

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

**Die Beteiligung der Peroxysomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren α und γ am
zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Johannes Schmidt
aus Basel

Würzburg, März 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Lange

Korreferent: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2011

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Präkonditionierung	1
1.1.1	Zeitverlauf der Präkonditionierung.....	2
1.1.2	Signaltransduktion des SWOP	3
1.2	Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren	6
1.2.1	Physiologische und pharmakologische Aspekte.....	6
1.2.2	PPAR und Präkonditionierung	7
1.3	Hypothese	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Verabreichung von Desfluran.....	9
2.2	Narkose und Überwachung.....	9
2.2.1	Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose.....	9
2.2.2	Instrumentierung.....	10
2.2.3	Induktion von Ischämie und Reperfusion.....	10
2.3	Protokoll	11
2.3.1	<i>In-vivo</i> Herzinfarktmodell des Kaninchens	11
2.3.2	Bestimmung der Herzinfarktgröße	12
2.4	Biochemische Untersuchungen	13
2.4.1	Messung von 15d-Prostaglandin J ₂	14
2.4.2	Auftrennung in zytosolische und nukleäre Zellfraktion	15
2.4.3	Messung der PPAR-DNA-Bindungsaktivität	20
2.4.4	Bestimmung von Nitrit (NO ₂ ⁻) und Nitrat (NO ₃ ⁻)	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Infarktgröße	24
3.2	15d-Prostaglandin J ₂	25
3.3	PPAR-DNA-Bindungsaktivität	26
3.4	NO _x	27
4	Diskussion.....	28
4.1	Infarktgröße	28
4.2	Signaltransduktion	29
4.2.1	Aktivierung der PPAR durch Desfluran	29
4.2.2	Signaltransduktion proximal von PPAR	30
4.2.3	Signaltransduktion distal von PPAR	32
4.3	Klinische Relevanz	33
5	Zusammenfassung	35
6	Literaturverzeichnis	37
7	Abbildungsverzeichnis	51

Abkürzungsverzeichnis

AAR	engl.: area-at-risk
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMPP	Adamantyl-1,2-Dioxetan-phenylphosphat
AP	alkalische Phosphatase
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
BL	engl.: Baseline
CK	Creatinkinase
COX-2	Cyclooxygenase 2
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EMLA	engl.: eutectic mixture of local anesthetics
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK 1/2	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase 1/2
FiO ₂	inspiratorischer Sauerstoffanteil
FWOP	engl.: first window of protection
GLUT 4	Glukosetransporter 4
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HF	Herzfrequenz
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie und Reperfusion
IgG	Immunglobulin G
IKK	engl.: inhibitor of κ B-Kinase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPC	ischämische Präkonditionierung
KAO	Koronararterienokklusion
kD	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LBD	engl.: ligand binding domain
LDH	Laktatdehydrogenase
LT	Leukotrien
MAC	engl.: minimal alveolar concentration
MAP	engl.: mean arterial pressure

Abkürzungsverzeichnis Fortsetzung:

MAP	engl.: mitogen-activated protein
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mPTP	engl.: mitochondrial permeability transition pore
MWCO	engl.: molecular weight cut-off
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T-cells
NF κ B	engl.: nuclear factor κ B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PBP	PPAR-bindendes Protein
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PC	Präkonditionierung
PG	Prostaglandin
PGC-1	PPAR γ -Coaktivator 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
PPC	pharmakologisch-induzierte Präkonditionierung
PPRE	engl.: peroxysome-proliferator response element
RLU	engl.: relative light units
RNS	engl.: reactive nitrogen species
ROS	engl.: reactive oxygen species
RPP	engl.: rate-pressure-product
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SRC-1	Steroid-Rezeptor Coaktivator 1
SWOP	engl.: second window of protection
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

1 Einleitung

Die kardiovaskulären Erkrankungen gehören zu den häufigsten Diagnosen von hospitalisierten Patienten in den Industrieländern¹. Die perioperative Morbidität und Mortalität aufgrund dieser Begleiterkrankungen stellen schon heute ein großes Problem dar² und werden infolge der demographischen Entwicklung in den nächsten Jahrzehnten noch deutlich zunehmen³. Daher spielen die Entwicklung perioperativer Strategien und die Erforschung kardioprotektiver Mechanismen eine entscheidende Rolle.

1.1 Präkonditionierung

Ein bekannter Mechanismus, der das Herz vor einer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (I/R) schützt, ist die Präkonditionierung (engl.: preconditioning, PC). Darunter versteht man eine erhöhte Widerstandsfähigkeit des Myokards gegenüber einer ischämischen Schädigung, bedingt durch die Änderung der phänotypischen Ausstattung der Kardiomyozten in Reaktion auf einen präkonditionierenden Stimulus⁴. Murry *et al.* demonstrierten als Erste, dass vier subletale, je fünfminütige Zyklen von Ischämie und Reperfusion vor einer nachfolgenden, langandauernden I/R eine bis zu 75prozentige Infarktgrößenreduktion bewirken⁵. Dieser Effekt wurde als „Ischämische Präkonditionierung“ (engl.: ischemic preconditioning, IPC) bekannt. Während der nachfolgenden intensiven Forschung konnte gezeigt werden, dass ebenso verschiedene pharmakologische Stimuli in der Lage sind, das Herz zu präkonditionieren. Kersten *et al.* konnten 1997 für Isofluran als erstes volatiles Anästhetikum einen solchen kardioprotektiven Effekt nachweisen⁶. Diese Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (engl.: anesthetic-induced preconditioning, APC) zeigte sich später auch für andere volatile Anästhetika wie Sevofluran⁷ und Desfluran⁸.

1.1.1 Zeitverlauf der Präkonditionierung

Die Präkonditionierung teilt sich in ein sogenanntes erstes Fenster (engl.: first window of protection, FWOP) und ein zweites Fenster (engl.: second window of protection, SWOP) bzw. späte Präkonditionierung (engl.: late PC). Abbildung 1-1 zeigt exemplarisch den Zeitverlauf der IPC. Das FWOP beginnt etwa 30 Minuten nach Einwirkung des stimulierenden Agens und hält für etwa 2-3 Stunden an. Das SWOP zeigt sich nach 24h und vermittelt Protektion für weitere 48h⁹. Einen nahezu identischen Verlauf zeigten Smul *et al.* für die Desfluran-induzierte Präkonditionierung¹⁰. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Signalmechanismen des zweiten Fensters der APC.

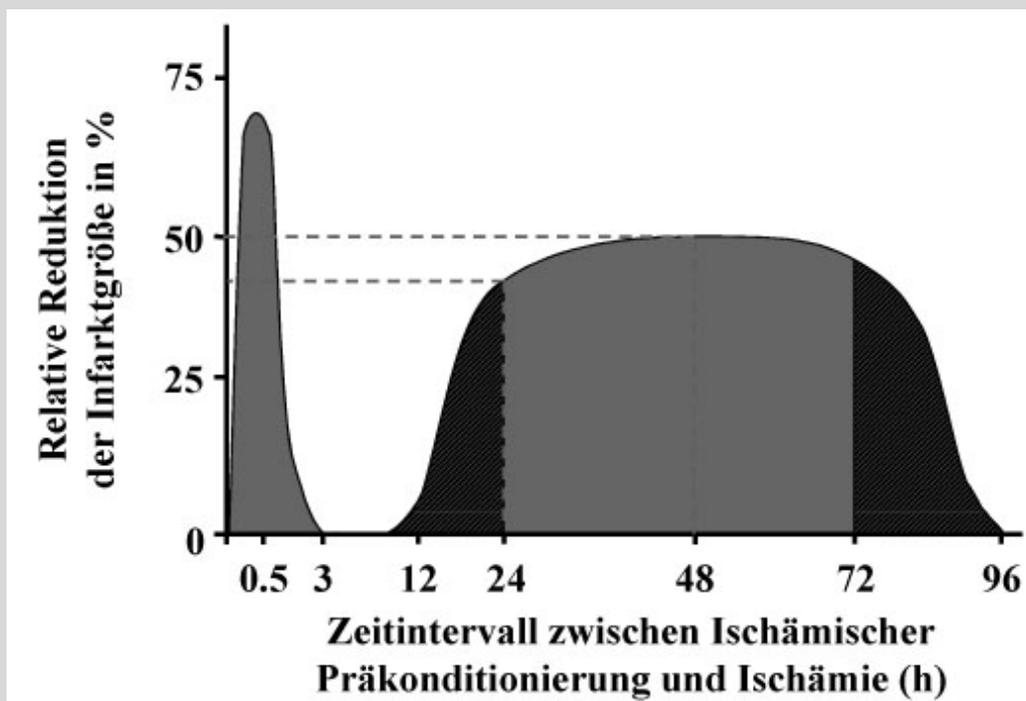


Abbildung 1-1: Zeitverlauf der ischämischen Präkonditionierung

Die ischämische Präkonditionierung (IPC) teilt sich auf in ein erstes Fenster (FWOP) und ein zweites Fenster (SWOP). Das Diagramm zeigt die relative Reduktion der Herzinfarktgröße von präkonditionierten Tieren gegenüber nicht-präkonditionierten Kontroll-Tieren in Abhängigkeit vom zeitlichen Intervall zwischen ischämischem Stimulus (IPC) und Ischämie

1.1.2 Signaltransduktion des SWOP

Die Signaltransduktion des SWOP der IPC und der APC ist sehr ähnlich¹¹. In Anlehnung an die späte IPC lassen sich die Bestandteile der Signalkaskade in Trigger und Mediatoren unterteilen (siehe Abb. 1-2)⁴. Die Trigger der PC sind Metaboliten und Liganden, die infolge des Einwirkens des Stimulus entstehen. Dazu gehören u. a. NO (Stickstoffmonoxid)^{12;13} sowie freie Sauerstoffradikale (ROS, engl.: reactive oxygen species)¹⁴. Sie aktivieren eine Signalkaskade, die zur nachfolgenden Aktivierung und/oder Entstehung von Mediatoren der späten PC führt. Diese sind Ausdruck des defensiven Phänotyps der Zelle und vermitteln die Protektion. Dazu zählen im Fall des SWOP u. a. die NOS (engl.: nitric oxide synthase)¹⁵ und COX-2 (Cyclooxygenase 2)¹⁶⁻¹⁸. Die besondere Bedeutung von NO wird unter Abschnitt 1.1.2.2 näher erläutert.

1.1.2.1 Prostaglandine

Die COX-2 synthetisiert in zwei Reaktionsschritten Prostaglandin H₂ (PGH₂)¹⁹. Alle anderen Prostaglandine (PG) werden in der Folge aus PGH₂ hergestellt. Hierbei kommen mehrere der Prostaglandine als Mediatoren der Präkonditionierung in Frage²⁰. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns auf 15d-PGJ₂, ein potenter Aktivator der Peroxysomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR²¹; siehe 1.2), für den Kliewer *et al.* eine Stimulation von sowohl PPAR α als auch γ aufzeigen konnten²². Neben ausgeprägten anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften^{21;23} besitzt 15d-PGJ₂ kardioprotektive Wirkungen, welche in zwei unabhängigen Studien nachgewiesen wurden^{24;25}. Ebenso bewirkt 15d-PGJ₂ eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials²⁶ – ein antiapoptotischer Mechanismus, der auch im Rahmen der Präkonditionierung von Bedeutung ist (siehe 1.1.2.3). Ob der kardioprotektive Effekt von 15d-PGJ₂ über Stimulation der PPAR vermittelt wird, konnte bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden.

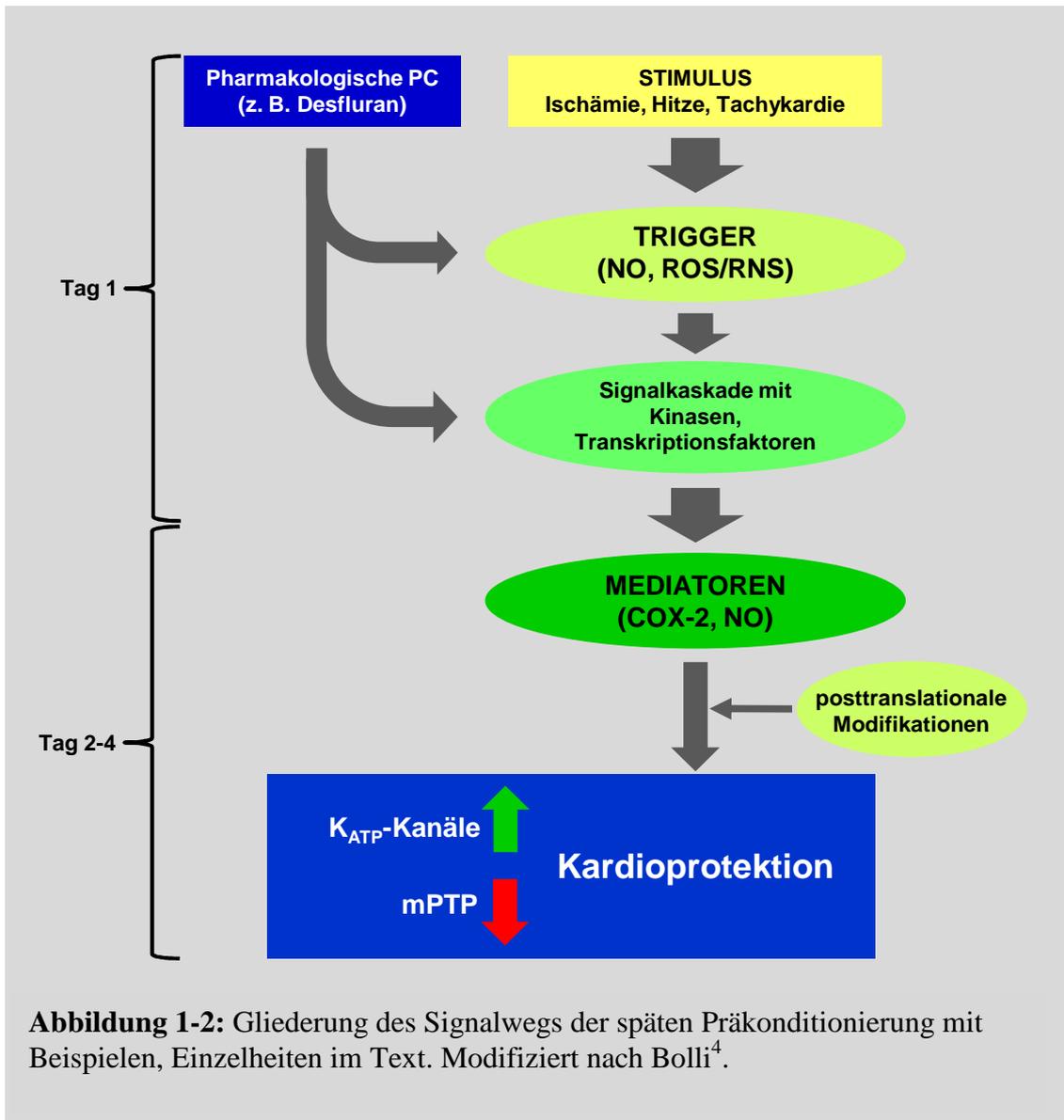


Abbildung 1-2: Gliederung des Signalwegs der späten Präkonditionierung mit Beispielen, Einzelheiten im Text. Modifiziert nach Bolli⁴.

