

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pathophysiologie

Myokardiale Signaltransduktion bei humoralem Transfer der
Kardioprotektion durch herzferne ischämische
Perkonditionierung in isoliert perfundierten Ratten- und
Mauserzen

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Étienne Elbers
aus Essen

2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76865

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221123-150034-3

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. P. Kleinbongard

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Hermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2022

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Skyschally, A., Kleinbongard, P., Lieder, H., Gedik, N., Stoian, L., Amanakis, G., Elbers, E., und Heusch, G. (2018). Humoral transfer and intramyocardial signal transduction of protection by remote ischemic preconditioning in pigs, rats, and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H159-H172.

Posterpräsentation

Elbers E. Intramyocardial signalling in isolated perfused rat and mouse hearts in response to humoral transfer of remote ischemic preconditioning. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2017.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Kardioprotektion durch herzferne ischämische Konditionierung	5
1.2 Translation der herzfernen ischämischen Perkonditionierung	6
1.3 Signaltransfer der herzfernen ischämischen Konditionierung	8
1.4 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Chemikalien	14
2.1.3 Reinigungssubstanzen für die Langendorff Apparatur	15
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.5 Puffer und Lösungen	16
2.2 Methoden	21
2.2.1 Tierexperimente	21
2.2.2 Statistik	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Isoliert perfundiertes Rattenherz	34
3.1.1 Infarktgrößen	34
3.1.2 Hämodynamik: KF und LVDD	35
3.1.3 Quantitative Proteinanalyse: Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges	35
3.2 Isoliert perfundiertes Mauserherz	37
3.2.1 Infarktgrößen	37
3.2.2 Hämodynamik: KF und LVDD	38
3.2.3 Quantitative Proteinanalyse: Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges	39
4 Diskussion	42
4.1 Limitationen	46
4.2 Ausblick	47
5 Zusammenfassung	48
6 Literaturverzeichnis	49
7 Anhang	58
7.1 Abkürzungsverzeichnis	58
7.2 Tabellen	60
7.3 Abbildungen	63
8 Danksagung	67
9 Lebenslauf	68

1 Einleitung

Die Ruptur und/oder Erosion einer vulnerablen Plaque kann zum thrombotischen Gefäßverschluss eines Herzkranzgefäßes führen. Die daraus resultierende Minderdurchblutung (Ischämie) des nachgeschalteten Herzmuskelareals führt zum akuten Myokardinfarkt (Heusch, 2020). Nach einer Phase, in der der Schaden potenziell noch reversibel ist, erfolgt mit zunehmender Dauer eine wellenförmige Ausbreitung der myokardialen Infarzierung (Reimer et al., 1977; Reimer & Jennings, 1979). Die rechtzeitige Wiederherstellung der Durchblutung (Reperfusion) im akut minderdurchbluteten Myokardareal durch Wiedereröffnung des versorgenden Gefäßes ist die einzige Maßnahme, um die drohende vollständige transmurale Infarzierung des betroffenen Myokardareals bei Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt zu limitieren (Heusch & Gersh, 2017; Heusch, 2020). Die Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes mittels perkutaner koronarer Intervention ist der Goldstandard bei der zeitigen Versorgung obengenannter Patienten (Ibanez et al., 2017). Jedoch verursacht die Reperfusion, neben der Ischämie, einen zusätzlichen spezifischen Schaden des Myokards (Heusch, 2018). Es wird angenommen, dass dieser Reperfusionsschaden circa 50 % der finalen Infarktgröße ausmacht (Yellon & Hausenloy, 2007; Fröhlich et al., 2013; Ibáñez et al., 2015). Trotz Fortschritten in Prävention und Therapie des akuten ST-Hebungsinfarktes nimmt die Inzidenz des akuten Myokardinfarktes nicht ab, mehr Patienten überleben diesen und entwickeln später eine Herzinsuffizienz (Roe et al., 2010; Moran et al., 2014). Die 1-Jahres-Mortalität dieser Patienten ist nach einer Registerstudie weiterhin bei circa 14 % (Szummer et al., 2017). Daher sind zusätzliche kardioprotektive Strategien, die über die alleinige zeitige Reperfusionstherapie hinausgehen, dringend nötig (Heusch, 2013, 2020).

1.1 Kardioprotektion durch herzferne ischämische Konditionierung

Kurze, nicht-schädigende Zyklen von Ischämie und Reperfusion (I/R), ausgelöst in peripheren Organen oder Geweben, reduzieren die myokardiale Infarktgröße in allen untersuchten Spezies, einschließlich des Menschen (Heusch et al., 2015).

Diese sogenannte herzferne ischämische Konditionierung kann zeitlich vor (Präkonditionierung, remote ischemic preconditioning, RIPC (Przyklenk et al., 1993; Skyschally et al., 2015)), während (Perkonditionierung, remote ischemic preconditioning, RPER (Kerendi et al., 2005; Skyschally et al., 2018)) oder nach (Postkonditionierung (Andreka et al., 2007)) einer lang andauernden, schädigenden myokardialen Ischämie angewendet werden.

1.2 Translation der herzfernen ischämischen Perkonditionierung

Obwohl bereits zahlreiche präklinische Studien zur herzfernen ischämischen Konditionierung durchgeführt wurden (Thielmann et al., 2013; Sloth et al., 2014; Yellon et al., 2015; Gaspar et al., 2018; Meybohm et al., 2018; Hausenloy et al., 2019), ist die Translation dieser Studien bisher weniger erfolgreich gewesen (Heusch & Gersh, 2020). Viele kleinere Studien zeigten zwar bereits einen Vorteil für Patienten durch RPER, jedoch konnte dies in einer großen multizentrischen Studie mit 5401 Patienten mit ST-Hebungsinfarkt, CONDI-2/ERIC-PPCI (effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction), nicht bestätigt werden (Hausenloy et al., 2019). Für RPER konnte bereits bei Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt in kleineren klinischen Studien wie CONDI (Bøtker et al., 2010), RIPOST-MI (remote ischemic postconditioning in myocardial infarction) (Prunier et al., 2014), LIPSIA Conditioning (Eitel et al., 2015) und ERIC-Lysis (effect of remote ischemic conditioning in heart attack patients) (Yellon et al., 2015) eine Verringerung der Infarktgröße gezeigt werden. Die Reduktion der Infarktgröße als primärer Endpunkt wurde mittels Messung der Biomarker einer Myokardschädigung (Kreatinkinase Muscle-Brain) (Prunier et al., 2014; Yellon et al., 2015) oder kardialer Bildgebung (Magnetresonanztomographie, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie) (Bøtker et al., 2010; Eitel et al., 2015) nachgewiesen. Retrospektiv konnte eine Verbesserung des Behandlungsergebnisses, gemessen anhand des Auftretens von schweren kardialen und zerebrovaskulären Komplikationen (Gesamtmortalität, Reinfarkt, Herzinsuffizienz, ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke), gezeigt werden (Sloth et al., 2014). Eine klinische 1:1 randomisierte Einzelzentrumsstudie, RIC-STEMI (randomized controlled trial of remote

ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty), zeigte erstmals prospektiv eine verbesserte Prognose durch RPER bei Patienten mit reperfundiertem ST-Hebungsinfarkt. Die kardiale Mortalität und die Hospitalisierung waren im Verlauf von mehr als einem Jahr bei den Patienten mit RPER gegenüber den Patienten mit Placebo reduziert (Gaspar et al., 2018).

In der multizentrischen, einfach verblindeten, randomisierten Studie CONDI-2/ERIC-PPCI zeigte sich jedoch keine Verbesserung des Behandlungserfolges (Herztod oder Herzinsuffizienz nach zwölf Monaten) durch herzferne ischämische Konditionierung bei akutem Myokardinfarkt (Hausenloy et al., 2019). Die Ergebnisse von CONDI-2/ERIC-PPCI stehen im Widerspruch zu den vielen kleineren präklinischen und klinischen Studien, wie CONDI, RIPOST-MI, LIPSIA Conditioning, RIC-STEMI und ERIC-Lysis (Heusch, 2020; Heusch & Gersh, 2020). Die Messung der Infarktgröße der Patienten erfolgte in der multizentrischen Studie CONDI-2/ERIC-PPCI mittels Biomarkern im Blut, anstatt mit sensitiveren bildgebenden Verfahren, sodass die Aussagekraft über die Infarktgröße letztlich limitiert ist. Die Infarktgröße ist jedoch der entscheidende Faktor, welcher die Prognose nach einem ST-Hebungsinfarkt bestimmt (Stone et al., 2016; Bøtker et al., 2018). Zudem war die Mortalität in CONDI-2/ERIC-PPCI mit 2 % in der Kontrollgruppe sehr gering, wohingegen für die klinische Realität eher 14 % angenommen werden müssen, wie sich in einer aktuellen größeren klinischen Registerstudie zeigte (Szummer et al., 2017; Heusch, 2020). Über 95 % der Studienpatienten wurden als Killip-Klasse 1 eingeordnet. Bei diesen Patienten kann man davon ausgehen, dass sie von über die zeitige Reperfusion hinausgehenden kardioprotektiven Strategien nicht profitieren. In der FIRST-Studie (Field Implementation of Remote Ischemic Conditioning in ST-elevation Myocardial Infarction) erlitten Patienten mit einem ST-Hebungsinfarkt und einem Herzstillstand oder kardiogenem Schock weniger schwerwiegende unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse nach 90 Tagen durch herzferne ischämische Konditionierung (Cheskes et al., 2020). Daher müssen sich zukünftige klinische Studien auf Patienten konzentrieren, die wirklich eine zusätzliche Kardioprotektion benötigen, das heißt Patienten mit schwereren ST-Hebungsinfarkten mit Killip-Klasse 3 und höher oder Patienten mit einer schlechteren medizinischen Versorgung (Heusch & Gersh, 2020). CONDI-2/ERIC-PPCI wurde primär entwickelt, um den Behandlungserfolg von einem großen

Patientenkollektiv mit ST-Hebungsinfarkt zu bestimmen. Der Therapieerfolg bei diesen Patienten wird jedoch von Prozessen, wie Infarktheilung, Remodelling und folglich von nachgeschalteten Therapien mit Betablockern oder ACE-Hemmern beeinflusst (Heusch, 2020), die als mögliche Störfaktoren wiederum den Behandlungserfolg beeinflussen haben könnten. Neben obengenannten Störfaktoren, die den Therapieerfolg beeinflussen können, gibt es Störgrößen, die mit der Kardioprotektion selbst interagieren können. Beispielsweise führte in Studien zu RIPC bei koronararteriellen Bypass-Operationen die Anästhesie mit Propofol zu einer Interaktion mit der RIPC-induzierten Kardioprotektion. Der durch RIPC vermittelte Schutz konnte bei den operierten Patienten nicht nachgewiesen werden, was sich anhand einer ausgebliebenen Troponinreduktion zeigte (Kottenberg et al., 2014). Andere diskutierte Störfaktoren, die mit der Kardioprotektion interagieren, sind Komorbiditäten und Komedikationen des Patientenkollektivs wie z.B. Plättchenhemmer wie Clopidogrel oder das Alter der Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt (Kleinbongard et al., 2020). Es ist bisher nicht bekannt, wie diese Störfaktoren mit der Kardioprotektion durch herzferne ischämische Konditionierung interagieren, da der Signaltransfer vom Stimulus in der Peripherie (kurze I/R-Zyklen) zum Herzen selbst und die myokardiale Signaltransduktion im Detail noch nicht verstanden sind (Heusch, 2017, 2020). Dieses Unverständnis wird als eines der Hindernisse für die Translation von kardioprotektiven Strategien, wie z.B. RPER, in die klinische Praxis angesehen. Robustere präklinische Daten sind daher dringend nötig.

1.3 Signaltransfer der herzfernen ischämischen Konditionierung

Humorale und neuronale Signalwege, die gegenseitig auf verschiedenen Ebenen interagieren, sind an dem Transfer des kardioprotektiven Signals vom Stimulus in der Peripherie zum Erfolgsorgan beteiligt (Heusch, 2015; Kleinbongard et al., 2017; Heusch, 2020). Es ist nicht abschließend geklärt, ob der oder die humoralen kardioprotektiven Faktoren lokal und/oder als Folge einer neuronalen Aktivierung von peripheren abdominalen Organen freigesetzt werden (Pickard et al., 2014; Kleinbongard et al., 2017). Als zentrales Übertragungsorgan für kardioprotektive humorale Faktoren bei RIPC wurde die Milz in Interaktion mit dem Vagus in Ratten und Schweinen identifiziert. Die pharmakologische vagale Aktivierung (über

muskarinerge Rezeptoren) von isoliert perfundierten Rattenmilzen führte zu einer Freisetzung kardioprotektiver Faktoren ins Blut. Eine Splenektomie und eine Denervierung der Milz verhinderte die Infarktgrößenreduktion durch RIPC (Lieder et al., 2018). In Mäusen bewirkte RIPC einen Anstieg des Serum-Erythropoetins (EPO), sowie der EPO-mRNA in der Niere. Eine Denervierung der Niere verhinderte den EPO-Anstieg und die Infarktgrößenreduktion durch RIPC (Oba et al., 2015). Eine humorale Übertragung der Kardioprotektion ist über die Speziesgrenze hinaus möglich. Von Individuen, die eine ischämische Konditionierung durchliefen, konnte mittels Blut (Dickson et al., 1999), Blutplasma (Skyschally et al., 2015) oder Blutplasmadialysat (Shimizu et al., 2009; Hildebrandt et al., 2016) die Kardioprotektion auf ein natives Herz übertragen werden. Jedoch ist die Identifizierung des oder der humoralen Faktoren weiterhin nicht erfolgreich (Gedik et al., 2017; Heusch, 2020). In der Literatur sind mehr als 100 humorale Faktoren, die Kardioprotektion vermitteln, beschrieben (Heusch, 2015).

Im Herzen werden die kardioprotektiven Signalkaskaden der herzfernen ischämischen Konditionierung über sarkolemmale Rezeptoren und/oder Rezeptor-unabhängig aktiviert. Dabei sind unter anderem G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von Adenosin, Bradykinin und Opioiden, spezifische Rezeptoren vom atrialem natriuretischem Peptid und Glykoprotein 130 beteiligt (Kleinbongard & Heusch, 2015). Eine Eliminierung bzw. Inhibition eines jeweiligen untersuchten humoralen Faktors verhinderte in vielen Studien die durch RIPC ausgelöste Kardioprotektion. Dabei konnte zwar die Kardioprotektion mittels Inhibition eines einzelnen obengenannten Faktors aufgehoben werden, jedoch wurden dabei die in früheren Arbeiten diskutierten Mediatoren in den Versuchen nicht berücksichtigt (Heusch, 2017).

Die intramyokardiale Signaltransduktion wurde schematisch durch drei große konzeptionelle Signalwege kategorisiert:

1. Der Survivor Activating Factor Enhancement Signalweg (SAFE-Signalweg) mit dem Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) als ein beteiligtes Protein (Lecour, 2009);
2. Der Reperfusion Injury Kinase Signalweg (RISK-Signalweg) mit der Protein Kinase B (AKT) und der Extracellulär Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) als beteiligte Schlüsselenzyme (Schulman et al., 2002; Hausenloy & Yellon, 2004);

3. Der Stickstoffmonoxid/Protein Kinase G Signalweg (NO/PKG-Signalweg) unter anderem mit endothelialer NO-Synthase und der Protein Kinase G (Cohen & Downey, 2007).

Diese Signalwege sind stark schematisiert, weitere Proteine sind an den Kaskaden beteiligt und interagieren untereinander (Heusch, 2020).

Alle Signalwege konvergieren auf dem Nukleus, dem Zytoskelett und als primäres Ziel auf mitochondrialer Ebene als Endeffektor (Heusch, 2015; Heusch, 2020). Zwischen verschiedenen Spezies gibt es eine unterschiedliche Beteiligung der genannten Signalwege (Heusch, 2015). Bei Schweinen spielte bei der Postkonditionierung und RIPC nur der SAFE-Signalweg eine kausale Rolle (Skyschally et al., 2009; Skyschally et al., 2015). In Ratten konnte eine Beteiligung des RISK- und des SAFE-Signalweges bei Kardioprotektion durch RIPC nachgewiesen werden (Suleman et al., 2008; Skyschally et al., 2015; Skyschally et al., 2018). Ebenfalls unterscheidet sich die Beteiligung der Schlüsselenzyme zwischen den Spezies. Beim Schwein spielt die Phosphorylierung von STAT3 eine kausale Rolle, wohingegen beim Menschen die Aktivierung von myokardialem STAT5 mit dem Schutz durch RIPC assoziiert ist (Heusch et al., 2012). Daher kann trotz ähnlicher Herzfrequenz, myokardialer und koronarer Anatomie des Schweineherzens und des menschlichen Herzens nicht von einer ähnlichen Beteiligung der Schlüsselenzyme der RPER ausgegangen werden (Ibáñez et al., 2015; Heusch & Rassaf, 2016). Weitere Untersuchungen der beteiligten Proteine in verschiedenen Spezies könnten daher das Wissen über die zugrunde liegenden Signalwegen der RPER erweitern.

Der Signaltransfer und die intramyokardiale Signaltransduktion der herzfernen ischämischen Konditionierung wurden weitestgehend aus experimentellen Tiermodellen und elektiven Eingriffen am Menschen mit RIPC abgeleitet (Heusch, 2015; Skyschally et al., 2015; Hausenloy et al., 2016). Bei elektiven Eingriffen mit kardialer Ischämie wie Bypass- oder Klappenoperationen ist RIPC zwar anwendbar, aber nicht bei einem unvorhersehbaren akuten Myokardinfarkt, einem der häufigsten kardiologischen Notfälle. Für diese Patienten ist die RPER das anwendbare Verfahren, da hier die herzferne ischämische Konditionierung während des bereits ablaufenden Infarktes noch angewendet werden kann.

