

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD GRAF
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zum kardioprotektiven Effekt
der Ischämischen Fernkonditionierung (RIPC)
bei gesunden und atherosklerotischen Organismen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kathrin Eglmeier

2019

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD GRAF
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zum kardioprotektiven Effekt
der Ischämischen Fernkonditionierung (RIPC)
bei gesunden und atherosklerotischen Organismen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kathrin Eglmeier

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Redel

2. Berichterstatter: PD Dr. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Perioperative Myokardinfarkt (POMI).....	2
1.2	Kardioprotektion durch Konditionierung.....	3
1.3	Ischämische Präkonditionierung (IPC).....	4
1.4	Anästhetika induzierte Präkonditionierung (APC).....	5
1.5	Ischämische Fernkonditionierung (RIPC)	6
1.6	Grenzen der Tierversuchsmodelle und daraus resultierende kontroverse Ergebnisse im klinischen Umfeld	8
1.7	Mechanismen des IPC und RIPC.....	9
1.8	Endotheliale Dysfunktion	11
1.9	Experimentelle Atherosklerose-Modelle	12
1.10	Fragetellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Versuchsgenehmigung.....	16
2.2	Durchführung der Untersuchungen.....	16
2.2.1	Versuchstiere.....	16
2.2.2	Geräte, OP-Besteck und andere Materialien	16
2.2.3	Medikamente, Chemikalien und andere Puffer.....	16
2.2.4	Narkose und Vorbereitung.....	17
2.2.5	Operationsschritte	17
2.2.6	Versuchsprotokoll	19
2.2.7	Okklusion der Koronararterie.....	21
2.2.8	Beendigung des Experiments.....	22
2.2.9	Auswertung mit Adobe Photo Shop.....	25
2.2.10	Berechnung der Area at risk (AAR) und Infarct size (IS)	26
2.3	Untersuchungen zum Nachweis atherosklerotischer Veränderungen .	27
2.3.1	Messung der endothelialen Dysfunktion am Myograph	27
2.3.2	Histologie.....	28
2.4	Statistische Analyse.....	29
3	Ergebnisse	30

3.1	Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf die Infarktgröße bei C57BL6N Mäusen	30
3.2	Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf die Infarktgröße bei LDLR^{-/-} Mäusen	32
3.3	Experimente zum Nachweis von Atherosklerose	34
3.3.1	Messung der endothelialen Funktion	34
3.3.2	Histologische Schnitte	36
4	Diskussion.....	38
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49

Abkürzungsverzeichnis:

AAR	Area at risk
ACh	Acetylcholin
APC	Anästhetika induzierte Präkonditionierung (<i>engl. anaesthetic preconditioning</i>)
apoE ^{-/-}	apoE-Gen deletiert
LDLR ^{-/-}	LDL-Rezeptor-Gen deletiert
miRNA	microRNA
BL	Baseline
CAO	Koronararterienokklusion (<i>engl. Coronary artery occlusion</i>)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
IA	Infarktareal
IPC	Ischämische Präkonditionierung (<i>engl. Ischemic preconditioning</i>)
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
IS	Infarktgröße (<i>engl. infarct size</i>)
L-Name	N-nitro-L-Arginin-Methylester
LV	Linker Ventrikel
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAP	Mittlerer arterieller Druck; (<i>engl. mean arterial pressure</i>)
MEM	Memoryphase
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (<i>engl. mitochondrial permeability transition pore</i>)
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
POMI	Perioperativer Myokardinfarkt (<i>engl. perioperative myocardial infarct</i>)
REP	Reperfusion
RIPC	Ischämische Fernkonditionierung (<i>engl. ischemic preconditioning</i>)

ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (<i>engl. reactive oxygen species</i>);
SEVO	Sevofluran
SNP	Natrium Nitroprussid (<i>engl. sodium nitroprusside</i>)
TIVA	Totale intravenöse Anästhesie

1 Einleitung

Weltweit werden jährlich ca. 200 Mio. abdominalchirurgische Operationen durchgeführt. Die perioperative Mortalität wird weiterhin hauptsächlich durch kardiovaskuläre Komplikationen beeinflusst. Mit einer Inzidenz von 5 % bei nicht kardiochirurgischen Eingriffen und einer Mortalität von 15 – 25 % während des Klinikaufenthalts stellt der perioperative Myokardinfarkt (POMI) eine ernstzunehmende Komplikation dar (1). Aufgrund des demographischen Wandels benötigen zunehmend ältere Patienten mit zahlreichen Begleiterkrankungen eine operative Behandlung. Um diese kardialen Risikopatienten vor einem POMI und einem damit einhergehenden myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) zu schützen, ist in der präanästhesiologischen Visite eine gründliche Anamneseerhebung und körperliche Untersuchung zur Einschätzung des aktuellen Gesundheitszustands durchzuführen. Mithilfe von Risiko-Scoring-Systemen (z.B. kardiale Risikostratifizierung nach Lee und Goldman) und Entscheidungsalgorithmen sollen kardiovaskuläre Risikopatienten evaluiert und ein auf den jeweiligen Patienten individuell angepasstes perioperatives Management festgelegt werden. Weitere präoperative Maßnahmen zur Risikoreduktion umfassen therapeutische Schritte, entweder interventioneller (z.B. PTA) oder medikamentöser Natur (z.B. β -Blocker) sowie die Auswahl des Anästhesieverfahrens. Intraoperativ kann eine Kardioprotektion lediglich durch kontinuierliche Überwachung (2) und bei Eintreten eines POMI durch perkutane Koronarintervention gewährleistet werden. Die Möglichkeiten der Anästhesie stoßen damit an ihre Grenzen und verlangen nach besseren kardioprotektiven Strategien. Ein neuartiges Konzept zur Kardioprotektion ist die Konditionierung. Hierunter versteht man „einen Mechanismus, der es einem Organismus durch Anpassungsprozesse ermöglicht“ (4), ein schädliches Ereignis

besser zu überstehen. Die Idee, dass ein Zielorgan einem Reiz ausgesetzt wird, um auf einen nachfolgenden ähnlichen bzw. stärkeren Reiz vorbereitet zu sein, nennt sich Präkonditionierung. Im Folgenden soll der perioperative Myokardinfarkt und das Prinzip der Präkonditionierung näher definiert werden.

1.1 Perioperative Myokardinfarkt (POMI)

Der perioperative Myokardinfarkt beschreibt eine Zellschädigung des Herzmuskelgewebes, welche im zeitlichen Umfeld eines chirurgischen Eingriffs stattfindet. Im Gegensatz zum akuten Koronarsyndrom stellt sich der POMI meist klinisch stumm dar und kann nur mithilfe von EKG-Veränderungen (z.B. neu aufgetretene ST-Streckensenkungen) oder laborchemisch detektiert werden (3). Pathophysiologisch werden zwei verschiedene Mechanismen des POMI unterschieden. Der Typ I oder auch das akute Koronarsyndrom ist einer akuten Durchblutungsstörung geschuldet. Physiologischer und emotionaler Stress führen zur Ruptur eines instabilen Plaques mit anschließender Thrombusbildung und folgender lokaler Okklusion oder distaler Embolisation (5). Ein länger andauerndes Missverhältnis des myokardialen Sauerstoffverbrauchs und –angebots charakterisiert den Typ II. Perioperative Faktoren, wie Blutungen, welche Anämie und Hypotension hervorrufen sowie schmerzbedingt erschwerte Atmung führen zu einer schweren Hypoxämie. Dem gegenüber steht ein erhöhter Sauerstoffbedarf bei erhöhter myokardialer Arbeitsleistung. Postoperative Schmerzen und ein allgemeiner inflammatorischer Zustand führen zu einem erhöhten Sympathikotonus mit Tachykardie und Vasokonstriktion (5). Experten vermuten, dass die Inzidenz des Typ II POMI höher ist als die eines durch Plaqueruptur bedingten MIs, vor allem angesichts des seltenen perioperativen Vorkommens eines ST-Hebungsinfarktes (6). Das Risiko für ein kardiales Ereignis kann intra- und postoperativ günstig beeinflusst

werden, indem die myokardiale Sauerstoff-Bilanz verbessert und durch die frühzeitige Detektion von beispielsweise ST-Senkungen das Risiko für einen IRS reduziert wird (7). Letzterer tritt als Komplikation auf, sobald ein Gewebe einen Sauerstoffmangel aufweist. Dieser führt zu einer Zellschädigung und abhängig von der Dauer der Ischämie zu einem apoptotischen und nekrotischen Zelluntergang. Die Therapie der Wahl ist die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung durch zeitnahe Reperfusion. Allerdings führt auch das abrupte Wiedereinsetzen der Sauerstoffzufuhr ischämischen Organgewebes zu einer Zellschädigung, die u.a. durch den Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verursacht wird. Die frühzeitige Erkennung eines IRS und die günstige Beeinflussung der O₂-Bilanz, wie sie beispielsweise durch eine optimale Volumen- und Druckbelastung des Herzens, das Aufrechterhalten eines konstanten mittleren arteriellen Drucks (MAP) über 55 - 60 mmHg, sowie eine Herzfrequenz zwischen 60 – 80/ min erlangt wird, sind nicht die einzigen Therapieansätze zur Kardioprotektion. Die Möglichkeit der Konditionierung stellt eine innovative Strategie zur Reduktion bzw. Prävention kardialer Ereignisse dar (7).

1.2 Kardioprotektion durch Konditionierung

Das Phänomen, dass ein subletaler zellulärer Stimulus, welcher die Zelle vor einer nachfolgenden potenziell letalen Schädigung warnt, durch Induktion zelleigener Schutzmechanismen die Auswirkung der Indexischämie reduziert, wird als Konditionierung bezeichnet. Je nachdem, ob der Stimulus vor der Ischämie oder vor der Reperfusion einsetzt, spricht man von Prä- oder Postkonditionierung. Im Fall der Konditionierung des Myokards stellt der IRS das schädliche Ereignis dar. Durch die Applikation von Stimuli in Form von z.B. kurzen Ischämien (Ischämische Präkonditionierung) wird eine höhere Ischämietoleranz der Zellen erlangt und so ein

kardioprotektiver Effekt bewirkt. Die Art der Stimuli kann unterschiedlich sein. So scheinen kurzzeitige Ischämien, aber auch pharmakologische Substanzen, wie Edelgase (8), Adenosin (9), Opioide (10) sowie volatile Anästhetika (Anästhetika induzierte Präkonditionierung) (11) eine günstige Wirkung auf die Folgen des IRS zu haben.

1.3 Ischämische Präkonditionierung (IPC)

Der bisher wirkungsvollste Mechanismus zur Kardioprotektion ist die ischämische Präkonditionierung. Sie lässt sich in allen bisher untersuchten Spezies und mehreren Organen nachweisen (12). Dieses Phänomen beschrieb Murry et al. erstmals 1986. An Hundeherzen demonstrierte er, dass mittels vier Zyklen einer je fünfminütigen Ischämie und Reperfusion des linken Ramus ventricularis anterior vor einer 40 minütigen Okklusion derselben Arterie und anschließender Reperfusion von 72 h die Infarktgröße um 75 % verringert werden konnte (13). Die Wirkung von IPC konnte bisher nicht nur in experimentellen Studien nachgewiesen werden, sondern auch in klinischen. Die therapeutische Anwendung von IPC zeigt, dass wiederholte Balloninsufflationen während perkutaner Koronarinterventionen zu weniger kardialen Komplikationen und einem geringeren Sterblichkeitsrisiko während des darauffolgenden Jahres führen (14). In einer Metaanalyse zur Rolle von IPC bei Herzoperationen wurde gezeigt, dass Patienten, welche zu Beginn der Operation einen ischämischen Stimulus erhalten haben, weniger Arrhythmien, einen geringeren Katecholaminbedarf sowie kürzere Aufenthalte auf der Intensivstation hatten (15). Dennoch handelt es sich beim IPC um ein invasives Verfahren, welches in bestimmten klinischen Situationen inadäquat ist und eine schädliche Wirkung haben kann (16).

1.4 Anästhetika induzierte Präkonditionierung (APC)

Volatile Anästhetika reduzieren die Arbeitsleistung des Herzens und senken so den myokardialen O₂-Bedarf. Zusätzlich zu diesem Benefit scheinen sie auch direkt kardioprotektiv zu wirken (13). Freedman et al. war der Erste, der einen kardioprotektiven Effekt bei volatilen Anästhetika beschrieb (13). An isolierten Rattenherzen wurde demonstriert, dass die Gabe von 2%igem Enfluran vor einem Ischämieereignis die funktionelle Erholung des Myokards im postischämischen Status verbessert (17). Bislang konnte für alle im anästhesiologischen Alltag relevanten volatilen Anästhetika, wie Isofluran, Desfluran und Sevofluran ein protektiver Effekt im Tiermodell nachgewiesen werden (11). Am murinen in vivo Herzinfarktmodell wurde gezeigt, dass sich die einzelnen Anästhetika in ihrem präkonditionierenden Potenzial unterscheiden. Im Versuchsprotokoll wurde das Anästhetikum für 15 Minuten appliziert und die Koronararterie 15 Minuten nach Beendigung der Halogenzufuhr okkludiert. Desfluran bewirkte eine Reduktion der Herzinfarktgröße um 70%. Sevofluran führte zu einer 26%igen Reduktion. Eine ähnlich starke Wirkung konnte durch eine Applikation von Isofluran über 30 Minuten erreicht werden (11). Kehl et al. zeigten, dass Isofluran bereits bei einer minimalen alveolären Konzentration (MAC) von 0,25 präkonditionierend wirkt. Höhere Konzentrationen des selben Anästhetikums zeigen nur bei niedrigem kollateralem Koronararteriendurchfluss eine stärkere Wirkung (18). Der Untersuchung der APC in experimentellen Studien folgte eine Übertragung in die Klinik. Kardiochirurgische Eingriffe boten sich für klinische Studien an, da sie hoch standardisiert sind. Aufgrund der niedrigen Mortalität und der niedrigen Anzahl an myokardialen Infarkt ereignissen in der postoperativen Phase wurde die Konzentration von Troponin, welches stark mit dem klinischen Outcome korreliert (19), als Endpunkt gewählt (20). Lee et al. untersuchten die Wirkung von Isofluran bei Patienten, welche

sich einer koronaren Bypass-Operation unterzogen. Die 15-minütige Applikation des volatilen Anästhetikums mit anschließender 5-minütiger Memory-Phase vor Abklemmen der Aorta ergab eine signifikant niedrigere Konzentration von Troponin I 24 h nach der Operation im Vergleich zur Kontrollgruppe (21). Auch für Desfluran, appliziert vor einem kardiopulmonalem Bypass, wurden postoperativ niedrigere Troponin I Konzentrationen gemessen sowie ein geringerer Katecholaminbedarf als bei Patienten, welche mit Propofol anästhetisiert wurden (22). In einer Metaanalyse, welche 3642 Patienten aus 38 Studien einschloss, war die postoperative Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen in der Gruppe mit totaler intravenöser Anästhesie (TIVA) doppelt so hoch im Vergleich zur Gruppe mit volatiler Anästhesie (23). Allerdings existieren auch mehrere Studien, die keine kardioprotektive Wirkung durch volatile Anästhetika zeigen (24,25). Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der vielversprechenden Wirkung der APC in Tierexperimenten und den kontroversen Ergebnissen in klinischen Studien ist die Tatsache, dass sich überwiegend kardiale Risikopatienten mit zahlreichen Co-Morbiditäten, wie Diabetes, chronischer Niereninsuffizienz und peripheren Gefäßerkrankungen herzchirurgischen Eingriffen unterziehen (20).