1.1.2.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) wird im Organismus über die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin synthetisiert. Diese Reaktion wird durch die NOS vermittelt, von der drei Isoformen beschrieben sind: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) sowie die induzierbare NOS (iNOS)^{27;28}. Die nNOS ist nur in sehr niedriger Konzentration im Myokard nachweisbar während die eNOS konstitutiv exprimiert wird, sowohl in den Endothelzellen der Koronararterien wie auch in den Kardiomyozyten

selbst²⁹. Unter physiologischen Bedingungen ist iNOS in Kardiomyozyten nicht nachweisbar, ihre Expression wird aber durch bestimmte Stimuli induziert³⁰. Die Existenz einer mitochondrialen NO-Synthase (mtNOS) wird derzeit kontrovers diskutiert³¹.

NO nimmt eine führende Rolle in den Signalwegen der Kardioprotektion ein – so konnte für NO eine Beteiligung am ersten und am zweiten Fenster der Präkonditionierung demonstriert werden. Smul *et al.* gelang der Nachweis, dass NO als Mediator an der Entstehung des FWOP der Desfluran-induzierten Präkonditionierung beteiligt ist³². Im Rahmen des SWOP zeigt sich eine duale Rolle: kurz nach dem präkonditionierenden Stimulus wirkt NO als Trigger^{13;33}, in der Folge auch als Mediator^{10;15}. Dieser Umstand wird als „NO-Hypothese der späten Präkonditionierung“ bezeichnet³⁴. Welche Isoform an der Entstehung des SWOP beteiligt ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Chiari *et al.* konnten die eNOS als Trigger und Mediator des Isofluran-induzierten SWOP identifizieren, in der gleichen Studie wurden nNOS und iNOS als Mediator ausgeschlossen³⁵. Allerdings zeigte sich in einer anderen Untersuchung die iNOS als Mediator des Isofluran-induzierten SWOP³⁶.

NO entfaltet als second messenger autokrine und parakrine Wirkungen. Via cGMP werden K_{ATP} -Kanäle aktiviert - ein entscheidender Schritt im Signalweg der Präkonditionierung (siehe 1.1.2.3)³⁷. Allerdings werden nicht alle Wirkungen über die cGMP vermittelt. Durch NO-abhängige Protein-S-Nitrosylierung wird eine direkte molekulare Modifikation des Proteoms der Zelle erreicht³⁸. In den letzten Jahren haben sich die Hinweise auf eine bedeutende Rolle der Nitrosylierung bei der Vermittlung der Kardioprotektion weiter verdichtet³⁹. Hierbei kommen verschiedene Signalwege in Betracht, beispielsweise Modifikation von mitochondrialen Proteinen wie z. B. Komplex I der Atmungskette⁴⁰ oder der Cytochrom-c-Oxidase⁴¹. Auch der Calcium-Haushalt kann über die Nitrosylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen beeinflusst werden⁴². Schließlich kann sich durch Modifikation von Caspase-3⁴³ oder Thioredoxin⁴⁴ ein direkter anti-apoptotischer Effekt entfalten.

1.1.2.3 Effektoren

Die Effektoren des FWOP und des SWOP scheinen größtenteils überein zu stimmen⁴⁵. So bewirkt beispielsweise die NO-vermittelte Öffnung von K_{ATP} -Kanälen eine Reduktion des mitochondrialen Ca^{2+} -Überschusses³⁷. Durch diesen Mechanismus wird im Zusammenspiel mit noch unbekanntem Signalmechanismen eine Prävention der Öffnung der mPTP (engl.: mitochondrial permeability transition pore), sowie die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials^{46;47} erreicht. Der so erzielte Erhalt der mitochondrialen Funktionalität als auch Integrität dient dann als entscheidender Schlüsselmechanismus in der Ausbildung der Kardioprotektion^{45;48}.

1.2 Peroxysomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Peroxysomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind im Nukleus der Zelle beheimatete Transkriptionsfaktoren und werden der Familie der intrazellulären Rezeptoren zugeordnet. Bisher sind drei verschiedene Isoformen der Rezeptoren identifiziert, PPAR α , β und γ . PPAR α wird in vielen Geweben exprimiert, darunter Leber, Niere und Herzmuskel⁴⁹. PPAR β zeigt sich ubiquitär^{49;50}, während PPAR γ vor allem in weißem Fettgewebe zu finden ist. Ebenso ist diese Isoform im Dickdarm und Herzmuskel vorhanden, allerdings in einer etwa zehnfach niedrigeren Konzentration⁵⁰. Die PPAR bilden nach Aktivierung ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR)⁵¹ und binden in der Folge an ein spezifisches PPRE (engl.: peroxisome proliferator response element) der DNA, um die Transkription der entsprechenden Zielgene zu regulieren⁵².

1.2.1 Physiologische und pharmakologische Aspekte

PPAR nehmen eine wichtige Stellung in der Regulation des zellulären Stoffwechsels und Energiehaushalts ein. PPAR α beispielsweise reguliert die Transkription der Acyl-CoA-Oxidase, dem Schlüsselenzym der β -Oxidation von Fettsäuren⁵³. Ebenso wird die Expression von Apolipoproteinen⁵⁴⁻⁵⁶ und der Lipoproteinlipase⁵⁷ induziert. Darauf beruht der cholesterinsenkende Effekt der Fibrate (PPAR α -Agonisten). PPAR γ

beeinflusst hingegen durch die Transkription der Phosphoenolpyruvatkinase⁵⁸ und des insulinabhängigen Glukosetransporters 4 (GLUT 4) die Glukoseaufnahme in die Zelle⁵⁹ - ein Effekt, der von den Antidiabetika der Glitazonfamilie ausgenutzt wird (PPAR γ -Agonisten).

Die genannten Wirkungen stellen nur einen Teil der PPAR-vermittelten Effekte dar. Darüber hinaus können PPAR auch auf Inflammation, Apoptose und oxidativen Stress Einfluss nehmen^{60;61}.

1.2.2 PPAR und Präkonditionierung

Eine ganze Reihe an Studien konnte bisher einen kardioprotektiven Effekt für PPAR-Agonisten demonstrieren^{24;25;62-66}. Zuerst beobachteten Yue *et al.* eine Infarktgrößenreduktion im *in-vivo*-Herzinfarktmodell nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon, einem PPAR γ -Agonisten⁶². Kurz danach konnte die gleiche Arbeitsgruppe für einen PPAR α -Agonisten ebenfalls eine Infarktgrößenreduktion zeigen⁶³. Dieser Effekt wurde in beiden Fällen auf anti-inflammatorische Wirkungen zurückgeführt. Die Inhibition von inflammatorischen Reaktionen durch PPAR-Agonisten wurde schon vielfach beschrieben und sind in einem Übersichtsartikel von Delerive *et al.* zusammengefasst⁶⁰. Beispielsweise vermitteln PPAR-Agonisten eine verminderte Expression von IL-6, die durch eine inhibitorische Interaktion der PPAR mit NF κ B (engl.: nuclear factor κ B) erklärt wird⁶⁷. Die Inhibition von NF κ B durch PPAR-Aktivierung konnten Zingarelli *et al.* als Mechanismus der 15d-PGJ₂-vermittelten Kardioprotektion identifizieren. Dabei zeigten sie weiterhin eine gesteigerte Aktivität von PPAR γ , eine erhöhte Phosphorylierung der anti-apoptotischen Kinase Akt sowie eine verminderte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten ins Myokard²⁵.

2002 untersuchten Wayman *et al.* die kardioprotektiven Eigenschaften verschiedener PPAR-Agonisten: Rosiglitazon, Ciglitazon, Pioglitazon, Clofibrat, WY14643 (ein PPAR α -Agonist), Prostaglandin A₁ und 15d-PGJ₂. Für alle konnte eine infarktgrößenreduzierende Wirkung im *in-vivo*-Modell demonstriert werden. Dabei erzielte die exogene Applikation von 15d-PGJ₂ die stärkste Infarktgrößenreduktion. Als

Signaltransduktionsmechanismus ergab sich hierbei ebenfalls eine Inhibition von NFκB. Allerdings zeigte die Studie auch eine verminderte Expression der iNOS und eine verminderte Nitrosylierung von Proteinen²⁴. Dieser Befund widerspricht jedoch der unter 1.1.2.2 erläuterten Theorie über die Rolle von NO und damit der Mehrzahl der existierenden Studien. So konnte die Forschergruppe um Pernow in drei Untersuchungen die Abhängigkeit der durch PPAR vermittelten Präkonditionierung von einer erhöhten NO-Produktion nachweisen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression und Phosphorylierung der eNOS nach Applikation von PPAR α- oder γ-Agonisten im ischämischen Myokard⁶⁴⁻⁶⁶.

1.3 Hypothese

Unter Berücksichtigung oben genannter Ausführungen stellten wir die Hypothese auf, dass das zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung durch eine erhöhte Produktion von 15d-PGJ₂ mit der nachfolgenden Aktivierung von PPARα und γ vermittelt wird.

2 Material und Methoden

Die Versuchsgenehmigung wurde unter dem Aktenzeichen 93/07 von der zuständigen Regierung von Unterfranken erteilt.

Alle Versuche wurden anhand eines etablierten *in-vivo*-Herzinfarktmodells^{32;68} an männlichen weißen Neuseeland-Kaninchen durchgeführt (9-12 Wochen, 2-2,5kg KG). Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums gehalten und erhielten flüssige und feste Nahrung ad libidum.

2.1 Verabreichung von Desfluran

Alle Tiere wurden 24h vor Instrumentierung randomisiert einer experimentellen Gruppe zugeordnet. Hiernach wurde den Tieren für die Dauer von 30 Minuten 1.0 MAC (8,9 Vol%) Desfluran⁶⁹ ($FiO_2 = 0,21$) oder Raumluft in einer Narkose-Induktionskammer verabreicht. Nach Abklingen der Narkose wurden die Tiere wieder in den Tierstall verbracht.

2.2 Narkose und Überwachung

2.2.1 Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose

Nach vorhergehender Lokalanästhesie mittels EMLA-Pflaster wurde eine 24G-Venenverweilkanüle in eine marginale Ohrvene platziert. Es erfolgte eine intravenöse Einleitung sowie die Aufrechterhaltung der Narkose mittels Natrium-Pentobarbital (Narcoren®, 30mg/kg Körpergewicht; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland). Die Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des Palpebralreflexes sowie des Fußwegzieh-Reflexes der Hinterpfote beurteilt. Bei Bedarf wurde die Narkose durch die zusätzliche Gabe von Pentobarbital i.v. vertieft.

2.2.2 Instrumentierung

Nach einer medianen Inzision des Halses wurde die Trachea kanüliert und eine kontrollierte, maschinelle Beatmung mittels eines Luft-Sauerstoff-Gemisch ($\text{FiO}_2 = 0,3$) eingeleitet. Zur Durchführung arterieller Blutgasanalysen wurde eine 24G Venenverweilkanüle in die auriculare Arterie platziert. Die Anpassung der Beatmungsparameter (Atemfrequenz und Tidalvolumen) im Versuchsverlauf orientierte sich an der kontinuierlichen Überwachung des endexpiratorischen CO_2 -Partialdrucks, sowie an regelmäßig durchgeführten arteriellen Blutgasanalysen (s. Versuchsprotokoll, Abb. 2-1).

Zur Überwachung der Herzfrequenz wurde über die rechte A. carotis communis ein Katheter in den linken Ventrikel eingebracht. Zur Überwachung des arteriellen Blutdrucks wurde ein weiterer Katheter in der Aorta abdominalis über die rechte A. femoralis platziert. Die Überwachung dieser hämodynamischen Parameter erfolgte kontinuierlich und wurde zu bestimmten Zeitpunkten während der Äquilibrationsphase (Baseline, BL), der Koronararterienokklusion (KAO) und der Reperfusion (nach 60, 120 und 180 Minuten Reperfusion) dokumentiert. Zur Aufzeichnung der Herzstromkurve wurde ein 3-Kanal-EKG angelegt. Desweiteren wurde über eine rektal platzierte Temperatursonde und einen Servo-kontrollierten OP-Tisch die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und auf physiologischem Niveau gehalten ($38,5^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$)⁷⁰. Zur Aufrechterhaltung einer Normovolämie wurde NaCl 0,9% i.v. zugeführt.

