

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Norbert Roewer

**Die Rolle der Calcium/Calmodulin Kinase II in der Desfluran-induzierten
Präkonditionierung und der Kardioprotektion durch Metoprolol**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Verena Schnupp

aus Grünsfeld-Zimmern

Würzburg, Juni 2010

Referent: Prof. Dr. med. F. Kehl

Koreferent : Prof. Dr. med. N. Roewer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2010

Die Promovendin ist Ärztin

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Betarezeptoren	- 1 -
1.1.1	Calcium/Calmodulin Kinase	- 2 -
1.2	Betablocker und Kardioprotektion	- 4 -
1.3	Präkonditionierung	- 5 -
1.3.1	Ischämische Präkonditionierung	- 5 -
1.3.2	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung	- 7 -
1.3.3	Klinische Studien	- 10 -
1.4	Fragestellung	- 12 -
2	Material und Methoden	- 13 -
2.1	Durchführung der Untersuchung	- 13 -
2.1.1	Versuchstiere	- 13 -
2.1.2	Narkose und Beatmung	- 13 -
2.1.3	Präparation	- 14 -
2.1.4	Induktion der myokardialen Ischämie	- 15 -
2.1.5	Beendigung des Experimentes	- 16 -
2.1.6	Auswertung des Experimentes	- 17 -
2.2	Experimentelles Protokoll	- 18 -
2.3	Organentnahmen	- 20 -
2.3.1	Protokoll zur Organentnahme	- 20 -
2.4	Molekularbiologische Untersuchungen	- 20 -
2.4.1	Herstellung der Lysate	- 20 -
2.4.2	Protein-Bestimmung nach Bradford	- 21 -
2.4.3	Auftrennung der Proteine	- 22 -
2.4.4	Western Blot	- 23 -
2.4.5	Antikörper-Inkubationen	- 25 -
2.4.6	Entwicklung	- 25 -
2.5	Auswertung	- 26 -
2.6	Statistik	- 26 -
3	Ergebnisse	- 28 -
3.1	Hämodynamik	- 29 -
3.2	Herzinfarktgrößen	- 32 -
3.3	CaMK II- und Phospholamban- Proteinexpression	- 33 -
4	Diskussion	- 37 -
5	Zusammenfassung	- 45 -
6	Literaturverzeichnis	- 46 -

Abkürzungsverzeichnis

AAR	area at risk; ischämisches Myokardareal
AC	Adenylylcyclase
APC	anesthetic-induced preconditioning; Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calciumionen
CaMK II	Calcium/Calmodulin Kinase II
CAO	Koronarokklusion
COX 2	Cyclooxygenase 2
DAG	Diacylglycerin
DES	Desfluran
dP/dt _{max}	maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes
EKG	Elektrokardiogramm
g	Gramm
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HR	heart rate; Herzfrequenz
IPC	ischemic preconditioning; Ischämische Präkonditionierung
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
I/R	Ischämie / Reperfusionsschaden
K ⁺	Kaliumionen
k	Kilo-
K ⁺ _{ATP} -Kanäle	ATP-regulierte Kalium-Kanäle
KN-93	selektiver Blocker der CaMK II
l	Liter
LV	linksventrikuläres Gewicht
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure; linksventrikulärer enddiastolischer Druck

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro-
MAC	minimal alveolar concentration; minimale alveoläre Konzentration
MAP	mean arterial pressure; Mittlerer arterieller Blutdruck
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
RPP	rate-pressure-product; Produkt aus HR und Blutdruck
ROS	reactive oxygen species; freie Sauerstoffradikale
RyR	Ryanodin Rezeptoren
Ser	Serin
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Thr	Threonin
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

1 Einleitung

Trotz aller Bemühungen die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu verringern, bleiben perioperative myokardiale Ischämien und Myokardinfarkte die wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Komplikationen und Mortalität. Dies betrifft vor allem Patienten mit einem hohem kardialen Risikoprofil während einer nichtkardialen Operation.¹

Um die Inzidenz dieser Komplikationen zu vermindern, empfehlen die Leitlinien des American College of Cardiologists/American Heart Association die Gabe von Blockern adrenerger Betarezeptoren (Betablocker) als Prophylaxe bei Patienten mit hohem kardialen Risiko.²

Die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) ist eine neuartige und viel versprechende kardioprotektive Strategie zur perioperativen Reduktion der Folgen eines potentiellen ischämischen Schadens und kann möglicherweise zur Verbesserung der perioperativen Patientenbetreuung beitragen.³

Eine kombinierte Applikation von Betablocker und Anästhetika-induzierter Präkonditionierung könnte zusätzliche Vorteile mit sich bringen.

1.1 Betarezeptoren

Die am Herzen für die sympathische Steuerung zuständigen β_1 -adrenergen Rezeptoren sind heptahelikale Transmembran-Rezeptoren, die an ein stimulierendes, heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt sind. Diese Proteine aktivieren die Adenylylcyclase (AC), welche die Biosynthese des second messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. (Abbildung 1) Dieser aktiviert die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA), welche unter anderem sarkolemmale L-Typ Ca^{2+} -Kanäle⁴, Phospholamban (PLB) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR)⁵, Ryanodinrezeptoren⁶ und die Myofilamente Troponin I und C⁷ phosphoryliert. Dies führt zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom, einer verstärkten Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR und einer verbesserten Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktiven Filamente.⁸ Somit werden die Kontraktilität, die Relaxationsfähigkeit und die Frequenz gesteigert.

Eine Aktivierung β_1 -adrenerger Rezeptoren löst jedoch auch eine alternative Signaltransduktion aus bei der die Calcium/Calmodulin Kinase II (CaMK II), unabhängig von dem klassischen cAMP/PKA- Signaltransduktionsweg, aktiviert wird.⁹ Sowohl die PKA als auch die CaMK II zielen auf viele gemeinsame Proteine im Ca^{2+} -Haushalt. Die CaMK II wirkt bei längerdauernder Aktivierung proapoptotisch.⁹ Eine Aktivitätsblockade der CaMK II schützt Myozyten vor einer β_1 -adrenerg vermittelten Apoptose wohingegen die Blockade der PKA keinen Einfluss darauf hat.⁹⁻¹¹

1.1.1 Calcium/Calmodulin Kinase

Calmodulin fungiert als intrazellulärer Ca^{2+} -Rezeptor und besteht aus einer Polypeptidkette mit vier hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen.¹² Durch gebundenes Ca^{2+} wird Calmodulin aktiviert, bindet die zugehörige Kinase und durchläuft eine Konformationsänderung.¹³

Wenn kein Ca^{2+} /Calmodulin vorhanden ist, ist das Enzym inaktiv, da es zu einer allosterischen Blockade der katalytischen Domäne durch die autoinhibitorische Region kommt. Bei steigendem intrazellulärem Ca^{2+} -Gehalt bindet der Ca^{2+} /Calmodulin Komplex an die regulatorische Domäne und aktiviert die Kinase. Das aktivierte Enzym kann sich an der Stelle Threonin (Thr) 287 autophosphorylieren¹⁴ und auf diese Weise die Aktivität verlängern^{15,16}. Um komplett deaktiviert zu werden, muss die autophosphorylierte CaMK II durch Phosphatasen dephosphoryliert werden.¹⁷

Die CaMK II wurde zunächst im zentralen Nervensystem entdeckt. Erst später konnte gezeigt werden, dass sie auch im Herzen, vorwiegend als CaMK II $_{\delta}$, vorkommt.^{17,18} Hier besteht die physiologische Bedeutung dieser Kinase darin, den Ca^{2+} -Haushalt und somit die Elektromechanische Kopplung zu regulieren. Während eines Aktionspotentials strömt Ca^{2+} über spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Dihydropyridin Rezeptoren) in den Kardiomyozyten ein. Dieses Ca^{2+} triggert über Ryanodin Rezeptoren (RyR) die Ca^{2+} -abhängige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Diese Ionen binden daraufhin an Troponin C und führen so zur Kontraktion der Myofilamente während der Systole.¹⁹ Die CaMK II ist dabei für die Feineinstellungen der

elektromechanischen Kopplung wichtig²⁰, indem sie zunächst über L-Typ-Ca²⁺-Kanäle den Ca²⁺-Einstrom reguliert²¹.

Des Weiteren wirkt die CaMK II auch auf die Ryanodin Rezeptoren ein. Durch die CaMK II abhängige Phosphorylierung, wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR2 für Ca²⁺ erhöht.^{22,23} Dieses eingeströmte Ca²⁺ aktiviert während der Systole Myofilamente, die für Kontraktionen verantwortlich sind.

Für die Relaxation des Myokards während der Diastole, muss ein großer Teil des zytosolischen Ca²⁺ über die Ca²⁺-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) in das SR oder über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher aus der Zelle gepumpt werden.

Die SERCA wird durch unphosphoryliertes PLB inhibiert.²⁴ Sobald PLB PKA abhängig an der Stelle Serin (Ser) 16 oder CaMK II abhängig an Thr 17 phosphoryliert wird, steigt die Aktivität der SERCA und somit auch die Ca²⁺-Wiederaufnahme ins SR, wodurch eine intrazelluläre Ca²⁺-Überladung vermindert wird.⁵

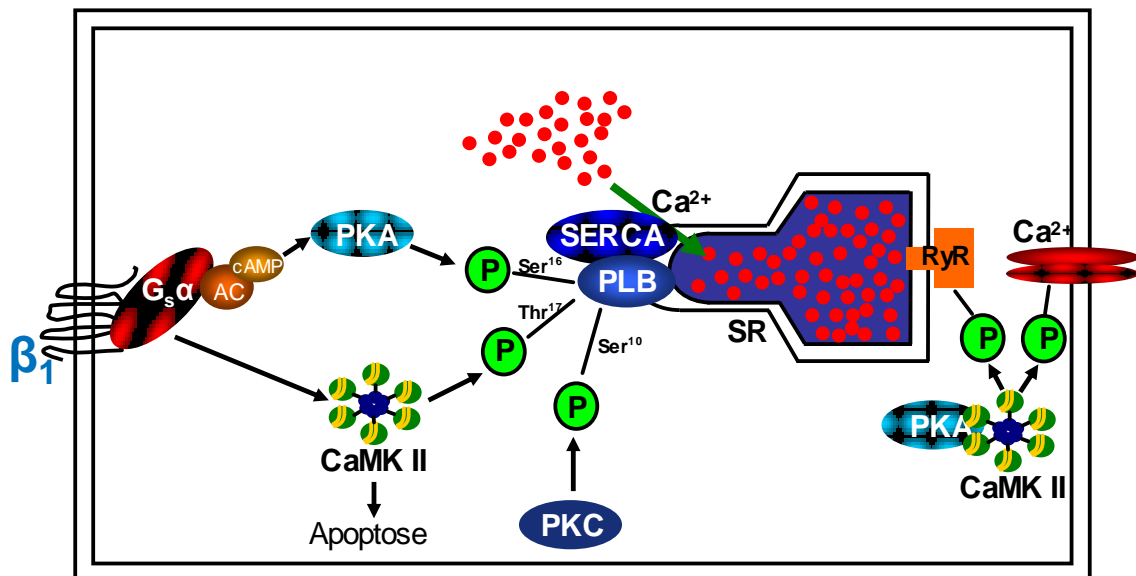


Abbildung 1: Schematische Darstellung des beta-adrenergen Signaltransduktionsweges;

AC Adenylatcyclase; β_1 Beta-1-adrenerger Rezeptor; Ca²⁺ Calciumionen; CaMK II Calcium/Calmodulin Kinase II; cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat; G_s stimulierendes G-Protein; P Phosphorylierungsstelle; PKA Proteinkinase A; PKC Proteinkinase C; PLB Phospholamban; RyR Ryanodinrezeptoren; SERCA Ca²⁺-ATPase des SR;

1.2 Betablocker und Kardioprotektion

Betarezeptorenblocker sind eine weit verbreitete Substanzklasse, die eine kompetitive Hemmung adrenerger Substanzen an β -Rezeptoren bewirken und so den Sympathotonus vermindern. β_1 -selektive Blocker wirken kardioselektiv und senken unter anderem über ein vermindertes Schlagvolumen und eine niedrige Herzfrequenz den Blutdruck und vermindern den Sauerstoffbedarf. Aufgrund einer verlängerten Diastole wird das Sauerstoffangebot erhöht. Somit verbessern diese Medikamente die Sauerstoffbilanz des Herzens.²⁵ Betablocker induzieren jedoch auch weitere, möglicherweise kardioprotektive Mechanismen wie eine Verminderung der Fettsäureakkumulation²⁶ oder Hemmung der Phospholipase A²⁷. Dabei ist Metoprolol der älteste β_1 -selektive Blocker mit einer Wirkdauer von 8-15 h.²⁵ Vor allem kardiale Risikopatienten mit koronarer Herzkrankheit, Hypertonus oder Herzrhythmusstörungen profitieren von einer Betablockermedikation. Auch in der Therapie des Myokardinfarktes sind sie ein wesentlicher Bestandteil um Morbidität und Mortalität zu senken.²⁸ In einer randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Studie wurden an 200 Patienten mit Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit die Effekte des Betablockers Atenolol mit denen eines Placebos verglichen. Dazu erhielten die Patienten vor und nach der Operation sowie während des Krankenhausaufenthaltes das jeweilige Präparat verabreicht. In der Atenololgruppe bestand bis zu zwei Jahre nach der Operation eine verminderte Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen sowie eine verringerte Mortalität.¹ Aber auch andere Studien zeigten, dass eine perioperative Betablockade die Inzidenz kardialer Ischämien bei kardialen Risikopatienten verbessert.^{29,30}

In den Leitlinien des American College of Cardiology (ACC) und der American Heart Association (AHA) wird eine Betablockade bei gefäßchirurgischen Eingriffen für Patienten mit hohem kardialem Risiko empfohlen. Außerdem wird Patienten, die bereits eine Betablockertherapie erhielten eine perioperative Weiterführung der Therapie empfohlen (Empfehlungen der Klasse I).²

In einer anderen Studie wurde zwischen low- und high- risk Patienten gemäß des Revised Cardiac Risk Index³¹ unterschieden und gezeigt, dass nur Patienten der high risk Gruppe von der Betablockertherapie profitieren und eine

niedrigere Krankenhausletalität außweisen.³² In weiteren randomisierten Studien wurde jedoch kein Vorteil durch die Betablockertherapie festgestellt und die Leitlinien in Frage gestellt.³³⁻³⁵

In der randomisierten-kontrollierten POISE Studie wurde auf mögliche Nebenwirkungen einer perioperativen Betablockertherapie hingewiesen.³⁶ Hier erhielten 8315 Patienten mit Risikofaktoren für Atherosklerose 2-4 Stunden vor der Operation bis 30 Tage nach der Operation Metoprolol oder Placebo verabreicht. Dies verringerte in der Metoprololgruppe die Inzidenz des Myokardinfarktes, erhöhte jedoch die des Apoplex und die Letalität.³⁶

1.3 Präkonditionierung

Präkonditionierung ist ein endogener Schutzmechanismus, bei dem kurze Triggerfaktoren wie beispielsweise Ischämien, Medikamente oder Temperaturwechsel die Toleranz von Zellen gegen die Auswirkungen einer konsekutiven passageren Ischämie erhöhen. Dieser Mechanismus ist in Organen mit hohem Energieverbrauch wie dem Gehirn³⁷⁻³⁹, der Lunge^{40,41}, der Leber^{42,43}, der Niere^{44,45} oder dem Herzen^{46,47} beschrieben. Im Herzen bewirkt die Präkonditionierung, dass das Myokard gegen länger dauernde Ischämien unempfindlicher wird, daher werden Funktionsminderungen und Arrhythmien gebessert sowie die Infarktgröße vermindert.

Man unterscheidet generell zwischen Ischämischer Präkonditionierung (IPC) und Pharmakologischer Präkonditionierung. Die Pharmakologische Präkonditionierung kann unter anderem durch Opioide⁴⁸, Adenosin⁴⁹, Katecholamine⁵⁰ und durch volatile Anästhetika⁵¹ induziert werden, hier spricht man von Anästhetika-induzierter Präkonditionierung.