Zur Verbesserung der bisher wenig erfolgreichen Translation in die klinische Praxis und um möglicherweise der pharmakologischen Rekrutierung der

Kardioprotektion näher zu kommen, ist folglich eine Aufschlüsselung der beteiligten Signaltransduktion, bei der für den Patienten mit akutem Myokardinfarkt klinisch relevanten RPER, unabdingbar.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den humoralen Transfer der RPER-induzierten Kardioprotektion auf isoliert perfundierte Ratten- und Mauserzbioassays und die dadurch induzierte intramyokardiale Signalaktivierung anhand ausgewählter Schlüsselenzyme zu untersuchen: Hierzu soll die Kardioprotektion, die zuvor im Großtiermodell Schwein durch RPER ausgelöst wurde, mittels Blutplasma/-dialysat auf isoliert perfundierte Ratten- und Mauserzen übertragen werden. Teilziele dieser Arbeit sind:

1. Untersuchung des Einflusses von Schweineblutplasma/-dialysat, gewonnen nach RPER oder Placebo-Manöver, auf die Infarktgrößen in isoliert perfundierten Ratten- und Mauserzen mit globaler I/R.
2. Untersuchung der durch Schweineblutplasma/-dialysat, gewonnen nach RPER oder Placebo-Manöver, induzierten Phosphorylierung von Schlüsselenzymen aus bekannten kardioprotektiven Signalwegen mittels Western Blot von Myokardbiopsien der isoliert perfundierten Ratten- und Mauserzen.
3. Untersuchung der kausalen Relevanz der untersuchten Schlüsselenzyme durch pharmakologische Blockade und Quantifizierung der induzierten Phosphorylierung mittels Western Blot von Myokardbiopsien der isoliert perfundierten Ratten- und Mauserzen.
4. Beurteilung der Erholung der funktionellen Parameter koronarer Fluss (KF) und linksventrikulär entwickelter Differenzdruck (LVDD) nach globaler I/R durch Schweineblutplasma/-dialysat, gewonnen nach RPER oder Placebo-Manöver.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analog-/Digitalwandler: PowerLab 8/35	AD Instruments, Spechbach, Deutschland
Aortenkanüle für das Rattenherz ICH-SR	Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Aortenkanüle für das Mäuseherz	Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Blutgasanalysator ABL 510	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
ChemoCam Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
<i>Datenerfassung und -auswertung:</i> LabImage 1D LabChart v8 ImageJ 1.48 v SigmaStat 3.5	Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Deutschland AD Instruments, Dunedin, Neuseeland National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA Systat Software Inc, San José, Kalifornien, USA
Dispergierer T 10 basic ULTRA-TURRAX®	IKA, Staufen, Deutschland
Druckaufnehmer DPT-6000	CODAN, Forstinning, Deutschland
Druckwandler Verstärker Modul (TAM-A)	Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Druckwandler Verstärker Modul (TAM-D)	Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Druckwandler Verstärker Quad Bridge Amp	AD Instruments, Dunedin, Neuseeland
Gel Doc™ EZ Gel Documentation System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Glaswaren:</i> Puffergefäße, Organbad, Windkessel, Wärmetauscher	Glastechnische Werkstatt Verhees, Neuss, Deutschland
Heizblock Thermostat TH 21	HLC, Bovenden, Deutschland

Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Pulch + Lorenz, March, Deutschland
Kleinschüttler IKA MS 3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Magnetrührplatte MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikrotiterplatten-Leser iMark™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
pH-Elektrode Blue Line 15 pH	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Pipetten, diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Programmierbare Spritzenpumpe Aladdin	WPI, Sarasota, Florida, USA
<i>Präparationsbesteck</i> : Mikrofederschere, Mikropinzette, feine Scheren, anatomische Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Rollerpumpe Reglo Digital	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Reinstwasseranlage arium® pro	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Scanner Epson Perfection 4870 Photo	Epson, Suwa, Nagano, Japan
Spiegelreflexkamera Canon EOS 750D	Canon, Tokio, Japan
Stereomikroskop Stemi 508	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Thermometer Digi-Sense J-T-E-K 2 Kanal	Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA
Thermostatischer 230V/50Hz Zirkulator E 100 Bad Volumen 3L	Lauda-Königshofen, Deutschland
Ultraschall-Flussmesser TTFM Typ 410	Transonic System Inc., Ithaca, New York, USA
Ultraschall-Flussmesskopf ME2-PXN	Transonic System Inc., Ithaca, New York, USA
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Waage Kern 770	Kern, Balingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1002	GFL, Burgwedel, Deutschland
<i>Zentrifugen:</i> Biofuge Fresco Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Linde, München, Deutschland
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 (H ₂ O))	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Center Valley, Pennsylvania, USA
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid Lösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital Narkodorm®	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Ponceau S-Lösung	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Probenpuffer XT (4x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Proteinstandard Precision Plus	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Protein Assay Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

Rinderserumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Stattic	Tocris, Bristol, Großbritannien
Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ECL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
U0126	Tocris, Bristol, Großbritannien
Wortmannin	Tocris, Bristol, Großbritannien

2.1.3 Reinigungssubstanzen für die Langendorff-Apparatur

Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	
Mucosol	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Incidin	Ecolab, St. Paul, Minnesota, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Criterion™ XT Bis-Tris Precast Gel (12 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Deckgläser	
1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml Einmalspritze BD Discardit II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Drei-Wege-Hähne	Smiths Medical Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Dialyseschlauch Spectra/Por® 2: 12-14 kDa	Spectrum Europe B.V., Breda, Niederlande
Einmalkanülen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Tubes®, diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filter-Papier für Western Blots	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Flexibler Plastikschlauch Rollerpumpe 2.06 I.D	Tygon, Charny, Frankreich

Flexibler Plastikschauch Rollerpumpe 2.79 I.D	Tygon, Charny, Frankreich
Flexibler Plastikschauch T3601-13	Tygon, Charny, Frankreich
Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Mikrotestplatten 96 Wells	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilter Chromafil Xtra PES- 500/25	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Membranfilter 0,45 Mikrometer	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Nahtmaterial Seraflex® USP 4/0	Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Original Perfusor, Syringe 50 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Parafilm M®	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovetten® 9ml Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Shandon™ Cryomatrix™ Einbettharz	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
Silikonschlauch 3350	Tygon, Charny, Frankreich
Vlieskompressen steril 10 cm x 10 cm	Fuhrmann, München, Deutschland

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Langendorff

Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) für isolierte Ratten- und Mausherzen:

118,00 mmol/l NaCl

24,90 mmol/l NaHCO₃

5,60 mmol/l Glukose

4,70 mmol/l KCl

2,00 mmol/l Natriumpyruvat

2,00 mmol/l CaCl₂

1,60 mmol/l MgSO₄ × 7 H₂O für Ratte; 1,10 mmol/l MgSO₄ × 7 H₂O für Maus

1,18 mmol/l KH₂PO₄

0,01 mmol/l EDTA für Ratte; 0,02 mmol/l EDTA für Maus

Der modifizierte KHP wurde durch kontinuierliche Einleitung von Carbogengas (95% O₂, 5 % CO₂) und einer Temperatur von 37 °C auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und über einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

Dialysatpuffer für isolierte Mausherzen:

118,00 mmol/l NaCl
24,90 mmol/l NaHCO₃
5,60 mmol/l Glukose
4,70 mmol/l KCl
2,00 mmol/l Natriumpyruvat
2,00 mmol/l CaCl₂
1,10 mmol/l MgSO₄ mal 7 H₂O
1,18 mmol/l KH₂PO₄
0,02 mmol/l EDTA für Maus

Inhibitoren für isolierte Ratten- und Mausherzen:

a) Inhibitoren für den SAFE-Signalweg: SAFE-Blockade (SAFE-BL)

-Stammlösung Stattic: 100 mmol/l DMSO
-Im KHP: 10 µmol/l für Ratte; 2 µmol/l für Maus

b) Inhibitoren für den RISK-Signalweg: RISK-Blockade (RISK-BL)

-Stammlösung Wortmannin: 10 mmol/l DMSO
-Wortmannin im KHP: 1 µmol/l für Ratte und Maus
-Stammlösung U0126: 100 mmol/l DMSO
-U0126 im KHP: 1 µmol/l für Ratte und Maus

TTC-Färbepuffer:

Natriumphosphat-Puffer:
0,09 mol/l Na₂HPO₄
0,09 mol/l NaH₂PO₄
1,5 % TTC für Ratte und 1 % für Maus

2.1.5.2 Western Blot

Aufarbeitungspuffer für Proteinlysate:

Stocklösung:

1 mol/l TRIS

Mit 37 % HCl auf pH=7,4

Gebrauchslösung:

0,1 mol/l TRIS

2 % (w/V) SDS

Standard für Proteinbestimmung:

Stocklösung:

2 mg/ml BSA

Gebrauchslösungen:

1: (0 mg/ml); 2: (0,2 mg/ml); 3: (0,4 mg/ml); 4: (0,6 mg/ml); 5: (0,8 mg/ml); 6: (1,0 mg/ml); 7: (1,2 mg/ml); 8: (1,4 mg/ml)

Stockpuffer Towbin 10-fach konzentriert:

0,25 mol/l TRIS

1,92 mol/l Glycin

pH=8,6 ± 0,2

Stockpuffer TBS 10-fach konzentriert:

0,20 mol/l TRIS

1,37 mol/l NaCl

In 37 % HCl auf pH=7,6 eingestellt

Laufpuffer für SDS-Page:

Gebrauchslösung:

Towbin 1-fach konzentriert

3,47 mmol/l SDS (1 % (w/v) SDS)

Puffer für Transfer auf PVDF-Membran:

Towbinpuffer 1-fach konzentriert

20 % (v/v) Methanol

Waschpuffer: Tris-buffered saline with Tween20-Puffer (TBS-T-Puffer):

Gebrauchslösung:

TBS 1-fach konzentriert

1 % (v/v) Tween 20

Milch 5 % zum Blocken:

5 % (w/v) Milchpulver gelöst in TBS-T-Puffer

Strippingpuffer zur Entfernung der Antikörper:

0,165 mol/l TRIS

0,25 mol/l NaOH

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Klonalität und Größe (kDa)	Ratte		Maus		Firma und Ordernummer
			Verdünnung in 5 % BSA	Sekundärer Antikörper	Verdünnung in 5 % BSA	Sekundärer Antikörper	
pAKT1/2/3 (Ser474)	Kaninchen	Polyklonal, 56	1:250	1:5.000	1:150	1:4.000	Cell Signaling #9271
pERK1(Thr202/Tyr204), pERK2(Thr185/TYR187)	Kaninchen	Polyklonal, 44/42	1:1.000	1:20.000	1:500	1:20.000	Cell Signaling #9101
pSTAT3 (Tyr705)	Maus	Monoklonal, 86	1:500	1:10.000	1:500	1:2.000	Cell Signaling #9138
gesAKT1/2/3	Kaninchen	Polyklonal	1:500	1:20.000	1:500	1:40.000	Cell Signaling #9272
gesERK1/2	Kaninchen	Polyklonal	1:1.000	1:40.000	1:1.000	1:40.000	Cell Signaling #9102
gesSTAT3	Kaninchen	Monoklonal	1:1.000	1:40.000	1:1.000	1:20.000	Cell Signaling #12640

AKT1/2/3: Protein Kinase B 1/2/3; ERK1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2; STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Firma
Peroxidasekonjugierter Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Cell Signaling
Peroxidasekonjugierter Anti-Maus IgG	Pferd	Cell Signaling

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimente

Die Experimente wurden zwischen Mai 2015 und Januar 2019 durchgeführt. Alle Versuche wurden durch das bioethische Komitee in Düsseldorf (G1407/14 und Z1493-15) genehmigt und entsprachen den deutschen Tierschutzgesetzen und der „Position of the American Heart Association on Research Animal Use“ der American Heart Association vom 11. November 1984 (Skyschally et al., 2018). Die experimentellen Protokolle, die Messungen des koronaren Flusses und des linksventrikulären Druckes, die Quantifizierung der Infarktgröße und die Induktion von RPER waren standardisiert (Bøtker et al., 2018; Lindsey et al., 2018). Die operativen Eingriffe im Schwein wurden von Priv. Doz. Dr. rer. medic. Andreas Skyschally durchgeführt. Plasmagewinnung und Aufbereitung, Versuche mit isoliert perfundierten Ratten- und Mausherzen nach Langendorff, sowie die Analyse der entnommenen Myokardbiopsien mittels Western Blot erfolgten selbstständig durch den Autor dieser Arbeit, Étienne Elbers, nach Anleitung durch Dr. med. Dipl. mus. Helmut Raphael Lieder.

2.2.1.1 Protokolle im Schwein

Männliche Göttinger Minischweine mit einem Gewicht von $30,9 \pm 2,9$ kg wurden mit Flunitrazepam (0,4 mg/kg i.v., Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) sediert. Die Anästhesie wurde mit Etomidat (0,3 mg/kg i.v., Hypnomidat, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) und Sufentanil (1 µg/kg i.v., Sufenta, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) eingeleitet und mit 2 % Isofluran (Forene, AbbVie, Ludwigshafen, Deutschland) in sauerstoffangereicherter Luft aufrechterhalten. Die Muskelrelaxation erfolgte durch einen Bolus Rocuronium (0,6 mg/kg i.v., Esmeron, MSD, Haar, Deutschland). Der Thorax wurde durch eine linkslaterale Thorakotomie eröffnet. Die 60-minütige Okklusion des Ramus interventricularis anterior, einem Ast der linken Koronararterie, erfolgte distal des zweiten diagonalen Astes.

Der linke Hinterlauf des Schweines wurde mittels eines Tourniquets für das RPER-Manöver (n=19) während der 20. min der Ischämie für 5 min abgebunden und wieder für 5 min reperfundiert. Dieser I/R Zyklus wurde viermal wiederholt. Für

das Placebo-Manöver (PLA) (n=20) wurde das Tourniquet nicht angezogen. 200 ml Vollblut wurden in der 10. min der Reperfusion aus der absteigenden Aorta thoracica in Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen, bei 4 °C für 10 min bei 800 g zentrifugiert und das separierte Plasma erneut bei 4 °C für 10 min bei 4500 g zentrifugiert. Das separierte Plasma wurde bei -80 °C für weitere Versuche tiefgefroren (Skyschally et al., 2018). Nach 180 min Reperfusion wurde der Ramus interventricularis anterior erneut abgebunden und 5 ml Patentblau V (Guerbet, Sulzbach, Deutschland) in den linken Vorhof injiziert, um das Risikoareal darzustellen. Das Schwein wurde mittels Injektion von 20 ml Kaliumchlorid-Lösung (2 mol/l, B. Braun, Melsungen, Deutschland) in den linken Ventrikel euthanasiert, das Herz entnommen und in 5 transversale Scheiben geschnitten, diese beidseitig fotografiert, gewogen und mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-(TTC-)Lösung für 20 min bei 37 °C gefärbt. Die totale Herzscheibengröße, die Fläche des linken Ventrikels, das Risikoareal und die Infarktgröße wurden planimetrisch quantifiziert. Das Risikoareal wurde als eine Fraktion des linken Ventrikels und das infarzierte Areal als eine Fraktion des Risikoareals kalkuliert.

Der Mittelwert des Risikoareals war in beiden Gruppen nicht unterschiedlich. RPER reduzierte die Infarktgröße gegenüber PLA (Abbildung 1). Die Infarktgrößenreduktion durch RPER im Schwein war vergleichbar mit vorigen experimentellen Arbeiten ausgelöst durch RIPC (Skyschally et al., 2015).

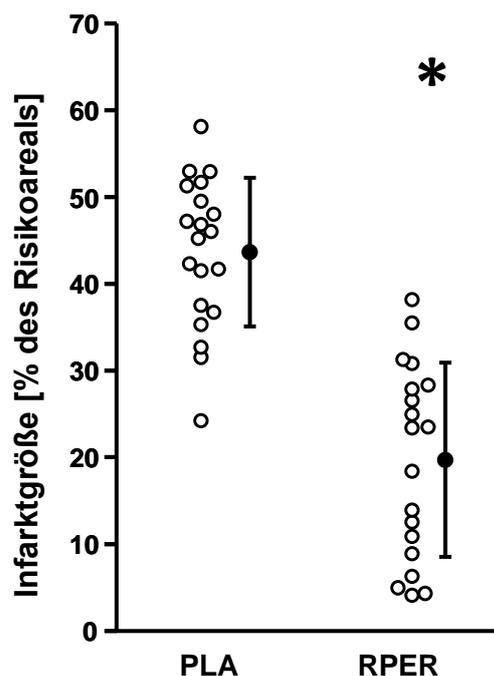


Abbildung 1: Infarktgrößen der Schweineherzen: Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. PLA; Ein-Weg-ANOVA und Fisher's Least-Significant-Difference Post-Hoc Test.

PLA: Schweine, die kein kardioprotektives Manöver erhielten; RPER: Schweine, die eine herzferne ischämische Per konditionierung durchliefen;

Risikoareal: Gefährdeter Myokardbereich distal des abgebunden Gefäßgebietes des Ramus interventricularis anterior. Es gab keinen Größenunterschied des Risikoareals zwischen der Placebo-Gruppe und der RPER-Gruppe.

Risikoareal PLA: 23 ± 5 % des linken Ventrikels; Risikoareal RPER: 22 ± 5 % des linken Ventrikels. Abbildung modifiziert nach (Skyschally et al., 2018).

2.2.1.2 Isoliert perfundiertes Rattenherz

Männliche Lewis-Ratten in einem Alter von 2 - 3 Monaten und einem Gewicht von 200 - 350 g (Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen) wurden mit einer Injektion von 800 mg/kg i.p. Pentobarbital (Narkodorm®, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert und mit 1500 I.E. unfraktioniertem Heparin (Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) mit derselben Injektion antikoaguliert.

Nach Erlöschen der Zwischenzehenreflexe wurde der Thorax bilateral eröffnet, das Herz rasch exzidiert und in 4 °C kalte 0,9 % NaCl-Lösung gelegt. Die Aorta wurde distal des Sinus aortae kanüliert und an einer Langendorff-Apparatur perfundiert. Die Perfusion erfolgte druckkonstant mit modifiziertem KHP bei 65 bis 68 mmHg. Der KF (ml/min) wurde mithilfe eines Ultraschall-Durchlaufflussmesskopfes oberhalb der Aortenkanüle gemessen. Die Messung des linksventrikulären systolischen (LVD_{sys}) und linksventrikulären diastolischen Druck (LVD_{dia}) erfolgte mittels eines mit einem Druckaufnehmer verbundenen, wassergefüllten Latexballons, der nach Eröffnung des linken Atriums durch Entfernung des Herzohrs in den linken Ventrikel vorgeschoben wurde. Der LVD_{dia} des Herzens wurde über Füllung des Ballons auf 5 bis 15 mmHg eingestellt. Über das rechte Herzohr wurde das Herz konstant bei einer Frequenz von 360 Schlägen pro min stimuliert. Die Temperatur wurde bei 37,3 - 37,7 °C konstant gehalten, indem das Herz in mit Carbogen begasten modifizierten KHP eingetaucht wurde. Die Perfusatemperatur wurde mittels Wärmeaustauscher vor der Aortenkanüle konstant gehalten.

Zu Versuchsbeginn durchliefen alle Herzen eine Stabilisierungsphase von 20 min. Herzen mit einem Fluss > 18 ml/min und < 10 ml/min, sowie einem linksventrikulärem Differenzdruck ($LVDD=LVD_{sys}-LVD_{dia}$) > 130 mmHg und < 70 mmHg wurden von allen weiteren Experimenten ausgeschlossen (Lieder et al., 2016; Lieder et al., 2018; Skyschally et al., 2018).

Vor dem Experiment wurde die Schweinplasmprobe bei Raumtemperatur aufgetaut und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 5 μ m filtriert. Das Schweinplasma wurde für 8 min über eine Spritzenpumpe im Verhältnis 1:6 vor der Heizspirale in den Pufferstrom infundiert. Das Schweineplasma wurde mit modifiziertem KHP für 2 min ausgewaschen und der Puffer im Organbad vollständig gewechselt, um Proteinausflockungen während der globalen Ischämie

zu verhindern. Perfusionsdruck, Temperatur, pH-Wert und die Sauerstoffsättigung des modifizierten KHP wurden durch die Infusion des Schweineplasmas nicht beeinflusst. Eine globale Ischämie wurde induziert, indem die Perfusion für 30 min vollständig unterbrochen wurde. Zu Beginn der Reperfusion wurde erneut Schweineplasma im Verhältnis 1:6 für 5 min in den Pufferstrom infundiert. Die Blocker wurden in DMSO gelöst, dem modifizierten KHP mit einer finalen Konzentration von 0,1 % zugesetzt und über die gesamte Versuchsdauer infundiert (Skyschally et al., 2018). In Vorversuchen zeigte sich kein Einfluss von DMSO und den gewählten Blockern (10 $\mu\text{mol/l}$ Stattic und 1 $\mu\text{mol/l}$ Wortmannin/U0126) auf die Infarktgröße (Abbildung 2).

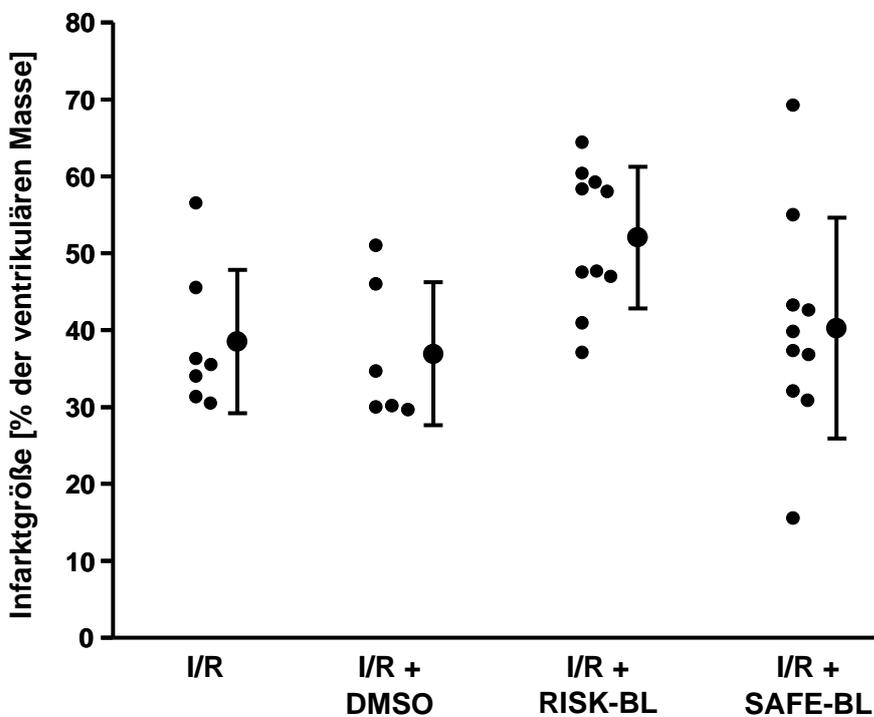


Abbildung 2: Infarktgrößen der isoliert perfundierten Rattenherzen mit in KHP gelöstem DMSO: Mittelwerte \pm Standardabweichung; Ein-Weg-ANOVA und Fisher's Least-Significant-Difference Post-Hoc Test.