2.2.3 Induktion von Ischämie und Reperfusion

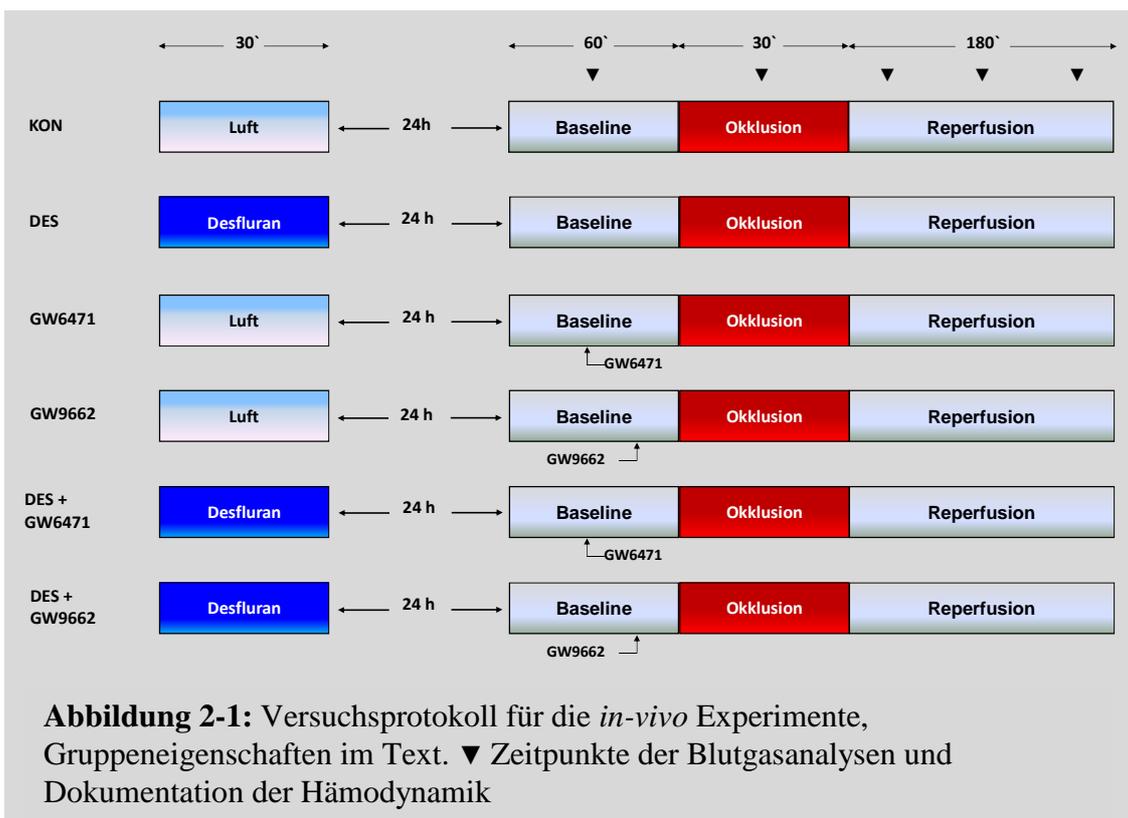
Nach linkslateraler Thorakotomie und Eröffnung des Perikards erfolgte die Umschlingung eines prominenten Astes der linken Koronararterie mittels chirurgischem Nahtmaterial (5-0 Seide). Beide Enden des Fadens wurden durch einen dünnen, kurzen Plastikschlauch gezogen. Durch Zuziehen der so entstandenen Schlinge konnte eine linksseitige Koronararterienokklusion (KAO) ausgelöst werden. Zur Verifizierung der kardialen Ischämie dienten die ST-Hebungen im EKG sowie die beobachtete epikardiale Zyanose. Durch Lösen der Schlinge wurde die Reperfusion erreicht und durch

Rückbildung der beobachteten EKG-Veränderungen sowie durch eine epikardiale Hyperämie bestätigt.

2.3 Protokoll

2.3.1 *In-vivo* Herzinfarktmodell des Kaninchens

Alle Tiere der *in-vivo*-Experimente wurden randomisiert sechs verschiedenen Gruppen zugeordnet. Wie in Abb. 2-1 dargestellt erhielten alle Tiere nach Instrumentierung eine 60-minütige Äquilibrationsphase (Baseline, BL), eine 30-minütige Koronararterienokklusion (KAO), gefolgt von einer 180-minütigen Reperfusion.



Versuchsgruppen:

- Kontrollgruppe (KON): keine weitere Intervention.
- Desflurangruppe (DES): Applikation von 1,0 MAC (8,9 Vol%) Desfluran für 30 Minuten 24h vor Instrumentierung (siehe 2.1).
- GW6471: Applikation des spezifischen PPAR α -Inhibitor GW6471 (4mg/kg i.p.) 30 Minuten vor KAO.
- GW9662: Applikation des spezifischen PPAR γ -Inhibitor GW 9662 (1mg/kg i.v.) 15 Minuten vor KAO.
- DES+GW6471: Applikation von 1,0 MAC (8,9 Vol%) Desfluran für 30 Minuten 24h vor Instrumentierung in Kombination mit dem spezifischen PPAR α -Inhibitor GW6471 (4mg/kg i.p.) 30 Minuten vor KAO.
- DES+GW9662: Applikation von 1,0 MAC (8,9 Vol%) Desfluran für 30 Minuten 24h vor Instrumentierung in Kombination mit dem spezifischen PPAR γ -Inhibitor GW 9662 (1mg/kg i.v.) 15 Minuten vor KAO.

2.3.2 Bestimmung der Herzinfarktgröße

Die Differenzierung zwischen Risikoareal (engl. area-at-risk, AAR) und tatsächlich nekrotischem Infarktareal erfolgte mittels TTC-Färbung (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)⁷¹.

Zunächst wurde am Ende der Reperusionsphase die Schlinge um die linke Koronararterie nochmals zugezogen und eine Patent-Blau-Lösung (2ml i.v.; 0,1 mg/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zur Anfärbung des regelrecht perfundierten Myokards appliziert. Danach wurden die Tiere mittels einer letalen Dosis Pentobarbital euthanasiert und das Herz entnommen.

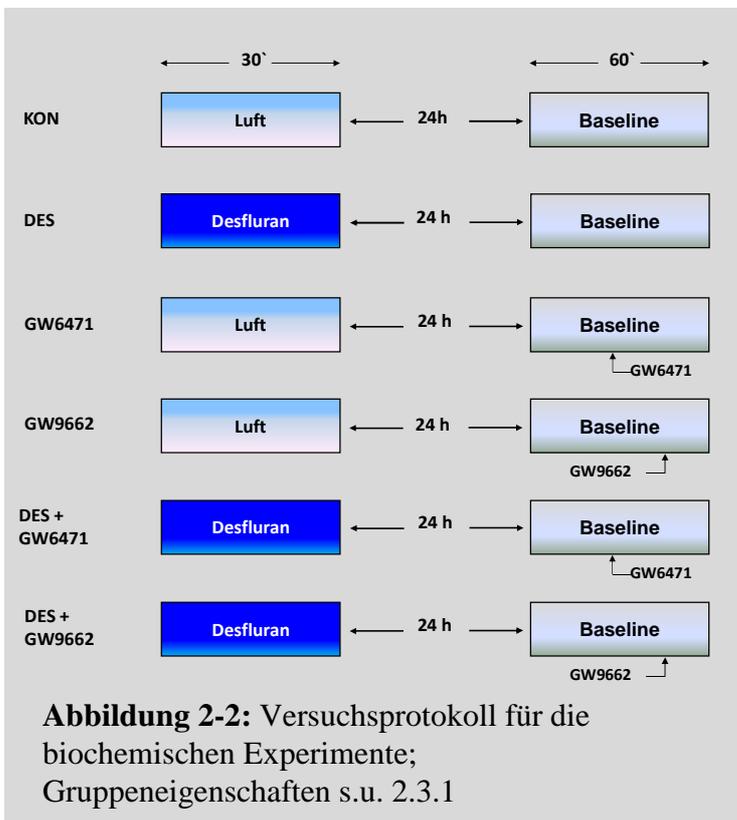
Der linke Ventrikel wurde präpariert und das ischämische Areal (rot, AAR) vom normal-perfundierten Gewebe (blau) getrennt. Beide Anteile wurden für 20 Minuten in einer 37°C warmen TTC-Lösung inkubiert (100mg/l in Phosphatpuffer, pH 7,4; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Durch NAD- bzw. NADP-abhängige Oxidasen wird hierbei TTC zu Formazan reduziert und nimmt eine rote Farbe an. Somit erscheint vitales Myokard in der Folge rot während nekrotisches Herzmuskelgewebe

eine grau-weißliche Färbung aufweist. Anschließend wurden die Proben für 24h zur Fixierung in Formaldehyd-Lösung (3,5%; Otto Fischer GmbH & Co. KG; Saarbrücken, Deutschland) verbracht.

Danach wurden nekrotische und vitale Areale der AAR unter einem Stereomikroskop (Leica MS5; Leica Mikroskopie Systeme AG, Heerbrugg, Schweiz) sorgfältig voneinander getrennt. Mittels einer digitalen Mikrowaage (Sartorius R 180 D; Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) erfolgte die gravimetrische Bestimmung der Gesamt-AAR, des nekrotischen Anteils der AAR, der regelrecht perfundierten Anteile der AAR, des nicht-ischämischen Teils des linken Ventrikels sowie des Gesamtgewichts des linken Ventrikels. Diese Bestimmungen wurden von einer in Bezug auf die Versuchsgruppe geblindeten Person durchgeführt.

2.4 Biochemische Untersuchungen

Analog zu den *in-vivo*-Versuchen wurden sechs Gruppen für die molekularbiologischen Untersuchungen gebildet. Hierbei wurden die Tiere bei gleichem Versuchsaufbau nach



Abschluss der Baselinephase durch eine letale Dosis Pentobarbital getötet und das Herz entnommen (Protokoll siehe Abb. 2-2). Der linke Ventrikel wurde abpräpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das so gewonnene Myokardgewebe bei -80°C aufbewahrt.

2.4.1 Messung von 15d-Prostaglandin J₂

Der myokardiale Gehalt an 15d-PGJ₂ wurde mittels eines kompetitiven enzymgekoppelten Immunabsorptionsassay (EIA) bestimmt (Biomol GmbH; Hamburg, Deutschland). Der Assay beruht auf der durch die Alkalische Phosphatase (AP) vermittelten Reaktion von farblosem p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu p-Nitrophenol, welches eine gelbe Farbe aufweist. Die AP liegt hierbei als Konjugat mit 15d-PGJ₂ vor (AP-15d-PGJ₂). Dieser Komplex wird exogen zugeführt und konkurriert mit dem 15d-PGJ₂ der zu messenden Probe um die Bindung an einen gegen 15d-PGJ₂ gerichteten Antikörper. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird durch einen an der Wandung der Reaktionsschächte der Mikrotiterplatte befestigten Zweitantikörper gebunden und so ebenfalls fixiert. Nach Entfernung des überschüssigen Antigens kann durch Zugabe des Substrats (pNPP) die Farbreaktion ausgelöst werden. Abschließend wird die Absorption bei 405nm bestimmt. Bei diesem kompetitiven EIA ist die Absorption umgekehrt proportional zum endogenen Gehalt der Probe an 15d-PGJ₂.

Inhalt des Komplett-Sets:

96-well-Mikrotiter-Platte, beschichtet mit polyklonalem Anti-Kaninchen-IgG (Spezies: Ziege)

Anti-15d-PGJ₂ (Spezies: Kaninchen)

15d-PGJ₂ konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP-PGJ₂)

15d-PGJ₂ Standard, 1µg/ml

p-Nitrophenylphosphat (pNPP, Konzentration nicht angegeben)

Assay-Puffer, Tris-gepufferte Elektrolytlösung (weitere Zus. nicht angegeben)

Wasch-Puffer, Tris-gepufferte Lösung + Detergenzien (weitere Zus. nicht angegeben)

300mg Herzgewebe wurden mit dem mitgelieferten Assay-Puffer versetzt und mit einem Homogenisator (IKA® RW14 basic, IKA® Werke GmbH & CO. KG; Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 Minuten bei 12.000g, 4°C zentrifugiert (Sepatech Megafuge 1,0R; Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde in einem Filtrationsgefäß (Roti-Spin Mini, MWCO

30kD; Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland) zur Entfernung der im Lysat enthaltenen IgG-Antikörper (Molekülmasse ca. 144kD) ultrafiltriert. Das so gewonnene, konzentrierte und gereinigte Lysat wurde für den EIA eingesetzt.

Die Durchführung des Assays erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 100µl des Lysats mit 50µl einer Lösung von 15d-PGJ₂-AP versetzt. Anschließend wurden 10µl des gegen 15d-PGJ₂ gerichteten Antikörpers in einer Konzentration von 1:100 hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Nach Inkubation (1h, Raumtemperatur) wurde die Platte dreimal mit Wasch-Puffer (1x) gewaschen. Nach Zugabe von 20µl der pNPP-Lösung erfolgte der Farbumschlag. Anschließend wurde die Absorption bei 405nm mit einem Photometer (Sunrise®, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen. Mittels einer Verdünnungsreihe ausgehend vom 15d-PGJ₂-Standard wurde eine Eichgerade ermittelt und so die Konzentration von 15d-PGJ₂ bestimmt.