1.5 Ischämische Fernkonditionierung (RIPC)

Die IPC zeigte im Tierversuch einen eindeutigen kardioprotektiven Nutzen. Eine Reduktion der Infarktgröße um 75 % ließ auf ebenso erfolgreiche Ergebnisse im klinischen Setting hoffen. Allerdings stellte sich deren Umsetzung aufgrund der erforderlichen Invasivität als schwierig dar und machte die Nutzen-Risiko-Abwägung zu einer Herausforderung (26). Die Idee einer ischämischen Fernkonditionierung, welche risikofrei am Patienten durchgeführt werden könnte, versprach die Entwicklung einer neuen, erfolgreichen Methode zur Minimierung des IRS. Beim

RIPC führt die Applikation kurzer Episoden von Ischämie und Reperfusion an einem bestimmten Organ oder Gewebe zu einer gesteigerten Resistenz anderer, entfernt liegender Organe gegenüber einem IRS (27). Das Phänomen der „Kardioprotektion aus der Ferne“ (28) wurde zum ersten Mal 1993 von Przyklenk et. al beschrieben. Sie zeigten an Hundeherzen, dass 4 Zyklen einer 5-minütigen Ischämie und Reperfusion an der linken Circumflexarterie, gefolgt von einer einstündigen Okklusion der linken Koronararterie eine signifikante Infarktreduktion bewirkten (28). Das Prinzip der intramyokardialen Protektion wurde stufenweise weiterentwickelt. Das Phänomen der Inter-Organ-Protektion wurde entdeckt. Auch durch kurze Ischämien anderer Organe, wie z. B. der Niere (29) oder des kleinen Intestinums (30) konnte eine kardioprotektive Wirkung hervorgerufen werden. Auch nicht kardiale Organe konnten durch RIPC vor einem IRS geschützt werden (31). Die Problematik der Invasivität der zuvor genannten Untersuchungen schuf den Anreiz für weitere Forschung. Versuche, eine Ischämie am Hinterlauf zu erzeugen, führten über die Präparation und Kompression der A. femoralis (32–34) hin zur einfachen Methode, den Blutfluss mithilfe einer Blutdruckmanschette zu unterbrechen (35). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Eigenkonstruktion entwickelt, welche als Blutdruckmanschette fungierte. Die gleichzeitige Durchführung von RIPC an zwei Hinterläufen senkte die Herzinfarktgröße in gleichem Maß wie die intermittierende Unterbrechung des Blutflusses an nur einem Hinterlauf (36). Untersuchungen zum optimalen RIPC-Zyklus ergaben, dass vier bis sechs Zyklen eine signifikante Kardioprotektion erreichen können. Zudem haben Zyklen mit je zweiminütiger Ischämie die gleiche infarktreduzierende Wirkung, wie Episoden mit je 5 Minuten Hinterlaufischämie. Die Unterbrechung der Blutzufuhr für 10 Minuten pro RIPC Episode schwächte die Wirkung ab (36). In dieser Arbeit wurden 3 Zyklen RIPC

bestehend aus fünfminütiger Hinterlaufischämie und ebenso langer Reperfusion am Hinterlauf der Maus appliziert. 2002 zeigte Kharbana et al. in vorläufigen klinischen Studien erstmals, dass RIPC durch das Anbringen einer Blutdruckmanschette am Oberarm nicht invasiv umgesetzt werden konnte. Durch das Aufpumpen wird eine kurze ungefährliche Ischämie induziert und nach Ablassen des Drucks die Reperfusion des Gewebes wiederhergestellt (37). Seitdem wurden mehrere klinische Studien mit kontroversen Ergebnissen durchgeführt. Während ein Teil eine kardioprotektive Wirkung durch RIPC nachwies (38–41), hatte in einigen Studien die RIPC-Versuchsgruppe keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe (42–45).

1.6 Grenzen der Tierversuchsmodelle und daraus resultierende kontroverse Ergebnisse im klinischen Umfeld

Es werden mehrere Faktoren diskutiert, welche für die gescheiterte Übertragung von RIPC und anderer Konditionierungsformen ins klinische Umfeld und für die Variabilität der Ergebnisse verantwortlich scheinen (46). Zum einen scheint ein Großteil der bisherigen Tiermodelle, welche zur Entwicklung neuer kardioprotektiver Strategien etabliert wurden, die klinische Situation inadäquat abzubilden. Während in der Klinik ein POMI entweder durch die Ruptur eines instabilen atherosklerotischen Plaques oder ein Missverhältnis der myokardialen O₂-Bilanz entsteht, wird im in vivo Modell der Infarkt durch die Okklusion einer gesunden Koronararterie von außen herbeigeführt. Zudem ist die Reperfusion durch PCI eher mit einer verbleibenden Stenose und thrombotischer Embolisation assoziiert als im Tiermodell. Weitere Unterschiede existieren bei der Dauer von Ischämie und Reperfusion sowie dem Endpunkt der Kardioprotektion. Im Tierversuch wird das Ausmaß der Präkonditionierung anhand der Reduktion des MIs, welche histologisch bestimmt wird, gemessen, während im klinischen Setting freigesetzte Biomarker zur

Abschätzung des Schadens herangezogen werden. Zudem variiert die Pathophysiologie des IRS mit der klinischen Situation. Der IRS, welcher beim akuten STEMI entsteht, unterscheidet sich von jenen, welche bei Eingriffen, wie koronarer Bypass-Operation, kardialem Arrest oder abdominalchirurgischen Operationen entstehen. Einen weiteren Grund stellt die Verwendung von überwiegend männlichen, kleinen Versuchstieren in jungem Alter dar. Diese weisen keine Co-Morbiditäten auf und nehmen keine Begleitmedikation ein. Im Gegensatz dazu stellen sich Patienten mit ischämischer Herzerkrankung erst in höherem Alter vor (55 bis 65 Jahre oder älter). In experimentellen Studien müssten deshalb 21-24 Monate alte Mäuse oder Ratten verwendet werden, um diesem Alter zu entsprechen. Auch das Geschlecht scheint die myokardiale Sensibilität auf die angewandte kardioprotektive Maßnahme zu beeinflussen. Im Tiermodell sollten deshalb auch weibliche Tiere untersucht werden. Aufgrund des demographischen Wandels bringen viele Patienten zahlreiche Co-Morbiditäten mit und steigern dadurch ihr kardiales Risiko. Deshalb ist es von enormer Wichtigkeit, dass kardioprotektive Strategien auch in Anwesenheit von einer oder mehreren Begleiterkrankungen getestet werden (47).

1.7 Mechanismen des IPC und RIPC

Sowohl IPC als auch RIPC vermitteln ihre kardioprotektive Wirkung über komplexe Signaltransduktionskaskaden, die bis heute noch nicht ganz verstanden sind.

Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die Formation eines Multiproteinkomplexes festlegt, ob ein Reiz kardioprotektiv wirkt. Bei diesem Endeffektor handelt es sich um die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), welche auf der inneren Mitochondrienmembran sitzt. Ist diese geöffnet, kommt es zum Einstrom von Wasser, dadurch zur Schwellung der Organellen, der

Freisetzung von intermembranärem Cytochrom C und damit zur Einleitung der Apoptose (48). Eine Konditionierung wirkt protektiv, indem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP senkt und damit die Integrität des Mitochondriums erhält (7). Während die intrakardiale Signaltransduktion beim IPC und RIPC ähnlich abläuft (49), ist beim RIPC der Mechanismus, welcher das am entfernten Organ generierte protektive Signal zum Zielorgan bringt noch ungelöst. Studien deuten auf eine Beteiligung von sowohl humoralen Faktoren als auch neuronalen Wegen hin. Beim RIPC folgt einer kurzen Ischämie des entfernt liegenden Organs stets eine Phase der Reperfusion. Man kann annehmen, dass diese Reperusionsphase benötigt wird, um eine Substanz oder einen humoralen Faktor auszuwaschen und über den Kreislauf zum Zielorgan zu transportieren (30). Die experimentelle Studie von Shimizu et al., in welcher die Transfusion von Plasma eines per Hinterlaufischämie präkonditionierten Kaninchens kardioprotektiv beim isolierten Empfängerherz wirkt (50), ist eine von vielen Untersuchungen (51–53), die die Hypothese von humoralen Faktoren unterstützt. Proteine, wie Kallistatin (54), Apolipoprotein A-I (55) und stromal-derived-factor 1 α (SDF 1 α) (56), aber auch andere Mediatoren, wie microRNAs (miRNA) (49,57), Bradykinin (58), Adenosin (59) sowie Stickstoffmonoxid (NO) (60) bzw. Nitrit (61) werden als humorale Faktoren diskutiert. Die kurze Halbwertszeit von Adenosin und NO macht es unwahrscheinlich, dass diese signifikant an der Übermittlung der Kardioprotektion beteiligt sind (27). Allerdings wirkt sich Nitrit mit einer Halbwertszeit von 60 Minuten (62) positiv auf den IRS aus (63). Es wird angenommen, dass die bei der Ischämischen Fernkonditionierung verursachten Scherkräfte zu einer eNOS-Aktivierung und NO-Bildung führen, welches wiederum zu Nitrit oxidiert wird. Über den Blutkreislauf gelangt Nitrit zur Zielzelle, dem Kardiomyozyten, wo während des IRS mithilfe von

Myoglobin eine Reduktion zu NO stattfindet. Dieses führt über eine nachgeschaltete Signalkaskade zu einer Minimierung mitochondrialer Nekrose und Apoptose (61). Experimente mit Ganglion-Blockern, wie Trimetaphan (64) und Hexamethonium (58,65,66) sowie die Resektion afferenter Nervenfasern(67–69) weisen darauf hin, dass ein protektives Signal ohne die Beteiligung von neuronalen Wegen nicht übertragen werden kann. Dass vermutlich sowohl humorale Faktoren als auch neuronale Reflexe zur Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung der RIPC notwendig sind, zeigte eine Studie mit Diabetes-Patienten. Jensen et al. fand heraus, dass das Plasma-Dialysat von mit RIPC behandelten Diabetikern mit peripherer Neuropathie die Myokardinfarktgröße in isolierten Kaninchenherzen nicht reduzieren konnte, während Plasma von Nicht-Diabetikern und Diabetikern ohne periphere Neuropathie nach Durchlauf des RIPC-Protokolls kardioprotektiv wirkten (70). Auch eine anti-inflammatorische Wirkung der RIPC wird diskutiert (71). Die Recherche zeigt, dass der zugrundeliegende Mechanismus des RIPC durch ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren gekennzeichnet ist und noch weitere Studien zur Entschlüsselung notwendig sind, um einen therapeutischen Nutzen daraus ziehen zu können.

1.8 Endotheliale Dysfunktion

Experimentelle Studien zeigen, dass bestimmte Co-Morbiditäten die infarktreduzierende Wirkung der Präkonditionierung stark einschränken. Zu diesen gehören neben dem Diabetes mellitus (72) vor allem die endotheliale Dysfunktion (73). In einem Versuch mit eNOS- und iNOS gendeletierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei diesen keine Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika möglich war (73). Eine eingeschränkte NOS-Aktivität ist ein typisches Merkmal der endothelialen Dysfunktion, wie sie zum Beispiel bei Atherosklerose vorkommt.

Aufgrund der hohen Prävalenz dieser Erkrankung in unserer Gesellschaft ist es wichtig, die zugrundeliegenden Mechanismen, welche die Präkonditionierung verhindern und die myokardiale Antwort einschränken, zu entschlüsseln und neue Ansätze zur Kardioprotektion zu entwickeln. Zur genaueren Untersuchung der Präkonditionierung bei atherosklerotischen Organismen wurde ein Krankheitsmodell entwickelt, welches der humanen Atherosklerose möglichst nahekommt.

1.9 Experimentelle Atherosklerose-Modelle

Die Pathogenese sowie mögliche Therapieansätze atherosklerotischer Läsionen wurden bereits an zahlreichen Tierarten erforscht. In Modellen mit Primaten und Schweinen ließen sich durch die Fütterung cholesterolreicher Nahrung atherosklerotische Veränderungen induzieren, welche eine große Ähnlichkeit mit humanen Läsionen aufweisen. Die Limitationen dieser Studien waren bedingt durch die verwendeten Spezies. Die Entwicklung eines genetisch reproduzierbaren murinen Modells der Atherosklerose löste die Probleme und Defizite von Studien mit großen Tierarten und erlaubte sogar Untersuchungen mit großen Fallzahlen, welche für die Entwicklung neuer Therapien notwendig sind (74). Die Maus als Spezies weist naturgemäß hohe HDL-Spiegel und niedrige VLDL- sowie LDL-Spiegel auf.

Genetische Manipulationen beruhen deshalb auf der Unterbindung von natürlicher Lipoproteinregulation und -metabolismus. Allerdings sind die meisten Stämme auch mit verändertem Lipoproteinprofil relativ resistent gegenüber der Entwicklung von Atherosklerose (75). Eine Ausnahme stellt der C57Bl6 Stamm dar. Unter hochkalorischen Diäten kommt es zur Ausbildung vaskulärer Läsionen, welche vor allem auf die Aortenwurzel beschränkt sind (76). Es handelt sich allerdings um sehr kleine Läsionen, welche überwiegend aus Schaumzellen bestehen und keine Anzeichen für eine Beteiligung glatter Muskelzellen aufweisen. Die ersten Versuche

zur Entwicklung eines Diät-induzierten Atherosklerose-Modells zeigten, dass ein zu hoher Gehalt an Fett, Cholesterin und Cholsäure toxisch wirkten und zu Gewichtsverlust der Nager und Erkrankung der Tiere führten. Die Entstehung der atherosklerotischen Veränderungen schien eher Folge eines chronisch inflammatorischen Zustandes (77) zu sein, als durch eine genetische Prädisposition bedingt (74).

ApoE^{-/-} Mäuse

ApoE ist ein Glykoprotein, welches unter anderem in der Leber synthetisiert wird und eine zentrale Rolle im sowohl humanen als auch murinen Fettstoffwechsel einnimmt. Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität an apoB-, apoE-, sowie Chylomikron-Rezeptoren erfolgt die spezifische Aufnahme von apoE enthaltenden Lipoproteinen in die Leber (78). 1992 wurden erstmals apoE^{-/-} Mäuse mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert (74). Diese Mäuse zeigen eine ausgeprägte Hypercholesterinämie und neigen auch ohne hochkalorische Diäten zur spontanen Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen, welche in Lokalisation und Pathogenese vergleichbar mit denen der humanen Atherosklerose sind. Bereits im Alter von 5 bis 6 Wochen kommt es zur Adhäsion von Monozyten an die endotheliale Oberfläche. Mit 6 bis 10 Wochen entwickeln sich fatty streak Läsionen, welche zunächst aus Schaumzellen und immigrierenden glatten Muskelzellen bestehen. Diese entwickeln sich rasch zu Läsionen mit nekrotischem Kern, umgeben von proliferierenden glatten Muskelzellen und variierenden Mengen extrazellulärer Matrix, weiter. Einige inflammatorische Läsionen infiltrieren die Tunica media der Aorta und führen so zur Entstehung von Aneurysmen (79). Unter einer „western-type diet“, welche 21% Fett und 0,15% Cholesterin enthält, verdreifacht sich der Cholesterinspiegel apoE^{-/-} Mäuse. Die Atherogenese wird außerdem enorm

beschleunigt, so dass 10 Wochen alte Tiere, welche die obengenannte Diät für fünf Wochen konsumieren, drei bis viermal größere Läsionen entwickeln als gleichaltrige Mäuse mit Standardfutter (80). Allerdings führt die obengenannte hochkalorische Nahrung nicht nur zu schwerer Hypercholesterinämie, sondern ruft auch eine Insulinresistenz hervor, welche einen Störfaktor bei Untersuchungen zur Atherogenese darstellt (75).