I/R: Ischämie/Reperfusion; DMSO: Perfusion mit DMSO gelöst in KHP; RISK-BL: Blockade des RISK-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 1 $\mu\text{mol/l}$ Wortmannin/U0126; SAFE-BL: Blockade des SAFE-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 10 $\mu\text{mol/l}$ Stattic.

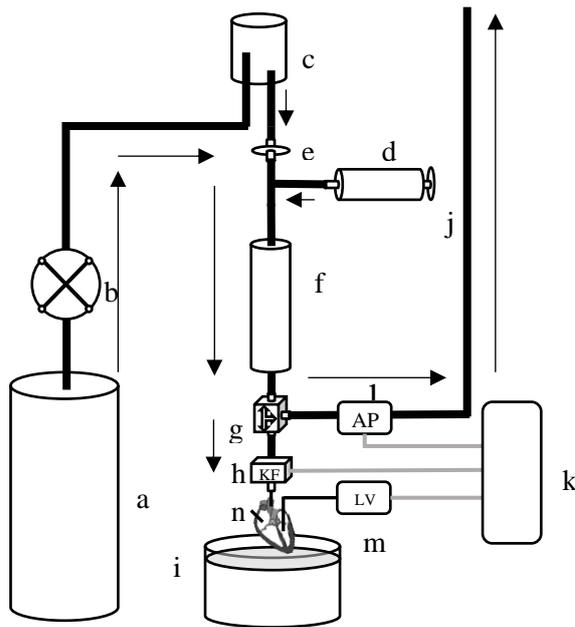


Abbildung 3: Aufbau Langendorff-Apparatur für isolierte Rattenherzen:

a. doppelwandiges Puffergefäß; b. Rollerpumpe; c. Windkessel; d. Spritzenpumpe; e. Membranfilter 5 µm; f. doppelwandige Heizspirale; g. Dreiwegehahn; h. Ultraschall-Durchlaufflussmesskopf; i. doppelwandiges Organbad; j. Steigrohr für hydrostatischen Perfusionsdruck; k. Computer zur Datenaufzeichnung; l. Druckaufnehmer AP; m. Druckaufnehmer LVDD an Latexballon; n. Pacer-Elektrode

2.2.1.2.1 Versuchsprotokolle

Jede Plasmaprobe eines spezifischen Schweines wurde in jedem der folgenden Versuchsprotokolle verwendet.

Die isoliert perfundierten Rattenherzen durchliefen folgende Protokolle:

1. Zeitkontrolle (ZK; n=5): 180 min Perfusion.
2. Ischämie/Reperfusion (I/R; n=7): 30 min Baseline, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion.
3. Infusion von Remote-ischemic-perconditioning-Plasma (pRPER; n=6): 20 min Baseline, 8 min Infusion von pRPER, 2 min auswaschen, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion mit 5 min Infusion von pRPER zu Beginn.
4. pRPER+RISK-BL (n=6): Das Protokoll war identisch zu pRPER mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Wortmannin und U0126 mit einer Konzentration von 1 µmol/l zur Blockade des RISK-Signalweges gelöst war.
5. pRPER+SAFE-BL (n=6): Das Protokoll war identisch zu pRPER mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Stattic mit einer Konzentration von 10 µmol/l zur Blockade des SAFE-Signalweges gelöst war.

6. Infusion von Placebo-Plasma (pPLA; n=6): 20 min Baseline, 8 min Infusion von pPLA, 2 min auswaschen, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion mit 5 min Infusion von pPLA zu Beginn.
7. pPLA+RISK-BL (n=6): Das Protokoll war identisch zu pPLA mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Wortmannin und U0126 mit einer Konzentration von 1 µmol/l zur Blockade des RISK-Signalweges gelöst war.
8. pPLA+SAFE-BL (n=5): Das Protokoll war identisch zu pPLA mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Stattic mit einer Konzentration von 10 µmol/l zur Blockade des SAFE-Signalweges gelöst war (Skyschally et al., 2018).

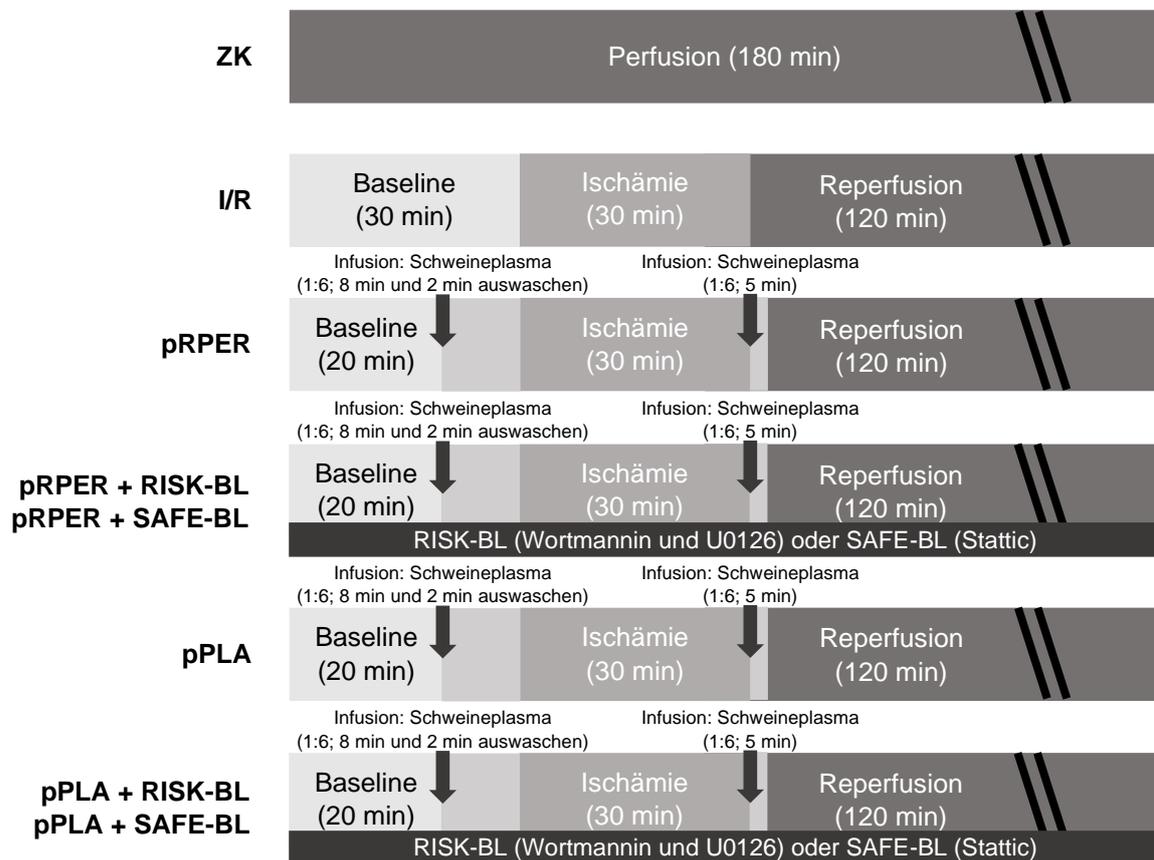


Abbildung 4: Übersicht der Versuchsprotokolle für isolierte Rattenherzen:

I/R: Ischämie/Reperfusion; pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; RISK-BL: Blockade des RISK-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 1 µmol/l Wortmannin und U0126; SAFE-BL: Blockade des SAFE-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 10 µmol/l Stattic; ZK: Zeitkontrolle.

2.2.1.3 Präparation des Schweineplasmadialysats

Vor dem Experiment wurden die Schweineplasmaproben bei Raumtemperatur aufgetaut, 14 ml in einen Dialyseschlauch mit einem Porendurchmesser für 12 bis 14 kDa große Moleküle pipettiert und dieser durch Klammern verschlossen. Die Membran wurde in 66 ml Dialysatpuffer mit dem gesamten Plasmareservoir eingetaucht und für 24 h bei 4 °C unter Schütteln dialysiert (Verdünnung 1:6).

Vor dem Versuch wurden Glukose und Bicarbonat im Dialysat gelöst, das Schweineplasmadialysat durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, vorgewärmt auf 37 °C und mit Carbogas begast. Zehn min vor der Infusion des Schweineplasmadialysats wurde Calciumchlorid auf 2 mmol/l titriert (Skyschally et al., 2018).

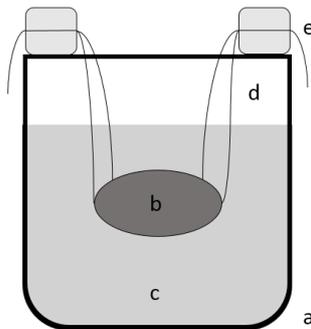


Abbildung 5: Präparation des Schweineplasmadialysats

a. Dialysatgefäß; b. Schweineplasma; c. Dialysatpuffer; d. Membran 12 - 14 kDa; e. Klemmen zum Membranverschluss

2.2.1.4 Isoliert perfundiertes Mauserz

Männliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Alter von 2 - 3 Monaten und einem Gewicht von 20 - 26 g wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend mit 200 I.E./kg i.p. unfraktioniertem Heparin (Heparin-Natrium-25000, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) antikoaguliert. Der Thorax wurde bilateral eröffnet, das Herz rasch exzidiert und zügig in 4 °C kalte 0,9 % NaCl-Lösung gelegt. Die Aorta wurde unter dem Stereomikroskop (Stemi 508, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) distal des Sinus aortae kanüliert und an einer Langendorff-Apparatur perfundiert.

Die Perfusion erfolgte druckkonstant mit modifizierten KHP bei 80 mmHg. Der KF wurde mithilfe eines Ultraschall-Durchflussmesskopfes oberhalb der Aortenkanüle gemessen. Die Messung des LVD_{sys} und LVD_{dia} erfolgte durch einen wassergefüllten Kunststoffballon, der nach Eröffnung des linken Atriums durch Absetzen des Herzohrs in den linken Ventrikel vorgeschoben wurde und mit einem

Druckaufnehmer verbunden war. Der LVD_{dia} des Herzens wurde über Füllung des Ballons auf 5 bis 15 mmHg eingestellt. Über das rechte Herzohr wurde das Herz konstant bei einer Frequenz von 500 Schlägen pro min elektrisch stimuliert. Eine thermostatgesteuerte Umwälzpumpe hielt die Herzen in einer feuchten doppelwandigen Glaskammer konstant bei 37,3 – 37,7 °C. Die Perfusatemperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten und die Temperatur wurde während des Versuchs kontinuierlich gemessen.

Zu Versuchsbeginn durchliefen alle Herzen eine Stabilisierungsphase von 20 min. Herzen mit einem Fluss > 5 ml/min bzw. < 1 ml/min und einem LVDD > 130 mmHg bzw. < 50 mmHg wurden aus dem Versuch ausgeschlossen (Hildebrandt et al., 2016; Skyschally et al., 2018).

Das Schweineplasmadialysat wurde unverdünnt über einen Zeitraum von 15 min vor der globalen Ischämie infundiert. Perfusionsdruck, Temperatur, pH-Wert und die Sauerstoffsättigung des modifizierten KHP wurden durch die Infusion des Schweineplasmadialysats nicht beeinflusst.

Die Blocker wurden in DMSO gelöst, dem modifizierten KHP mit einer finalen Konzentration von 0,1 % zugesetzt und über die gesamte Versuchsdauer infundiert (Skyschally et al., 2018). In Vorversuchen zeigte sich kein Einfluss von DMSO und den gewählten Blockern (2 µmol/l Stattic und 1 µmol/l Wortmannin/U0126) auf die Infarktgröße (Abbildung 6).

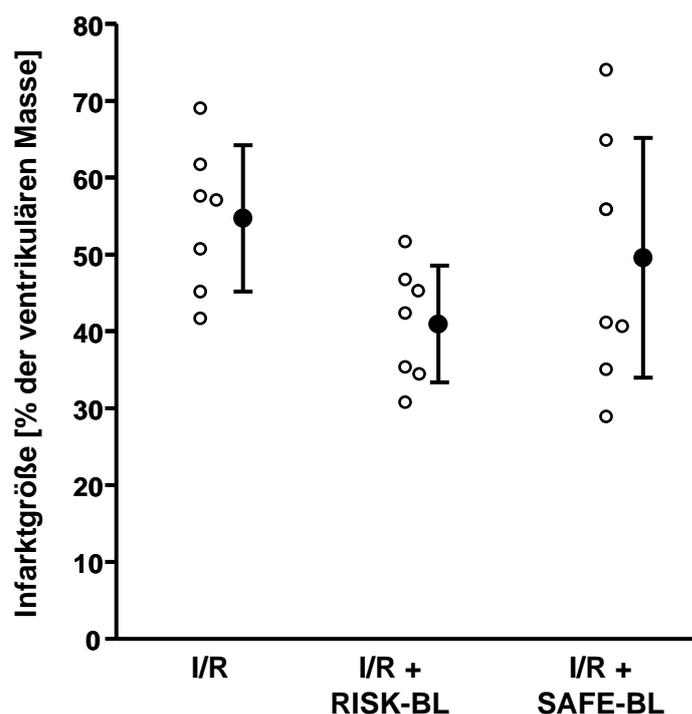


Abbildung 6: Infarktgrößen der isoliert perfundierten Mauserzen mit in KHP gelöstem DMSO und Blockern: Mittelwerte ± Standardabweichung; Ein-Weg-ANOVA und Fisher's Least-Significant-Difference Post-Hoc Test.

I/R: Ischämie und Reperfusion; RISK-BL: Blockade des RISK-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 1 µmol/l Wortmannin/U0126; SAFE-BL: Blockade des SAFE-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 2 µmol/l Stattic.

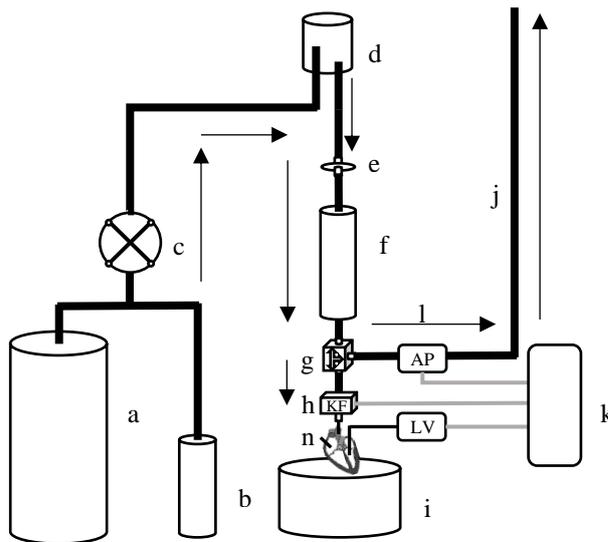


Abbildung 7: Aufbau Langendorff-Apparatur für isolierte Mausherzen:

a. doppelwandiges Puffergefäß;
 b. doppelwandiges Dialysatgefäß;
 c. Rollerpumpe; d. Windkessel;
 e. Membranfilter 5 μm ; f. Heizspirale;
 g. Dreiwegehahn; h. Ultraschall-Durchlaufflussmesskopf;
 i. doppelwandiges Organbad; j. Steigrohr für hydrostatischen Perfusionsdruck;
 k. Computer zur Datenaufzeichnung; l. Druckaufnehmer AP; m. Druckaufnehmer LVDD an Kunststoffballon; n. Elektrode

2.2.1.4.1 Versuchsprotokolle

Jede Plasmaprobe eines spezifischen Schweines wurde in jedem der folgenden Versuchsprotokolle verwendet.

Die isoliert perfundierten Mausherzen durchliefen folgende Protokolle:

1. Zeitkontrolle (ZK; n=4): 180 min Perfusion.
2. Ischämie/Reperfusion (I/R; n=6): 30 min Baseline, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion.
3. Infusion von Remote-ischemic-perconditioning-Plasmadialysat (dRPER; n=5): 20 min Baseline, 15 min Infusion von dRPER, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion.
4. dRPER+RISK-BL (n=5): Das Protokoll war identisch zu dRPER mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Wortmannin und U0126 mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ zur Blockade des RISK-Signalweges gelöst war.
5. dRPER+SAFE-BL (n=5): Das Protokoll war identisch zu dRPER mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Stattic mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zur Blockade des SAFE-Signalweges gelöst war.
6. Infusion von Placebo-Plasmadialysat (dPLA; n=5): 20 min Baseline, 15 min Infusion von dPLA, 30 min globale Ischämie, 120 min Reperfusion.
7. dPLA+RISK-BL (n=5): Das Protokoll war identisch zu dPLA mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP

Wortmannin und U0126 mit einer Konzentration von 1 µmol/l zur Blockade des RISK-Signalweges gelöst war.

8. dPLA+SAFE-BL (n=5): Das Protokoll war identisch zu dPLA mit dem Unterschied, dass während des gesamten Versuchs im modifizierten KHP Stattic mit einer Konzentration von 10 µmol/l zur Blockade des SAFE-Signalweges gelöst war (Skyschally et al., 2018).

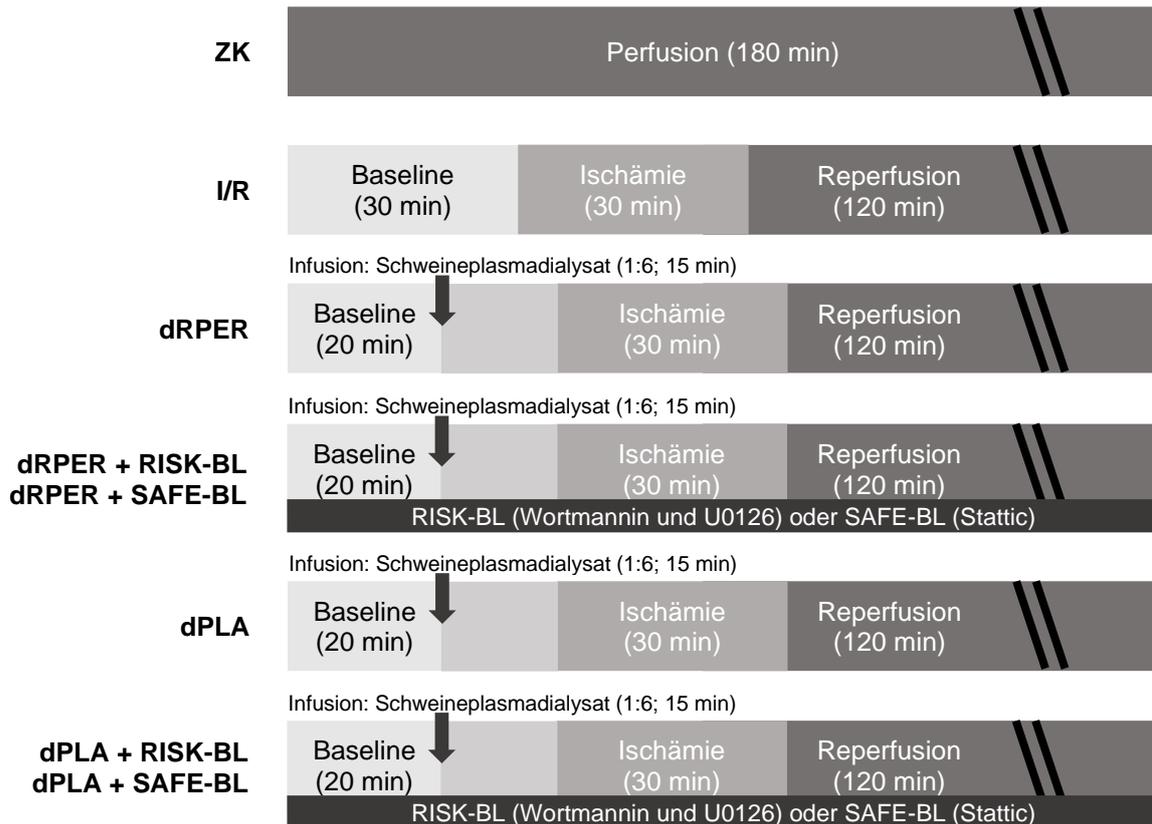


Abbildung 8: Übersicht der Versuchsprotokolle für isolierte Mausherzen

I/R: Ischämie/Reperfusion; dPLA: Dialysat aus Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; dRPER: Dialysat aus Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perikonditionierung; RISK-BL: Blockade des RISK-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 1 µmol/l Wortmannin und U0126; SAFE-BL: Blockade des SAFE-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von 2 µmol/l Stattic; ZK: Zeitkontrolle.