2.4.2 Auftrennung in zytosolische und nukleäre Zellfraktion

Die Auftrennung in zytosolische und nukleäre Fraktionen erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls von Cargnoni *et al.*⁷².

Verwendete Lösungen:

(Chemikalien erworben bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

PBS pH 7,4

137mM NaCl

2,7mM KCl

10mM Na₂HPO₄

1,76mM KH₂PO₄

Puffer A (hypoton)

10mM HEPES pH 7,9
10mM KCl
0,1mM EDTA
1% (v/v) Triton X-100
1mM DTT
1mM PMSF
Proteasen-Inhibitor-Cocktail
(Complete Mini; Roche AG, Basel,
Schweiz)

Puffer B (hyperton)

20mM HEPES pH 7,9
0,4mM NaCl
0,1mM EDTA
1% (v/v) Triton X-100
1mM DTT
1mM PMSF
20% (v/v) Glycerol
Proteasen-Inhibitor Cocktail
(Complete Mini; Roche AG, Basel,
Schweiz)

Laemmli-Puffer

0,125M Tris pH 7,4
4% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerol
10% (v/v) 2-Mercaptoethanol
0,004% (w/v) Bromphenol-Blau

Elektrophorese-Puffer

25mM Tris pH 7,4
0,19M Glycin
0,5% (w/v) SDS

Transfer-Puffer

25mM Tris pH 7,4
0,19M Glycin
0,5% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

300mg Herzgewebe wurden zunächst in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mit 1ml Puffer A versetzt. Nach der Homogenisierung mit einem elektronischem Laborrührer (IKA® RW14 basic, IKA® Werke GmbH & CO. KG; Staufen, Deutschland) wurde das Gemisch für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 10.000g bei 4°C für 5 Minuten. Der Überstand - die zytosolische

Fraktion - wurde bei -80°C eingefroren. Das die Zellkerne enthaltende Sediment wurde in Puffer A resuspendiert, nochmals mit 10.000g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Nun wurde das Sediment in $150\mu\text{l}$ Puffer B gelöst. Dieses Gemisch wurde für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 20.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand - die nukleäre Fraktion - wurde in frische Gefäße umgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Auftrennung der Zelllysate wurden nach jeder Präparation mittels Immunoblotting Markerproteine bestimmt. Als Marker für die zytosolische Fraktion nutzten wir GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 36 kD), als Marker der Kernfraktion diente PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase, 116 kD) - ein nukleäres Enzym welches u. a. an der DNA-Reparatur beteiligt ist⁷³.

Zuerst wurde die Proteinkonzentration der Lysate mit der Methode nach Bradford bestimmt⁷⁴. $800\mu\text{l}$ H_2O , $1\mu\text{l}$ Lysat und $200\mu\text{l}$ Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden zusammen in eine Kunststoffküvette gegeben und durchmischt. Mit einem Photometer wurde die Absorption bei 595nm gemessen und anhand einer Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt. Nun wurde jeweils eine Menge von $60\mu\text{g}$ Protein in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit dem entsprechenden Puffer (zytosolische Fraktion: Puffer A; nukleäre Fraktion: Puffer B) auf ein Gesamtvolumen von $20\mu\text{l}$ aufgefüllt. Anschließend wurden noch einmal $20\mu\text{l}$ Laemmli-Puffer mit $0,5\%$ β -Mercapto-Ethanol hinzugefügt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei $10.000\text{U}/\text{m}$ (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) war die Probenvorbereitung abgeschlossen und die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) konnte vorbereitet werden.

Trenngel 12%

1,7ml H₂O
2ml Acrylamid (30%)
1,2ml Tris-Puffer 1,5M pH 8,8
50µl SDS (Sodiumdodecylsulfat, 10%)
15µl APS (Ammoniumpersulfat, 10%)
7,5µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Sammelgel 4%

1,55ml H₂O
0,3ml Acrylamid (30%)
0,65ml Tris-Puffer 0,5M pH 6,8
25µl SDS (10%)
7,5µl APS (10%)
4µl TEMED

Die Gele wurden in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) befestigt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Dann wurden die Proben in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei 80Volt gestartet. Nachdem die Lauffront das Sammelgel passiert hatte, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

Anschließend wurden die Proteine mittels eines Nassblot-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde blasenfrei auf das Gel gelegt und zwischen Blotting-Papier (330g/m²) und 2 mit Transferpuffer getränkte Schwämme in eine Kassette gespannt. Die Kassette wurde senkrecht in eine Blotkammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gestellt und komplett mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 250mA.

Am nächsten Morgen wurde die Membran aus der Kassette genommen und für eine Stunde in Milch (5% Milchpulver in PBS) zur Blockade unspezifischer Bindungen inkubiert.

Nun erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern gegen PARP und GAPDH (beide Cell Signaling Technology Inc., Boston, USA). Beide Antikörper wurden mit 5% Milchpulver in PBS verdünnt, bei Anti-PARP genügte eine Konzentration von 1:500, bei Anti-GAPDH eine Konzentration von 1:3000. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal für fünf Minuten in PBS + 0,05% Tween 20 gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Für beide Proteine wurde hierbei ein Anti-Maus-IgG-

Antikörper (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Konzentration betrug 1:5000, die Verdünnung erfolgte wiederum mit 5% Milchpulver in PBS. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Dann wurde die Membran wieder dreimal für je fünf Minuten mit PBS + 0,05% Tween 20 gespült.

Zur Herstellung der Substrat-Lösung für die Meerrettich-Peroxidase wurden zwei Fertig-Lösungen verwendet (Amersham™ ECL™; GE Healthcare, München, Deutschland), die nur noch im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt werden mussten. Dieses Gemisch wurde für genau eine Minute auf die Membran gegeben und anschließend mit Blotting-Papier abgetupft. Die Detektion der Lichtemission erfolgte mit einem Röntgenfilm (Fuji Super RX; Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) der anschließend in einem Automaten (Kodak X-omat 2000; Kodak, New York, USA) entwickelt wurde. Abb. 2-3 zeigt repräsentative Banden für die nukleären und zytosolischen Fraktionen. Anhand der Immunoblots konnte von einer stark angereicherten nukleären Fraktion ausgegangen werden.

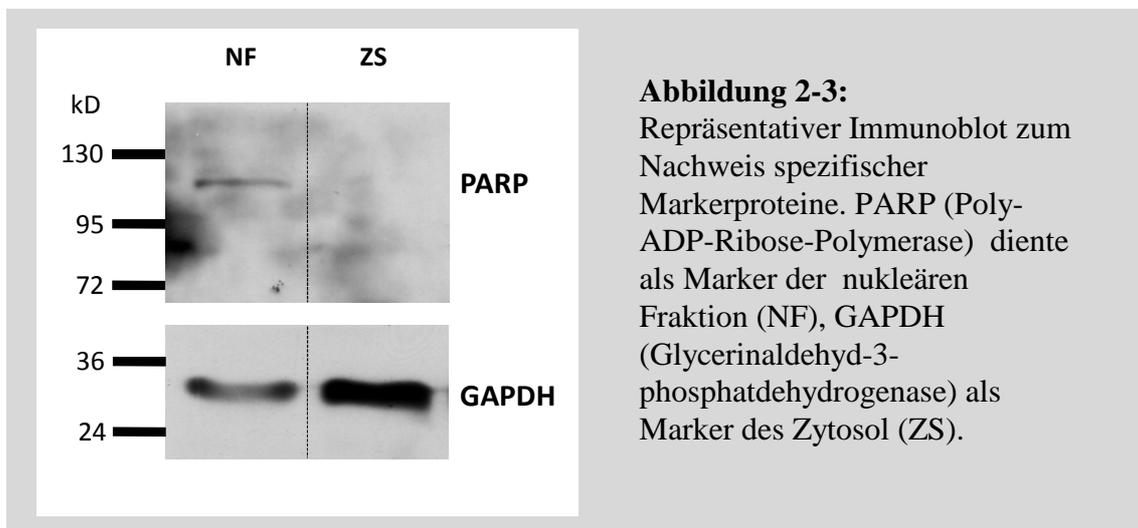


Abbildung 2-3:

Repräsentativer Immunoblot zum Nachweis spezifischer Markerproteine. PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) diente als Marker der nukleären Fraktion (NF), GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) als Marker des Zytosol (ZS).

2.4.3 Messung der PPAR-DNA-Bindungsaktivität

Die nukleären Extrakte wurden zur Durchführung des PPAR-DNA-Assays verwendet. Die Bestimmung der PPAR-DNA-Bindungsaktivität erfolgte hierbei mittels eines Chemilumineszenz-basierten Komplett-Sets (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der Assay beruht auf der Spaltung von AMPP (Adamantyl-1,2-Dioxetan-Phenylphosphat) durch die Alkalische Phosphatase (AP) und misst die hierbei entstehende Emission von Licht⁷⁵.

Auf einer Mikrotiterplatte befinden sich immobilisierte PPRE (engl.: peroxysome-proliferator response element), d. h. DNA-Fragmente, die den Bindungspartnern der PPARs entsprechen. Auf diese Platte wird das nukleäre Extrakt aufgebracht. Die im Lysat enthaltenen PPARs binden an das PPRE. Nach Entfernen des überschüssigen Lysats wird die Mikrotiterplatte mit dem gegen PPAR gerichteten Erstantikörper inkubiert. Hiernach wird die überschüssige Lösung entfernt und der mit Alkalischer-Phosphatase konjugierte Zweitantikörper aufgebracht. Nach Zugabe von AMPP kann nun die Lichtentwicklung mit einem Luminometer bestimmt werden.

Inhalt des Komplett-Sets:

96-well-Mikrotiterplatte, beschichtet mit einem PPRE

Assay-Puffer (Zusammensetzung nicht angegeben)

Wasch-Puffer (Zusammensetzung nicht angegeben)

Anti-PPAR-Antikörper, Spezies: Maus

AP-konjugierter Zweitantikörper, anti-Maus-IgG, Spezies: Ziege

AMPP-Lösung (Konzentration nicht angegeben)

Die Durchführung des Assays erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden 90µl des Assay-Puffers mit 10µl des nukleären Extrakts auf die Mikrotiterplatte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Reaktionsschächte geleert und fünfmal mit jeweils 200µl Wasch-Puffer gewaschen. Nun wurden 100µl des Erstantikörpers in einer Konzentration von 1:50 in

die Reaktionsschächte zugegeben und wieder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsschächte wieder geleert und fünfmal mit 200µl Wasch-Puffer (1x) gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe des AP-konjugierten Zweitantikörpers (100µl, Konzentration 1:100) und eine anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde wiederum fünfmal mit 200µl Wasch-Puffer (1x) gewaschen und die Reaktionsschächte komplett von Flüssigkeit geleert. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl der AMPP-Lösung. Nach kurzer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Lichtemission bei 540nm mittels eines Luminometers (Infinte® 200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen werden.

2.4.4 Bestimmung von Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻)

NO wird in biologischen Systemen sehr schnell abgebaut ($t_{1/2} \sim 4\text{sec}$)⁷⁶. Die Endprodukte des NO-Abbaus sind Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻). Somit dient die Summe aus Nitrit und Nitrat (NO_x) als Surrogatparameter der NO-Spiegel im Gewebe. Diese Summe wurde in der aktuellen Studie mittels eines kolorimetrischen Assays bestimmt (Cayman Chemicals Europe, Tallinn, Estland). Der Assay basiert auf dem Nachweis von Nitrit mittels der Griess-Reaktion⁷⁷. Zuerst erfolgt mit Hilfe der Nitrat-Reduktase die Umwandlung des gesamten Nitrats zu Nitrit. Danach wird in einem ersten Reaktionsschritt Nitrit mit Sulfanilamid (Griess-Reagenz 1) konjugiert. In einem zweiten Schritt reagiert dieses Molekül mit 1-Naphthylethylendiamin (Griess Reagenz 2) zu einem violetten Azofarbstoff. Dessen Absorption kann bei 540nm gemessen werden und ist proportional zur Konzentration von NO_x im Gewebe.

Inhalt des Komplett-Sets:

Assay-Puffer (20mM KPO₄, pH 7,4)

Nitrat-Reduktase (in Assay-Puffer; Konzentration nicht angegeben)

Kofaktoren für Laktatdehydrogenase (in Assay-Puffer; Zus. nicht angegeben)

Nitrat-Standard 2mM (in Assay-Puffer)

Laktatdehydrogenase (LDH, in Assay-Puffer; Konz. nicht angegeben)

Inhalt des Kompletts-Sets (Fortsetzung):

Griess-Reagenz 1 (Sulfanilamid, Konz. nicht angegeben)

Griess-Reagenz 2 (Naphthylethyldiamin, Konz. nicht angegeben)

96-well-Mikrotiter-Platte

Zuerst wurden 300mg Herzgewebe in 1,5ml Assay-Puffer homogenisiert (IKA® RW14 basic, IKA® Werke GmbH & CO. KG; Staufen, Deutschland). Anschließend wurde das Gemisch mit 10.000g bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in spezielle Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) umgefüllt und mit einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) mit 100.000g, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde zur Entfernung der im Lysat enthaltenen NO-Synthasen (Molekülmasse: 133-155kD) in einem Filtrationsgefäß (Roti-Spin Mini, MWCO 30kD; Carl Roth, Karlsruhe) ultrafiltriert (12.000g, 4°C, 2h). Das so gereinigte Lysat wurde für den Assay eingesetzt.