1.3.1 Ischämische Präkonditionierung

Die Ischämische Präkonditionierung wurde im Jahre 1986 erstmals von Murry et al. an Hunden beschrieben.⁴⁶ Bei dieser wegweisenden Untersuchung wurde durch die Vorschaltung von vier Episoden einer jeweils 5 Minuten andauernden Koronarokklusion vor einer 40 minütigen koronaren Okklusion, die Infarktgröße um 75% reduziert. Somit wurde der bisher wirkungsvollste kardioprotektive

Mechanismus entdeckt, der in allen bisher untersuchten Spezies beobachtet werden konnte.⁵²

Die Präkonditionierung verläuft in zwei Phasen. Die frühe Präkonditionierung, das so genannte erste Fenster, hält je nach Spezies bis zu drei Stunden an.⁴⁶ Nach etwa 24 Stunden beginnt ein zweites Fenster. Diese späte Präkonditionierung hält für weitere 48-72 Stunden an.⁵³⁻⁵⁵ Nur in diesen Phasen besteht eine Protektion gegen Ischämien. Während der frühen Präkonditionierung spielt die Aktivierung bereits vorhandener Proteine die entscheidende Rolle, für die späte Phase ist dagegen die Neusynthese kardioprotektiver Proteine charakteristisch.⁵⁶

Es können aber auch kurze, ischämische Stimuli während der frühen Reperfusionphase nach einer koronaren Okklusion die Infarktgröße reduzieren. Dieses Phänomen wird als Postkonditionierung bezeichnet und vermag das Myokard, ähnlich der Präkonditionierung, gegen die Folgen einer Koronarischämie zu schützen.⁵⁷

Die Mechanismen der frühen Präkonditionierung werden vorwiegend über sarkolemmale, an Guaninnukleotid-bindende Proteine gekoppelte Rezeptoren vermittelt, wobei die kaskadenartige Aktivierung verschiedener Mediatoren die entscheidende Rolle spielt.⁵⁸ Dabei tragen insbesondere Proteinkinasen über eine Aktivitätssteigerung oder Translokation, die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS)⁵⁹ und die Aktivierung Adenosintriphosphat-regulierter Kalium-Kanäle (K_{ATP}-Kanäle)⁶⁰ zu einer Infarktgrößenreduktion bei.

Durch die IPC kommt es auch zu einer Optimierung der intrazellulären Calciumhomöostase mit konsekutiv verringerter Funktionsminderung des Myokards infolge des Ischämie/ Reperfusionsschaden (I/R).⁶¹ Die zytosolische Ca²⁺-Überladung wird als einer der Hauptdeterminanten des I/R angesehen, während die kardioprotektiven Effekte der IPC mit einer verstärkten Ca²⁺-Aufnahme ins Sarkoplasmatisches Retikulum korrelieren.⁶² Von der Calcium/Calmodulin Kinase II ist inzwischen bekannt, dass sie die IPC vermittelt.^{62,63} Diese Kinase phosphoryliert Phospholamban vorwiegend während Ischämie und Reperfusion⁶⁴, was eine verstärkte Aktivität der Ca²⁺-

ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums und eine verbesserte Ca^{2+} -Aufnahme ins SR zur Folge hat²⁰.

1.3.2 Anästhetika-induzierte Präkonditionierung

Bereits im Jahre 1988 zeigten Warltier et al., dass sich die Myokardfunktion nach einer 15 minütigen Koronarokklusion bessert, wenn zuvor Halothan bzw. Isofluran verabreicht wurde. Somit konnte eine positive Beeinflussung des myokardialen Stunning durch volatile Anästhetika belegt werden.⁶⁵ Für Halothan⁶⁶ und Isofluran⁶⁷ wurde in den folgenden Jahren erkannt, dass sie durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen eine koronare Vasodilatation bewirken. Außerdem wurde die günstige Beeinflussung des myokardialen Stunning durch Isofluran mit nichtselektiven K_{ATP} -Kanal-Antagonisten wie Glibenclamid aufgehoben.^{68,69} Kersten et al. konnten kurz darauf erstmalig zeigen, dass Isofluran eine Präkonditionierung induzieren kann, dabei sind die Infarktgrößen der Isofluran-induzierten Präkonditionierung mit denen der IPC vergleichbar.⁵¹ Außerdem wurde durch den nichtselektiven K_{ATP} -Kanal-Antagonisten Glibenclamid die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung aufgehoben, was schon auf die fundamentale Rolle der Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen für die APC hindeutet.⁵¹

Inzwischen konnte für alle klinisch relevanten volatilen Anästhetika wie Halothan^{70,71}, Enfluran⁷⁰, Isofluran^{70,71}, Sevofluran⁷¹ und Desfluran⁷¹, eine Präkonditionierung im Tiermodell gezeigt werden. Bezüglich eines optimalen Applikationsprotokolls volatiler Anästhetika in der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung haben Lange et. al gezeigt, dass es für Desfluran eine Schwellendosis gibt, die durch wiederholte Verabreichungen gesenkt werden kann. In dieser Studie lag die Schwelle zur Präkonditionierung im Herzinfarktmodell des Kaninchens für Desfluran zwischen 0,5 und 1,0 minimale alveoläre Konzentration (MAC). Durch die wiederholte Gabe mit dazwischengeschalteten Memoryphasen konnte auch durch subanästhetische Dosen Desfluran eine Kardioprotektion gewährleistet werden. Eine Dosissteigerung über die Schwellendosis hinaus oder eine längerdauernde Applikation zeigten keinen weiteren protektiven Effekt.⁷² Auch Kehl et. al

zeigten, dass eine Erhöhung von Isofluran von 0,25 auf bis zu 1,25 MAC keine weitere Verminderung der Infarktgrößen bewirkte, allerdings machten höhere Konzentrationen des volatilen Anästhetikums die Infarktgrößenreduktion unabhängig vom koronaren Kollateralblutfluss.⁴⁷

Ähnlich der IPC ist auch die APC ein biphasisches Phänomen. An Kaninchen konnte dies zunächst für Isofluran gezeigt werden.^{73,74} Für Desfluran wurde das zweite Fenster genauer untersucht, dabei ließ sich 24, 48 und 72 Stunden nach der Applikation des Anästhetikums eine signifikante Infarktgrößenreduktion nachweisen, die nach 96 Stunden nicht mehr vorhanden war.⁷⁵

Aber auch die Gabe volatiler Anästhetika in der frühen Reperfusionphase reduziert die Infarktgröße.⁷⁶ Dieses Phänomen wird Anästhetika-induzierte Postkonditionierung genannt und konnte von Preckel et al. erstmals 1998 gezeigt werden.^{77,78}

Die Mechanismen des ersten Fensters der APC sind denen der IPC ähnlich. So wird auch die APC durch die Aktivierung von Adenosin-⁷⁹, α -adrenergen-⁸⁰, Opioid-⁸¹ oder Bradykin- Rezeptoren, die mitunter an inhibitorische G-Proteine⁸² gekoppelt sind, vermittelt. Andere G-Proteine aktivieren die Phospholipasen C und D, was die Bildung von Inositol-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. IP₃ setzt über spezifische Rezeptoren Ca²⁺ aus dem SR frei. Sowohl Ca²⁺ als auch DAG, Stickstoffmonoxid (NO) und ROS aktivieren die verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Diese Aktivierung führt zu einer Translokation, welche an der Vermittlung der APC beteiligt ist⁸³, wohingegen die Inhibition der Translokation durch Colchicin die APC inhibiert⁸⁴. Aber auch die Bildung ROS in der mitochondrialen Atmungskette ist ein wichtiger Bestandteil des Signaltransduktionsprozesses der APC, da eine Koadministration von ROS-Fängern die Präkonditionierung verhindert. Außerdem wurde gezeigt, dass durch die Isoflurangabe selbst ROS erzeugt werden.^{59,85,86}

Eine Schlüsselrolle in der Präkonditionierung kommt der Aktivierung sarkolemmaler und mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle zu, denn die Blockade der Kanäle hebt eine Desfluran-induzierte Präkonditionierung vollständig auf.⁸⁷ ROS und PKC sind in der Lage diese Kanäle zu aktivieren. Aber auch NO, das

durch die Aktivierung der NO-Synthase (NOS) durch volatile Anästhetika gebildet wird sowie Prostaglandine, die durch die Cyclooxygenase 2 (COX 2) synthetisiert werden, können die Aktivität von K_{ATP} -Kanäle beeinflussen und spielen somit eine Rolle in der APC. Umgekehrt hebt eine Blockade der NO Synthase⁸⁸ oder der COX 2^{74,89} die APC ebenfalls auf. Auch die verzögerte Öffnung der mitochondrialen „permeability-transition“ Poren (mPTP), welche vermutlich teilweise über K_{ATP} -Kanäle vermittelt wird, ist an der APC beteiligt.⁹⁰ An dem komplexen Netzwerk der APC sind jedoch noch viele weitere Kinasen wie beispielsweise Protein-Tyrosin-Kinase⁸³ oder Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt⁹¹ oder Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)⁹², die vor- nach- und parallel zur PKC geschaltet sind, beteiligt. (Abbildung 2)

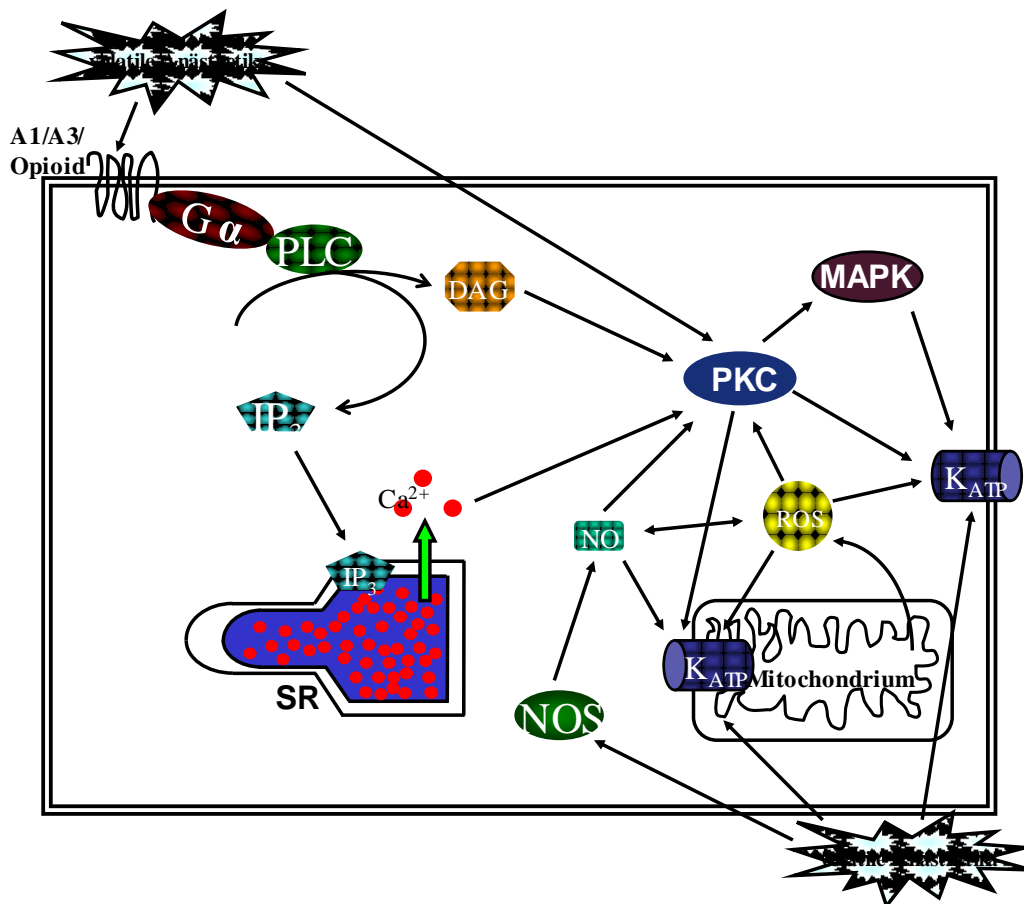


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion der APC; DAG Diacylglycerin; **G α** Guaninnukleotid-bindendes Protein; **IP₃** Inositoltrisphosphat; **K_{ATP}** ATP-regulierte Kalium-Kanäle; **MAPK** Mitogenaktivierte Proteinkinase; **NO** Stickstoffoxid; **NOS** Stickstoffmonoxidsynthase; **PKC** Proteinkinase C; **PLC** Phosphipase C; **ROS** freie Sauerstoffradikale; **SR** Sarkoplasmatisches Retikulum;

Neben den genannten Komponenten ist auch der β -adrenerge Signaltransduktionsweg für die Vermittlung der Präkonditionierung von Bedeutung.^{80,93-95} Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Betarezeptoren die IPC abschwächt.⁹³⁻⁹⁵ Aber auch die APC wurde in Zusammenhang mit der Betablockade untersucht. In einem zellulären Modell simulierter Ischämie an Rattenzellen beeinflusste der Betablocker Propranolol die APC nicht.⁹⁶ In einem anderen Modell an menschlichen Zellen wurden jedoch die günstigen Effekte des Desfluran durch Propranolol aufgehoben.⁸⁰ Lange et al. haben sich erstmals mit der Rolle des β_1 -adrenergen Signaltransduktionsweges in der APC gegen Myokardinfarkt in einer *in vivo* Studie am Kaninchen beschäftigt. In diesem Experiment wurde der β_1 -Rezeptor mit dem kurzwirksamen Betablocker Esmolol blockiert und auf diesem Wege die APC inhibiert.⁹⁴

Auch für die PKA, ein Bestandteil des klassischen β_1 -adrenergen Signaltransduktionsweges, konnte durch Blockade mit dem spezifischen Inhibitor H-89 gezeigt werden, dass diese an der Vermittlung der APC beteiligt ist.⁹⁴ Als ein weiterer Bestandteil der β_1 -adrenergen Signaltransduktion konnte für die CaMK II gezeigt werden, dass sie die IPC vermittelt.^{62,63} Diese reguliert die intrazellulären Ca^{2+} Homöostase und könnte möglicherweise auch in der APC eine wichtige Rolle spielen, dies wurde aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht weiter untersucht.

Da β_1 -Rezeptoren neben den klassischen G_s -Proteinen auch an G_i -Proteine gekoppelt sein können⁹⁷, kann über einen PKC-abhängigen Signaltransduktionsweg die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen vermittelt werden, welche bekanntlich eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der APC spielen.^{51,87}

1.3.3 Klinische Studien

Klinische Studien zur IPC zeigen auch beim Menschen kardioprotektive Effekte. So konnte bei einer wiederholten perkutanen transluminalen Koronarangioplastie gezeigt werden, dass verglichen mit der initialen Ballon-Dilatation (ischämische Episode), die zweite Dilatation mit weniger pektanginösen Beschwerden und weniger ST-Veränderungen einherging.⁹⁸

Außerdem bewirkt eine myokardiale Ischämie in Form einer Angina pectoris vor einem Myokardinfarkt eine geringere Morbidität und Mortalität im Vergleich zu Patienten ohne Präinfarktangina.⁹⁹

Auch für die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung gibt es klinische Hinweise einer Wirksamkeit am Menschen, wobei die meisten Studien bei elektiven Bypassoperationen erfolgten.^{100,101} Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass eine 5 minütige Desfluran Gabe vor der Kardioplegie den Anstieg von Troponin I und NT-pro-BNP, als Marker einer myokardialen Dysfunktion, verminderte.¹⁰² Eine 10 minütige Präkonditionierung mit Sevofluran führt noch ein Jahr postoperativ zu einer Verminderung kardialer Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt oder plötzlichen Herztod.¹⁰¹

De Hert et al. beschäftigten sich mit dem Applikationszeitpunkt und der Applikationsdauer der volatilen Anästhetika. Dabei zeigte sich, dass die Sevofluran-Applikation während der gesamten Operationszeit Vorteile im Bezug auf myokardiale Schädigung und Erholung der ventrikulären Funktion mit sich bringt, wohingegen die Sevoflurangabe während einer Prä- und Postkonditionierungsphase in dieser Arbeit nicht protektiv ist.¹⁰³

Somit werden die positiven Effekte der volatilen Anästhetika deutlicher, wenn man totale intravenöse Anästhesieverfahren mit inhalativen Narkoseverfahren vergleicht. Dazu wurden hauptsächlich Untersuchungen an Patienten mit herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Extrakorporalzirkulation durchgeführt. Diese haben ergeben, dass sich bei Desfluran- oder Sevofluran-anästhesierten Patienten die hämodynamischen Parameter schneller normalisierten und der Anstieg des Troponin I geringer war als bei den Patienten unter Propofol Narkose.¹⁰⁴ Des weiteren ist eine Desfluran- oder Sevoflurannarkose mit einem kürzerem postoperativem Intensivaufenthalt und einer kürzeren Krankenhausliegedauer, verglichen mit intravenösen Anästhesieverfahren, assoziiert.¹⁰⁵ In einer großen retrospektiven klinischen Studie wurden an 10535 Patienten, die eine Herzoperation durchliefen, die Effekte von Propofol und Sevofluran verglichen. Dabei zeigte sich, dass Patienten, die kurze Zeit vor der Operation keine instabile Angina pectoris und/oder keinen Myokardinfarkt erlitten unter Sevofluran eine signifikant

niedrigere postoperative Mortalität zeigten.¹⁰⁶ Eine Metaanalyse aus 27 Studien mit 2979 Patienten konnte diese Daten weiter untermauern und bestätigte den Vorteil volatiler Anästhetika gegenüber totalen intravenösen Narkoseregimes bei herzchirurgischen Eingriffen.¹⁰⁷ Bisher konnte jedoch keine Verbesserung der Mortalität oder der postoperativen Infarktrate durch volatile Anästhetika nachgewiesen werden.¹⁰⁸

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit wurde die bislang unbekannte Rolle der Calcium/Calmodulin Kinase II in der Vermittlung der Desfluran-induzierten Präkonditionierung und in der durch den Betablocker Metoprolol vermittelten Kardioprotektion untersucht. Außerdem wurde die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung in Kombination mit der Betablockade durch Metoprolol untersucht. Dazu wurde ein in vivo Herzinfarktmodell des Kaninchens verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothesen zu testen, dass

1. die Blockade der CaMK II die Desfluran-induzierte Präkonditionierung verhindert.
2. die Kardioprotektion durch Metoprolol dosisabhängig ist.
3. Metoprolol dosisabhängig die Desfluran-induzierte Präkonditionierung des Herzens blockiert.