LDLR^{-/-} Mäuse

1993 produzierten Ishibashi et al. mittels gezielter Genmodifikation in embryonalen Stammzellen erstmals eine LDLR^{-/-} Maus (81). Ein Großteil der Lipoproteine, welche an den LDL-Rezeptor binden, wird vom triglyceridreichen VLDL geliefert, welches von der Leber sezerniert wird. Während der Zirkulation im Blut werden zahlreiche Triglyceride durch die Lipoproteinlipase vom VLDL mittels Hydrolyse entfernt und es entsteht das IDL, welches rasch in die Leber aufgenommen wird. Der Grund für die rasche Aufnahme ist, dass IDL den Liganden apoE enthält, welcher eine hohe Affinität am LDL-Rezeptor aufweist. Im Kreislauf verbleibendes IDL konvertiert zu LDL. Dieses wiederum enthält apoB-100, welches nur schwer an den LDL-Rezeptor bindet, weshalb LDL-Partikel über längere Zeit im Blut zirkulieren. Cholesterolreiche Chylomikrone, welche die Liganden apoE und apoB-48 enthalten, können zusätzlich durch den Chylomikron-Reszeptor aufgenommen werden. In Mäusen kommt apoB-48 auch in VLDL vor, weshalb bei funktionslosem LDL-Rezeptor ein Teil der Lipoproteine durch den Chylomikron-Reszeptor aufgenommen werden kann, was zu einem geringeren Anstieg des LDL-Plasmaspiegels führt (81). Während LDLR^{-/-} Mäuse unter einer Standardnahrung (Fett: 4-6%; Cholesterol: < 0,02%) lediglich erhöhte LDL-Spiegel aufweisen, kommt es bei Fütterung einer „western-type diet“ zu großflächigen atherosklerotischen Läsionen, welche mit der Dauer der Fütterung an

Komplexität zunehmen (75). Die „western-type diet“ wirkt allerdings nicht nur proatherogen, sondern führt neben extremer Hypercholesterinämie auch zu weiteren Kriterien des metabolischen Syndroms, wie Adipositas, Hypertriglyceridämie, Hyperinsulinämie sowie Insulinresistenz (82). Auch Haut- und Fellirritationen sowie Steatosis hepatis und Gastritis (83) sind Folgen der hochkalorischen Nahrung (82). Zur Erzeugung atherosklerotischer Organismen wurde in diesen Experimenten ein Tierfutter gewählt, welches einen Gesamtfettgehalt von 4,5 % und einen Cholesteringehalt von 1% aufweist. Untersuchungen haben gezeigt, dass eher die Menge an Cholesterol als der Gesamtfettgehalt die atherogene Hauptkomponente darstellt (75).

1.10 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir zum einen, ob sich RIPC im in vivo Herzinfarktmodell der Maus umsetzen lässt sowie das Ausmaß der Infarktreaktion durch RIPC im Vergleich zu einer Präkonditionierung mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran. Des Weiteren sollte die kardioprotektive Wirkung der RIPC in atherosklerotischen Organismen gemessen werden. Dazu wurden LDLR^{-/-} Mäuse über einen längeren Zeitraum mit hochkalorischer Nahrung gefüttert. Durch Messung der endothelialen Dysfunktion im Organbad und die Anfertigung histologischer Schnitte sollten atherosklerotische Veränderungen nachgewiesen werden. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Hypothesen zu testen, dass Remote ischemic Preconditioning keine kardioprotektive Wirkung in atherosklerotischen Organismen hat.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsgenehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde unter dem Aktenzeichen 54-2532.1-18/14 genehmigt.

2.2 Durchführung der Untersuchungen

2.2.1 Versuchstiere

Man verwendete männliche C57BL6N Mäuse, welche zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 8 Wochen alt waren und ein Gewicht von 20-25 g hatten. Für die experimentellen Untersuchungen mit atherosklerotischen Organismen fütterten wir männliche LDLR^{-/-} Mäuse (Stamm B6.12957-Ldlr tmlHer/J, Stock #002207; Alter 8 Wochen) mit hochkalorischem Futter (SM M-Z, atherogen, +1% Cholesterin, Basis V1124, ohne Extrafett, ssniff Spezialdiäten GmbH) über einen Zeitraum von 14 bis 16 Wochen (82). Bei der Durchführung des Versuchs betrug ihr Gewicht zwischen 25 und 35 g. Beide Mäusestämme bestellten wir bei Charles River. Die Tiere wurden nach deren Ankunft in den Tierställen des Universitätsklinikums untergebracht, wo sie feste Nahrung und Wasser ad libidum erhielten.

2.2.2 Geräte, OP-Besteck und andere Materialien

Siehe Anhang

2.2.3 Medikamente, Chemikalien und andere Puffer

Natriumpentobarbital (*Merial GmbH*); Heparin-Lösung 800 I.E./ml (*Rotexmedica GmbH*); Evans-Blue-Lösung 5% (*Sigma -Aldrich®*); Triphenyltetrazoliumchlorid (4%; *Sigma-Aldrich®*); Phosphatpuffer (ph 7,4); Formaldehyd-Lösung 4% (*AppliChem*); KREBS-Lösung (95% O₂, 5% CO₂); Noradrenalin (*Sigma-Aldrich®*); Acetylcholin

(Sigma-Aldrich®); L-NAME Hydrochloride (Sigma-Aldrich®); Natrium Nitroprussid Dihydrat (Sigma-Aldrich®)

2.2.4 Narkose und Vorbereitung

Die Narkose wurde mit einer Injektion von 60 mg/kg Natriumpentobarbital unter das Bauchfell eingeleitet. Nach der Applikation wurden ca. 5 min Einwirkzeit abgewartet, bevor das Versuchstier auf dem OP-Tisch fixiert werden konnte. Die Narkose hielt ca. 90 bis 120 min an, bevor in 15 mg/kg Schritten die Anästhesie weiter vertieft wurde. Das narkotisierte Tier wurde rücklings auf die 3,5 cm x 7,5 cm große Heizplatte des OP-Tisches gelegt und mit dem Gebiss unter einem Gummiband fixiert. Dem Tier war eine eigenständige Regulierung der Körpertemperatur noch möglich, da der Schwanz nicht mehr auf der Wärmeplatte lag. Eine Fixierung der Maus erfolgte mithilfe von Micropore-Klebestreifen und vier 26 G Kanülen, mit welchen die Pfoten des Versuchstiers auf den EKG-Pads befestigt wurden. Über eine rektal eingeführte Temperatursonde konnte die Körpertemperatur überwacht werden.

2.2.5 Operationsschritte

Tracheotomie

Die Maus erhielt zur Sicherstellung der Atemwege eine Tracheotomie. Dazu wurde ein Hautschnitt von der Kehle bis zum Brustbein durchgeführt. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert, mit einer Pinzette fixiert und mit einer Schere leicht angeritzt, um den Tubus, eine 22 G Kanüle, einführen zu können. Die Kanüle wurde nach erfolgreicher Intubation entfernt und der Katheter an den Beatmungsschlauch angesteckt. Der Tubus wurde außerdem mit einem Doppelknoten fixiert. Dazu wurde unter der Trachea ein ca. 10 cm langer mit NaCl angefeuchteter Faden (Resorba

Seide schwarz H3F 4/0, 1,5 metric) hindurchgezogen. Der Beatmungsschlauch wurde auf dem OP-Tisch mit Tupfer und Klebestreifen fixiert, um beim Bewegen des OP-Tisches eine Extubation zu vermeiden. Das Beatmungsgerät wurde auf einen Fluss von 0,3 l/min Frischgaszufuhr und eine Atemfrequenz von 120/min eingestellt.

Kanülierung der A. carotis

Die Blutdruckmessung und die intraoperative Regulation des Volumenstatus erfolgte über einen in die rechte A. carotis communis eingeführten Katheter, welcher mit einem Druckabnehmer verbunden war. Um Sicht auf die A. carotis zu erlangen, wurden die Tonsillen zur Seite gelegt. Es empfahl sich einen möglichst langen Abschnitt der Arterie freizulegen, um ein stabileres Sitzen des Schlauches zu garantieren und sich die Möglichkeit eines erneuten Punktionsversuchs vorzubehalten. Mittels einer Pinzette wurde das umliegende Gewebe gedehnt und die Arterie vom mitlaufenden N. vagus befreit. Anschließend wurde mit einer Pinzette ein mit NaCl angefeuchteter doppelt gelegter ca. 30 cm langer Faden (Resorba Seide schwarz H1F 6/0, 0,7 metric) unter der Arterie durchgezogen, welcher am Doppelende durchtrennt wurde, so dass zwei Fäden entstanden. Mit beiden Fäden wurde ein Knoten vorgelegt. Der kaudal liegende Knoten wurde in eine Klemme eingelegt und locker nach kaudal gezogen. Der zweite Knoten wurde soweit wie möglich kranial gesetzt, gestrafft und am Tubus fixiert. Durch Ziehen der Klemme nach kaudal, wurde die Arterie gestrafft, um diese mit einer Federschere zu punktieren. Mithilfe eines kleinen Häkchens wurde die Arterie von rechts angehoben. Von links kommend wurde dann mit einer Pinzette der Arterien Schlauch eingeführt, nach kaudal geschoben und gerade ausgerichtet. Danach wurde der kaudal liegende Faden zugeknotet. Eine weitere Fixierung des Arterien Schlauchs erfolgte über ein 0,5cm x 1cm großes Transpore-Stück. Anschließend wurde der Arterien Schlauch

mittels des Transducerspülsystems mit 0,1ml NaCl gespült und die Arterie mit dem Druckabnehmer genullt.

Sternotomie und Eröffnung des Perikards

Zunächst wurde ein Hautschnitt von der linken vorderen Extremität schräg zum Brustbein vorgenommen. Mithilfe einer Pinzette wurde die Haut vom Gewebe gelöst. Der Längs- und Quermuskel wurde mit einem Kauter am Brustbein abgetrennt und zur Seite geklappt. Das über den linken Rippenbogen laufende große Blutgefäß wurde koaguliert und anschließend die erste Rippe durchtrennt. Mit dem Rippenspreizer wurde der Brustraum eröffnet, so dass das Herz im Herzbeutel sichtbar wurde.

Arterienligatur

Der Herzbeutel wurde mit 2 Klammern nach vorne gezogen, so dass das Herz nach vorne verlagert wurde. Das Perikard wurde so weit oben eröffnet, bis das rechte Atrium gut sichtbar war. Mit einem in NaCl getränkten Tupfer wurde über das Herz gestrichen, um die linke hellrot erscheinende Koronararterie sichtbar zu machen. Zur Arterienligatur wurde das Herz mit einem Tupfer nach links kaudal gedrückt und fixiert. Mit der Nadel wurde möglichst weit kranial schräg unterhalb der Arterie eingestochen und das Gefäß mit dem Faden umschlungen (6-0). Der Rippenspreizer wurde gelöst und die Muskelstränge wieder über das Herz gelegt. Über die offenen OP-Stellen wurden zwei Parafilm-Stücke gelegt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.2.6 Versuchsprotokoll

Nach Vollendung der Arterienligatur begann die sogenannte Baseline (BL), eine Zeitspanne, welche dazu diente, dass sich Herzfrequenz (HF) und MAP nach den operativen Eingriffen wieder normalisierten. Die Versuchstiere wurden randomisiert 3

verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet. Alle Tiere erhielten eine Narkose mit Pentobarbital. In der Kontrollgruppe erhielten die Tiere keine Intervention. Die BL dauerte 45 min. Danach folgte eine 45-minütige Koronararterienokklusion (CAO) und eine Reperfusion (REP) von 180 Minuten. In der APC-Versuchsgruppe wurde nach 15 Minuten BL, für 15 Minuten 1,0 (MAC) Sevofluran (SEVO) appliziert und weitere 15 Minuten die Memoryphase (MEM) abgewartet. CAO und REP folgten. Die Versuchstiere der RIPC-Gruppe wurden nach 15 Minuten BL mittels 3 Zyklen, bestehend aus einer 5-minütigen Hinterlaufischämie und jeweils 5 Minuten Reperfusion präkonditioniert. Danach erfolgten CAO und REP. Für die experimentellen Versuche mit LDLR^{-/-} Mäusen wurde das Versuchsprotokoll CON und RIPC verwendet. HF und MAP wurden in allen Versuchsgruppen jeweils nach der BL, CAO sowie nach der 60., 120. und 180. Minute Reperfusion gemessen.

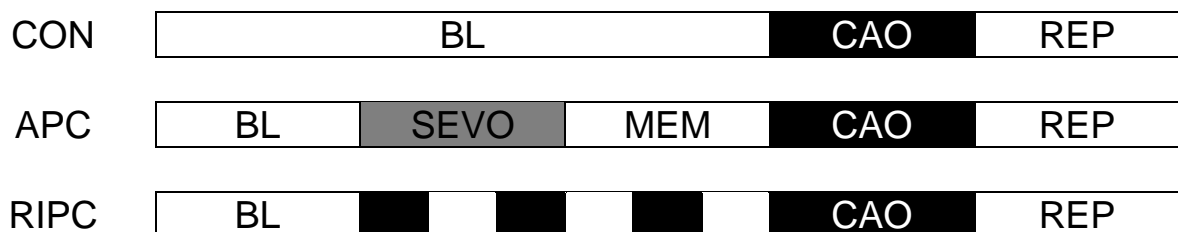


Abbildung 1: Experimentelles Protokoll: CON=Kontrolle; APC=Anästhetika induzierte Präkonditionierung mit Sevofluran; RIPC=Ischämische Fernkonditionierung; BL=Baseline; MEM=Memoryphase; CAO=Koronararterienokklusion; REP=Reperfusion

Hinterlaufischämie

Als Manschette diente ein abgeschnittenes 3 ml Kryoröhrchen, welches über den linken Hinterlauf gezogen wurde. Zwischen Bein und Röhrchen wurde ein 3,0 mm großer Endotrachealtubus eingeführt, welcher mit einer Pumpe verbunden war. Über

diese konnte ein Druck von 2 bar aufgebaut werden, bei welchem die arterielle Durchblutung unterbrochen wurde. Die Pfote der Maus erblasste.

2.2.7 Okklusion der Koronararterie

Auf die Enden des Fadens, mit welchem die linke Koronararterie umschlungen worden war, wurde ein kleiner Tubus aufgefädelt. Danach wurden diese an zwei 2,0 ml Eppendorf-Cups, welche 1 ml NaCl enthielten befestigt. Zu beiden Seiten der Maus wurde eine Sicherheitsnadel in die Korkplatte gesteckt. Zu Beginn der Okklusion wurden die Cups über die Nadeln gehängt, so dass diese frei in der Luft hingen. Dadurch wurde der Tubus auf die Arterie gedrückt und die Blutzufuhr unterbrochen. Am EKG zeigte sich zu Beginn eine ST-Hebung. Der linke Ventrikel erschien blasser und die Blutgefäße traten dunkler hervor. Zum Beenden der Okklusion wurden die Cups gleichmäßig angehoben und auf dem Operationstisch abgelegt. Die Fäden wurden von den Eppendorf-Cups gelöst und der Silikon-Tubus mit einer Pinzette entfernt. Die Reperfusion des linken Ventrikels setzte wieder ein und das EKG normalisierte sich.



Abbildung 2: Versuchsaufbau des in vivo Herzinfarktmodells.

2.2.8 Beendigung des Experiments

Herzentnahme

Der Versuch wurde mit der Herzentnahme beendet. Die Applikation von 0,35 ml Heparin über den Arterienkatheter führte zur Lyse von Thromben, welche aufgrund von koaguliertem Blut entstanden waren und machte den Zugang wieder durchgängig. Der bereits vorgelegte Doppelknoten wurde zugezogen und damit die Durchblutung über die linke Koronararterie irreversibel gestoppt. Das anschließend über den Arterienkatheter gegebene Evans-Blue (1 ml) verteilte sich im Körper der Maus. Mit einer Pinzette wurde das Herz am Gefäßstrang gegriffen und leicht angehoben. Mit einer Schere wurde der Gefäßstrang oberhalb der Pinzette durchtrennt und das Herz aus dem Brustkorb entnommen.