Die Durchführung des Assays erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde eine frische 1mM NADPH-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in Assay-Puffer angesetzt. 10µl der NADPH-Lösung und 10µl der Nitrat-Reduktase-Lösung wurden mit 60µl des Lysats in einem Reaktionsschacht zur Umwandlung des Nitrats für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10µl der LDH-Kofaktoren-Lösung und 10 µl der LDH-Lösung zum Verbrauch des überschüssigen NADPH hinzugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50µl des Griess-Reagenz 1 zugegeben und sofort danach 50µl Griess-Reagenz 2. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 540nm mit einem Photometer (Sunrise®, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt. Aus Nitrat-Lösungen bekannter Konzentration, die denselben Arbeitsschritten unterzogen wurden, konnte eine Eichgerade ermittelt werden und so die Konzentration von NO_x im Gewebe errechnet werden.

3 Ergebnisse

Es wurden 75 Tiere instrumentiert um 72 erfolgreiche Experimente abzuschließen. Ein Tier wurde wegen einer AAR unter 15% des linksventrikulären Gewichts ausgeschlossen, zwei weitere Tiere verstarben an therapierefraktärem Kammerflimmern. Wie aus Tabelle 3-1 ersichtlich, ergaben sich bei der Auswertung der hämodynamischen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Hämodynamik

	BL		KAO		Reperfusion					
					60 min	120 min	180 min			
HF (min⁻¹)										
KON	278	± 10	252	± 10	240	± 9	234	± 10	241	± 9
DES	268	± 12	266	± 4	257	± 7	257	± 8	254	± 8
GW6471	261	± 11	251	± 10	236	± 10	237	± 10	240	± 10
GW9662	261	± 8	251	± 11	242	± 8	235	± 8	227	± 15
DES+GW6471	269	± 7	267	± 9	260	± 10	253	± 10	251	± 11
DES+GW9662	262	± 8	263	± 10	249	± 11	248	± 12	251	± 10
MAP (mmHg)										
KON	67	± 3	63	± 4	63	± 3	61	± 3	63	± 4
DES	74	± 3	71	± 3	68	± 3	68	± 4	66	± 7
GW6471	64	± 3	62	± 2	62	± 2	71	± 6	68	± 4
GW9662	77	± 4	74	± 3	70	± 4	67	± 6	62	± 5
DES+GW6471	65	± 3	61	± 3	64	± 4	61	± 4	60	± 4
DES+GW9662	75	± 4	70	± 6	65	± 5	63	± 8	58	± 7
RPP (HRxMAP/1000)										
KON	19	± 1	16	± 1	15	± 2	14	± 1	16	± 1
DES	20	± 1	19	± 1	18	± 1	17	± 1	16	± 1
GW6471	16	± 1	15	± 1	14	± 1	16	± 1	16	± 2
GW9662	20	± 2	19	± 1	17	± 1	16	± 2	15	± 2
DES+GW6471	18	± 1	17	± 1	17	± 2	16	± 2	16	± 2
DES+GW9662	19	± 1	16	± 1	16	± 1	15	± 2	14	± 3

Tabelle 3-1: systemische hämodyn. Parameter. Daten angegeben als Mittelwert ± SEM

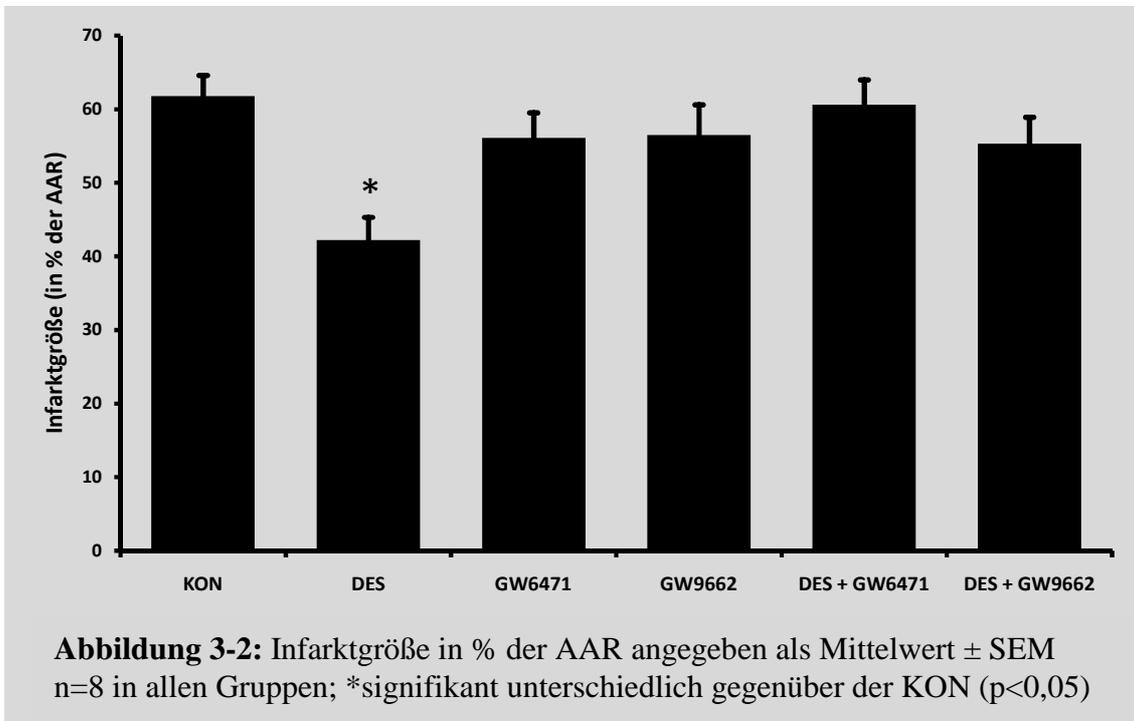
HF: Herzfrequenz

MAP: mittlerer arterieller Blutdruck

RPP: Produkt aus Herzfrequenz und MAP

3.1 Infarktgröße

Die Infarktgröße (siehe Abb.3-2) betrug $61,8 \pm 2,8\%$ in der Kontrollgruppe wobei sich durch die Applikation von Desfluran eine signifikante Reduktion zeigte ($42,2 \pm 3,1\%*$, $p < 0,05$). Dieser kardioprotektive Effekt wurde sowohl durch die vorangehende Gabe von GW6471, als auch GW9662 aufgehoben ($60,3 \pm 3,4\%$ bzw. $55,3 \pm 3,6\%$) wobei die alleinige Gabe des PPAR α -Antagonisten als auch des PPAR γ -Antagonisten keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe erbrachte ($56,1 \pm 4,1\%$ bzw. $56,5 \pm 3,4\%$). Die Tabelle 3-3 zeigt die gravimetrischen Daten der Versuche.

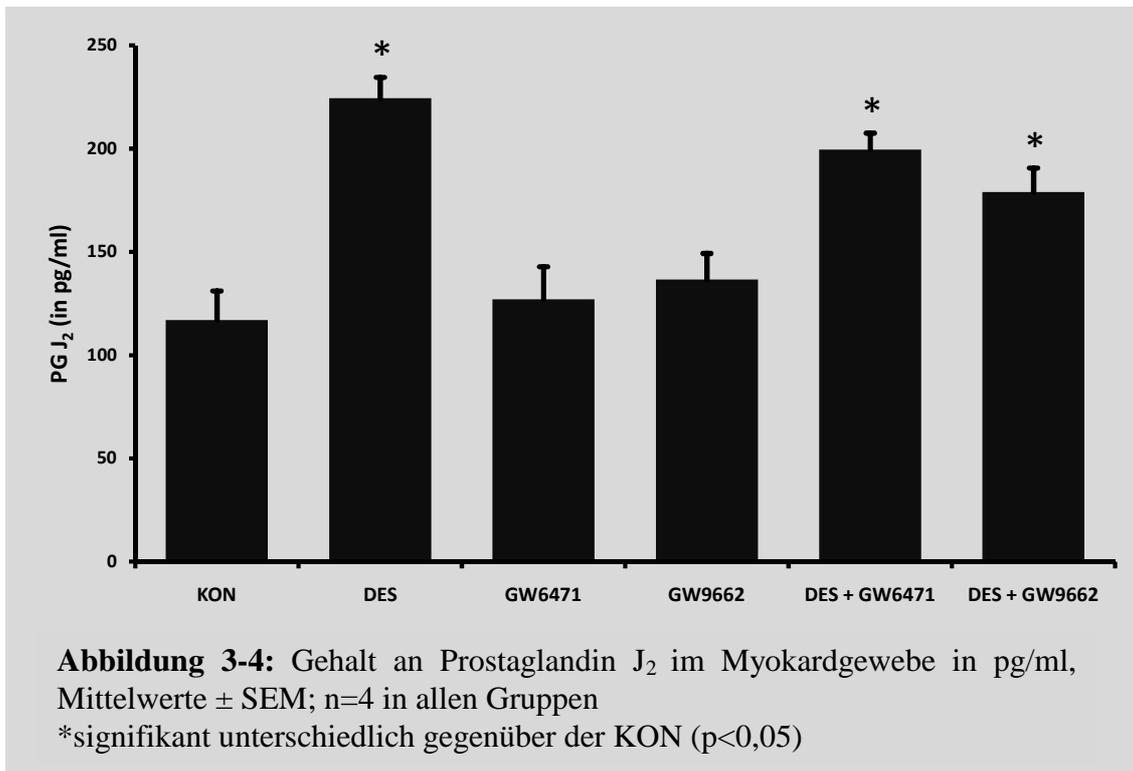


	n	AAR (%)	AAR (g)	LV (g)	KG (kg)
KON	8	38 \pm 3	1,20 \pm 0,12	3,21 \pm 0,15	2,5 \pm 0,1
DES	8	42 \pm 3	1,28 \pm 0,14	3,04 \pm 0,22	2,4 \pm 0,1
GW6471	8	36 \pm 4	0,99 \pm 0,08	2,76 \pm 0,11	2,4 \pm 0,1
GW9662	8	40 \pm 4	1,28 \pm 0,12	3,27 \pm 0,19	2,6 \pm 0,1
DES+GW6471	8	37 \pm 5	1,11 \pm 0,16	2,92 \pm 0,15	2,4 \pm 0,1
DES+GW9662	8	43 \pm 1	1,34 \pm 0,11	2,84 \pm 0,17	2,3 \pm 0,1

Tabelle 3-3: gravimetrische Daten angegeben als Mittelwert \pm SEM
AAR: area-at-risk, ischämisches Areal; angegeben in Prozent des linken Ventrikels und als absoluter Wert (g); LV: linker Ventrikel

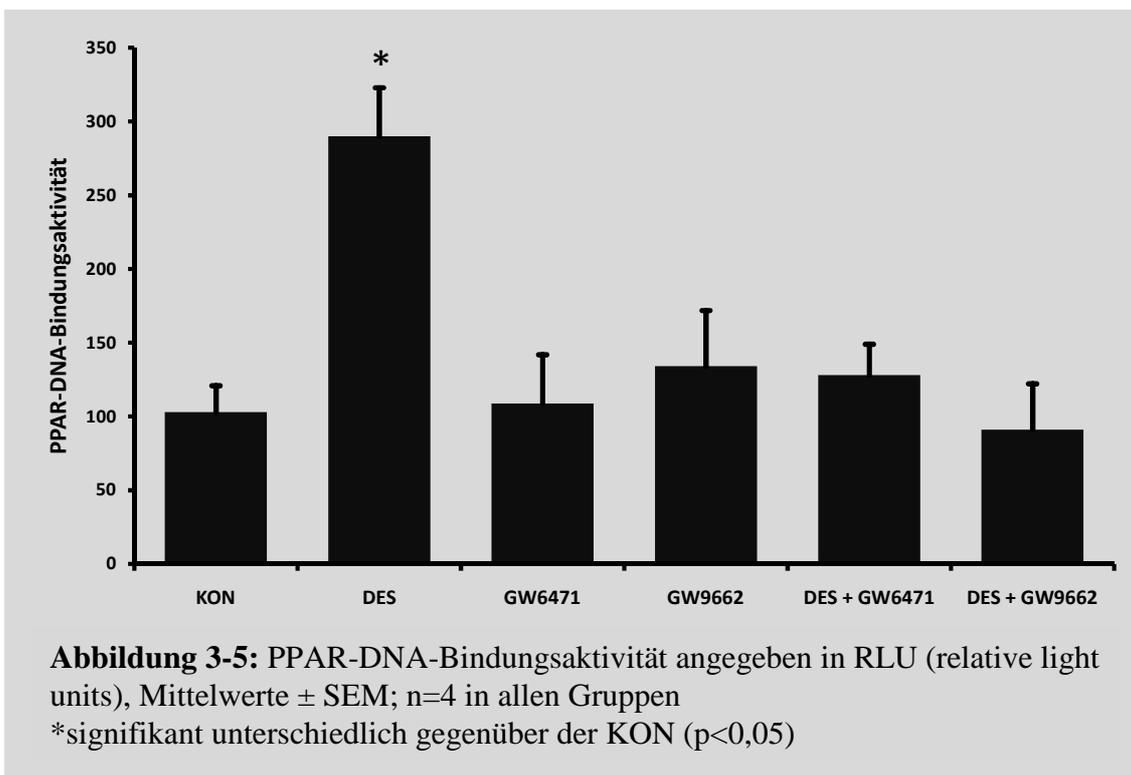
3.2 15d-Prostaglandin J₂

Die Applikation von Desfluran bewirkte einen signifikanten Anstieg der myokardialen Gewebespiegel von 15d-PGJ₂ (DES 224,4±10,2pg/ml* vs. KON 116,9±14,2pg/ml), ein Befund der sich auch bei kombinierter Gabe von Desfluran und GW6471, als auch GW9662 zeigte (DES+GW6471 199,5±8,1pg/ml* und 179±11,7pg/ml*). Die isolierte Verabreichung von GW6471 bzw. GW9662 erbrachte hingegen keine Veränderung der myokardialen Gewebespiegel von 15d-PGJ₂ (GW6471 127,1±15,8pg/ml und GW9662 136,6±12,7pg/ml, siehe Abb. 3-4).