2 Material und Methoden

2.1 Durchführung der Untersuchung

2.1.1 Versuchstiere

Gemäß dem Tierschutzgesetz über Versuche an lebenden Tieren wurde ein Antrag bei der zuständigen Behörde der Regierung Unterfrankens gestellt, welche die Tierversuchsgenehmigung erteilte.

Die Durchführung der experimentellen Untersuchung erfolgte an männlichen, weißen Neuseelandkaninchen, die neun bis zwölf Wochen alt waren und zwischen 2000 und 2500g wogen.

Diese wurden für etwa eine Woche in den Tierställen des Universitätsklinikums gehalten. Während dieser Zeit erhielten sie feste Nahrung und Wasser ad libidum.

Die für die jeweiligen Untersuchungen benötigten Tiere wurden unmittelbar vor den experimentellen Durchführungen aus den Tierställen geholt.

2.1.2 Narkose und Beatmung

Zur Einleitung der Narkose wurde den Kaninchen eine 24G intravenöse Venenverweilkanüle in die marginale Ohrvene gelegt. Die korrekte intravenöse Lage der Kanüle wurde anschließend durch Spülung mit 0,9%iger Natriumchloridlösung überprüft. Bei sicherer intravenöser Lage erfolgte die Narkoseinduktion mittels Bolusinjektion von Natrium-Pentobarbital (30 mg/kg).

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels kontinuierlicher intravenöser Infusion von 20-30 mg/kg/h Natrium-Pentobarbital über einen Perfusor, der durch einen Dreiwegehahn mit der Venenverweilkanüle verbunden wurde.

Die Anästhesietiefe wurde regelmäßig überprüft, wobei der Palpebral-Reflex bei Berühren der Wimpern und der Fußwegzieh-Reflex bei Druck auf die Zehenzwischenräume der Hinterpfote als Parameter zur Einschätzung der Narkosetiefe dienten. Die Tiere erhielten bei Bedarf zusätzliche Gaben von Natrium-Pentobarbital (10 mg/ml) intravenös als Bolus.

Um eine kontinuierliche, kontrollierte Beatmung der Tiere über den gesamten Versuchsablauf gewährleisten zu können, wurden die Tiere tracheotomiert.

Nach einer ventralen Mittellinien-Inzision wurde die Trachea freipräpariert, so dass sie über eine Länge von etwa 2 cm dargestellt werden konnte. Kranial und kaudal des dargestellten Bereiches wurden zwei Seidenfäden um die Trachea geschlungen. Dazwischen erfolgte die Tracheotomie und es wurde eine Trachealkanüle eingeführt, welche mit beiden Fäden fixiert wurde.

Die Kaninchen wurden während des gesamten Experimentes kontinuierlich unter Verwendung eines Luft-Sauerstoff-Gemisches ($FiO_2 = 0,3$; Air = 0,7; entsprechend 0,5 l/min O_2 und 1l/min Air) druckkontrolliert beatmet (Cicero[®], Dräger, Lübeck, Deutschland).

Der endexpiratorische CO_2 -Partialdruck, der über eine Messsonde (Dräger, Lübeck, Deutschland) kontinuierlich überwacht wurde, wurde durch Anpassung von Tidalvolumen und Atemfrequenz konstant im physiologischen Bereich (30-40 mmHg) gehalten.

Arterielle Blutgasanalysen (ABL 505 Blutgasanalysegerät, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) wurden über den gesamten Zeitraum des Versuches in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Die Blutgasanalysen wurden jeweils am Ende der einzelnen Versuchsperioden (Baseline, Intervention, Memory Okklusion), in der Reperfusionphase stündlich sowie am Ende des Versuchs durchgeführt.

2.1.3 Präparation

Zunächst wurde die rechte Arteria carotis communis über eine Länge von 2 cm von ventral freipräpariert und das kraniale und kaudale Ende des dargestellten Abschnittes jeweils mit einem Seidenfaden umschlungen. Mit dem kaudalen Faden wurde kurzzeitig die Blutzufuhr bis zum Einführen des Katheters in die Arterie unterbunden. Nach einer Inzision der Arteria carotis communis wurde ein mit 0,9% NaCl gefüllter PE 50 Polyethylen-Katheter in die Arterie eingeführt und retrograd in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dieser wurde mit Hilfe der zwei Seidenfäden in seiner Position sicher platziert.

Über diesen Katheter konnte der linksventrikuläre Druck (LVEDP) sowie der maximale Anstieg des linksventrikulären Druckes ($+dP/dt_{max}$) gemessen werden.

Um auch den mittleren arteriellen Druck (MAP) kontrollieren zu können, wurde die rechte Arteria femoralis in eine Länge von 2 cm freipräpariert und nach Inzision ein Katheter über die Arteria femoralis in der Arteria abdominalis platziert (2,5 French, Micro-Tip Catheter, Millar Instruments Inc., Houston, Texas). Auch hier wurde der Katheter in der korrekten Position mit einem um die Arteria femoralis gelegten Seidenfaden gesichert.

In Rechtsseitenlage wurde eine Thorakotomie im vierten Interkostalraum links durchgeführt. Nach Darstellung des Herzens konnte das Perikard stumpf eröffnet werden.

Es wurde ein prominenter Ast der linken Koronararterie aufgesucht und etwa in der Mitte seiner Verlaufsstrecke zwischen Herzbasis und Herspitze mittels eines chirurgischen Fadens (2/0 Ethicon Perma - Hand® Seide, Fa. Johann + Johann Intl.) umschlungen. Beide Fadenenden wurden durch einen etwa 1,5 cm langen Kunststoffschlauch geführt, um eine Schlinge entstehen zu lassen. Mit Hilfe diese Schlinge konnte die Koronarokklusion durchgeführt werden.

Des Weiteren wurde bei allen Versuchstieren ein 3-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) angelegt, um kontinuierlich Herzfrequenz und Rhythmus sowie ischämiebedingte Veränderungen während der Okklusionsphase zu überwachen.

Mittels einer rektal platzierten Temperatursonde wurde die Körpertemperatur der Kaninchen überwacht und über einen Regelkreis mit einem beheizbaren OP-Tisch (Föhr, Medical Instrumente, Seeheim, Deutschland) konstant auf $38,5 \pm 0,5$ °C gehalten.

Zur Aufrechterhaltung der intraoperativen Flüssigkeitshomöostase wurde kontinuierlich physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, 40ml/h) über den venösen Zugang an der Ohrvene infundiert.

2.1.4 Induktion der myokardialen Ischämie

Fünf Minuten vor der Okklusion der Koronararterie wurde allen Tieren 300 U/kg Heparin zur Antikoagulation intravenös appliziert. Um die myokardiale Ischämie auszulösen, wurde der mit dem chirurgischen Nahtmaterial angeschlungene prominente Ast der linken Koronararterie okkludiert. Dazu wurde die Ligatur

zugezogen, das Kunststoffröhrchen in Richtung Herz vorgeschoben und mit einer Péan-Klemme fixiert.

Die myokardiale Ischämie wurde anhand von ST-Strecken Veränderung im EKG, regionaler Zyanose und Dyskinesien des Myokards innerhalb der Ischämiezone verifiziert.

Durch lockern der Schlinge wurde die Reperfusion ermöglicht, wobei eine adäquate Reperfusion durch Hyperämie des Myokards und Rückgang der EKG-Veränderungen festgestellt werden konnte.

2.1.5 Beendigung des Experimentes

Nach Abschluss der Reperusionszeit wurde die angeschlungene Koronararterie erneut okkludiert, gleich darauf wurden 2 ml Patentblau (0,1 g/ml, Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) intravenös injiziert.

Durch den Farbstoff konnte der noch normal durchblutete, nicht-ischämische Anteil des Myokards von dem ischämischen Bereich des Myokards (area at risk, AAR) separiert werden. Daraufhin erhielten die Kaninchen eine letale Dosis Natrium-Pentobarbital und das Herz wurde nach Abtrennung von Aorta sowie Vena cava inferior et superior entnommen.

Nach der Entnahme wurden zunächst rechter und linker Vorhof sowie rechter und linker Ventrikel voneinander separiert.

Nun erfolgte die Präparation des linken Ventrikels, indem dieser von der Basis bis zur Herzspitze in fünf Scheiben geschnitten wurde. Anschließend erfolgte die sorgfältige Trennung der blauen (das heißt die regelhaft perfundierten Areale) von den rot erscheinenden (entspricht den ischämischen Arealen) Anteilen.

Nach der Trennung wurden die blauen und die roten Gewebeanteile für 20 Minuten separat in eine auf 37°C erwärmte Lösung aus Kaliumdihydrogenphosphat/Kaliumhydrogenphosphat (K_3PO_4 , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 1% 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), welche mittels 0,1M Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 7,4

adjustiert wurde, gegeben. Das Gewebe wurde anschließend für 24 Stunden in 10%iger Formaldehydlösung konserviert.

TTC wird durch oxidative Enzymsysteme wie z.B. NAD - bzw. NADP – abhängige Oxidasen zu einem lipidlöslichen Formazan reduziert und erscheint in dieser Form rot. Somit erscheint nach der Inkubation mit TTC vitales Herzmuskelgewebe rötlich, wohingegen sich abgestorbenes Gewebe grauweiß darstellt.¹⁰⁹

2.1.6 Auswertung des Experimentes

Die Versuchsauswertung erfolgte am Folgetag der Untersuchung nach 24-stündiger Konservierung des Myokardgewebes in 10%iger Formaldehydlösung. Unter einem Stereomikroskop (Leica M55, Leica Mikroskopie Systeme AG, Heerbrugg, Schweiz) wurde die Area at Risk sorgfältig in rot (d.h. vitales Myokard) und grauweiß erscheinende (d.h. irreversibel infarziertes Myokard) Anteile separiert und getrennt voneinander aufbewahrt.

Anschließend erfolgte mittels einer digitalen Messwaage (Sartorius R 180 D, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) die gravimetrische Bestimmung des infarzierten Areals, des ischämischen Areals, der AAR (entspricht der Summe aus vitalem und irreversibel infarziertem Myokard), des nicht ischämischen Anteils des linken Ventrikels sowie der Gesamtmasse des linken Ventrikels. Hier wurde die Herzinfarktgröße als Prozentwert der AAR ausgedrückt.

Außerdem wurde der Anteil der AAR an der Gesamtmasse des linken Ventrikels als prozentualer Wert bestimmt. Tiere, deren AAR weniger als 15% der Gesamtmasse des linken Ventrikels betrug, wurden nicht in die Auswertung des Experimentes miteinbezogen. Eine Untersuchung von Ytrehus et al. zeigte, dass die Größe des myokardialen ischämischen Areals einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Infarktgröße darstellt.¹¹⁰ Aus einer kleinen AAR resultiert auch eine kleine Infarktgröße und umgekehrt. Um diesen Einfluss zu vermindern, wurden in der Untersuchung nur Tiere mit einer AAR von mindestens 15% des linksventrikulären Gewichts miteinbezogen.

Ebenso wurden Tiere, die während des Versuches ein Pumpversagen des linken Ventrikels oder Kammerflimmern erlitten hatten, von der Versuchsauswertung ausgeschlossen.

Die gravimetrische Messung wurde von einer geblindeten Person durchgeführt.

2.2 Experimentelles Protokoll

Die Kaninchen wurden randomisiert zwölf Versuchsgruppen zugeordnet. (Abbildung 3)

Unabhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe gab es ein Basisprotokoll, das sich über einen Zeitraum von insgesamt 300 Minuten erstreckte. Alle Versuchstiere erhielten Natrium-Pentobarbital (20–30 mg/kg/h) als Hintergrundnarkose. Das Protokoll begann nach Beendigung der Präparation der Tiere.

Die erste Phase des Protokolls war die als Baseline bezeichnete Äquilibrationsphase, in der die Ausgangswerte der hämodynamischen Parameter über eine Zeit von 30 Minuten aufgezeichnet wurden. Darauf folgte die Interventionsphase.

In der Kontrollgruppe erfolgte in dieser Phase außer der kontinuierlichen intravenösen Gabe von 0,9% Natriumchlorid keine weitere Intervention. Die Desfluran Gruppe erhielt für 30 Minuten 1,0 MAC (Minimale Alveoläre Konzentration) Desfluran (Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland). Dies entspricht beim Kaninchen einer endtidalen Konzentration von 8,9 Vol.-%.¹¹¹ Die endtidalen Konzentrationen von Desfluran wurden kontinuierlich mit einem kalibrierten Infrarot-Analysegerät (Dräger, Lübeck, Deutschland) gemessen.

Die verschiedenen Gruppen erhielten jeweils den β_1 -selektiven Blocker Metoprolol in einer Dosis von 0,2; 1,0; 1,75; oder 2,5 mg/kg. Außerdem erhielten vier weitere Gruppen eine Kombination aus 0,2; 1,0; 1,75; oder 2,5 mg/kg Metoprolol mit 1,0 MAC Desfluran. Desfluran und Metoprolol wurden 30 Minuten kontinuierlich appliziert. In zwei weiteren Versuchsgruppen wurde ein Bolus des spezifischen CaMKII-Inhibitors KN-93 (300 μ g/kg, Sigma-Aldrich,

München, Deutschland) direkt in den linken Ventrikel injiziert. Die Gabe von KN-93 erfolgte entweder alleine oder in Kombination mit 1,0 MAC Desfluran.

Die Zeitspanne zwischen dem Ende der Applikation des volatilen Anästhetikums und dem Beginn der Koronarokklusion wird als Memory-Phase bezeichnet. Das bedeutet, dass bereits zu Beginn der Koronarokklusion kein Anästhetikum mehr nachweisbar ist und trotzdem eine Präkonditionierung induziert wird. Nach der 30 minütigen Memory-Periode folgte in jeder Gruppe eine 30 minütige Koronarokklusion. Im Anschluss an die Phase der Okklusion folgte als letzter Abschnitt des Protokolls die Reperfusionphase über eine Zeitspanne von drei Stunden.

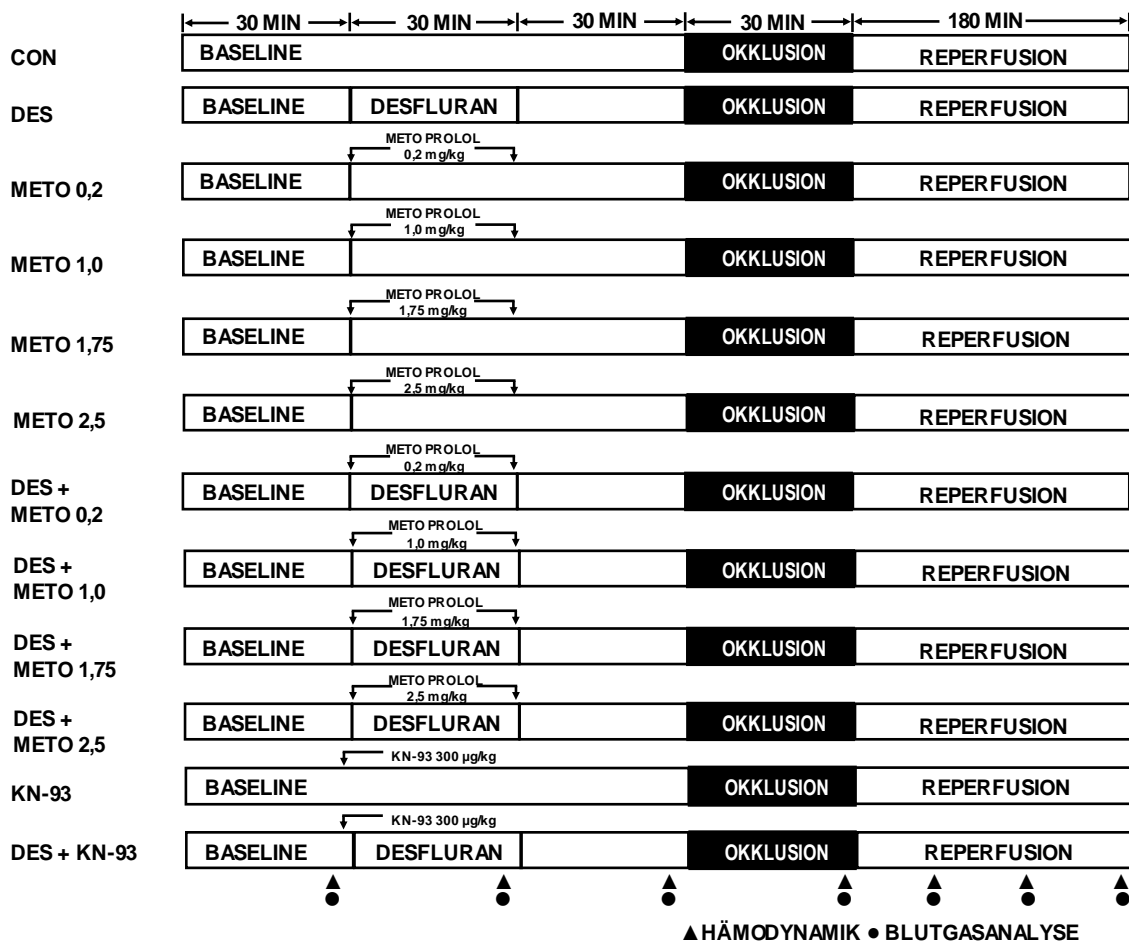


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Experimentellen Protokolls;

CON = Kontrolle; DES = 1,0 MAC Desfluran; METO = 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; DES + METO = 1,0 MAC Desfluran + 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol (n=10 pro Gruppe); KN-93 = 300 µg/kg KN-93; KN-93/DES = KN-93 + Desfluran (n=6 pro Gruppe).

