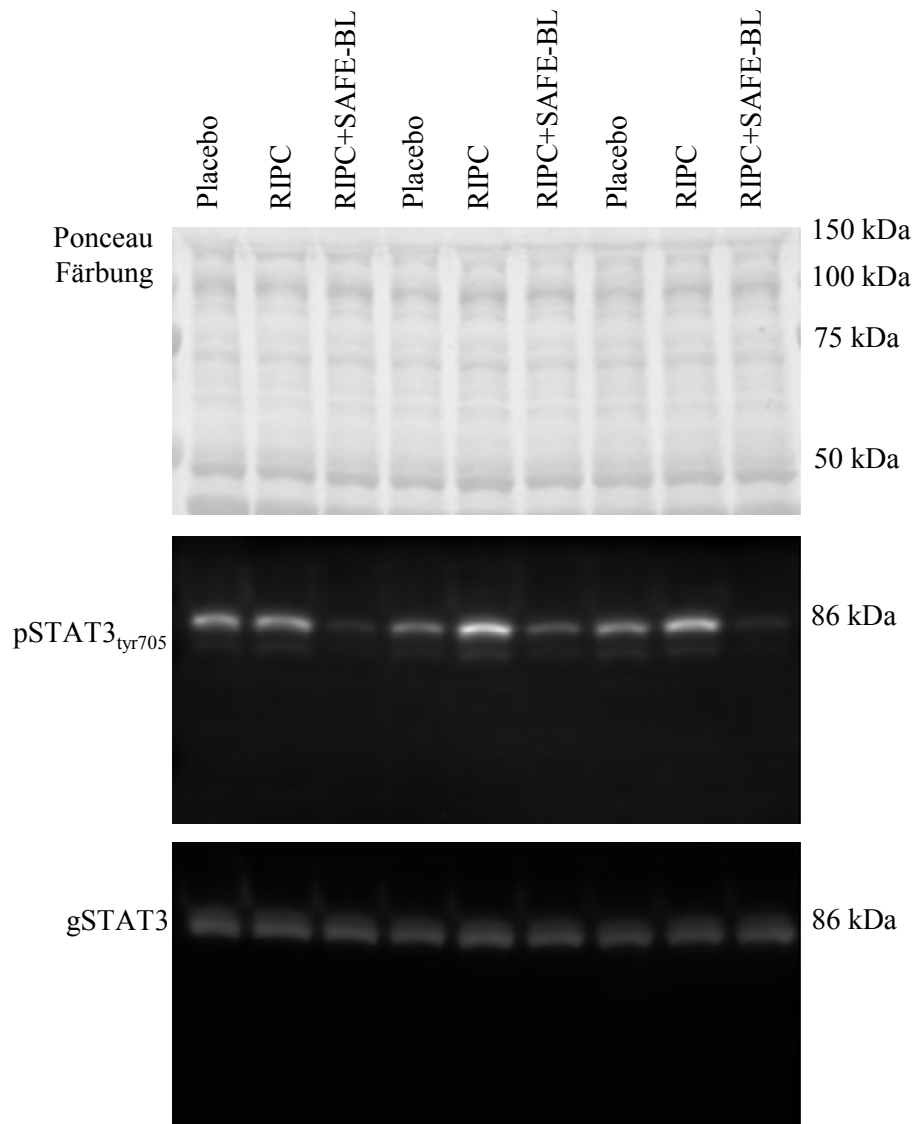


Abbildung 10: Western Blot Analyse von STAT3: in Herzspitzen des isoliert perfundierten Rattenherzens nach Infusion von RIP oder Placebo Plasma unter SAFE SAFE Blockade (SAFE-BL) n=3; oben: Ponceau Färbung der Western Blot Membran; mitte: Immunoreaktivität des phosphorylierten STAT3 Signals bei Tyr₇₀₅; unten: Immunoreaktivität des Gesamtproteins