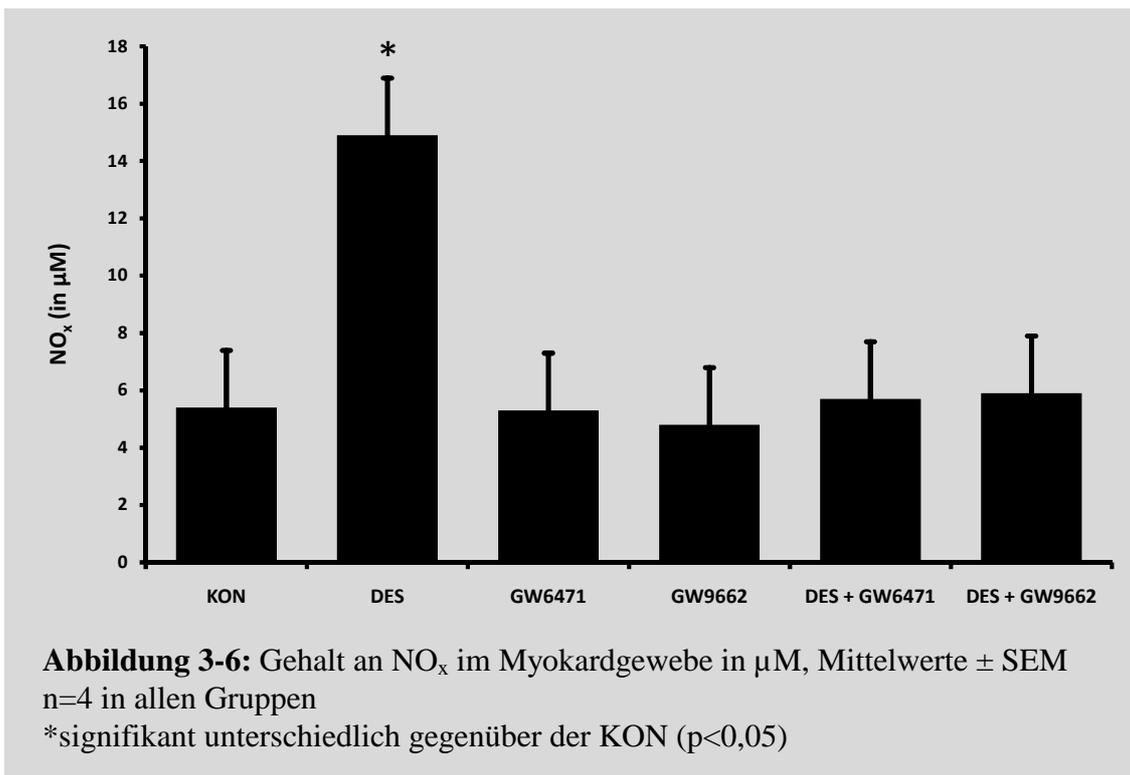
3.3 PPAR-DNA-Bindungsaktivität

Eine signifikant gesteigerte PPAR-DNA-Bindungsaktivität (siehe Abb. 3-5) war in den mit Desfluran vorbehandelten Tieren festzustellen (DES 289,9±33RLU* (relative light units) vs. KON 102,9±18RLU), wobei die durch Desfluran induzierte Steigerung der PPAR-DNA-Bindungsaktivität sowohl durch GW6471, als auch GW9662 aufgehoben (DES+GW6471 128,1±20,9RLU und DES+GW9662 91,2±31RLU) wurde. Die isolierte Applikation von GW6471 bzw. GW9662 zeigte hingegen keinen Einfluss auf die PPAR-DNA-Bindungsaktivität (GW6471 108,8±33RLU bzw. GW9662 134±37,9RLU).



3.4 NO_x

Die Konzentration von NO_x diente als Surrogatparameter der NO-Spiegel im Herzmuskelgewebe. Wie aus Abb. 3-6 ersichtlich erhöhte Desfluran den Gehalt an NO_x signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (DES 14,9±0,7μM* vs. KON 5,4±0,7μM). Diese durch das volatile Anästhetikum bewirkte Steigerung der myokardialen NO-Spiegel wurde durch die kombinierte Applikation von Desfluran und GW6471 bzw. GW9662 aufgehoben (DES+GW6471 5,7±0,3μM; DES+GW9662 5,9±0,9μM). Die alleinige Applikation des PPARα-Inhibitors GW6471 bzw. des PPARγ-Inhibitors GW9662 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den myokardialen Gehalt an NO_x (GW6471 5,3±0,5μM; GW9662 4,8±0,4μM).



4 Diskussion

Das zweite Fenster der APC bewirkt einen protektiven Effekt gegenüber einer ischämischen Schädigung des Herzens, sowohl *in-vivo*^{10;18} als auch am isoliert perfundierten Herzen^{33;36;78}. Dabei ist das Zusammenspiel verschiedener Signalwege und die hieraus resultierende *de-novo*-Synthese protektiver Proteine ein entscheidender Mechanismus⁷⁹.

4.1 Infarktgröße

Als primärer Endpunkt der Kardioprotektion diente in dieser Arbeit die Reduktion der nach I/R-Schädigung resultierenden Infarktgröße. Die beobachtete Infarktgrößenreduktion um etwa 20% der AAR nach Gabe von Desfluran entspricht den o. g. zuvor publizierten Studien, wobei sich in der Gegenüberstellung mit dem FWOP eine etwas geringere Reduktion der Infarktgröße ergab^{32;68}. Dies ist ein bekanntes Phänomen: Die Infarktgrößenreduktion beim SWOP ist im Vergleich zum FWOP geringer ausgeprägt, wobei das SWOP insgesamt eine höhere Reliabilität aufweist⁴.

Wichtige, zu beachtende potentielle Einflussfaktoren sind hierbei sowohl Alterationen in der systemischen Hämodynamik, die Existenz von Kollateralen⁸⁰ sowie die gewählte Hintergrundnarkose. Die Messungen der systemischen Hämodynamik ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen (siehe Tabelle 3-1), ebenso lagen keine signifikanten Größenunterschiede der AAR vor. Daher ist davon auszugehen dass die Hämodynamik keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße hatte. Betrachtet man die Kollateralversorgung, so ist bekannt dass Kaninchen nur über sehr spärlich ausgeprägte myokardiale Kollateralen verfügen⁸¹. Auch die notwendige Hintergrundnarkose mittels Pentobarbital in der von uns verwendeten Dosis von 30mg/kg KG hat nach Haessler *et al.* keinen Einfluß auf die Infarktgröße⁸². Daher ist davon auszugehen, dass alle drei der oben genannten Faktoren keine signifikanten Auswirkungen auf die Infarktgröße in der aktuellen Studie hatten, ohne allerdings die Kollateralversorgung oder den Einfluss von Pentobarbital direkt quantifiziert zu haben.

4.2 Signaltransduktion

Betrachtet man die im Rahmen der protektiven Antwort aktivierten Signalwege, so zeigte sich in Folge der Applikation von Desfluran eine gesteigerte PPAR-DNA-Bindungsaktivität, erhöhte myokardiale Gewebespiegel von 15d-PGJ₂ als auch von NO. Die Aktivierung von PPAR α und PPAR γ stellte sich ferner als ein essentieller Mechanismus in der Signaltransduktion des SWOP heraus, da durch die spezifische pharmakologische Blockade die protektiven Wirkungen außer Kraft gesetzt wurden. Dies zeigte sich im Ausmaß der resultierenden Infarktgröße sowohl für PPAR α als auch für PPAR γ .

4.2.1 Aktivierung der PPAR durch Desfluran

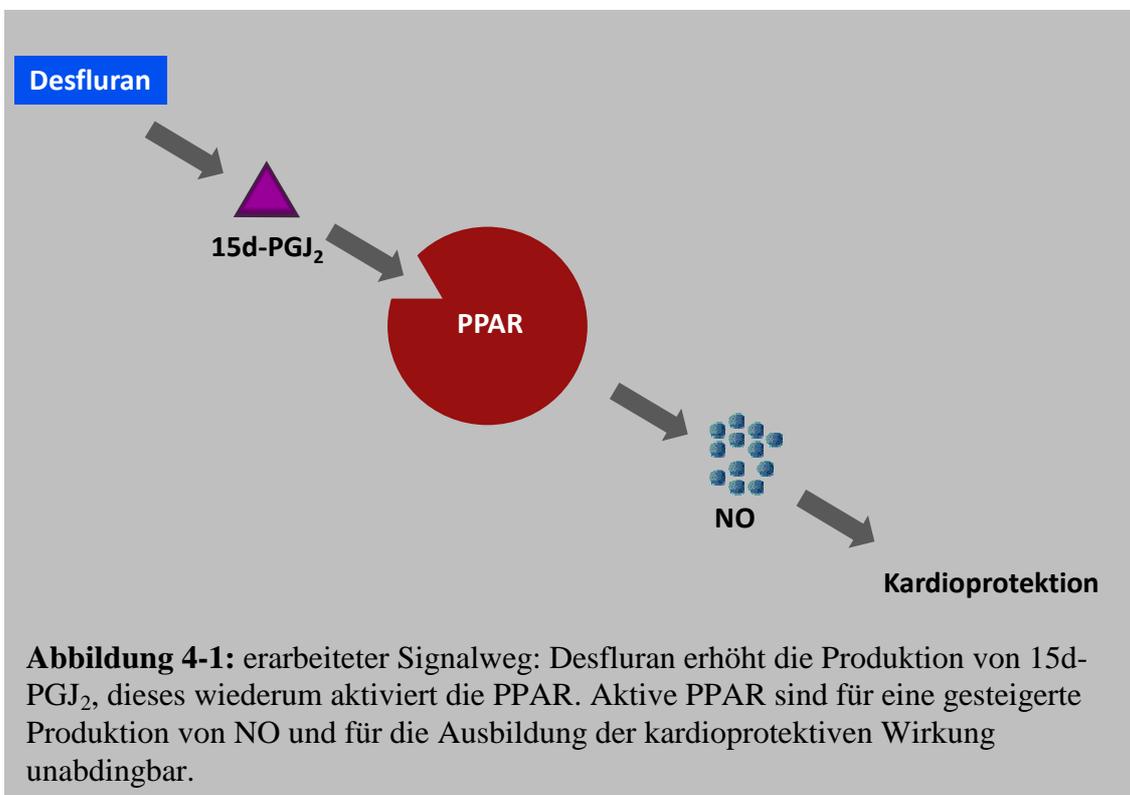
Die Aktivierung der PPAR durch volatile Anästhetika sowie deren Beteiligung am SWOP der APC ist ein bisher noch nicht beschriebenes Phänomen und ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Untersuchung. Eine Vielzahl an Studien konnte bereits kardioprotektive Effekte für endogene und exogene Agonisten des PPAR α und des PPAR γ demonstrieren^{24;62-66}. So bewirkte die Gabe der PPAR α -Agonisten Clofibrat als auch WY-14643 eine substantielle Infarktgrößenreduktion in der Ratte²⁴. Der gleiche Effekt war mit GW7647 (ebenfalls ein PPAR α -Agonist) in Mäusen zu erreichen⁶³. Kardioprotektive Wirkungen unter Beteiligung von PPAR γ zeigten sich nach Gabe von Thiazolidindionen²⁵ als auch in der Signaltransduktion des FWOP und SWOP der Endotoxin-induzierten Präkonditionierung^{83;84}. Des Weiteren wurde erst vor kurzem für einen Agonisten der PPAR β -Isoform eine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen⁸⁵. Die hier durch Desfluran bewirkte Steigerung der PPAR-Aktivität um das ~3fache, verbunden mit einer Reduktion der myokardialen Infarktgröße ist daher in den aktuellen Stand der Forschung hervorragend integrierbar und unterstreicht die wichtige Stellung von PPAR α als auch von PPAR γ in der kardioprotektiven Signaltransduktionskette. Einschränkend muss allerdings hinzugefügt werden, dass der zur Messung der PPAR-DNA-Bindungsaktivität eingesetzte Assay keine differenzierte Analyse zwischen der α - und γ -Isoform erlaubt. Weiterhin kann bei einem *in-vivo* Versuch eine unspezifische

Wirkung der verwendeten Antagonisten nie sicher ausgeschlossen werden. Unterstützt werden unsere Ergebnisse allerdings durch die effektive Blockade der PPAR-DNA-Bindung nach Applikation der Inhibitoren sowie durch die zuvor gezeigte spezifische Selektivität der verwendeten Pharmaka^{86;87}.