2.2.1.5 Bestimmung der Infarktgröße

Nach Versuchsende wurden die Herzen in Cryomatrix eingebettet, bei -20 °C tiefgefroren, in sechs 1 mm (Maus) bzw. 2 mm (Ratte) dicke, transversale Scheiben geschnitten und für 5 min in einer 1,5 % (Rattenherz) bzw. 1 % (Mausherz) TTC-Färbelösung bei 37 °C gefärbt. Anschließend wurden die

Herzscheiben mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, die Herzscheiben beidseitig fotografiert und für die quantitative Proteinanalyse bei -80 °C tiefgefroren.

Die Auswertung der Infarktgrößen erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ 1.47v (Bethesda, Maryland, USA).

Von allen Herzscheiben wurden beidseitig die Pixel der jeweils rot gefärbten lividen Areale und die der jeweils weißen infarzierten Schnittflächen addiert und so eine prozentuale Infarktgröße der ventrikulären Masse für jedes Herz bestimmt (Skyschally et al., 2018).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Schweineplasmaproben

		Schweineplasmaproben																					
		PLA						RPER						PLA						RPER			
		♣	■	▲	◆	♠	▼	▶	◀	★	●	●	✦	◁	△	◇	◊	◊	◊	▷	☆	▽	□
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Langendorff Ratte																							
	pPLA bzw. pRPER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+											
	pPLA bzw. pRPER + RISK-BL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+											
	pPLA bzw. pRPER + SAFE-BL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+											
Langendorff Maus																							
	dPLA bzw. dRPER													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	dPLA bzw. dRPER + RISK-BL													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pPLA bzw. pRPER + SAFE-BL													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Western Blot																							
	pPLA bzw. pRPER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+											
	pPLA bzw. pRPER + RISK-BL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+											
	pPLA bzw. pRPER + SAFE-BL	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+											
	dPLA bzw. dRPER													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	dPLA bzw. dRPER + RISK-BL													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	dPLA bzw. dRPER + SAFE-BL													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

dPLA: Dialysat aus Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; dRPER: Dialysat aus Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; PLA: Schweine, die kein kardioprotektives Manöver erhielten; RPER: Schweine, die eine herzferne ischämische Perkonditionierung durchliefen; RISK-BL: Blockade des RISK-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von Wortmannin und U0126 (jeweils 1 µmol/l für Ratte und Maus); SAFE-BL: Blockade des SAFE-Signalweges mittels kontinuierlicher Perfusion von Stattic (10 µmol/l für Ratte; 2 µmol/l für Maus); +: verwendet in der jeweiligen Methode; -: nicht verwendet in der jeweiligen Methode.

2.2.1.5 Quantitative Proteinanalyse mittels Western Blot

Myokardscheiben der isoliert perfundierten Ratten- und Mausherzen wurden mit 3 bzw. 2 ml 0,1 mol/l TRIS und 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) Puffer für 20 s mit einem Dispergierer homogenisiert, für 5 min bei 70 °C erhitzt und für 10 min bei 20 °C mit 13000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Von dem separierten Lysat erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Die Proteinlysate wurden aliquotiert bei -80 °C gelagert.

Die Lysatmenge mit 20 µg Protein wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) für 50 min bei 200 V auf einem 12 % Gel getrennt und die separierten Proteine auf eine PDVF-Membran bei 100 V für 90 min transferiert. Der Transfer wurde mittels Gel Doc™ EZ Gel Documentation System und Ponceau S-Färbung überprüft.

Nach Blockade der Membran mit 5 % Milch erfolgte die Inkubation mit dem in 5 % BSA verdünntem spezifischen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde gewaschen, geblockt und für 45 min mit dem in 5 % Milch gelösten sekundären Antikörper inkubiert. Auf die Membran wurde für 5 min ECL zugegeben, welches das Substrat enthält, das durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers enzymatisch umgesetzt wurde. Die Messung der Lumineszenz der Banden erfolgte mittels ChemoCam Imager.

Nach dem Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer erfolgte die Inkubation mit einem neuen primären Antikörper. Zuerst erfolgte die Gabe der Antikörper der phosphorylierten Formen von AKT1/2/3(Ser⁴⁷³), ERK1(Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), ERK2(Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷) und STAT3(Tyr⁷⁰⁵). Nach der letzten phosphorylierten Form wurden die drei Antikörper auf der Membran durch Inkubation mit dem Stripping-Puffer für 10 min bei 55 °C entfernt, gewaschen und nacheinander die Membran mit den Antikörpern für die Gesamtformen von AKT, ERK 1/2 und STAT3 inkubiert.

Die Auswertung der Lumineszenz der Banden erfolgte quantitativ mit LabImage1D (Leipzig, Deutschland).

Für die Auswertung aller Versuche des entsprechenden Bioassays erfolgte die Verteilung der Proben auf zwei Gele/Membranen. Für den Erhalt der biologischen Varianz der Proben, erfolgte eine Korrektur der technischen Varianz durch Unterschiede im numerischen Auslesen der unterschiedlichen Intensität der Chemilumineszenz auf verschiedenen Membranen. Die totale numerische

Signalintensität der jeweiligen Proteine auf den verschiedenen Membranen wurde gleichgesetzt. Für die Gleichsetzung der Signalintensität des untersuchten Proteins, welche auf unterschiedliche Gele aufgetragen und auf verschiedenen Membranen ausgelesen wurde, wurde die Signalintensität jedes Proteins normalisiert durch Multiplikation mit dem reziproken Wert der entsprechenden totalen Membransignalintensität dieses Proteins auf der jeweiligen Membran (Kleinbongard et al., 2018). Diese Normalisierungsprozedur erfolgte für jedes Protein auf der entsprechenden Membran. Die phosphorylierten Proteine wurden im Verhältnis zu ihrer jeweiligen Gesamtform gesetzt.

2.2.2 Statistik

Die Untersuchungen der Infarktgröße und der Western-Blot-Analyse wurden, bezüglich des Placebo- versus RPER-Protokolls, verblindet durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde genutzt, um die Normalverteilung aller Datensätze zu testen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Infarktgrößen wurden mittels Ein-Wege-Varianzanalyse (Ein-Weg-ANOVA) verglichen. Die Immunoreaktivität der Proteinphosphorylierung und KF und LVDD in isolierten Ratten- und Mauserzen wurde mittels Zwei-Wege-ANOVA mit wiederholten Messungen verglichen. Bei einem signifikanten Unterschied wurden die Mittelwerte mit Fisher's Least-Significant-Difference Post-Hoc Test verglichen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Alle Testungen wurden mit der Software Sigma Stat 3.5 (San José, USA) durchgeführt (Skyschally et al., 2018).

3 Ergebnisse

3.1 Isoliert perfundiertes Rattenherz

3.1.1 Infarktgrößen

Die Infarktgröße der ZK-Gruppe betrug nach 180 min Perfusion 5 ± 3 % der ventrikulären Masse. Nach 30 min globaler Ischämie und 120 min Reperfusion betrug die Infarktgröße 39 ± 9 % der ventrikulären Masse (Abbildung 9) (Skyschally et al., 2018).

Die Infarktgröße in Herzen nach Infusion von pRPER war kleiner als die Infarktgröße nach Infusion von pPLA (21 ± 4 % vs. 36 ± 4 %) (Abbildung 9) (Skyschally et al., 2018). Nach Infusion von pPLA mit RISK-BL betrug die Infarktgröße 41 ± 9 % und mit SAFE-BL 39 ± 8 %. Die Infarktgröße nach Infusion von pRPER mit RISK-BL betrug 42 ± 6 % und mit SAFE-BL 43 ± 15 % (Abbildung 9) (Skyschally et al., 2018).

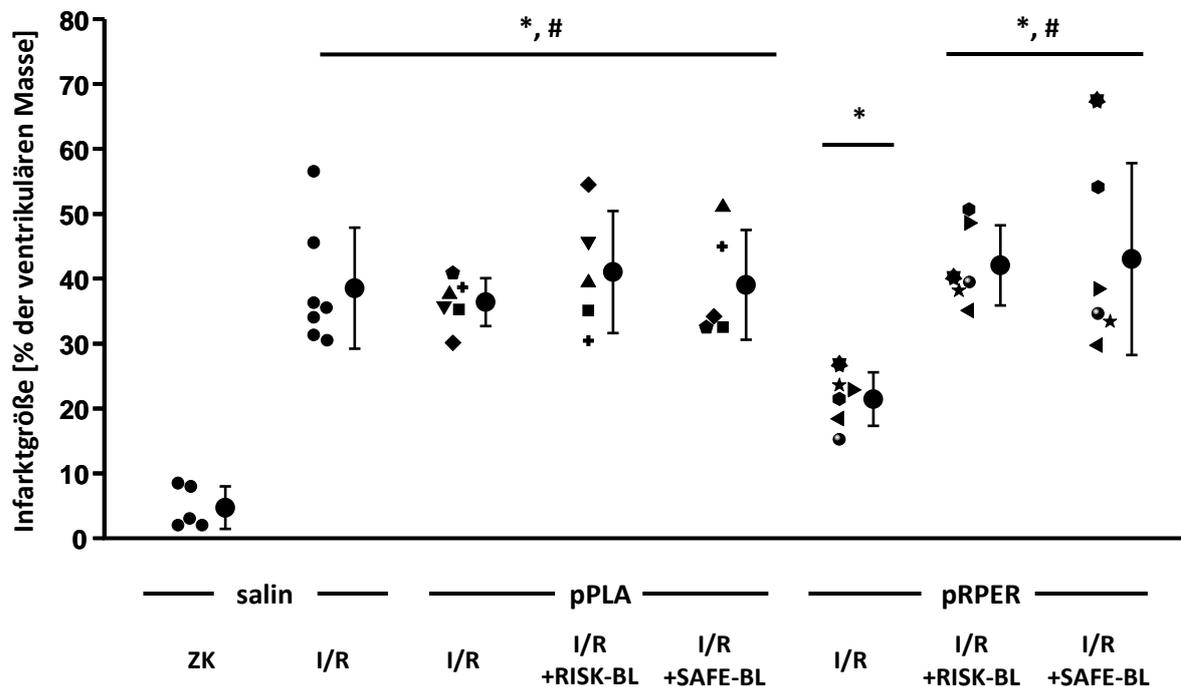


Abbildung 9: Infarktgrößen der isoliert perfundierten Rattenherzen: Infusion von Schweineplasma (1:6) ohne Blockade und mit Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges. Symbole von demselben Typ, in den Gruppen pPLA und pRPER, repräsentieren Plasmaproben von demselben Schwein. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. ZK; # $p < 0,05$ vs. pRPER-I/R; Ein-Weg-ANOVA mit Fisher's Least-Significant-Difference Post-Hoc Test. I/R: Ischämie/Reperfusion, pPLA:

Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver, pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung, +RISK-BL: reperfusion injury salvage kinase Blockade, +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade, ZK: Zeitkontrolle. Abbildung modifiziert nach (Skyschally et al., 2018).

3.1.2 Hämodynamik: KF und LVDD

KF und LVDD waren am Ende der Stabilisierungsphase nicht unterschiedlich zwischen allen Gruppen (Tabelle 4, Anhang) (Skyschally et al., 2018). Plasmainfusion reduzierte KF und LVDD in allen Gruppen außer in pPLA+RISK-BL gegenüber der jeweiligen Baseline (Tabelle 4, Anhang) (Skyschally et al., 2018). In allen Gruppen mit Ausnahme von RPER+SAFE-BL war die Reduktion des KF am Ende des Auswaschens reversibel. In den Gruppen pRPER und pRPER+RISK-BL war auch die Reduktion des LVDD am Ende des Auswaschens reversibel (Tabelle 4, Anhang). KF und LVDD waren während der gesamten Ischämie in allen Gruppen gegenüber der Baseline verringert (Tabelle 4, Anhang). In der ZK-Gruppe zeigte sich keine Reduktion des KF und LVDD bis zum 30 min nach Reperfusion entsprechenden Zeitpunkt (90 min Perfusion) gegenüber der Baseline (Tabelle 4, Anhang). In der I/R-Gruppe waren der KF und LVDD während der gesamten Ischämie und Reperfusion gegenüber der jeweiligen Baseline verringert (Tabelle 4, Anhang). Der LVDD erholte sich in allen Gruppen nach Ischämie verglichen zur Baseline nicht. Der KF erholte sich in den Gruppen pPLA+SAFE-BL, pRPER, pRPER+RISK-BL, pRPER+SAFE-BL (Tabelle 4, Anhang) (Skyschally et al., 2018).

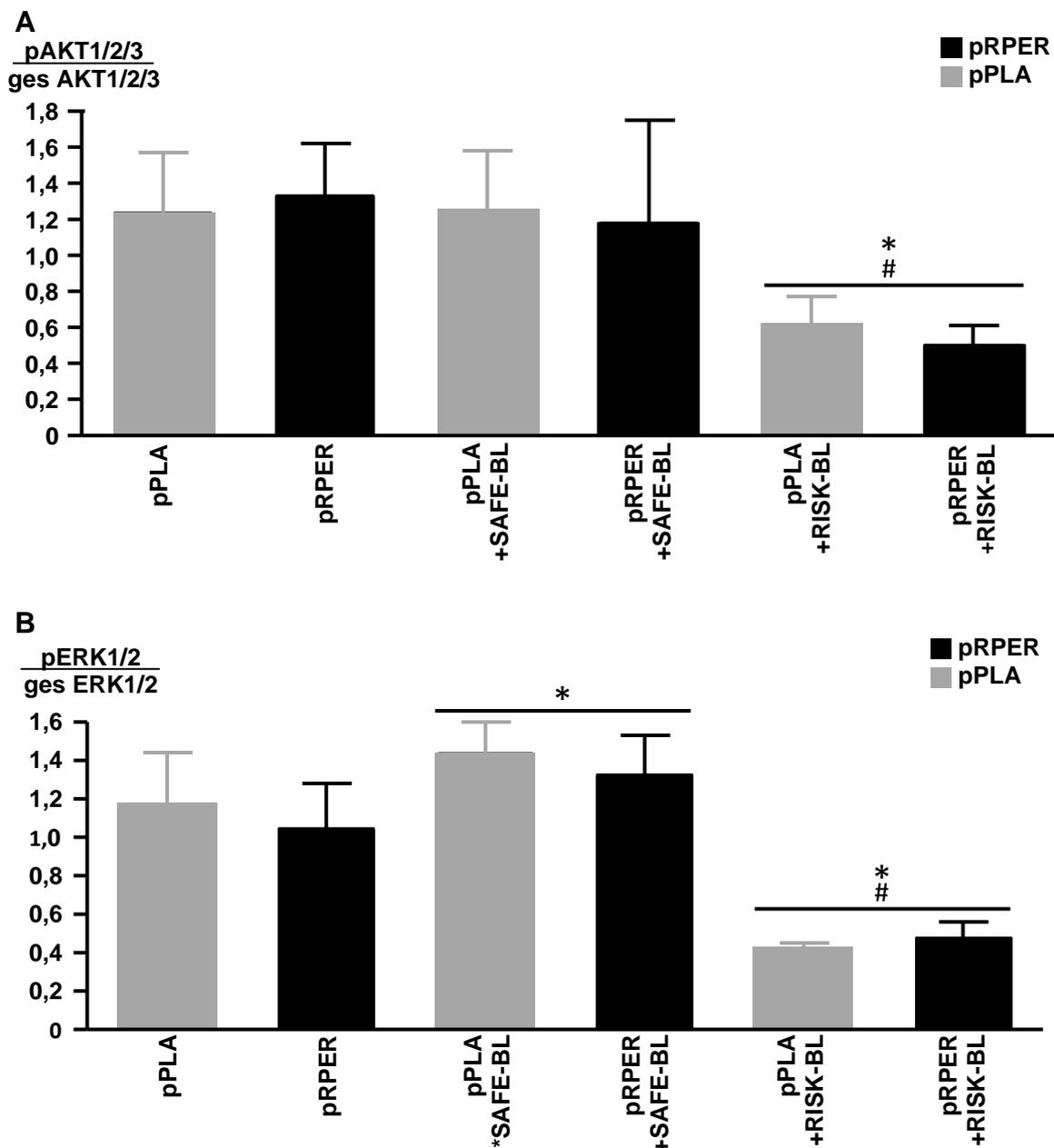
3.1.3 Quantitative Proteinanalyse: Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges

Die untersuchten Proteine AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 der Myokardbiopsien der Rattenherzen zeigten nach 120 min Reperfusion keine verstärkte Phosphorylierung normalisiert auf ihre Gesamtform in der pRPER-Gruppe gegenüber der pPLA-Gruppe (Abbildung 10 A, B, C).

Unter kontinuierlicher RISK-BL war die Phosphorylierung von AKT1/2/3 und ERK1/2, normalisiert auf ihre Gesamtform, nach 120 min Reperfusion in den Myokardbiopsien der Gruppen pRPER und pPLA gegenüber den Proteinen der Myokardbiopsien ohne Blockade und mit SAFE-BL vermindert (Abbildung 10 A, B). STAT3 zeigte unter kontinuierlicher RISK-BL nach 120 min Reperfusion einen

Anstieg der Phosphorylierung gegenüber den Proteinen der Myokardbiopsien ohne Blockade (Abbildung 10 C).

Unter kontinuierlicher SAFE-BL war die Phosphorylierung von STAT3 nach 120 min Reperfusion in den Gruppen RPER und PLA gegenüber den Proteinen der Myokardbiopsien ohne Blockade vermindert (Abbildung 10 C), jedoch nicht die Phosphorylierung von AKT (Abbildung 10 A). ERK1/2 zeigte unter SAFE-BL nach 120 min Reperfusion einen Anstieg der Phosphorylierung gegenüber den Proteinen der Myokardbiopsien ohne Blockade (Abbildung 10 B).



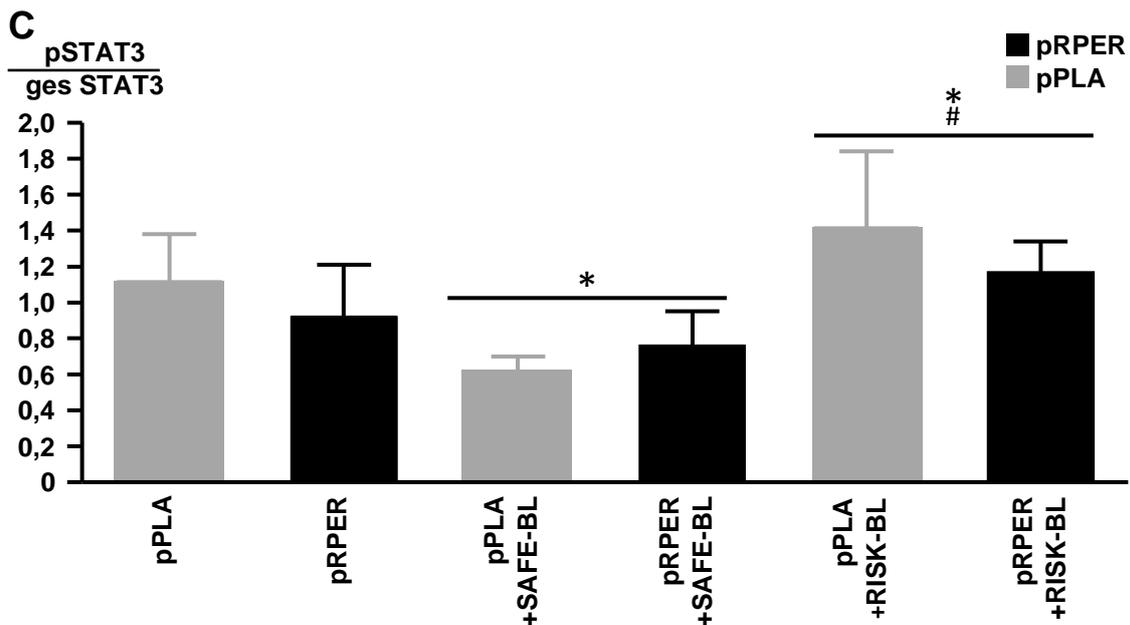


Abbildung 10: Phosphorylierung der Proteine AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 der isoliert perfundierten Rattenherzen nach 120 min Reperfusion und TTC-Färbung: als Verhältnis des immunreaktiven Signals der Phosphorylierung und der Gesamtform der Proteine in Herzen mit Infusion von pPLA (n=6) und pRPER (n=6) ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- (PLA: n=5; RPER: n=5) und des RISK-Signalweges (PLA: n=5; RPER: n=6).