Entfernung des rechten Ventrikels

Das Herz wurde mit einer Kanüle so am Apex fixiert, dass der rechte Ventrikel nach oben zeigte. Nach einer Spülung des Herzens mit NaCl, um restliche Farbe zu entfernen und bessere Sichtverhältnisse zu schaffen, wurden mithilfe einer Federschere die Vorhöfe entfernt. Anschließend glitt man mit einer Pinzette in den rechten Ventrikel, hob ihn leicht an und schnitt dann entlang des Septums keilförmig auf den Apex zu.



Abbildung 3: Präparation des rechten Ventrikels am murinen Herz

Anfertigung der Herzschnitte

Der linke Ventrikel wurde in einen Schneideblock gelegt und für 30 min bei -20°C gefroren. Währenddessen befanden sich ca. 10 Eppendorf-Cups mit 1 ml TTC-Lösung im Thermomixer zur Inkubation bei 37°C . Im nächsten Schritt wurden 10 Rasierklingen in den Schneideblock gesteckt und dann gleichmäßig nach unten gedrückt, so dass die linke Herzkammer in 7 bis 8 Scheiben geschnitten wurde.

Nach Befüllung der Eppendorf-Cups mit dem jeweiligen Schnitt wurden diese nochmals für 25 min. bei 37°C im Thermomixer mit einer Frequenz von 450 pm geschüttelt. Danach legte man die Herzschnitte in Petrischalen und bedeckte sie mit 4%igem Formaldehyd, um ein Austrocknen über Nacht zu vermeiden und die Schnitte zusätzlich flach zu drücken.

Fotografieren der Schnitte

Am Folgetag wurden die Schnitte gewogen und die Werte notiert. Anschließend legte man sie geordnet vom Apex bis zur Basis von links nach rechts auf einen Objektträger. Ein zweiter Objektträger wurde darüber platziert und zwischen die Glasplättchen so viel Natriumchlorid gespritzt, bis alle Schnitte umspült waren. Die Objektträger wurden auf schwarzes Tonpapier gelegt und mit einer Schwanenhalslampe bestrahlt. Die Hälse der Lampe wurden so eingestellt, dass die Kegel fast kongruent überlappten und so den jeweiligen Schnitt gut beleuchteten. Die Fotos wurden über ein Doppelmikroskop angefertigt, an welchem eine Kamera (Canon EOS 500D) angeschlossen war. Das Mikroskop war auf eine 25-fache Vergrößerung eingestellt. Die Kameraeinstellungen waren P; Selbstauslösende Reihenaufnahme mit einer Wartezeit von 2 Sekunden. Der Selbstauslöser wurde verwendet, um eine Unschärfe der Bilder, die durch die Berührung der Kamera entstehen hätte können, zu vermeiden. Bei jedem Schnitt wurde das Bild mithilfe des Feinregulators scharf gestellt. Um beide Seiten fotografieren zu können wurde das Objektträgerkonstrukt gewendet, indem man mit einer Pinzette zwischen Tonpapier und Objektträger fuhr und anschließend zügig kippte. Nachdem von jedem Schnitt jeweils von der apikalen als auch der basalen Seite ein Foto angefertigt worden war, wurden die Schnitte in ein mit Formaldehyd befülltes Eppendorf Cup gegeben, mit der jeweiligen Nummer der Maus beschriftet und bei -20°C eingefroren.

2.2.9 Auswertung mit Adobe Photo Shop

Die Fotos wurden mithilfe des Programms Adobe Photoshop Elements 2.0 ausgewertet. Mit dem Auswahlrechteck wurden die Schnitte möglichst knapp zugeschnitten. Über die Funktionen Strg C, Strg N wurde das Bild kopiert und eine neue Datei zur Bearbeitung erstellt. Über Strg V wurde das zugeschnittene Bild eingefügt und über Strg E auf eine Ebene reduziert. Auf das Bild wurde eine Auto-Tonwertkorrektur, eine Auto-Kontrast und eine Auto-Farbkorrektur angewendet. Man erstellte zu jedem Bild drei Ebenen. In Ebene 1 markierte man den linken Ventrikel (LV) blau und sparte dabei Überreste des rechten Ventrikels, Gefäße oder Seitenanschnitte aus. In Ebene 2 wurde die Area at risk (AAR), das von der Ischämie betroffene Areal, mit rot markiert. Zur Area at risk zählten ziegelrot erscheinendes Gewebe, sowie weißes infarziertes Gewebe. In Ebene 3 wurde das Infarktareal (IA), irreversibel geschädigtes Gewebe, mit gelb markiert und blassrosa erscheinende Gebiete gepunktet.

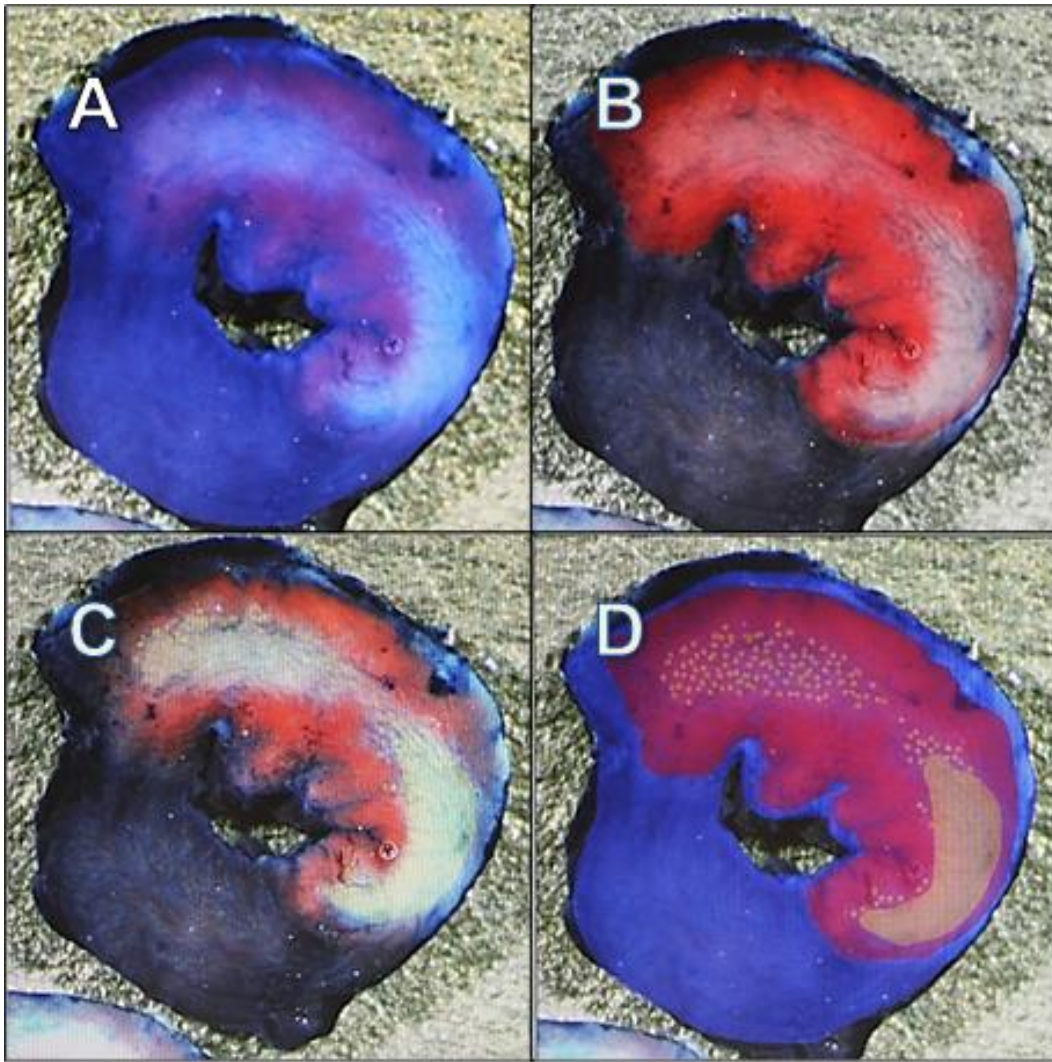


Abbildung 4: Planimetrie der myokardialen Infarktgröße. Digitale Photographien einer mittelventrikulären Scheibe nach Färbung mit Evans Blue und TTC. Infarzierte Areale erscheinen weiß; noch vitales Gewebe innerhalb der Area at risk färbt sich ziegelrot; A: Planimetrie des gesamten linken Ventrikels (blau); B: der Area at risk (rot); C: des infarzierten Gewebes (gelb); D: Übersicht der 3 Markierungsebenen.

2.2.10 Berechnung der Area at risk (AAR) und Infarct size (IS)

Die Pixelwerte des LV, der AAR sowie des IA von der apikalen als auch basalen Seite eines jeden Herzschnitts wurden in eine Exceltabelle übertragen. Zudem wurde das Gewicht des jeweiligen Herzschnitts notiert. Aus diesen Werten ließ sich das Gesamtgewicht des LV, der AAR, sowie des IAs berechnen. Die AAR in % wurde als Verhältnis des Gesamtgewichts der AAR zum Gesamtgewicht des LV angegeben.

Sie gibt also das Ischämieareal in g an. Die IS in % errechnete sich aus dem Verhältnis des Gesamtgewichts des IAs zum Gesamtgewicht der AAR. Analog zur AAR gibt die IS das Infarktareal in g an.

2.3 Untersuchungen zum Nachweis atherosklerotischer Veränderungen

2.3.1 Messung der endothelialen Dysfunktion am Myograph

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Translokation getötet und das mesenteriale Gefäßsystem dargestellt. Es folgte die Präparation zweier Äste dritter Ordnung der A. mesenterica superior. Die Gefäßsegmente wurden nacheinander im Myograph (111P, DMT, Aarhus, Dänemark) zwischen zwei Kapillaren eingespannt und mit oxygenierter KREBS Lösung (37°C; pH=7,4) perfundiert. Die Gefäße wurden unter einem konstanten Druck von 45 mmHg äquilibriert. Alle Versuche folgten dem gleichen Schema. Zwischen der Gabe verschiedener Agentien lag stets eine 40-minütige Auswaschphase mit KREBS-Lösung. Zudem wurde jedes Mal der Ausgangswert des Gefäßlumens bestimmt, bevor eine neue kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen wurde. Für jede Konzentration wurde eine Messung des Lumens sowie der Wanddicke an drei verschiedenen Stellen des Gefäßes unter Verwendung eines kalibrierten Video-Systems vorgenommen und daraus der Mittelwert berechnet. Zu Beginn des Versuchs wurde das Gefäßsegment für 40 Minuten mit KREBS-Lösung gewaschen, damit sich das Endothel von den Einflüssen der Präparation beruhigte. Danach folgte die Messung der Kontraktion der glatten Muskulatur bei 10^{-5} mol/l Noradrenalin (NA) und anschließend die Vasodilatation bei einer AcetylcholinKonzentration (ACh) von 10^{-4} mol/l. Damit sollte geprüft werden, ob der Gefäßabschnitt funktionsfähig und letztendlich geeignet für die folgenden Untersuchungen war. Es folgte die Messung des Gefäßdurchmessers

für aufsteigende Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-4} mol/l NA. Danach wurde nach einer Vorkontraktion mit 10^{-5} mol/l NA die endothel-abhängige Vasodilatation durch Perfusion mit aufsteigenden ACh-Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-4} mol/l) gemessen. Nach einer weiteren 40-minütigen Auswaschphase mit KREBS-Lösung erfolgte die Gabe des NO-Synthase-Inhibitors L-Name in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l. Der Gefäßabschnitt wurde für 20 Minuten inkubiert, um eine irreversible Hemmung der NO-Synthase zu erzielen. Nach einer Vorkontraktion mit 10^{-5} mol/l NA wurde das Segment erneut mit ACh in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-4} mol/l) perfundiert und das vasodilatierte Lumen gemessen. Einer Ausspülphase mit KREBS folgte die Gabe von Natrium nitroprusside (SNP) in einer aufsteigenden Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-2} mol/l, um die endothel-unabhängige Vasodilatation zu bestimmen.

2.3.2 Histologie

Zum Nachweis atherosklerotischer Veränderungen auf Zellebene wurden histologische Schnitte der Aorta der LDLR^{-/-} Mäuse angefertigt. Nach der Herzentnahme (s. oben) wurde die Aorta entlang der Wirbelsäule freipräpariert, exzidiert, halbiert und danach in Formalin (4%) fixiert. In der Pathologie des Uniklinikums Regensburg erfolgte die Einbettung am Einbettautomaten (Typ Excelsior). An der Ausgießstation (Typ Histocenter 3) wurden die Aortenhälften so in Blöcke gegossen, dass diese am Mikrotom quer angeschnitten wurden. Die 5 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei 60 °C zum Trocknen in den Wärmeschrank gelegt. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung in Hämalaun-Eosin nach einem standardisierten Protokoll. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Auswertung der histologischen Schnitte von einer Fachärztin der Pathologie durchgeführt.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mithilfe von SPSS durchgeführt. Die gewonnenen Daten werden in der vorliegenden Arbeit als Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts präsentiert und wurden mit dem Kruskal-Wallis- und Dunn's-Test (RIPC vs. APC vs. CON bei Wildtypmäusen) bzw. dem Mann-Whitney Test (RIPC vs. CON bei LDLR^{-/-} Mäusen) auf Signifikanz ($p < 0,05$) getestet.

3 Ergebnisse

Einhundertelf C57BL6N Mäuse wurden instrumentiert. Insgesamt 43 Tiere wurden aus der Wertung genommen, da 25 Tiere vorzeitige Asystolien entwickelten (21 CON; 2 APC; 2 RIPC), weitere 12 perioperative Komplikationen aufwiesen (12 CON) und zwei Mäuse keine ST-Hebung zeigten (2 CON). Bei 4 Tieren waren die Herzschnitte nicht verwertbar (4 CON). Die verbleibenden 68 Tiere durchliefen den Versuch erfolgreich. Davon wurden 11 Tiere ausgeschlossen, da die AAR weniger als 20 % des linksventrikulären Gewichts betrug (9 CON; 1 APC; 1 RIPC). Eine IS von weniger als 20 % führte bei 6 Mäusen der Kontrollgruppe ebenfalls zum Ausschluss. Für Tiere innerhalb der Interventionsgruppen wurde festgelegt, dass eine IS größer als 45 % zur Exklusion führt. Damit wurden 3 Tiere nicht in die Auswertung mit einbezogen (1 APC; 2 RIPC). Daraus resultiert eine Gruppengröße von 25 Versuchstieren in der Versuchsgruppe CON; 11 Tieren in APC und 12 Tieren in RIPC. In einer weiteren Versuchsreihe wurden 18 LDLR^{-/-} Mäuse präpariert. Insgesamt fünf Tiere schieden vorzeitig aufgrund einer Asystolie aus dem Experiment aus (2 LDL-CON; 3 LDL-RIPC). Drei Tiere der LDL-CON wiesen eine IS von weniger als 20 % auf, was zur Exklusion führte. Damit belief sich die Gruppengröße von LDL-CON auf drei Versuchstiere und LDL-RIPC auf 7 Versuchstiere.

3.1 Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf die Infarktgröße bei C57BL6N Mäusen

Die AAR zeigte keinen signifikanten Unterschied unter den Gruppen. Das von der Ischämie betroffene Areal betrug in allen drei Gruppen zwischen 30 % und 40 % (vgl. Abb. 5). Sowohl APC als auch RIPC zeigten eine signifikante Reduktion der IS zur Kontrollgruppe. Die IS in CON betrug 45,31 +/- 2,61 %. Die Applikation von

Sevofluran reduzierte die Herzinfarktgröße auf 27,11 +/- 3,44 % (p<0,05). RIPC ergab eine IS von 23,74 +/- 4,31 % (p<0,05). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Präkonditionierungsformen festgestellt werden (vgl. Abb. 6).