4.2.2 Signaltransduktion proximal von PPAR

Die Aktivierung der PPAR erfolgt in der Hauptsache durch endogene Liganden, wobei der gesteigerten Produktion von Fettsäuren⁶¹ als auch des Eicosanoids 15d-PGJ₂ entscheidende Bedeutung zukommt^{21;22}. Für Eicosanoide ist hierbei eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Präkonditionierung beschrieben: Durch eine Blockade der COX-2 – das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Prostaglandinsynthese – wird das SWOP der APC und der IPC aufgehoben^{16;18}. Wayman *et al.* konnten erstmals eine Infarktgrößenreduktion durch 15d-PGJ₂ demonstrieren. Dabei wurde auch die Aktivierung von PPAR α und PPAR γ als möglicher Wirkmechanismus diskutiert²⁴. Allerdings zeigten Zingarelli *et al.*, dass die durch 15d-PGJ₂ ausgelöste Kardioprotektion nicht durch GW9662 aufgehoben werden konnte – im Gegensatz zur Protektion durch Ciglitazon, dessen Protektion vollständig durch GW9662 außer Kraft gesetzt wurde²⁵. Die in der aktuellen Arbeit parallel zur gesteigerten PPAR-DNA-Bindungsaktivität erhöhten Gewebespiegel von 15d-PGJ₂ legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung der PPAR indirekt durch eine gesteigerte Produktion des endogenen Liganden 15d-PGJ₂ erfolgte (siehe Abbildung 10). Eine Rolle für das Eicosanoid in der Signalkaskade oberhalb der PPARs wird auch durch die Tatsache bekräftigt dass die nach der Gabe von Desfluran gesteigerten 15d-PGJ₂ Spiegel auch unter der Blockade von PPAR α oder PPAR γ erhöht blieben. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Zingarelli *et al.* lassen sich insbesondere durch die Verwendung unterschiedlicher methodischer Ansätze erklären: Zingarelli verwendete ein Rattenmodell, wobei die Schädigung nach I/R lediglich durch eine Schädigungsskala (engl.: damage score), die Plasma-CK und die Myeloperoxidase-Aktivität bestimmt wurde. Weiterhin applizierte Zingarelli die verwendeten Pharmaka erst zu Beginn der Reperfusion. Aufgrund dieser methodischen Diskrepanzen lassen sich die Rückschlüsse auf die Signaltransduktion

daher nur eingeschränkt vergleichen. Kritisch muss allerdings hinzugefügt werden, dass 15d-PGJ₂ durch einen charakteristischen ungesättigten α,β -Carbonylrest potentiell in der Lage ist elektrophile als auch pro-oxidative Wirkungen zu entfalten. Daher könnte das Eicosanoid durch kovalente Bindung an Cystein-Thiole den zellulären Redoxstatus beeinflussen⁸⁸. Allerdings ist bekannt, dass in der Tat die Mehrzahl der durch 15d-PGJ₂ bewirkten zellulären Ereignisse durch die Aktivierung der PPAR zustande kommt⁸⁹.



4.2.3 Signaltransduktion distal von PPAR

Die Frage nach einem möglichen Effektor in der durch PPAR α und PPAR γ regulierten Signaltransduktionskette bedarf einer differenzierten Betrachtung. Die hier untersuchten molekularen Änderungen sind Ausdruck eines defensiven Phänotyps der Kardiomyozyten, wobei insbesondere NO unbestritten als ein wichtiger Mediator der späten Präkonditionierung agiert^{15;32} (siehe auch Absatz 1.1.2.2). Eine erhöhte Verfügbarkeit von NO zeigte sich auch in der aktuellen Untersuchung in Folge der Desfluranapplikation nach direkter Messung der NO-Abbauprodukte. Dieses Phänomen unterlag wiederum der Regulation durch PPAR α als auch PPAR γ , nachgewiesen durch das Ausbleiben der Konzentrationserhöhung des protektiven Mediators nach pharmakologischer Blockade beider Rezeptoren.

Zieht man nun einerseits in Betracht, dass die PPAR ihre Effekte im Sinne einer transkriptionellen Regulation vermitteln, sowie andererseits NO physiologisch durch die Aktivierung von NO-Synthasen gebildet wird, so scheint ein transkriptioneller Mechanismus als sehr wahrscheinlich. In Bezug auf die zeitliche Koordinierung der Inhibitorgabe lässt sich beobachten, dass bereits eine 15 bzw. 30minütige PPAR-Blockade ausreichte, um den NO-Spiegel auf Kontrollniveau absinken zu lassen. Dies ist vereinbar mit dem Konzept der Notwendigkeit einer optimalen Steuerbarkeit der protektiven Signalkaskaden, sowohl durch die rasche Regulation der Mediatorsynthese als auch durch rapide Degradation⁹⁰. So konnten Veränderungen in der iNOS Transkription bereits nach ca. 20 Minuten nachgewiesen werden⁹¹. Daher ist ein transkriptioneller Wirkmechanismus sehr gut vorstellbar. Allerdings existieren auch eine Reihe nicht-genomischer Effekte der PPAR wie beispielsweise eine Interaktion mit der PKC⁹², die ebenso eine wichtige Rolle bei der Präkonditionierung spielt⁴⁷.

Hierbei kann die nicht-enzymatische Bildung von NO unter hypoxischen Bedingungen (d.h. direkt aus Nitrit⁹³) als Ursache des erhöhten NO-Spiegels ausgeschlossen werden, da die Versuchstiere für die biochemischen Bestimmungen zu keiner Zeit einem hypoxischen Zustand ausgesetzt waren.

Die Frage, ob die eNOS oder die iNOS an der erhöhten NO-Synthese beteiligt ist, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten. In der aktuellen Literatur finden sich widersprüchliche Hinweise: Eine Studie von Bulhak *et al.*⁶⁴ demonstrierte eine erhöhte Expression der eNOS nach Gabe eines PPAR α -Agonisten, ein Befund den Gonon *et al.* ebenso für PPAR γ -Agonisten aufzeigten⁶⁶. Darüber hinaus konnte im Mausmodell nach der Gabe von Pioglitazon eine erhöhte Phosphorylierungsrate der eNOS gefunden werden⁹⁴ – ein Effekt der ähnlich im Rahmen der APC unter der Beihilfe des PI3K/Akt- und des ERK1/2-Weges auftritt⁹⁵. Auf der anderen Seite existieren viele Studien, die die iNOS als Mediator des SWOP der APC identifizieren konnten: Wakeno-Takahashi *et al.* zeigten einen erhöhten iNOS-Proteinspiegel sowie eine erhöhte iNOS-Aktivität während des Isofluran-induzierten SWOP³⁶ und Chen *et al.* demonstrierten einen erhöhten iNOS-Proteinspiegel 24h nach Isofluraninhalation⁹⁶.

4.3 Klinische Relevanz

Das logische Ziel, das sich letztendlich nicht nur aus den in der aktuellen Arbeit erzielten Ergebnissen, sondern auch aus anderen Studien mit volatilen Anästhetika ergibt, ist die Translation dieser z.T. verblüffenden präkonditionierenden Effekte in die klinische Praxis. Diese konnte bisher – mit Ausnahme kleinerer klinischer Studien – noch nicht gelingen. Allerdings zeigte sich insbesondere bei kardiochirurgischen Eingriffen ein positiver Effekt der volatilen Anästhetika⁹⁷⁻⁹⁹. So war der postoperative Aufenthalt auf der Intensivstation nach herzchirurgischen Eingriffen unter Narkose mit Sevofluran oder Desfluran im direkten Vergleich zu Patienten, die Propofol als Narkotikum erhielten, verkürzt. Ebenso zeigten sich in der gleichen Studie ein erniedrigtes postoperatives Troponin I, sowie eine kürzere Applikationsdauer von positiv inotrop-wirksamen Substanzen⁹⁷. In einer weiteren Arbeit von Meco *et al.* mit dem Endpunkt der linksventrikulären Funktion vor und nach ACVB-Operation ergab sich für Patienten, die vor Induktion der Kardioplegie für 5 Minuten 2,5 MAC Desfluran erhielten, sowohl nach 12 als auch 72 Stunden postoperativ eine bessere diastolische und systolische Funktion⁹⁸. Auch Garcia *et al.* konnten 2005 ein positives

kardiovaskuläres 1-Jahres-Outcome für Patienten zeigen, die während einer ACVB-Operation mit 4 Vol% Sevofluran für 10 Minuten präkonditioniert wurden⁹⁹. Einschränkend muss in Bezug auf die limitierten klinischen Ergebnisse hinzugefügt werden, dass die meisten Patienten, die von der Präkonditionierung profitieren könnten, in fortgeschrittenem Alter sind und an Vorerkrankungen leiden, wobei eindeutige Ergebnisse in Tierversuchen aufzeigen, dass der präkonditionierende Effekt mit dem Alter abnimmt^{100;101} und dass chronische Erkrankungen, z. B. Diabetes mellitus, die Protektion negativ beeinflussen¹⁰².

5 Zusammenfassung

Der perioperative Myokardinfarkt ist eine der Hauptursachen perioperativer Morbidität und Mortalität¹⁰³, wobei bis zu 40% der Patienten an einem akuten Ereignis versterben¹⁰⁴. Eine der Hauptaufgaben der anästhesiologischen Forschung besteht daher in der Entwicklung neuer, verbesserter Strategien sowohl in der Erkennung und Prophylaxe als auch in der Therapie perioperativer Myokardischämien. In einer wegweisenden Studie zeigten Kersten *et al.* 1997 erstmals einen kardioprotektiven Effekt für volatile Anästhetika: Die Verabreichung von Isofluran vor der Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) führte zu einer signifikanten Reduktion der resultierenden Infarktgröße⁶. Diese kardioprotektiven Eigenschaften wurden in der Folge auch für andere volatile Anästhetika aufgezeigt, ebenso wie die Induktion eines zweiten Fensters der Präkonditionierung (SWOP) beginnend 24h post-donum. Essentielle molekulare Mechanismen der protektiven Signalkaskade sind hierbei u.a. eine gesteigerte Synthese von Prostaglandinen sowie die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Vergleichbare NO-abhängige, kardioprotektive Wirkungen zeigen sich ebenso für Agonisten der Peroxysomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) α und γ . Die PPAR sind Transkriptionsfaktoren, die nach Liganden-vermittelter Aktivierung (u.a. 15d-Prostaglandin J₂, 15d-PGJ₂) ihre Wirkungen entfalten. Daher testeten wir die Hypothese, dass das zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung durch eine erhöhte Produktion von 15d-PGJ₂ mit der nachfolgenden Aktivierung von PPAR α und γ vermittelt wird.

Die Experimente wurden in einem etablierten *in-vivo* Herzinfarktmodell des Kaninchens durchgeführt. Männliche weiße Neuseeland-Kaninchen wurden randomisiert 6 Gruppen zugeteilt. Alle Tiere erhielten eine 30-minütige Okklusion der linken Koronararterie (KAO) gefolgt von einer 3-stündigen Reperfusion. Zwei Gruppen erhielten entweder Desfluran (1.0 MAC, DES) oder Raumluft (Kontrolle, KON) 24h vor KAO. In weiteren Gruppen erhielten die Tiere den PPAR α -Antagonisten GW6471 oder den PPAR γ -Antagonisten GW9662, jeweils alleine (GW6471 bzw. GW9662) oder in Kombination mit vorheriger Desfluranapplikation (DES+GW6471 bzw. DES+GW9662). Die

Infarktgröße (IS/AAR) wurde nach Bestimmung des Ischämieareals (AAR) und des Infarktareals (IS) gravimetrisch nach TTC-Färbung ermittelt. Sechs identische Gruppen wurden instrumentiert zur Entnahme des Herzens und anschließender Analyse der PPAR-DNA-Bindungsaktivität sowie der Gewebekonzentrationen von 15d-PGJ₂ und NO mittels spezifischer Assays.

Als Ergebnis zeigte sich eine signifikant reduzierte Herzinfarktgröße (DES 42,2±3,1%* vs. KON 61,8±2,8%; *p<0,05) 24h nach der Applikation des volatilen Anästhetikums. Dieser kardioprotektive Phänotyp war begleitet von einer erhöhten PPAR-DNA-Bindungsaktivität (DES 289,9±33RLU* vs. KON 102,9±18RLU, *p<0,05), als auch erhöhten Gewebekonzentrationen von 15d-PGJ₂ (DES 224,4±10,2pg/ml* vs. KON 116,9±14,2pg/ml) und NO (DES 14,9±0,7µM* vs. KON 5,4±0,7µM). Unter spezifischer pharmakologischer Blockade von PPAR α oder PPAR γ kam es zum Verlust dieser protektiven Effekte, wobei sowohl die Infarktgrößenreduktion (DES+GW6471 60,0±2,8% bzw. DES+GW9662 56,5±2,9%), als auch die Elevation der PPAR-DNA-Bindungsaktivität (DES+GW6471 128,1±20,9RLU bzw. DES+GW9662 91,2±31RLU) und der myokardialen NO Konzentrationen (DES+GW6471 5,7±0,3µM bzw. DES+GW9662 5,9±0,9µM) aufgehoben wurde. Unbeeinflusst von der Blockade der PPAR blieb der durch Desfluran erhöhte 15d-PGJ₂-Spiegel (DES+GW6471 199,5±8,1pg/ml* und DES+GW9662 179,0±11,7pg/ml*; p<0,05 vs. KON).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung durch die Aktivierung der PPAR α und γ vermittelt wird. Die Applikation von Desfluran scheint hierbei durch die erhöhte Produktion von 15d-PGJ₂ eine Signalkaskade in Gang zu setzen, welche nicht nur in der Aktivierung von PPAR α und PPAR γ resultiert, sondern ebenso durch die konsekutiv erhöhte myokardiale Verfügbarkeit von NO die Kardioprotektion vermittelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J: Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update. A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2009;
2. Mangano DT: Perioperative cardiac morbidity--epidemiology, costs, problems, and solutions. *West J.Med.* 1994; 161: 87-9
3. Eisenmenger M., Pötsch, O, and Sommer, B. Bevölkerung Deutschlands bis 2050 - 11- koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. 2006. Statistisches Bundesamt.
4. Bolli R: The late phase of preconditioning. *Circ.Res.* 2000; 87: 972-83
5. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36
6. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-70
7. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999; 91: 1437-46

8. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000; 92: 1731-9
9. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM: Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res.Cardiol.* 1997; 92: 159-67
10. Smul TM, Redel A, Stumpner J, Lange M, Lotz C, Roewer N, Kehl F: Time Course of Desflurane-induced Preconditioning in Rabbits. *J.CardiThorac.Vasc.Anesth.* 2009;
11. Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul.Pharmacol.* 2005; 42: 243-52
12. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, Takano H, Jadoon AK, Wu WJ, Bolli R: Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am.J.Physiol* 1997; 273: H2931-H2936
13. Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y, Jadoon AK: Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ.Res.* 1997; 81: 42-52
14. Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF, Bolli R: Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J.Clin.Invest* 1996; 97: 562-76
15. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R: Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 98: 441-9
16. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R: Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late

- phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000; 97: 10197-202
17. Alcindor D, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR:
Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic
preconditioning in vivo. *Anesthesiology* 2004; 100: 547-54
 18. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, Alcindor D, Pratt PF, Kersten JR,
Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane produces delayed preconditioning against
myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2.
Anesthesiology 2004; 100: 525-31
 19. Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of
prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol.Rev.* 2004; 56: 387-437
 20. Jenkins CM, Cedars A, Gross RW: Eicosanoid signalling pathways in the heart.
Cardiovasc.Res. 2009; 82: 240-9
 21. Uchida K, Shibata T: 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic
trigger of cellular responses. *Chem.Res.Toxicol.* 2008; 21: 138-44
 22. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A
prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor
gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-9
 23. Kawamoto Y, Nakamura Y, Naito Y, Torii Y, Kumagai T, Osawa T, Ohigashi
H, Satoh K, Imagawa M, Uchida K: Cyclopentenone prostaglandins as potential
inducers of phase II detoxification enzymes. 15-deoxy-delta(12,14)-
prostaglandin j2-induced expression of glutathione S-transferases. *J.Biol.Chem.*
2000; 275: 11291-9
 24. Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Pisano B,
Chatterjee PK, Thiemermann C: Ligands of the peroxisome proliferator-

- activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J.* 2002; 16: 1027-40
25. Zingarelli B, Hake PW, Mangeshkar P, O'Connor M, Burroughs TJ, Piraino G, Denenberg A, Wong HR: Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, in reperfusion injury: role of nuclear factor-kappaB, heat shock factor 1, and Akt. *Shock* 2007; 28: 554-63
26. Garg TK, Chang JY: 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2 prevents reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane depolarization induced by oxidative stress. *BMC.Pharmacol.* 2004; 4: 6
27. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31
28. Li H, Forstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J.Pathol.* 2000; 190: 244-54
29. Brahmajothi MV, Campbell DL: Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ.Res.* 1999; 85: 575-87
30. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U: Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol.Chem.* 2003; 384: 1343-64
31. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW: Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci.* 2009; 14: 4436-43
32. Smul TM, Lange M, Redel A, Burkhard N, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide. *Anesthesiology* 2006; 105: 719-25

33. Shi Y, Hutchins WC, Su J, Siker D, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Keszler A, Tweddell JS, Baker JE: Delayed cardioprotection with isoflurane: role of reactive oxygen and nitrogen. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005; 288: H175-H184
34. Bolli R: Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2001; 33: 1897-918
35. Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, Krolikowski JG, Kersten JR, Wartier DC, Pagel PS: Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium. *Anesthesiology* 2005; 103: 74-83
36. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Imamura H, Shingu K: Isoflurane induces second window of preconditioning through upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005; 289: H2585-H2591
37. Schulz R, Kelm M, Heusch G: Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* 2004; 61: 402-13
38. Mannick JB, Schonhoff CM: NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic.Res.* 2004; 38: 1-7
39. Sun J, Murphy E: Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ.Res.* 2010; 106: 285-96
40. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefter DJ, Gladwin MT: Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J.Exp.Med.* 2007; 204: 2089-102

41. Zhang J, Jin B, Li L, Block ER, Patel JM: Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C840-C849
42. Sun J, Morgan M, Shen RF, Steenbergen C, Murphy E: Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ.Res.* 2007; 101: 1155-63
43. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M: Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2005; 38: 163-74
44. Tao L, Gao E, Bryan NS, Qu Y, Liu HR, Hu A, Christopher TA, Lopez BL, Yodoi J, Koch WJ, Feelisch M, Ma XL: Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion: role of S-nitrosation [corrected]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101: 11471-6
45. Hausenloy DJ, Yellon DM: The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2010; 24: 235-54
46. Krolkowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS: Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesth.Analg.* 2005; 101: 1590-6
47. Pravdic D, Sedlic F, Mio Y, Vladic N, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ: Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology* 2009; 111: 267-74
48. Halestrap AP: A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem.Soc.Trans.* 2010; 38: 841-60

49. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137: 354-66
50. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B: Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 2001; 142: 4195-202
51. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA: Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 1440-4
52. Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N, Green S: PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993; 192: 37-45
53. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W: Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol.Cell* 1993; 77: 67-76
54. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B: Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 31012-8
55. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J: Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J.Clin.Invest* 1995; 96: 741-50

56. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J: Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 13470-5
57. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 1996; 15: 5336-48
58. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM: PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol.Cell Biol.* 1995; 15: 351-7
59. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR: PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J.Clin.Invest* 1998; 101: 22-32
60. Delerive P, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J.Endocrinol.* 2001; 169: 453-9
61. Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr.Rev.* 1999; 20: 649-88
62. Yue TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Bril A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH: In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 2001; 104: 2588-94
63. Yue TL, Bao W, Jucker BM, Gu JL, Romanic AM, Brown PJ, Cui J, Thudium DT, Boyce R, Burns-Kurtis CL, Mirabile RC, Aravindhan K, Ohlstein EH:

- Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 2393-9
64. Bulhak AA, Sjoquist PO, Xu CB, Edvinsson L, Pernow J: Protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury by PPAR- α activation is related to production of nitric oxide and endothelin-1. *Basic Res.Cardiol.* 2006; 101: 244-52
65. Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, Lundberg JO, Sjoquist PO, Pernow J: PPAR- α activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009; 296: H719-H727
66. Gonon AT, Bulhak A, Labruto F, Sjoquist PO, Pernow J: Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in relation to nitric oxide. *Basic Res.Cardiol.* 2007; 102: 80-9
67. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 32048-54
68. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, Redel A, Klotz KN, Roewer N, Kehl F: Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* 2006; 105: 503-10
69. Doorley BM, Waters SJ, Terrell RC, Robinson JL: MAC of I-653 in beagle dogs and New Zealand white rabbits. *Anesthesiology* 1988; 69: 89-91

70. Walther OE, Riedel W, Iriki M, Simon E: Differentiation of sympathetic activity at the spinal level in response to central cold stimulation. *Pflugers Arch.* 1971; 329: 220-30
71. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W: Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am.Heart J.* 1981; 101: 593-600
72. Cargnoni A, Tiberio L, Martina P, Ardesi R, Schiaffonati L, Ferrari R: A Sample-saving preparation to extract DNA-binding proteins from cardiac and vascular tissues. *Lab Invest* 2002; 82: 667-9
73. Desnoyers S, Kaufmann SH, Poirier GG: Alteration of the nucleolar localization of poly(ADP-ribose) polymerase upon treatment with transcription inhibitors. *Exp.Cell Res.* 1996; 227: 146-53
74. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72: 248-54
75. Kricka LJ: Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin.Chem.* 1991; 37: 1472-81
76. Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993; 7: 349-60
77. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* 1982; 126: 131-8
78. Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE: Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K(ATP) channels. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002; 283: H61-H68

79. Rizvi A, Tang XL, Qiu Y, Xuan YT, Takano H, Jadoon AK, Bolli R: Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am.J.Physiol* 1999; 277: H874-H884
80. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM: Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am.J.Physiol* 1994; 267: H2383-H2390
81. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM: 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.* 1987; 21: 737-46
82. Haessler R, Kuzume K, Chien GL, Wolff RA, Davis RF, Van Winkle DM: Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc.Res.* 1994; 28: 1574-80
83. Collin M, Murch O, Thiernemann C: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonists GW9662 and T0070907 reduce the protective effects of lipopolysaccharide preconditioning against organ failure caused by endotoxemia. *Crit Care Med.* 2006; 34: 1131-8
84. Sivarajah A, McDonald MC, Thiernemann C: The cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia, are abolished by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2005; 313: 896-901
85. Kapoor A, Collino M, Castiglia S, Fantozzi R, Thiernemann C: Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-beta/delta attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. *Shock* 2009;

86. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB: Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 2002; 415: 813-7
87. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG: Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 2002; 41: 6640-50
88. Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K: Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 12076-83
89. Kim EH, Surh YJ: 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem.Pharmacol.* 2006; 72: 1516-28
90. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu.Rev.Biochem.* 1992; 61: 761-807
91. Liu SF, Barnes PJ, Evans TW: Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo. *Crit Care Med.* 1997; 25: 512-8
92. Ali FY, Armstrong PC, Dhanji AR, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA, Warner TD: Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2009; 29: 706-11
93. Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P: Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim.Biophys.Acta* 1999; 1411: 250-62

94. Ye Y, Lin Y, Manickavasagam S, Perez-Polo JR, Tieu BC, Birnbaum Y: Pioglitazone protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury in eNOS and iNOS knockout mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; 295: H2436-H2446
95. Krolkowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS: Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can.J.Anaesth.* 2006; 53: 174-82
96. Chen CH, Chuang JH, Liu K, Chan JY: Nitric oxide triggers delayed anesthetic preconditioning-induced cardiac protection via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of inducible nitric oxide synthase. *Shock* 2008; 30: 241-9
97. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2004; 101: 9-20
98. Meco M, Cirri S, Gallazzi C, Magnani G, Cosseta D: Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 2007; 32: 319-25
99. Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br.J.Anaesth.* 2005; 94: 159-65
100. Sniecinski R, Liu H: Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology* 2004; 100: 589-97

101. Nguyen LT, Rebecchi MJ, Moore LC, Glass PS, Brink PR, Liu L: Attenuation of isoflurane-induced preconditioning and reactive oxygen species production in the senescent rat heart. *Anesth.Analg.* 2008; 107: 776-82
102. Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002; 282: H2018-H2023
103. Mangano DT: Perioperative cardiac morbidity. *Anesthesiology* 1990; 72: 153-84
104. Lee TH, Marcantonio ER, Mangione CM, Thomas EJ, Polanczyk CA, Cook EF, Sugarbaker DJ, Donaldson MC, Poss R, Ho KK, Ludwig LE, Pedan A, Goldman L: Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation* 1999; 100: 1043-9

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:

Stumpner, J.:

Desfluran induziert ein erstes und ein zweites Fenster der Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt in vivo (2008)

URN: [urn:nbn:de:bvb:20-opus-27263](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bvb:20-opus-27263)

URL: <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2008/2726/>

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. M. Lange für die Überlassung des Themas bedanken. Dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Professor Dr. med. N. Roewer, gilt ebenso mein Dank. Seine Förderung der Grundlagenforschung in der Anästhesiologie hat diese Arbeit ermöglicht.

Herrn Professor Dr. med. D. Drenckhahn danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und ganz besonders für die weitere Führung auf dem Weg der Wissenschaft.

Ein herzlicher Dank gebührt meinem Betreuer Dr. med. Christopher Lotz. Durch seine Unterstützung erfuhr ich Ehrgeiz, Kreativität und Freude an der wissenschaftlichen Tätigkeit.

Dieser Dank gilt auch allen Mitgliedern der AG Organprotektion. Das kollegiale Miteinander und die wechselseitige Unterstützung von Doktoranden und Betreuern stellt für mich eine wesentliche Grundlage für den wissenschaftlichen Erfolg dar. Namentlich erwähnen möchte ich an dieser Stelle meine Mitdoktoranden Verena Schnupp und Tobias Tischer-Zeitz sowie Dr. med. Jan Stumpner. Herzlichen Dank für die konstruktiven Gespräche und die angenehme, produktive Atmosphäre im Labor.

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern - ihre Unterstützung in jeder Hinsicht hat mir mein Studium und damit diese Promotion ermöglicht. Ich bin Ihnen zutiefst dankbar. Dies gilt ebenso meinen Geschwistern Katharina, Ulrich und Friederike. Die Gewißheit, immer auf ein offenes Ohr und offene Arme zu stoßen, wird viel zu selten verbalisiert, erhöht aber die Stresstoleranz ganz wesentlich. Dafür ebenso meine tiefe Dankbarkeit und Verbundenheit.

Und zu guter Letzt meine liebste Charlotte! Vielen Dank, dass Du immer für mich da bist. Hier erscheinst Du zwar als Schlusslicht, Du stehst aber immer an meiner ersten Stelle!

Curriculum Vitae

Johannes Schmidt

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	18. September 1981
Geburtsort	Basel - CH
Staatszugehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

06/2001	Abitur Hochrhein-Gymnasium, Waldshut
04/2003 - 07/2009	Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2005	Physikum
06.11.2009	Staatsexamen
12.11.2009	Approbation

Berufstätigkeit

seit 16.11.2009	wissenschaftlicher Assistent Institut für Anatomie und Zellbiologie Lehrstuhl II - Vorstand: Prof. Dr. D. Drenckhahn Universität Würzburg
-----------------	--

Würzburg, den 09. März 2011

Johannes Schmidt