A Verhältnis pAKT1/2/3 zur Gesamtform von AKT1/2/3; **B** Verhältnis pERK1/2 zur Gesamtform von ERK1/2; **C** Verhältnis pSTAT3 zur Gesamtform von STAT3.

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; * $p < 0,05$ vs. ohne Blocker;

$p < 0,05$ vs. SAFE-Blockade. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver, pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung, +RISK-BL: reperfusion injury salvage kinase Blockade, +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade. (Für die Originalabbildungen der Ponceaufärbung und Chemilumineszenz siehe Abbildung 13-15, Anhang).

3.2 Isoliert perfundiertes Mauserz

3.2.1 Infarktgrößen

Die Infarktgröße der ZK-Gruppe betrug nach 180 min Perfusion 2 ± 1 % der ventrikulären Masse. Nach 30 min globaler Ischämie und 120 min Reperfusion betrug die Infarktgröße 55 ± 10 % (Abbildung 11) (Skyschally et al., 2018).

Die Infarktgröße in Herzen nach Infusion von dRPER war kleiner als die Infarktgröße nach Infusion von dPLA (29 ± 4 % vs. 63 ± 8 %) (Abbildung 11) (Skyschally et al., 2018).

Nach Infusion von dPLA mit RISK-BL betrug die Infarktgröße 53 ± 15 % und mit SAFE-BL 49 ± 5 %. Die Infarktgröße nach Infusion von dRPER mit RISK-BL betrug 54 ± 7 % und mit SAFE-BL 54 ± 20 % (Abbildung 11) (Skyschally et al., 2018).

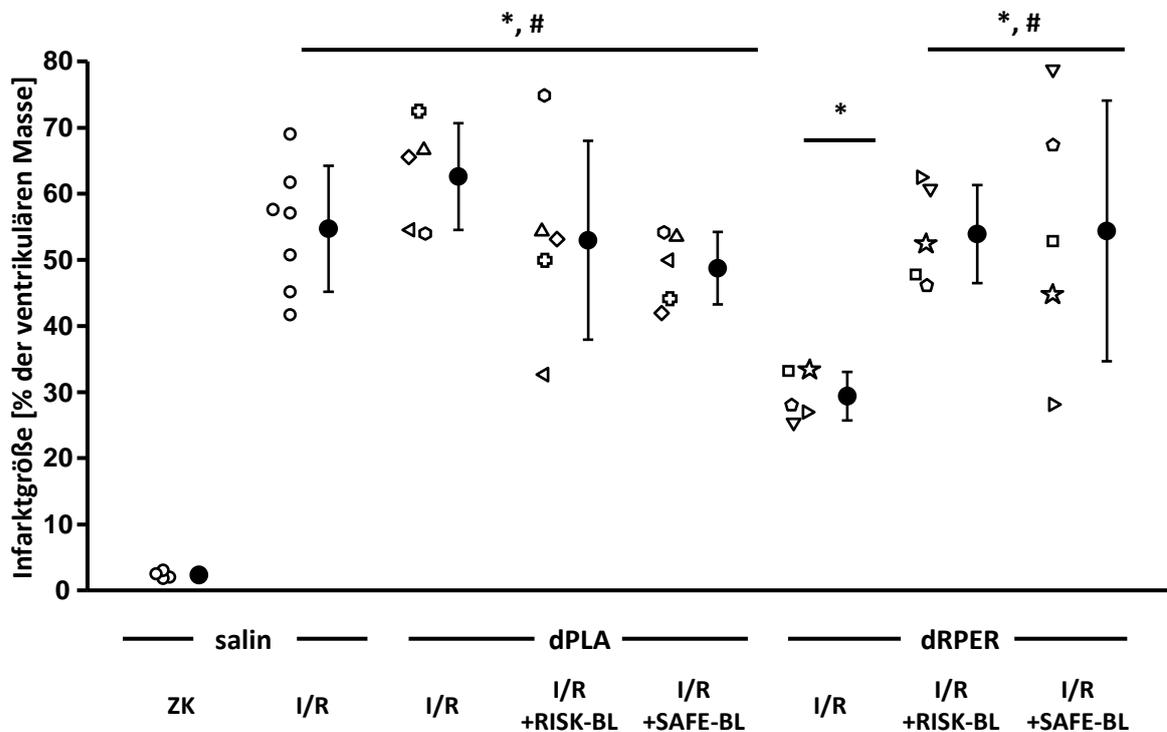


Abbildung 11: Infarktgrößen der isoliert perfundierten Mausherzen: Infusion von Schweineplasmadialysat (1:6, 12-14kDa) ohne Blockade und mit Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges. Symbole von demselben Typ, in den Gruppen dPLA und dRPER, repräsentieren Plasmadialysatproben von demselben Schwein. Mittelwerte \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. ZK; # $p < 0,05$ vs. pRPER-I/R; Ein-Weg-ANOVA mit Fisher Least-Significant-Difference Post-Hoc Test. dPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver, dRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Per konditionierung, I/R: Ischämie/Reperfusion, +RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade, +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade, ZK: Zeitkontrolle. Abbildung modifiziert nach (Skyschally et al., 2018).

3.2.2 Hämodynamik: KF und LVDD

Der KF und LVDD waren am Ende der Stabilisierungsphase nicht unterschiedlich mit Ausnahme des KF von dPLA+RISK-BL und dRPER+RISK-BL (Tabelle 5, Anhang). RISK-BL erhöhte den KF während der Baseline und der Dialysatgabe und trendweise auch in der Reperfusion (Tabelle 5, Anhang) (Skyschally et al., 2018). In der ZK-Gruppe zeigte sich keine Reduktion des KF und LVDD bis zum

30 min nach Reperfusion entsprechenden Zeitpunkt (95 min Perfusion) gegenüber der Baseline (Tabelle 5, Anhang). Infusion von Schweineplasmadialysat hatte keinen Einfluss auf KF und LVDD im Vergleich zur jeweiligen Baseline in allen Gruppen (Tabelle 5, Anhang).

KF und LVDD war während der gesamten Ischämie in allen Gruppen gegenüber der Baseline verringert (Tabelle 5, Anhang). Der LVDD erholte sich nur teilweise auf das Niveau der Baseline während der Reperfusion, jedoch am stärksten mit Infusion von dRPER verglichen mit I/R und dPLA zu den Zeitpunkten Rep10 und Rep30 (Tabelle 5, Anhang) (Skyschally et al., 2018). RISK- und SAFE-BL verhinderte die funktionelle Erholung nach Infusion von dRPER zu den Zeitpunkten Rep10 und Rep30 (Tabelle 5, Anhang) (Skyschally et al., 2018).

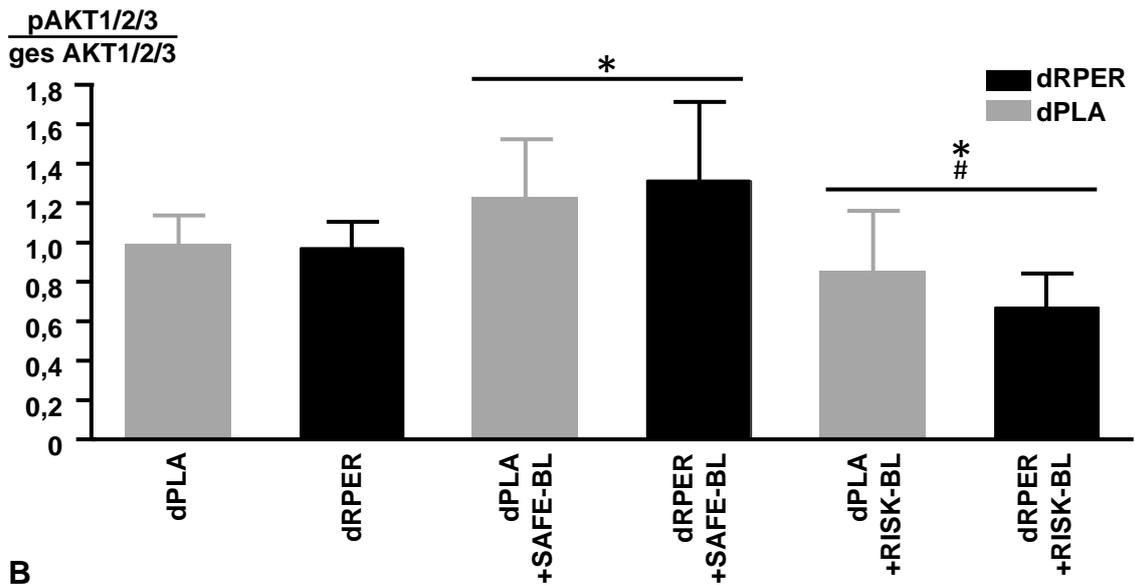
SAFE-BL nach Infusion von dPLA verbesserte die funktionelle Erholung des LVDD verglichen zu I/R (Tabelle 5, Anhang) (Skyschally et al., 2018).

3.2.3 Quantitative Proteinanalyse: Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges

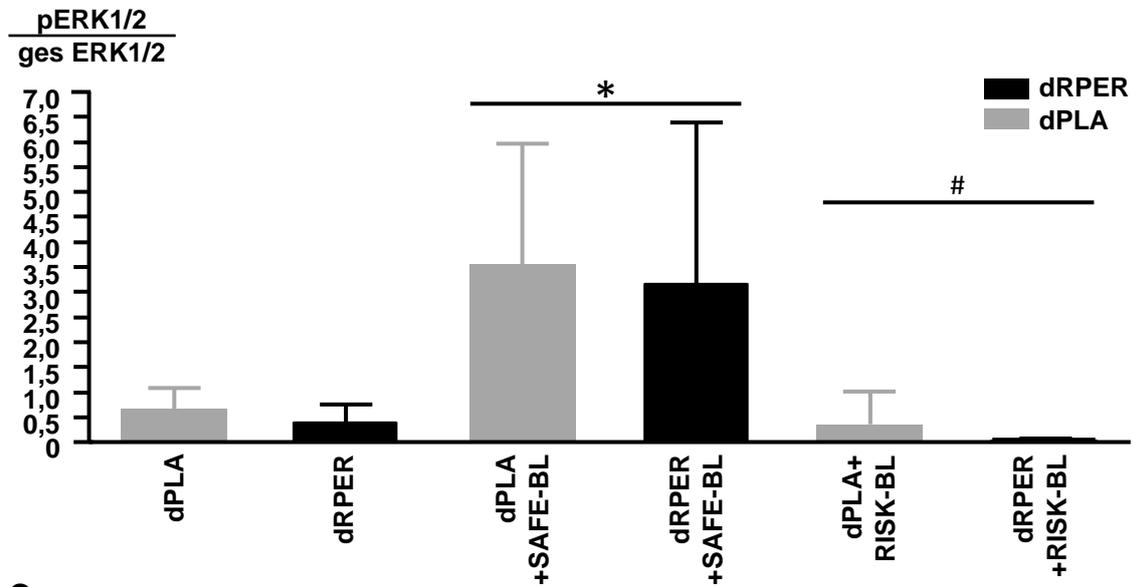
Die Proteine AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 der Mausherzen zeigten nach 120 min Reperfusion keine verstärkte Phosphorylierung, normalisiert auf ihre Gesamtform, in der dRPER-Gruppe gegenüber der dPLA-Gruppe (Abbildung 12 A, B, C). Unter kontinuierlicher RISK-BL war die Phosphorylierung von AKT1/2/3 nach 120 min Reperfusion in den Mausherzen der Gruppen dRPER und dPLA gegenüber Proteinen der Mausherzen ohne Blockade vermindert (Abbildung 12 A). STAT3 zeigte unter RISK-BL nach 120 min Reperfusion keine Verminderung der Phosphorylierung gegenüber den Proteinen der Mausherzen ohne Blockade (Abbildung 12 C).

Unter kontinuierlicher SAFE-BL war die Phosphorylierung von STAT3 nach 120 min Reperfusion in den Gruppen dRPER und dPLA gegenüber den Proteinen der Mausherzen ohne Blockade vermindert (Abbildung 12 C). AKT1/2/3 und ERK1/2 zeigte unter SAFE-BL nach 120 min Reperfusion eine vermehrte Phosphorylierung gegenüber den Proteinen der Mausherzen ohne Blockade (Abbildung 12 A, B).

A



B



C

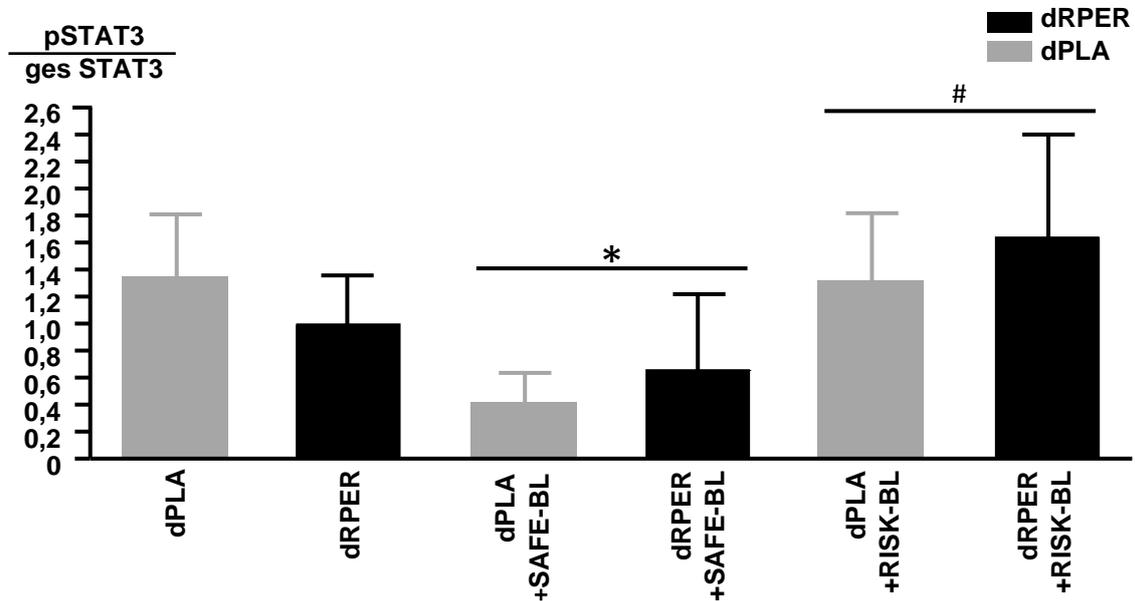


Abbildung 12: Phosphorylierung der Proteine AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 der isoliert perfundierten Mauserzen nach 120 min Rep: als Verhältnis des immunoreaktiven Signals der Phosphorylierung und der Gesamtform der Proteine in Herzen mit Infusion von dPLA (n=5) und dRPER (n=5) ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- (PLA: n=5; RPER: n=5) und des RISK-Signalweges (PLA: n=5; RPER: n=6). **A** Verhältnis pAKT1/2/3 zur Gesamtform von AKT1/2/3; **B** Verhältnis pERK1/2 zur Gesamtform von ERK1/2; **C** Verhältnis pSTAT3 zur Gesamtform von STAT3. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; * $p < 0,05$ vs. ohne Blocker; # $p < 0,05$ vs. SAFE-Blockade. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver, pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung, +RISK-BL: reperfusion injury salvage kinase Blockade, +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade. (Für die Originalabbildungen der Ponceaufärbung und Chemilumineszenz siehe Abbildung 16-18, Anhang)

4 Diskussion

Die durch RPER ausgelöste Kardioprotektion konnte humoral mittels pRPER bzw. dRPER auf isoliert perfundierte Ratten- und Mauserzen übertragen werden. Die durch pRPER induzierte Reduktion der Infarktgröße in den isoliert perfundierten Rattenherzen war vergleichbar mit der, die in einer früher publizierten Studie mittels Infusion von Schweineplasma mit RIPC erreicht werden konnte (Skyschally et al., 2015). Die potenziellen kardioprotektiven Faktoren, die durch RPER in die systemische Zirkulation und daher in das Blutplasma bzw. Blutplasmadialysat freigesetzt wurden, wurden hier nicht genauer charakterisiert. Die Verwendung einer Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 12 – 14 kDa ermöglicht zumindest eine Größenordnung des oder der kardioprotektiven Faktoren bei RPER. Plasmadialysat (12 - 14 kDa), gewonnen aus gesunden Probanden nach RIPC, vermittelte ebenfalls Kardioprotektion in isoliert perfundierten Maus- (Hildebrandt et al., 2016) oder Kaninchenherzen (Shimizu et al., 2009). Die Verwendung einer Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 12 – 14 kDa lässt zudem die direkte Beteiligung zellulärer Faktoren oder extrazellulärer Vesikel bei RPER unwahrscheinlich erscheinen. Eine Freisetzung kardioprotektiver Faktoren aus extrazellulären Vesikel während des Dialyseprozesses könnte jedoch möglich sein. Übereinstimmend mit vorherigen Arbeiten (Skyschally et al., 2015; Hildebrandt et al., 2016) kann auch bei RPER über die Beteiligung des RISK- und SAFE-Signalweges, mittels derer jeweiliger pharmakologischer Blockade, zumindest indirekt auf mögliche typische Aktivatoren dieser Signalwege in Ratten- und Mauserzen geschlossen werden. Die Beteiligung des SAFE-Signalweges könnte auf Zytokine als mögliche zirkulierende kardioprotektive Faktoren hindeuten (Lecour et al., 2005; Zurbier et al., 2012). Der RISK-Signalweg hingegen wird klassischerweise u.a. von Adenosin oder Opioiden aktiviert (Krieg et al., 2002; Ikeda et al., 2006). Die genaue Identifikation der kardioprotektiven humoralen Faktoren ist in der Literatur weiterhin ausstehend (Heusch, 2017; Kleinbongard et al., 2017; Heusch, 2020).

Im isoliert perfundierten Mauserz verhinderte die RISK-Blockade die Phosphorylierung von AKT1/2/3, aber nicht die von ERK1/2. Im Ratten- und Mausmyokard kam es hier unter Blockade des SAFE-Signalweges zu einer

vermehrten Phosphorylierung der Proteine des RISK-Signalweges. Die Blockade des RISK-Signalweges hingegen führte zu einer vermehrten Phosphorylierung der Proteine des SAFE-Signalweges. Interessanterweise führte diese verstärkte Phosphorylierung der untersuchten Proteine des RISK-Signalweges unter SAFE-Blockade und der Proteine des SAFE-Signalweges unter RISK-Blockade nicht per se zu einem kardioprotektiven Effekt. Das könnte darauf hinweisen, dass dem RISK- und SAFE-Signalweg bisher unbekannt Signalkomponenten nachgeschaltet sind, die bei der Ausprägung des RPER-vermittelten Schutzes eine Rolle spielen könnten. Dem entgegengesetzt stehen Arbeiten, die eine gegenteilige Interaktion des RISK- und SAFE-Signalweges zeigen konnten: Bei ischämischer Präkonditionierung an isolierten Kardiomyozyten kam es unter 30-minütiger pharmakologischer Blockade von AKT durch Wortmannin zu einer Abnahme der Phosphorylierung von STAT3 und vice versa (Suleman et al., 2008; Somers et al., 2012; Hadebe et al., 2018). Die Blockierung des RISK- oder SAFE-Signalweges verhinderte den kardioprotektiven Effekt durch die ischämische Präkonditionierung in isolierten Kardiomyozyten (Suleman et al., 2008). Eine vermehrte Aktivierung von Kinasen nach pharmakologischer Blockade einer Komponente des RISK-Signalweges (Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) –AKT) führte in isoliert perfundierten Rattenherzen zu einer vermehrten Phosphorylierung einer anderen Komponente des RISK-Signalweges (MAPK/ERK-Kinase 1/2 (MEK1/2) –ERK1/2) und umgekehrt (Hausenloy et al., 2004). In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde keine vermehrte Phosphorylierung von AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 unter Blockade des SAFE- oder des RISK-Signalweges nach Infusion von RIPC-Plasma nachgewiesen (Skyschally et al., 2015; Hildebrandt et al., 2016). In einer vorherigen Arbeit wurde in isoliert perfundierten Mausherzen humanes Plasmadialysat nach RIPC-Manöver infundiert, nachdem zuvor der RISK- bzw. der SAFE-Signalweg für 20 min blockiert wurde (und nicht wie in dieser Arbeit kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer) (Hildebrandt et al., 2016). Eine nicht-kontinuierliche Blockade obengenannter Signalwege, im Gegensatz zur hier durchgeführten permanenten Blockade, könnte dazu geführt haben, dass damals keine reaktive Gegenregulierung des jeweils anderen Signalweges nachgewiesen wurde. In einer weiteren Studie wurden isoliert perfundierte Rattenherzen mit RIPC-Schweinplasmadialysat nach einer vorherigen 20-minütigen Blockade des RISK-

Signalweges behandelt (Skyschally et al., 2015). Auch hier zeigte sich keine gegenteilige Aktivierung des SAFE-Signalweges in den isoliert perfundierten Rattenherzen (Skyschally et al., 2015). Aufgrund der temporären und nicht kontinuierlichen Blockade des RISK- oder SAFE-Signalweges in den obengenannten Arbeiten kann eine reaktive Gegenregulierung der in dieser Arbeit untersuchten Signalwege unter kontinuierlicher Blockade eines Signalweges bei RPER nicht abschließend geklärt werden.