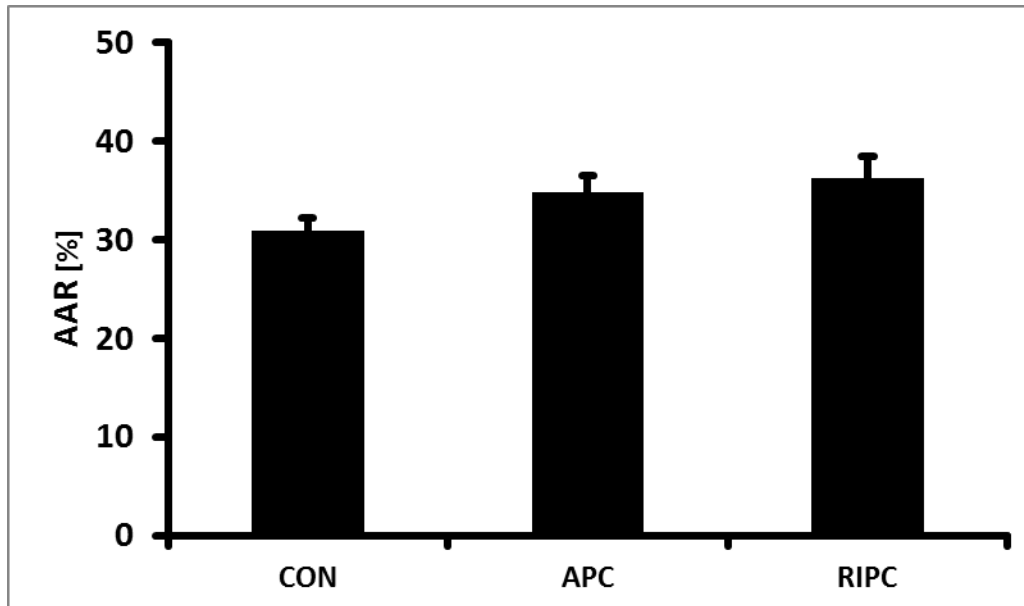


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der AAR am linken Ventrikel;
Angegeben ist Mittelwert +/- SD. CON = Kontrollgruppe (n=25), APC = 1,0 MAC Sevofluran (n=11) und RIPC = 3 x 5 min Hinterlaufischämie (n=12).

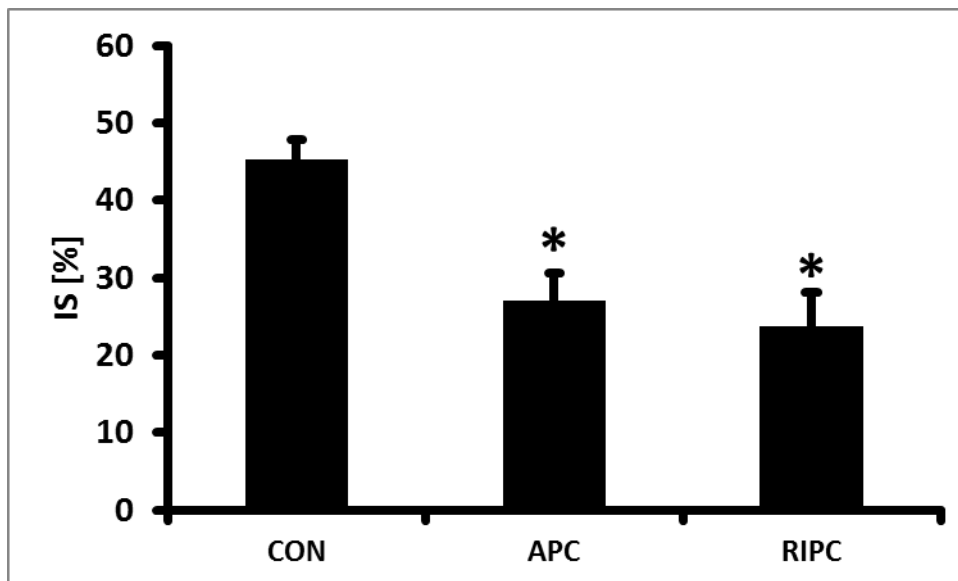


Abbildung 6: Prozentualer Anteil der Herzinfarktgröße an der AAR;

Angegeben ist Mittelwert \pm SD. * Signifikant ($p < 0,05$) verschieden zu CON. CON = Kontrollgruppe (n=25); APC = 1,0 MAC Sevofluran (n=11); RIPC = 3 x 5 min Hinterlaufischämie (n=12).

3.2 Einfluss der Ischämischen Fernkonditionierung auf die Infarktgröße bei LDLR^{-/-} Mäusen

Bei der AAR der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied verglichen zur AAR der ischämisch fernkonditionierten Mäuse (vgl. Abb. 7). Die Herzinfarktgröße der LDLR^{-/-}RIPC-Gruppe, welche 7,70 \pm 1,02 % ($p < 0,05$) betrug, war signifikant kleiner verglichen zur Kontrollgruppe. Diese hatte eine Infarktgröße von 41,17 \pm 2,07 % (vgl. Abb. 8).

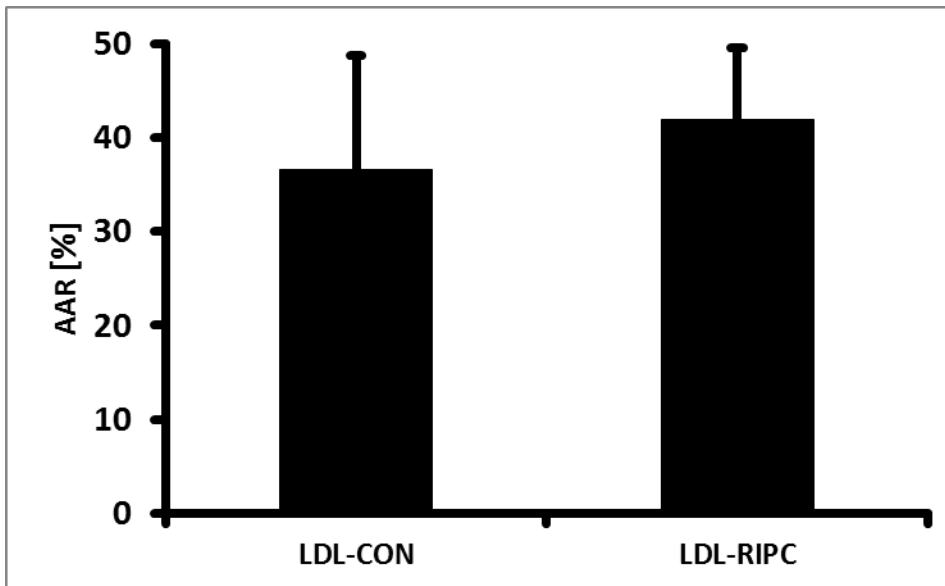


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der AAR am linken Ventrikel;

Angegeben sind Mittelwert +/- SD. LDL-CON = Kontrollgruppe der LDLR^{-/-} Mäuse (n=3); LDL-RIPC = 3 x 5 min Hinterlaufischämie bei LDLR^{-/-} Mäusen (n=7).

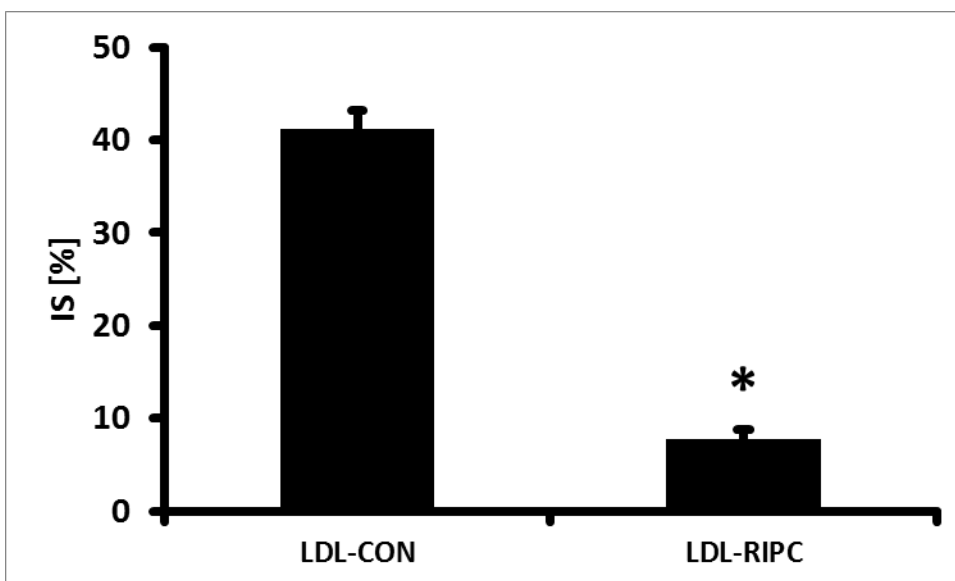


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der Herzinfarktgröße an der AAR;

Angegeben sind Mittelwert +/- SD. *Signifikant ($p < 0,05$) verglichen zu LDL-CON. LDL-CON = Kontrollgruppe der LDLR^{-/-} Mäuse (n=3); LDL-RIPC = 3 x 5 min Hinterlaufischämie bei LDLR^{-/-} Mäusen (n=7).

3.3 Experimente zum Nachweis von Atherosklerose

Zwanzig LDLR^{-/-} Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 14 bis 16 Wochen hochkalorische Nahrung. Um atherosklerotische Veränderungen nachzuweisen, wurde bei zwei Mäusen die endotheliale Funktion am Myographen gemessen. Zudem wurde bei 17 Mäusen die Aorta entnommen, um durch Anfertigung histologischer Schnitte mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Gefäßwand darzustellen.

3.3.1 Messung der endothelialen Funktion

Es wurden 3 Mäuse getötet. Darunter befanden sich zwei 23 Wochen alte LDLR^{-/-} Mäuse, welche zu Lebzeiten mit hochkalorischer Nahrung gefüttert wurden. Eine 8 Wochen alte C57Bl6N Maus stellte die Kontrolle dar.

Noradrenalin vermittelt seine Wirkung über die Bindung an den α 1-Adrenorezeptor, über dessen Stimulation es zu einer Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskulatur und damit zu einer Verengung des Gefäßlumens kommt. Mit aufsteigenden Konzentrationen an Noradrenalin nimmt die Vasokonstriktion zu. Bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l NA ist die maximale Vasokonstriktion der Mesenterialgefäße der C57Bl6N Maus erreicht. Die Gefäße der LDLR^{-/-} Mäuse sind bei 10^{-4} mol/l NA maximal kontrahiert (vgl. Abb. 9). Acetylcholin führt endothelabhängig über eine Freisetzung von NO zu einer Vasorelaxation. Mit steigender Konzentration kommt es zu einer zunehmenden Gefäßerweiterung. Während Acetylcholin in der Kontrollgruppe zu einer Dilatation um 89,2 % gemessen am mit 10^{-5} mol/l NA vorkontrahierten Lumen führt, liegt bei LDLR^{-/-} Mäusen die maximale Vasorelaxation bei 74,1 % des Ausgangswertes (vgl. Abb. 10). L-NAME führt zu einer irreversiblen Hemmung der endothelialen Synthese. Die ACh induzierte Vasorelaxation wird bei einer Vorbehandlung des Mesenterialgefäßes mit einem

eNOS-Blocker abgeschwächt. Es wird eine Relaxation von 74,6 % des vorkontrahierten Lumens erreicht. Dem gegenüber steht eine Vasodilatation um 89,2 % ohne L-NAME (vgl. Abb. 11). Eine Vorbehandlung mit L-NAME zeigt, dass unter Ausschaltung der endothelialen Synthese mittels ACh eine Gefäßerweiterung um 60,3 % vom Ausgangswert möglich ist. Die Wirkung von ACh an den unbehandelten Mesenterialgefäßen von LDLR^{-/-} Mäusen betrug 74,2 % (vgl. Abb. 12). S-Nitroprussid führt als NO-Donator zu einer endothel-unabhängigen Vasodilatation. Sowohl in den Mesenterialgefäßen der C57Bl6N Maus als auch der LDLR^{-/-} Mäuse wird bei einer Konzentration von 10⁻² mol/l SNP eine über 90 %ige Relaxation erreicht (vgl. Abb.13).

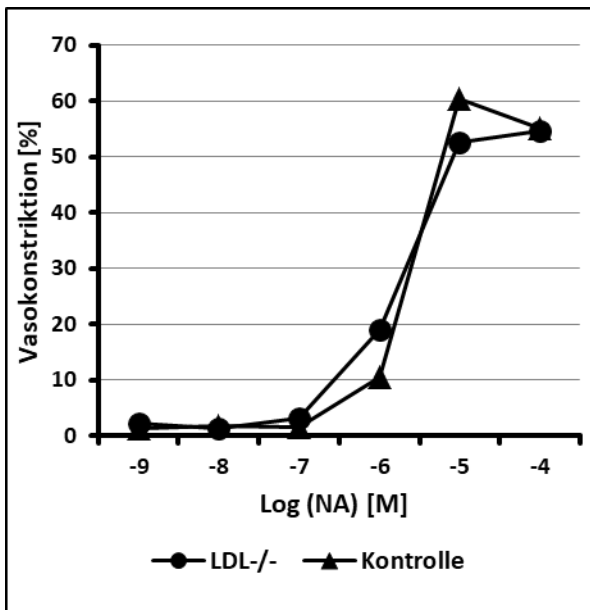


Abbildung 9: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von NA an Mesenterialgefäßen von C57Bl6N oder LDLR^{-/-} Mäusen

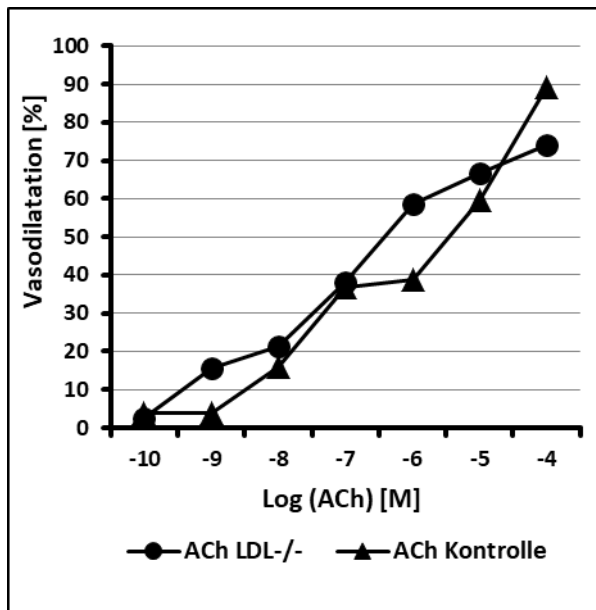


Abbildung 10: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an vorkontrahierten Mesenterialgefäßen von C57Bl6N und LDLR^{-/-} Mäusen

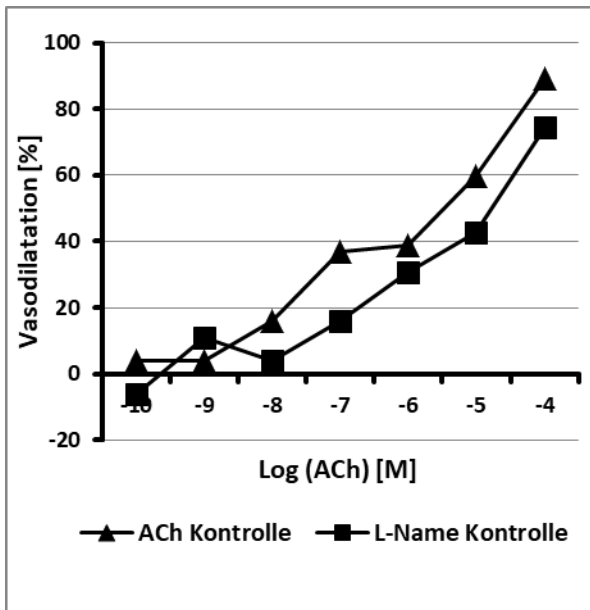


Abbildung 11: Wirkung von ACh an mit L-NAME inkubierten Mesenterialgefäßen im Vergleich zu unbehandelten Mesenterialgefäßen einer C57Bl6N Maus