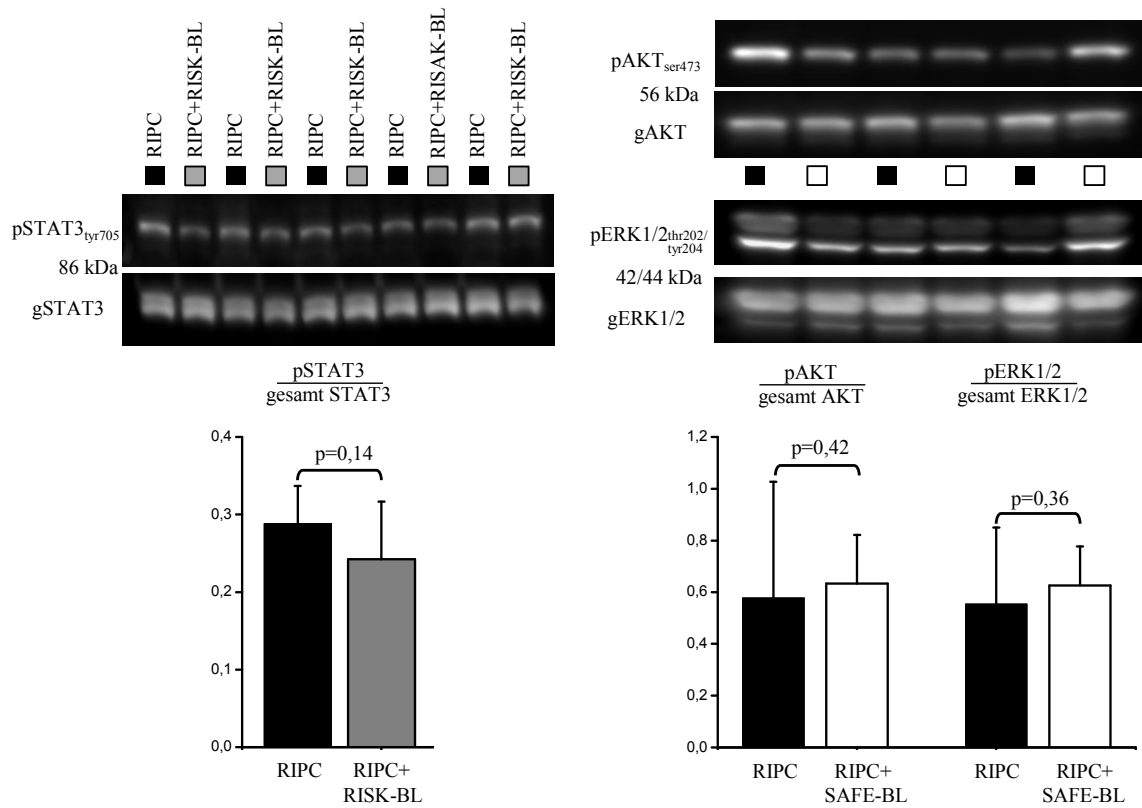


Abbildung 11: Einfluss der RISK Inhibitoren auf den SAFE Signalweg (links) bzw. des SAFE Inhibitors auf den RISK Signalweg (rechts): in Herzspitzen des isoliert perfundierten Rattenherzens; links: Immunoreaktivität des Proteins STAT3 unter RISK Blockade, rechts: Immunoreaktivität der Proteine AKT und ERK1/2 unter SAFE Blockade; die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung; gepaarter t-Test