Obwohl durch die pharmakologische Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges die pRPER- und dRPER-induzierte Infarktgrößenreduktion aufgehoben wurde, konnte hier keine vermehrte Phosphorylierung von AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 nachgewiesen werden. In einer vorherigen Arbeit, in einem vergleichbaren Modell, konnte bei einer größeren Anzahl von Myokardbiopsien aus isoliert perfundierten Rattenherzen nach Infusion von pRPER jedoch eine deutliche Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Diese vermehrte Phosphorylierung von STAT3 unterlag jedoch einer großen Streuung (Lieder et al., 2019). Angesichts der großen Streuung wäre in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis einer vermehrten Phosphorylierung von AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 durch pRPER bzw. dRPER eine größere numerische Anzahl der Myokardbiopsien notwendig gewesen. In obengenannter Arbeit zeigte sich aber ebenfalls kein Unterschied in der vermehrten Phosphorylierung von AKT und ERK (Lieder et al., 2019).

In vorherigen Arbeiten wurde eine Kardioprotektion durch Infusion von RIPC-Schweineplasma mit einer Verdünnung von 1:10 in isoliert perfundierten Rattenherzen und durch humanes RIPC-Plasmadialysat mit einer Verdünnung von 1:20 in isoliert perfundierten Mauserherzen induziert (Skyschally et al., 2015; Hildebrandt et al., 2016). Beim hier verwendeten pRPER und dRPER waren höhere Konzentrationen notwendig (1:6), um eine vergleichbare Reduktion der Infarktgröße im isoliert perfundierten Ratten- und Mauserherz zu erreichen. Möglicherweise könnte eine geringere Konzentration an kardioprotektiven Faktoren im hier verwendeten Plasma eine höher konzentrierte Infusion notwendig gemacht haben. Dies könnte durch eine frühere Abnahme des Blutes nach dem Schutzmanöver erklärbar sein: Die Blutentnahme für das 1:10 verdünnte RIPC-Schweineplasma erfolgte 60 min nach dem RIPC-Manöver (Skyschally et al., 2015), wohingegen in der hier vorliegenden Arbeit Blut 10 min nach dem RPER-Manöver entnommen wurde. In der früheren Studie mit humanem RIPC-

Plasmadialysat konnte eine deutlich stärkere Reduktion der Infarktgröße in isoliert perfundierten Mausherzen erreicht werden, wenn Blut 30 min oder später nach RIPC entnommen wurde. Bei einer Blutentnahme nach 5-10 min nach dem RIPC-Manöver war die Infarktgrößenreduktion deutlich geringer ausgeprägt (Hildebrandt et al., 2016). Eine zeitabhängige Freisetzung kardioprotektiver Faktoren nach entsprechendem Manöver könnte für die Konzentrationsunterschiede ursächlich sein: Zum hier gewählten Zeitpunkt der Blutabnahme könnten sowohl weniger kardioprotektive Faktoren, als auch andere kardioprotektive Faktoren freigesetzt worden sein, als in den Arbeiten mit RIPC und einer späteren Blutentnahme nach dem Manöver (Skyschally et al., 2015; Hildebrandt et al., 2016).

Neben einer zeitlichen Abhängigkeit, die sowohl einen quantitativen als auch qualitativen Einfluss auf die Freisetzung der humoralen Faktoren nach herzferner ischämischer Konditionierung gehabt haben könnte, muss auch von zeitabhängigen Unterschieden in der myokardialen Signaltransduktion ausgegangen werden. Für eine Reduktion der Infarktgröße müssen kardioprotektive Signalwege bereits in der frühen Reperfusion aktiviert sein und kausal beteiligte Proteine zu diesem Zeitpunkt untersucht werden (Heusch, 2015; Gent et al., 2017). Bei einer früheren Probenentnahme, anstatt des hier gewählten Zeitpunktes nach 120 min Reperfusion, wäre es eventuell möglich eine vermehrte Phosphorylierung von AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 in isoliert perfundierten Ratten- und Mausherzen nachzuweisen. Eine Probenentnahme zu einem früheren Zeitpunkt in den hier durchgeführten Versuchen ist jedoch durch die geringe Größe der Ratten- und Mausherzen limitiert, und zusätzliche frühere Biopsien würden die Quantifizierung der Infarktgröße verfälschen: Die erforderliche Gewebemenge einer für die Westernblot-Analyse benötigten Myokardbiopsie (10-20 mg) aus dem linken Ventrikel könnte die Reperfusion nachgeschalteter Myokardareale kompromittieren und zu falsch-positiven TTC-Färbungen führen, da die Infarktgrößendemarkierung mittels TTC-Färbung eine vollständige Reperfusion über mindestens 90 min voraussetzt. In den Myokardbiopsien des Schweines nach RPER wurde eine vermehrte Phosphorylierung von STAT3 nach 10 min Reperfusion nachgewiesen (Skyschally et al., 2018). Relativ zur Gesamtherzmasse des linken Ventrikels (0,5 g Ratte vs. 200-300 g Schwein) stört eine Myokardbiopsie beim Schweineherz zum Zeitpunkt 10 min nach Reperfusion weniger. Obwohl Unterschiede bei der myokardialen Signaltransduktion zwischen

verschiedenen Spezies existieren und somit eine frühe Aktivierung von STAT3 im Schweinemyokard nicht auf das Ratten- oder Mausmyokard übertragbar ist, erscheint eine transiente Aktivierung der untersuchten Schlüsselproteine AKT1/2/3, ERK1/2 und STAT3 möglich, da zudem die Blocker des SAFE- und RISK-Signalweges eine Phosphorylierung und Infarktgrößenreduktion verhinderte. Zur genauen Aufschlüsselung der Signalwege der RPER sind zukünftig weitere biokinetische Untersuchungen nötig, bei der Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten in der Reperfusion gewonnen werden müssten (Hadebe et al., 2018; Kleinbongard et al., 2018).

4.1 Limitationen

Die dargestellten Ergebnisse unterliegen einigen Einschränkungen bezüglich der Übertragbarkeit auf den Patienten:

1. Es wurden ausschließlich isoliert perfundierte Herzen aus gesunden Ratten und Mäusen verwendet, die wiederum mit Plasmaproben, gewonnen aus gesunden Schweinen, behandelt wurden. Patienten mit akuten ST-Hebungsinfarkten weisen in der Regel atherosklerotische Gefäßveränderungen auf und haben oft multiple Komorbiditäten und Komedikationen, die ebenfalls mit dem Schutz der RPER interferieren können (Ferdinandy et al., 2014; Andreadou et al., 2020; Kleinbongard et al., 2020).
2. Das Schweineplasma bzw. Schweineplasmadialysat wurde vor der globalen Ischämie in den Pufferstrom infundiert und anschließend ausgewaschen, sodass es zu einer verkürzten und keiner langanhaltenden Kontaktzeit der humoralen Faktoren mit dem Koronarsystem kam. Mögliche Effekte auf die Signaltransduktion könnten vermindert sein.
3. Die zeitliche Kinetik der beteiligten Proteine am Signaltransfer und der Signaltransduktion bleibt unklar, da die Blutentnahme vom Schwein einmalig 10 min nach Beginn der Reperfusion und die Probenentnahme des Ratten- und Mausmyokards nach 120 min Reperfusion erfolgte. Die Wahl eines früheren Zeitpunktes für die Myokardprobenentnahme hätte weitere Versuche notwendig gemacht. Diese zusätzlichen Experimente konnten aber aufgrund des limitierten Volumens der Schweineplasmaproben nicht durchgeführt werden.

4. Bei den isoliert perfundierten Ratten und Mauserherzen handelt es sich um Blut- und somit auch zellfreie Systeme. Der Einfluss von Zellen oder extrazellulärer Vesikel wird somit nicht erfasst (Davidson et al., 2017).
5. Der neuronale Übertragungsweg der Kardioprotektion durch RPER vom Ort des Stimulus zum Zielorgan ist aufgrund der gewählten Bioassays (denervierte, isoliert perfundierte Herzen) nicht berücksichtigt. Nur auf der Ebene der isoliert perfundierten Herzen ist eine neuronale Komponente noch möglich. Intrinsische kardiale Ganglien könnten über humorale Mediatoren rekrutiert worden sein (Pickard et al., 2016; Pickard et al., 2017).
6. Spätere Veränderungen der Infarktgröße durch Heilung und Remodelling werden nicht berücksichtigt (Pokorney et al., 2012).

4.2 Ausblick

Weiterführende Versuche sind notwendig, um die Translation der effektiven Infarktgrößenreduktion von präklinischen Studien in ein verbessertes Behandlungsergebnis in größeren klinischen Studien zu ermöglichen (Lecour et al., 2021). Der Fokus muss nun auf die Beteiligung des RISK- und SAFE-Signalweges bei der RPER in Tiermodellen, die dem Patientenkollektiv mit akutem Myokardinfarkt eher entsprechen, gelegt werden. Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt sind typischerweise alt, leiden an mehreren Komorbiditäten wie Atherosklerose, Diabetes etc. und haben diverse Komedikationen (Kleinbongard et al., 2020). Für eine erfolgreiche Translation wären daher Versuche nötig, die die Beteiligung obengenannter Signalwege in isoliert perfundierten Herzen von Tieren mit multiplen Vorerkrankungen untersuchen. Für eine effektive pharmakologische Rekrutierung der Kardioprotektion beim akuten ST-Hebungsinfarkt müsste zudem in weiteren biokinetischen Versuchen nachgewiesen werden, ob der RISK- und SAFE-Signalweg bereits zu einem früheren Zeitpunkt kausal beteiligt sind. Ebenfalls müssten langzeitige Effekte, unter anderem Heilung und Remodelling, die die finale Infarktgröße und Prognose des Patienten beeinflussen (Heusch, 2020), in weiterführenden Versuchen untersucht werden. Derartige zukünftige Untersuchungen würden das Verständnis der RPER erweitern und eine erfolgreiche Translation auf Patienten verbessern, die dringend zusätzliche Kardioprotektion benötigen.

5 Zusammenfassung

Kurze Zyklen von Ischämie/Reperfusion (I/R) in herzfernen Organen oder Geweben, die vor (Prä-), während (Per-) oder nach (Postkonditionierung) einer myokardialen Ischämie durchgeführt werden, reduzieren die myokardiale Infarktgröße in allen bisher untersuchten Spezies, einschließlich dem Menschen. Die herzferne ischämische Perkonditionierung (RPER) ist bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt anwendbar, allerdings ist die Translation bisher weniger erfolgreich. Dies wird zum Teil damit erklärt, dass der Signaltransfer von der Peripherie zum Herzen und die intramyokardiale Signaltransduktion der durch RPER vermittelten Kardioprotektion im Detail noch nicht verstanden sind. An der Übertragung der Kardioprotektion sind neuronale und humorale Komponenten, die interagieren, beteiligt. Die Kardioprotektion kann humoral mittels Blut/Plasma über die Speziesgrenze hinaus auf ein isoliertes Empfängerherz übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde an Schweinen, mit myokardialem I/R-Protokoll, RPER am Hinterlauf bzw. ein Placebo-Manöver durchgeführt. RPER reduzierte im Schweinemodell die Infarktgröße gegenüber Placebo. Für den humoralen Transfer der Kardioprotektion wurde Blut von Schweinen, mit RPER oder Placebo-Manöver, in der Reperfusion entnommen. Separiertes Plasma wurde in isoliert perfundierte Rattenherzen bzw. das Plasmadialysat in isoliert perfundierte Mauseherzen infundiert. Die isoliert perfundierten Herzen durchliefen eine globale I/R. Infusion von RPER-Plasma bzw. -Plasmadialysat reduzierte die Infarktgröße in den Herzen gegenüber der Infusion von Placebo-Plasma bzw. -Plasmadialysat. Die pharmakologische Blockade des reperfusion injury salvage kinase (RISK)-Signalweges mit Wortmannin/U0126 und des survivor activating factor enhancement (SAFE)-Signalweges mit Stattic verhinderte die durch RPER-Plasma bzw. -Plasmadialysat vermittelte Kardioprotektion in beiden Bioassays. Nach Reperfusion und histochemischer Infarktdemarkierung wurde die Phosphorylierung möglicher beteiligter Proteine im Myokard beider Bioassays quantifiziert. Die Proteinkinase B (AKT1/2/3) und die extracellular-signal regulated kinases 1/2 (ERK1/2) (RISK-Signalweg) oder der signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (SAFE-Signalweg) waren gegenüber Placebo nicht vermehrt phosphoryliert. Die beteiligten Proteine in dem Myokard zeigten bei pharmakologischer Blockade eine verminderte Phosphorylierung des jeweiligen Signalweges, sodass von einer kausalen Beteiligung des RISK- und SAFE-Signalweges bei der durch RPER vermittelten Kardioprotektion im Ratten- und Mausmyokard ausgegangen werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Andreadou, I., Schulz, R., Badimon, L., Adameova, A., Kleinbongard, P., Lecour, S., Nikolaou, P. E., Falcao-Pires, I., Vilahur, G., Woudberg, N., Heusch, G.,Ferdinandy, P. (2020): Hyperlipidaemia and cardioprotection: Animal models for translational studies. *Br J Pharmacol* 177, 5287-5311.
2. Andreka, G., Vertesaljai, M., Szantho, G., Font, G., Piroth, Z., Fontos, G., Juhasz, E. D., Szekely, L., Szelid, Z., Turner, M. S., Ashrafian, H., Frenneaux, M. P.,Andreka, P. (2007): Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 93, 749-752.
3. Bøtker, H. E., Hausenloy, D., Andreadou, I., Antonucci, S., Boengler, K., Davidson, S. M., Deshwal, S., Devaux, Y., Di Lisa, F., Di Sante, M., Efentakis, P., Femmino, S., Garcia-Dorado, D., Gircz, Z., Ibanez, B., Iliodromitis, E., Kaludercic, N., Kleinbongard, P., Neuhauser, M., Ovize, M., Pagliaro, P., Rahbek-Schmidt, M., Ruiz-Meana, M., Schluter, K. D., Schulz, R., Skyschally, A., Wilder, C., Yellon, D. M., Ferdinandy, P.,Heusch, G. (2018): Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 113, 39.
4. Bøtker, H. E., Kharbanda, R., Schmidt, M. R., Bøttcher, M., Kaltoft, A. K., Terkelsen, C. J., Munk, K., Andersen, N. H., Hansen, T. M., Trautner, S., Lassen, J. F., Christiansen, E. H., Krusell, L. R., Kristensen, S. D., Thuesen, L., Nielsen, S. S., Rehling, M., Sørensen, H. T., Redington, A. N.,Nielsen, T. T. (2010): 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. *The Lancet* 375, 727-734.
5. Cheskes, S., Koh, M., Turner, L., Heslegrave, R., Verbeek, R., Dorian, P., Scales, D. C., Singh, B., Amlani, S., Natarajan, M., Morrison, L. J., Kakar, P., Nowickyj, R., Lawrence, M., Cameron, J.,Ko, D. T. (2020): Field implementation of remote ischemic conditioning in ST-segment-elevation myocardial infarction: The FIRST Study. *Can J Cardiol* 36, 1278-1288.
6. Cohen, M. V.,Downey, J. M. (2007): Cardioprotection: spotlight on PKG. *Br J Pharmacol* 152, 833-834.
7. Davidson, S. M., Takov, K.,Yellon, D. M. (2017): Exosomes and cardiovascular protection. *Cardiovasc Drugs Ther* 31, 77-86.
8. Dickson, E. W., Reinhardt, C. P., Renzi, F. P., Becker, R. C., Porcaro, W. A.,Heard, S. O. (1999): Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis* 8, 123-129.

9. Eitel, I., Stiermaier, T., Rommel, K. P., Fuernau, G., Sandri, M., Mangner, N., Linke, A., Erbs, S., Lurz, P., Boudriot, E., Mende, M., Desch, S., Schuler, G., Thiele, H. (2015): Cardioprotection by combined intrahospital remote ischaemic preconditioning and postconditioning in ST-elevation myocardial infarction: the randomized LIPSIA CONDITIONING trial. *Eur Heart J* 36, 3049-3057.

10. Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Baxter, G. F., Schulz, R. (2014): Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev* 66, 1142-1174.

11. Fröhlich, G. M., Meier, P., White, S. K., Yellon, D. M., Hausenloy, D. J. (2013): Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* 34, 1714-1722.

12. Gaspar, A., Lourenco, A. P., Pereira, M. A., Azevedo, P., Roncon-Albuquerque, R., Jr., Marques, J., Leite-Moreira, A. F. (2018): Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI). *Basic Res Cardiol* 113, 14.

13. Gedik, N., Kottenberg, E., Thielmann, M., Frey, U. H., Jakob, H., Peters, J., Heusch, G., Kleinbongard, P. (2017): Potential humoral mediators of remote ischemic preconditioning in patients undergoing surgical coronary revascularization. *Sci Rep* 7, 12660.

14. Gent, S., Skyschally, A., Kleinbongard, P., Heusch, G. (2017): Ischemic preconditioning in pigs: a causal role for signal transducer and activator of transcription 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312, H478-H484.

15. Hadebe, N., Cour, M., Lecour, S. (2018): The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res Cardiol* 113, 9.

16. Hausenloy, D. J., Barrabes, J. A., Bøtker, H. E., Davidson, S. M., Di Lisa, F., Downey, J., Engstrom, T., Ferdinandy, P., Carbrera-Fuentes, H. A., Heusch, G., Ibanez, B., Iliodromitis, E. K., Inse, J., Jennings, R., Kalia, N., Kharbanda, R., Lecour, S., Marber, M., Miura, T., Ovize, M., Perez-Pinzon, M. A., Piper, H. M., Przyklenk, K., Schmidt, M. R., Redington, A., Ruiz-Meana, M., Vilahur, G., Vinten-Johansen, J., Yellon, D. M., Garcia-Dorado, D. (2016): Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol* 111, 70.

17. Hausenloy, D. J., Kharbanda, R. K., Moller, U. K., Ramlall, M., Aaroe, J., Butler, R., Bulluck, H., Clayton, T., Dana, A., Dodd, M., Engstrom, T., Evans, R.,

- Lassen, J. F., Christensen, E. F., Garcia-Ruiz, J. M., Gorog, D. A., Hjort, J., Houghton, R. F., Ibanez, B., Knight, R., Lippert, F. K., Lonborg, J. T., Maeng, M., Milasinovic, D., More, R., Nicholas, J. M., Jensen, L. O., Perkins, A., Radovanovic, N., Rakhit, R. D., Ravkilde, J., Ryding, A. D., Schmidt, M. R., Riddervold, I. S., Sorensen, H. T., Stankovic, G., Varma, M., Webb, I., Terkelsen, C. J., Greenwood, J. P., Yellon, D. M., Botker, H. E. (2019): Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet* 394, 1415-1424.
18. Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M., Yellon, D. M. (2004): Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 63, 305-312.
19. Hausenloy, D. J., Yellon, D. M. (2004): New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61, 448-460.
20. Heusch, G. (2013): Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 381, 166-175.
21. Heusch, G. (2015): Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 116, 674-699.
22. Heusch, G. (2017): Remote ischemic conditioning: the enigmatic transfer of protection. *Cardiovasc Res* 113, 1-2.
23. Heusch, G. (2018): Protection of the human coronary circulation by remote ischemic conditioning. *Int J Cardiol* 252, 35-36.
24. Heusch, G. (2020): Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* 17, 773-789.
25. Heusch, G., Botker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A., Yellon, D. (2015): Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol* 65, 177-195.
26. Heusch, G., Gersh, B. J. (2017): The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J* 38, 774-784.
27. Heusch, G., Gersh, B. J. (2020): Is Cardioprotection Salvageable? *Circulation* 141, 415-417.