2.3 Organentnahmen

Für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen wurde das Protokoll verkürzt und die Herzen bereits fünf Minuten nach Beendigung der Interventionsphase entnommen.

Narkoseinduktion, Narkoseaufrechterhaltung, Präparation, Monitoring sowie Überwachung und Modulation von Narkosetiefe, Herzkreislaufparameter und Atmung erfolgten wie bei der Durchführung des eigentlichen Experimentes.

Auf die Koronarokklusion sowie die Färbung des Myokards mittels Patentblau wurde verzichtet.

2.3.1 Protokoll zur Organentnahme

In diesem Teil des Experimentes wurden die 42 Tiere randomisiert sechs Versuchsgruppen mit je sieben Tieren zugeteilt.

Dabei erhielten die Kaninchen 0,9% NaCl in der Kontrollgruppe oder 1.0 MAC Desfluran in der Desflurangruppe. Außerdem wurde Metoprolol in einer Konzentration von 2,5 mg/kg kontinuierlich intravenös oder 300µg/kg KN-93 als Bolus in den linken Ventrikel, jeweils alleine oder in Kombination mit 1.0 MAC Desfluran, appliziert. Fünf Minuten nach Beendigung der Desfluran- oder Metoprolol-Zufuhr bzw. 35 Minuten nach der Bolusinjektion von KN-93 wurden die Herzen zügig entnommen und zunächst in Eis-gekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Vorhöfe und der rechte Ventrikel wurden separiert und verworfen. Der linke Ventrikel wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu den molekularbiologischen Untersuchungen gelagert.

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

2.4.1 Herstellung der Lysate

Etwa 0,5 cm² große Stücke des gefrorenen Herzgewebes wurden in 500 µl gekühltem RIPA-Puffer mit Proteasen-Inhibitoren (Complete, mini, Roche diagnostics Mannheim) in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Für phosphorylierte Proteine wurden 20mM NaF (Sigma, Steinheim) und 1mM Na₃VO₄ (Sigma, Steinheim) hinzugefügt.

Diese Proben wurden daraufhin mittels eines Homogenisators (IKA[®] RW14 basic, IKA[®] Werke, Staufen) mit Glaskolben in den dazugehörigen Homogenisatorzylindern auf Eis zweimal für 30 Sekunden bei zirka 1500 U/m homogenisiert. Das gewonnene Homogenisat wurde für 30 Minuten bei 4°C und 12000xg zentrifugiert (Sepatech Megafuge 1,0R, Heraeus). Der hierbei gewonnene Überstand, mit einer gewünschten Proteinkonzentration von circa 10µg/µl, wurde in frische, gekühlte Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

PBS (phosphate buffered saline) (5 fach) pH 7,4

41,17 g Na₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
11,73 g NaH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
20 g NaCl (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)
930 ml H₂O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg)

RIPA-Puffer

97,5 ml PBS
1 ml Igepal CA-630 (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)
500 mg Sodium deoycholot (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)
1 ml 10% SDS (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)

2.4.2 Protein-Bestimmung nach Bradford

Zur Messung der Gesamtproteinkonzentration nutzten wir die Methode nach Bradford.¹¹² Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue an Proteine wird das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschoben, dies dient als Maß für die Proteinkonzentration.

In Kunststoffküvetten (Sarstedt, Nürnbrecht) wurde jeweils 1 µl des Lysates mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad Laboratories GmbH, München) versetzt und gut durchmischt. Daraufhin wurde die Absorption bei 595 nm spektrophotometrisch mittels HP620 (Hewlett Packard) gemessen und die Proteinkonzentrationen mithilfe der Standardkurve bestimmt. Nach

Berechnung wurden 60 µg Gesamtprotein (bzw. 10 µg Protein bei PLB) in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem jeweiligen Lösungspuffer auf 20 µl aufgefüllt. Vor der 5 minütigen Denaturierung bei 95°C (Techne, Dri-Block® DB-2A, Cambridge, UK) wurden 20 µl Laemmli Puffer (BioRad, Hercules, CA, USA) mit 0,5% β-Mercapto-Ethanol (Sigma, Steinheim) zugefügt. Das denaturierte Gemisch wurde 1 Minute bei 10000U/m (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

2.4.3 Auftrennung der Proteine

Zur Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht diente eine Gelelektrophorese mit SDS (Sodium dodecyl sulfat)-Gelen nach dem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffer.¹¹³

Zunächst wurde das Trenngel gemischt und zwischen zwei Glasplatten mit 1,5 mm Spacer (BioRad Laboratories GmbH, München), die in einer speziellen Halterung (BioRad Laboratories GmbH, München) fixiert waren, eingefüllt. Auf die Oberfläche wurde ein 1cm breiter Film destilliertes Wasser gegeben.

Nachdem das Trenngel polymerisiert hatte wurde das oben schwimmende H₂O komplett entfernt und das Sammelgel vorbereitet. Dieses wurde auf das Trenngel aufgebracht und 1,5 mm dicke 10-well Kämmen luftblasenfrei eingesetzt. Diese wurden nach der Polymerisierung des Gels entfernt und die so entstandenen Probenaschen mit destilliertem H₂O gespült um Gelreste zu entfernen.

Diese Gele wurden in die Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN 3 BioRad Laboratories GmbH, München) eingesetzt und befestigt.

Nun wurden die vorbereiteten Probengemische mithilfe von Gelloader-Pipettenspitzen (Gilson®, Middleton, USA) komplett in die Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurde in eine der Taschen 5 µl eines Proteinmarkers (peqGOLD Protein-Marker V (Prestained), PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bzw. Kaleidoscope Polypeptide Standards, BioRad Laboratories GmbH, München) gegeben.

Anschließend wurde die Kammer vollständig mit Elektrophorese-Puffer gefüllt, an eine Stromquelle (PowerPac™ HC High-Current Power Supply, BioRad

Laboratories GmbH, München) angeschlossen und zunächst auf 80 V gestellt. Sobald die Lauffront das Sammelgel passiert hatte wurde die Spannung auf 95-110 V erhöht bis die Proteine am unteren Ende des Gels angekommen waren.

Zusammensetzung des Trenngels (15%)

2,35 ml	H ₂ O
2,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
100 µl	10% SDS
5 ml	Acrylamide/ Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
50 µl	APS
5 µl	TEMED (Sigma, Steinheim)

Zusammensetzung des Sammelgels (5%)

2,85 ml	H ₂ O
1,25 ml	0,5 M Tris pH 6,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
50 µl	10% SDS
850 µl	Acrylamide/ Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
25 µl	10% APS
5 µl	TEMED

Elektrophorese-Puffer (5-fach) pH 8,3

15 g	Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
72 g	Glycin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
5 g	SDS
900 ml	H ₂ O

2.4.4 Western Blot

Die so aufgetrennten Proteine wurden durch das Wetblot-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen mit der Porengröße von 0,2 µl transferiert und somit immobilisiert.

In die Blotting-Kassette wurde zuerst eine in Transfer-Puffer getränkte Fasermatte gelegt, darauf ein ebenfalls getränktes Blotting-Papier (330g/m²). Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen, das Trenngel wurde vorsichtig auf das Whatman-Papier gelegt. Auf das Gel wurde die in Puffer getränkte Nitrocellulosemembran (Protran, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel) in gelgröße blasenfrei aufgelegt, darauf kam wiederum ein getränktes Blotting-Papier und zum Schluss noch einmal eine getränkte Fasermatte. Die Kassette wurde in die Transferkammer gestellt, komplett mit Transfer-Puffer aufgefüllt und an eine Stromquelle mit 250 mA angeschlossen. Der Transfer wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt.

Transferpuffer

200 ml Elektrophorese-Puffer (5 fach)

200 ml Methanol (Merck)

600 ml H₂O

Am nächsten morgen wurde die Membran aus der Blotting-Apparatur herausgenommen und trocknen lassen, um die Proteine auf der Membran zu fixieren.

Anhand des Größenmarkers, der auf der Membran zu sehen war, wurden die Molekulargewichte der gesuchten Proteine mit denen bekannter Proteine verglichen. In Höhe des gesuchten Proteins wurde mit dem Skalpell ein Streifen aus der Nitrozellulosemembran herausgeschnitten.

Zusätzlich wurde aus jeder Membran im Bereich des stabil-exprimierten Proteins GAPDH („housekeeping-protein“) ein Streifen abgetrennt, der als interne Ladekontrolle diente.

Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden alle Membranen in einer Lösung aus 5% Milchpulver (BioRad Laboratories GmbH, München) in PBS/Tween 20 (PBS/T: 1000 ml PBS (1 fach), 500 µl Tween 20) für mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4.5 Antikörper-Inkubationen

Die blockierten Membranen wurden aus der Milchlösung herausgenommen und in den gewünschten Konzentrationen des spezifischen Antikörpers in 5%iger Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Heidolph Duomax 1030) inkubiert:

1:3000 Maus-anti-Phospholamban (Affinity BioReagents™, Golden, CO, USA)

1:3000 Maus-anti-GAPDH (Chemicon International).

Die Folgenden Antikörper wurden in 5% Milch in PBS/T über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert:

1:1000 Kaninchen-anti-Phospholamban (Ser 16),

1:1000 Kaninchen-anti-Phospholamban (Thr 17) (beide Badrilla, Leeds, UK),

1:200 Ziege-anti-CaMK II δ (A-17) (Santa Cruz Biotechnology).

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Membranen mindestens fünfmal 10 minütlich mit PBS/T unter leichtem Schütteln gespült.

Als Zweitantikörper wurden an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Diese waren jeweils gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet (Anti-Kaninchen IgG, Anti-Maus IgG (beide GE Healthcare, Freiburg) Anti-Ziege IgG (Santa Cruz Biotechnology)).

Anschließend wurden die Membranen wieder wie oben beschrieben gespült.

2.4.6 Entwicklung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels ECL Detektionsreagenz (GE Healthcare) und einem Röntgenfilm, der durch die Peroxidase katalysierte Chemolumineszenzreaktion des Luminols geschwärzt wurde.

Dazu wurden die beiden Reaktionslösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für genau 60 sec auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden zwischen durchsichtigen Folien in eine Röntgenkassette (Dr. Goos Suprema, Heidelberg) eingelegt und das Signal per Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray film, Düsseldorf) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mit einem Röntgenfilmentwickler (Kodak X-omat 2000, Kodak, New York, USA).

2.5 Auswertung

Alle hämodynamischen Parameter (LVEDP, LVP, MAP), Körpertemperatur und EKG wurden kontinuierlich mit Hilfe eines analog-digital Konverter (Data TranslationTM, Marlboro, USA) und einer speziellen Software (Notocord[®] hem 3.5, Croissy sur Seine, France) auf einem Personal Computer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) aufgezeichnet.

Die durch Western Blot entstandenen Banden wurden mittels eines Fotoscanners (Epson Perfection, Epson, Meerbusch, Deutschland) als Positivfilm eingescannt und die Signalintensitäten der jeweiligen Banden densitometrisch gemessen (ScanPack3.0, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen). Die Ergebnisse wurden durch die internen Ladekontrollen normalisiert, indem ein Quotient aus den Signalintensitäten des gesuchten Proteins und der Ladekontrolle gebildet wurde.

Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) analysiert.

2.6 Statistik

Die Statistische Analyse der hämodynamischen Daten wurde zwischen den Gruppen (Kontrolle vs. Desfluran vs. 0,2 mg/kg Metoprolol vs. 1,0 mg/kg Metoprolol vs. 1,75 mg/kg Metoprolol vs. 2,5 mg/kg Metoprolol vs. KN-93 vs. 0,2 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. 1,0 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. 1,75 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. 2,5 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. KN-93+Desfluran) und innerhalb der Gruppen (Baseline vs. Präkonditionierung vs. Memory vs. Okklusion vs. Reperfusion 1 vs. Reperfusion 2 vs. Reperfusion 3) als Varianzanalyse mittels ANOVA für wiederholte Messungen durchgeführt. Im Falle einer Signifikanz wurden one-way post-hoc Varianzanalysen für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt durchgeführt.

Die statistische Analyse des Körpergewichts, des linksventrikulären Gewichts (LV), der AAR, der AAR/LV, der Infarktgröße/AAR und der Densitometrie wurde als one-way Varianzanalyse (Kontrolle vs. Desfluran vs. 0,2 mg/kg Metoprolol vs. 1,0 mg/kg Metoprolol vs. 1,75 mg/kg Metoprolol vs. 2,5 mg/kg Metoprolol vs. KN-93 vs. 0,2 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. 1,0 mg/kg Metoprolol+Desfluran

vs. 1,75 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. 2,5 mg/kg Metoprolol+Desfluran vs. KN-93+Desfluran) und gegebenenfalls einem post-hoc Duncan's test durchgeführt. Die Daten wurden mit einem Computer und einer Statistik-Software (StatMost 3.6 für WindowsTM, Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA) gewonnen.

Unterschiede der Daten wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

Es wurden 130 Kaninchen instrumentiert, um 112 erfolgreiche Experimente abzuschließen. Zusätzlich wurden noch 42 Tieren die Herzen entnommen, um Western blot Analysen durchzuführen. (Tabelle 1)

Anzahl n	CON	DES	METO 0,2	METO 1,0	METO 1,75	METO 2,5	METO 0,2/DES	METO 1,0/DES	METO 1,75/DES	METO 2,5/DES	KN-93	KN-93 /DES
Infarktgröße	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	6
Westernblot	7	7	-	-	-	7	-	-	-	7	7	7

Tabelle 1: Gruppengrößen der Infarktgrößenbestimmung und der Western blot Analyse;

CON = Kontrolle; DES = Desfluran; METO = 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; DES + METO = 1,0 MAC Desfluran + 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; KN-93 = 300 µg/kg KN-93; KN-93/DES = KN-93 + Desfluran.

Drei Tiere wurden wegen eines therapierefraktären Kammerflimmerns ausgeschlossen, wobei diese Tiere der Kontroll-, Metoprolol 1,0 mg/kg- und Metoprolol 2,5 mg/kg Gruppe angehörten.

Elf weitere Kaninchen wurden wegen linksventrikulären Pumpversagens ausgeschlossen (1 Desfluran, 2 Desfluran + Metoprolol 0,2 mg/kg, 2 Desfluran + Metoprolol 2,5 mg/kg, 2 Metoprolol 0,2 mg/kg, 2 Metoprolol 1,0 mg/kg, 1 Metoprolol 1,75 mg/kg und 1 Metoprolol 2,5 mg/kg) und vier wegen einer AAR von weniger als 15% des linksventrikulären Gewichts (1 Desfluran + Metoprolol 1,75 mg/kg, 1 Metoprolol 1,0 mg/kg und 2 Metoprolol 2,5 mg/kg).

Zwischen den Gruppen gab es keine Unterschiede bezüglich des Körpergewichts, des linksventrikulären Gewichts und des Gewichts der AAR. Das relative Gewicht der AAR im Verhältnis zum linksventrikulären Gewicht zeigte keine signifikanten Unterschiede. (Tabelle 2)

	KG (kg)	LV (g)	AAR (g)	AAR/LV (%)
CON	2,41 ± 0,08	3,26 ± 0,15	1,25 ± 0,12	38 ± 3
DES	2,24 ± 0,10	3,12 ± 0,15	0,99 ± 0,13	32 ± 4
METO 0,2	2,47 ± 0,08	3,45 ± 0,13	1,26 ± 0,16	36 ± 4
METO 1,0	2,50 ± 0,10	3,53 ± 0,18	1,45 ± 0,18	40 ± 4
METO 1,75	2,40 ± 0,06	3,30 ± 0,12	1,10 ± 0,06	34 ± 2
METO 2,5	2,16 ± 0,08	3,02 ± 0,13	1,04 ± 0,16	34 ± 5
METO 0,2/DES	2,44 ± 0,08	3,16 ± 0,14	1,08 ± 0,13	34 ± 3
METO 1,0/DES	2,48 ± 0,11	3,46 ± 0,18	1,45 ± 0,16	41 ± 3
METO 1,75/DES	2,39 ± 0,03	3,28 ± 0,12	1,22 ± 0,11	38 ± 4
METO 2,5/DES	2,25 ± 0,10	3,12 ± 0,16	1,25 ± 0,20	39 ± 6
KN-93	2,53 ± 0,07	3,17 ± 0,15	1,00 ± 0,08	32 ± 2
KN-93/DES	2,59 ± 0,06	3,19 ± 0,26	0,97 ± 0,18	31 ± 6

Tabelle 2: Körpergewicht in kg, Gewicht des linken Ventrikels in g, Gewicht der AAR in g, Größe der AAR als Prozentwert der Größe des linken Ventrikels; KG = Körpergewicht; LV = linksventrikuläres Gewicht; AAR = Area at risk; CON = Kontrollgruppe; DES = 1,0 MAC Desfluran; METO = 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; DES + METO = 1,0 MAC Desfluran + 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol (n=10 pro Gruppe); KN-93 = 300 µg/kg KN-93; KN-93/DES = KN-93 + Desfluran (n=6 pro Gruppe). Alle Angaben sind Mittelwert ± SEM.