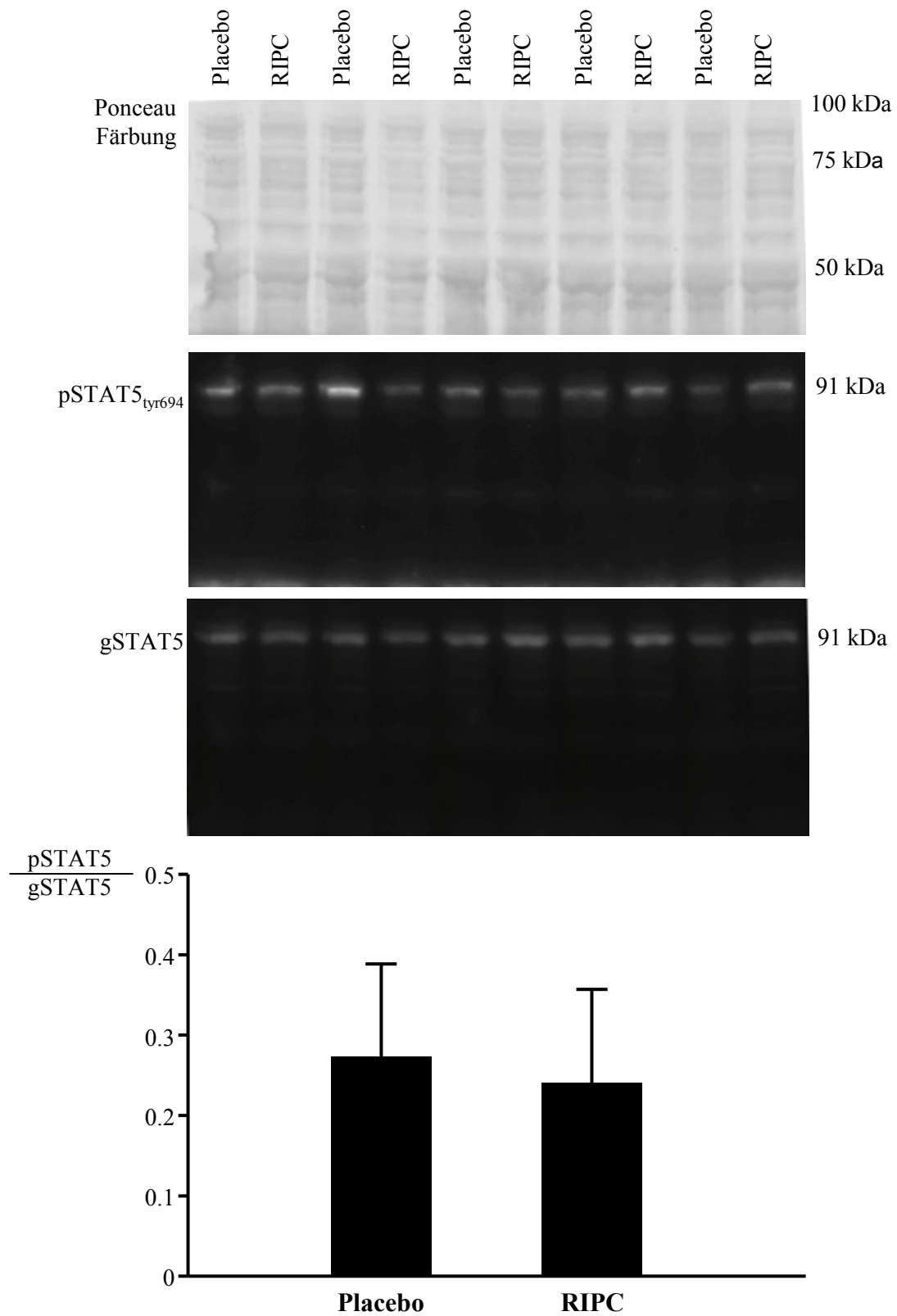


Abbildung 12: Western Blot Analyse von STAT5: in Herzspitzen des isoliert perfundierten Rattenherzens nach von RIPC oder Placebo Plasma; oben: Ponceau Färbung der Western Blot Membran; mitte: Immunoreaktivität des phosphorylierten STAT5 Signals bei Tyr₆₉₄; unten: Immunoreaktivität des Gesamtproteins; die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung

8 Danksagung

Hinter jeder Dissertation steht die Arbeit eines ganzen Teams und deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen zu bedanken, die mich in den vergangenen Jahren mit Rat und Tat unterstützt haben.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Gerd Heusch für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Pathophysiologie und die Bereitstellung eines interessanten Themas und der sehr guten Arbeitsbedingungen.

Ein großer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Skyschally für die intensive Betreuung meiner Arbeit und die stets kompetente wissenschaftliche Unterstützung.

Frau Priv.-Doz. Dr. Petra Kleinbongard danke ich dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr hatte und dass sie es schafft, einem mit Ratschlägen und Ideen immer neu zu motivieren.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Sabine Gent für Ihre kompetente Hilfestellung beim Erlernen der Western Blot Methode.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Petra Gres für ihre stets helfenden Hände und Ihre tatkräftige Unterstützung im Langendorff Labor.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für die hilfsbereite Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Zuletzt danke ich natürlich meinen Eltern, meinem Freund Jan Kowalski und meiner gesamten Familie für die immerwährende Unterstützung während meines Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Skyschally A, Gent S, Amanakis G, **Schulte C**, Kleinbongard P, Heusch G (2015):

Across-species transfer of protection by remote ischemic preconditioning with species-specific myocardial signal transduction by RISK and SAFE pathways

Circulation Research 117(3):279-88

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306878

Veröffentlichte Kongressbeiträge

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P (2014):

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts

Cardiovascular Research, 103, Suppl P157

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P (2014):

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts

Clinical Research in Cardiology. 103, Suppl 1 P433

Schulte C, Skyschally A, Heusch G, Kleinbongard P (2014):

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts

Acta Physiologica. 210, Suppl 695

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P (2013):

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to isolated recipient rat hearts

Circulation. 128, Suppl S 17872

Posterpräsentationen

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts

European Society of Cardiology. 04.07.2014,

Barcelona, Spanien

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts

80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. 24.04.2014,

Mannheim, Deutschland

Schulte C, Skyschally A, Heusch G, Kleinbongard P.

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts.

93th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft. 13.03.2014,

Mainz, Deutschland

Schulte C, Skyschally A, Heusch G, Kleinbongard P.

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to an *in vitro* bioassay of isolated perfused recipient rat hearts.

12. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen. 22.11.2013,

Essen, Deutschland

Skyschally A, **Schulte C**, Heusch G, Kleinbongard P.

Humoral transfer of remote ischemic preconditioning's protection from donor pigs *in vivo* to isolated recipient rat hearts.

American Heart Association Scientific Sessions 2013. 16.11. - 17.11.2013,

Dallas, Texas, USA