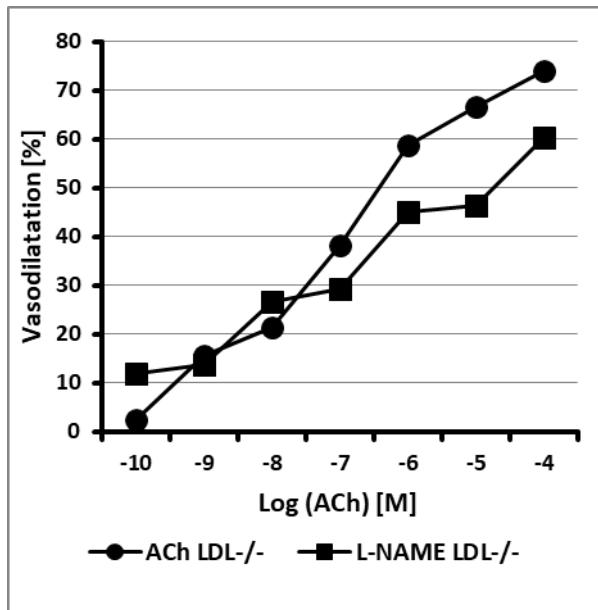


Abbildung 12: Wirkung von ACh an mit L-NAME inkubierten Mesenterialgefäßen im Vergleich zu unbehandelten Mesenterialgefäßen einer LDLR^{-/-} Maus

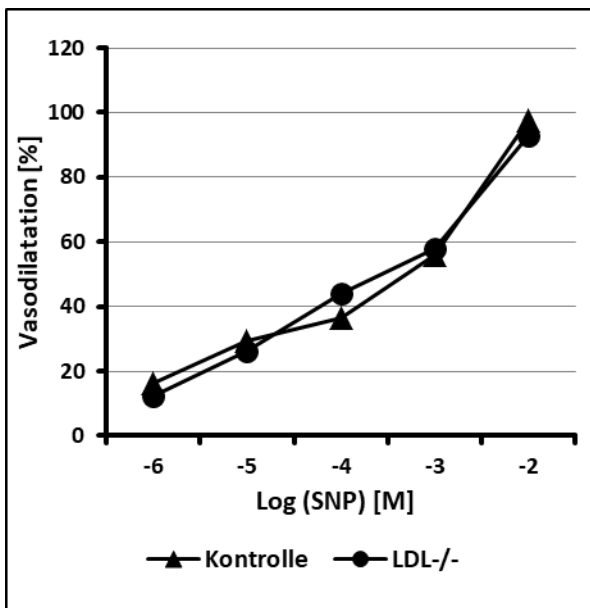


Abbildung 13: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von SNP an vorkontrahierten Mesenterialgefäßen einer C57Bl6N oder LDLR^{-/-} Mäusen

3.3.2 Histologische Schnitte

Bei 17 der LDLR^{-/-} Tiere wurde nach Versuchsdurchführung die Aorta entnommen und mittels HE gefärbten Präparaten lichtmikroskopisch untersucht. Die Auswertung

durch eine Pathologin ergab, dass sich in keinem der angefertigten Präparate Anzeichen einer beginnenden Atherosklerose zeigten (vgl. Abb. 14).

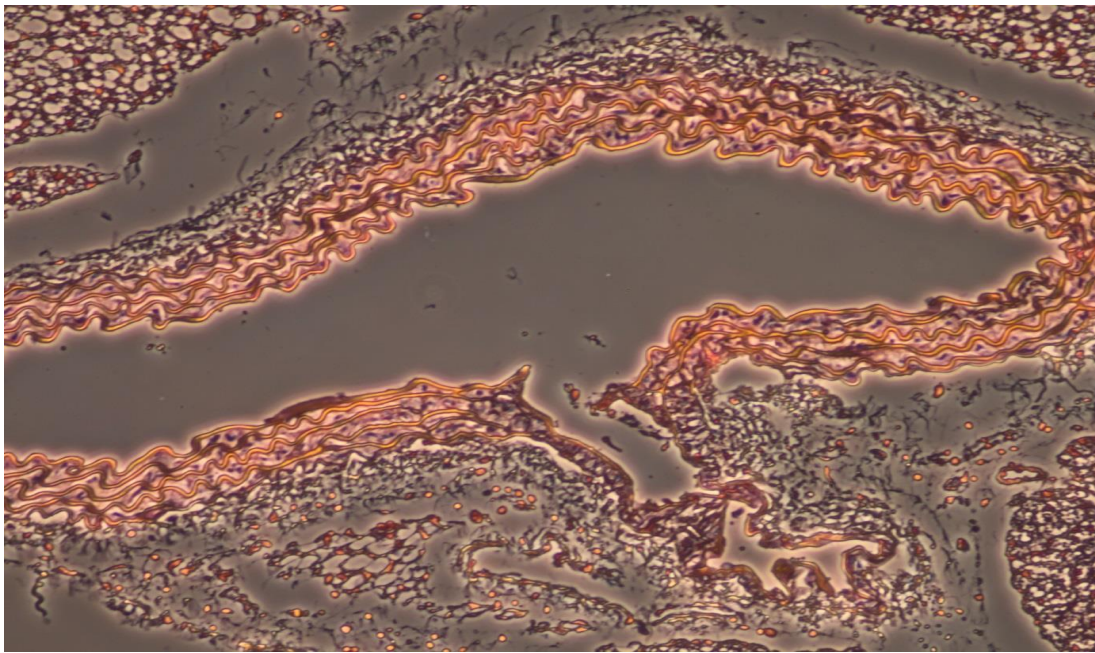


Abbildung 14: Aorta einer LDLR^{-/-} Maus in HE-Färbung

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Hypothese getestet werden, dass Ischämische Fernkonditionierung in atherosklerotischen Mäusen keinen kardioprotektiven Effekt zeigt. Obwohl die Anwendung der RIPC in zahlreichen Tierversuchen zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt (33,35,36,52,84,85), profitieren Patienten im klinischen Setting nur begrenzt von der innovativen Methode (42–45). Studien haben gezeigt, dass junge gesunde Versuchstiere einen größeren Nutzen aus kardioprotektiven Anwendungen zogen, als ältere Tiere (86). Im klinischen Alltag bilden überwiegend ältere Menschen mit zahlreichen Begleiterkrankungen das Patientengut. Dies macht bevorstehende Operationen zu riskanten Eingriffen. In der industrialisierten Welt stellt vor allem die Atherosklerose eine häufige und ernstzunehmende Co-Morbidität dar, welche zu kardiovaskulären Erkrankungen führt. Die Mutmaßung, dass RIPC in atherosklerotischen Organismen nicht kardioprotektiv wirkt, wird durch eine Studie von Redel et al. gestützt. Diese zeigten, dass die Wirkung von Anästhetika induzierter Präkonditionierung mit Desfluran bei eNOS^{-/-} Mäusen aufgehoben war. Während die IS in Wildtyp-Mäusen mittels 15 minütiger Applikation von Desfluran signifikant von 50% auf 10% reduziert wurde, ließ sich in eNOS^{-/-} Mäusen der myokardiale Schaden nicht verringern (73). Man nimmt an, dass die endotheliale Dysfunktion in hohem Maß an der Entstehung von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen beteiligt ist (87). Die endotheliale NO-Synthase, ein Enzym, welches vornehmlich in den Endothelzellen exprimiert wird, ist maßgeblich an der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt (88). NO wiederum wirkt gefäßschützend. Über dessen vasodilatierende Wirkung ist es nicht nur an der Regulation des Blutdrucks beteiligt, sondern beugt auch die Entstehung von Atherosklerose vor, indem es die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen mindert

sowie die Expression pro-inflammatorischer atherosklerosefördernder Gene reduziert (88). Oxidativer Stress, wie er durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie hervorgerufen wird, führt zu einer Entkopplung der eNOS (89). Superoxide reagieren mit NO zu Peroxynitrit (ONOO^-), welches Tetrahydrobiopterin (BH_4), einen für die NO-Synthase essentiellen Cofaktor, oxidiert. Dadurch wird die Reduktion von O_2 von der Stickstoffmonoxid-Synthese entkoppelt und eNOS zu einem dysfunktionalen Enzym, welches reaktive Sauerstoffradikale generiert und damit pro-atherosklerotisch wirkt. Ist das Endothel nicht in der Lage, adäquate Mengen Stickstoffmonoxid herzustellen, liegt eine endotheliale Dysfunktion vor (88). Die Untersuchungen von Redel et al. zeigen, dass in Mäusen mit endothelialer Dysfunktion die kardioprotektive Wirkung von Desfluran aufgehoben ist (73). Dies führt zur Hypothese dieser Arbeit, dass auch RIPC in atherosklerotischen Organismen keine infarkt-reduzierende Wirkung zeigt. Die Experimente dieser Studie wurden am in vivo Herzinfarktmodell der Maus durchgeführt, welches erstmalig Michael et al. beschrieb (90). Letzteres musste zunächst im Labor etabliert werden. Der Versuchsaufbau sowie die Versuchsdurchführung erfolgten analog der Methodenbeschreibung von Redel et al. (91). Die Sicherung der Atemwege erfolgte im Rahmen dieser Studie anstelle einer Intubation unter Sicht mittels Tracheotomie, da diese technisch einfacher durchzuführen war. Der restliche operative Ablauf unterschied sich nicht von der Vorlage. Die Koronarokklusion wurde mit über Metallstangen hängenden, mit 1ml Wasser befüllten Eppendorf-Cups herbeigeführt. Diese Methode bietet einige Vorteile gegenüber einer Okklusion mit zugezogenem Knoten, welcher zu Beginn der Reperfusion wieder gelöst werden muss (92). Während eine Ligatur der linken Koronararterie mittels Knoten ein hohes Risiko für Gewebeverletzungen mit sich

bringt und keine vollständige Unterbrechung des Blutflusses garantiert, kann die Koronarokklusion durch das Anhängen von Gewichten mit hoher Reliabilität durchgeführt werden (91). Die Infarktgrößen wurden von einem Untersucher ausgemessen und ausgewertet. Studien zeigen, dass eine doppelte Messung durch zwei unabhängige Untersucher nicht notwendig ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (91,93). In einer ersten Versuchsreihe wurde die kardioprotektive Wirkung des volatilen Anästhetikums Sevofluran getestet. Gemäß dem Versuchsprotokoll von Redel et al. erfolgte vor einer 45 minütigen Koronarokklusion und anschließender 3 stündiger Reperfusion die Applikation von 1,0 MAC Sevofluran für 15 Minuten (11). Es zeigte sich, dass das volatile Anästhetikum die Infarktgröße auf 27% und damit signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe senken konnte. Diese Daten lassen sich mit denen von Redel et al. bestätigen, welcher durch Anwendung von Sevofluran eine Infarktreaktion von 26 % erzielte (11). Die Reproduktion dieser Ergebnisse zeigt, dass das im Rahmen dieser Studie etablierte Tierversuchsmodell funktioniert. Zur Umsetzung der Ischämischen Fernkonditionierung wurde ein Konstrukt entwickelt, welches die Funktion einer Blutdruckmanschette erfüllen sollte. Hierzu wurde ein 3 ml Kryoröhrchen gekürzt und über den Hinterlauf gezogen. Zwischen hinterer Extremität und Röhrchen wurde ein Tubus eingeführt dessen Ballon mit einer Pumpe verbunden war. Der Ballon des Tubus wurde soweit aufgepumpt bis der auf den Hinterlauf ausgeübte Druck die Durchblutung der A. femoralis unterbrach, was an einem Erblassen der Pfote zu erkennen war. Im Gegensatz zu einer operativen Präparation der A. femoralis mit anschließender Ligatur (33) stellt diese Methode eine kostengünstige, nicht invasive und leicht umsetzbare Alternative dar. Die Wahl des RIPC Zyklus basierte auf den Erkenntnissen von Johnsen et al. (36). Durch Verwendung unterschiedlicher

Versuchsprotokolle, welche bezüglich Zyklusanzahl und Ischämiedauer variierten, wollte dieser den optimalen RIPC-Algorithmus mit der maximalen kardioprotektiven Wirkung entschlüsseln. Es wurden entweder zwei, 4, 6 oder 8 Zyklen über eine Blutdruckmanschette am Hinterlauf von C57Bl/6NTac Mäusen appliziert, bevor eine 25-minütige Ischämie mit anschließender einstündiger Reperfusion des Herzens ex vivo im Langendorff-Modell folgte. Deren Untersuchung ergab, dass vier bis sechs Zyklen eine signifikante Kardioprotektion erreichen können. Eine höhere Anzahl an RIPC Zyklen erzielt keine weitere Infarktreaktion. Die Variation der Dauer der Hinterlaufischämie im RIPC-Protokoll, welche mit zwei, 5 und 10 Minuten pro Zyklus getestet wurde, ergab, dass Zyklen mit je zweiminütiger Ischämie die gleiche infarktreduzierende Wirkung haben, wie Episoden mit je 5 Minuten Hinterlaufischämie. Die Unterbrechung der Blutzufuhr für 10 Minuten pro RIPC Episode schwächte die Wirkung ab. In deren Versuchsprotokolle betrug die Reperfusionsdauer je Zyklus stets 5 Minuten (36). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde ein RIPC-Zyklus bestehend aus jeweils 5 Minuten Ischämie und Reperfusion gewählt. Dieser wurde dreimal hintereinander appliziert, bevor die Indexischämie begann. Die Ergebnisse zeigen, dass RIPC eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion der IS auf 24 % bewirkt. Dies kann mit Daten aus vorhergehenden Untersuchungen bezüglich der kardioprotektiven Wirkung der RIPC bestätigt werden (33,35,36,52,84,85). Damit wurde gezeigt, dass RIPC in diesem Modell funktioniert und die Infarktgröße in dem Maß reduziert werden kann, wie es durch die Applikation von Sevofluran möglich ist. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden kardioprotektiven Strategien. Ein Vergleich der Mittelwerte der AAR von Kontrollgruppe, APC und RIPC zeigt, dass die Werte zwischen 30% und 40% liegen und kein signifikanter Unterschied besteht. Hierzu

muss die linke Koronararterie stets auf ca. gleicher Höhe ligiert werden, was eine hohe operative Qualität in dieser Studie beweist.