3.1 Hämodynamik

Zwischen den Gruppen bestanden keine hämodynamischen Unterschiede während der Baseline. Metoprolol alleine zeigte keinen Effekt auf den mittleren arteriellen Druck, aber ab einer Dosis von 1 mg/kg senkte es die Herzfrequenz (HR). Diese Reduktion wurde während des kompletten Protokolls beobachtet. Metoprolol zeigte unabhängig von der Dosierung keinerlei Effekte auf die maximale Druckentwicklung des linken Ventrikels. Desfluran beeinflusste die Herzfrequenz nicht, reduziert aber alleine oder in Kombination mit verschiedenen Dosen Metoprolol sowohl den MAP als auch dP/dt_{max} und das Rate Pressure Product (RPP). Allerdings kehrten der MAP und $+dP/dt_{max}$ vor Beginn der Koronarokklusion wieder auf Ausgangswerte zurück. Der LVEDP wurde von keinem der verwendeten Pharmaka beeinflusst. Der MAP wurde durch Verabreichung von KN-93 reduziert. (Tabelle 3)

Ergebnisse

HR (min ⁻¹)	Base	Interv	Memo	CAO	Reperfusion (h)		
					1	2	3
CON	268±7	262±7	263±7	263±6	249±6	240±5	234±7
DES	272±9	260±8	264±9	264±7	246±8	230±5*	219±5*
METO 0,2	280±8	245±9*	247±7*	251±11	245±9*	243±11*	237±9*
METO 1,0	276±13	231±10 ^{†*}	232±9*	238±9*	232±9*	231±9*	229±8*
METO 1,75	273±9	229±4 ^{†*}	226±5 ^{†*}	231±8 ^{†*}	227±5*	225±5*	224±6*
METO 2,5	253±8	209±8 ^{†*}	208±9 ^{†*}	210±9 ^{†*}	210±9 ^{†*}	200±10 ^{†*}	203±12 ^{†*}
METO 0,2/DES	270±11	234±8*	242±9	248±9	239±10	236±11*	230±10*
METO 1,0/DES	268±9	214±7 ^{†*}	224±8 ^{†*}	235±8*	225±8*	224±7*	227±9*
METO 1,75/DES	278±10	222±4 ^{†*}	228±5 ^{†*}	233±6*	225±4*	219±4*	213±5*
METO 2,5/DES	252±12	199±6 ^{†*}	209±6 [†]	215±5 ^{†*}	218±8 ^{†*}	203±13 ^{†*}	198±14 ^{†*}
KN-93	277±7	257±8	247±10	253±9	249±9	246±9	245±10*
KN-93/DES	254±10	256±20	250±10	237±7	243±9	244±9	243±8
MAP (mmHg)	Base	Interv	Memo	CAO	1	2	3
CON	88±5	90±5	90±5	87±5	85±4	80±6	80±5
DES	90±4	55±3 ^{†*}	84±4	80±5	77±5	71±4*	67±5*
METO 0,2	98±3	94±5	91±5	86±4	84±5	81±5	78±6*
METO 1,0	97±5	94±7	92±7	84±6	82±5	78±5	79±5
METO 1,75	98±5	88±6	88±6	83±6	82±6	80±5*	77±5*
METO 2,5	87±5	84±6	81±6	80±9	77±9	76±8	75±7
METO 0,2/DES	95±5	55±4 ^{†*}	90±5	87±4	85±5	82±5	79±6
METO 1,0/DES	93±5	55±4 ^{†*}	90±4	81±4	76±4	77±5	81±4
METO 1,75/DES	96±5	60±3 ^{†*}	90±6	83±4	81±5	79±5	79±6
METO 2,5/DES	86±5	46±3 ^{†*}	77±6	75±4	71±4	70±7	67±4*
KN-93	79±4	69±5 [†]	69±4 [†]	65±6 [†]	61±5 [†]	63±4	66±5
KN-93/DES	78±5	56±6 [†]	75±5	72±5	70±3	67±2	65±6
LVEDP (mmHg)	Base	Interv	Memo	CAO	1	2	3
CON	3±1	3±1	3±1	8±2	5±1	6±1	7±1
DES	3±1	2±1	2±1	3±1	3±1	5±2	5±2
METO 0,2	3±1	3±1	4±1	8±1	6±1	5±1	6±2
METO 1,0	4±1	3±1	4±1	9±1	6±1	6±2	7±2
METO 1,75	2±1	1±0	2±0	5±1	3±0	3±0	4±1
METO 2,5	3±1	4±1	3±1	6±1	5±1	8±2	6±2
METO 0,2/DES	3±1	4±1	4±1	6±2	4±1	5±1	6±1
METO 1,0/DES	2±1	2±1	2±1	5±1	2±1	3±1	2±0
METO 1,75/DES	3±1	2±0	2±0	8±1	5±1	5±1	6±1
METO 2,5/DES	3±1	3±1	3±1	7±1	3±1	2±1	2±1
KN-93	8±4	6±3	12±8 [†]	6±4	5±3	5±3	5±3
KN-93/DES	8±3	7±2	6±2	10±2	9±2	10±2	12±2

Ergebnisse

+dP/dt_{max} (mmHg·s⁻¹)	Base	Interv	Memo	CAO	1	2	3
CON	4516±395	4491±339	4560±396	4250±402	3941±369	3452±459	3173±440
DES	4425±670	2147±163 ^{†*}	3730±527	3440±394	2956±302	3434±962	3098±781
METO 0,2	4664±583	3564±434	3569±581	3086±318	2932±284*	2986±272*	2680±324*
METO 1,0	3832±514	3252±532	3276±517	2715±475	2806±475	2637±396	2382±400
METO 1,75	4995±310	3442±326	3677±349	3304±269*	3020±248*	2671±286*	2368±291*
METO 2,5	4003±217	3639±219 [†]	3565±233	3238±224	3036±280	3100±192	3206±382
METO 0,2/DES	4092±660	1832±256 ^{†*}	3688±591	2969±425	2924±422	2620±356	2500±369*
METO 1,0/DES	4373±435	1975±192 ^{†*}	3925±406	3117±378	3110±543	2843±348	3054±366
METO 1,75/DES	4290±514	2199±298 ^{†*}	3840±492	3271±365	3143±403	2985±388	2789±346
METO 2,5/DES	3927±281	2212±233 ^{†*}	3418±387	3126±314	3025±280	2923±253	2765±197
KN-93	1876±577 [†]	1950±630 [†]	2097±669 [†]	2125±648 [†]	1922±541 [†]	1781±460 [†]	1760±649
KN-93/DES	2273±680 [†]	1656±281 [†]	2279±646 [†]	2157±655 [†]	2163±607 [†]	2071±546	2068±477
RPP(HR · MAP)	Base	Interv	Memo	CAO	1	2	3
CON	23.9±1.5	23.9±1.4	23.7±1.4	23.4±1.2	22.1±1.1	20.4±1.4	19.9±1.2
DES	24.6±1.6	14.3±1.1 ^{†*}	22.3±1.5	21.1±1.3	19.1±1.4	16.4±0.9*	14.5±0.9*
METO 0,2	27.2±1.8	23.2±1.9	22.7±1.8	21.7±1.8*	20.6±1.8*	20.0±1.9*	18.6±1.8*
METO 1,0	26.8±2.0	22.0±2.0	21.6±1.9	20.3±2.0*	19.2±1.8*	18.4±1.7*	18.3±1.6*
METO 1,75	27.1±1.9	20.2±1.5*	20.1±1.4*	19.4±1.6*	18.8±1.6*	18.1±1.4*	17.3±1.2*
METO 2,5	22.3±1.6	17.7±1.7 [†]	17.0±1.8 [†]	16.9±2.3 [†]	16.5±2.3	15.4±2.0*	15.6±2.1*
METO 0,2/DES	25.9±2.1	12.9±1.2 ^{†*}	21.9±1.9	21.7±1.7	20.7±1.8	19.7±2.0*	18.5±2.1*
METO 1,0/DES	24.9±1.3	11.7±0.9 ^{†*}	20.3±1.1	19.1±1.3*	17.1±1.0*	17.2±1.3*	18.4±1.2*
METO 1,75/DES	27.1±2.0	13.4±0.8 ^{†*}	20.5±1.7*	19.2±1.3*	18.1±1.3*	17.4±1.4*	17.0±1.5*
METO 2,5/DES	21.0±1.3	9.1±0.5 ^{†*}	16.1±1.1 [†]	16.1±0.8 [†]	15.4±1.0 [†]	14.3±1.8 ^{†*}	13.5±1.4*
KN-93	18.9±1.7	14.4±1.6 [†]	18.9±1.7 [†]	17.0±1.4 [†]	16.8±1.3 [†]	15.9±0.6	16.7±1.2
KN-93/DES	19.1±1.4	17.7±1.4 [†]	17.1±1.2	16.1±1.3 [†]	14.6±0.9	15.6±1.1	16.3±1.5

Tabelle 3: Systemische hämodynamische Parameter; Base = Baseline; Interv = Intervention; CAO = Koronararterienokklusion; CON = Kontrolle; DES = Desfluran; +dP/dt_{max} = maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes; HR = Herzfrequenz; KN-93 = 300 µg/kg KN-93; KN-93/DES = KN-93 + Desfluran; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck; Memo = Memory Periode ohne Intervention; METO = 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; DES + METO = 1,0 MAC Desfluran + 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; Precon = Applikation von Desfluran oder Metoprolol oder KN-93 einzeln oder zusammen mit Desfluran; RPP = Produkt aus MAP und HR; n = 10 pro Gruppe, außer KN-93 und KN-93/DES (n = 6). Alle Angaben sind Mittelwert ± SEM, *Signifikant (P < 0.05) verschieden von Baseline, †Signifikant (P < 0.05) verschieden von dem jeweiligen Wert in der Kontrollgruppe.

3.2 Herzinfarktgrößen

Die Herzinfarktgröße der Kontrollgruppe betrug $60\pm 3\%$. Die 30 minütige Gabe von 1 MAC Desfluran reduzierte die Infarktgröße signifikant auf $33\pm 2\%$. Die Gabe des spezifischen CaMK II-Inhibitor KN-93 in einer Dosierung von 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zeigte keinen Effekt auf die Infarktgröße, die $55\pm 4\%$ betrug. Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wurde hingegen durch KN-93 geblockt, die Infarktgröße betrug hierbei $57\pm 3\%$. (Abbildung 4)

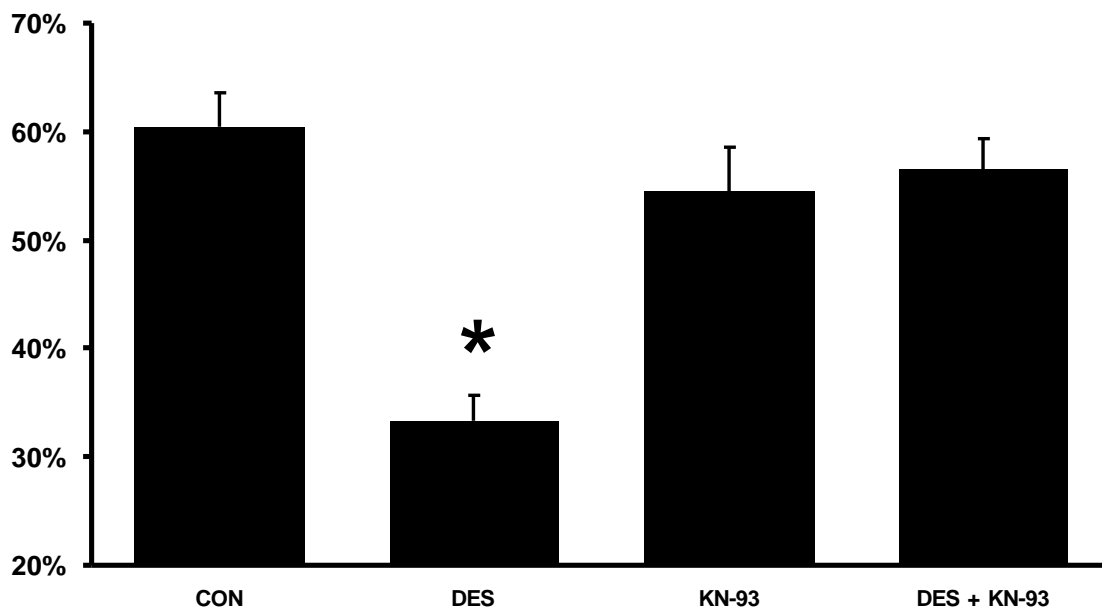


Abbildung 4: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals; CON = Kontrollgruppe; DES = 1,0 MAC Desfluran; KN-93 (spezifischer Inhibitor der CaMK II) = 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KN-93; DES + KN-93 = 1,0 MAC Desfluran + 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KN-93; n = 10 pro Gruppe, außer KN-93 und DES + KN-93 (n=6 pro Gruppe). Angegeben ist Mittelwert \pm SEM.* Signifikant (P < 0,05) verschieden zu CON.

Eine Dosis von 0,2 und 1,0 mg/kg Metoprolol beeinflusste die Infarktgrößen nicht, die $55\pm 3\%$ bzw. $53\pm 3\%$ betragen. Erst die Gabe von 1,75 und 2,5 mg/kg Metoprolol reduzierte die Infarktgrößen signifikant (*P<0,05) auf $48\pm 4\%$ und $39\pm 5\%$. Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung wurde von Metoprolol dosisabhängig unterschiedlich stark blockiert, dabei betragen die Infarktgrößen unter der Gabe von 0,2; 1,0; 1,75 und 2,5 mg/kg Metoprolol jeweils $46\pm 5\%$; $51\pm 3\%$; $52\pm 3\%$ und $55\pm 3\%$. (Abbildung 5)

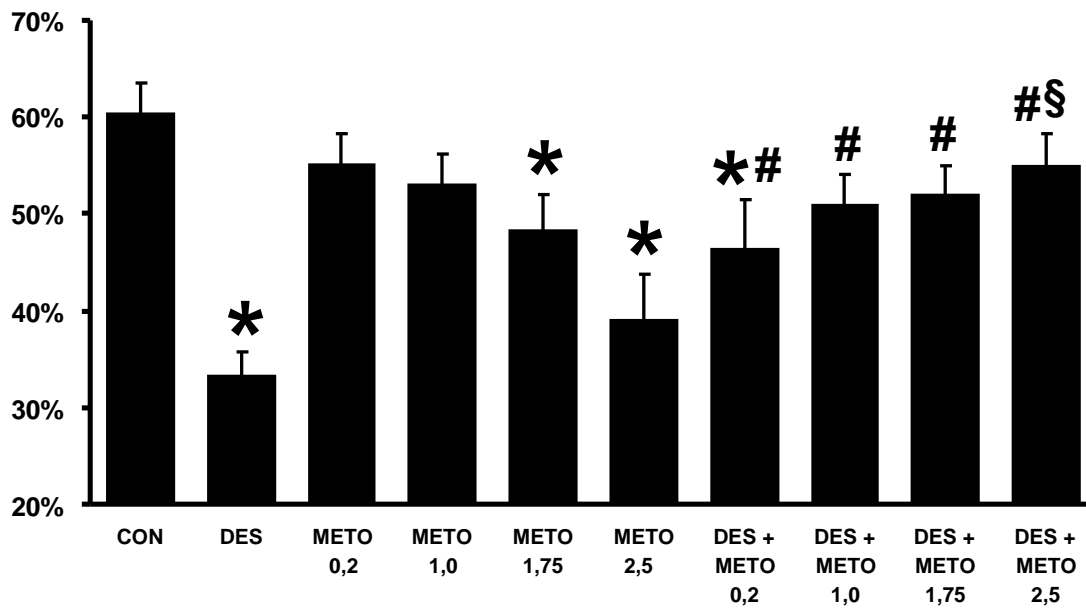


Abbildung 5: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areal; CON = Kontrollgruppe; DES = 1,0 MAC Desfluran; METO = 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; DES + METO = 1,0 MAC Desfluran + 0,2; 1,0; 1,75; 2,5 mg/kg Metoprolol; n = 10 pro Gruppe. Angegeben ist Mittelwert±SEM. * Signifikant (P < 0,05) verschieden zu CON, # Signifikant (P < 0,05) verschieden zu DES, § Signifikant (P < 0,05) verschieden zu METO 2,5.