28. Heusch, G., Musiolik, J., Kottenberg, E., Peters, J., Jakob, H., Thielmann, M. (2012): STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. *Circ Res* 110, 111-115.
29. Heusch, G., Rassaf, T. (2016): Time to give up on cardioprotection? A critical appraisal of clinical studies on ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 119, 676-695.
30. Hildebrandt, H. A., Kreienkamp, V., Gent, S., Kahlert, P., Heusch, G., Kleinbongard, P. (2016): Kinetics and signal activation properties of circulating factor(s) from healthy volunteers undergoing remote ischemic pre-Conditioning. *JACC Basic Transl Sci* 1, 3-13.
31. Ibáñez, B., Heusch, G., Ovize, M., Van de Werf, F. (2015): Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 65, 1454-1471.
32. Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., Group, E. S. D. (2017): 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 39, 119-177.
33. Ikeda, Y., Miura, T., Sakamoto, J., Miki, T., Tanno, M., Kobayashi, H., Ohori, K., Takahashi, A., Shimamoto, K. (2006): Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms of cardioprotection afforded by delta-opioid receptor activation. *Basic Res Cardiol* 101, 418-426.
34. Kerendi, F., Kin, H., Halkos, M. E., Jiang, R., Zatta, A. J., Zhao, Z. Q., Guyton, R. A., Vinten-Johansen, J. (2005): Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 100, 404-412.
35. Kleinbongard, P., Bøtker, H. E., Ovize, M., Hausenloy, D. J., Heusch, G. (2020): Co-morbidities and co-medications as confounders of cardioprotection- Does it matter in the clinical setting? *Br J Pharmacol* 177, 5252-5269.
36. Kleinbongard, P., Heusch, G. (2015): Extracellular signalling molecules in the ischaemic/reperfused heart - druggable and translatable for cardioprotection? *Br J Pharmacol* 172, 2010-2025.

37. Kleinbongard, P., Skyschally, A., Gent, S., Pesch, M., Heusch, G. (2018): STAT3 as a common signal of ischemic conditioning: a lesson on "rigor and reproducibility" in preclinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 113, 3.
38. Kleinbongard, P., Skyschally, A., Heusch, G. (2017): Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflugers Arch* 469, 159-181.
39. Kottenberg, E., Musiolik, J., Thielmann, M., Jakob, H., Peters, J., Heusch, G. (2014): 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* 147, 376-382.
40. Krieg, T., Qin, Q., McIntosh, E. C., Cohen, M. V., Downey, J. M. (2002): ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2322-2330.
41. Lecour, S. (2009): Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol* 46, 607-609.
42. Lecour, S., Andreadou, I., Bøtker, H. E., Davidson, S. M., Heusch, G., Ruiz-Meana, M., Schulz, R., Zuurbier, C. J., Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J. (2021): IMProving Preclinical Assessment of Cardioprotective Therapies (IMPACT) criteria: guidelines of the EU-CARDIOPROTECTION COST Action. *Basic Res Cardiol* 116, 52.
43. Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., Opie, L. H. (2005): Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 112, 3911-3918.
44. Lieder, H. R., Baars, T., Kahlert, P., Kleinbongard, P. (2016): Aspirate from human stented saphenous vein grafts induces epicardial coronary vasoconstriction and impairs perfusion and left ventricular function in rat bioassay hearts with pharmacologically induced endothelial dysfunction. *Physiol Rep* 4, e12874.
45. Lieder, H. R., Kleinbongard, P., Skyschally, A., Hagelschuer, H., Chilian, W. M., Heusch, G. (2018): Vago-Splenic Axis in Signal Transduction of Remote Ischemic Preconditioning in Pigs and Rats. *Circ Res* 123, 1152-1163.

46. Lieder, H. R., Skyschally, A., Heusch, G., Kleinbongard, P. (2019): Plasma from remotely conditioned pigs reduces infarct size when given before or after ischemia to isolated perfused rat hearts. *Pflugers Arch* 471, 1371-1379.
47. Lindsey, M. L., Bolli, R., Canty, J. M., Jr., Du, X. J., Frangogiannis, N. G., Frantz, S., Gourdie, R. G., Holmes, J. W., Jones, S. P., Kloner, R. A., Lefer, D. J., Liao, R., Murphy, E., Ping, P., Przyklenk, K., Recchia, F. A., Schwartz Longacre, L., Ripplinger, C. M., Van Eyk, J. E., Heusch, G. (2018): Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314, H812-H838.
48. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
49. Meybohm, P., Kohlhaas, M., Stoppe, C., Gruenewald, M., Renner, J., Bein, B., Albrecht, M., Cremer, J., Coburn, M., Schaelte, G., Boening, A., Niemann, B., Sander, M., Roesner, J., Kletzin, F., Mutlak, H., Westphal, S., Laufenberg-Feldmann, R., Ferner, M., Brandes, I. F., Bauer, M., Stehr, S. N., Kortgen, A., Wittmann, M., Baumgarten, G., Meyer-Treschan, T., Kienbaum, P., Heringlake, M., Schoen, J., Treskatsch, S., Smul, T., Wolwender, E., Schilling, T., Fuernau, G., Bogatsch, H., Brosteanu, O., Hasenclever, D., Zacharowski, K. (2018): RIPHeart (Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery) Study: Myocardial dysfunction, postoperative neurocognitive dysfunction, and 1 year follow-up. *J Am Heart Assoc* 7, e008077.
50. Moran, A. E., Forouzanfar, M. H., Roth, G. A., Mensah, G. A., Ezzati, M., Flaxman, A., Murray, C. J., Naghavi, M. (2014): The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation* 129, 1493-1501.
51. Oba, T., Yasukawa, H., Nagata, T., Kyogoku, S., Minami, T., Nishihara, M., Ohshima, H., Mawatari, K., Nohara, S., Takahashi, J., Sugi, Y., Igata, S., Iwamoto, Y., Kai, H., Matsuoka, H., Takano, M., Aoki, H., Fukumoto, Y., Imaizumi, T. (2015): Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. *Circ J* 79, 1557-1567.
52. Pickard, J. M., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., Yellon, D. M. (2016): Co-dependence of the neural and humoral pathways in the mechanism of remote ischemic conditioning. *Basic Res Cardiol* 111, 50.
53. Pickard, J. M. J., Bøtker, H. E., Crimi, G., Davidson, B., Davidson, S. M., Dutka, D., Ferdinandy, P., Ganske, R., Garcia-Dorado, D., Gircz, Z., Gourine, A. V., Heusch, G., Kharbada, R., Kleinbongard, P., MacAllister, R., McIntyre, C., Meybohm, P., Prunier, F., Redington, A., Robertson, N. J., Suleiman, M. S., Vanezis, A., Walsh, S., Yellon, D. M., Hausenloy, D. J. (2014): Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from

the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. *Basic Res in Cardiol* 110, 453.

54. Pickard, J. M. J., Burke, N., Davidson, S. M., Yellon, D. M. (2017): Intrinsic cardiac ganglia and acetylcholine are important in the mechanism of ischaemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 112, 11.
55. Pokorney, S. D., Rodriguez, J. F., Ortiz, J. T., Lee, D. C., Bonow, R. O., Wu, E. (2012): Infarct healing is a dynamic process following acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson* 14, 62.
56. Prunier, F., Angoulvant, D., Saint Etienne, C., Vermes, E., Gilard, M., Piot, C., Roubille, F., Elbaz, M., Ovize, M., Bière, L., Jeanneteau, J., Delépine, S., Benard, T., Abi-Khalil, W., Furber, A. (2014): The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 109, 400.
57. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., Whittaker, P. (1993): Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87, 893-899.
58. Reimer, K. A., Jennings, R. B. (1979): 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* 40, 633-644.
59. Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., Jennings, R. B. (1977): The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786-794.
60. Roe, M. T., Messenger, J. C., Weintraub, W. S., Cannon, C. P., Fonarow, G. C., Dai, D., Chen, A. Y., Klein, L. W., Masoudi, F. A., McKay, C., Hewitt, K., Brindis, R. G., Peterson, E. D., Rumsfeld, J. S. (2010): Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 56, 254-263.
61. Schulman, D., Latchman, D. S., Yellon, D. M. (2002): Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1481-1488.
62. Shimizu, M., Tropak, M., Diaz, R. J., Suto, F., Surendra, H., Kuzmin, E., Li, J., Gross, G., Wilson, G. J., Callahan, J., Redington, A. N. (2009): Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly

on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 117, 191-200.

63. 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 Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ Res* 117, 279-288.
64. Skyschally, A., Kleinbongard, P., Lieder, H., Gedik, N., Stoian, L., Amanakis, G., Elbers, E., Heusch, G. (2018): Humoral transfer and intramyocardial signal transduction of protection by remote ischemic preconditioning in pigs, rats, and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H159-H172.
65. Skyschally, A., van Caster, P., Boengler, K., Gres, P., Musiolik, J., Schilawa, D., Schulz, R., Heusch, G. (2009): Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* 104, 15-18.
66. Sloth, A. D., Schmidt, M. R., Munk, K., Kharbanda, R. K., Redington, A. N., Schmidt, M., Pedersen, L., Sørensen, H. T., Bøtker, H. E., Investigators, C. (2014): 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* 35, 168-175.
67. Somers, S. J., Frias, M., Lacerda, L., Opie, L. H., Lecour, S. (2012): Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther* 26, 227-237.
68. Stone, G. W., Selker, H. P., Thiele, H., Patel, M. R., Udelson, J. E., Ohman, E. M., Maehara, A., Eitel, I., Granger, C. B., Jenkins, P. L., Nichols, M., Ben-Yehuda, O. (2016): Relationship between infarct size and outcomes following primary PCI: Patient-level analysis from 10 randomized trials. *J Am Coll Cardiol* 67, 1674-1683.
69. Suleman, N., Somers, S., Smith, R., Opie, L. H., Lecour, S. C. (2008): Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 79, 127-133.
70. Szummer, K., Wallentin, L., Lindhagen, L., Alfredsson, J., Erlinge, D., Held, C., James, S., Kellerth, T., Lindahl, B., Ravn-Fischer, A., Rydberg, E., Yndigegn, T., Jernberg, T. (2017): Improved outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction during the last 20 years are related to implementation of evidence-based treatments: experiences from the SWEDEHEART registry 1995–2014. *Eur Heart J* 38, 3056-3065.

71. Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Wendt, D., Gedik, N., Pasa, S., Price, V., Tsagakis, K., Neuhäuser, M., Peters, J., Jakob, H., Heusch, G. (2013): Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 382, 597-604.
72. Yellon, D. M., Ackbarkhan, A. K., Balgobin, V., Bulluck, H., Deelchand, A., Dhuny, M. R., Domah, N., Gaoneadry, D., Jagessur, R. K., Joonas, N., Kowlessur, S., Lutchoo, J., Nicholas, J. M., Pauvaday, K., Shamloll, O., Walker, J. M., Hausenloy, D. J. (2015): Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size in STEMI patients treated by thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 65, 2764-2765.
73. Yellon, D. M., Hausenloy, D. J. (2007): Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 357, 1121-1135.
74. Zuurbier, C. J., Jong, W. M., Eerbeek, O., Koeman, A., Pulskens, W. P., Butter, L. M., Leemans, J. C., Hollmann, M. W. (2012): Deletion of the innate immune NLRP3 receptor abolishes cardiac ischemic preconditioning and is associated with decreased Il-6/STAT3 signaling. *PLoS One* 7, e40643.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AKT1/2/3	Protein Kinase B 1/2/3
ANOVA	analysis of variance; Varianzanalyse
DMSO	Dimethylsulfoxid
dPLA	Plasmadialysat entnommen nach Placebo-Manöver
dRPER	Plasmadialysat entnommen nach herzferner ischämische Perkonditionierung
EPO	Erythropoetin
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
Isch	Ischämie
g	Gramm
ges AKT1/2/3	Gesamtprotein AKT1/2/3
ges ERK1/2	Gesamtprotein ERK1/2
ges STAT3	Gesamtprotein STAT3
kDa	Kilodalton
KF	Koronarer Fluss
kg	Kilogramm
KHP	Krebs-Henseleit Puffer
LVDD	Linksventrikulär entwickelter Differenzdruck
LVDdia	Linksventrikulärer diastolischer Druck
LVDsys	Linksventrikulärer systolischer Druck
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl der Versuche

NO/PKG-Signalweg	Stickstoffmonoxid/Proteinkinase G Signalweg
p	p-Wert, Irrtumswahrscheinlichkeit
pAKT1/2/3	Phosphoprotein AKT1/2/3
pERK1/2	Phosphoprotein ERK1/2
PLA	placebo remote ischemic percondtioning
pPLA	Plasma entnommen nach Placebo-Manöver
pRPER	Plasma entnommen nach herzferner ischämische Perkonditionierung
pSTAT3	Phosphoprotein STAT3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rep	Reperfusion
RIPC	remote ischemic preconditioning; herzferne ischämische Präkonditionierung
RISK-BL	RISK-Blockade
RISK-Signalweg	Reperfusion Injury Salvage Kinase Signalweg
RPER	remote ischemic percondtioning; herzferne ischämische Perkonditionierung
SAFE-BL	SAFE-Blockade
SAFE-Signalweg	Survivor Activating Factor Enhancement Signalweg
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS	Tris-buffered saline; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T-Puffer	Tris-buffered saline with Tween20-Puffer
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
V	Volt
vs.	versus
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
ZK	Zeitkontrolle

7.2 Tabellen

Tabelle 4: KF und LVDD der isoliert perfundierten Rattenherzen nach Schweineplasmainfusion ohne Blockade und mit Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges

	Zeitpunkt	KF [ml/min]	LVDD [mmHg]
ZK (n=5)	Baseline	14,0 ± 2,5	106 ± 12
	Saline	13,2 ± 1,8	100 ± 8‡
	Washout	13,1 ± 1,5	101 ± 9§
	Zeitpunkte, die den in den anderen Protokollen entsprechen:		
	+5 min	13,1 ± 1,5	116 ± 35
	+25 min	13,5 ± 1,5	118 ± 38
	+40 min	13,5 ± 1,2	102 ± 9
	+60 min	13,0 ± 0,9	99 ± 11
I/R (n=7)	Baseline	14,2 ± 1,9	102 ± 16
	Saline	13,7 ± 1,9	98 ± 17‡
	Washout	13,9 ± 1,9	100 ± 15§
	Isch5	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	4 ± 6*
	Rep10	8,8 ± 2,4*	22 ± 22*
	Rep30	9,6 ± 1,2*	30 ± 20*
PLA (n=6)	Baseline	14,7 ± 1,0	92 ± 10
	Plasma	11,9 ± 2,8*	59 ± 25*
	Washout	14,7 ± 2,2	75 ± 15*
	Isch5	0,0 ± 0,1*	1 ± 0*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	1 ± 0*
	Rep10	8,5 ± 3,2*	26 ± 18*
	Rep30	8,6 ± 2,9*	21 ± 13*
pPLA+RISK-BL (n=5)	Baseline	14,8 ± 1,9	99 ± 20
	Plasma	14,1 ± 2,0†	90 ± 29
	Washout	14,2 ± 1,2	92 ± 25
	Isch5	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Rep10	7,6 ± 0,7*	13 ± 10*
	Rep30	8,4 ± 2,3*	16 ± 10*
pPLA+SAFE-BL (n=5)	Baseline	12,9 ± 2,6	93 ± 11
	Plasma	9,1 ± 2,7*	51 ± 15*
	Washout	11,5 ± 2,3	75 ± 18*
	Isch5	0,0 ± 0,0*	2 ± 3*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	5 ± 7*
	Rep10	6,0 ± 2,1	18 ± 12*
	Rep30	6,2 ± 1,8	26 ± 13*
pRPER (n=6)	Baseline	13,5 ± 1,8	95 ± 8
	Plasma	9,3 ± 2,6*	53 ± 14*
	Washout	13,9 ± 2,0	80 ± 8
	Isch5	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Isch25	0,0 ± 0,1*	3 ± 4*
	Rep10	8,5 ± 1,2	25 ± 18*
	Rep30	8,4 ± 1,2	31 ± 20*
pRPER+RISK-BL (n=6)	Baseline	15,1 ± 2,2	94 ± 10
	Plasma	13,2 ± 4,8*	70 ± 23*
	Washout	14,9 ± 2,6	89 ± 16
	Isch5	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	2 ± 2*
	Rep10	7,2 ± 1,9	4 ± 7*
	Rep30	7,6 ± 1,8	9 ± 15*
pRPER+SAFE-BL (n=6)	Baseline	14,5 ± 2,1	92 ± 22
	Plasma	7,3 ± 3,7*	57 ± 38*
	Washout	10,8 ± 2,1*	62 ± 43*
	Isch5	0,0 ± 0,0*	1 ± 1*
	Isch25	0,0 ± 0,0*	2 ± 2*
	Rep10	7,9 ± 2,2	22 ± 25*
	Rep30	8,8 ± 3,1	33 ± 22*

Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. Baseline; † $p < 0,05$ vs. pPLA+SAFE-BL; ‡ $p < 0,05$ vs. pPLA, pPLA+RISK-BL, pPLA+SAFE-BL, pRPER, pRPER+RISK-BL, pRPER+SAFE-BL.; § $p < 0,05$ vs. pPLA, pPLA+SAFE-BL, pRPER, pRPER+RISK-BL, pRPER+SAFE-BL; Zwei-Wege-ANOVA mit wiederholten Messungen und Fisher Least-Significant-Difference Post-Hoc Test. Isch5/25: 5/25 min der Isch; KF: Mittelwert des koronaren Perfusionsflusses innerhalb einer Minute; LVDD: Mittelwert des Linksventrikulären Differenzdruckes (LVDD) innerhalb einer Minute; pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perikonditionierung; Rep10/30: 10/30 min der Rep; +RISK-BL: reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade. Tabelle modifiziert nach (Skyschally et al., 2018).