Um die Wirkung von RIPC in atherosklerotischen Organismen zu untersuchen, verwendete man LDLR^{-/-} Mäuse, welche über längere Zeit mit hochkalorischem Futter ernährt wurden. Die Anwendung von RIPC ergab, dass die Infarktgröße in LDLR^{-/-} Mäusen verglichen mit der IS der LDLR^{-/-} Kontrollgruppe um 80% und damit signifikant gesenkt wurde. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur Hypothese, dass die Wirkung von RIPC in atherosklerotischen Organismen aufgehoben ist. Bisher existieren keine Daten von vergleichbaren Experimenten, die diese Ergebnisse bestätigen oder widerlegen. Mit dem Wissen um den physiologischen Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose legen die Versuchsergebnisse nahe, dass die Wirkung von RIPC nicht von einer endothelialen Dysfunktion beeinflusst wird. Widersprüchlich hierzu stehen die Studien der Arbeitsgruppe um Abu-Amara. Sechs Zyklen bestehend aus vierminütiger Hinterlauf-Ischämie und vierminütiger Reperfusion, gefolgt von einer Ischämie des Leberlappens von 40 Minuten Dauer und anschließender zweistündiger Reperfusion, konnten in eNOS^{-/-} Mäusen die erhöhten Aminotransferase-Level nicht senken. Auch die positiven Auswirkungen von RIPC auf den histopathologischen und ultrastrukturellen Leberschaden sowie mikrovaskulären Blutfluss, welche sich in Wildtyp-Tieren zeigten, blieben in eNOS^{-/-} Mäusen aus (94). Geht man davon aus, dass die Signaltransduktion von RIPC unabhängig vom Zielorgan gleich abläuft, würde dies die Frage einer Umgehung der eNOS-Synthase aufwerfen. Auch die Tatsache, dass Stickstoffmonoxid wesentlich am Reaktionsweg von RIPC beteiligt zu sein scheint, steht im Widerspruch zu einer eNOS unabhängigen Signaltransduktion (95,96). Stellt man die Hypothese auf, dass RIPC in eNOS^{-/-} Mäusen, welche einen

IRS am Myokard erleiden nicht kardioprotektiv wirkt, müsste man anhand der Versuchsergebnisse dieser Studie annehmen, dass atherosklerotische Organismen über andere Signalwege die endotheliale Dysfunktion kompensieren. Eine weitere Erklärung für das Ergebnis dieser Studie wäre, dass keine bzw. noch keine endotheliale Dysfunktion und folglich keine Atherosklerose vorgelegen hat. Diese Annahme wird durch die Messungen am Myographen bestätigt. Zwar lässt sich erkennen, dass die Vasodilatation bei den LDLR^{-/-} Mäusen im Vergleich zu einer gesunden C57Bl6N Maus leicht eingeschränkt ist, allerdings nicht in dem Maß, wie es zu erwarten wäre. Die Zugabe von Acetylcholin induzierte in der Kontrollgruppe eine Vasorelaxation um 89,2 %. In den LDLR^{-/-} Mäusen betrug das Gefäßlumen 74,1 % des Ausgangswertes. Daraus lässt sich keine endotheliale Dysfunktion ableiten. Die Wahl der LDLR^{-/-} Mäuse sowie der proatherogenen Nahrung basierte auf den Daten von bereits erfolgreich funktionierenden Atherosklerosemodellen anderer Versuchsgruppen (82,97). LDLR^{-/-} Mäuse entwickeln unter Standardnahrung (Fett: 4-6 %, Cholesterol: < 0,02%) milde Läsionen am Aortenstamm oder entlang der Aorta (75). Ihr Cholesterolplasmaspiegel ist unter regulärer Nahrung doppelt so hoch wie der einer C57Bl6N Maus, wobei Cholesterol vor allem in atherogenem LDL gebunden ist und nur geringe Mengen an VLDL vorhanden sind. Auch das humane Lipoproteinprofil ist durch letztgenannte Gegebenheiten gekennzeichnet (81,98). Hartvigsen et al. entwickelten ein Atherosklerosemodell, welches auch ohne Fütterung einer hochkalorischen „western-type diet“ zur Hypercholesterinämie und Entstehung von atherosklerotischen Läsionen in LDLR^{-/-} Mäusen führt. 14 Wochen alte Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 28 Wochen eine mit Cholesterol angereicherte Diät (Fett:4,4%; Cholesterol:1%). Es zeigte sich, dass diese Mäuse keine Nebenwirkungen, wie Leberverfettung, Fellirritationen oder Ulzerationen, wie

es unter „western-type diet“ beobachtet wurde, entwickelten. Trotz signifikant erhöhter Cholesterolaspiegel im Vergleich zu Mäusen mit regulärer Nahrung, waren die Tiere gesund und aktiv (82). Für die Untersuchungen dieser Studie war dies ein wichtiges Kriterium, da mögliche Confounder, wie eine neu aufgetretene Insulinintoleranz vermieden werden sollten. Obwohl das Areal atherosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel signifikant kleiner war verglichen mit Mäusen unter „western-type diet“, konnte trotzdem eine Atherogenese auf moderatem Niveau beobachtet werden (82). Die Ergebnisse dieser Studie beruhen auf Nagern, welche über 14 bis 16 Wochen eine vergleichbare Diät (Fett: 4,5%; Cholesterol: 1%) erhielten. Die Mäuse waren darunter stets aktiv und gesund. In den mit HE gefärbten histologischen Schnitten der Aorten konnten keine für eine Atherosklerose charakteristischen Veränderungen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Mäuse zu früh getötet wurden. Unterschiede bezüglich des Modells nach Hartvigsen bestehen insofern, dass die Mäuse dieser Studie zum Zeitpunkt der Tötung maximal 24 Wochen alt waren, während sich die Versuchstiere der Hartvigsenstudie in einem Alter von 42 Wochen befanden (82). LDLR^{-/-} Mäuse weisen unter Standarddiät auch nach 9 bis 12 Monaten nur minimal ausgeprägte atherosklerotische Läsionen auf (99). Untersuchungen zu Verteilung und Progression atherosklerotischer Veränderungen in LDLR^{-/-}Mäusen ergaben, dass unter hochkalorischer Diät (Fett: 21%; Cholesterol: 0,15%) innerhalb von 0 bis 3 Monaten erste Läsionen im Bereich des Aortensinus, des Aortenbogens und des Truncus brachiocephalicus nachweisbar waren (100). Zwar erhielten die Tiere dieser Studie eine Diät mit deutlich geringerem Fettgehalt. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass aufgrund des Cholesterolgehalts von 1 %, welcher eine der stärksten proatherogenen Komponenten darstellt (75), bereits beginnende atherosklerotische Veränderungen

im Bereich des Aortensinus vorlagen. Allerdings müssen diese Veränderungen noch so gering ausgeprägt gewesen sein, dass diese histopathologisch nicht nachweisbar waren. Demzufolge wäre das Ergebnis der RIPC in LDLR^{-/-} Mäusen nicht überraschend, da zum Zeitpunkt der Präkonditionierung möglicherweise keine Atherosklerose vorgelegen hat und damit die kardioprotektive Wirkung nicht abgeschwächt wurde. Um die Fragestellung dieser Studie weiter zu erforschen sollte in künftigen Untersuchungen z.B. eine längere Fütterungszeit der Versuchstiere eingehalten werden um nachweisbare atherosklerotische Läsionen zu generieren. Die Zusammensetzung des Futters sollte beigehalten werden, da eine „western-type“ ähnliche Nahrung zwar schneller proatherogen wirkt, aber auch zahlreiche Begleiterkrankungen der Tiere mit sich bringt, die die Ergebnisse verfälschen können. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von apoE^{-/-} Mäusen, da diese eine größere Neigung zur Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen aufweisen (79). Eines der Hauptmerkmale der humanen Atherosklerose ist deren Lokalisation unter anderem in den Koronararterien und damit die Entstehung des atherosklerosebedingten Myokardinfarkts. Aus diesem Grund sollte ein Atherosklerosemodell gewählt werden in welchem die Tiere atherosklerotische Läsionen in den Herzkranzgefäßen entwickeln. Allerdings existiert bisher kein Modell, welches ohne Fütterung einer unphysiologischen toxischen Nahrung Läsionen entwickelt, welches in Lokalisation und Stadium der humanen Atherosklerose gleicht (76,101,102). Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte außerdem die Wirkung der Ischämischen Fernkonditionierung in eNOS^{-/-} Mäusen sein, um die im Rahmen dieser Studie neu aufgetretenen Fragen zu klären, insbesondere, ob die der RIPC zugrundeliegende Signaltransduktion die endotheliale Dysfunktion umgeht. Nach Etablierung eines funktionierenden

Atherosklerosemodells sollte außerdem die kardioprotektive Wirkung des Anästhetikums Sevofluran untersucht werden, um dann eine Aussage über die Potenz der verschiedenen kardioprotektiven Strategien in Anwesenheit einer Begleiterkrankung zu treffen.

5 Zusammenfassung

Ischämische Fernkonditionierung bedeutet, dass eine Ischämie eines „entfernten“ Gewebes bzw. Organs eine Konditionierung des Zielorgans auf nachfolgende Ischämien hervorruft und so gewebeschützend wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RIPC im in vivo Herzinfarkt-Modell der Maus untersucht. Drei Episoden bestehend aus einer je fünfminütigen Ischämie und Reperfusion am Hinterlauf der Maus führten zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Resultaten einer Präkonditionierung mit Sevofluran nach gleichem Versuchsprotokoll ergab keinen signifikanten Unterschied. Dies zeigt, dass es sich bei RIPC um eine vielversprechende Form der Präkonditionierung handelt.

Kardiovaskuläre Erkrankungen, die am häufigsten durch atherosklerotische Veränderungen ausgelöst werden, stellen seit vielen Jahren die Haupttodesursache der westlichen Bevölkerung dar. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von RIPC als potente kardioprotektive Strategie in einem Atherosklerosemodell der Maus zu untersuchen. Hierzu verwendeten wir LDLR^{-/-} Mäuse, welche über einen Zeitraum von 14 bis 16 Wochen mit cholesterolhaltiger Nahrung gefüttert wurden, mit dem Ziel der Induktion atherosklerotischer Veränderungen. Die Versuche ergaben, dass mittels RIPC eine zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion des Infarktareals erlangt wurde. Die zum Nachweis der Atherosklerose durchgeführten Untersuchungen ergaben widersprüchliche Resultate. Während eine Messung der Relaxationsfähigkeit der Mesenterialgefäße am Myograph Anzeichen einer eingeschränkten eNOS vermuten ließ, zeigten sich in den mit HE gefärbten Aortenquerschnitten keine Hinweise auf atherosklerotische

Prozesse. Um eine absolute Aussage zur Wirkung von RIPC in mit Atherosklerose erkrankten Tieren treffen zu könne, sollte ein Modell mit stärker ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen gewählt werden. Ebenso wäre eine Untersuchung der Wirkung von RIPC in eNOS^{-/-} Mäusen interessant, um zu erforschen, ob eine bestehende endotheliale Dysfunktion, wie sie auch bei der Entstehung von Atherosklerose beteiligt ist, Einfluss auf die Wirkung der Ischämischen Fernkonditionierung nimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei RIPC um eine potente Form der Konditionierung handelt, die bei Übertragung ins geeignete klinische Umfeld durch ihre ungefährliche schnelle Umsetzung eine zukünftige realistische Strategie zur Kardioprotektion darstellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Spelten O, Rudolph V. Perioperativer Myokardinfarkt. *Intensivmed.up2date*. 2014;10(01):61–74. doi:10.1055/s-0034-1364874
2. Hoeft A., Buhre W., editors. *Anästhesie beim kardiovaskulären Risikopatienten: Grundlagen und klinische Praxis*. Dieselstraße 2, 50859 Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2008. de.
3. Andreas Hoeft WB. *Anästhesie beim kardiovaskulären Risikopatienten: Grundlagen und klinische Praxis*; 2006. de.
4. Bein B, Meybohm P. Perioperative Organprotektion - Organprotektion durch Konditionierung [Organ protection by conditioning]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2010;45(4):254-61; quiz 262. ger.
5. Puelacher C, Lurati-Buse G, Singeisen H, Dang M, Cuculi F, Müller C. Perioperative myocardial infarction/injury after noncardiac surgery. *Swiss Med Wkly*. 2015;145w14219. doi:10.4414/smw.2015.14219
6. Landesberg G, Beattie WS, Mosseri M, Jaffe AS, Alpert JS. Perioperative myocardial infarction. *Circulation*. 2009;119(22):2936–44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.828228
7. Stumpner J, Lange M, Roewer N, Kranke P, Smul TM. Anästhesie und Organprotektion--Perioperative Myokardprotektion bei nicht kardiochirurgischen Eingriffen [Perioperative myocardial protection in non-cardiac surgery]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2015;50(9):546–55. ger. doi:10.1055/s-0041-101995
8. Smit KF, Weber NC, Hollmann MW, Preckel B. Noble gases as cardioprotectants - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*. 2015;172(8):2062–73. doi:10.1111/bph.12994
9. Liu GS, Thornton J, van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84(1):350–6.
10. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res*. 1996;78(6):1100–4.
11. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Lange M, Smul TM, Lotz C, Roewer N, Kehl F. Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234(10):1186–91. doi:10.3181/0902-RM-58
12. FBulluck H, Bulluck H, FHausenloy DJ, Hausenloy DJ. Ischaemic conditioning: are we there yet? *Heart*. 2015;101(13):1067–77. doi:10.1136/heartjnl-2014-306531
13. Hausenloy DJ, Boston-Griffiths E, Yellon DM. Cardioprotection during cardiac surgery. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):253–65. doi:10.1093/cvr/cvs131
14. Laskey WK, Beach D. Frequency and clinical significance of ischemic preconditioning during percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(6):998–1003.
15. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of

- perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(5):985–94. doi:10.1016/j.ejcts.2008.07.062
16. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):377–86. doi:10.1093/cvr/cvn114
 17. Freedman BM, Hamm DP, Everson CT, Wechsler AS, Christian CM2. Enflurane enhances postischemic functional recovery in the isolated rat heart. *Anesthesiology*. 1985;62(1):29–33.
 18. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology*. 2002;96(3):675–80.
 19. Croal BL, Hillis GS, Gibson PH, Fazal MT, El-Shafei H, Gibson G, Jeffrey RR, Buchan KG, West D, Cuthbertson BH. Relationship between postoperative cardiac troponin I levels and outcome of cardiac surgery. *Circulation*. 2006;114(14):1468–75. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602370
 20. Kunst G, Klein AA. Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection - cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac anaesthesia. *Anaesthesia*. 2015;70(4):467–82. doi:10.1111/anae.12975
 21. Lee M, Chen C, Kuo M, Kang P, Lo A, Liu K. Isoflurane preconditioning-induced cardio-protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Anaesthesiol*. 2006;23(10):841–7. doi:10.1017/S0265021506000354
 22. Tritapepe L, Landoni G, Guarracino F, Pompei F, Crivellari M, Maselli D, Luca M de, Fochi O, D'Avolio S, Bignami E, Calabro MG, Zangrillo A. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24(4):323–31. doi:10.1017/S0265021506001931
 23. Landoni G, Greco T, Biondi-Zoccai G, Nigro Neto C, Febres D, Pintaudi M, Pasin L, Cabrini L, Finco G, Zangrillo A. Anaesthetic drugs and survival: a Bayesian network meta-analysis of randomized trials in cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 2013;111(6):886–96. doi:10.1093/bja/aet231
 24. Lurati Buse, Giovanna A L, Schumacher P, Seeberger E, Studer W, Schuman RM, Fassl J, Kasper J, Filipovic M, Bolliger D, Seeberger MD. Randomized comparison of sevoflurane versus propofol to reduce perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery. *Circulation*. 2012;126(23):2696–704. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.126144
 25. Zangrillo A, Testa V, Aldrovandi V, Tuoro A, Casiraghi G, Cavenago F, Messina M, Bignami E, Landoni G. Volatile agents for cardiac protection in noncardiac surgery: a randomized controlled study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011;25(6):902–7. doi:10.1053/j.jvca.2011.06.016
 26. McCafferty K, Forbes S, Thiernemann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech*. 2014;7(12):1321–33. doi:10.1242/dmm.016741
 27. Aimo A, Borrelli C, Giannoni A, Pastormerlo LE, Barison A, Mirizzi G, Emdin M, Passino C. Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences. *World J Cardiol*. 2015;7(10):621–32. doi:10.4330/wjcv.v7.i10.621

28. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893–9.
29. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(2):556–64.
30. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel, M. A., Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193–200. doi:10.1161/01.CIR.94.9.2193
31. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002;74(9):1247–51. doi:10.1097/01.TP.0000032752.61372.36
32. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997;96(5):1641–6.
33. Zhang S, Wang N, Xu J, Gao Q, Lin G, Bruce IC, Xia Q. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology*. 2006;105(3):550–6.
34. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol*. 1997;273(4 Pt 2):H1707-12.
35. Chen X, Wu B, Wang J, Bai T. Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(20):1723–7.
36. Johnsen J, Pryds K, Salman R, Lofgren B, Kristiansen SB, Botker HE. The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(2):10. doi:10.1007/s00395-016-0529-6
37. Kharbanda RK. Transient Limb Ischemia Induces Remote Ischemic Preconditioning In Vivo. *Circulation*. 2002;106(23):2881–3. doi:10.1161/01.CIR.0000043806.51912.9B
38. Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, Di Salvo C, Kolvekar S, Yap J, Lawrence D, Bognolo J, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. *Heart*. 2009;95(19):1567–71. doi:10.1136/hrt.2008.155770
39. Hong DM, Mint JJ, Kim JH, Sohn IS, Lim TW, Lim YJ, Bahk JH, Jeon Y. The effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Anaesth Intensive Care*. 2010;38(5):924–9.
40. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, Price V, Tsagakis K, Neuhäuser M, Peters J, Jakob H, Heusch G. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet*. 2013;382(9892):597–604. doi:10.1016/S0140-6736(13)61450-6

41. Candilio L, Malik A, Ariti C, Barnard M, Di Salvo C, Lawrence D, Hayward M, Yap J, Roberts N, Sheikh A, Kolvekar S, Hausenloy DJ, Yellon DM. Effect of remote ischaemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing cardiac bypass surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart*. 2015;101(3):185–92. doi:10.1136/heartjnl-2014-306178
42. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, Gosling P, Townsend P, Townend JN, Green D, Bonser RS. Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? *Circulation*. 2010;122(11 Suppl):S53-9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.926667
43. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, Musto R, Sherwood R, Desai J, John L, Shah AM, Marber MS, Kunst G. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Res Cardiol*. 2011;106(4):511–9. doi:10.1007/s00395-011-0185-9
44. Young PJ, Dalley P, Garden A, Horrocks C, La Flamme A, Mahon B, Miller J, Pilcher J, Weatherall M, Williams J, Young W, Beasley R. A pilot study investigating the effects of remote ischemic preconditioning in high-risk cardiac surgery using a randomised controlled double-blind protocol. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(3):256. doi:10.1007/s00395-012-0256-6
45. Lucchinetti E, Bestmann L, Feng J, Freidank H, Clanachan AS, Finegan BA, Zaugg M. Remote ischemic preconditioning applied during isoflurane inhalation provides no benefit to the myocardium of patients undergoing on-pump coronary artery bypass graft surgery: lack of synergy or evidence of antagonism in cardioprotection? *Anesthesiology*. 2012;116(2):296–310. doi:10.1097/ALN.0b013e318242349a
46. Pickard JMJ, Botker HE, Crimi G, Davidson B, Davidson SM, Dutka D, Ferdinandy P, Ganske R, Garcia-Dorado D, Giricz Z, Gourine AV, Heusch G, Kharbanda R, Kleinbongard P, MacAllister R, McIntyre C, Meybohm P, Prunier F, Redington A, Robertson NJ, Suleiman MS, Vanezis A, Walsh S, Yellon DM, Hausenloy DJ. Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. *Basic Res Cardiol*. 2015;110(1):453. doi:10.1007/s00395-014-0453-6
47. Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R, Botker HE, Davidson SM, Downey J, Heusch G, Kitakaze M, Lecour S, Mentzer R, Mocanu MM, Ovize M, Schulz R, Shannon R, Walker M, Walkinshaw G, Yellon DM. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(6):677–86. doi:10.1007/s00395-010-0121-4
48. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 2002;55(3):534–43.
49. Heusch G, Botker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(2):177–95. doi:10.1016/j.jacc.2014.10.031
50. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium:

- evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(5):191–200. doi:10.1042/CS20080523
51. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, Przyklenk K. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 2):H2451-7.
 52. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, Redington AN. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005;79(12):1691–5.
 53. Serejo FC, Rodrigues LF JR, da Silva Tavares, Kelly Campos, de Carvalho, Antonio Carlos Campos, Nascimento JHM. Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(4):214–20. doi:10.1097/FJC.0b013e3180325ad9
 54. Helgeland E, Breivik LE, Vaudel M, Svendsen OS, Garberg H, Nordrehaug JE, Berven FS, Jonassen AK. Exploring the human plasma proteome for humoral mediators of remote ischemic preconditioning--a word of caution. *PLoS One*. 2014;9(10):e109279. doi:10.1371/journal.pone.0109279
 55. Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, Chwastyniak M, Tamareille S, Lamon D, Furber A, Pinet F, Prunier F. Apolipoprotein a-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning. *PLoS One*. 2013;8(10):e77211. doi:10.1371/journal.pone.0077211
 56. Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1alpha/CXCR4 signalling axis. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(5):377. doi:10.1007/s00395-013-0377-6
 57. Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, Wei C, Hu P, Kharbanda RK, Redington AN. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(5):423. doi:10.1007/s00395-014-0423-z
 58. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res*. 2002;55(3):583–9.
 59. Leung CH, Wang L, Nielsen JM, Tropak MB, Fu YY, Kato H, Callahan J, Redington AN, Caldarone CA. Remote cardioprotection by transfer of coronary effluent from ischemic preconditioned rabbit heart preserves mitochondrial integrity and function via adenosine receptor activation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(1):7–17. doi:10.1007/s10557-013-6489-2
 60. Kuntscher MV, Kastell T, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, Germann G. Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery*. 2002;22(6):227–31. doi:10.1002/micr.10042
 61. Totzeck M, Hendgen-Cotta U, Rassaf T. Concepts of hypoxic NO signaling in remote ischemic preconditioning. *World J Cardiol*. 2015;7(10):645–51. doi:10.4330/wjc.v7.i10.645
 62. Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, Pluta RM, Hon YY, Grimes G, Partovi K, Pelletier MM, Oldfield EH, Cannon RO3, Schechter AN, Gladwin MT. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects,

- pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation*. 2007;116(16):1821–31. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.712133
63. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff H, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10256–61. doi:10.1073/pnas.0801336105
 64. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(3):450–6. doi:10.1016/j.jacc.2005.04.044
 65. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel, M A, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193–200.
 66. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(5):H1571-6.
 67. Ding YF, Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao*. 2001;53(1):7–12.
 68. Dong J, Liu Y, Ji E, He R. Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Sheng Li Xue Bao*. 2004;56(1):41–6.
 69. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(5):651–5. doi:10.1007/s00395-010-0099-y
 70. Jensen RV, Stottrup NB, Kristiansen SB, Botker HE. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(5):285. doi:10.1007/s00395-012-0285-1
 71. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MMH, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 2004;19(1):143–50. doi:10.1152/physiolgenomics.00046.2004
 72. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;1167. doi:10.1186/1475-2840-11-67
 73. Redel A, Stumpner J, Smul TM, Lange M, Jazbutyte V, Ridyard DG, Roewer N, Kehl F. Endothelial nitric oxide synthase mediates the first and inducible nitric oxide synthase mediates the second window of desflurane-induced preconditioning. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013;27(3):494–501. doi:10.1053/j.jvca.2012.04.015
 74. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(3):503–17.

75. Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(2):242–9. doi:10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17
76. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(1):133–40.
77. Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2572–9. doi:10.1172/JCI116495
78. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258(5081):468–71.
79. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(1):141–7.
80. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;71(2):343–53.
81. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92(2):883–93. doi:10.1172/JCI116663
82. Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, Rafia A, Juliano J, Hökkö S, Steinberg D, Palinski W, Witztum JL, Li AC. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):878–85. doi:10.1161/01.ATV.0000258790.35810.02
83. Laurila A, Cole SP, Merat S, Obonyo M, Palinski W, Fierer J, Witztum JL. High-fat, high-cholesterol diet increases the incidence of gastritis in LDL receptor-negative mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(6):991–6.
84. Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, Redington AN, Nielsen TT, Botker HE. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(3):H1252-6. doi:10.1152/ajpheart.00207.2004
85. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, Macallister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002;106(23):2881–3.
86. Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien P. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl.* 2007;13(3):382–90. doi:10.1002/lt.21100
87. Polovina MM, Potpara TS. Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgrad Med.* 2014;126(2):38–53. doi:10.3810/pgm.2014.03.2739
88. Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its

- pharmacological reversal. *Biol Chem*. 2006;387(12):1521–33. doi:10.1515/BC.2006.190
89. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*. 2012;23(4):222–31. doi:10.5830/CVJA-2011-068
 90. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):H2147-54. doi:10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2147
 91. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, Lange M, Eckle T, Eltzschig H, Roewer N, Kehl F. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(1):84–93. doi:10.3181/0612-RM-308
 92. Eckle T, Grenz A, Köhler D, Redel A, Falk M, Rolauffs B, Osswald H, Kehl F, Eltzschig HK. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2533-40. doi:10.1152/ajpheart.00472.2006
 93. Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 2):H1375-87.
 94. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Fuller B, Seifalian A, Davidson B. Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver. *Liver Transpl*. 2011;17(5):610–9. doi:10.1002/lt.22272
 95. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Mel A de, Tapuria N, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. Nitric oxide is an essential mediator of the protective effects of remote ischaemic preconditioning in a mouse model of liver ischaemia/reperfusion injury. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(6):257–66. doi:10.1042/CS20100598
 96. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res*. 2014;114(10):1601–10. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303822
 97. Temel RE, Rudel LL. Diet effects on atherosclerosis in mice. *Curr Drug Targets*. 2007;8(11):1150–60.
 98. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*. 2014;66(4):1142–74. doi:10.1124/pr.113.008300
 99. Veniant MM, Withycombe S, Young SG. Lipoprotein Size and Atherosclerosis Susceptibility in Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(10):1567–70. doi:10.1161/hq1001.097780
 100. Ma Y, Wang W, Zhang J, Lu Y, Wu W, Yan H, Wang Y. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. *PLoS One*. 2012;7(4):e35835. doi:10.1371/journal.pone.0035835
 101. Gonzalez L, Yu P and Trigatti BL. Mouse Models of Coronary Artery Atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Disorders*. 2016;3(1):1021.

102. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994;93(5):1885–93. doi:10.1172/JCI117179

Anhang

Geräte	
Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Analysenwaage Sartorius Typ. BP.2215	Sartorius
Canon EOS 500D	Canon
EKE Kaltlichtreflektor 21V 150W GX5.3 Osram 93638	Osram
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf
IL GEM Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH
KL 1500 LED	Schott
Leica M 651 Stereomikroskop	Leica
LogiCal® Pressure Monitoring System	Smiths medical
Microm HM 340E	Thermo Fisher Scientific
OP-Tisch für Mäuse (08321)	KE-Med. Techn. Gerätebau
SAR-830/AP Small Animal Ventilator	CWE Biomedical Electronics
Thermoblock MD mini, D022145	Kisker Biotech GmbH & Co KG
Überwachungsmonitor SC 9000	Siemens

OP-Besteck	
Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Castroviejp with Tungsten Carbide Jaws, No. 12565-14	Fine Science Tools (FST)
Chirurg. Schere, BC325R	Medika Medizintechnik GmbH
Doppelelevatorium n. Freer halbscharf und stumpf, 20cm	Medika Medizintechnik GmbH
Dumont#5, No. 11251-20	FST
Durotip-Praep. Schere, BC252R	Medika Medizintechnik GmbH

Extra Fine Graefe Forceps, No. 11151-10	FST
Halsted-Mosquito curved, No. 13009-12	FST
Hardened Fine Iris Scissors, No. 14090-11	FST
Low Cost Cautery Kit, No. 18010-00	FST
Replacement tip angled, No. 18000-02	FST
Retractor Goldstein, No. 17003-03	FST
Schwartz Micro Serrefines straight, No. 18052-01	FST
Small vessel Cauterizer, No. 18000-00	FST
Spring scissor straight, No. 15000-10	FST

Andere Materialien	
Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Acrylic Mouse Heart Slicer [HSMA001-1]	Zivic Instruments Pittsburgh
BD Microlance 3, 22G 1 ¼"-Nr.12, REF 300900	BD GmbH
BD Microlance Kanüle 26 G	BD GmbH
BD Neoflon TM Veneverweilkatheter mit Flügeln, 26G, REF 391349	BD GmbH
Bügelklinge mit Griffschutz, SIH1	A. Hartenstein GmbH
Cryoröhrchen mit Innengewinde, E312.1	Roth
Deckgläser rechteckig 24x60mm	A. Hartenstein GmbH
Gewebeklebeband 19mm Schwarz, K19S	A. Hartenstein GmbH
KIMBERLY-CLARK MICROCUFF Endotracheal Tube, Paediatric Oral/Nasal Magill, 3.0mm	Kimberly-Clark* Healthcare
Monovette® 1ml LH, 05.1146	Sarstedt AG & Co.
Multi-Adapter, 14.1205	Sarstedt AG & Co.
Omnican® F, 1ml	Braun B. Melsungen AG

Omnifix®-F Duo	Braun B. Melsungen AG
Parafilm M 38m×10cm, PF10	VWR International GmbH
PE tubing PORTEX® SX01	A. Hartenstein GmbH
PE tubing PORTEX® SX05	A. Hartenstein GmbH
Petrischalen, Standart 35mm, EL46-1	Roth Carl GmbH & Co KG
pH-Seide K802H	Johnson & Johnson Medical GmbH
Prolenefaden 5-0 8686H	Johnson & Johnson Medical GmbH
Reaktionsgefäße+Deckel 0,5ml, RK05	A. Hartenstein GmbH
Reaktionsgefäße+Deckel 1,5ml, RK1G	A. Hartenstein GmbH
Seidenfaden 4-4, H3F	Resorba Wundversorgung GmbH + Co
Seidenfaden 6-0, H1F	Resorba Wundversorgung GmbH + Co
Sicherheitsvenenverweilkanüle, 22G, (0,9×25mm)	Braun B. Melsungen AG
Silikonschlauch SS01	A. Hartenstein GmbH
S-Monovette® 9ml K3E, 02.1066.001	Sarstedt AG & Co.
Sugi Saugstreifen Steril, rhombisch, REF31301	Kettenbach GmbH & Co. KG
Wägeschalen, WAE1	A. Hartenstein GmbH
Wägeschalen, WAE2	A. Hartenstein GmbH
Zellkulturschale, 628960	Greiner Bio-One GmbH

Danksagung

Ein recht herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. A. Redel für die Überlassung des Themas, sein stetes Engagement und insbesondere seine zuverlässige und kompetente Betreuung bei der Erarbeitung meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gebührt der medizinischen Fachangestellten Frau Gabriele Bollwein und dem Leiter des Labors Herrn Dr. Michael Gruber für die hervorragende Zusammenarbeit, ihre tatkräftige Unterstützung und ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD. Dr. A. Redel für das freundliche Arbeitsklima.

Der herzlichste Dank gilt meinen Eltern Michaela und Martin Eglmeier, welche mir dieses Studium ermöglicht haben und mich während dieser Zeit stets unterstützt haben.

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Doktorarbeit alleine und ohne fremde Hilfe erstellt habe.

Seubersdorf, den 05.01.2019

Kathrin Eglmeier

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kathrin Maria Eglmeier
Anschrift: Bahnhofstraße 2, 92358 Seubersdorf
Geburtsdatum: 20.02.1993
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1996 – 2000 Grundschole Seubersdorf
2000 – 2011 Gymnasium Parsberg
01.07.2011 Abitur (Note 1,0)

Universitäre Ausbildung

10/2011 - 06/2018 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg
21.08.2013 1.Staatsexamen (Note 3,0)
06.04.2017 2.Staatsexamen (Note 3,0)
05.06.2018 3.Staatsexamen (Note 1,0)

Seubersdorf, den 05.01.2019

Kathrin Eglmeier