3.3 CaMK II- und Phospholamban- Proteinexpression

Die Proteinexpression der gesamten CaMK II und des gesamten Phospholamban war in allen Gruppen gleich stark ausgeprägt und wurde somit von keinem der verwendeten Pharmaka beeinflusst. (Abbildung 6, Abbildung 7)

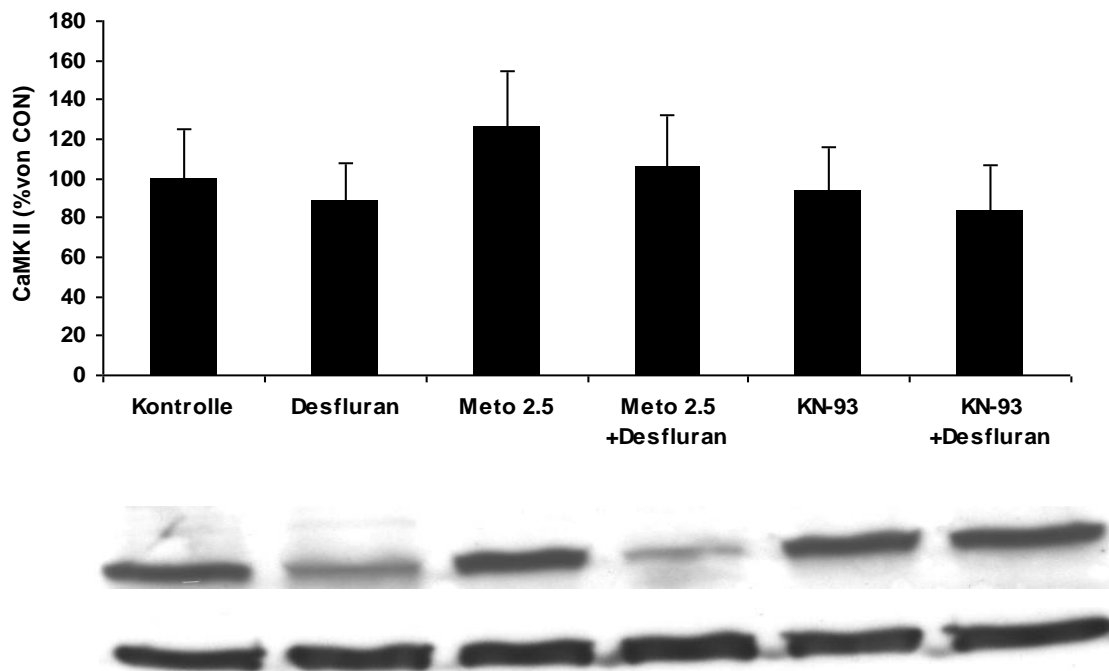


Abbildung 6: Proteinexpression der Calcium/Calmodulin Kinase II nach Applikation von Desfluran, Metoprolol oder KN-93 (spezifischer Inhibitor der CaMK II), jeweils alleine oder in Kombination mit Desfluran.

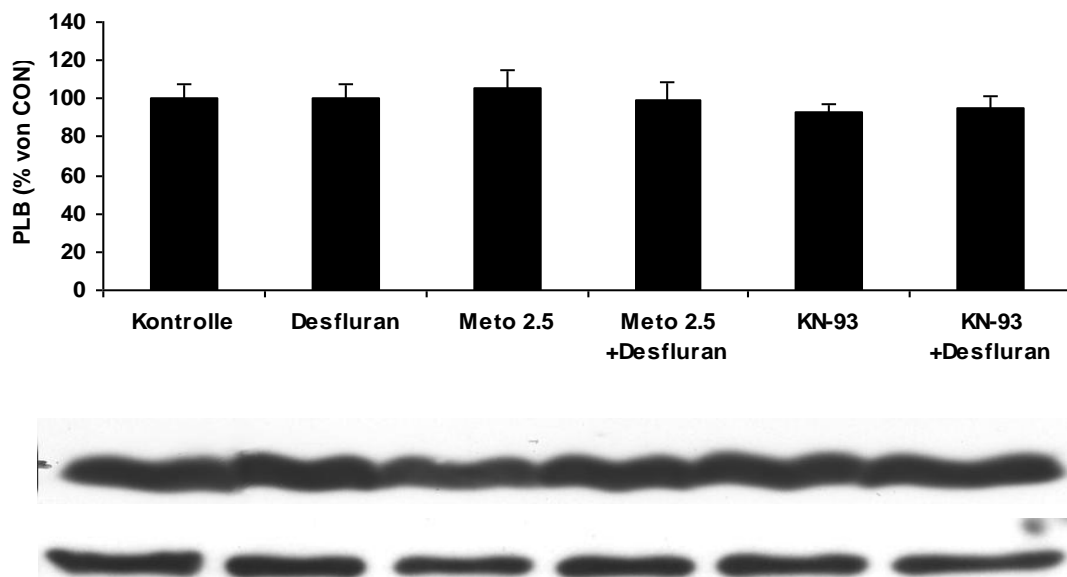


Abbildung 7: Proteinexpression des Phospholamban nach Applikation von Desfluran, Metoprolol oder KN-93 (spezifischer Inhibitor der CaMK II), jeweils alleine oder in Kombination mit Desfluran.

Die Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung des Phospholamban an der Stelle Serin 16 wurde durch Metoprolol alleine und in Kombination mit Desfluran blockiert. Die Gabe von Desfluran oder KN-93, alleine oder in Kombination mit Desfluran, beeinflusste die Proteinexpression an dieser Phosphorylierungsstelle nicht. (Abbildung 8)

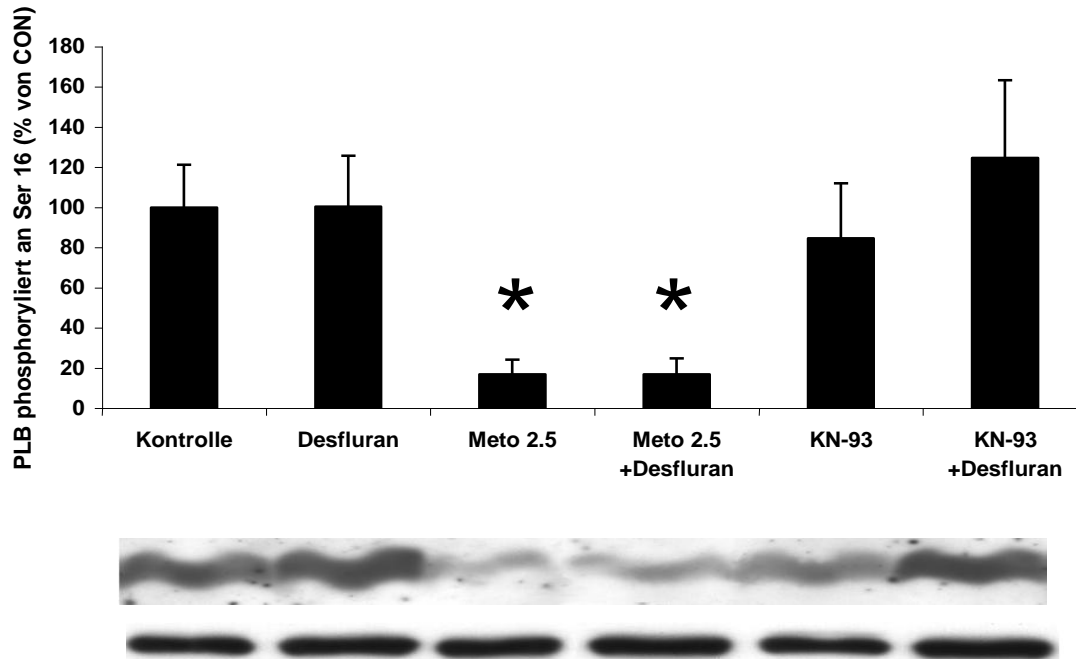


Abbildung 8: Proteinexpression des an der Stelle Serin 16 phosphorylierten Phospholamban nach Applikation von Desfluran, Metoprolol oder KN-93 (spezifischer Inhibitor der CaMK II), jeweils alleine oder in Kombination mit Desfluran.

Die CaMK II abhängige Phosphorylierung des Phospholamban an der Stelle Threonin 17 wurde durch die Gabe des spezifischen CaMK II-Inhibitors KN-93 und Metoprolol, jeweils einzeln oder in Kombination mit Desfluran, blockiert. Die Applikation von Desfluran alleine bewirkte bei der Phospholamban-phosphorylierung an der Stelle Threonin 17 keine Änderung der Proteinexpression. (Abbildung 9)

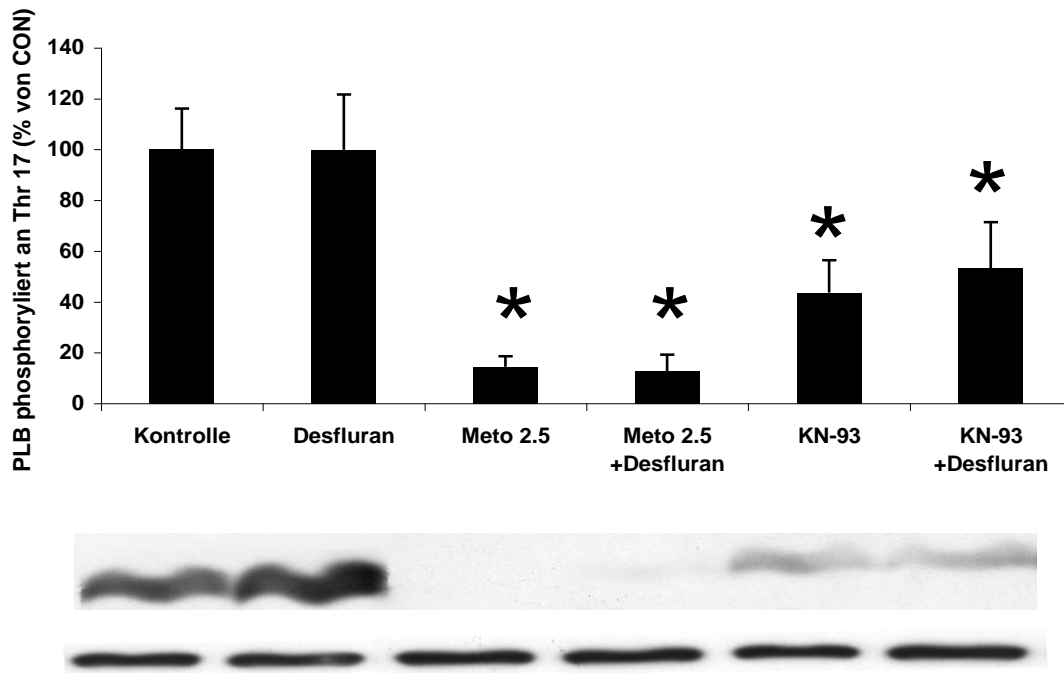


Abbildung 9: Proteinexpression des an der Stelle Threonin 17 phosphorylierten Phospholamban nach Applikation von Desfluran, Metoprolol oder KN-93 (spezifischer Inhibitor der CaMK II), jeweils alleine oder in Kombination mit Desfluran.

Abbildung 6-9: Die Ergebnisse sind als densitometrischer Mittelwert der Immunoblots in Prozent des Kontrollwerts und als repräsentative Western blots dargestellt. Oben jeweils das gesuchte Protein, unten das housekeeping Protein GAPDH. Kontrolle = Kontrollgruppe; Desfluran = 1,0 MAC Desfluran; Meto 2,5 = 2,5 mg/kg Metoprolol; Meto 2,5+Desfluran = 2,5 mg/kg Metoprolol + 1 MAC Desfluran; KN-93 = 300 µg/kg KN-93; KN-93+Desfluran = 300 µg/kg KN-93 + 1,0 MAC Desfluran. n = 7 pro Gruppe. Angegeben ist Mittelwert±SEM. * Signifikant verschieden von Kontrolle.

4 Diskussion

Als Präkonditionierung wird ein endogener Schutzmechanismus bezeichnet, bei dem die Toleranz einer Zelle gegen die Auswirkungen eines späteren ischämischen Schadens erhöht wird. Bei der kardialen Präkonditionierung wird generell zwischen Ischämischer Präkonditionierung und Pharmakologischer Präkonditionierung unterschieden, wobei die Pharmakologische Präkonditionierung unter anderem durch Opioid⁴⁸, Adenosin⁴⁹, Katecholamine¹¹⁴ oder volatile Anästhetika⁵¹ getriggert wird.

In der vorliegenden Studie wurde das Myokardinfarktmodell des weißen Neuseelandkaninchens⁵⁴ eingesetzt, um die Rolle der CaMK II in der Anästhetika-induzierte Präkonditionierung und in der durch Metoprolol vermittelten Kardioprotektion zu erforschen. Außerdem wurde dosisabhängig der Einfluss von Metoprolol auf die Desfluran-induzierte Präkonditionierung untersucht. Neben in vivo Modellen an Hunden^{51,53}, Ratten⁴⁸ und Mäusen¹¹⁵ ist das Kaninchenmodell ein Standardmodell zur Erforschung der Präkonditionierung. Des Weiteren wurden Western blots als etablierte Methode zum semiquantitativen Nachweis verschiedener Proteine durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte durch Immunfärbungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Calcium/Calmodulin Kinase II, Phospholamban und gegen das an Serin 16 sowie Threonin 17 phosphorylierte Phospholamban.

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Blockade der CaMK II, mit dem spezifischen Inhibitor KN-93, die Desfluran-induzierte Präkonditionierung aufhebt.

Ca²⁺ ist der zentrale second messenger myokardialer Zellen. Dabei vermittelt die CaMK II, als vorwiegende Isoform im Herzen, viele der intrazellulären Interaktionen. So werden die spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanäle, die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodinrezeptoren sowie die Wiederaufnahme des Ca²⁺ in das SR über die Ca²⁺-ATPase durch die CaMK II moduliert.²⁰ Folglich ist die CaMK II vorwiegend für die intrazelluläre Ca²⁺ Homöostase verantwortlich.

Von einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung ist jedoch bekannt, dass ihr eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens zukommt. Aus dem vermehrten intrazellulären Ca^{2+} -Anfall während der Reperfusion resultiert eine verminderte Kontraktionskraft des Myokards. Dies entsteht zunächst wegen einer reduzierten Antwort der kontraktiven Filamente auf Ca^{2+} und letztendlich einer Proteolyse der Myofilamente durch Calpain.¹¹⁶

Aus diesem Grund könnte eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Überladung die Folgen des Ischämie-Reperfusionsschadens positiv beeinflussen. Es ist bereits bekannt, dass eine bessere Ca^{2+} -Verwertung während der Reperusionsphase einen Teil der Präkonditionierungsmechanismen des Myokards darstellt und die IPC die durch den Ischämie-Reperfusionsschaden getriggerte Abschwächung der Ca^{2+} Aufnahme ins SR und die Aktivitätsminderung der Ca^{2+} -ATPase verhindert.⁶² Eine Blockade der CaMK II mit KN-93 hebt die positiven Effekte der IPC auf die kardialen Funktionen auf wie in einer Studie an isolierten Rattenherzen nach einer simulierter Ischämie an einem niedrigeren P_{\max} und höheren LVEDP im Vergleich zur Präkonditionierungsgruppe gezeigt werden konnte.⁶³

Ähnlich der Ischämischen Präkonditionierung kann auch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung die Ca^{2+} -Überladung vermindern und die linksventrikuläre Funktion verbessern.¹¹⁷

Die Ergebnisse der aktuellen Untersuchungen zeigen nun, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung durch die spezifische Blockade der CaMK II mit KN-93 aufgehoben wird. Dies lässt vermuten, dass die CaMK II einen wesentlichen Bestandteil des Signaltransduktionsweges der Desfluran-induzierten Präkonditionierung darstellt. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse der Western blot Analyse, dass die CaMK II durch KN-93 wirkungsvoll blockiert wird, da die CaMK abhängige Phosphorylierung des Phospholamban an der Stelle Thr 17 blockiert wird, während die PKA abhängige Phosphorylierung des Phospholamban an der Stelle Ser 16 nicht beeinflusst wird.¹¹⁸

Metoprolol blockiert hingegen die Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen des Phospholamban. Diese unterschiedlichen

Wirkungen auf die jeweiligen Phosphorylierungsstellen des PLB könnten für die Unterschiede zwischen Desfluran und Metoprolol hinsichtlich der Kardioprotektion verantwortlich sein. Während die Blockade der CaMK II, und damit einhergehend die Phosphorylierung des PLB an Thr 17, die Desfluran-induzierte Präkonditionierung blockiert, könnte die effektive Blockade der PKA und der CaMK II, und somit die Phosphorylierung des PLB an beiden Phosphorylierungsstellen, für die Kardioprotektion durch Metoprolol notwendig sein.