Tabelle 5: KF und LVDD der isoliert perfundierten Mausherzen nach Schweineplasma-dialysatinfusion (1:6, 12-14kDa) ohne Blockade und mit Blockade des RISK- und SAFE-Signalweges

	Zeitpunkt	KF [ml/min]	LVDD [mmHg]
ZK (n=4)	Baseline	2,6 \pm 0,7	71 \pm 5
	Saline	2,6 \pm 0,6	73 \pm 5
	Washout	2,5 \pm 0,5	74 \pm 3
	Zeitpunkte, die den in den Anderen Protokollen		
	+5 min	2,4 \pm 0,4	72 \pm 3
	+25 min	2,4 \pm 0,4	72 \pm 4
I/R (n=5)	+40 min	2,3 \pm 0,3	67 \pm 3
	Baseline	2,0 \pm 0,7	79 \pm 16
	Saline	1,9 \pm 0,7	76 \pm 13
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 0*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	0 \pm 0*
	Rep10	1,6 \pm 0,7	10 \pm 18*
PLA (n=5)	Rep30	1,6 \pm 0,8	41 \pm 19*
	Baseline	1,9 \pm 0,7	85 \pm 21
	Dialysat	2,1 \pm 0,9	101 \pm 28
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	3 \pm 3*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	2 \pm 3*
	Rep10	1,6 \pm 0,6	10 \pm 11*
dPLA+RISK-BL (n=5)	Rep30	1,7 \pm 0,6	36 \pm 18*
	Baseline	3,3 \pm 1,3†	90 \pm 24
	Dialysat	3,3 \pm 1,5†	89 \pm 21
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 1*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	0 \pm 1*
	Rep10	3,1 \pm 1,7	8 \pm 8*
dPLA+SAFE-BL (n=5)	Rep30	3,2 \pm 1,6	39 \pm 23*
	Baseline	2,9 \pm 1,1	95 \pm 18
	Dialysat	2,6 \pm 0,6	104 \pm 38
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 1*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	0 \pm 0*
	Rep10	2,6 \pm 1,1	17 \pm 22*
dRPER (n=5)	Rep30	2,6 \pm 1,0	69 \pm 27*§
	Baseline	2,8 \pm 0,8	80 \pm 18
	Dialysat	2,7 \pm 0,9	90 \pm 25
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 1*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	0 \pm 0*
	Rep10	3,3 \pm 1,1	34 \pm 26*†§
dRPER+RISK-BL	Rep30	3,3 \pm 1,0	81 \pm 8*†§
	Baseline	4,3 \pm 1,3‡	99 \pm 16
	Dialysat	4,3 \pm 1,7‡	101 \pm 27
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 0*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 2*
	Rep10	3,6 \pm 1,3	11 \pm 11*
dRPER+SAFE-BL	Rep30	3,6 \pm 1,3	45 \pm 21*
	Baseline	2,8 \pm 1,2	95 \pm 22
	Dialysat	2,9 \pm 0,8	103 \pm 23
	Isch5	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 1*
	Isch25	0,0 \pm 0,0*	1 \pm 1*
	Rep10	2,6 \pm 1,4	19 \pm 27*
	Rep30	2,5 \pm 1,3	47 \pm 40*

Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$ vs. Baseline; † $p < 0,05$ vs. dPLA; ‡ $p < 0,05$ vs. dRPER; § $p < 0,05$ vs. I/R; Zwei-Wege-ANOVA mit wiederholten Messungen mit Fisher least-significant-difference Post-Hoc Test. dPLA: Plasmadialysat entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; dRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perikonditionierung; Isch5/25: 5/25 min der Ischämie; I/R: Ischämie/Reperfusion; KF: Mittelwert des koronaren Perfusionsflusses innerhalb einer Minute; LVDD: Mittelwert des LVDD innerhalb einer Minute; Rep10/30: 10/30 min der Rep; +RISK-BL: reperfusion injury salvage kinase blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement blockade; ZK: Zeitkontrolle. Tabelle modifiziert nach (Skyschally et al., 2018).

7.3 Abbildungen

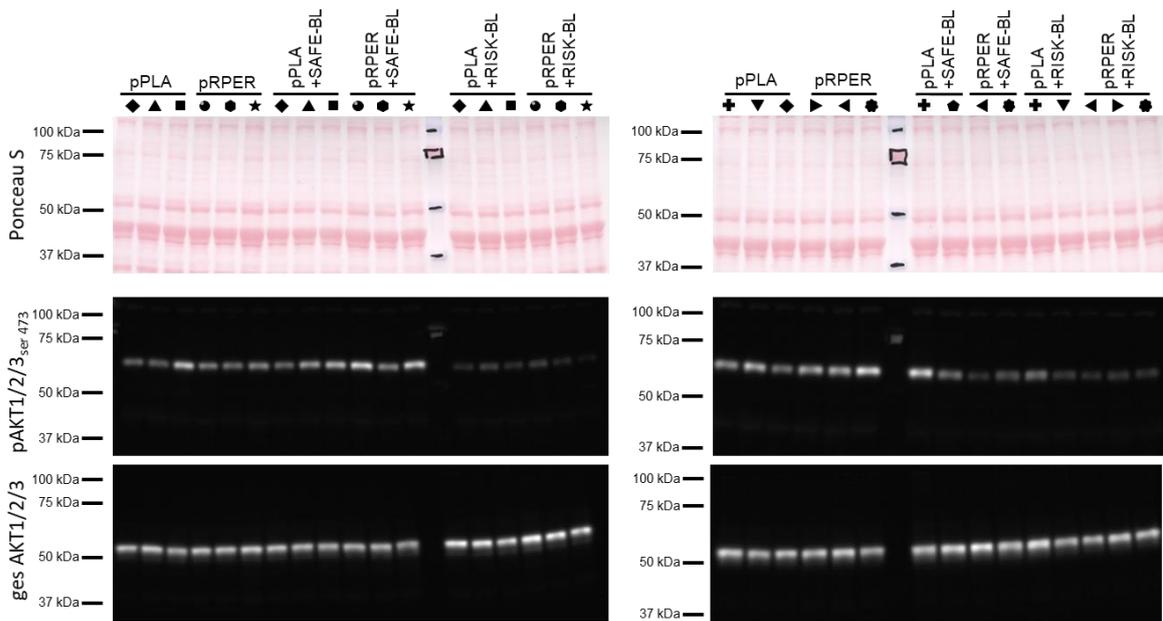


Abbildung 13: Western Blot Analyse von AKT1/2/3 (56 kDa) und phosphoryliertem AKT1/2/3_(Ser474) in den TTC gefärbten Rattenmyokardbiopsien nach RPER- und PLA-Plasmainfusion ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Serin₄₇₃ phosphoryliertem AKT_(Ser474) und dem gesamten AKT. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

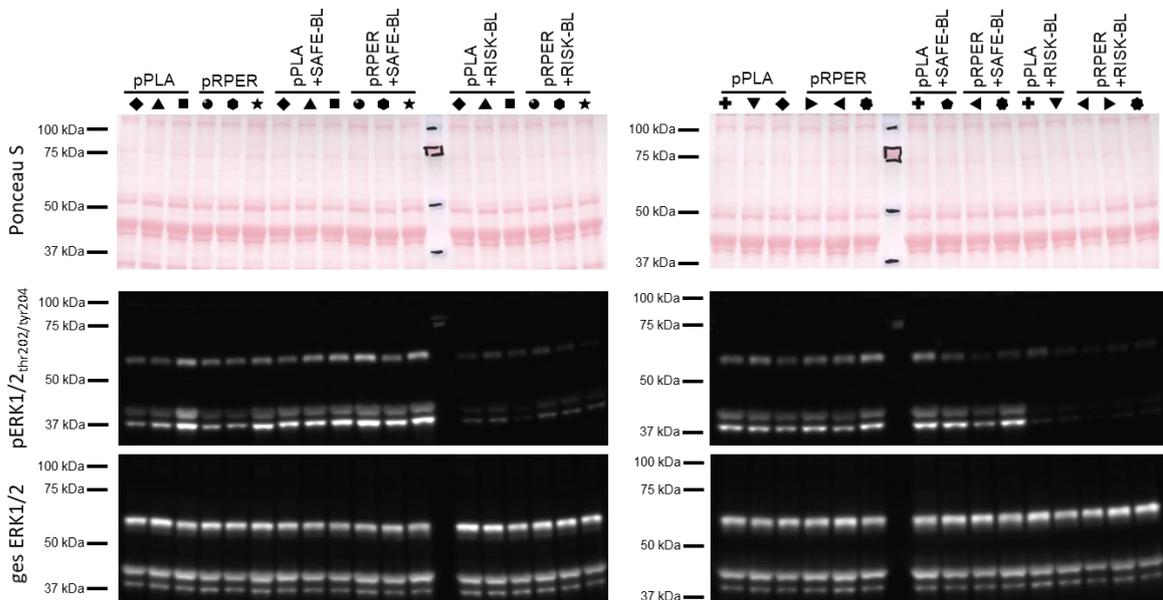


Abbildung 14: Western Blot Analyse von ERK1/2 (44/42 kDa) und phosphoryliertem ERK1_(Thr202/Tyr204), ERK2_(Thr185/Tyr187) in den TTC gefärbten Rattenmyokardbiopsien nach RPER- und PLA-Plasmainfusion ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Threonin₂₀₂ und Thyrosin₂₀₄ phosphoryliertem ERK1_(Thr202/Tyr204) und bei Threonin₁₈₅

und Thyrosin₁₈₇ phosphoryliertem ERK2_(Thr185/Tyr187) und dem gesamten ERK1/2. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

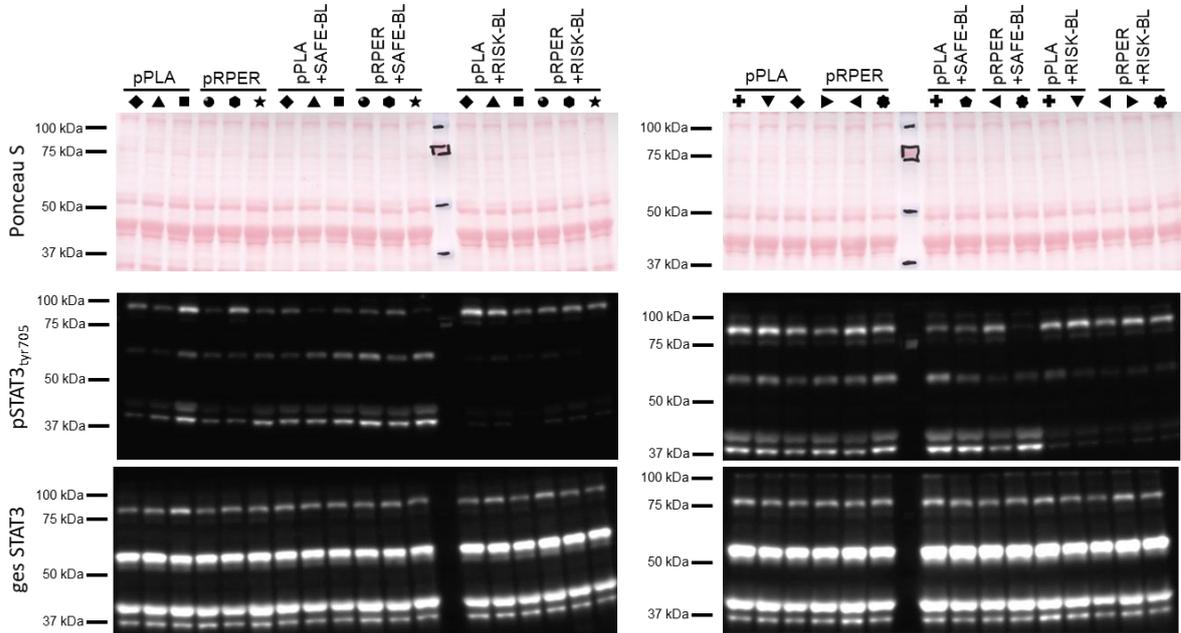


Abbildung 15: Western Blot Analyse von STAT3 (86 kDa) und phosphoryliertem STAT3_(Tyr705) in den TTC gefärbten Rattenherzbiopsien nach RPER- und PLA-Schweinplasmainfusion ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Thyrosin₇₀₅ phosphoryliertem STAT3_(Tyr705) und dem gesamten STAT3. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

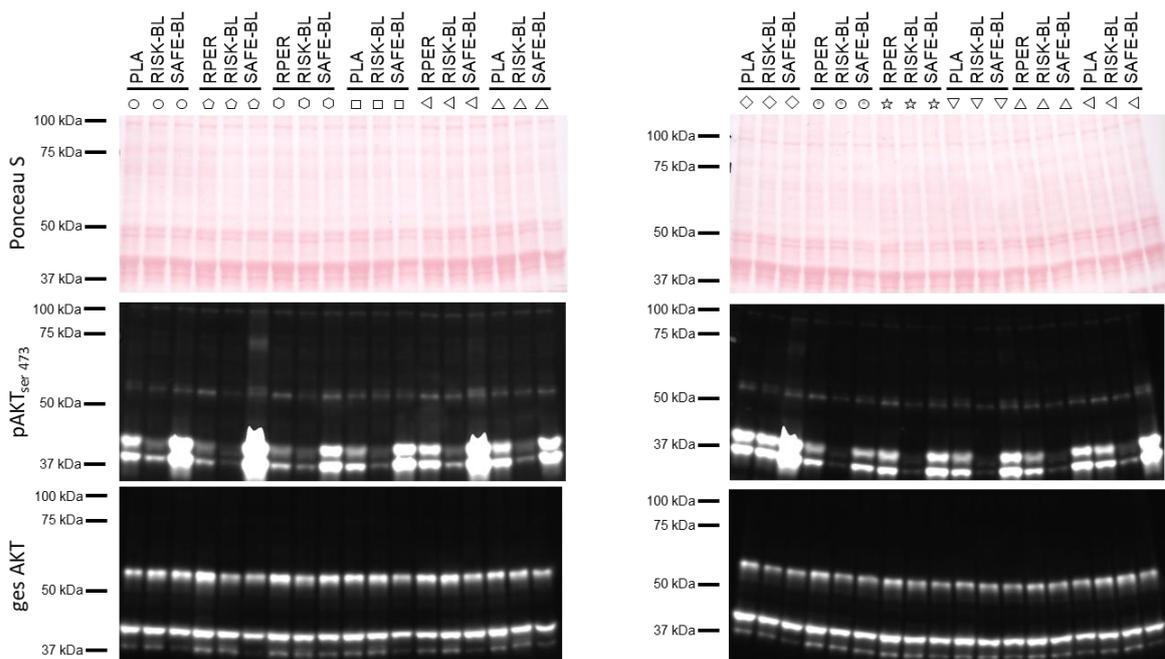


Abbildung 16: Western Blot Analyse von AKT1/2/3 (56 kDa) und phosphoryliertem AKT1/2/3_(Ser474) in den TTC gefärbten Mausherzen nach Infusion des RPER- und PLA-Schweineplasmadialysats ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Serin₄₇₃ phosphoryliertem AKT_(Ser474) und dem gesamten AKT. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

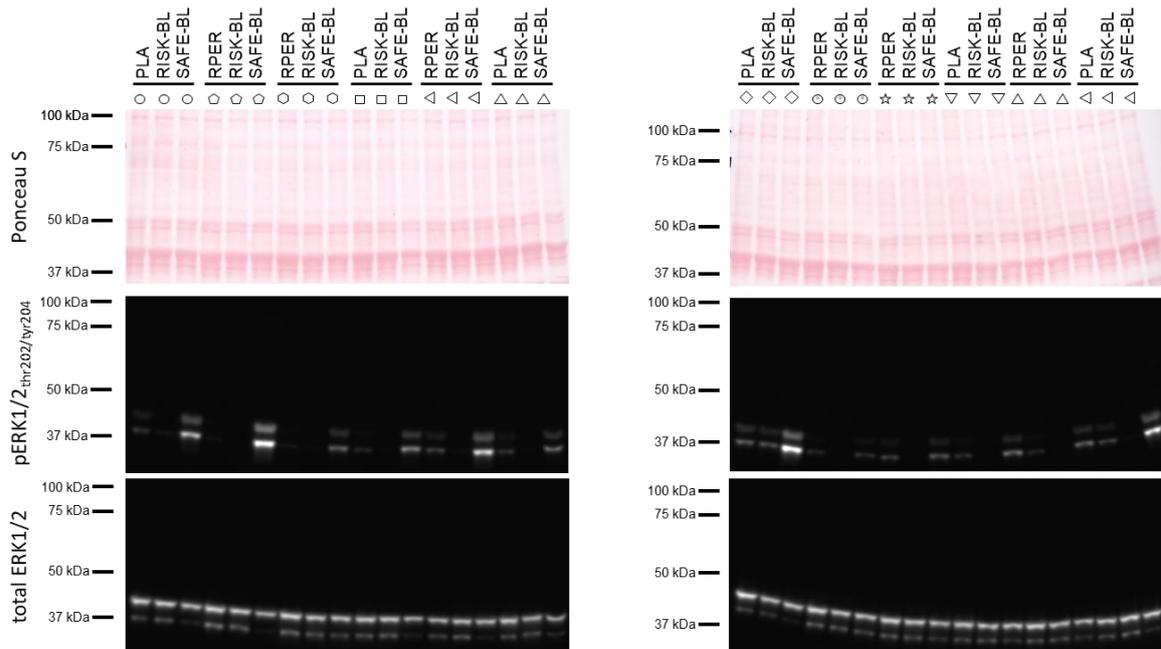


Abbildung 17: Western Blot Analyse von ERK1/2 (44/42 kDa) und phosphoryliertem ERK1_(Thr202/Tyr204) und ERK2_(Thr185/Tyr187) in den TTC gefärbten Mausherzen nach Infusion des RPER- und PLA-Schweineplasmadialysats ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Threonin₂₀₂ und Thyrosin₂₀₄ phosphoryliertem ERK1_(Thr202/Tyr204) und bei Threonin₁₈₅ und Thyrosin₁₈₇ phosphoryliertem ERK2_(Thr185/Tyr187) und dem gesamten ERK1/2 und dem gesamten ERK1/2. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

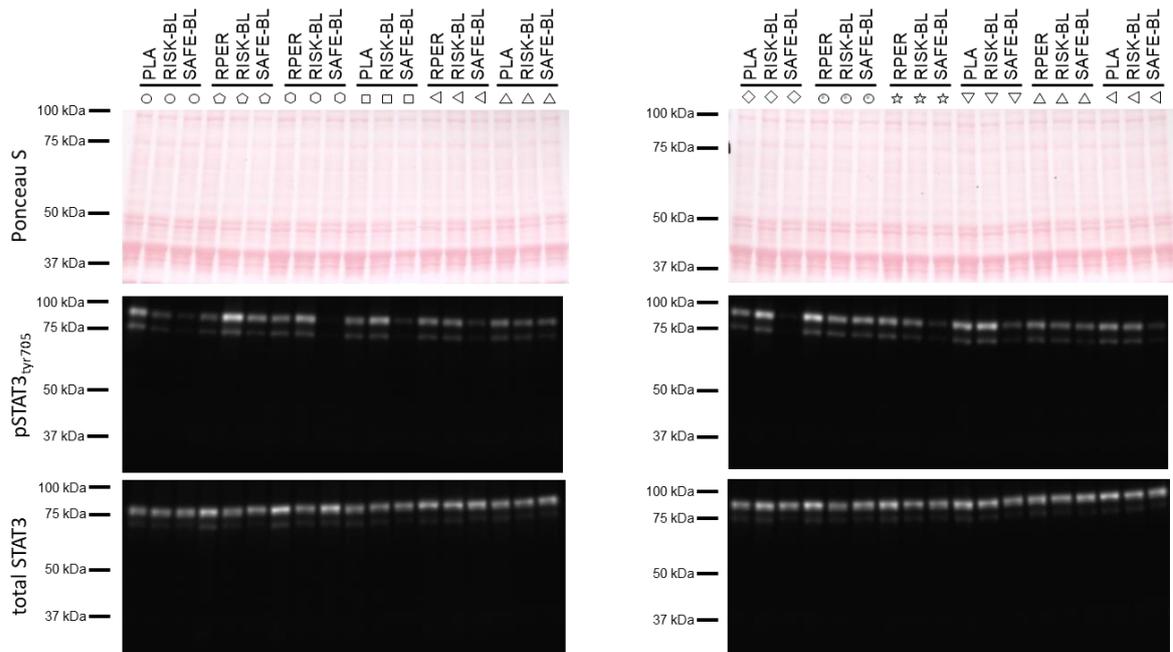


Abbildung 18: Western Blot Analyse von STAT3 (86 kDa) und phosphoryliertem STAT3_(Tyr705) in den TTC gefärbten Mausherzen nach Infusion des RPER- und PLA-Schweineplasmadialysats ohne Blockade und mit Blockade des SAFE- und RISK-Signalweges nach 120 min Reperfusion. Dargestellt sind Ponceau-Färbung, die Signale von bei Thyrosin₇₀₅ phosphoryliertem STAT3_(Tyr705) und dem gesamten STAT3. pPLA: Plasma entnommen von Schweinen nach Placebo-Manöver; pRPER: Plasma entnommen von Schweinen nach herzferner ischämischer Perkonditionierung; + RISK-BL: Reperfusion injury salvage kinase Blockade; +SAFE-BL: survivor activating factor enhancement Blockade.

8 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Menschen, die mich auf vielfältige Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Heusch, der es mir ermöglichte am Institut für Pathophysiologie zu promovieren und dessen fachliche und administrative Leitung die Qualität dieses Projektes maßgeblich vorantrieb.

Ich danke ebenfalls herzlich Prof. Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard, die immer neue wissenschaftliche Denkanstöße gab, mich motivierte weiterzuarbeiten und die Dissertation gewissenhaft und voller Hilfsbereitschaft unterstützte.

Besonderen Dank gilt Dr. med. Helmut Raphael Lieder für die stets geduldige Betreuung im Langendorff Labor und für seine stete Hilfe bei der Verfassung dieser Dissertation.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Freundin und meiner Familie, die mir in schwierigen Zeiten des Studiums und der Promotion immer wieder beiseite standen.

9 Lebenslauf

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