Dabei sollte man bedenken, dass eine lang anhaltende Stimulation β -adrenerger Rezeptoren mit negativen Folgen verknüpft sein kann. So wird eine übermäßige β -adrenerge Stimulation, wie sie bei chronischer Herzinsuffizienz oder Hypertension auftritt, für die Apoptose von Kardiomyozyten verantwortlich gemacht.¹¹⁹ Dieser Mechanismus wird aber nicht durch den klassischen cAMP/PKA Signaltransduktionsweg vermittelt, sondern durch eine Umschaltung auf eine PKA-unabhängige Aktivierung der CaMK II.⁹ Außerdem bewirkt eine verstärkte Aktivität der CaMK II, sei es durch einem Myokardinfarkt oder durch eine verstärkte β -adrenerge Stimulation, ein ungünstiges Remodeling des Herzens.¹²⁰

Diese Beobachtungen können dadurch erklärt werden, dass PLB während der Reperfusionphase hauptsächlich durch die CaMK II an der Stelle Thr 17 phosphoryliert wird.⁶⁴ Die Phosphorylierung des PLB geht mit einer verstärkten Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums einher, woraus eine höhere Ca^{2+} -Beladung des SR, eine vermehrte Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR und eine zytosolischen Ca^{2+} -Überladung folgt. Eine Entfernung sowie eine Phosphorylierung des PLB haben den gleichen Effekt auf die SR Ca^{2+} -ATPase, daher weisen PLB defiziente Mäuse einen verstärkten ischämischen Schaden verglichen mit Wildtypmäusen auf.¹²¹

Da Metoprolol aber die Phosphorylierung des PLB an beiden Stellen verhindert und unphosphoryliertes PLB als endogener Inhibitor der SERCA wirkt, könnte dies zu den kardioprotektiven Effekten des Metoprolols während der Reperfusion beitragen.

Demzufolge ist die CaMK II notwendig um sowohl eine Ischämische- als auch eine Anästhetika-induzierte Präkonditionierung zu vermitteln. Eine anhaltende und lang andauernde Aktivitätsblockade der CaMK II durch Betablocker könnte hingegen die schädlichen Folgen der adrenergen Stimulation und somit auch der verlängerten CaMK II Aktivierung abwenden.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass Metoprolol die Infarktgröße reduzierte, allerdings nur, wenn die höchsten Dosen des Betablockers von 1,75 und 2,5 mg/kg vor der Ischämieinduktion verwendet werden. Die Gabe von 1,0 mg/kg Metoprolol und weniger reicht nicht aus, um einen kardioprotektiven Effekt zu erzielen.

In einer anderen Studie an einem Myokardinfarktmodell des Kaninchens wurde die Infarktgröße bereits durch 1,0 mg/kg effektiv reduziert.¹²² Allerdings wurde in dieser Studie das Metoprolol nicht vor der Ischämie, sondern erst fünf Minuten vor Beginn der Reperfusionphase verabreicht. Somit resultieren hieraus möglicherweise höhere Plasmaspiegel während der Reperfusionphase, die in unserer Studie erst bei Dosen von mehr als 1,0 mg/kg erreicht werden konnten.

In einigen in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass sich eine kurzzeitige β -adrenerge Stimulation positiv auf den I/R Schaden auswirkt und eine Präkonditionierung vermitteln kann.¹²³⁻¹²⁵ So wurden beispielsweise isolierte Rattenherzen vor einer Ischämie mit Isoproterenol, einem unselektiven β -Agonisten perfundiert, was zu einer verminderten postischämischen Freisetzung der Kreatinkinase und einer besseren linksventrikulären Funktion führte. Durch die selektive Blockade des β_1 -adrenergen Rezeptors mit Atenolol sowie dem β_2 -Subtypen mit ICI 118,551 konnte gezeigt werden, dass vorwiegend β_1 -Rezeptoren für diese Form der Kardioprotektion von Bedeutung sind.¹²³

In wieweit die β -adrenerge Signaltransduktion an der Desfluran-induzierten Präkonditionierung beteiligt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dabei zeigte sich, dass Metoprolol die Desfluran-induzierte Präkonditionierung dosisabhängig abschwächt oder aufhebt.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit anderen Publikationen. Desfluran präkonditioniert humanes Myokard gegen simulierte Ischämie in vitro, wobei die nicht selektive beta-adrenerge Blockade mit Propranolol diesen Effekt aufhebt.⁸⁰ Des Weiteren verhindert die β_1 -selektive Rezeptorblockade mit Esmolol, sowie die Blockade der nachgeschalteten PKA mit H-89 die Desfluran- und Sevofluran-induzierte Präkonditionierung im Herzinfarktmodell des Kaninchens in vivo.⁹⁴

Es wurde bisher vermutet, dass die Kardioprotektion durch Betablocker auf einer Verbesserung der myokardialen Sauerstoffbilanz beruht.¹²⁶

Es ist jedoch unter Einbeziehung der vorliegenden Ergebnisse auch möglich, dass die Metoprolol induzierte Infarktgrößenreduktion nach experimenteller Ischämie von weiteren Mechanismen abhängt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bekräftigt, dass in dieser und anderen Studien zu Betablocker induzierten Infarktgrößenreduktion die positiven Effekte unabhängig von der Herzfrequenzreduktion waren.¹²⁷ Eine Arbeit zur Wiederherstellung der linksventrikulären Funktion nach Ischämie, unter Verwendung eines ultrakurzwirksamen Betablockers, bestätigte ebenfalls eine Unabhängigkeit der kardioprotektiven Wirkung von der Herzfrequenz.¹²⁸ Weitere, möglicherweise kardioprotektive Wirkungen der Beta-adrenergen Rezeptor Blockade umfassen die Hemmung der CaMK, wie in dieser Untersuchung gezeigt wurde, die Hemmung der Phospholipase A²⁷, die Verminderung der Fettsäureakkumulation vor der beta Oxidation²⁶ sowie membranstabilisierende Effekte^{129,130}. Diese Effekte des Metoprolols könnten durch die Auswirkungen der Desfluran-induzierten Präkonditionierung beeinträchtigt werden.

Die Studie von Hanouz et. al bezüglich der Bedeutung α - und β -adrenerger Rezeptoren in der Desfluran-induzierten Präkonditionierung in menschlichen Myokardzellen lässt starke Parallelen zu dem tierexperimentell erforschten Signaltransduktionsweg erkennen.^{80,94} Denn sowohl Hanouz et. al als auch Lange et. al zeigten, dass β -adrenerge Rezeptoren mit der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade an der APC beteiligt sind. Aufgrund der

weitgehenden Kongruenz der bisher gewonnenen Ergebnisse, kann davon ausgegangen werden, dass die tierexperimentell gewonnenen Daten bezüglich der APC auch beim Menschen Relevanz besitzen. So liegt die Vermutung nahe, dass der in dieser Arbeit tierexperimentell untersuchten Signaltransduktionswege auch beim Menschen eine wichtige Rolle in der APC zukommt.

Um die genauen zugrunde liegenden Mechanismen der Infarktgrößenreduktion durch Metoprolol sowie der Interaktionen mit Desfluran besser zu verstehen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Die vorliegenden Ergebnisse sollten in Zusammenhang mit verschiedenen, potentiell limitierenden Faktoren betrachtet werden. KN-93 ist ein selektiver, kompetitiver Inhibitor der Bindung des Calmodulin an die CaMK II und daher ein potenter Inhibitor der Kinaseaktivität sowie der Autophosphorylierung der CaMK II. KN-93 hat keinen Effekt auf andere Proteinkinasen¹³¹, hemmt jedoch direkt L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und K^+ -Ströme¹³². Deshalb kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Inhibition dieser Ionenströme die Ergebnisse beeinflusst hat.

Eine kurzzeitige Myokardischämie verursacht eine Kompartimentierung der CaMK II mit einer nachfolgenden Rückverteilung der CaMK II ins Zytosol während der Reperfusionphase.¹³³ So besteht die Möglichkeit, dass die Translokation der CaMK II eine Rolle bei der Desfluran-induzierten Präkonditionierung oder der Kardioprotektion durch Metoprolol spielt. Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht weiter untersucht.

In dieser Arbeit wurde der klinisch sehr oft verwendete, kardi selektive β_1 -Adrenorezeptorenblocker Metoprolol untersucht. Eine Infarktgrößenreduktion wurde nur mit sehr hohen Dosen dieses Betablockers erreicht, welche wesentlich höher sind, als die beim Menschen in der Klinik verwendeten. Die Applikation dieser extremen Dosen könnte das linksventrikuläre Pumpversagen bei zehn der Kaninchen in den Metoprololgruppen erklären. Allerdings bewirkte 0,2 mg/kg Metoprolol, vergleichbar der beim Menschen verwendeten Dosierung, keine Änderung der Infarktgröße oder der Herzfrequenz während

der Ischämie und Reperfusionphase. Als physiologischen Marker der erfolgreichen Betablockade verwendeten wir die Frequenzverminderung, diese wurde allerdings nur unter höheren Dosen Metoprolols erreicht. So mussten in dieser Arbeit, wie auch in der Studie von Feuerstein et al.¹²², höhere Dosen des Betablockers Metoprolol verwendet werden, um die gewünschte Frequenzreduktion zu erreichen.

Das linksventrikuläre ischämische Myokardareal¹¹⁰ und der koronare Kollateralblutfluss sind wichtige Einflussfaktoren auf die zu erwartende Herzinfarktgröße. Je größer das myokardiale ischämische Areal ist, desto größer ist die resultierende Infarktgröße. Zwischen der AAR in den verschiedenen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied (Tabelle 2). Der koronare Kollateralblutfluss wurde in unserem Modell nicht gemessen, denn wie eine Untersuchung zeigte ist der koronare Kollateralblutfluss im Myokard des Kaninchens vernachlässigbar.¹³⁴ So können weder Unterschiede in der AAR noch im Kollateralblutfluss einen bedeutenden Effekt auf die unterschiedlichen Infarktgrößen haben.

Des Weiteren lässt sich eine Beeinflussung der Herzinfarktgröße durch die Hintergrundnarkose mit Pentobarbital nicht sicher ausschließen. Haessler et al. haben allerdings gezeigt, dass Pentobarbital in einer Dosierung von 30 mg/kg KG/h die resultierende Infarktgröße nicht signifikant beeinflusst.¹³⁵ Außerdem muss zu einer Übertragbarkeit auf den Menschen einschränkend gesagt werden, dass es sich bei den Versuchstieren um kardial gesunde, junge Kaninchen handelt, während es sich in der klinischen Situation meist kardial vorgeschädigte, ältere Patienten handelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung durch die CaMK II abhängige Phosphorylierung des Phospholamban vermittelt wird, wohingegen die Kardioprotektion durch Metoprolol während der Reperfusion durch die Blockade der PKA und CaMK II abhängigen Phosphorylierung des Phospholamban vermittelt wird. Außerdem konnte im in vivo Herzinfarktmodell des Kaninchens gezeigt werden, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung und die Kardioprotektion durch

Metoprolol für sich alleine zwei potente Mechanismen sind um die resultierende Infarktgröße nach Ischämie zu vermindern.

Während Metoprolol nur in hohen Dosen die Herzinfarktgrößen vermindert, hebt es dosisabhängig die Desfluran-induzierte Präkonditionierung auf.

Diese Ergebnisse zeigen eine negative Interaktion zwischen der Desfluran-induzierten Präkonditionierung und der β_1 -adrenergen Rezeptorblockade, dies bedarf weiterer Untersuchungen bezüglich der zugrunde liegenden Mechanismen.

Diese Erkenntnisse könnten möglicherweise in der Zukunft auch die peri- und intraoperative Behandlung kardialer Risikopatienten beeinflussen. Denn eine Kombination aus Betablockern und volatilen Anästhetika ist eine weit verbreitete kardioprotektive Strategie. Wie sich allerdings in dieser tierexperimentellen Untersuchung zeigte, schwächt eine Betablockade die kardioprotektiven Effekte der APC dosisabhängig ab oder hebt sie auf. Daher wäre für die Patienten der Benefit möglicherweise größer, wenn sie entweder eine hochdosierte Betablockertherapie mit einem totalen intravenösen Anästhesieverfahren oder eine Anästhetika-induzierte Präkonditionierung ohne zusätzlich Betablocker verabreicht bekommen.

Bisher bleibt jedoch unklar, in wieweit diese experimentellen Erkenntnisse wirklich auf den Patienten übertragen werden können. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

5 Zusammenfassung

Die Präkonditionierung ist ein endogener Schutzmechanismus, bei dem die Toleranz einer Zelle gegen die Auswirkungen eines späteren ischämischen Schadens erhöht wird. Volatile Anästhetika sind in der Lage den durch die Ischämie verursachten Gewebsschaden zu vermindern, indem sie diesen Schutzmechanismus aktivieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der CaMK II in der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung und in der durch Metoprolol vermittelten Kardioprotektion, sowie der dosisabhängige Effekt von Metoprolol auf die Kardioprotektion und die Desfluran-induzierte Präkonditionierung. Dazu wurde der spezifische Inhibitor der CaMK II, KN-93, sowie der kardioselektive Betablocker Metoprolol in verschiedenen Dosierungen, jeweils vor der Koronarokklusion alleine oder zusammen mit Desfluran, verabreicht. Die Versuche wurden in einem in vivo Herzinfarktmodell an weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Die Resultate dieser Untersuchungen ergaben, dass KN-93 die Infarktgröße nicht reduzierte und die Desfluran-induzierte Präkonditionierung aufgehoben wurde. Die effektive Hemmung der CaMK II wurde durch Western blot Analysen bestätigt. Die weiteren Ergebnisse ergaben, dass erst eine Metoprolol-Dosis von 1,75 mg/kg und 2,5 mg/kg die Myokardinfarktgröße signifikant verminderte. Die Western blot Analyse zeigte eine effektive Blockade beider Phosphorylierungsstellen des PLB. Außerdem wurde die Desfluran-induzierte Präkonditionierung durch 0,2 mg/kg Metoprolol abgeschwächt, durch 1,0 mg/kg, 1,75 mg/kg oder 2,5 mg/kg Metoprolol wurde sie vollständig aufgehoben.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung über die Calcium/Calmodulin Kinase II abhängige Phosphorylierung des Phospholamban vermittelt wird. Dagegen wird die Metoprolol-induzierte Kardioprotektion während der Reperfusion durch die Blockade der PKA- und CaMK II-abhängigen Phosphorylierung des PLB vermittelt. Außerdem deuten die Ergebnisse auf eine negative Interaktion zwischen der Desfluran-induzierten Präkonditionierung und der beta-adrenergen Blockade hin.

6 Literaturverzeichnis

1. Mangano,D.T., Layug,E.L., Wallace,A. & Tateo,I. Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N. Engl. J Med* **335**, 1713-1720 (1996).
2. Fleisher,L.A. *et al.* ACC/AHA 2006 guideline update on perioperative cardiovascular evaluation for noncardiac surgery: focused update on perioperative beta-blocker therapy: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery): developed in collaboration with the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society for Vascular Medicine and Biology. *Circulation* **113**, 2662-2674 (2006).
3. Warltier,D.C., Pagel,P.S. & Kersten,J.R. Approaches to the prevention of perioperative myocardial ischemia. *Anesthesiology* **92**, 253-259 (2000).
4. Gerhardstein,B.L., Puri,T.S., Chien,A.J. & Hosey,M.M. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**, 10361-10370 (1999).
5. Simmerman,H.K. & Jones,L.R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.* **78**, 921-947 (1998).
6. Marx,S.O. *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365-376 (2000).
7. Sulakhe,P.V. & Vo,X.T. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol. Cell Biochem.* **149-150**, 103-126 (1995).
8. Lohse,M.J., Engelhardt,S. & Eschenhagen,T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* **93**, 896-906 (2003).
9. Wang,W. *et al.* Sustained beta(1)-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circulation Research* **95**, 798-806 (2004).

10. Zhu,W.Z. *et al.* Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest* **111**, 617-625 (2003).
11. Ferrero,P. *et al.* Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J. Mol. Cell Cardiol.* **43**, 281-291 (2007).
12. Babu,Y.S., Bugg,C.E. & Cook,W.J. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **204**, 191-204 (1988).
13. Ikura,M. *et al.* Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* **256**, 632-638 (1992).
14. Maier,L.S. & Bers,D.M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**, 919-939 (2002).
15. Lai,Y., Nairn,A.C. & Greengard,P. Autophosphorylation Reversibly Regulates the Ca²⁺/Calmodulin-Dependence of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 4253-4257 (1986).
16. Meyer,T., Hanson,P.I., Stryer,L. & Schulman,H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* **256**, 1199-1202 (1992).
17. Zhang,T. & Brown,J.H. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 476-486 (2004).
18. Jett,M.F., Schworer,C.M., Bass,M. & Soderling,T.R. Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 354-360 (1987).
19. Bers,D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205 (2002).
20. Maier,L.S. & Bers,D.M. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.* **73**, 631-640 (2007).
21. Lee,K.S. Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 3941-3945 (1987).
22. Wehrens,X.H.T., Lehnart,S.E., Reiken,S.R. & Marks,A.R. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation Research* **94**, E61-E70 (2004).

23. Maier, L.S. *et al.* Transgenic CaMKII δ overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* **92**, 904-911 (2003).
24. Brittsan, A.G. & Kranias, E.G. Phospholamban and cardiac contractile function. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 2131-2139 (2000).
25. Karow, T. & Lang-Roth, R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2007. (2007).
26. Igarashi, N. *et al.* Influence of beta-adrenoceptor blockade on the myocardial accumulation of fatty acid tracer and its intracellular metabolism in the heart after ischemia-reperfusion injury. *Circ. J.* **70**, 1509-1514 (2006).
27. Trotz, M., Jellison, E.J. & Hostetler, K.Y. Propranolol inhibition of the neutral phospholipases of rat heart mitochondria, sarcoplasmic reticulum and cytosol. *Biochemical Pharmacology* **36**, 4251-4256 (1987).
28. Gottlieb, S.S., McCarter, R.J. & Vogel, R.A. Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **339**, 489-497 (1998).
29. Poldermans, D. *et al.* The effect of bisoprolol on perioperative mortality and myocardial infarction in high-risk patients undergoing vascular surgery. Dutch Echocardiographic Cardiac Risk Evaluation Applying Stress Echocardiography Study Group. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1789-1794 (1999).
30. Wallace, A. *et al.* Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group. *Anesthesiology* **88**, 7-17 (1998).
31. Lee, T.H. *et al.* Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation* **100**, 1043-1049 (1999).
32. Lindenauer, P.K. *et al.* Perioperative beta-blocker therapy and mortality after major noncardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* **353**, 349-361 (2005).
33. Yang, H., Raymer, K., Butler, R., Parlow, J. & Roberts, R. The effects of perioperative beta-blockade: results of the Metoprolol after Vascular Surgery (MaVS) study, a randomized controlled trial. *Am. Heart J.* **152**, 983-990 (2006).
34. Juul, A.B. *et al.* Effect of perioperative beta blockade in patients with diabetes undergoing major non-cardiac surgery: randomised placebo controlled, blinded multicentre trial. *BMJ* **332**, 1482 (2006).
35. Brady, A.R., Gibbs, J.S., Greenhalgh, R.M., Powell, J.T. & Sydes, M.R. Perioperative beta-blockade (POBBLE) for patients undergoing infrarenal

- vascular surgery: results of a randomized double-blind controlled trial. *J. Vasc. Surg.* **41**, 602-609 (2005).
36. The POISE Trial, I. Rationale, design, and organization of the PeriOperative ISchemic Evaluation (POISE) Trial: A randomized controlled trial of metoprolol versus placebo in patients undergoing noncardiac surgery. *American Heart Journal* **152**, 223-230 (2006).
 37. Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C. & Lazdunski, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 4666-4670 (1995).
 38. Kehl, F., Payne, R.S., Roewer, N. & Schurr, A. Sevoflurane-induced preconditioning of rat brain in vitro and the role of KATP channels. *Brain Res.* **1021**, 76-81 (2004).
 39. Payne, R.S., Akca, O., Roewer, N., Schurr, A. & Kehl, F. Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats. *Brain Res.* **1034**, 147-152 (2005).
 40. Li, G., Chen, S., Lu, E. & Luo, W. Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann. Thorac. Surg.* **71**, 631-635 (2001).
 41. Kalb, R., Schober, P., Schwarte, L.A., Weimann, J. & Loer, S.A. Preconditioning, but not postconditioning, with Sevoflurane reduces pulmonary neutrophil accumulation after lower body ischaemia/reperfusion injury in rats. *Eur. J. Anaesthesiol.* **25**, 454-459 (2008).
 42. Peralta, C. *et al.* Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* **28**, 768-773 (1998).
 43. Beck-Schimmer, B. *et al.* A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann. Surg.* **248**, 909-918 (2008).
 44. Torras, J. *et al.* Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.* **61**, 2218-2227 (2002).
 45. Obal, D. *et al.* Effect of sevoflurane preconditioning on ischaemia/reperfusion injury in the rat kidney in vivo. *Eur. J. Anaesthesiol.* **23**, 319-326 (2006).
 46. Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136 (1986).

47. Kehl,F. *et al.* Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology* **96**, 675-680 (2002).
48. Schultz,J.E., Hsu,A.K. & Gross,G.J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ. Res.* **78**, 1100-1104 (1996).
49. Liu,G.S. *et al.* Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* **84**, 350-356 (1991).
50. Banerjee,A. *et al.* Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ. Res.* **73**, 656-670 (1993).
51. Kersten,J.R., Schmeling,T.J., Pagel,P.S., Gross,G.J. & Warltier,D.C. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* **87**, 361-370 (1997).
52. Kloner,R.A. & Jennings,R.B. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* **104**, 2981-2989 (2001).
53. Kuzuya,T. *et al.* Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ. Res.* **72**, 1293-1299 (1993).
54. Marber,M.S., Latchman,D.S., Walker,J.M. & Yellon,D.M. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* **88**, 1264-1272 (1993).
55. Baxter,G.F., Goma,F.M. & Yellon,D.M. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res. Cardiol.* **92**, 159-167 (1997).
56. Rizvi,A. *et al.* Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am. J. Physiol* **277**, H874-H884 (1999).
57. Zhao,Z.Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **285**, H579-H588 (2003).
58. Zaugg,M., Lucchinetti,E., Uecker,M., Pasch,T. & Schaub,M.C. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br. J. Anaesth.* **91**, 551-565 (2003).

59. Tanaka,K. *et al.* Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* **97**, 1485-1490 (2002).
60. Kawamura,S., Yoshida,K., Miura,T., Mizukami,Y. & Matsuzaki,M. Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon, which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am. J. Physiol* **275**, H2266-H2271 (1998).
61. Yellon,D.M. & Downey,J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* **83**, 1113-1151 (2003).
62. Osada,M., Netticadan,T., Kawabata,K., Tamura,K. & Dhalla,N.S. Ischemic preconditioning prevents I/R-induced alterations in SR calcium-calmodulin protein kinase II. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **278**, H1791-H1798 (2000).
63. Benter,I.F. *et al.* Signal transduction mechanisms involved in cardiac preconditioning: Role of Ras-GTPase, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and epidermal growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biochemistry* **268**, 175-183 (2005).
64. Vittone,L., Mundina-Weilenmann,C., Said,M., Ferrero,P. & Mattiazzi,A. Time Course and Mechanisms of Phosphorylation of Phospholamban Residues in Ischemia-reperfused Rat Hearts. Dissociation of Phospholamban Phosphorylation Pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **34**, 39-50 (2002).
65. Warltier,D.C., al Wathiqui,M.H., Kampine,J.P. & Schmeling,W.T. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* **69**, 552-565 (1988).
66. Larach,D.R. & Schuler,H.G. Potassium channel blockade and halothane vasodilation in conducting and resistance coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 72-81 (1993).
67. Cason,B.A., Shubayev,I. & Hickey,R.F. Blockade of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels eliminates isoflurane-induced coronary artery vasodilation. *Anesthesiology* **81**, 1245-1255 (1994).
68. Kersten,J.R. *et al.* Glyburide, a KATP channel antagonist, attenuates the cardioprotective effects of isoflurane in stunned myocardium. *Anesth. Analg.* **83**, 27-33 (1996).
69. Kersten,J.R. *et al.* Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology* **85**, 794-807 (1996).

70. Cope,D.K., Impastato,W.K., Cohen,M.V. & Downey,J.M. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* **86**, 699-709 (1997).
71. Piriou,V. *et al.* Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br. J. Anaesth.* **89**, 486-491 (2002).
72. Lange,M. *et al.* Desflurane-Induced Preconditioning Has a Threshold That Is Lowered by Repetitive Application and Is Mediated by beta(2)-Adrenergic Receptors. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* (2009).
73. Tonkovic-Capin,M. *et al.* Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K(ATP) channels. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **283**, H61-H68 (2002).
74. Tanaka,K. *et al.* Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* **100**, 525-531 (2004).
75. Smul,T.M. *et al.* Time Course of Desflurane-induced Preconditioning in Rabbits. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* **24**, 91-98 (2010).
76. Smul,T.M. *et al.* Desflurane-Induced Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Depends On Timing. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* **23**, 600-606 (2009).
77. Preckel,B. *et al.* Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br. J. Anaesth.* **81**, 905-912 (1998).
78. Schlack,W., Preckel,B., Stunneck,D. & Thamer,V. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *Br. J. Anaesth.* **81**, 913-919 (1998).
79. Kersten,J.R. *et al.* Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **86**, 1128-1139 (1997).
80. Hanouz,J.L. *et al.* Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* **97**, 33-41 (2002).
81. Ludwig,L.M. *et al.* Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology* **98**, 705-711 (2003).
82. Toller,W.G., Kersten,J.R., Gross,E.R., Pagel,P.S. & Warltier,D.C. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of

- inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* **92**, 1400-1407 (2000).
83. Ludwig,L.M., Weihrauch,D., Kersten,J.R., Pagel,P.S. & Warltier,D.C. Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology* **100**, 532-539 (2004).
84. Ismaeil,M.S., Tkachenko,I., Hickey,R.F. & Cason,B.A. Colchicine inhibits isoflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* **91**, 1816-1822 (1999).
85. Mullenheim,J. *et al.* Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* **96**, 934-940 (2002).
86. Tanaka,K. *et al.* Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* **98**, 935-943 (2003).
87. Toller,W.G. *et al.* Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **92**, 1731-1739 (2000).
88. Smul,T.M. *et al.* Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide. *Anesthesiology* **105**, 719-725 (2006).
89. Alcindor,D., Krolkowski,J.G., Pagel,P.S., Warltier,D.C. & Kersten,J.R. Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. *Anesthesiology* **100**, 547-554 (2004).
90. Piriou,V. *et al.* Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* **100**, 581-588 (2004).
91. Raphael,J., Rivo,J. & Gozal,Y. Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br. J. Anaesth.* **95**, 756-763 (2005).
92. Zhong,L. & Su,J.Y. Isoflurane activates PKC and Ca(2+) -calmodulin-dependent protein kinase II via MAP kinase signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* **96**, 148-154 (2002).
93. Horimoto,H., Saltman,A.E., Gaudette,G.R. & Krukenkamp,I.B. Nitric oxide-generating beta-adrenergic blocker nipradilol preserves postischemic cardiac function. *Ann. Thorac. Surg.* **68**, 844-849 (1999).

94. Lange, M. *et al.* Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* **105**, 503-510 (2006).
95. Suematsu, Y., Anttila, V., Takamoto, S. & del Nido, P. Cardioprotection afforded by ischemic preconditioning interferes with chronic beta-blocker treatment. *Scand. Cardiovasc. J.* **38**, 293-299 (2004).
96. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Spahn, D.R., Pasch, T. & Schaub, M.C. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* **97**, 4-14 (2002).
97. Belevych, A.E., Juranek, I. & Harvey, R.D. Protein kinase C regulates functional coupling of beta1-adrenergic receptors to Gi/o-mediated responses in cardiac myocytes. *FASEB J.* **18**, 367-369 (2004).
98. Deutsch, E. *et al.* Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* **82**, 2044-2051 (1990).
99. Kloner, R.A. *et al.* Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* **91**, 37-45 (1995).
100. Julier, K. *et al.* Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* **98**, 1315-1327 (2003).
101. Garcia, C. *et al.* Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br. J. Anaesth.* **94**, 159-165 (2005).
102. Meco, M., Cirri, S., Gallazzi, C., Magnani, G. & Cossetta, D. Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **32**, 319-325 (2007).
103. De Hert, S.G. *et al.* Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* **101**, 299-310 (2004).
104. De Hert, S.G. *et al.* Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* **99**, 314-323 (2003).
105. De Hert, S.G. *et al.* Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* **101**, 9-20 (2004).

106. Jakobsen,C.J., Berg,H., Hindsholm,K.B., Faddy,N. & Sloth,E. The influence of propofol versus sevoflurane anesthesia on outcome in 10,535 cardiac surgical procedures. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **21**, 664-671 (2007).
107. Symons,J.A. & Myles,P.S. Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia* **97**, 127-136 (2006).
108. Yu,C.H. & Beattie,W.S. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can. J. Anaesth.* **53**, 906-918 (2006).
109. Warltier,D.C., Zyvoloski,M.G., Gross,G.J., Hardman,H.F. & Brooks,H.L. Determination of experimental myocardial infarct size. *J. Pharmacol. Methods* **6**, 199-210 (1981).
110. Ytrehus,K. *et al.* Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am. J. Physiol* **267**, H2383-H2390 (1994).
111. Doorley,B.M., Waters,S.J., Terrell,R.C. & Robinson,J.L. MAC of I-653 in beagle dogs and New Zealand white rabbits. *Anesthesiology* **69**, 89-91 (1988).
112. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
113. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
114. Banerjee,A. *et al.* Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ. Res.* **73**, 656-670 (1993).
115. Redel,A. *et al.* Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth. Analg.* **106**, 384-91, table (2008).
116. Bolli,R. & Marban,E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiological Reviews* **79**, 609-634 (1999).
117. An,J.Z. *et al.* Anesthetic preconditioning enhances Ca²⁺ handling and mechanical and metabolic function elicited by Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibition in isolated hearts. *Anesthesiology* **105**, 541-549 (2006).
118. Said,M., Mundina-Weilenmann,C., Vittone,L. & Mattiazzi,A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is

- different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **444**, 801-809 (2002).
119. Yang, Y. *et al.* Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H3065-H3075 (2006).
120. Zhang, R. *et al.* Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature Medicine* **11**, 409-417 (2005).
121. Cross, H.R., Kranias, E.G., Murphy, E. & Steenbergen, C. Ablation of PLB exacerbates ischemic injury to a lesser extent in female than male mice: protective role of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H683-H690 (2003).
122. Feuerstein, G. *et al.* Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model. *Eur J Pharmacol.* **351**, 341-350 (1998).
123. Frances, C. *et al.* Role of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc. Pharmacol.* **41**, 396-405 (2003).
124. Nasa, Y., Yabe, K. & Takeo, S. Beta-adrenoceptor stimulation-mediated preconditioning-like cardioprotection in perfused rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **29**, 436-443 (1997).
125. Lochner, A., Genade, S., Tromp, E., Podzuweit, T. & Moolman, J.A. Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation* **100**, 958-966 (1999).
126. Gorman, M.W., He, M.X. & Sparks, H.V. Adenosine Formation During Hypoxia in Isolated Hearts: Effect of Adrenergic Blockade. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **26**, 1613-1623 (1994).
127. Warltier, D.C., Gross, G.J., Jesmok, G.J., Brooks, H.L. & Hardman, H.F. Protection of ischemic myocardium: comparison of effects of propranolol, bevantolol and N-dimethyl propranolol on infarct size following coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Cardiology* **66**, 133-146 (1980).
128. Kimura-Kurosawa, S. *et al.* Cardioprotective effect and mechanism of action of landiolol on the ischemic reperfused heart. *Journal of Anesthesia* **21**, 480-489 (2007).
129. Boucher, M., Chapuy, E. & Duchene-Marullaz, P. Membrane stabilizing activity and [beta]-adrenoceptor antagonist-induced bradycardia in conscious dogs. *European Journal of Pharmacology* **211**, 343-349 (1992).

130. Takeo,S., Yamada,H., Tanonaka,K., Hayashi,M. & Sunagawa,N. Possible involvement of membrane-stabilizing action in beneficial effect of beta adrenoceptor blocking agents on hypoxic and posthypoxic myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* **254**, 847-856 (1990).
131. Sumi,M. *et al.* The Newly Synthesized Selective Ca²⁺/Calmodulin Dependent Protein Kinase-II Inhibitor Kn-93 Reduces Dopamine Contents in Pc12H Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **181**, 968-975 (1991).
132. Anderson,M.E. *et al.* KN-93, an Inhibitor of Multifunctional Ca⁺⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase, Decreases Early Afterdepolarizations in Rabbit Heart. *J Pharmacol Exp Ther* **287**, 996-1006 (1998).
133. Uemura,A., Naito,Y. & Matsubara,T. Dynamics of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II following acute myocardial ischemia - translocation and autophosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **297**, 997-1002 (2002).
134. Maxwell,M.P., Hearse,D.J. & Yellon,D.M. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **21**, 737-746 (1987).
135. Haessler,R. *et al.* Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **28**, 1574-1580 (1994).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Franz Kehl für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Ausdrücklicher Dank gebührt dem Betreuer dieser Arbeit Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Lange für die sehr gute Zusammenarbeit, die konstruktive Kritik sowie die stete Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Roewer für die Möglichkeit, in seiner Klinik diese Dissertation anzufertigen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Virginija Jazbutyte für die sehr gute Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden sowie bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Lange für die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Verena Maria Schnupp
Geburtstag	15.05.1984 in Bad Mergentheim

Schulbildung

09/1990-08/1994	Grund- und Hauptschule Grünsfeld
09/1994-06/2003	Abitur Matthias-Grünewald-Gymnasium, Tauberbischofsheim

Freiwilliges Soziales Jahr

09/2003-04/2004	Bund der Deutschen Katholischen Jugend und Caritas-Krankenhaus, Innere Medizin, Bad Mergentheim
-----------------	---

Studium

04/2004-05/2010	Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
03/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Ärztin

Würzburg, 15. Juni 2010